

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591858

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的とした消化器癌の重粒子線治療の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic Research on Gastrointestinal Cancer Stem Cell Targeting Therapy with Heavy Ion Beams

研究代表者

崔 星(SAI, SEI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・主任研究員

研究者番号：20342735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト膵臓癌細胞株を用い、超高速セルソーターにて膵臓癌幹細胞を分離収集後、これら癌幹細胞に対して炭素線はX線照射に比べやはり2倍以上強く(RBE=2.23-2.66)癌幹細胞を殺傷すること認められた。また、X線に比べ炭素線照射24時間後でより多くのDNA損傷マーカー-gammaH2AX fociの残存が認められ、Gemcitabine併用時はさらに増加した。移植動物実験の分子病理学的所見から比較的低線量(25Gy)にGemcitabine併用では著しく膵臓癌幹細胞を殺傷することでより強い腫瘍増殖抑制や高い治癒率が認められた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate whether a carbon ion beam in combination with gemcitabine has advantages over X-ray in targeting putative pancreatic cancer stem-like cells (CSCs) in vitro and in vivo. The number of colonies and spheroids formed from CSCs after carbon ion beam was significantly reduced compared to after X-ray irradiation, and they were extremely highly suppressed when carbon ion beam combined with gemcitabine. Expressions of multiple cell death-related genes were remarkably highly induced, and large numbers of H2AX foci in CSCs were formed after carbon ion beam combined with gemcitabine. The highly expressed CSC markers were significantly inhibited after 30 Gy of carbon ion beam and almost lost after 25 Gy carbon ion beam combined with 50 mg/kg gemcitabine. In conclusion, a carbon ion beam combined with gemcitabine has superior potential to kill pancreatic CSCs via irreparable clustered DSB compared to a carbon ion alone or X-rays combined with gemcitabine.

研究分野：放射線生物学

キーワード：粒子線生物学 膵臓がん がん幹細胞 DNA損傷と修復 分子病理学

1. 研究開始当初の背景

我々は以前大腸癌細胞株を用い、炭素線はX線に比べ放射線抵抗性大腸癌幹細胞をより強く殺傷することを報告してきた(1)。しかし一部の癌腫、特に膵癌は悪性度が高く、全体平均では5年生存率がわずか10-20%で、年間日本では3万人近く死亡している。したがって、これらの難治性癌の治療成績を高めることは、当研究所重粒子線癌治療において非常に重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、主に膵癌を中心に炭素線単独或はGemcitabine併用によるコロニー、スフェア形成能、DNA損傷、移植腫瘍に対する増殖抑制や治癒率の違いについて比較検討し、より有効な癌治療法開発につなげたい。

3. 研究の方法

各種膵癌細胞株を用いて、実験方法は下記通りのである。

1) 膵癌における癌幹細胞の分離同定とマウス移植の確立

まずヒト膵臓癌由来 PANC1, PK45, Miapaca2, Bxpc3 などから癌幹細胞マーカーCD44, CD24, ESA 蛍光抗体を用い、超高速セルソーター(BD FACSAria)にてそれぞれの癌幹細胞を同定・分離・収集後、in vitro では colony や tumor spheroid 形成能の違い、in vivo では NOD-SCID マウスに移植し腫瘍形成能の違いを確認した。

2) 重粒子線、X線照射単独及びGemcitabine併用による膵癌制御の比較検討

【in vitro 実験】上記分離収集された癌幹細胞と非癌幹細胞を用い 1) コロニー形成法による膵癌幹細胞生存率解析：炭

素線(6cm-SOBPビームの拡大部の中心) X線照射単独或いはGemcitabine併用処置を行い、コロニー形成能、スフェア形成能の違いを調べた。2) γ H2AX fociによる膵癌幹細胞のDNA損傷修復能の解析：炭素線、X線照射単独或いはGemcitabine併用処置を行い、DNA損傷修復マーカーとして γ H2AX fociの形成数を経時的变化を調べた。3) RT-PCR Array法による遺伝子網羅的解析を行った

【in vivo 実験】炭素線、X線単独或はGemcitabine併用など群に分け、処置した群と対象群の標本から病理標本し、病理組織的变化や免疫組織学染色にて癌幹細胞マーカーであるCD44+, ESA+の発現変化も比較検討した。

4. 研究成果

炭素線はX線照射に比べやはり2倍以上強く(RBE=2.23-2.66)癌幹細胞を殺傷すること認められた(図1、表1)。

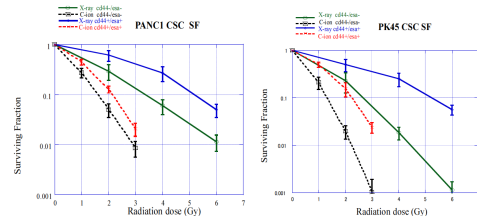


図1

表1

Cells	X-ray	C-ion	RBE
PANC1			
CD44+/ESA+	5.13 ± 0.11 Gy	2.12 ± 0.10 Gy	2.43
CD44-/ESA-	3.26 ± 0.13 Gy	1.72 ± 0.06 Gy	1.94
PK45			
CD44+/ESA+	5.26 ± 0.13 Gy	2.24 ± 0.10 Gy	2.35
CD44-/ESA-	2.73 ± 0.10 Gy	1.44 ± 0.07 Gy	1.93

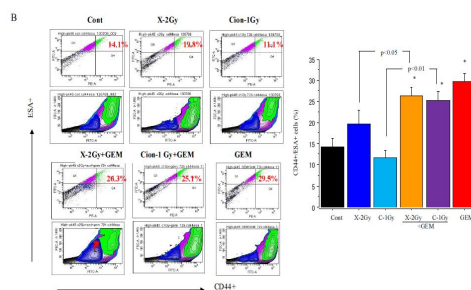


図2

癌幹細胞の割合はX線、炭素線照射単独に比べ、Gemcitabine併用時に著しく上

昇したが(図2) コロニー、スフェア形成能は顕著に低下した(図3)。

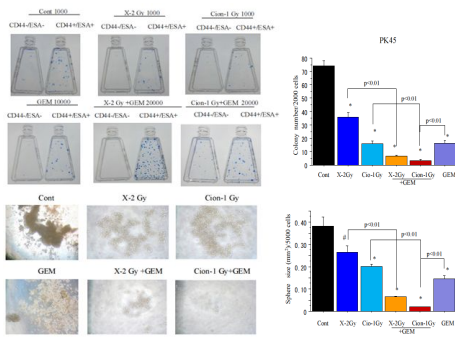


図3

RT-PCR Array による遺伝子発現変化の解析では、炭素線と Gemcitabine 併用では炭素線単独或はX線と Gemcitabine 併用に比べより強く apoptosis や autophagy 関連遺伝子 Bax, Cytochrome c, LC3, p62 などの発現を有意に誘導することが認められた(図4)

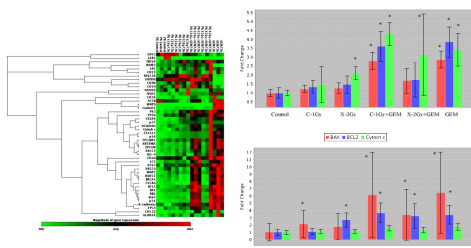


図4

また、X線に比べ炭素線照射24時間後により多くのDNA損傷マーカー-gammaH2AX fociの残存が認められ、Gemcitabine併用時はさらに増加した(図5)。

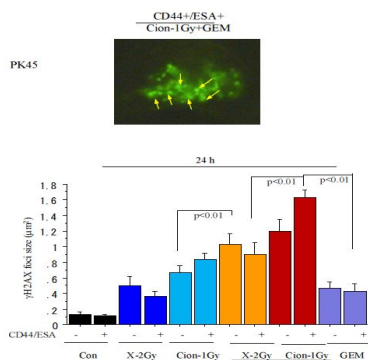


図5

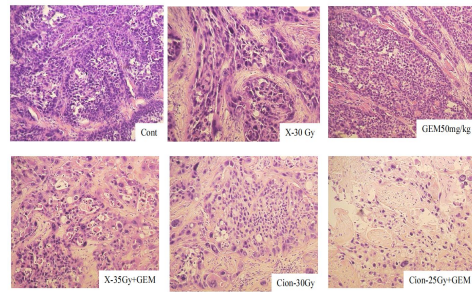


図6

移植動物実験の分子病理学的所見から、高線量(35Gy)炭素線単独、或は比較的low線量(25Gy)に Gemcitabine 併用では炭素線 25Gy 単独照射に比べ腫瘍細胞の繊維化、空洞化が顕著であり、X線 60Gy 照射に比べ著しく腫瘍幹細胞を殺傷することでより強い腫瘍増殖抑制や高い治癒率が認められた(図6)。これは現在、放医研で進行膵癌に対して炭素線と Gemcitabine との併用治療を行っており、2年生存率が54%と今まで世界各施設の報告より2倍以上高い生存率を得ており、我々の結果はある程度この臨床データを基礎的研究からその分子機構を解明することができた。

<引用文献>

1. Cui X*, Oonishi K, Tsujii H, Yasuda T, Matsumoto Y, Furusawa Y, Akashi M, Kamada T, Okayasu R. Effects of Carbon Ion Irradiation on Colon Cancer Stem-like Cells and Its Comparison with X-rays. 2011 Cancer Res 71(10): 3676-87.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計40件)

1. Sai S*, Wakai T, Vares G, Yamada S, Kamijo T, Kamada T, and Shirai T.

- Combination of Carbon Ion Beam and Gemcitabine Causes Unreparable DNA Damage and Death of Radioresistant Pancreatic Cancer Stem-Like Cells In Vitro and In Vivo 2015 Oncotarget 6 (8), 5517-5535. 査読あり
2. Vares G, Sai S, Wang B, Fujimori A, Neno M, Nakajima T. Progesterone generates cancer stem cells through membrane progesterone receptor-triggered signaling in basal-like human mammary cells. 2015 Cancer Lett 362(2):167-73. 査読あり
 3. Xue L, Furusawa Y, Okayasu R, Miura M, Cui X et al., The complexity of DNA double strand break is a crucial factor for activating ATR signaling pathway for G2/M checkpoint regulation regardless of ATM function. 2015 DNA Repair 25:72-83. 査読あり
 4. Ninomiya Y, Cui X*, Yasuda T, Wang B, Yu D, Suzuki-Sekine E, and Neno M. Arsenite induces premature senescence via p53/p21 pathway as a result of DNA damage in human malignant glioblastoma cells. 2014 BMB Reports 2014; 47(10):575-80. 査読あり
 5. Vares G, Cui X, Wang B, Nakajima T, Neno M. Generation of breast cancer stem cells by steroid hormones in irradiated human mammary cell lines. 2013 PLoS One. 8(10):e77124. doi: 10.1371/journal.pone.0077124. 査読あり
 6. Oonishi K, Cui X*, Hirakawa H, Fujimori A, Kamijo T, Yamada S, Osamu Yokosuka, and Kamada T. Different Effects of Carbon Ion Beams and X-rays on Clonogenic Survival and DNA Repair in Human Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. 2012 Radiother & Oncol 105(2):258-65. 査読あり
- * , Corresponding author: Cui X = Sai S
- [学会発表](計 112 件)
- 招待講演
1. 崔星、唐澤久美子、堀本義哉、林光弘、白井敏之
題名:炭素線と Cisplatin との併用による Triple Negative 乳癌幹細胞に対する細胞殺傷及び DNA 損傷増感作用
第 17 回癌治療増感シンポジウム
2015 年 2 月 7 日 奈良市
 2. Sei Sai and Toshiyuki Shirai
題名 : Cancer Stem Cell-Targeting Radiotherapy by Carbon Ion Beam Alone or in Combination with Molecular Targeting Drugs
The 2nd Global Chinese Congress of Radiation Research (GCCRR2014)
2014 年 5 月 13 日 Suzhou, China
 3. Sei Sai and Toshiyuki Shirai
題名 : Pancreatic Cancer Stem-Like Cell Targeting Radiotherapy by Carbon Ion Beam Alone or in Combination with Gemcitabine
Korea Society of Radiation Bioscience (KSRB) Spring Conference
2014 年 5 月 8 日 Busan, Korea

4. 崔星
 題名：がんの親玉-がん幹細胞を狙い撃ちできる重粒子治療
 一消化器系がんを中心に
 東海がんプロフェッショナル養成基盤推進プランセミナー にて
 2013年11月30日 名古屋市
5. 崔星
 題名：「Eradication of Cancer Stem Cells by Heavy Ion Radiotherapy
 Columbia University Radiological Center
 2012年11月2日 NewYork, USA
6. 崔星
 題名：「Elimination of Cancer Stem Cells by Carbon Ion Beam
 ---A Promising New Strategy for Cancer Treatment」
 韓国原子力研究院(KAERI)先端放射線技術研究所(ARTI)
 2012年5月14日 井邑市
 国内学会
1. 崔星、若井俊文、上條岳彦、白井敏之
 肝癌幹細胞に対する重粒子単独或は Sorafenib との併用による殺傷効果
 第27回日本放射線腫瘍学会
 2014年12月11~13日 横浜
2. 崔星
 放射線抵抗性癌幹細胞に対する重粒子線単独或は抗癌剤との併用による細胞生存、DNA 損傷、腫瘍抑制効果について
 第57回日本放射線影響学会
 2014年10月1~3日 鹿児島
3. 崔星、上條岳彦、若井俊文、白井敏之
 ARTEMIS 欠損によるヒト大腸癌幹細胞マーカー発現変化及びX線、炭素線に対する感受性増強
 第73回日本癌学会
 2014年9月25~27日 横浜
4. 崔星、唐澤久美子、堀本義哉、林光弘、白井敏之
 重粒子単独或は Cisplatin との併用によるTriple Negative乳癌幹細胞に対する細胞生存及びDNA 損傷
 第22回日本乳癌学会
 2014年7月10日~11日 大阪
5. 崔星、若井俊文、趙建東、山田滋、鎌田正
 重粒子単独或は Gemcitabine 併用によるヒト膵癌幹細胞及び移植腫瘍抑制効果
 第44回日本膵臓学会
 2013年7月25~26日 仙台
6. Sei Sai, Toshifumi Wakai, Guillaume Vares, Bing Wang, Mitsuru Neno, Tekehiko Kamijo, Toshiyuki Shirai, and Tadashi Kamada
 Defects in XRCC4 Alters Human Colon Cancer Stem Cell Markers and Enhances Its Radiosensitivity to X-ray and Carbon Ion Beam
 第72回日本癌学会学術総会
 2013年10月3日~5日 横浜
7. 崔星、唐澤久美子、堀本義哉、Guillaume Vares、林光弘、白井敏之
 X線単独或は Cisplatin や Chk1 阻害剤併用によるTriple Negative乳癌幹細胞への影響
 第26回日本放射線腫瘍学会・青森
 2013年10月18日~20日
8. 崔星、若井俊文、白井敏之
 重粒子線単独或は Sorafenib や Chk1 阻害剤併用による肝癌幹細胞への影響
 第56回放射線影響学会・青森
 2013年10月18日~20日
9. 崔星、山田滋、鎌田正
 重粒子線によるヒト肝癌幹細胞生存率及びDNA 損傷への影響

第 25 回日本放射線腫瘍学会・
2012 年 11 月 23 日 ~ 25 日 東京

国際学会

1. Sei Sai, Toshifumi Wakai, Guillaume Vares, Shigeru Yamada, Tadashi Kamada, and Toshiyuki Shirai
Combination of Carbon Ion Beam and Gemcitabine Causes Unrepairable DNA Damage and Death of Radioresistant Pancreatic Cancer Stem-Like Cells In Vitro and In Vivo
AACR annual meeting April 18-22, 2015 Philadelphia, USA
2. Sei Sai, Kumiko Karasawa, Guillaume Vares, Yoshiya Horimoto, Mitsuhiro Hayashi, and Toshiyuki Shirai
Effects of Carbon Ion Beam Alone or in Combination with Cisplatin on Triple Negative Breast Cancer Stem-Like Cells
AACR annual meeting April 4-9, 2014 San Diego, USA
3. Sei Sai and Toshiyuki Shirai
Carbon Ion Beam Combined with Gemcitabine Remarkably Disrupts Pancreatic Cancer Stem-Like Cells via Complex DNA Double Strand Breaks (DSB) and Multiple Cell Death Pathways
46th Annual Meeting of the European Pancreatic Club June 25-28, 2014 UK Southampton
4. Sei Sai and Toshiyuki Shirai.
Eradication of Gastrointestinal Cancer Stem Cells by Heavy Ion Radiotherapy
6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells
October 12-15, 2013, Dalian, China
5. Sei Sai, Toshiyuki Shirai, Tadashi

Kamada

- Effects of Carbon Ion Beam Alone or in Combination with Chk1 Inhibitor and Gemcitabine on Putative Pancreatic Cancer Stem Cells
International Association of Pancreatology (IAP) and Korean Pancreatobiliary Association (KPBA) September 4-7, 2013, Seoul, Korea
6. Sei Sai, Toshifumi Wakai, Jian-Dong Zhao, Toshiyuki Shirai, and Tadashi Kamada
Effects of Carbon Ion Beam Alone or in Combination with Sorafenib on Putative Liver Cancer Stem Cells
The 17th ECCO, 38th ESMO, 32nd ESTRO European Cancer Congress, September 27-October 2, 2013, Amsterdam, Netherlands
 7. Sei Sai, Toshifumi Wakai, Guillaume Vares, Tadashi Kamada.
The Role of XRCC4 in Human Colon Cancer Stem Cell Properties and Radiosensitivity
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 11 th Annual Meeting, June 12-15 in Boston, USA

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

崔 星 (SAI, Sei)

放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター 主任研究員

研究者番号：20342735

(2) 研究分担者

上條 岳彦 (KAMIJO, Takehiko)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所 所長

研究者番号：90262708