

Title	癌幹細胞の誤修復誘導による放射線増感を利用した新たな治療戦略の開発
Sub Title	Misrepair using radiosensitizer and radiosensitivity under non cycling cells
Author	川田, 哲也(Kawata, Tetsuya) 深田, 淳一(Fukada, Junichi)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>グリオーマ細胞を用いてX線、粒子線での染色体異常解析を解析した。放射線増感効果が期待できるNBS1遺伝子の阻害剤であるmirinでCD133+, CD133-細胞で比較を行った。CD133+のstem like cellはCD133-細胞と比較するとAKTの活性化が促進されることがわかった。DNA損傷を修復する能力がCD133+のstem like cellは高いことが示唆された。また、正常線維芽細胞の静止期細胞に粒子線およびX線を照射しPLDRについても検討を行った。エックス線とことなり粒子線では非対数増殖期でも誤修復が多くPLDRが欠損する原因と考えられ粒子線治療の有効性が示唆された。</p> <p>We have demonstrated whether AKT is important molecular targets to control the radioresistance through the activation of phospholitated AKT compared between CD133+ and CD133- glioma tumour cells after ionizing radiation treatment. We showed IR-induced AKT phosphorylation in CD133+ tumour cells than CD133- tumour cells when mirin was used. Our data suggested that the tumour cells expressing CD133+, a maker for the stem cell, was induced the activation of AKT more than CD133- cells after radiation. From this result, it may be said that CD133+cells have greater repair activation in response to DNA damage in cellular radiosensitivity. Confluent normal cells were exposed to X-rays and heavy ions and PLDR was studied using FISH technique. It was found that heavy ions induce similar exchanges between PLDR and PLD condition, suggesting that heavy ion therapy is as effective to non-cycling cells as cycling cells.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2011～2013 課題番号：23591849 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
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23591849seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23591849seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591849

研究課題名(和文) 癌幹細胞の誤修復誘導による放射線増感を利用した新たな治療戦略の開発

研究課題名(英文) Misrepair using radiosensitizer and radiosensitivity under non cycling cells

研究代表者

川田 哲也(Kawata, Tetsuya)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60234077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマ細胞を用いてX線、粒子線での染色体異常解析を解析した。放射線増感効果が期待できるNBS1遺伝子の阻害剤であるmirinでCD133+、CD133-細胞で比較を行った。CD133+のstem like cellはCD133-細胞と比較するとAKTの活性化が促進されることがわかった。DNA損傷を修復する能力がCD133+のstem like cellは高いことが示唆された。また、正常線維芽細胞の静止期細胞に粒子線およびX線を照射しPLDRについても検討を行った。エックス線とことなり粒子線では非対数増殖期でも誤修復が多くPLDRが欠損する原因と考えられ粒子線治療の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated whether AKT is important molecular targets to control the radioresistance through the activation of phospholitated AKT compared between CD133+ and CD133- glioma tumour cells after ionizing radiation treatment. We showed IR-induced AKT phosphorylation in CD133+ tumour cells than CD133- tumour cells when mirin was used. Our data suggested that the tumour cells expressing CD133+, a marker for the stem cell, was induced the activation of AKT more than CD133- cells after radiation. From this result, it may be said that CD133+ cells have greater repair activation in response to DNA damage in cellular radiosensitivity. Confluent normal cells were exposed to X-rays and heavy ions and PLDR was studied using FISH technique. It was found that heavy ions induce similar exchanges between PLDR and PLD condition, suggesting that heavy ion therapy is as effective to non-cycling cells as cycling cells.

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：幹細胞 静止期細胞 放射線増感 PLDR

## 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種類あり、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。

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、がん細胞が発生するというがん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。ニッチには、低酸素ニッチと血管性ニッチがある。低酸素ニッチは固形腫瘍の低酸素分画に存在することから、増殖は停止してG0期にあると考えられている。血管性ニッチは血管内皮細胞に接着することが重要とされ、血管近傍に存在することから、酸素や栄養分に富み、増殖しながらstemnessを維持している。

## 2. 研究の目的

神経膠腫は原発性脳腫瘍の中で最も多く発生する腫瘍であり、特に予後の悪い膠芽腫の平均生存期間は1年程度、5年生存率10%以下である。更に、再発率が非常に高いこともglioblastomaの特性である。近年、薬剤抵抗性、放射線抵抗性などの研究が多くなされ、その結果、脳腫瘍幹細胞の存在が明らかにされた。がん幹細胞は分化したがん細胞よりも抗がん剤や放射線治療に対する感受性が低いことが知られている。更

に、がん幹細胞は放射線照射によるDNA損傷を修復する能力も高いことがわかり、抗がん剤や放射線治療で遺伝子がダメージを受けても容易に死滅しないことが示唆され、再発・転移の原因と考えられていることから、gliomaがん幹細胞をターゲットとしたX線照射の影響を検討することを目的とした。

また、生体内では正常細胞の多くは静止期にあり、がん細胞よりも放射線抵抗性を示すと考えられている。本研究では、正常の線維芽細胞を用いてX線、重粒子線照射による細胞周期による放射線感受性を静止期および対数増殖期で検討を加えX線、重粒子線の細胞周期依存性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経膠腫(glioblastoma multiforme)幹細胞の放射線感受性

gliomaがん細胞U251 cell lineよりstem like cellを樹立

癌幹細胞の生存比率が低く、純粋な癌幹細胞集団を分離することは極めて困難であり、種々の方法で癌幹細胞が濃縮されて細胞集団を癌幹細胞として扱うことが多い。本研究ではスフェア形成法：種々の癌組織から得られた細胞を無血清培地でEGFまたはbEGFを加え培養すると、スフェアを形成する細胞が存在し、その中で癌幹細胞が濃縮され未分化能、多分化能、自己複製能が保持されている。表面マーカー：CD133, CD44, ABCG2等が癌幹細胞のマーカーとして用いられているが、単一マーカーで癌幹細胞と同定できるマーカーはまだ知られておらず、これらのマーカー-positiveな集団の中で、その一部が癌幹細胞である。得られた細胞群をflow cytometry法により確認し、癌幹細胞集団とした。がん幹細胞に対する放射線増感効果をDNA損傷修復遺伝子であるNBS1を抑制するMirinを用いて解析を行なった。

## (2) 線維芽細胞を用いた細胞周期依存性に関する研究

正常の皮膚線維芽細胞である AG1522 を用いて X 線および重粒子線照射を行なった。照射時、細胞は非対数増殖の状態では照射を行い PLDR に関して検討を加えた。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経膠腫(glioblastoma multiforme)幹細胞の放射線感受性に関する研究結果

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。ATM 遺伝子も同様に DNA 切断に早期に反応する遺伝子で、放射線抵抗性腫瘍では ATM, NBS1 遺伝子の活性が静止期でも活性が高い可能性がある。ATM は MRN 複合体依存的に活性化され、活性化 ATM は下流に位置する分子をリン酸化することによって DNA の損傷修復が行われる。従って、MRN-ATM 経路の働きを抑制することで DNA 損傷の修復を阻害し、放射線感受性を増強する効果が期待される。MRN-ATM 経路を阻害する新しい低分子阻害剤である Mirin (MRN 阻害) の研究が報告されている。そこで Mirin を用いて線維芽細胞、癌細胞における放射線増感効果を検討した。線維芽細胞、悪性グリオーマ細胞株を用いて Mirin 及び放射線照射の併用効果を生存率で比較検討した。その結果、線維芽細胞では照射と MIRIN の併用による生存率は影響がみられなかったが、悪性グリオーマ細胞株では低下していた。このことから DNA 損傷修復に關与する MRN - ATM を阻害する薬剤 MIRIN と放射線照射により、悪性グリオーマ細胞は各々単独より併用することで放射線増感効果があることが示唆された。線維芽細胞、癌細胞における静止期、対数増殖期での放射線感受性を p 5 3 の活性、アポトーシスを比較したところ静止期では p 5 3 の活性化もアポトーシスもみられなかった。今年度は ATM の下流にある AKT の活性化を Mirin を用いて検討した。

活性化された AKT は、プロアポトーシス Bcl-2 ファミリーのメンバーである Bad、Bax、カスパーゼ-9、GSK-3、FoxO1 をリン酸化することで、アポトーシスや細胞増殖を抑制する。悪性グリオーマ細胞では Mirin により AKT の活性化が低下したことが認められた。しかし線維芽細胞では認められなかった。このことから悪性グリオーマ細胞では Mirin による DNA 損傷修復が阻害されたことが示唆された。

放射線増感作用のメカニズムを解明するため、腫瘍細胞生存の重要なシグナル分子である AKT の活性化状態を放射線照射後検討した。CD133+、と CD133- 細胞間で比較検討した。その結果、CD133+ の stem like cell では、AKT の活性化状態、phosphorylated AKT が検出された。放射線増感作用のメカニズムを解明するため、腫瘍細胞生存の重要なシグナル分子である AKT の活性化状態を放射線照射後検討した。CD133+、と CD133- 細胞間で比較検討した。その結果、CD133+ の stem like cell では、AKT の活性化状態、phosphorylated AKT が検出された。CD133+ の stem like cell は CD133- 細胞と比較すると AKT の活性化が促進されることがわかった。これは DNA 損傷を修復する能力が CD133+ の stem like cell は高いことが示唆される。

#### (2) 線維芽細胞を用いた細胞周期依存性に関する研究結果

X 線は 6 Gy 照射後に染色体解析を行なったところ非対数増殖で修復させた場合で 2.8 倍誤修復が見られた。低 LET 放射線である X 線では PLDR が存在する原因として非対数増殖 (G0/G1) で修復させた方で修復効率が高いことが考えられた。一方、重粒子線 2 Gy 照射で PLDR に関して検討したところ、高 LET 放射線では非対数増殖期でも対数増殖期でも

誤修復の頻度は変わらない傾向が見られた。この結果は重粒子線では非対数増殖期の細胞にも効果的に誤修復を起こすことを示唆し、粒子線治療ががん幹細胞（おそらく静止期）にも有効であることが示唆された。以上の結果は (J Radiat Res. 2013 Nov 1;54(6):989-997) および Mutat Res. 2013 Aug 30;756(1-2):101-107) にて報告を行なった。以上の結果から X 線治療においてもがん幹細胞を照射後に細胞周期を進行させる治療方法が確立できれば新たな放射線治療の開発につながると予測される。

#### 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 3 件)

1. Hu W, Pei H, Li H, Ding N, He J, Wang J, Furusawa Y, Hirayama R, Matsumoto Y, Liu C, Li Y, Kawata T, Zhou G. Effects of shielding on the induction of 53BP1 foci and micronuclei after Fe ion exposures. J Radiat Res. 2014 Jan 1;55(1):10-16. doi: 10.1093/jrr/rrt078. (査読有)

2. Liu C, Kawata T, Zhou G, Furusawa Y, Kota R, Kumabe A, Sutani S, Fukada J, Mishima M, Shigematsu N, George K, Cucinotta F. Comparison of the repair of potentially lethal damage after low- and high-LET radiation exposure, assessed from the kinetics and fidelity of chromosome rejoining in normal human fibroblasts. J Radiat Res. 2013 Nov 1;54(6):989-997. doi: 10.1093/jrr/rrt031. (査読有)

3. Liu C, Kawata T, Furusawa Y, Zhou G, Inoue K, Fukada J, Kota R, George K, Cucinotta F, Okayasu R. Chromosome aberrations in normal human fibroblasts analyzed in G0/G1 and G2/M phases after exposure in G0 to radiation with different linear energy transfer (LET). Mutat Res. 2013 Aug 30 ;756(1-2):101-107. doi:10.16/j.mrgentox.2013.05.005. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

1. Kawata T et al. Potentially lethal damage repair after low or high LET irradiation. 58<sup>th</sup> Annual meeting of Radiation Research. 平成 24 年 9 月 29 日～10 月 5 日 サンワン プエルトリコ

2. Tetsuya Kawata et al. Hyper-radiosensitivity of Ataxia Telangiectasia exposed to radiation. The second international conference of Peking University on radiation oncology. 平成 24 年 5 月 20 日～5 月 24 日 北京大学 中国

3. Tetsuya Kawata et al. Chromosomal aberration in normal and AT cells exposed to high dose of low-dose rate irradiation. 22<sup>nd</sup> Annual NASA Space Radiation Investigators' workshop. 平成 23 年 9 月 18 日～平成 23 年 9 月 25 日 Texas USA

[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]  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (2) 研究分担者

深田 淳一 (FUKADA Junichi)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：50338159