

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591860

研究課題名(和文)がん幹細胞の放射線応答を指標とした至適な放射線治療効果増強法を目指した基礎的研究

研究課題名(英文)Role of cancer stem in determining radiosensitivity in vitro and in vivo

研究代表者

秋元 哲夫(Akimoto, Tetsuo)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長

研究者番号：10261851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はがん幹細胞の放射線応答を指標とした至適でかつ効率的な放射線治療効果増強法の確立を主目的にして立案された。平成24年度および25年度は培養細胞を用いた基礎的な研究を実施し、それ以降は強度変調放射線治療で根治照射を施行した中咽頭癌症例の予後とp16発現とがん幹細胞マーカーであるCD44の発現との相関について検討をした。対象例の3年全生存、無増悪生存および局所領域制御は73%、64%および76%であり、CD44陽性の57%および70%に比較して有意の良好であった。これらの結果は、がん幹細胞の腫瘍内の多寡が放射線治療の効果や予後予測に重要であることを示すものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study is to establish effective radiosensitizing approach based in the role of cancer stem cells in determining radiosensitivity and/or cellular response to cancer cells. In 2013 and 2014, we performed basic research using cultured cancer cells, and then, we investigated the correlation between clinical outcomes after definitive IMRT for oropharyngeal cancer and the expression of p16 and CD44, cancer stem cell marker. Finally, we demonstrated that the PFS and LRC rates in the CD44(-) patients (86% and 93%, respectively) were significantly higher than those in the CD44(+) patients (57% and 70%, respectively), and concluded that profiling of CD44 and p16 protein expressions by immunohistochemical staining is useful for predicting the treatment outcomes in patients with OPSCC undergoing definitive intensity modulated radiation therapy.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線感受性 がん幹細胞 放射線抵抗性 放射線生物学 放射線治療

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞が治療の反応性や治癒可能性に密接に関与していることが指摘され、放射線感受性に関しても非がん幹細胞と比較してがん幹細胞が放射線抵抗性であることを示唆する報告が相次いでいる。その機序として、放射線による DNA 損傷に対する高い修復能力、増殖能力の維持や再酸化化などのがん幹細胞の放射線応答の特徴に起因するものであることが分かってきている。しかし、その多くの基礎データは 1 回照射によるものが多く、臨床で汎用されている分割照射に対するがん幹細胞の応答や照射間隔の違いによる反応性の相違などについては解明されていない。がん幹細胞に特徴的なシグナルや分子を標的にした治療戦略を有効かつ効率的に用いて放射線治療効果増強を目指すには、がん幹細胞の放射線応答、特に時間因子も加味した分割照射に対する応答を非がん幹細胞との相違を含めて解明する必要がある。本研究は、がん幹細胞の放射線応答を指標とした至適でかつ効率的な放射線治療効果増強法の確立を目指した基礎的研究である。

“がん幹細胞が治療の反応性や治癒可能性に密接に関与しており、がん幹細胞が放射線抵抗性であることを示唆する報告が相次いでいる。その機序として、DNA 損傷に対する高い修復能力、増殖能力や再酸化化などのがん幹細胞の放射線応答の特徴に起因するものであることが指摘されている。しかし、多くの基礎データは 1 回照射によるものが多く、臨床で汎用されている分割照射に対するがん幹細胞の応答や照射間隔の違いによる反応性の相違などについては解明されていない。がん幹細胞にシグナルや分子を標的にした治療戦略を有効かつ効率的に用いて放射線治療効果増強を目指すには、がん幹細胞の放射線応答、特に時間因子も加味した分割照射に対する応答を非がん幹細胞との相違を含めて解明する必要がある。本研究は、がん幹細胞の放射線応答を指標とした至適でかつ効率的な放射線治療効果増強法の確立を目指した基礎的研究である。”

2. 研究の目的

放射線治療は腫瘍に対する根治的局所療法として確立しており、その局所制御率を向上するため、1) 放射線治療の線量の増加、2) 分割線量 (1 回線量) の工夫: 多分割照射および寡分割照射法など、3) 化学療法との併用、などが臨床導入され、前立腺癌、肺癌、食道癌および頭頸部癌を始めとする多くの疾患で治療成績向上に寄与している。しかし、このような治療 intensity 増強のアプローチにも関わらず放射線に対する反応が不良な難治性または放射線抵抗性腫瘍の克服

は十分でなく、未だ解決すべき点が多く残されている。腫瘍の放射線感受性決定に関わる分子機構として、癌抑制遺伝子 p53 の変異の有無、DNA 損傷修復機構、上皮増殖因子受容体 (EGFR) に代表される増殖因子受容体とそのシグナル伝達を始めとする様々な遺伝子や分子の変異・活性化が候補として報告され、腫瘍の放射線感受性修飾の標的としての有用性が検証されてきた。我々も EGFR の発現と放射線感受性との相関やその活性化阻害による放射線感受性の修飾効果について検討してきた (Akimoto T et al: Clin Cancer Res. 5(10): 2884-90, 1999, Akimoto T et al: Int J Radiat Oncol Biol Phys. 44(2): 413-9, 1999, Akimoto T et al: Int J Radiat Oncol Biol Phys. 50(1): 195-201, 2001, Akimoto T et al: Anticancer Res. 24(2B): 811-9, 2004)。これらの生物学的なアプローチの中で、EGFR を標的にした Cetuximab などの分子標治療薬と放射線治療の併用に関しては進行頭頸部癌で放射線治療単独と比較して有意に生存率向上が得られることが示され、生物学的な放射線感受性増強法の臨床での成功例と言える。EGFR とそのシグナル伝達阻害は、腫瘍の増殖抑制に加えて受容体の活性化抑制が受容体の核内移行を阻害し DNA 損傷修復機能を抑制的に制御することが、放射線感受性増感の主な機序と preclinical study では示されている。しかし、Cetuximab 併用も放射線治療の分割法により併用効果に差があり、上記の頭頸部癌臨床試験では放射線治療の後半で 1 日 2 回の放射線治療を行う Concomitant boost 法で特に治療成績向上が認められることが分かっており、両者の至適な併用方法に関してはその分子機序を含めて研究の余地が多く残されている。加えて、固形腫瘍では遺伝子や関連分子・シグナルの活性化という腫瘍そのものに起因する放射線感受性や放射線応答の規定因子のみならず、腫瘍と間質との相互作用や血管新生の状態に基づく腫瘍の酸素濃度などの腫瘍の微小環境が放射線感受性やその反応性に影響する。このような複雑な要因が、細胞レベルと組織レベルの放射線感受性の一元的な解釈を難しくしており、放射線感受性と反応性の乖離の一因となっている。

近年の研究で固形腫瘍のがん細胞に一定に割合で幹細胞と同様の性質をもった自己複製能および多分化能を有するとがん幹細胞が含まれており、それが腫瘍の発生に関与することが示され、急性骨髄性白血病において初めて同定された以降、様々な癌においてがん幹細胞の発見・同定が相次いでいる。放射線治療効果とがん幹細胞との関連の観点からは、腫瘍の縮小の早さを指標とする放射線反応性は、腫瘍の構成要素の大部分を占める非がん幹細胞の放射線治療による細胞死や吸収・処理がその規程因子となる。しかし、放射線治療のような局所療法で腫瘍を局所制御に導くには、再発の起源となるがん幹

細胞の根絶が重要となる。上記のように、放射線に対する反応性は非がん幹細胞とがん幹細胞では異なることや、非がん幹細胞とがん幹細胞の腫瘍内の局在の違いによる微小環境の相違が放射線感受性の差となって治療効果の相違に密接に関与している。がん幹細胞が化学療法や放射線に抵抗性であることを示唆する報告が相次いでいる。その機序として、1) DNA 損傷修復、2) 増殖能力、3) 再酸素化、などにおいて非がん幹細胞に比較してがん幹細胞が高い能力を有していることに起因するものであることが指摘されている。固形腫瘍の環境には酸素分圧を含めて heterogeneity が存在し、さらに分割照射を用いた放射線治療が進む過程で腫瘍内のがん幹細胞および非がん細胞の置かれている微小環境は刻々と変化していくことが容易に想像される。放射線治療では、治療の後半で腫瘍が治療抵抗性になる腫瘍の加速再増殖の現象があることが従来からよく知られている。この加速再増殖の機序にがん幹細胞が関与していることを示唆する結果も報告されている。がん幹細胞が放射線抵抗性であるとする多くの基礎データは細胞レベルによる放射線の1回照射によるものが多く、臨床で汎用されている分割照射に対するがん幹細胞の応答や照射間隔の違いによる反応性の相違などについては十分に解明されていない。

放射線治療の成否に関与する因子として、1) DNA 損傷修復、2) 細胞周期の再分布、3) 再増殖、4) 再酸素化、という“4つのR”が古典的な放射線生物学で重要であるとされている。分子生物学的な手法を用いてがん細胞の放射線応答や感受性の研究が飛躍的に進展した現在においても、これらの因子の重要性は臨床的な観点からも変わらない。がん幹細胞が有するとされる放射線応答の特性が、この“4つのR”の現象に密接に関与していることは容易に推測できる。そのため、がん幹細胞に特異的なシグナルや分子を標的にした治療戦略を有効かつ効率的に用いて放射線治療効果増強を目指すには、がん幹細胞の放射線応答、特に細胞周期の再分布や治療中の再増殖などの時間因子も加味した分割照射に対する応答を非がん幹細胞との相違を含めて解明する必要がある。これはがん幹細胞に特異的なシグナルや分子機構を標的にした阻害が放射線感受性に与える影響を検証する際やがん幹細胞を標的にした薬剤の至適併用法（放射線治療との併用の至適なタイミングを含めて）を確立する上で重要な基礎となる。さらに、がん幹細胞の生態学的な適所、いわゆるニッチ領域が放射線照射の時間経過でどのように変化していくかを検討して、そのニッチを構築する組織または微小環境を放射線治療で効率的に破綻する方法または破綻していく経緯の手がかりが明らかとなれば、がん幹細胞の放射線感受性や放射線応答を効率的に増強す

る治療法の開発につながると考えられる。放射線治療では、大きい分割線量を用いる定位放射線治療や寡分割照射法ならびに小さな分割線量を1日に複数回行う過分割照射法など種々の分割法の工夫が臨床で行われ、それぞれ臨床試験などでもその有効性が確立している。しかし、通常分割照射に併用すると有効な化学放射線療法が多分割照射法では十分な上乗せ効果が得られない、また頭頸部癌の標準的な化学放射線療法に放射線知慮併用で有効性が示されている Cetuximab を併用しても上乗せ効果がないなど、放射線治療の局所制御向上を目指した基礎的ならびに臨床的研究には解明すべき点が多く残されている。このような背景から本研究はがん幹細胞を指標とした更なる放射線治療効果増強の研究として着想された。がん幹細胞はその特徴的な表面マーカーもいくつかのがん細胞で明らかとなりつつあり、治療に対する反応性や効果の動態を非がん幹細胞と区別して解析することが可能となってきている。そのため、これまでの放射線感受性の増感のアプローチをがん幹細胞の動態の観点から再検証する必要性も高い。本研究の目的は、臨床応用可能ながん幹細胞の放射線応答を指標とした至適かつ効率的な放射線治療効果増強法の確立を目指すもので、その基礎的研究から臨床材料を用いた研究に発展させ臨床へのフィードバックへつなげるものである。

3. 研究の方法

平成 24 年度

研究には、CD133 陽性の大腸癌細胞株 HCT116 および当施設で樹立した CD133 陽性脳腫瘍細胞株を用いる。それぞれの細胞で CD133 陰性細胞を分離して、その両者の放射線感受性や放射線応答について *in vitro* および *in vivo* にて検討を進めた。

がん幹細胞と非がん幹細胞の放射線感受性、放射線応答の相違の検討。

上記について、分割照射での放射線応答や感受性の修飾を検討して、分割照射に対する両細胞間での相違を検討して、その相違に重要な役割を果たしている因子を同定する。

同定されたがん幹細胞で特異的な分子および遺伝子を siRNA により抑制・阻害して、単回照射および分割照射に対する放射線感受性および反応性がどのように修飾されるかを解析する。

in vitro での結果を移植腫瘍で検証し、*in vivo* での再現性を確認する。

がん幹細胞の放射線感受性決定における意義を、臨床材料を用いて検証・評価する。

4. 研究成果

がん幹細胞が治療の反応性や治癒可能性

に密接に関連していることが指摘され、放射線感受性に関しても非がん幹細胞と比較してがん幹細胞が放射線抵抗性であることを示唆する報告が相次いでいる。その機序として、放射線による DNA 損傷に対する高い修復能力、増殖能力の維持や再酸素化などががん幹細胞の放射線応答の特徴に起因するものであることが分かってきているが、その詳細や臨床的な意義については、十分に解明されているとは言えない。そこで、本研究は、がん幹細胞の放射線応答を指標とした至適でかつ効率的な放射線治療効果増強法の確立を主目的にして立案された。平成 24 年度および 25 年度は培養細胞を用いた基礎的な研究を実施し、それ以降は強度変調放射線治療で根治照射を施行した中咽頭癌症例の予後と HPV 感染の指標である p16 発現とがん幹細胞マーカーである CD44 の発現との相関について検討をした。対象 58 例の 3 年全生存、無増悪生存および局所領域制御は 73%、64% および 76%、であり、CD44 陰性群の無増悪および局所領域制御率は 86%、93%、であり、CD44 陽性の 57% および 70% に比較して有意の良好であった。p16 と CD44 の統合解析では CD44 陽性/p16 陰性の予後が最も不良であった。これらの結果は、がん幹細胞の腫瘍内の多寡が放射線治療の効果や予後予測に重要であることを示すもので、重要な予後因子およびがん細胞の放射線応答で大きな役割を果たしていることを示唆するものと考えている。

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 16 件)

1. Zenda S, Akimoto T, Mizumoto M, Hayashi R, Arahira S, Okumura T, Sakurai H. Phase II study of proton beam therapy as a nonsurgical approach for mucosal melanoma of the nasal cavity or para-nasal sinuses. *Radiother Oncol.* 118(2): 267-71, 2016.
2. Motegi A, Arahira S, Zenda S, Hayashi R, Fujii M, Akimoto T. Impact of expression of CD44, a cancer stem cell marker, on the treatment outcomes of intensity-modulated radiotherapy in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 94(3): 461-8, 2016.
3. Nakamura N, Takahashi O, Zenda S, Kawamori J, Ogita M, Onozawa M, Arahira S, Toshima M, Motegi A, Hirano Y, Hojo H, Akimoto T. Neuropathic Pain Features in Patients with Bone Metastases. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 28: 204-208, 2016.
4. Hirano Y, Nakamura N, Zenda S, Hojo H, Motegi A, Arahira S, Toshima M, Onozawa M, Akimoto T. Incidence and severity of adverse events associated with re-irradiation for spine or pelvic bone metastases. *Int J Clin Oncol.* In press.
5. Kohno R, Yamaguchi H, Motegi K, Tanaka F, Akita T, Nagata Y, Hotta K, Miyagishi T, Nishioka S, Dohmae T, Akimoto T; Position verification of the RADPOS 4-D in-vivo dosimetry system; Accepted in *International Journal of Medical Physics, Clinical Engineering and Radiation Oncology* in press.
6. Mizutani S, Takada Y, Kohno R, Hotta K, Tansho R, Akimoto T; Application of dose kernel calculation using a simplified Monte Carlo method to treatment planning for scanned proton beams; Accepted in *J. Appl. Clin. Med. Phys* 8;17(2): 574, 2016.
7. Hotta K, Kohno R, Nagafuchi K, Yamaguchi H, Tansho R, Takada Y, Akimoto T. Evaluation of Monitor Unit Calculation Based on Measurement and Calculation with a Simplified Monte Carlo Method for Passive Beam Delivery System in Proton Beam Therapy. *Journal of Applied Clinical Medical Physics* 16; 228-238, 2015.
8. Zenda S, Kawashima M, Arahira S, Kohno R, Nishio T, Tahara M, Hayashi R, Akimoto T. Late toxicity of proton beam therapy for patients with the nasal cavity, para-nasal sinuses, or involving the skull base malignancy: importance of long-term follow-up. *Int J Clin Oncol.* 20(3): 447-54, 2015.
9. Tahara M, Kiyota N, Mizusawa J, Nakamura K, Hayashi R, Akimoto T, Hasegawa Y, Iwae S, Monden N, Matsuura K, Fujii H, Onozawa Y, Homma A, Kubota A, Fukuda H, Fujii M. Phase II trial of chemoradiotherapy with S-1 plus cisplatin for unresectable locally advanced head and neck cancer (JCOG0706). *Cancer Sci.* 106(6): 726-33, 2015.
10. Mizowaki T, Aoki M, Nakamura K, Yorozu A, Kokubo M, Karasawa K, Kozuka T, Nakajima N, Sasai K, Akimoto T. Current status and outcomes of patients developing PSA recurrence after prostatectomy who were treated with salvage radiotherapy: a JROSG surveillance study. *J Radiat Res.* 56(4): 750-6 2015.

- 1 1 . Hashimoto Y, Akimoto T, Iizuka J, Tanabe K, Mitsuhashi N. Correlation between the changes in the EPIC QOL scores and the dose-volume histogram parameters in high-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiation therapy for prostate cancer. Jpn J Clin Oncol. 45(1): 81-7 2015.
- 1 2 . Maebayashi T, Ishikawa H, Yoroza A, Yoshida D, Katoh H, Nemoto K, Ishihara S, Takemoto S, Ishibashi N, Tokumaru S, Akimoto T; Working Subgroup of Urological Cancers in Japanese Radiation Oncology Study Group. Patterns of practice in the radiation therapy for bladder cancer: survey of the Japanese Radiation Oncology Study Group (JROSG). Jpn J Clin Oncol. 2014 44(11): 1109-15.
- 1 3 . Shinozaki T, Hayashi R, Miyazaki M, Tomioka T, Zenda, Tahara T, Akimoto T. Gastrostomy dependence in head and neck carcinoma patient receiving post-operative therapy. Jpn J Clin Oncol 2014 44(11): 1058-62.
- 1 4 . Motegi A, Kawashima M, Arahira S, Zenda S, Toshima M, Onozawa M, Hayashi R, Akimoto T. Accelerated radiotherapy for T1 T2 glottic cancer Head and Neck Head Neck. 2015 7(4): 579-84.
- 1 5 . Motegi K, Kohno R, Ueda T, Shibuya T, Ariji T, Kawashima M, Akimoto T. Evaluating positional accuracy using megavoltage cone-beam computed tomography for IMRT with head-and-neck cancer. J Radiat Res. 55(3): 568-74, 2014.
- 1 6 . Aoki M, Mizowaki T, Akimoto T, Nakamura K, Ejima Y, Jingu K, Tamai Y, Nakajima N, Takemoto S, Kokubo M, Katoh H. Adjuvant radiotherapy after prostatectomy for prostate cancer in Japan: a multi-institutional survey study of the JROSG. J Radiat Res. 55(3): 533-40, 2014.

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1 . 秋元哲夫 集学的治療の中での陽子線治療の可能性 日本癌学会総会(名古屋) 2015.
- 2 . Akimoto T. Role of particle therapy in radiotherapeutic management of esophageal squamous cell carcinoma. 日本医学放射線学会総会(横浜) 2015.
- 3 . Akimoto T. Clinical perspective of combined molecular targeting agents and radiation therapy. International Congress of Radiation Research, Kyoto,

May 25 - 29, 2015.

- 4 . Akimoto T. The role of proton beam therapy in the multidisciplinary treatment for head and neck cancer, lung cancer and esophageal cancer. International Symposium on Radiation Medicine (Taipei), 2015.
- 5 . Akimoto T. Initial results of proton beam therapy with without concurrent chemotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. 60th Annual meeting of ASTRO (SanAntonio, USA), 2015.
- 6 . Akimoto T. Particle therapy for skull base and sinonasal tumors. 第4回アジア頭頸部癌学会(神戸), 2015.
- 7 . 秋元哲夫 放射線感受性のバイオマーカー: 開発の現況と将来展望 日本癌治療学会(京都), 2015.
- 8 . 秋元哲夫 集学的治療における陽子線治療の有効性 日本医学放射線学会秋季臨床大会(盛岡) 2015.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
該当する項目はなし。

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)
該当する項目はなし。

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

- 6 . 研究組織
(1) 研究代表者
秋元哲夫(TETSUO Akimoto)
国立研究開発法人国立がん研究センター
・先端医療開発センター・分野長
研究者番号: 10261851