

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861069

研究課題名(和文)非小細胞肺癌の放射線抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of the radiation resistance in non-small cell lung cancer

研究代表者

岡野 奈緒子 (Okano, Naoko)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00647349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌株に対して、炭素イオン線が通常のX線に抵抗性の細胞に対して治療効果があるのか、またそれらの仕組みについて解明することを目的として実験を行った。X線に対する炭素イオン線のRBEを測定し、細胞表面蛋白に対する抗体を用いたフローサイトメトリーを利用して照射抵抗性の細胞を分離することを試みたが、照射抵抗性細胞に選択的に発現する細胞表面マーカーを同定することができず、照射抵抗性細胞を効率的に抽出することが出来なかった。

研究成果の概要(英文)：This studies were aimed to clarify if the carbon ion beam was superior to X-ray resistant cells of non-small cell lung cancer and the molecular biological mechanisms of radio resistance. At first, we calculated the Relative Biological Effectiveness (RBE) of carbon ion beam to X-ray and irradiated the cells by the dose computed with RBE. Then we attempted to derive radiation-resistant cells used with flow cytometry system and antibody to cell surface antigens, but we couldn't identify expressed factors in radio resistant cells and couldn't derive selectively.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線抵抗性 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

肺癌は難治性、進行性の病気であり、2009年の統計では、肺癌による死亡率は男女ともに全国1位となっている。また、特に70歳以上の高齢者の罹患率が高いという特徴がある。肺癌患者には高齢者が多く、喫煙との関連が強いので、喫煙による慢性閉塞性肺疾患などの併存している症例が多く外科手術が不能である症例も少なくない。そのため、いずれの段階、組織型においても放射線治療の果たす役割は非常に大きい。しかし、非小細胞肺癌において、手術をした場合でも5年生存率は、病期I期 (IA、IB期) : 70%、II期 (IIA、IIB期) : 50%、IIIA期 : 25%、手術が行えないIII期で、放射線療法と化学療法の合併療法を受けた場合、5年生存率は15~20%といずれも十分な成績とは言い難い。(1) 今後の放射線治療成績の向上が肺癌の治療成績の向上において不可欠である。

近年、定位照射や強度変調放射線治療などの治療方法や、照射直前に治療位置を確認し正確に治療対象に治療線量を照射できる装置などの治療機器と治療技術の進歩により、治療対象に対し高線量を投与し、かつ周囲の正常組織に対してはより低線量の被曝にとどめるという治療が可能となり、従来の放射線治療と比べ多くの線量を少ない回数で効果的に照射することができるようになったため、以前と比較して治療成績は向上した。重粒子線治療は、よりターゲットに局限した照射が可能であり、さらにDNAの二重鎖切断を起こす割合が高く、高い殺細胞効果が認められ、高い生物学的効果が期待できる。しかしながら、X線より高い治療効果が得られる重粒子線治療においても抵抗性の腫瘍が存在しており、さらに抗がん剤を併用してもなお抵抗性を示す腫瘍細胞が存在している。

放射線抵抗性の原因になっていると現在考えられている細胞に癌幹細胞 (cancer stem cell) がある。Cancer stem cellは正常のstem

cellやprogenitor cellの遺伝子変異により癌化したものと考えられているもので、正常組織の幹細胞と同様に癌の発生、転移の原因となる細胞で、この細胞自体に放射線などの治療に対する抵抗性が認められており、この細胞が照射やその他の治療に抵抗性に残存することで、再増殖やリンパ管、血管を介した転移の起点となっている可能性が考えられている。再発腫瘍の治療抵抗性の原因としても、化学療法や放射線治療の結果残存したそれらの治療に対して抵抗性の細胞が再増殖することにより再発するためであると考えられている。また、残存した癌幹細胞はその自己複製能と分化能のため、転移を起こす原因となる、(2-7)

そこで本研究では、

1. 治療抵抗性を示す細胞は癌幹細胞なのか、
2. 癌幹細胞の治療抵抗性の原因となるメカニズムはいかなるものか、
3. 抵抗性を示す細胞は癌幹細胞だけなのか

といった問題を明らかにすることを目的としている。

- 1) 国立がんセンター 最新がん統計
- 2) Kim CF et al Identification and expansion of bronchial alveolar stem cells in normal lung and lung cancer: *Cell* 121 823-835 2005
- 3) Eramo A et al Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 13 504-514 2008
- 4) Chen YC et al Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *Proc One* 3 e2673 2008
- 5) Jayesh Sagar et al. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review *Cancer Cell*

International;2007,7:9

- 6) Jane E. Visvader et al. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions: *NATURE REVIEWS* 2008, 8 755-767
- 7) Long V Nguyen et al. Cancer stem cells: an evolving concept; *NATURE REVIEWS* 2012, 12:133-143

2. 研究の目的

本研究では、複数種類の非小細胞肺癌細胞株にX線および重粒子線をin vitro, in vivoで臨床における根治線量を照射し、その残存細胞すなわち放射線抵抗性細胞を抽出する。これを癌幹細胞で発現しているCD133、CD44などの発現の有無、また生体内で自立増殖能の有無を確認し、癌幹細胞としての性質を持つ細胞であるか否かを検討する。また、放射線抵抗性を放射線の線質の相違に起因するのかを分子生物学的手法を用いて検証する。また、癌幹細胞以外の残存細胞の発現タンパクや遺伝子変異に共通点がないか探索する。

上記についてはCuiらと同様の手法を用いて(5)、cancer-stem like cellを同定し、その性質、またその他の放射線抵抗性を示した細胞の性質を検討するものである。

(5) Xing Cui et al, Effects of Carbon Ion Beam on Putative Colon Cancer Stem Cells and Its Comparison with X-rays ;*Cancer Res* 2011;71;3676-3687

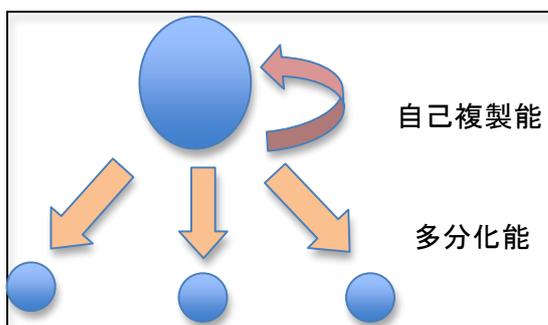


Figure1 癌幹細胞の特徴

3. 研究の方法

実験細胞・照射装置

本研究においては、ATCC (VA, USA)より購入した非小細胞肺癌株 A549、H460を用いた。

それぞれの細胞は、10%FBS と 100U/ml のペニシリンと 100 μg/ml のストレプトマイシンを混注した RPMI-1640(Life Technologies, CA, USA)を培養液として用いた。

X線の照射には、Faxitron RX-650 (100 kVp, 1.14 Gy/min, Faxitron Bioptics, AZ, USA)を用いた。炭素イオン線の照射は群馬大学重粒子線医学研究センターにおいて臨床に用いている線質と同じ 290

MeV/nucleon、6cm の拡大ブラッグピークビーム、拡大ブラッグピークの中心付近で LET 約 50 keV/μm を用いて行った。

①各細胞における RBE の測定

コロニーアッセイ法を用いて測定した。具体的には、細胞を 6cm dish に播種後 37°C で 2 日間培養し、X線、炭素イオン線をそれぞれ照射した。その後 7 日間培養した。その後、25%メタノールで溶解、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色し、50 個以上の細胞からなるコロニーを有意なコロニーとしてコロニー数をカウントし、これを細胞生産率としてプロットし、細胞生存曲線を得た。これを L-Q モデルに fit させて RBE を計算し、導き出した。

②X線照射後の細胞の FACS に適したタイミングの検討

A549、H460 細胞に対して、RBE を参考に播種から 24 時間後にほぼ confluent の状態の細胞に対し、D10 から求めた RBE に近い値である X線 6 Gy、炭素イオン線 2Gy をそれぞれ照射した。照射後、1 時間、16 時間、24 時間、48 時間、72 時間後に PBS で洗浄後、トリプシン処理で dish から細胞を剥離し、洗浄液 (rinsing solution) を用いて洗浄・遠心する作業を 3 回繰り返す。抗 FcR 抗体および抗 CD133 抗体と反応させ、更に洗浄・遠心を行った後、MERCK 社 quava easyCyte HT システムを用いてフローサイトメトリー (FACS) を行った。この結果を Incyte software を用いて解析した。実験において抗体には Miltenyi biotec 社 CD133-PE を使用し、isotype control として同社の Mouse IgG1-PE を使用した。

③X線、炭素イオン線照射細胞の抗 CD133 抗体の反応

②の結果を元に、照射 20 時間後と 96 時間後にそれぞれ抗 CD133 抗体の陽性率を FACS を用いて②と同様の手法で測定した。

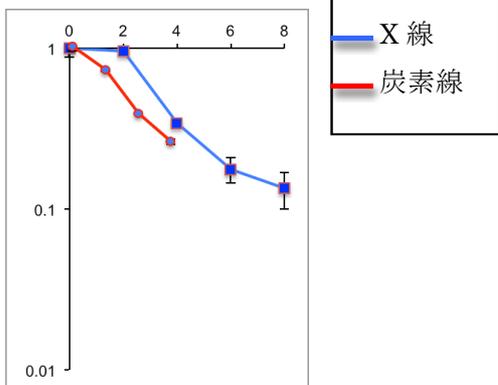
④抗 CD44 抗体、抗 EpCam 抗体との反応

抗 CD44 抗体、抗 CD326 抗体 (EpCAM) はそれぞれ Miltenyi biotec 社 CD44-PE、CD326-PE を使用し、③と同じ手法で FACS により陽性率を計測した。

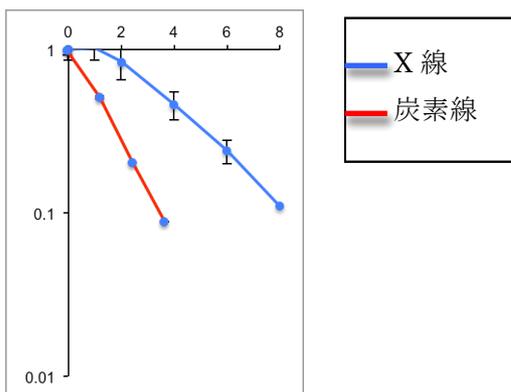
4. 研究成果

①

A549



H460



LQモデルに当てはめると、
A549においてD50におけるRBEは2.2
(仮想D10では4.1)
H460においてD10におけるRBEは3.1
と計算された。

②

CD133(+) (%)

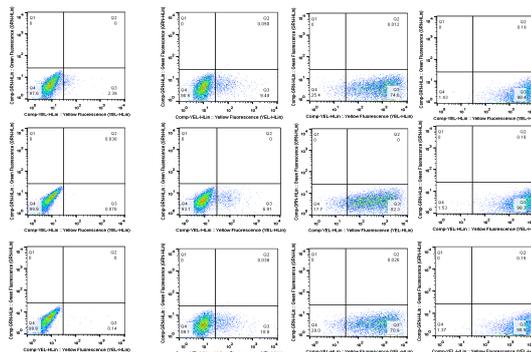
	A549	H460
control	25.68	3.77
1h	13.22	2.53
18h	29.26	10.8
24h	15.53	4.27
48h	26.53	7.25
72h	34.64	9.99

いずれの細胞株でも18時間後とその後は時間経過とともに上昇している傾向があった。

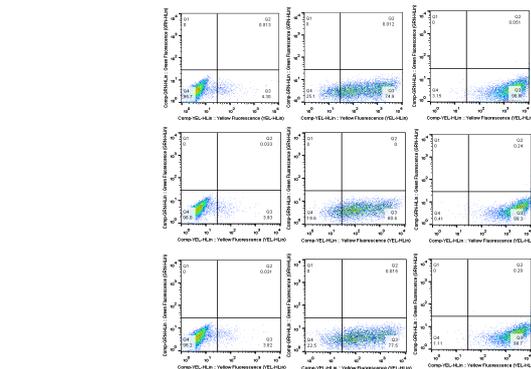
③④

A549(上段から control/X線/炭素線)

Control CD133 CD44 EpCAM

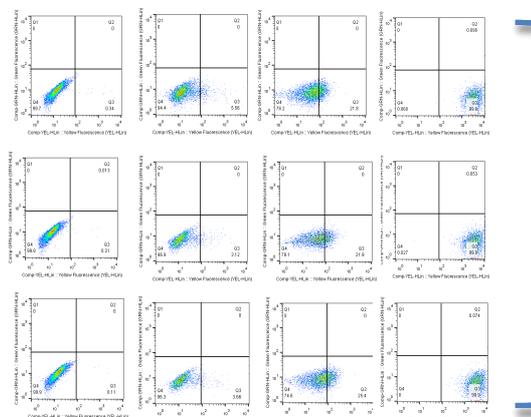


20h

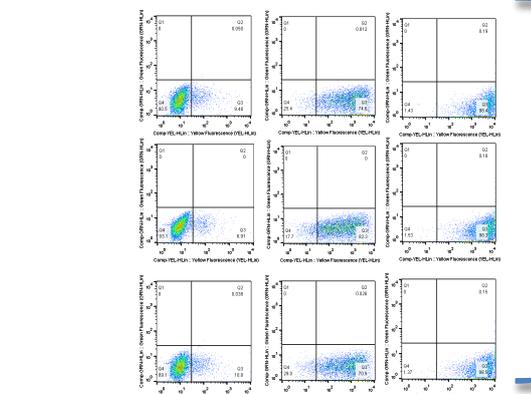


96h

H460



20h



96h

	A549	control	CD133	CD44	EpCAM
	control	1.2405	9.305	97.125	74.406
	X線	0.122	6.8675	98.415	81.9065
20h	炭素イオン	0.1625	10.519	98.66	72.163
	control	0.094	4.1875	97.0755	75.156
	X線	0.1135	3.886	99.48	80.358
96h	炭素イオン	0.175	3.7255	99.0385	76.7075
	H460				
	control	0.355	5.71	99.9245	22.4
	X線	0.2065	3.12	99.9545	22.1145
20h	炭素イオン	0.115	3.62	99.972	25.8
	control	0.1615	4.745	99.105	19.855
	X線	0.166	1.5635	99.325	8.571
96h	炭素イオン	0.159	2.1575	99.49	6.712

上記表に結果の一覧を示す。いずれの表面マーカーも照射により有意な割合の増加は見られず、むしろ低下傾向であった。このことからこれらの表面マーカーに対する抗体反応の陽性・陰性の結果はX線や炭素イオン線への抵抗性と関係がないと考えられた。CD133に於いてはX線に比して炭素イオン線では割合が低下している傾向が見られた。以上の一般的ながん幹細胞様細胞の表面マーカーである表面蛋白の反応を見ることで照射抵抗性細胞かどうかの評価をすることは困難であると考えられた。

本研究で、がん幹細胞様細胞としての特徴を持つと考えられる放射線抵抗性細胞として予定していた性質をもつ細胞群が本研究では得られなかったと考えられたため、in vivoの実験となる以下の実験には不相当であると考え、中止した。
以下に細胞群が採取されていた場合に予定していた実験について記載する。

得られた放射線抵抗性細胞群（表面マーカー陽性）と非抵抗性細胞群（表面マーカー陰性）をそれぞれマウスに移植し、求められたRBEを元に照射し、増大してきたところでその細胞の表面マーカー陽性の割合を元に、照射抵抗性細胞群の割合に変化があるかどうかを照射を行わなかった場合と合わせて検討。また、それらの細胞が、がん幹細胞様細胞としての性質である自己増殖能や分化した腫瘍細胞からの脱分化が見られるかどうかin vivoで兼継する。
また、それらの細胞の表面抗原について他にも適切に評価できるものがあるか検討する。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 奈緒子 (Okano, Naoko)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00647349

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：