

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791235

研究課題名(和文) ヒトがん幹細胞の放射線感受性と低酸素影響

研究課題名(英文) The radiosensitivity and effects of hypoxia in human cancer stem cells

研究代表者

高橋 桃子 (TAKAHASHI MOMOKO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・博士研究員

研究者番号：10531460

研究成果の概要(和文)：近年、多くの腫瘍で幹細胞様の挙動を示す「がん幹細胞」の存在が明らかになってきた。本研究の目的は、神経膠芽腫における「がん幹細胞」を同定し、放射線感受性ならびにその特性を明らかにすることである。その結果、腫瘍細胞の培養環境の変化により一部の細胞群が「がん幹細胞」に特徴的な様相を示すこと、それらの細胞群は放射線に対して抵抗性であることが示された。また、これらの細胞群はX線よりも重粒子線に対しては感受性が高かったことも示された。

研究成果の概要(英文)：Recently several studies demonstrated that there is a small fraction in solid tumor which is highly resistant to ionizing radiation and that the radioresistant tumor cells often express some stem cell markers. This small population of cells is characteristic of stem cells and called “cancer stem cell”. It is highly resistant to ionizing radiation and it is suggested that resistance of cancers to both radiation and chemotherapeutic agents can be attributed to the features of the cancer stem cells. The purpose of this study is the analysis of cancer stem-like cells derived from established glioblastoma cell line and radiosensitivity in cancer stem-like cells using X-rays and heavy ion beam. As a result, it has been shown that sub population of human glioblastoma cell line A172 grown in non serum free medium showed cancer stem cell-like property and radioresistance to both X-rays and heavy ion beam.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響評価

キーワード：がん幹細胞・放射線・低酸素

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍を形成する細胞には幹細胞様の挙動を示す「がん幹細胞」と、それから増殖・分化した「がん細胞」があることが、外胚葉、中胚葉、内胚葉組織に由来する多くの腫瘍で

明らかになってきた (Al-Hajj et al. PNAS 2003; Hemmati et al. PNAS 2003; Singh et al. Nature 2004; Li et al. Cancer Res.2007)。腫瘍の大部分を構成する「がん細胞」は、増殖速度が速く低酸素でネクローシスをおこ

し、一定の細胞寿命を有して可移植性が少ないと考えられている。一方「がん幹細胞」は増殖速度が遅く、低酸素条件を好むことが予想され、さらに不死で可移植性があり放射線や化学療法剤に対して抵抗性を示す。このことから、「がん幹細胞」はがん特有な増殖能や転移といった特徴を決定付けると共に、がんの治療抵抗性の要因となる細胞であることが示唆される。

従来の放射線治療は腫瘍全体が標的であったが、上記の学術的背景から後者の「がん幹細胞」を標的としなければならない。特に難治性のがんについては、治療抵抗性における「がん幹細胞」の寄与が大きいことが予想される。このことから、このような腫瘍内に存在する「がん幹細胞」の特性とその放射線効果を把握することが放射線治療を行ううえで重要となる。

さらに近年のがん研究において、腫瘍塊内において低酸素・低栄養状態の腫瘍細胞が脱分化し幹細胞様の特性を獲得するという報告が得られている(Holmquist et al. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006; Pålman et al. *Semin. Cancer Biol.* 2004)。低酸素・低栄養状態の腫瘍細胞は放射線治療や化学療法に対して抵抗性を示すことが知られているが、がん幹細胞としての特性の獲得がどのような機構で引き起こされるのかはいまだ不明である。このことから、がん幹細胞を放射線治療における新たな標的とする場合、低酸素・低栄養状態の腫瘍細胞が幹細胞様の特性を獲得する機構を明らかにすることが重要である。

2. 研究の目的

難治性がんである神経膠芽腫における「がん幹細胞」を同定すると共に、「がん幹細胞」の放射線感受性ならびにその特性を明らかにすると共に、「がん幹細胞」と「非がん幹細胞」の低酸素における特性変化を明らかにすることである。

3. 研究の方法

- (1) 難治性がん(神経膠芽腫)からのがん幹細胞の分離幹細胞と非幹細胞を標識・分離する装置を用いて神経膠芽腫に由来する培養細胞(または、入手可能な神経膠芽腫、正常神経芽細胞)から、幹細胞と非幹細胞を分離回収する。

これまでの実験結果として、神経膠芽腫を通常条件で培養しただけでは幹細胞様の特性は獲得できず、腫瘍塊から分離しなければ幹細胞マーカー陽性細胞は得られないことが明らかとなっている。また、セルソーターを使用した分離方法では回収はできたものの分離後の細胞状態が悪く実験に使用できるものは得られなかった。そこで本実験ではマウス移植腫瘍な

らびに細胞集団を表面マーカーで標識・分離する細胞分離装置を用いてがん幹細胞の分離・収集を試みる。

幹細胞の標識としては CD133 陽性を用いる予定であるが、別に Hoechst dye の排除能を指標とする方法についても試みる。分けられた両細胞の生物学的特性の違いを以下の観点から比較する。

- ① がん細胞としての悪性度の比較
- ② 遺伝子発現の比較

- (2) 神経膠芽腫の放射線治療抵抗性に関連するがん幹細胞の特性ならびに低酸素状態における特性変化の解明
分離したがん幹細胞ならびに非がん幹細胞を用いて、電離放射線ならびに重粒子線に対する感受性の解析を行う。さらに、低酸素条件で細胞が培養可能な装置を用いて、がん幹細胞ならびに非がん幹細胞の低酸素培養による特性の変化を検討する。実験手法としては以下の例を用いる。

- ① がん幹細胞の電離放射線ならびに重粒子線に対する感受性の比較を行う。具体的には生存率測定による放射線感受性の変化、DNA 鎖切断修復能 (γ H2AX, DNA-PKcs, Rad50 等のフォーサイの観察、comet assay 法) 等を用いる。
- ② がん幹細胞における特定遺伝子の電離放射線ならびに重粒子線による発現変化を見る。具体的な手法はウェスタンブロットティング、定量的 RT-PCR などを用いる。標的となる遺伝子の候補は、以前より得られている正常細胞での網羅的遺伝子解析の結果を参考に、電離放射線により発現量が左右される事が明確であるものを中心に絞り込む。
- ③ がん幹細胞ならびに非がん幹細胞を低酸素状態で培養したときの生物学的特性の変化を解析する。具体的にはがん幹細胞マーカーの発現変化、上記の研究結果で明らかとなった特定遺伝子の変化等を解析する。

4. 研究成果

(1) 難治性がん(神経膠芽腫)からのがん幹細胞の分離

研究手法にある通りマウス移植腫瘍ならびに細胞集団を表面マーカーで標識・分離する細胞分離装置を用いてがん幹細胞の分離・収集を試みたが、移植腫瘍内における CD133 陽性細胞は想定していたよりも少量であった。試行錯誤の結果、無血清培地で腫瘍細胞を培養することにより、neurosphere を形成することが明らかとなった(図 1A)。過去の研究結果で neurosphere が幹細胞の特徴であることが示されていたことから、無血清培地で培養した細胞ががん幹細胞である可能性が高いと考えた。そこで幹細胞マーカー、幹細胞関連遺伝子が発現しているのか確認したところ、幹細胞マーカーである CD133 の発現は認められなかったが、Sox2, Nestin, musashi 等の幹細胞関連遺伝子の発現上昇が認められた(図 1 B)。

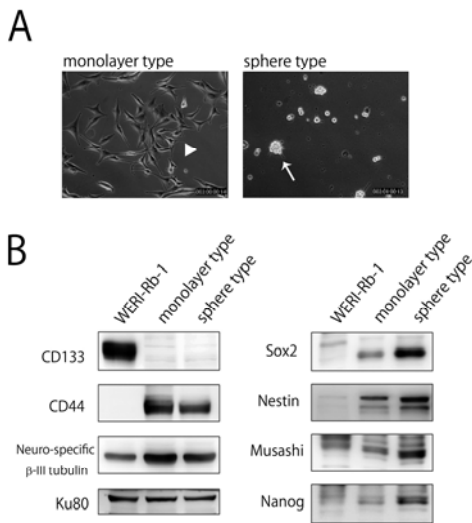


図 1：無血清培地で神経膠芽腫細胞を培養した時の細胞の様子(A 右)と、幹細胞マーカー及び幹細胞関連遺伝子の発現解析

更に、DNA 合成及び細胞分裂を解析した結果、neurosphere 群でそれらの遅滞が見られた。

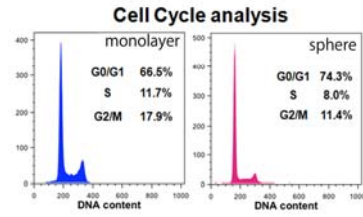
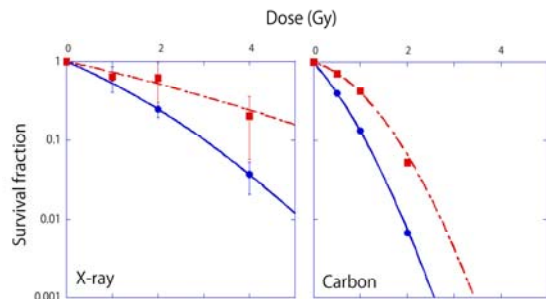


図 2：通常細胞及び neurosphere の細胞周期解析の様子

(2) 神経膠芽腫の放射線治療抵抗性に関連するがん幹細胞の特性ならびに低酸素状態における特性変化の解明

(1)の結果に従い、neurosphere 形態の A172 における放射線感受性を通常の A172 と比較した。その結果、生



存率曲線において X 線、重粒子線共に neurosphere の放射線抵抗性が認められた(図 3)。

図 3：neurosphere 及び通常 A172 の生存率曲線。赤が neurosphere, 青が通常を示す。

更に、gamma-foci による DNA 損傷と修復の比較を行ったところ、neurosphere 群において修復能の遅滞が見られた(図 4)。

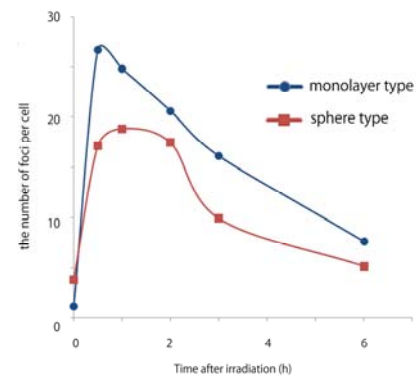


図 4：gamma-foci 染色による DNA 損傷及び修復過程の解析。

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)

[学会発表] (計2件)

・ Akira, Fujimori. “Cancer stem-like cells from a glioblastoma cell line is resistant to X-rays and carbon-ion beams”, 第70回日本癌学会、2011年10月3日、名古屋

・ Takahashi, Momoko. “Study of radiosensitivity in cancer stem-like cells from a glioblastoma cell line”, the 14th International Congress of Radiation Research、2011年9月1日、ポーランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 桃子 (Takahashi Momoko)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・博士研究員

研究者番号：10531460

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし