

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19710049  
 研究課題名（和文）より有効な放射線療法に向けた新規放射線耐性責任遺伝子の網羅的単離  
 研究課題名（英文）Screening of the candidate gene involved in clinically relevant radioresistance  
 研究代表者  
 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

## 研究成果の概要：

放射線療法時に見られる放射線耐性細胞は予後を左右する重要な因子の 1 つである。本研究では、2Gy/day の X 線を 30 日以上照射し続けても増殖する放射線耐性細胞株の樹立を試み、解析した。その結果、放射線耐性細胞では効率的に X 線で誘発される DNA2 本鎖切断を修復している事が分かった。また、PCR based differential display 法による遺伝子発現解析から、放射線耐性細胞に特異的に発現が変動している遺伝子が幾つか得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

## 研究分野：分子放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線耐性・放射線療法・遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

がんの 3 大治療法である放射線療法は局所制御が可能な点から、広く使われている。治療機器の性能の向上は著しいものの、放射線耐性細胞の出現と言う解決すべき課題が今なお残っている。標準的な放射線療法は、2Gy/day の X 線を 30 回以上照射することで行われるが、放射線耐性細胞の存在は治療の予後を左右する重要な要因の一つである。従って、放射線耐性細胞の性質を理解することはより有効な放射線療法の開発には不可欠である。しかし、2Gy/day の X 線を照射し続

けても分裂・増殖する臨床的な放射線耐性細胞は存在していなかった。本研究では、放射線療法時に出現する放射線耐性細胞のモデルとなる、臨床的な放射線耐性細胞を樹立してその解析に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

標準的な放射線療法で用いられる 2Gy/day の X 線を照射し続けても分裂・増殖するヒト由来の放射線耐性細胞株を樹立して、その性質を親株と比較する事でより有効な放射線療法の開発を目指した。特に、遺伝子発現の

違いに注目して放射線耐性に関与する遺伝子の単離を目指した。

### 3. 研究の方法

[細胞]

ヒト肝がん由来の HepG2 細胞及び、ヒト口腔がん由来の SAS 細胞を用いた。

[放射線耐性細胞の樹立]

1 日に照射する X 線の量を段階的に増すことで、2Gy/day の X 線を毎日照射し続けても増殖する臨床的な放射線耐性細胞の樹立を試みた。

[X 線で誘発される DNA 損傷の解析]

ギムザ染色による小核形成の頻度、また細胞免疫学的解析による gamma-H2AX foci の形成頻度を調べることで行った。

[細胞周期の解析]

細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、FACS 解析を行った。

[遺伝子発現]

PCR-based differential display 法により、放射線耐性細胞特異的に発現が変動している遺伝子の単離を試みた。

### 4. 研究成果

[臨床的な放射線耐性細胞の樹立]

HepG2 及び SAS から 2Gy/day の X 線を照射し続けても増殖する、臨床的な放射線耐性細胞である HepG2-8960-R 及び SAS-R を樹立した(右図)。親株である HepG2 は照射総線量が 20Gy 辺りまでは増殖するのに対して、HepG2-8960-R 細胞は、2Gy/day の X 線を 30 日照射し続けても増殖することは明らかである(A)。SAS についても、照射総線量が 20Gy 辺りまでは増殖するものの、その後総細胞数は減少するのに対して、SAS-R は 2Gy/day の X 線を照射し続けても増殖することは明らかである(B)。従って、臨床的な放射線耐性細胞を独立に 2 系統樹立したと考えられる。2Gy/day の X 線を照射し続けても増殖する細胞は、世界ではじめてである。

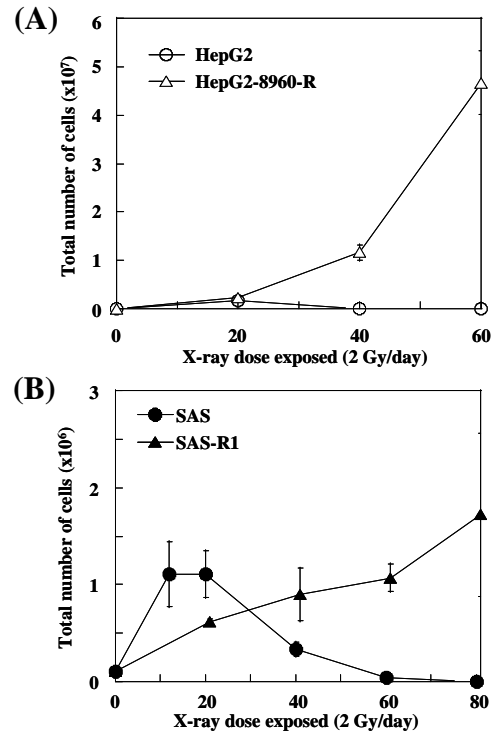
[X 線で誘発される DNA 損傷の修復]

X 線照射により形成される小核及び gamma-H2AX foci の頻度は、放射線耐性細胞では親株に比べて低いことが明らかとなった。このことは、放射線耐性細胞では効率的に X 線で誘発された DNA の 2 本鎖切断を修復している事を示唆する。

[細胞周期]

放射線耐性細胞では、親株に比べて S 期の細胞集団の多いことが FACS 解析から明らかになった。このことは、放射線耐性細胞ではより修復能の高い相同組換え修復を行っている可能性を示唆するが、更なる検討が必要である。

[放射線耐性細胞で発現が変動している遺伝子の単離]



PCR-base differential display 法においては、120 種類の primer pair を用いて解析を行った。HepG2 と HepG2-8960-R 及び SAS と SAS-R 間で共通して発現が変動している PCR 産物が 11 種類得られている。今後は、これらの PCR 産物の塩基配列を解析し、実際に放射線耐性に関与しているのかを検討する。

### 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 10 件)

- ① Yamamoto Y, Usuda N, Takatsuji T, Kawahara Y, Fukumoto M. Long incubation period for the induction of cancer by thorotrast is attributed to the uneven irradiation of liver cells at the microscopic level. *Radiat Res.* 2009 171:494-503. (査読有)
- ② Kawahara Y, Li L, Baba T, Nakagawa H, Shimura T, Yamamoto Y, Ohkubo Y, Fukumoto M. Clinically relevant radioresistant cells efficiently repair DNA double-strand breaks induced by X-rays. *Cancer Sci.* 2009 100:747-752. (査読有)
- ③ Ohtake Y, Maruko A, Kawahara Y, Fukumoto M, Ohkubo Y. Stabilities of <sup>67</sup>Ga- and <sup>111</sup>In-labeled transferrin in vitro. *Protein Pept Lett.* 2009 16:138-142. (査読有)
- ④ Baba T, Nishimura M, Kawahara Y, Ueda

- N, Naitoh S, Kume M, Yamamoto Y, Fujita J, Funae Y, Fukumoto M. Analysis of gene and protein expression of cytochrome P450 and stress-associated molecules in rat liver after spaceflight. *Pathol Int.* 2008 58:589-595. (査読有)
- ⑤ Roudkenar MH, Halabian R, Ghasempour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, Kuwahara Y, Fukumoto M, Shokrgozar MA. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H2O2 toxicity. *Arch Med Res.* 2008 396:560-566. (査読有)
- ⑥ Roudkenar MH, Li L, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Wang L, Kasaoka S, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M. Gene expression profiles in mouse liver cells after exposure to different types of radiation. *J Radiat Res.* 2008 49:29-40. (査読有)
- ⑦ Roudkenar MH, Bouzari S, Kuwahara Y, Roushandeh AM, Baba T, Oloomi M, Fukumoto M. Induction of apoptosis on K562 cell line and double strand breaks on colon cancer cell line expressing high affinity receptor for granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). *Iran Biomed J.* 2008 12:1-6. (査読有)
- ⑧ Wang L, Kuwahara Y, Li L, Baba T, Shin RW, Ohkubo Y, Ono K, Fukumoto M. Analysis of Common Deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 2007 83:433-442. (査読有)
- ⑨ Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh AM, Ebshima S, Abe S, Ohkubo Y, Fukumoto M. Oxidative stress induced Lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *J Radiat Res.* 2007 48:39-44. (査読有)
- ⑩ Roudkenar MH, Bouzari S, Oolomi M, Kuwahara Y, Roushandeh AM, Baba T, Fukumoto M. Assessment of GM-CSF receptors by real-time RT-PCR on cell lines expressing high and low affinity receptors and their relation to cytotoxic effect of chimeric protein (StxA1-GM-CSF) *DARU.* 2007 15:151-155. (査読有)
- [学会発表] (計 23 件)
- ① 桑原 義和, 森 美由紀, 中川 浩伸, 志村 勉, 福本 学 ラパマイシン投与による放射線耐性細胞のX線に対する増感効果 第 51 回 日本放射線影響学会大会 2008 年 11 月 19-21 日 福岡 (口頭)
- ② 桑原 義和, 中川 浩伸, 森 美由紀, 志村 勉, 福本 学 放射線感受性を高感度に検出するHigh density survival assayの改良開発 第 51 回 日本放射線影響学会大会 2008 年 11 月 19-21 日 福岡 (ポスター)
- ③ 志村 勉, 桑原 義和, 福本 学, アラジヤム ミリット複製フォーク進行阻害により誘導されるDNA 2 重鎖切断の生成機構とその修復 第 51 回 日本放射線影響学会大会 2008 年 11 月 19-21 日 福岡
- ④ 日高 征幸, 尾田 正二, 漆原 佑介, 桑原 義和, 福本 学, 三谷 啓志 DNA損傷応答遺伝子ric1の機能解析 第 51 回 日本放射線影響学会大会 2008 年 11 月 19-21 日 福岡
- ⑤ 志村 勉, 角田 智, 中川 浩伸, 桑原 義和, 福本 学 X線長期被ばくの生物影響: サイクリンD1 の過剰発現によるG1/Sチェックポイント機構の損失 第 51 回 日本放射線影響学会大会 2008 年 11 月 19-21 日 福岡
- ⑥ Kuwahara Y, Nakagawa H, Shimura T, Mori M, Kurihara A, Baba T, Fukumoto M. Rapamycin abrogates the phenotype of acquired radioresistance *in vivo*. 第 67 回 日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日(名古屋) Workshops 口頭
- ⑦ Baba T, Nakagawa H, Kuwahara Y, Kurihara A, Fukumoto M. Analysis of chromosomal loci with high frequency of loss of heterozygosity in Thorotrast-induced liver tumors. 第 67 回 日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日(名古屋)
- ⑧ Kurihara A, Kuwahara Y, Shimura T, Yamamoto Y, Fukumoto M. Dose chronic exposure to ionizing radiation induce somatic mutations in the D-loop of mitochondrial DNA? 第 67 回 日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日(名古屋)
- ⑨ Yamamoto Y, Kuwahara Y, Fukumoto M. Long incubation period of cancer by internal irradiation is attributed to the uneven irradiation at microscopic level. 第 67 回 日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日(名古屋)
- ⑩ Nakagawa H, Kuwahara Y, Miyashita H, Mori S, Shimura T, Mori M, Baba T, Fukumoto M. Establishment and characterization of a radioresistant cell line from oral squamous cell carcinoma cell line, SAS cells. 第 67

- 回 日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28-30 日(名古屋)
- ⑬ 福本 学、桑原 義和 ヒト放射線内部被ばくによる肝発がんの分子機構：トロトラスト症から 第 40 回日本臨床分子形態学会総会 (シンポジウム) 2008 年 10 月 3-4 日にある(福岡)
- ⑭ 桑原 義和、馬場 泰輔、井上 和也、栗原 愛、福本 学 放射線耐性細胞ではX線で誘発されるDNAの 2 本鎖切断は正確に修復される 第 50 回 日本放射線影響学会大会 2007 年 11 月 14-17 日(千葉) 口頭
- ⑮ 栗原 愛、王 ル、井上 和也、桑原 義和、山本 雄造、福本 学 ミトコンドリアの D-loop領域に放射線被ばくに特異的な変異は存在するか? 第 50 回 日本放射線影響学会大会 2007 年 11 月 14-17 日(千葉)
- ⑯ 井上 和也、高橋 由明、村田 和弘、桑原 義和、志村 勉、福本 学 放射線耐性及び長期放射線被ばく細胞におけるゲノムワイドなメチル化領域の探索 第 50 回 日本放射線影響学会大会 2007 年 11 月 14-17 日(千葉)
- ⑰ 馬場 泰輔、桑原 義和、井上 和也、栗原 愛、鈴木 実、小野 公二、福本 学 分離培養したラット肝構成細胞の $\gamma$ 線に対する遺伝子発現変化 第 50 回 日本放射線影響学会大会 2007 年 11 月 14-17 日(千葉)
- ⑱ Kurihara A, Kondoh T, Kashino G, Ono K, Shinohara K, Kuwahara Y, Fukumoto M. Histopathological study of rat brain exposed to X-ray microplanar beams. 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3-5 日(横浜)
- ⑲ Baba T, Kuwahara Y, Kurihara A, Fukumoto M. Loss of heterozygosity on chromosome 8q21.2-q21.3 which is associated with Thorotrast-induced liver tumors. 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3-5 日(横浜)
- ⑳ Kuwahara Y, Baba T, Kurihara A, Fukumoto M. Characterization of radioresistant cells established by long-term X-ray exposure. 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3-5 日(横浜) ポスター
- ㉑ Hidaka M, Oda S, Kuwahara Y, Fukumoto M, Mitani H. The mutation of ricl induces delayed repair of DNA double strand breaks, cell death inhibition and early checkpoint release. 13th International congress of radiation research (San Francisco, USA) 2007 年 7 月 8-12 日
- ㉒ Shimada Y, Ebishima S, Yamaguchi Y, Kuwahara Y, Kakinuma S, Amasaki Y,

- Nishimura M, Imaoka T, Kobayashi Y, Sato Y. Methylation of SOCS3 and p15 in carbon-ioninduced thymic lymphomas of B6C3F1 mice. 13th International congress of radiation research (San Francisco, USA) 2007 年 7 月 8-12 日
- 21 Kurihara A, Wang L, Kuwahara Y, Baba T, Ono K, Fukumoto M. Analysis of Common Deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation. 13th International congress of radiation research (San Francisco, USA) 2007 年 7 月 8-12 日
- 22 馬場 泰輔、桑原 義和、井上 和也、栗原 愛、福本 学 肝腫瘍における染色体 13q31 の LOH 解析 第 4 回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム 2007 年 6 月 4 日(仙台)
- 23 桑原 義和、馬場 泰輔、井上 和也、栗原 愛、進藤 智彦、福本 学 放射線耐性細胞株の樹立とその特徴解析 第 4 回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム 2007 年 6 月 4 日(仙台) ポスター

[その他]

ホームページ等

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/path/>  
新聞掲載

Medical Tribune VOL.41 NO.3 p.35 2008.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑原 義和(Yoshikazu Kuwahara)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：00392225

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし