

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510063

研究課題名(和文)がん幹細胞の放射線耐性の克服

研究課題名(英文)Eradication of radioresistant cancer stem cells by inhibiting the AKT survival signaling pathway.

研究代表者

志村 勉 (Shimura, Tsutomu)

国立保健医療科学院・その他部局等・その他

研究者番号：40463799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は均一な集団ではなく、自己複製能と腫瘍形成能を併せ持つ細胞群、がん幹細胞が存在する。がん幹細胞は放射線に耐性を示し、治療後のがんの再発の原因となる。我々は、ヒト肝がん細胞株HepG2を分割照射し、放射線耐性のがん幹細胞を濃縮した。このがん幹細胞は、5GyのX線照射で細胞の生存シグナルAKTが活性化され、細胞死は誘導されなかった。一方、親株HepG2細胞では、同様の照射で細胞死が誘導された。がん幹細胞のAKTの活性化が放射線耐性に関与するかどうかを検討し、AKT阻害剤と放射線の併用で、がん幹細胞の放射線耐性は抑制されることを *in vitro* と *in vivo* 両方の解析で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Radioresistance, which is a major cause of failure of radiotherapy (RT), is proposed as one of the intrinsic characteristics of cancer stem cells (CSCs) whose unique DNA damage response (DDR), efficient DNA repair and resistance to apoptosis are thought to confer the phenotype. We have isolated surviving CSCs by exposure to long-term fractionated radiation for 82 days from HepG2 cells (82FR-31NR cells). 82FR-31NR cells exhibited CSC properties, such as high expression of CSC marker CD133 and the ABC transporters (MDR1 and BCRP1), and high tumorigenic potential after transplantation into nude mice. 82FR-31NR cells showed efficient DNA repair of radiation-induced DNA damage and radioresistance with activation of the AKT signaling pathway. Therefore, inhibition of the AKT pathway by an AKT inhibitor, resulted in radiosensitization of 82FR-31NR cells. Combination of fractionated RT and reagents targeting the AKT pathway to eradicate CSCs would be effective therapeutic modality.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 がん

1. 研究開始当初の背景

日本人における死因の第1位はがんである。がん征圧のための研究推進がなされているが、がんに対する決定打となる治療法はいまだに確立されていない。放射線療法は、腫瘍に線量を集めるため、全身への負担が小さく、臓器の形態と機能温存性に優れている。しかし、放射線治療における最大の難問は放射線抵抗性のがん細胞の存在である。腫瘍組織を構成するがん細胞は均一な集団ではなく、自己複製能と腫瘍形成能を併せ持つ細胞群、がん幹細胞が存在すると想定されている。がん幹細胞は優れたDNA修復能と細胞死抵抗性を備え、放射線や抗がん剤に耐性を示す。このため、放射線療法や化学療法後に生き残ったがん幹細胞は再び増殖し、がんの再発の原因となると考えられている(図1)。

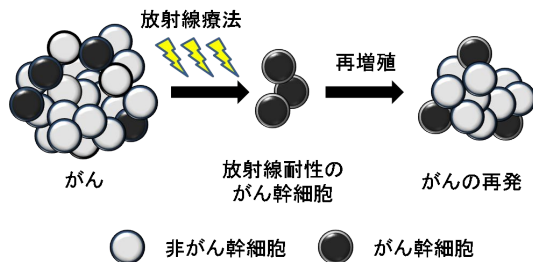


図1 がんの再発の原因となるがん幹細胞の放射線耐性

近年、がん幹細胞を標的としたがん治療法の確立に向けた研究が注目を集めている。がん幹細胞は細胞表面マーカーCD133の抗体を用いて分離される。この方法で分離したがん幹細胞は、通常の血清を含む培養液では自己複製能を失い分化するため、増殖因子を加えた無血清の培養液を用いて培養される。親株細胞とがん幹細胞では、使用する培養液が異なることから、培養液の影響を受けずに両者の放射線応答を比較することはこれまで困難であった。

2. 研究の目的

我々はヒトがん細胞株を用いて従来の抗体法ではなくX線を繰り返し照射し、非がん幹細胞を死滅させ、放射線耐性のがん幹細胞の濃縮を試みた。濃縮したがん幹細胞と親株細胞を同一の培養条件下で培養し、両者の放射線応答を比較することで、がん幹細胞の放射線耐性に関わる分子を明らかにした。さらに、同定した遺伝子の働きを阻害し、がん幹細胞の放射線耐性抑制法を検討した。

以上の解析により、がん幹細胞を標的としたより有効な放射線治療法の確立に取り組んだ。

3. 研究の方法

3-1. 放射線によるがん幹細胞の濃縮法の確立

ヒト肝がん細胞株 HepG2 と神経膠芽腫細胞株 A172 に 0.5Gy の X 線を 1 日 2 回の分割照射スケジュールで 82 日間照射した。細胞を、

蛍光標識された抗 CD133 抗体を用いて染色し、フローサイトメーターでがん幹細胞の濃縮度を評価した。さらに、分割照射を休止後に CD133 陽性細胞の頻度が減少するかどうかを同様のフローサイトメーターを用いた解析で検討した。

3-2. 放射線耐性がん幹細胞の性状解析

定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR 法) でがん幹細胞マーカー遺伝子 Multiple drug resistance 1 (MDR1) や Breast Cancer Resistance Protein (BCRP1) の遺伝子発現を解析した。親株細胞とがん幹細胞 (5×10^5) をヌードマウスに皮下に移植し、腫瘍形成能を検討した。コロニーアッセイ法を用いて、放射線照射後に形成されたコロニー数を計測し、細胞の放射線感受性を検討した。ヌードマウスに作製したヒト腫瘍片を用いて、放射線感受性を検討した。

3-3. がん細胞の放射線応答の解析

細胞の生存に関わる AKT シグナル経路ががん幹細胞の放射線耐性に関与するかどうかを検討した。AKT リン酸化抗体を用いて、活性化型 AKT をウエスタンブロッティング法で検出し、放射線照射後の AKT の活性化を検討した。

3-4. がん幹細胞の放射線耐性の克服

AKT 阻害剤 AP1-2 (カルピオケム社) を用いて、AKT の活性化を阻害することで、がん幹細胞の放射線耐性が抑制可能かどうか検討した。親株細胞とがん幹細胞をヌードマウスの右脇腹、左脇腹にそれぞれ移植し、コントロール群、放射線単独群 (3Gyx7 回)、AKT 阻害剤単独群 (7 回)、放射線と AKT 阻害剤併用群の 4 群に分け、腫瘍体積が約 40mm³ の大きさに放射線照射や薬剤投与を開始し、約 20 日間腫瘍体積変化を測定して、腫瘍の再増殖が観察されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

分割照射 82 日間 (82Fractionated Radiation:FR) で、HepG2 と A172 を細胞では、照射前には 10% 程度であった CD133 陽性のがん幹細胞を約 90% にまで濃縮することを明らかにした。この細胞を、照射を止めて 31 日間培養 (31 non-radiation:NR) しても CD133 の発現は、維持された (以後、82FR-31NR 細胞と呼ぶ) (図 2)。

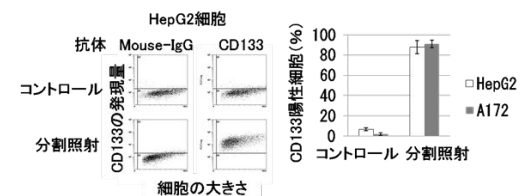


図2 放射線によるがん幹細胞の濃縮
Mouse-IgGはネガティブコントロールとして使用し、CD133の発現でがん幹細胞を検出した。分割照射後、本来10%以下であったCD133陽性細胞は、約90%まで濃縮された。

遺伝子発現の解析から、HepG2 と A172 の 82FR-31NR 細胞では、CD133 以外のがん幹細胞のマーカーで抗がん剤の排出に関わる ABC トランスポーター遺伝子 (MDR1 や BCRP1) の高発現が観察された。また、少量の 82FR-31NR 細胞の移植で、ヌードマウスにヒト移植片が観察され、82FR-31NR 細胞ががん幹細胞の特性である高腫瘍形成能を持つことを明らかにした。さらに、親株 HepG2, A172 細胞と比較して HepG2 と A172 の 82FR-31NR 細胞は放射線に耐性を示すことをコロニーアッセイ法で明らかにした。以上の結果から、放射線分割照射法で、放射線耐性のがん幹細胞が濃縮されることを明らかにした。驚くことに、82FR-31NR 細胞では、従来の抗体法で分離したがん幹細胞とは異なり、親株と同様の血清を含む培養液中で、がん幹細胞の形質を失うことなく増殖した。このため、親株と同じ培養条件下で、細胞の生存に関わる AKT の放射線応答を解析した。5Gy の X 線照射で、親株の HepG2 細胞では AKT は活性化されず、細胞死 (アポトーシス) が誘導された。一方、82FR-31NR 細胞では、5Gy の照射で AKT が活性化され、細胞死は誘導されなかった。がん幹細胞の放射線耐性に、AKT の活性化が関与するかどうか、AKT 阻害剤を用いて検討した。AKT 阻害剤と放射線の併用で、がん幹細胞の放射線耐性が抑制されることを、*in vitro* と *in vivo* の両方の解析で、明らかにした。

これまで、放射線治療成績向上のため、腫瘍に限局して放射線を照射するための放射線照射装置の開発や、照射スケジュールについての検討が行われ、十分な治療成績の向上が得られた。しかし、それでもなお、放射線により治療効果が望めない放射線耐性の腫瘍が存在する。本研究により、AKT 経路の阻害ががん幹細胞の放射線耐性の抑制に有効であることを明らかにした。AKT は様々な分子を介して、細胞死の抑制、細胞の増殖、解糖系、血管新生を制御する。これらの機能ががん幹細胞の放射線耐性に関与することが考えられる。今後は、AKT 阻害剤の効果をより詳細に検討し、正常細胞の副作用を抑え、がん細胞の放射線耐性の克服を目的とする臨床応用に向けた研究が必要である

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Fu H, Martin M, Regairaz M, Huang L, You Y, Lin CM, Ryan M, Kim R, Shimura T, Pommier Y, and Aladjem M. The DNA repair endonuclease Mus81 facilitates fast DNA replication in the absence of exogenous damage. *Nature Communications* 6, doi:10.1038/ncomms7746. 2015
2. Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L, Tateishi S, Shimura T, Li J, Iizuka D, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Kamiya K. RAD18 Activates the G2/M Checkpoint through DNA Damage Signaling to Maintain Genome Integrity after

- Ionizing Radiation Exposure. *PLoS One*. 10(2):e0117845. doi: 10.1371/journal.pone.0117845. 2015.
3. Shimura T, Yamaguchi I, Terada H, Kengo O, Svendsen E.R., Kunugita N. Public Health Activities for Mitigation of Radiation Exposures and Risk Communication Challenges after the Fukushima Nuclear Accident *Journal of Radiation Research*. *J Radiat Res* doi: 10.1093/jrr/rrv013. 2015
4. Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. DNA damage signaling guards against perturbation of cyclin D1 expression triggered by low-dose long-term fractionated radiation. *Oncogenesis* 3, e132; doi:10.1038/oncsis. 2014.
5. Shimura T, Noma N, Sano Y, Ochiai Y, Oikawa T, Fukumoto M, Kunugita N. AKT-mediated enhanced aerobic glycolysis causes acquired radioresistance by human tumor cells. *Radiotherapy and Oncology*, 2014,112 (2): 302-307.
6. Shimura T, Hamada N, Sasatani M, Kamiya K, Kunugita N. Nuclear accumulation of cyclin D1 following long-term fractionated exposures to low-dose ionizing radiation in normal human diploid cells. *Cell Cycle*, 2014, 13(8):1248-55.
7. Fukumoto M, Amanuma T, Kuwahara Y, Shimura T, Suzuki M, Mori S, Kumamoto H, Saito Y, Ohkubo Y, Duan Z, Sano K, Oguchi T, Kainuma K, Usami S, Lee I, Fukumoto M. GBP1 is one of the key molecules contributing to cancer cell radioresistance. *Cancer science*, 2014, 105 (10): 1351-1359.
8. Oji Y, Tatsumi N, Kobayashi J, Fukuda M, Ueda T, Nakano E, Saito C, Shibata S, Sumikawa M, Fukushima H, Saito A, Hojo N, Suzuki M, Hoshikawa T, Shimura T, Morii E, Oka Y, Hosen N, Komatsu K, Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1 promotes homologous recombination-mediated DNA damage repair. *Molecular Carcinogenesis*. doi: 10.1002/mc.22248. 2014
9. Shimura T, Yamaguchi I, Terada H, Kengo O, Svendsen E.R., Kunugita N. Radiation Occupational Health Interventions Offered to Radiation Workers in Response to the Complex Catastrophic Disaster at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *J Radiat Res* doi: 10.1093/jrr/rru110. 2014
10. 志村 勉, 櫻田 尚樹 長期放射線被曝とサイクリン D1 生体の科学 : 2014; 65 (2): 176-181
11. Shimura T, Ochiai Y, Noma N, Oikawa T, Sano Y, Fukumoto M. Cyclin D1 overexpression perturbs DNA replication and induces replication-associated DNA double-strand breaks in acquired radioresistant cells. *Cell Cycle*. 2013, 12(5):773-82.
12. Fukuda T, Kino Y, Abe Y, Yamashiro H, Kuwahara Y, Nihei H, Sano Y, Irisawa A, Shimura T, Fukumoto M, Shinoda H, Obata Y,

Saigusa S, Sekine T, Isogai E, Fukumoto M. Distribution of artificial radionuclides in abandoned cattle in the evacuation zone of the Fukushima Daiichi nuclear power plant. PLoS One. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054312.

13. Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Takahashi A, Fukumoto M. Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. Oncogenesis 2012, doi:10.1038/oncsis.

14. 志村 勉、野間 直十、佐野 由衣、落合 泰史、及川 利幸、角田 智、福本 学、櫻田 尚樹 長期放射線被ばくによるサイクリン D1 発現制御の破綻 放射線生物研究 2013, 48: 323-335.

15. 志村 勉 放射線生物学から見た低線量放射線の生体影響 保健医療科学 2013, 62:189-195.

〔学会発表〕(計9件)

1. Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Kunugita N. Perturbation of AKT/cyclin D1 signaling pathway by oxidative stresses following low dose long-term fractionated radiation in normal human fibroblasts The 5th International Symposium Biological Effects of Low Dose Radiation; 2015.3.2-3. P.45.

2. 志村 勉、桑原 義和、福本 学 AKT 経路を標的としたがん細胞の放射線耐性の抑制 第 57 回日本放射線影響学会 ; 2014 年 10 月; 鹿児島 . P.78

3. 志村 勉、小林 純也、小松 賢志、櫻田 尚樹 放射線高感受性細胞を用いた低線量放射線応答の解析 第 57 回日本放射線影響学会 ; 2014 年 10 月; 鹿児島 . P.127

4. 志村 勉 AKT 経路を標的としたがん細胞の放射線耐性の抑制 第 4 3 回放射線による制癌シンポジウム;2014 年 7 月;京都. P.26

5. Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Hamada N, Kunugita N. Cyclin D1 as a molecular marker and possible molecular radioprotection target for long-term exposure to low-dose ionizing radiation. 4rd International Symposium Biological Effects of Low Dose Radiation; 2014.2.13-14. 2014. P.63.

6. Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Sano Y, Kakuda S, Fukumoto M. Eradication of radioresistant tumors by inhibiting the AKT survival signaling pathway. 3rd International Symposium Biological Effects of Low Dose Radiation; 2013.2.12-13. 2013. P.50.

7. 志村 勉、笹谷 めぐみ、神谷 研二、浜田 信行、櫻田 尚樹 低線量長期放射線によるサイクリン D1 発現制御の破綻 第 56 回日本放射線影響学会 ; 2013 年 10 月; 青森 . 第 55 回日本放射線影響学会要旨集 p.143

8. Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Fukumoto M. Eradication of radioresistant tumors by inhibiting

the AKT survival signaling pathway. The joint symposium of the 7th international symposium network of the institute network and the 45th IDAC symposium, the 2nd symposium for joint usage/research center of aging 2012. p3

9. 志村 勉、桑原 義和、福本 学、寺田 宙、櫻田 尚樹 低線量放射線に対するサイクリン D1 の応答の解析 第 55 回日本放射線影響学会 ; 2012 年 9 月; 仙台 . 第 55 回日本放射線影響学会要旨集 p.121

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

志村 勉 (Shimura Tsutomu)

国立保健医療科学院 生活環境研究部 衛生管理研究領域 上席主任研究官

研究者番号 40463799