

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861141

研究課題名(和文) がんの炭素イオン線抵抗性におけるヘテロクロマチンの役割に関する研究

研究課題名(英文) Research of relationship between carbon ion beam resistance and heterochromatin formation in cancer cells

研究代表者

佐藤 克俊 (Sato, Katsutoshi)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・研究員

研究者番号：20589650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス扁平上皮がん細胞株NR-S1に対しX線及び炭素イオン線を繰り返し照射し、放射線抵抗性がん細胞株としてそれぞれX60及びC30細胞を独自に樹立した。解析の結果、X60細胞はX線だけでなく炭素イオン線抵抗性であること、C30細胞のX線や炭素イオン線感受性はNR-S1細胞とほぼ同等であること、X線及び炭素イオン線抵抗性とヘテロクロマチンドメイン数は強く相関すること、X60細胞ではX線や炭素イオン線照射後のRad51フォーカス形成が亢進することが示された。この研究により、がん細胞のX線及び炭素イオン線抵抗性にはヘテロクロマチン領域で起こる相同組換え修復が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Radioresistant cancer cell line X60 and C30 was originally established by means of repeated exposure the mouse squamous cell carcinoma cell line NR-S1 to X-ray and carbon ion beam (C-ion) irradiation, respectively. The results showed that the X60 cells acquired the resistance to both X-ray and C-ion irradiation. On the other hand, the X-ray and C-ion sensitivity of C30 cells was approximately same as that of NR-S1 cells. Moreover, it is shown that the X-ray and C-ion resistance was strongly correlated with the heterochromatin domain number, and the Rad51 focus formation was significantly promoted in X-ray and C-ion resistant X60 cells compared with that in NR-S1 and C30 cells. Our results suggested that homologous recombination repair in heterochromatin region is associated with the X-ray and C-ion resistance in cancer cells.

研究分野：医歯薬

キーワード：粒子線治療 炭素イオン線抵抗性

1. 研究開始当初の背景

放射線照射技術の発展により放射線治療成績は向上したが、一部の症例では局所制御できず、照射野内の局所再発もみられる。この原因として腫瘍内の放射線抵抗性がん細胞の存在が考えられることから、がんの X 線及び炭素イオン線抵抗性の分子機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

独自に樹立した X 線及び炭素イオン線抵抗性がん細胞を解析することで、X 線や炭素イオン線照射後に起こるヘテロクロマチン形成が、がんにおける X 線及び炭素イオン線抵抗性に与える影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

がん細胞株としてマウス扁平上皮がん細胞株 NR-S1、1 回線量 10 Gy の X 線 (20kV、20mA) を合計 60 Gy に達するまで繰り返し照射して樹立したがん細胞株 X60 細胞、1 回線量 5 Gy の炭素イオン線 (290MeV/n) を合計 30 Gy に達するまで繰り返し照射して樹立したがん細胞株 C30 を用いた。X60 及び C30 細胞については後述する。これらの放射線感受性、細胞学的性質、DNA 修復能等を比較した。

4. 研究成果

(1) 繰り返し X 線を照射して樹立した X60 細胞及び親細胞株 NR-S1 細胞の X 線及び炭素イオン線感受性をコロニー形成法により測定し、両者で比較した。その結果、X60 細胞は NR-S1 細胞に比べて X 線と炭素イオン線に著しく抵抗性であった。生存率を 10% まで減少させるために必要な線量である D10 値を解析した結果、X 線の D10 値は X60 細胞及び NR-S1 細胞でそれぞれ 10.5、6.4 Gy、炭素イオン線の D10 値はそれぞれ 6.4、3.9 Gy だった。この結果から、繰り返しの X 線照射によりがん細胞は顕著な X 線及び炭素イオン線抵抗性を獲得する可能性があることが示された。X60 細胞は性質の不均一な細胞の集団であることが推測されるため、X60 細胞から無作為に 10 個の細胞 (X60-2、X60-4、X60-A3、X60-A9、X60-B11、X60-B12、X60-C3、X60-D4、X60-D9、X60-H2) を選択し、これらの X 線及び炭素イオン線感受性を測定した。その結果、これらの X 線及び炭素イオン線感受性は均一ではなく、分散していることが示された。このうち、X60-A3、X60-B12、X60-H2 細胞が顕著に X 線及び炭素イオン線抵抗性だった。以上の結果より、繰り返しの X 線照射によりがん細胞は X 線だけでなく炭素イオン線抵抗性も獲得すること、これらの抵抗性は照射を受けた集団内で分散していることが示された。

(2) NR-S1、X60 細胞、及び X60 細胞の単一クローンの細胞学的特徴 (細胞の形態、大きさ、ヘテロクロマチンドメイン数、DNA 量、

G1 期、G2/M 期、S 期の細胞の含有率) を測定し、これらと X 線及び炭素イオン線感受性の相関を解析した。その結果、X 線感受性と炭素イオン線感受性 ($R=0.87$ 、 $P=0.00053$)、ヘテロクロマチンドメイン数と X 線 ($R=0.74$ 、 $P=0.0098$) 及び炭素イオン線抵抗性 ($R=0.79$ 、 $P=0.0038$)、形態的に紡錘形の細胞の割合と炭素イオン線抵抗性 ($R=0.75$ 、 $P=0.0085$) に統計的有意な正の相関が検出された。この結果から、特にヘテロクロマチンドメイン数と X 線及び炭素イオン線抵抗性が深い関連がある可能性が示唆された。

(3) ヘテロクロマチン領域における DNA 修復はユークロマチン領域と異なり、相同組み換え (HR) 修復が優位に働くことを示す報告がある ()。HR 修復は、非相同末端 (NHEJ) 修復と比較して誤りの少ない修復方式として知られている ()。X60 細胞のヘテロクロマチンドメイン数は NR-S1 細胞よりも有意に多く、さらにヘテロクロマチンドメイン数は X 線と炭素イオン線抵抗性と相関することから、X60 細胞では DNA 修復に何らかの違いがある可能性がある。そこで、NR-S1 細胞と X60 細胞に X 線及び炭素イオン線をそれぞれ 10Gy 及び 5 Gy 照射し、その 24 時間後に DNA 二本鎖切断 (DSB) の指標として広く知られている γ -H2AX に対する免疫蛍光染色を行い、核内 γ -H2AX フォーカス数を測定することで X 線及び炭素イオン線照射後の DNA 修復能を比較した。その結果、X60 細胞における照射後の γ -H2AX フォーカス数は、NR-S1 細胞と比較して有意に低いことが示された。この結果により X60 細胞は DNA 修復能が亢進していることが示された。

(4) ヘテロクロマチン領域における DNA 修復能を評価するため、NR-S1 細胞及び X60 細胞から単離した X 線及び炭素イオン線抵抗性のクローンである X60-A3 (A3) 細胞の細胞核に対し、放射線医学総合研究所の所有する SPICE (Single Particle Irradiation system to Cell) により陽子線マイクロビーム照射 (3.4 MeV/n の陽子線を 3 μ m 間隔で細胞核あたり 5 点照射する) を行い、ヘテロクロマチンに集積するタンパク質である HP1 β と γ -H2AX フォーカスの共局在を経時的に評価した。しかし、照射 30 分後には HP1 β と γ -H2AX フォーカスの隣接はみられたものの、これらの共局在を観察時間内に確認することができなかった。ヘテロクロマチン領域の DNA 損傷は照射約 3 分後からヘテロクロマチンの周辺に移動し、その後 Rad51 が関与する HR により修復されることが報告されている () ことから、ヘテロクロマチン領域の DNA 修復を評価するためには、照射 3 分以内の早期から観察する必要があることが示された。

(5) がん細胞に対し X 線を繰り返し照射することで X 線と炭素イオン線の両方に対し抵

抗性になることが示された。しかし、炭素イオン線の繰り返し照射により X 線や炭素イオン線抵抗性が生じるかどうか評価した研究は今まで報告されていない。そこで、NR-S1 細胞に、10 Gy の X 線と生物学的等価線量である 1 回線量 5 Gy の炭素イオン線を、合計 30 Gy に達するまで繰り返し照射し、C30 細胞を樹立した。C30 細胞の X 線及び炭素イオン線感受性を解析した結果、X 線及び炭素イオン線の D10 値はそれぞれ 8.0 及び 4.9 Gy だった。しかし、生存曲線を NR-S1 細胞と比較した結果、統計的有意差は検出できなかった。さらに、細胞学的形態も NR-S1 細胞と比較して大きな違いはなかった。これらの結果から、がん細胞に対する炭素イオン線の繰り返し照射は顕著な X 線及び炭素イオン線抵抗性は生じないこと、また X 線の繰り返し照射と異なり、形態的に大きな変化はみられないことが示された。

(6) X60 細胞は X 線及び炭素イオン線抵抗性であり、これらはヘテロクロマチンドメイン数と統計的有意な相関があること、また DNA 修復能が高いことが示された。ヘテロクロマチン領域では HR 修復が優位に行われる()ことから、X60 細胞は HR 修復能が高い可能性がある。そこで、NR-S1、X60 及び C30 細胞におけるシスプラチン感受性を解析した。シスプラチンは DNA 鎖間架橋を引き起こす薬剤であり、これは Fanconi Anemia 経路を介する HR 修復で除去されることが知られている。よって、シスプラチン感受性を解析することで、限定的ではあるが HR 修復能を評価できる。解析の結果、X60 細胞は NR-S1 や C30 細胞に比べて著明なシスプラチン抵抗性だった。以上の結果より、X60 細胞では HR 修復が亢進している可能性が示された。

(7) X60 細胞は C30 細胞や NR-S1 細胞に比べて HR 修復能が亢進している可能性があることから、5 Gy の X 線及び炭素イオン線を各細胞に照射し、その後、Rad51 フォーカス数の経時的変化を解析した。Rad51 は HR 修復に必要なタンパク質である。解析の結果、X 線及び炭素イオン線照射 1 時間後の Rad51 フォーカス数が、X60 細胞において有意に高く、6 時間後には各細胞間で同等数となり、24 時間後には各細胞とも非照射時と同程度まで低下することが示された。この結果から、X60 細胞では HR 修復が優位に機能している可能性が示された。

(8) X60 細胞では X 線及び炭素イオン線照射 1 時間後から HR 修復が優位に機能している可能性が示された。よって HR 修復の阻害剤の併用により、X60 細胞に生じた X 線及び炭素イオン線抵抗性を減少させることができる可能性がある。これを評価するため、Rad51 の阻害剤 B02 の炭素イオン線増感効果を解析した。NR-S1、X60、及び C30 細胞に 5 µM

の B02 を投与し、その 24 時間後に 4 Gy の炭素イオン線を照射した。照射直後にコロニー形成法を行い、生存率を求めた。これらを B02 非投与時の生存率と比較し、炭素イオン線増感効果を評価した。解析の結果、B02 併用群における NR-S1、X60 及び C30 細胞の生存率は、非投与群に比べて著明に減少した。これより、B02 には炭素イオン線増感効果があることが示された。しかし、B02 併用時における X60 細胞の生存率は NR-S1 や C30 細胞と比較しても依然として高く、X60 細胞に生じた炭素イオン線抵抗性を NR-S1 細胞と同等まで低下させることはできなかった。この結果により、Rad51 の阻害により顕著な炭素イオン線増感を得ることはできるものの、X60 細胞に生じた炭素イオン線抵抗性を抑制できないことが示された。この解析により HR 修復だけが X60 細胞の X 線及び炭素イオン線抵抗性の原因ではないことが明らかとなった。

(8) 本研究の成果を以下にまとめる。本研究では X 線及び炭素イオン線を繰り返し照射し、それぞれ X60 及び C30 細胞を樹立した。X60 細胞は X 線だけでなく炭素イオン線抵抗性であること、C30 細胞の X 線及び炭素イオン線感受性は、その親細胞株である NR-S1 細胞とほぼ同等であることを示した。この結果により、がん細胞に対し X 線を繰り返し照射することで、がん細胞は X 線及び炭素イオン線を獲得すること、一方、同等の炭素イオン線ではこれらに対する抵抗性は生じないことが示された。また、がん細胞におけるヘテロクロマチンドメイン数は X 線及び炭素イオン線抵抗性と強く相関することが示された。さらに、がん細胞における X 線及び炭素イオン線抵抗性には Rad51 が関与する HR 修復の亢進が関与する可能性があることが示された。HR 修復はヘテロクロマチン領域における DNA 修復に関与することが示されていることから、ヘテロクロマチン領域における HR 修復の亢進が、がん細胞における X 線や炭素イオン線抵抗性機構の一つである可能性が示された。

<引用文献>

- Goodarzi AA, Jeggo P, Lobrich M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: getting the strong, silent type to relax. DNA Repair (Amst) 2010; 9:1273-82.
- Durante M, Bedford JS, Chen DJ, Conrad S, Cornforth MN, Natarajan AT, et al. From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break. Mutat Res 2013; 756:5-13.
- Chiolo I, Minoda A, Colmenares SU, Polyzos A, Costes SV, Karpen GH. Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete

recombinational repair. Cell 2011; 144:732-44.

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2件)

Katsutoshi Sato, Masaharu Nishikino, Tetsuya Kawachi, Takashi Shimokawa, Takashi Imai, Teruki Teshima, Hiroaki Nishimura, Masaki Kando, A laser-plasma-produced soft X-ray laser at 89 eV generates DNA double-strand breaks in human cancer cells. Journal of radiation research, 56, 2015, 633-638.

Katsutoshi Sato, Takashi Imai, Ryuichi Okayasu, Takashi Shimokawa, Heterochromatin domain number correlates with x-ray and carbon-ion radiation resistance in cancer cells, Radiation Research, 182, 2014, 408-419.

[学会発表](計13件)

佐藤 克俊、今井 高志、下川 卓志、放射線治療後の再増殖腫瘍モデルの樹立とこれらの性質変化の解析、日本放射線影響学会第57回大会、2014年10月1日、鹿児島県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)。

Katsutoshi Sato, Takashi Imai, Takashi Shimokawa, Repeated carbon ion beam irradiations confer the carbon ion beam resistance but not X-ray resistance in cancer cells, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sept. 25, 2014, Pacifico Yokohama(Kanagawa, Yokohama).

Ma Liqiu, Katsutoshi Sato, Takashi Imai, Takashi Shimokawa, Impact of grafted tumor types and host mouse strains on metastasis repression by the C-ion and iDCs combination therapy, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sept. 25, 2014, Pacifico Yokohama(Kanagawa, Yokohama).

坂本 慶充、関根 絵美子、馬 立秋、佐藤 克俊、藤崎 真吾、中西 郁夫、下川 卓志、ハイスループット放射線防護剤スクリーニング法の高度化、フリーラジカルサマースクール in 館山 2014、2014年8月7日、筑波大学館山研修所(千葉県・館山市)。

下川 卓志、関根 絵美子、中西 郁夫、佐藤 克俊、放射線治療のための併用療法・薬剤の開発、Biothech2014、2014年5月14日、東京ビッグサイト(東京都・

江東区)。

Katsutoshi Sato, Takashi Imai, Ryuichi Okayasu, Takashi Shimokawa, Characterization of X-ray and carbon ion beam resistant cancer cells for effective control of radioresistant tumor, The 2nd International Symposium of Training Plans for Oncology Professionals, Jan. 18, 2014, Grand Front Osaka Knowledge Capital (Osaka, Osaka).

佐藤 克俊、入江 大介、今井 高志、下川 卓志、放射線治療モデルによる再増殖腫瘍の樹立とその性質の解析、日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月18日、ホテルクラウンパレス青森(青森県・青森市)。

下川 卓志、佐藤 克俊、入江 大介、馬 立秋、森竹 浩之、大塚 裕美、菅 和美、中里 真弓、今井 高志、炭素イオン線による肺線維化マウスモデルにおけるLETの影響、日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月18日、ホテルクラウンパレス青森(青森県・青森市)。

Katsutoshi Sato, Takashi Imai, Takashi Shimokawa, Heterochromatin focus number correlates with X-ray and carbon ion beam resistance in cancer cells, The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct. 3, 2013, Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama).

Takashi Shimokawa, Hidetoshi Fujita, Akihiro Hosoi, Katsutoshi Sato, Kazuhiro Kakimi, Takashi Imai, Analysis of underlying mechanisms for combination therapy of carbon-ion irradiation and dendritic cell immunotherapy, The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct. 3, 2013, Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama).

Takashi Imai, Mayumi Fujita, Katsutoshi Sato, Takashi Shimokawa, Molecular analysis of the different responses of cancer cell to radiation, The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct. 3, 2013, Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama).

Katsutoshi Sato, Daisuke Irie, Miyako Nakawatari, Etsuko Nakamura, Hiroyuki Moritake, Takashi Imai, Takashi Shimokawa, Establishment and characterization of novel carbon-ion beam resistance cells, Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposium 2013 (HITSRS 2013), May 3, 2013, Keiyo Bank Culture Plaza (Chiba, Chiba). Takashi Shimokawa, Hidetoshi Fujita,

Katsutoshi Sato, Miyako Nakawatari,
Tomoko Fujita, Hiroyuki Moritake, Ken
Ando, Daisuke Irie, Takashi Imai,
Elucidating the mechanisms behind late
lung injury after carbon ion
irradiation, Heavy Ion in Therapy and
Space Radiation Symposium 2013 (HITSRS
2013), May 3, 2013, Keiyo Bank Culture
Plaza (Chiba, Chiba).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 克俊 (KATSUTOSHI, Sato)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所

重粒子医科学センター

研究員

研究者番号：20589650