

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670184

研究課題名(和文)がん幹細胞仮説は放射線耐性克服に有用か

研究課題名(英文)Is the cancer stem cell hypothesis useful to conquer radioresistant cancers?

研究代表者

福本 学 (Fukumoto, Manabu)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60156809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がん幹細胞性が治療抵抗性に関係しているとされる。がん細胞が放射線耐性を獲得するために幹細胞性が関わっているか否かを明らかにすることを目的とした。我々の樹立した臨床的放射線耐性細胞では、がん幹細胞マーカー陽性細胞の比率が上昇しているが、分割照射を継続してもがん幹細胞が増加するとは限らないことが明らかとなった。さらに、臨床的放射線耐性を獲得した細胞が必ずしも幹細胞マーカー陽性とは限らなかった。以上から放射線耐性の獲得にがん幹細胞性は関与しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently, the cancer stem cell (CSC) is suggested to be resistant against therapy and recurrence. The fraction of CSCs was higher in clinically relevant radioresistant cells than in their parental cells. However, a long-term low dose fractionated radiation resulted in radioresistance of parental cells but did not increase CSCs fraction. We therefore conclude that the CSC phenotype is not involved in the acquisition of radioresistance of cancer cells.

研究分野：放射線病理学

キーワード：放射線耐性 がん幹細胞 放射線治療 分割照射 病理学

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、放射線耐性がんの征圧を目指して、標準的な分割放射線療法と同条件である、X線 2Gy の 1 回/日照射を 30 日以上続けても増殖を続ける形質を臨床的放射線耐性 (clinically relevant radioresistant, CRR) と定義し、CRR 細胞の樹立法を世界に先駆けて確立し (Cancer Sci 100:747, 2009)、異なるヒト組織由来の CRR 細胞株を複数樹立した。CRR 細胞樹立の再現実験から、CRR 細胞樹立には長期少線量 (X線 0.5Gy/12 時間) 分割照射が必須であることが判明した。親細胞に少線量、30 日間照射すると、親株細胞よりは耐性ではあるが臨床線量では死滅してしまう、獲得耐性 (acquired radioresistance, ARR) となること、ARR の誘導に cyclinD1 の発現上昇が重要であることを報告した (Oncogene 29:4826, 2010, Int J Radiat Biol 80:540, 2011)。近年、種々のがん組織内に存在する自己複製能と造腫瘍能を有する、がん幹細胞 (CSC) が、治療抵抗性と治療後再発の要因であると考えられている。申請者らは、親細胞株に X線 0.5Gy 分割照射を 80 日以上続けると CSC マーカー陽性 ARR 細胞比率を 60% 以上に濃縮できることを報告した (Oncogenesis 1:e12.doi:10.1038/oncsis.2012.12)。申請者の研究室では、CRR 細胞樹立に ARR の段階が必須であるが、CRR 細胞の cyclinD1 発現量は ARR 細胞よりも低く、親株細胞と同レベルであること、一月間照射しないと、ARR 細胞は次第に耐性を失うが CRR 細胞の耐性は安定であることが明らかとなった (未発表)。以上から、CRR 細胞は ARR 細胞に含まれる耐性細胞の選択ではなく、ARR 細胞に非可逆的变化が加わった結果であると考えられる

2. 研究の目的

申請者の研究室では、ARR が CRR 樹立に必須のステップであることが明らかとなった。近年、種々のがん細胞集団は一様ではなく、少数であるが存在する、正常幹細胞マーカー陽性の CSC が治療抵抗性と治療後再発の要因であると考えられている。本研究では、CRR の樹立に ARR 細胞中の CSC が分割照射によって選択されるのか、ARR 細胞が CRR 細胞に転換するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトがん細胞の CRR 化に伴う CSC 性獲得の有無を調べる為に、ヒト肺がん細胞 A549 から CSC 分画である side population (SP) をフローサイトメーターで分離した。SP の検出は、プラスチック上で培養した細胞をトリプシン処理後に回収し、一定濃度の細胞浮遊液をペラパミル処理の有無によって 2 群に分類した。ペラパミルは 2% FBS/ 10mM HEPES 含有 PBS⁻ で終濃度 50 μ g/ml に調整し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間処理した。その後、両群共に、ヘキスト 33342 を終濃度 5 μ g/ml に希釈した反応液中に均一になるように混和し、37 $^{\circ}$ C で 90 分間処理した。染色後にフローサイトメーターの UV レ

ザーでヘキスト 33342 を励起し、450nm 及び 670nm のフィルターを通して検出される蛍光値からドットプロットを作成した。ペラパミル処理群を陰性対照とし、死細胞を除くヘキスト 33342 蛍光値が低い領域に検出された細胞を SP として算出した。A549 は老化様増殖停止 (SLGA) による細胞死が放射線によって誘導される。そのため、A549 の親株細胞で 10Gy の X線照射後に、90% 以上の親株細胞で SLGA が誘導される条件で SP の検出頻度を調べ、SLGA の誘導と SP 検出頻度の関係を検討した。

CSC は高い ALDH 活性を示すため、親株と CRR 細胞の ALDH 活性を Aldehyde Dehydrogenase-based cell detection kit (STEMCELL) を用いてフローサイトメーターで検出した。さらに、A549-CRR を用いて分割照射下で生存コロニーを形成させ、個々の生存コロニーにおける ALDH 活性を蛍光顕微鏡画像で観察した。

親細胞株、SAS, HepG2, HeLa とそれらの CRR 細胞について X線照射ではなく、CRR 形質のみに関与して発現亢進する遺伝子を cDNA マイクロアレイを用いて同定し、siRNA による転写阻害と cDNA 遺伝子導入によって、その遺伝子の機能解析を行った。さらに GBP-1 遺伝子陽性細胞と CSC マーカーの関係を検討した。

本提案に先立って、培養系において CRR 形質は mTOR 経路阻害によって、X線によるオートファジー細胞死が誘導されることを明らかにしている。SAS と SAS-CRR について、培養系とヌードマウス背部皮下に形成させた腫瘍組織の mTOR 阻害によって放射線感受性が高まるかを解析した。

4. 研究成果

親株と CRR 細胞における CSC の含有率について、SP を指標に比較した。A549 親株では SP の割合は約 15% であった。CRR 化に伴って SP は約 30% に増加した (図 1)。

A549 における X線照射による主な細胞死経路は SLGA であることを確認した。A549-CRR は CRR 形質を維持する目的で毎日 2Gy の分割照射を継続しており、CRR 細胞集団中には SLGA 誘導細胞が少なからず含まれてしまう。そこで、SLGA の誘導と SP の関係を検討した。10Gy の X線単回照射により、照射された親株の約 90% 以上で SLGA が誘導された時点で SP の検出を行った。SLGA 誘導 A549 細胞のうち、約 4% のみが SP であった。親株と CRR 細胞では SP の増加が約 15% であったことから、CRR 細胞で検出された増加には SLGA による影響は少ないこと、CRR 化に伴って SP が増加したことが確認された。一方、親株は 1.5Gy/日の分割照射に対して生存できなかったが、1.5Gy/日の分割照射前に 1Gy/日の分割照射を 14 日行った細胞は引き続き 1.5Gy/日の分割照射を 1 ヶ月以上行っても増殖が可能な ARR 細胞となった。そこで、この ARR 細胞でも SP の検出を行った。しかしながら、この

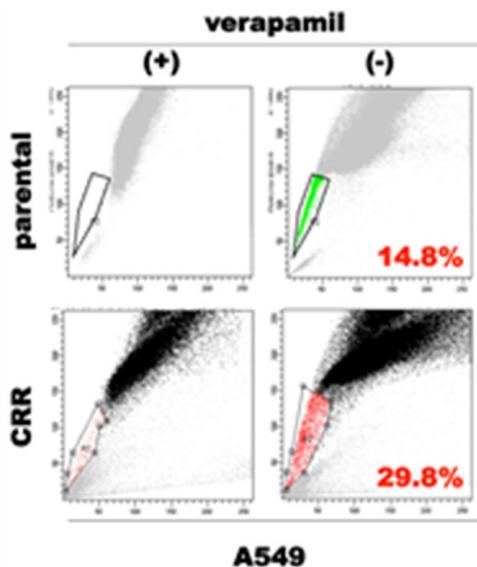


図1. A549細胞におけるCRR化の過程でSPは2倍に増加した。

ARR細胞におけるSP含有率は親株以下であった。この結果は、CRR化によってSPが増加したものの、SPの増加は必ずしも放射線耐性の獲得と相関していないことを示している。

親株とCRR細胞で高いALDH活性(ALDH^{high})を示す分画が検出されたヒトがん細胞3株(SAS, HepG2, A549)では、親株のALDH^{high}分画は14-40%の範囲であり、がん細胞株によってCSCの含有率は異なっていた。ただ、親株のALDH^{high}分画の割合とCRR細胞の樹立のしやすさに相関は見られなかった。さらに、全ての親株は1.5Gy以上の分割照射量に対して生存できないために、親株から直接CRR細胞を樹立することはできなかった。一方で、樹立したCRR細胞では細胞株によらずALDH^{high}分画が増加しており、増加した割合は5-30%の範囲で細胞株によって異なっていた。CRR細胞の作成には0.5あるいは1Gy/日の事前分割照射によってARR形質の誘導が必須であることを再確認した。A549親株に0.5Gy/日を31回分割照射すると、親株よりも放射線抵抗性を示すARR形質を獲得し、その後も継続して分割照射を90回以上行くと、特に4Gy以上の高線量域でさらに放射線抵抗性を獲得していた。そこで0.5Gy/日の分割照射を31回、及び102回行ったARR細胞を作成し、ALDH活性を調べたところ、どちらのARR細胞も親株よりもALDH^{high}分画は増加していたが、分割照射回数増加(放射線抵抗性の増強)とALDH^{high}分画には関連性が見られなかった。すなわち、CRR細胞は親株で検出されたALDH^{high}分画が選択・濃縮されるという単純な機構ではないことが示された(図2)。

X線照射後のA549-CRRの生存コロニーの一部はALDH陽性と陰性細胞がまばらに存在する混合集団であったが、その他の多くの生存コロニーはALDH陰性細胞のみから形成されていた。

以上の結果より、CRR細胞は必ずしもCSC

に依存する形質ではなく、非CSCにCRR形質が誘導されることによって放射線耐性が誘導される経路が示された。

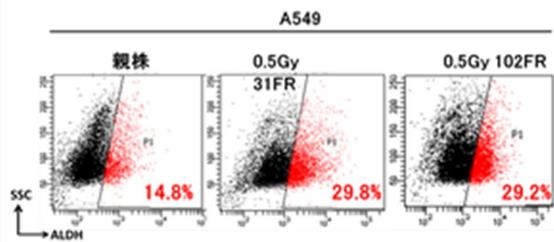


図2. X線0.5Gy毎日照射によってALDH陽性分画は増加したが経過を追って増加するものではなかった。

すべての解析した親細胞株とCRR細胞の対においてguanine nucleotide-binding protein 1 (GBP1)遺伝子の発現亢進がCRR形質の発現に共通して検出された。GBP-1阻害によって親細胞、CRR細胞ともにアポトーシスを誘導すること、CRR細胞の放射線感受性を親細胞株程度にまで高めるが、親細胞株にGBP-1の遺伝子導入による発現亢進では放射線耐性を誘導できなかった。以上より、CRR形質の発現には複数の遺伝子の関与が必要であるが、単一の責任遺伝子が存在するのではないことを明らかにした。また、ほぼ全部のCRR細胞ではGBP-1陽性であった。CSCマーカー陽性細胞の割合は親株よりもCRR細胞で高かったが、陽性細胞率はGBP-1陽性細胞率に比較して有意に低かった。この事実から、CRR細胞が必ずしもCSC性を有さないことが明らかとなった(図3)。

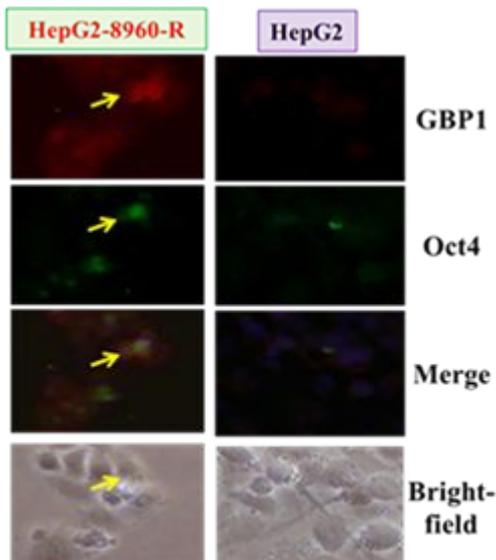


図3. ほとんどのCRR細胞(左列)ではGBP-1陽性だが、親細胞(右列)では幹細胞マーカー陽性は一部に過ぎない。

mTOR阻害剤は、培養系でもマウス移植腫瘍でもCRR細胞を親細胞よりも放射線感受性を誘導した。しかし、移植系ではmTOR阻害により、放射線による腫瘍血管のアポトーシスの誘導が亢進し、結果として腫瘍血管に血栓形成するために腫瘍が縮小することが明らかとなった。現象としての結果は同じでも、

培養系と細胞—細胞間の相互関係のある体内では機構が異なること、治療を目指した研究における動物実験の重要性を再確認した。

図4に本研究から明らかとなった放射線耐性の獲得とCSCの関係を示す。一部の細胞に誘導される放射線獲得耐性に伴うCSC化の機序は今後の研究課題である。

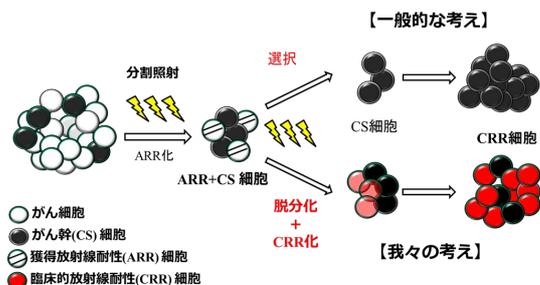


図4. 分割照射によって、内因性に放射線耐性であるCSCの濃縮が起こるが、獲得放射線耐性はCSC性とは無関係である。しかし、耐性獲得の過程で一部はがん細胞の脱分化によってCSCが生じる可能性はある。

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13件)

1. Fukumoto Mo, 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, Kinoshita K, Lee I, Fukumoto Ma: Guanine nucleotide-binding protein 1 is one of the key molecules contributing to cancer cell radioresistance. *Cancer Sci.* 105(10):1351-9, 2014. doi: 10.1111/cas.12489.、査読有
2. Kuwahara Y, Mori M, Kitahara S, Fukumoto Mo, Ezaki T, Mori S, Echigo S, Ohkubo Y, Fukumoto Ma: Targeting of tumor endothelial cells combining 2 Gy/day of X-ray with Everolimus is the effective modality for overcoming clinically relevant radioresistant tumors. *Cancer Med* doi: 10.1002/cam4.185, 2014.、査読有
3. Fukumoto M: Radiation pathology: From thorotrast to the future beyond radioresistance. *Pathol Internatl* 64(6), doi:10.1111/pin.121, 2014.、査読有
4. Takahashi A, Ma C, Nakagawa A, Yoshida Y, Kanai T, Ohno T, Kuwahara Y, Fukumoto M, Nakano T: Carbon-ion beams efficiently induce cell killing in X-Ray resistant human squamous tongue cancer cells *Int J Med Phys Clin Engineer Radiat Oncol* 3:133-42, 2014. doi:10.4236/ijmpcero.2014.33019、査読有
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. *Radiother Oncol.* 112(2):302-7, 2014. (doi: 10.1016/j.radonc.2014.07.015)、査読有

[学会発表](計30件)

1. 西本明功、濱進、中村伊吹、桑原義和、福本学、小暮健太郎. 低酸素環境下の臨床的放射線耐性細胞におけるミトコンドリアのターンオーバーの活性化. 日本薬学会第136年回2016年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. 鈴木正敏、漆原佑介、福本基、桑原義和、福本学. 臨床的放射線耐性細胞ではがん幹細胞様細胞が増加する. 第74回癌学会学術総会2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
3. 福本基、桑原義和、漆原佑介、鈴木正敏、原田浩、福本学. 臨床的放射線体制細胞とHIF1アルファの関係. 第74回日本癌学会学術総会2015年10月9日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
4. Fukumoto M. Attracted to radiation biology. 15th International Congress of Radiation Research. 2015年5月28日、京都国際会議場(京都府京都市)
5. 桑原義和、鷺尾亮太、福本基、漆原佑介、鈴木正敏、福本学. 臨床的放射線体制細胞の多様性と共通性. 第17回癌治療増感研究シンポジウム2015年2月6日、奈良県文化会館(奈良県桜井市)
6. Fukumoto M、Kuwahara Y、Suzuki M. Establishment of Clinically Relevant Cell Lines and their Characteristics. International Conference on Radiation Biology-2014(ICRB-2014) 2014年11月11日(インド・ニューデリー市)
7. 福本学. 放射線影響研究に見せられて. 日本放射線影響学会第57回大会2014年10月2日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
8. 鈴木正敏、桑原義和、福本学. 段階的に照射線量を増加させる分割照射を長期間行くと、放射線抵抗性が増強される. 第73回日本癌学会学術総会2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
9. 桑原義和、鷺尾亮太、福本基、漆原佑介、鈴木正敏、福本学. 臨床的放射線体制細胞に生じたDNA損傷は親株に比べて正確に修復される. 第73回日本癌学会学術総会学術総会2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
10. 福本基、桑原義和、漆原佑介、鈴木正敏、福本学. GBP1は臨床的放射線体制細胞の形質に寄与する遺伝子である. 第73回日本癌学会学術総会学術総会2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
11. Fonkoua M、Suzuki M、Kuwahara Y、Fukumoto M. Enhancement of

Radioresistance by Long-term Fractionated Radiation Exposure with Stepwise Dose Escalation. 4th Annual Conference of Japan Association for Human Security Studies 2014 年 9 月 6 日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

12. 鈴木正敏、メタッセホンコワ ロジヌエメ、吉田幸代、井上和也、漆原佑介、桑原義和、福本 学 . 臨床的放射線耐性(CRR)獲得過程における少線量放射線分割照射の意義 . 第 33 回分子病理学研究会宮城蔵王シンポジウム 2014 年 7 月 25 日、宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県刈田郡蔵王町)
13. 安彦 亮、斎藤陽平、桑原義和、山本由美、山本文彦、福本 学、大久保恭仁人 . 肝癌細胞株 HepG2 の放射線耐性獲得に対する Transglutaminase2 の関与 . 第 33 回分子病理学研究会宮城蔵王シンポジウム 2014 年 7 月 25 日、宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県刈田郡蔵王町)
14. 桑原義和、高橋慎太郎、鷲尾亮太、福本基、漆原佑介、鈴木正敏、福本 学 . X 線及びドセタキセル体制におけるミトコンドリア関与の検討 . 第 2 回がん代謝研究会 2014 年 7 月 10 日、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)
15. 福本 学 . 獲得放射線耐性(ARR)がん細胞から臨床的放射線体制(CRR)がん細胞へ . 第 20 回国際癌治療増感研究会 2014 年 6 月 7 日、高知県民文化ホール(高知県高知市)
16. 桑原義和、福本 基、鈴木正敏、福本 学 . 臨床的放射線体制細胞における X 線誘発 HPRT 遺伝子座の突然変異率 . 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 25 日、広島国際会議場(広島県広島市)
17. 鈴木正敏、桑原義和、福本 学 . 臨床的放射線体制(CRR)獲得過程における少線量放射線分割照射の役割 . 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日、広島国際会議場(広島県広島市)
18. 福本 基、桑原義和、鈴木正敏、福本 学 . 腫瘍血管内皮を標的としたホウ素中性子捕獲法の臨床的放射線体制細胞に対する影響 . 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日、広島国際会議場(広島県広島市)

〔図書〕(計 1 件)

- 1 . 福本 学 (編集) 特集: 放射線障害の病理 . 病理と臨床, 33 (1), 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/path/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福本 学 (FUKUMOTO, MANABU)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 60156809

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

桑原 義和 (KUWAHARA, YOSHIKAZU)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号: 00392225

鈴木 正敏 (SUZUKI, MASATOSHI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号: 60515823

漆原 佑介 (URUSHIHARA, YUUSUKE)

東北大学・加齢医学研究所・博士研究員

研究者番号: 30722269