

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461871

研究課題名(和文) 臨床的放射線耐性獲得機構におけるTGF-beta/EMT経路の関与

研究課題名(英文) Analysis of TGF beta/EMT axis on the formation of clinically-relevant radioresistant phenotype

研究代表者

鈴木 正敏 (SUZUKI, MASATOSHI)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60515823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトがん細胞を用いて、分割照射耐性獲得メカニズムの解明を試みた。一般的な放射線治療と同様に2Gy/日の分割照射に耐性を獲得するがん細胞は、必ず0.5Gy以上2Gy未満の小線量放射線による事前分割照射が必要である。小線量分割照射によって放射線耐性が付与され、分割線量を段階的に増加させる事で放射線耐性を増強させる事を明らかにした。その分子メカニズムについて完全に明らかにするまでには至らなかったが、放射線耐性の獲得に関わると一般的に考えられてきたがん幹細胞形質、上皮間葉転換などが関与する可能性が低い事を示した。また、放射線による致死的なDNA損傷である二重鎖切断の残存数が耐性細胞特異的に少なかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the inducible radioresistant mechanism that cancer cells are able to proliferate under 2 Gy/day of fractionated radiation exposure, so called clinically-relevant radioresistant phenotype (CRR). For CRR formation, we revealed that pre-exposure with less than 2 Gy/day of fractionated dose and stepwise dose-escalation was critically required prior to 2 Gy/day of fractionated exposure. Pre-exposure with lower fractionated dose brought radioresistant phenotype (acquired radioresistance, ARR) and dose-escalation gradually enhanced radioresistance. We also found that the nature of cancer stem cell or epithelial-mesenchymal transition, which is generally known as the factors contributing acquired radioresistance, was not involved in CRR formation. We also found less DNA damage, especially DNA double strand breaks, in radioresistant cells and that suppression of DNA-damage response might be involved in the mechanism of ARR and/or CRR formation.

研究分野：放射線治療生物学

キーワード：臨床的放射線耐性 放射線獲得耐性 放射線治療 分割照射

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 臨床的放射線耐性 (CRR)がん細胞

臨床的放射線耐性 (Clinically Relevant Radioresistance: CRR)細胞は、1日2 Gy の X 線分割照射を30日以上継続しても増殖し続ける能力をもつがん細胞と定義する。親株のほとんどは1日2 Gy、30日の分割照射中に細胞死が誘発され、培養フラスコ中に張り付いている細胞であっても引き続き分割照射下では分裂増殖ができない。このため、1日2 Gy の長期分割照射期間中に分裂増殖を続ける事が出来る親株はほぼ存在しない。その一方で親株に対して、1日照射線量を0.5 Gy以上2 Gy未滿 (小線量)の範囲で段階的に線量を増加させる長期分割照射を事前に行うと、引き続き2 Gy、30日以上長期分割照射に対して分裂増殖を可能とする CRR 細胞が出現することを明らかにした。事前分割照射の意義は不明であるが、12時間ごとに0.5 Gyを照射すると1ヶ月後には親株よりも放射線抵抗性を示すが CRR 細胞ほどの耐性を獲得していない獲得放射線耐性 (Acquired RadioResistance: ARR)を示すことを報告していた。そのため、1日ごとに小線量で分割照射を行った場合にも同様に、ARR 形質を誘発する可能性が考えられ、その検証が必要であった。また、この ARR 細胞の一部だけが CRR 細胞となる (CRR 化) ことから、CRR 化は複数の経路が関与する複雑な過程を想定する必要があった。

研究開始時において、放射線分割照射に対する研究は極めて限られていた。ほとんどは2 Gy以上の高線量照射を数回繰り返した後の生存細胞で、親株に対する放射線耐性獲得の有無を検討したものである。CRR 細胞樹立の過程で、数回の反復照射と長期間の分割照射では得られる結果が異なる事を経験していた。また、数回の反復照射によって獲得された放射線耐性が CRR 形質と同様であるかについての検討はなされていない。そのため、一般的な放射線治療と同様に1日2 Gyの分割照射に対して抵抗性を示す CRR 化の過程に関与する機構を明らかにする事は、放射線治療抵抗性腫瘍の根治的治療を目指す研究において極めて重要であると位置づけた。研究開始時点で、すでに複数のヒトがん細胞株において CRR 細胞の樹立に成功していたことから、CRR 形質は様々なヒトがん細胞において広く共通した特徴であると考えられる。

### (2) 放射線耐性の獲得に関与するメカニズム

12時間ごとの0.5 Gy分割照射で作成した ARR 細胞や CRR 細胞では、X 線照射後の DNA 損傷、特に致死性の高い二重鎖切断残存数が親株細胞と比較して少ない、という共通点を見いだした。その結果、アポトーシス、あるいはオートファジーなどの非アポトーシス型細胞死の誘発頻度が低く、放射線抵抗性を示すと予想される。

12時間ごとに0.5 Gyの分割照射を1ヶ月

間行った ARR 細胞の解析を通じて、サイクリン D1 の蓄積が確認された。サイクリン D1 は細胞周期制御因子の一つであると同時に、DNA 二重鎖切断修復機構の一つである相同組換え修復機構 (HR)に関与して HR を促進していることが示された。このことから、事前照射によって DNA 損傷修復機構が活性化する細胞が CRR 化の初期段階に必要なイベントとなる可能性がある。

ARR 細胞内のサイクリン D1 蓄積には、ARR 細胞で活性化していた AKT を介するシグナル伝達経路が関与している事を報告してきた。しかしながら、1日1回の分割照射によって樹立した CRR 化の過程ではサイクリン D1 発現量も AKT 活性化レベルも親株状態と比べて変化がなかった。この結果は、ARR 細胞からの CRR 化において AKT の不活性化が重要であるか、あるいは分割照射間の時間の差によって耐性獲得機構が異なる可能性が考えられ、この点は明らかにすべきである。

腫瘍の悪性度や放射線抵抗性に関して、がん幹細胞が関与する可能性が強く示唆されていた。肝がん細胞株由来の CRR 細胞の1種では幹細胞マーカーのひとつである CD133 が強く発現していることを見いだした。CD133 の発現は親株や ARR 細胞ではウェスタンブロッティングによるアッセイ系では検出限界以下であり、CRR 細胞特異的に発現していることを確認した。通常、がん細胞では CD133 のプロモーター領域にある DNA は DNA メチル化酵素である DNMT1/DNMT3B によって高度にメチル化修飾を受ける事でその発現が強く抑制されている。CD133 の発現はプロモーター領域の DNA メチル化状態に強く依存しており、DNMT1/DNMT3B は TGF- $\beta$  処理によって強い負の制御をうけるために CD133 は発現しやすくなる。また、TGF- $\beta$  は上皮間葉転換 (EMT) を介してがん細胞をより抵抗性を持つがん幹細胞様の形質に転換させる事が知られている。これらの知見は CRR 過程で TGF- $\beta$  シグナルが活性化する事を示唆している。ただ CRR 化に伴い AKT が基底状態に戻る理由は不明であるため、さらに検討する必要ある。

## 2. 研究の目的

CRR 化に関与するメカニズムを解明するために、事前照射により誘導される ARR 過程とその後の CRR 過程に関与する変化を解析する。特に、EMT やがん幹細胞様の形質獲得の観点から解析するとともに、様々なヒトがん細胞由来 CRR 細胞に広く共通した特徴であるかを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞と X 線照射

本研究では、以下の異なる組織由来のがん細胞株を使用した (神経膠腫由来がん細胞株

A172、非小細胞性肺がん由来細胞株 A549、子宮頸癌由来細胞株 HeLa、肝がん由来細胞株 HepG2、口腔がん由来細胞 SAS)。がん細胞は 5% FBS を含む RPMI 培地で、一般的な方法で培養、継代維持を行った。X 線照射は 150kVp, 20mA, 5.5mm Al+0.1mm Cu フィルターを搭載した X 線発生装置で ARR 細胞には小線量、CRR 細胞には 2 Gy/日の X 線を照射した。

## (2) 蛍光免疫染色

カバーガラス上に播種された細胞は、4 % パラホルムアルデヒド溶液で 10 分間の固定処理を行った後、0.5% トライトン X-100 溶液を氷上で 5 分間処理する事で膜透過処理を行った。フォーカス形成にはリン酸化 H2AX (Ser139)、53BP1 をそれぞれ特異的に認識する 1 次抗体、EMT 評価では E-cadherin と Vimentin、その他サイクリン D1 や ki67、CD133 を特異的に認識する抗体を 5 % ドライミルクを含むトリスバッファー (TBS-DT) で希釈後、固定したサンプルにのせて 37°C で 2 時間処理した。1 次抗体は PBS で洗浄後、2 次抗体として Alexa488、あるいは Alexa594 が結合しているマウスまたはウサギ IgG 抗体を TBS-DT に希釈した溶液をのせて 37°C で 1 時間処理した。細胞核の対比染色は DAPI 染色を行った。

## (3) 幹細胞マーカーの検出

SP 分画検出試料は、トリプシン処理後に回収した細胞でベラパミル処理有無の 2 群を用意し、終濃度 5 $\mu$ g/ml のヘキスト 33342 を 37°C で 90 分間処理した。冷蔵 PBS での洗浄、PI の添加後に 402-406nm、及び 650-670nm の蛍光フィルターを搭載したフローサートメーターで解析した。SP 分画の検出領域はベラパミルを処理したサンプルの解析プロットをもとに作成した。

## 4. 研究成果

### (1) 小線量分割照射細胞の放射線感受性

12 時間ごとの 0.5 Gy 分割照射を 1 ヶ月間行うと ARR 形質を獲得する事を報告していた。そこで、CRR 細胞樹立方法と同様に 1 日ごとに 0.5 Gy の分割照射を行い、ARR 形質獲得の有無を調べた。先行研究で使用した HeLa 細胞を用いて検討したところ、31 回の分割照射 (0.5 Gy/日-31FR) 後の HeLa 細胞は親株と類似した放射線感受性を示した。そこで、0.5 Gy/日の分割照射を 60 回、及び 90 回まで延長し、感受性試験を行ったが、いずれの条件も親株と類似した放射線感受性を示した。

次に、0.5 Gy/日-31FR 細胞と 0.5 Gy/日-90FR 細胞で、1 Gy/日に線量を上昇させた時の分割照射に対する放射線感受性を検討した。分割照射期間中の生存率を調べるために、それぞれの細胞を T-25 フラスコに低密度で播種し、1 Gy/日の分割照射期間中にコロニーを形成させた。同時に、それぞれの細胞で非照射群を別に用意し、コロニー形成能

(PE) も調べた。1 Gy/日の分割照射を 14 回終了後に生存率を調べたところ、0.5 Gy/日-90FR 細胞が 31FR 細胞よりも有意に生存率が高かった。また、1 Gy/日の分割照射に対する感受性を親株と比較するために、分割照射期間中にコロニーを形成させる同様の方法で親株と 0.5 Gy/日-31FR 細胞の生存率を比較した。すると、0.5 Gy/日-31FR 細胞が親株よりも生存率が低い結果となった。0.5 Gy/日-31FR 細胞の PE は、親株の 4 割程度であったことから、事前に行った 0.5 Gy/日の分割照射による細胞死の影響が考えられた。0.5 Gy/日-31FR 細胞は、分割照射を終えた後に 31 日間培養すると (0.5 Gy/日-31FR+31NIR 細胞)、PE が親株の 8 割程度まで回復していたので、この細胞と親株で 1 Gy/日の分割照射に対する感受性を、上述と同様の方法で検討した。すると、0.5 Gy の分割照射を行った細胞が親株よりも放射線抵抗性を示した。以上の結果をまとめると、0.5 Gy/日の照射でも ARR 形質を誘導する事、分割照射回数が多いほど ARR 形質が増強される事、小線量分割照射による放射線耐性は単回照射に対する放射線感受性試験で必ずしも評価が出来ず、分割照射に対する新たな試験法の確立が必要となる事が示唆された。

### (2) 分割照射回数と ARR 形質誘導の検討

ARR 形質の誘導が事前分割照射の回数に依存するか否かを検討した。まず、由来組織の異なるヒトがん細胞株 (A549, HeLa, HepG2, SAS) において、親株が生存できない分割照射線量を調べたところ、今回調べた全てのヒトがん細胞株は 1.5 Gy/日以上分割照射に対して生存する事が出来なかった。ARR 形質は親株と比較して放射線耐性を示す事と定義しているため、親株に 1 Gy/日の事前照射を行い、1.5 Gy/日以上分割照射に生存可能になった時に ARR 形質が誘導されたと評価した。1 Gy/日の事前照射を継続し、1 週間毎に 1.5 Gy/日の分割照射線量に切り換えて生存可能な細胞の出現を検討した。1 Gy/日の事前照射を 1 週間続けた後に 1.5 Gy/日に切り換えた場合には、全ての細胞株で、親株同様に生存細胞は出現しなかった。一方、1 Gy/日の事前照射を 2 週間続けた後に 1.5 Gy/日に切り換えると、A549 のみが 1.5 Gy/日の分割照射に対して生存する細胞が出現した。A549 以外の細胞株は 1 ヶ月以上の 1 Gy/日事前照射によって、1.5 Gy/日に生存できる細胞が出現するようになったが、生存可能な細胞の存在比は細胞株によって異なっていた。以上の検討より、ARR の誘導は事前分割照射回数のような物理的要素ではなく、事前分割照射によって誘導される生物学的要素によって決定されるものと予想された。また、ARR 形質を獲得する 1 Gy/日の事前照射を行った後に、1.5 Gy/日の分割照射を行わずに直接 2 Gy/日の分割照射を行い、CRR 細胞樹立の可否を検討した。親株に比べて ARR 細胞では、2

Gy/日の分割照射下で増殖が可能となる期間が延長していたが、最終的には全て死滅したために、CRR 細胞の形成には至らなかった。そこで、1 Gy/日の事前照射を 100 回まで延長して検討したが、今回調べた全てのがん細胞株では 1 Gy/日の事前照射から CRR 形質は誘導されなかった。ちなみに、1.5 Gy/日の分割照射を介すると CRR 細胞が樹立できた。すなわち、事前照射によって ARR 形質を獲得した細胞が出現し、引き続き事前照射によって ARR 細胞が選択される過程と、分割線量を段階的に増加する事で ARR 形質を増強させる過程が CRR 化に必須である事が示された。

(3) ARR、CRR 細胞の分子生物学的特徴の解析  
前項で記載した 1 Gy/日の事前照射によって ARR 形質を獲得した細胞 (ARR1 細胞) の特徴を解析するために、まず放射線照射による致死性の高い DNA 二重鎖切断の残存について、リン酸化 H2AX と 53BP1 が形成するフォーカスを指標に親株との比較を行った。親株に 1 Gy/日の分割照射を行うと、7 日後以降から急激に細胞数が減少するために、親株と ARR1 細胞に 1 Gy/日の分割照射を 7 回繰り返し、その 24 時間後に細胞を固定してフォーカス形成を検討した。分割照射後の親株では、リン酸化 H2AX と 53BP1 が共局在するフォーカスがほぼ全ての細胞で検出された事に対し、同じ条件の分割照射を行った ARR1 細胞では細胞当りのフォーカス数が少ない事に加えて、1 Gy 照射 24 時間後であっても 53BP1 フォーカスが検出されない細胞が確認された。また、リン酸化 H2AX と 53BP1 が共局在している場合でも、H2AX のリン酸化が弱まっている細胞も検出された。以上の結果より、放射線誘発 DNA 二重鎖切断に関する ARR 細胞の特徴として、二重鎖切断の生成が少ない、あるいはその修復効率が高いこと、あるいは H2AX リン酸化に参与する ATM、ATR、DNA-PKcs いずれかの活性化が抑制される事が予想された。また、DNA 二重鎖切断残存数が少ない結果、アポトーシスや老化様増殖停止、ミトコンドリア・カタストロフィなどの細胞死の誘導も抑制されていた。しかしながら、ARR1 細胞に 2 Gy/日の分割照射を行うと、親株同様に、ほぼ全ての ARR1 細胞でも共局在した多数のフォーカスが残存し、H2AX リン酸化レベルの抑制も観察されなかった結果は、ARR1 細胞には CRR 細胞が含まれていないという結果と一致していた。

先行研究における 12 時間ごとの反復照射ではサイクリン D1 が蓄積し、放射線抵抗性の獲得に参与する事を示唆していた。サイクリン D1 が HR に参与する報告があった事から、1 日 1 回の分割照射における ARR 誘導への関与が考えられた。そこで、ARR1 細胞においてサイクリン D1 と 53BP1 フォーカスを検出する蛍光免疫染色を行った。親株と ARR 細胞のサイクリン D1 の局在に著変は認められず、また、ARR 細胞におけるサイクリン D1 の発現

量は多くの場合親株と同様であり、一部の細胞で核内に多く発現している事が確認された。しかしながら、核内にサイクリン D1 が多く発現している ARR 細胞は扁平化、巨大化していたため、老化様増殖停止が誘導されている事が予想された。そこで、A549 細胞が放射線によって老化様増殖停止が有意に誘発される事、また、老化細胞では増殖マーカーである ki67 の発現が抑制されることが報告されていたので、A549 由来 ARR 細胞で ki67 とサイクリン D1 の蛍光免疫二重染色を行った。すると、サイクリン D1 が核内に多く蓄積している細胞では高頻度に ki67 が陰性であることが分かった。そのため、核内にサイクリン D1 が多く蓄積している細胞は増殖をしていない老化様増殖停止細胞が多く含まれており、ARR 細胞の定義である増殖している細胞とは性質が異なっていた。すなわち、1 日毎に行う分割照射が誘導する ARR 形質の獲得にはサイクリン D1 非依存的な経路の関与が予想された。

また、放射線抵抗性への関与が示唆されている EMT の誘導を確認するために、E-cadherin と Vimentin の発現を蛍光免疫染色で確認したところ、ARR1 細胞、CRR 細胞ともに両タンパク質の発現はほぼ全ての細胞で親株と同様であった事から、放射線が誘発する ARR、及び CRR 形質には EMT が関与しない事が示唆された。

次に、ARR 化及び CRR 化とがん幹細胞の関連性を side population (SP) 分画を指標として調べた。細胞株によって割合は異なっていたが、SP 分画が親株で検出された。しかしながら、親株に 2 Gy/日の分割照射に耐性を示さなかった事から、親株中のがん幹細胞が濃縮した結果が CRR 細胞となる、という仮説は棄却された。そこで、がん幹細胞が非がん幹細胞と比べて ARR 形質や CRR 形質を獲化しやすい可能性を検討するために、まず、親株と CRR 細胞で SP 分画の割合を比較した。4 細胞株を調べたうち、親株、CRR 細胞ともに SP 分画が検出できなかった 1 株を除く全ての細胞株で CRR 細胞に占める SP 分画の割合は増加していた。そこで、最も上昇率の高かった細胞株で ARR 化に伴う SP 分画を調べたところ、親株に比べて有意な増加は確認できなかった。すなわち、耐性獲得過程と SP 分画の割合に相関は見られなかった。SP 分画以外に ALDH 活性の検出も広くがん幹細胞マーカーとして知られている。そこで、CRR 細胞で SP 分画の割合が増加していた細胞株において、CRR 細胞を低密度で播種し、2 Gy/日の分割照射期間中にコロニーを形成した生存細胞で ALDH 活性を検出した。一部の生存コロニーでは ALDH 活性の高い細胞が検出されたが、高い活性を示したのはコロニーを形成する細胞の一部のみであり、活性の低い細胞と共に 1 つの生存コロニーを形成していた。その他の多くの生存コロニーは ALDH 活性が弱い細胞でコロニーが構成されていた。この他、

CD133 を組織幹細胞マーカーとする肝がん、あるいは脳腫瘍由来の CRR 細胞で CD133 を検出した。肝がん細胞である HepG2 由来の CRR 細胞では CD133 を強く発現していたが、この CRR 細胞とは独立して同様に HepG2 から作成した CRR 細胞の CD133 発現は親株と同程度であった。脳腫瘍由来細胞株由来 CRR 細胞も親株と同程度の発現量であった。すなわち、CRR 化にがん幹細胞形質が必須ではない事、また CRR 化におけるがん幹細胞の優位性はない事が示された。

#### 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 1 件)

Fukumoto M., Amanuma T., Kuwahara Y., Shimura T., Suzuki M., Mori S., Kumamoto H., Saito Y., Ohkubo Y., Duan Z., Sano K., Oguchi T., Kainuma K., Usami S., Kinoshita K., Lee I., Fukumoto M., Guanine nucleotide-binding 1 is one of the key molecules contributing to cancer cell radioresistance. Cancer Sci., 査読有、105 (10)、2014、1351-9、10.1111/cas

[学会発表](計 12 件)

鈴木 正敏 他、臨床的放射線耐性細胞ではがん幹細胞様細胞が増加する、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日～2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場 (愛知・名古屋)

鈴木 正敏 他、小線量放射線分割照射による放射線抵抗性の増強、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日～2014 年 10 月 3 日、かごしま県民交流センター (鹿児島・鹿児島)

鈴木 正敏 他、段階的に照射線量を増加させる分割照射を長期間行くと、放射線抵抗性が増強される、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日～2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

鈴木 正敏 他、臨床的放射線耐性 (CRR) 獲得過程における少線量放射線分割照射の役割、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日～2014 年 4 月 26 日、広島国際会議場 (広島・広島)

鈴木 正敏 他、臨床的放射線耐性 (CRR) 獲得過程における小線量放射線分割照射の意義、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日～2013 年 10 月 20 日、ホテルクラウンパレス青森 (青森・青森)

鈴木 正敏 他、臨床的放射線耐性は長期放射線分割照射による獲得耐性を経過する必要がある、第 72 回日本癌学会学

術総会、2013 年 10 月 3 日～2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)  
鈴木 正敏 他、臨床的放射線耐性獲得過程における放射線獲得耐性の意義、第 51 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、2013 年 7 月 6 日、長陵会館 (宮城・仙台)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

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)

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

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/path/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 正敏 (SUZUKI, Masatoshi)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60515823

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

福本 学 (FUKUMOTO, Manabu)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60156809

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