

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591391

研究課題名(和文) 放射線抵抗性静止期癌細胞の損傷修復遺伝子抑制による新たな治療方法の開発

研究課題名(英文) New approach of radiotherapy to non-cycling tumor stem cells by repair gene inhibition

研究代表者

川口 修 (KAWAGUCHI OSAMU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90276428

研究成果の概要(和文)：腫瘍の放射線抵抗性と関連すると考えられる静止期幹細胞の感受性を高めるための基礎実験を行った。腫瘍は低栄養状態により静止期に誘導し、正常細胞は接触による細胞周期停止により実験を行った。放射線による損傷修復遺伝子である ATM, NBS1 遺伝子を抑制する目的で ATM, NBS1 inhibitor を使用したところ、静止期癌細胞でも正常細胞でも同様に誤修復が誘導された。一方で、対数増殖期の癌細胞、正常線維芽細胞でも ATM, NBS1 阻害剤を使用して放射線損傷修復を経時的にみたところ、ATM inhibitor、NBS1 inhibitor でも再結合できない染色体の fragments の増加が見られた。正常組織では、静止期にある細胞分画が多いと考えられ、腫瘍の増殖期細胞を死滅させることで、癌幹細胞が分裂することを狙った治療法として ATM, NBS1 抑制は意義がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Confluent normal fibroblast cells and non-cycling tumor cells were exposed to X-rays and chromosome aberrations were investigated in the first G<sub>2</sub>/M phase after exposure. Cells were subcultured 24 h with ATM and NBS1 inhibitor after exposure and chromosome aberration analysis was performed to see the inhibitory effects. Chromosome damage was assessed in chromosomes 1 and 3 using whole chromosome fluorescence in situ hybridization (FISH). After irradiation with 2.5 Gy, the yield of chromosome aberrations and fragments were significantly higher in cells with ATM and NBS1 inhibitor. In contrast, when cycling cells were irradiated and G<sub>2</sub> chromosome aberrations were analyzed, the yield of chromatid breaks was higher in ATM and NBS1 inhibitor treated cells. Since in normal tissues non-cycling components appear to be much more than tumor tissues, increase of chromatid breaks in cycling cells is hopeful to improve tumor radiation therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：ATM, NBS1, 修復抑制、染色体解析、静止期

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞には、個体を形成する様々な体細胞に分化する能力をもつ幹細胞と、組織固有の多分化能を有して各臓器・組織を構成する細胞の供給源となる組織幹細胞の2種類が存在する。組織幹細胞は自己複製によって幹細胞を維持すると同時に、不均等分裂により一部が自己複製のサイクルから逸脱して成熟細胞へと分化し、組織を構成する細胞を作り出す。組織幹細胞は、自己複製能、多分化能を有し損傷した組織を修復することができるが、組織に持続的に存在する幹細胞の遺伝子に変異が蓄積することで癌細胞が発生するという癌幹細胞仮説が提唱されている。すなわち、多くの場合、癌幹細胞の起源は通常の組織幹細胞と考えられ、組織幹細胞に遺伝子変異が蓄積し癌幹細胞になると考えられている。癌幹細胞は正常な組織幹細胞と同様に、特別な微小環境（ニッチ）中に存在していると考えられている。正常細胞の多くは静止期として存在し、静止期正常細胞は癌細胞より放射線に対し抵抗性を示すことにより放射線治療が成り立つが、一方、癌幹細胞も静止期にあると考えられ、放射線治療、化学療法に抵抗性を示すと考えられる。静止期にいると考えられる癌幹細胞の感受性を高めることが、放射線治療の成績向上に不可欠と考えられる。

放射線治療の主なターゲットは細胞核内のDNAでありDNAの損傷修復に初期に関与すると考えられるATM, NBS1の抑制による放射線増感効果を細胞周期ごとに確認する実験は行われていないため、有意義な研究となりうると考えている。

## 2. 研究の目的

静止期腫瘍細胞の放射線感受性決定と静止期癌細胞の放射線感受性を高める方法を見出すことにより新たな治療方法を開発することを目的とする。腫瘍組織には増殖期細胞と静止期細胞が混在していると考えられる。放射線に対して抵抗性を示すことが知られている低酸素細胞や腫瘍内に存在する腫瘍幹細胞は静止期と考えられている。多くの研究は増殖機癌細胞をターゲットとしているが、静止期の細胞の感受性や増感方法開発を目的とした研究はほとんどないのが現状である。静止期癌細胞をターゲットとする治療方法の開発は今後の放射線治療成績向上には不可欠な検討課題と考えている。

感受性を高める目的としてATM, NBS1遺伝子を抑制することによる感受性増強試験を行う。

## 3. 研究の方法

癌細胞およびヒト線維芽細胞のPCCによる放射線感受性試験

本研究で使用する癌細胞はヒト由来の肺癌細胞、食道癌、膵臓癌、そしてヒト由来の正常線維芽細胞(3種類)を用いる。各細胞は10%のFBSの栄養状態のもとで数日間培養し、DISHに60-70% confluentの状態まで増殖した時期に1%のFBSを含む培養液に取り替える。低栄養状態で数日間培養することにより癌細胞はG0期で停止した細胞(フローサイトメーターにて細胞周期の確認を行う)を得ることができる。

それぞれの細胞にX線で2.5Gy照射し、照射後、mirin, ATM阻害剤を加えてG0期で培養、修復させた細胞と照射後、直ちにトリプシンで単一細胞とし、培養した細胞における染色体断片数を経時的に24時間まで測定する予定である。ヒト線維芽細胞としては、本年度はNBS1遺伝子に変異を有するGM07166細胞と、ATM遺伝子に異常を有するGM02052, GM01829細胞、正常線維芽細胞を使用する。

さらに細胞周期を進行させた状態でmirin, ATM阻害剤を使用してG2期染色体解析を行う予定である。

## 4. 研究成果

放射線照射によりNBS1遺伝子はMre11, Rad50とMRN複合体を形成して、DNA二本鎖切断修復の主要な役割を担っている。MRN複合体はDNAの切断部に最初に集積されると同時にATMを切断部へ誘導し、ATMを活性化する。活性化されたATMは下流の様々な分子をリン酸化することでDNA損傷に対応する細胞周期チェックポイント機構が動き始める。そこでMRN-ATMを抑制することで、放射線感受性を増強する効果が期待される。

昨年度、ATM, NBS1遺伝子をsiRNAにて抑制する実験を行ったが、静止期では導入が困難であったので、腫瘍細胞(glioma細胞)数種および正常細胞に遺伝子を抑制することが知られているKu55933とMirinを静止期細胞に使用して、染色体損傷、生存率を測定した。各遺伝子の抑制はWestern法により確認した。染色体解析からは、いずれの物質によっても、修復の正確性が著しく低下し、異なる染色体損傷が高いことが示された。Glioma細胞はp53のwild, mutant及びPTENのwild, mutantの4種を用いたが、染色体損傷はwild type, mutantでは異なる結果が得られた。

また、リン酸化されたAKTはwild typeとmutantでは同様にATM阻害剤であるKu55933とMirinにより抑制傾向にみられた。

図1

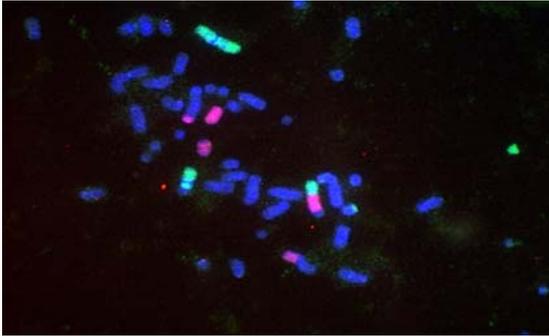


図1にAT由来の線維芽細胞に照射後に1番と3番の染色体プローブを使用したFISH画像を提示する。AT細胞では多数のtranslocation, insertion等の誤修復が誘導されている。このことは、ATMに異常があると、結合能は保たれているが、切断されたDNA断端の認識ができず、誤修復が多数発生すると考えられる。

図2

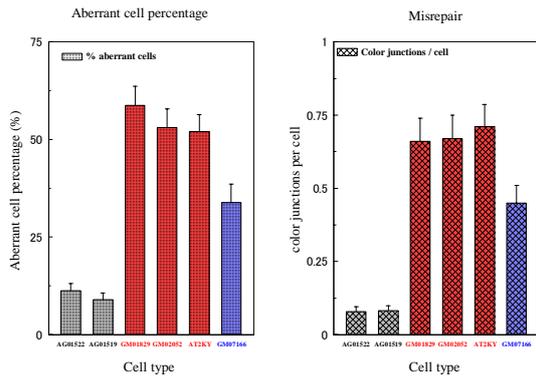
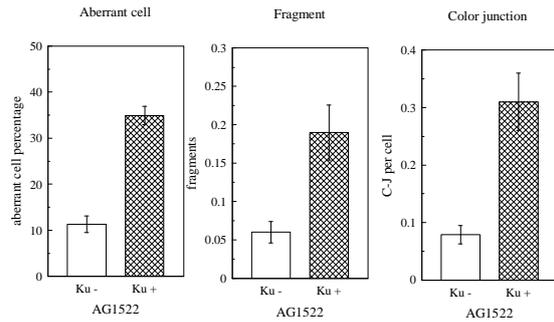


図2では、正常細胞（黒）2種類、AT細胞3種類、NBS1 遺伝子異常を有する細胞1種類の染色体の誤修復データを提示する。

G0期で修復させると、正常細胞では異常細胞の割合も少ない上、誤修復の頻度もAT、NBS1細胞と比較して著しく低いことがわかった。ATM、NBS1阻害剤では誤修復が増加する可能性が示唆され、感受性増強が期待された。

図3にはATM阻害剤を増感剤として使用した結果を提示する。細胞周期を停止させた状態でATM阻害剤を加えるとAT細胞で見られたような誤修復が著しく増加した。低栄養状態で静止期にして勝者した際の癌細胞でも同様な結果が得られた。（データは非掲載）

図3



Confluent AG1522 cells were put on ice before irradiation to avoid quick repair after irradiation. After irradiation, 10 micromol ATM inhibitor (kept on ice) was added and incubated for 24 hours.

細胞周期を進行させた正常細胞、AT、NBS1細胞でATMおよびNBS1阻害剤を加えると、いずれにおいても再結合できない染色分体型の切断の増加が観察された（データは非掲載）。

今後、これらのデータをまとめて論文として発表する予定である。

## 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0件）

〔学会発表〕（計1件）

1. Kawata T, Shigematsu N, Kawaguchi O, Liu C, Furusawa Y, Hirayama R, George K, Cucinotta F (2011) Chromosomal Aberrations in Normal and AT Cells Exposed to High Dose of Low Dose Rate Irradiation. 22<sup>nd</sup> Annual NASA Space Radiation Investigators' Workshop, League City, Texas USA (September 18-21, 2011)

〔図書〕（計0件）

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 修 (KAWAGUCHI OSAMU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90276428

(2) 研究分担者

川田 哲也 (KAWATA TETSUYA)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：60234077

(3) 連携研究者

なし