

総 説

標準的放射線療法に抵抗性を示すがん細胞の不思議な性質

桑原 義和,^{a,b*} 富田 和男,^b 北原 秀治,^c 五十嵐健人,^b 漆原 佑介,^d
齋藤 陽平,^e 佐藤 友昭,^b 栗政 明弘,^a 福本 学^f

Interesting Characteristics of Clinically Relevant Radioresistant Cell Lines

Yoshikazu KUWAHARA,^{a,b*} Kazuo TOMITA,^b Shuji KITAHARA,^c Kento IGARASHI,^b Yusuke URUSHIHARA,^d
Yohei SAITO,^e Tomoaki SATO,^b Akihiro KURIMASA,^a and Manabu FUKUMOTO^f

^aDivision of Radiation Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Tohoku Medical and Pharmaceutical University;

^bDepartment of Applied Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University;

^cDepartment of Anatomy and Developmental Biology, Tokyo Women's Medical University;

^dLaboratory for Radiation Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku University; ^eDepartment of Radiopharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Medical and Pharmaceutical University; ^fDepartment of Molecular Pathology, Tokyo Medical University.

(Received November 20, 2018)

Radiotherapy (RT) is one of the major modalities for the treatment of human cancers and has been established as an excellent local treatment for malignant tumors. However, the development or existence of radioresistant cells is a critical problem in RT. To improve the efficacy of RT understanding the characteristics of radioresistant cells is one of the important topics in radiation biology. Recently, a system to compare between radioresistant and sensitive cells with the isogenic background was established. In this review, we will provide an overview of several curious but interesting aspects of clinically relevant radioresistant cell lines.

Key words — X-ray, clinically relevant radioresistant cell, xenograft tumor model, hypoxia

はじめに

放射線療法は手術療法や化学療法と並ぶがんの3大治療法の一つである。強度変調放射線療法(Intensity Modulated Radiation Therapy: IMRT)など、治療機器の向上は目覚ましい反面、放射線を照射しても生存し続ける放射線抵抗性細胞の出現や存在といった克服すべき課題が今なお残っている。¹⁻³⁾放射線抵抗性細胞の性質を理解して、より有効な放射線療法を行うために、多くの研究が行われてきた。⁴⁻⁸⁾これらの研究では、分割照射に抵抗性を示すがん細胞が存在しないため、単回照射での放射線抵抗性を解析対象にしている。⁹⁾また、比較する細胞株間でゲノム背景が異なるため、放射線抵抗性に関与する様々な因子が報告されている。従って、解析結果が臨床上問題となる2~3

Gy/日の分割照射^{10,11)}に抵抗性を示す腫瘍に必ずしも当てはまるとは限らない。このような問題を克服して、より臨床に近い条件で放射線抵抗性細胞を解析する必要がある。そこで、標準的放射線療法である2 Gy/日のX線を照射し続けても増殖する臨床的放射線耐性(clinically relevant radioresistant; CRR)細胞を複数のヒト由来がん細胞株から樹立することを試みた。¹²⁾

臨床的放射線耐性細胞とは

ヒト子宮頸部がん由来HeLa細胞やヒト非小細胞肺癌由来H1299細胞は、ヒト肝細胞がん由来HepG2細胞などに比べてX線単回照射に比較的抵抗性を示す。しかし、2 Gy/日のX線を照射し続けると、由来組織にかかわらず総照射線量が30 Gy程度までは増殖するものの、さらにX線を照射すると大部分の細胞は増殖を停止して細胞死を誘発する。総照射線量が60 Gyに達すると、ほぼ全ての細胞が死滅した。従って、広く研究に用いられているヒト由来のがん細胞で2 Gy/日のX線照射に抵抗性を示す細胞は存在しないと考えられる。

^a東北医科薬科大学医学部放射線基礎医学教室, ^b鹿児島大学歯学総合研究科歯科応用薬理学分野, ^c東京女子医科大学医学部解剖学・発生生物学, ^d東北大学大学院医学系研究科放射線生物学分野, ^e東北医科薬科大学薬学部放射薬品学教室, ^f東京医科大学分子病理学講座
*e-mail: y-kuwahara@tohoku-mpu.ac.jp

放射線抵抗性と同様に抗がん剤抵抗性も古くから研究が行われている.¹³⁻¹⁶⁾ 微小管脱重合阻害剤であるドセタキセル (Docetaxel; DTX) 抵抗性にはMDR1 (Multiple drug resistance 1) などの薬剤排出ポンプの高発現や β チューブリンの高発現および突然変異の関与が示唆されている.^{17,18)} また, DNA 鎖内に架橋を形成するシスプラチン (Cisplatin) においても様々な抵抗性の要因が報告されている.^{19,20)} これらの研究で用いられる抗がん剤抵抗性がん細胞株は, 細胞が死なない比較的低濃度の抗がん剤を含有する培地で細胞を培養し, 徐々に抗がん剤の濃度を濃くしていくことで樹立することができる.²¹⁾ このような樹立方法に倣い, X線分割照射抵抗性細胞の樹立も細胞が死なずかつ増殖できる0.5 Gy/日のX線照射を行い, 徐々に

1回あたりの照射線量を増やしていくことで可能ではないかと考えた.⁹⁾ 数年の歳月をかけて, ヒトのがんに由来する複数の細胞株から2 Gy/日のX線を照射し続けても増殖する放射線耐性細胞の樹立に成功した. 最近では, ヒト由来のがん細胞は3~3.5 Gy/日のX線照射まで抵抗性を示すことも分かった. ヒト舌がん由来SAS細胞から3.5 Gy/日のX線照射を行っても増殖する細胞株を樹立した. 3.5 Gy/日のX線を照射している細胞は, 増殖率が悪く, 細胞死を誘発しやすい. 一方, 2 Gy/日のX線を照射している細胞の増殖率は親株とほとんど変わらず, 細胞死もほとんど誘発されない. このことから, 2 Gy/日のX線を照射しても増殖する細胞を臨床的放射線「耐性」細胞, 2 Gyよりも高い線量を照射しても増殖する細胞を臨床的放射線

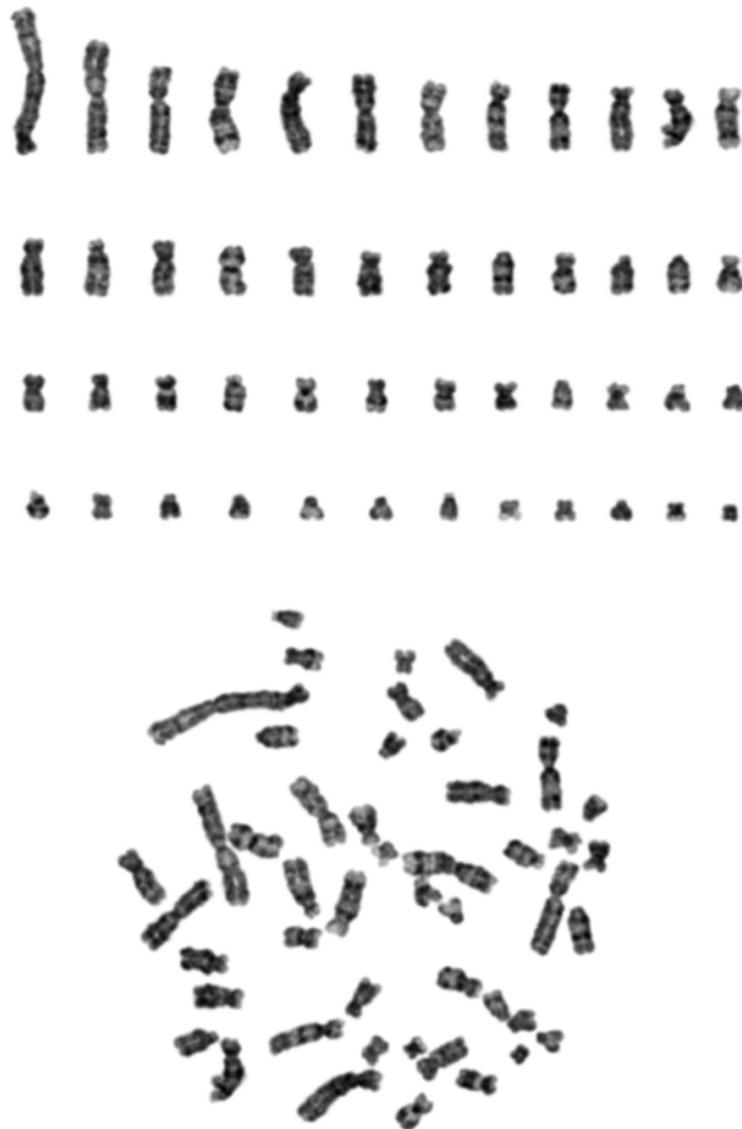


Fig. 1. Chromosome analysis of clinically relevant radioresistant HepG2-8960-R. Chromosome spreading combined with Giemsa staining was performed. Complex chromosome rearrangements are occurred in HepG2-8960-R.

「抵抗性」細胞と区別している。英語では、どちらも clinically relevant radioresistant (CRR) cell である。放射線耐性細胞を樹立しやすい細胞とそうでない細胞があるものの、由来組織がいずれであれ固形腫瘍由来のがん細胞株から放射線耐性細胞が樹立できなかった例はこれまでにない。一方で、血球系由来の細胞株から放射線耐性細胞の樹立に成功した例はない。血球系のがん細胞は 0.5 Gy/日の X 線分割照射には抵抗性を示しても、1 Gy/日の X 線を照射すると死滅した。血球系由来のがん細胞は apoptosis を誘発しやすいため、放射線耐性細胞は樹立できないと考えられる。親株と樹立した CRR 細胞は、ゲノム背景が同一であるため、両者を比較することによりがんの放射線抵抗性獲得のメカニズムが従来の解析以上に浮き彫りになりやすいと考えられる。

HepG2 細胞から樹立した CRR 細胞である HepG2-8960-R 細胞の染色体を G バンド分染法で解析すると、HepG2-8960-R 細胞は 2 Gy/日の X 線を 2,500 日以上照射されているため、染色体の複雑な再構成が生じており、染色体番号の判別は不可能であった (Fig. 1)。しかし、HepG2 および HepG2-8960-R 細胞を CGH (Comparative Genomic Hybridization) 解析すると、DNA のコピー数は両細胞株間でそれほど変化しておらず、ゲノム量は安定していることが示された。²²⁾

CRR 細胞は X 線抵抗性の形質を維持するために、2 Gy/日の X 線を 24 時間ごとに照射している (Maintenance Irradiation; MI)。MI を停止しても、およそ半年間は放射線耐性の形質を維持していた。1 年以上 MI を行っていない CRR 細胞の X 線感受性を調べると、単回照射の X 線感受性は親株と同程度であり、2 Gy/日の X 線を分割照射すると、30 日以内にほぼ全ての細胞が死滅した。樹立した全ての CRR 細胞で X 線耐性の喪失が見られた。従って、CRR 細胞の放射線耐性の形質は MI で維持されており、可逆的であった。

CRR 細胞の X 線耐性メカニズム

CRR 細胞における X 線耐性のメカニズムを作用機序の異なる様々な抗がん剤への感受性を解析することで明らかにしようとした。²³⁾ 交叉耐性を示す抗がん剤が見つければ、その作用機序から CRR 細胞の X 線耐性機構が明らかになると考えられる。既に作用機序が分かっており長年使用されているフルオ

ロウラシル (fluorouracil; 5-FU) やシスプラチン (cisplatin; CDDP) など複数の抗がん剤を用いたスクリーニング解析から、樹立した全ての CRR 細胞は由来組織に関係なく、DTX に交叉耐性を示した。X 線はがん細胞内に活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) を発生し、^{24,25)} 一本鎖切断や二本鎖切断を誘発する。^{26,27)} 従って、CRR 細胞は DNA 損傷に対する修復能が高いと推測され、DNA 二本鎖切断を誘発するブレオマイシン (Bleomycin) やエトポシド (Etoposide) に抵抗性を示すと推測していた。しかし、これらの抗がん剤は親株と同様に CRR 細胞にも有効であった。解析の結果、CRR 細胞の DTX 抵抗性にはミトコンドリア (mitochondria; mt) の関与が示唆された。JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) 染色を行うと、CRR 細胞の mt 膜電位 ($\Delta\psi_m$) は親株に比べて低下していることが分かった。²³⁾ さらに、X 線照射および DTX 処理後、親株では mt に ROS が検出されるのに対して、CRR 細胞ではほとんど検出されなかった。このような性質を示す細胞に、mtDNA 欠失 $\rho 0$ 細胞が知られている。²⁸⁾ $\rho 0$ 細胞は低濃度の Ethidium Bromide 処理で容易に樹立することができる。²⁹⁾ $\rho 0$ 細胞は CRR 細胞と同様に $\Delta\psi_m$ が低く、X 線照射および DTX 処理後、mtROS が検出されない (投稿中)。以上から、mt の機能低下ががん細胞の放射線抵抗性の一因になっていると考えられる。しかし、CRR 細胞から樹立した $\rho 0$ 細胞では、分割照射に対する放射線抵抗性は失われていた。このことから、CRR 細胞の mt は機能低下しているものの、mt が放射線抵抗性に何らかの役割を果たしている可能性も示されている。低酸素下でがん細胞を培養すると、エネルギー代謝は解糖系に依存する。³⁰⁾ 1 週間 MI を行わず 1% O_2 で培養した CRR 細胞に 2 Gy/日の X 線を照射すると、親株と同様に全ての細胞が 30 日以内に死滅した。このことから、CRR 細胞の生存には mt の存在は必要不可欠であると考えられる。

CRR 細胞は *in vivo* においても X 線に抵抗性を示すのか?

がんの放射線療法で問題となる放射線抵抗性細胞を克服するためには、*in vivo* の解析は必要不可欠である。*In vitro* の解析では、がん細胞のみを解析対象としているため、がん細胞自体の性質を理解するためには有効である。*In vitro* の解析ではが

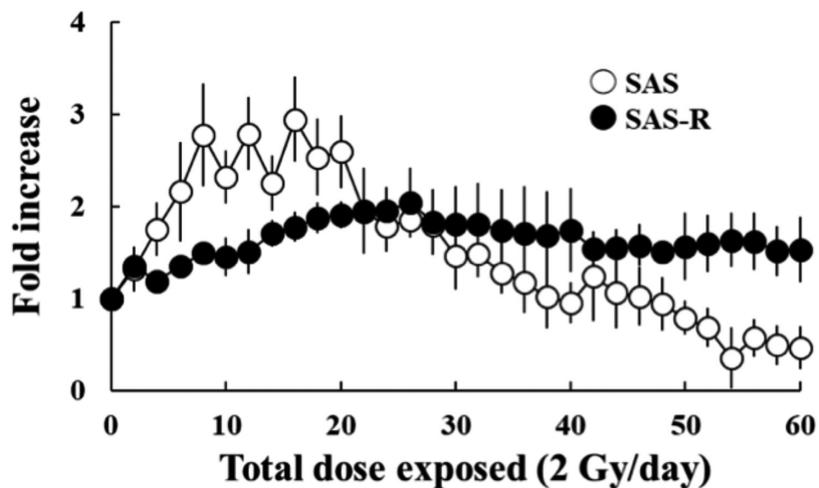


Fig. 2. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts under exposure to 2 Gy/day of X-rays. (n=3)

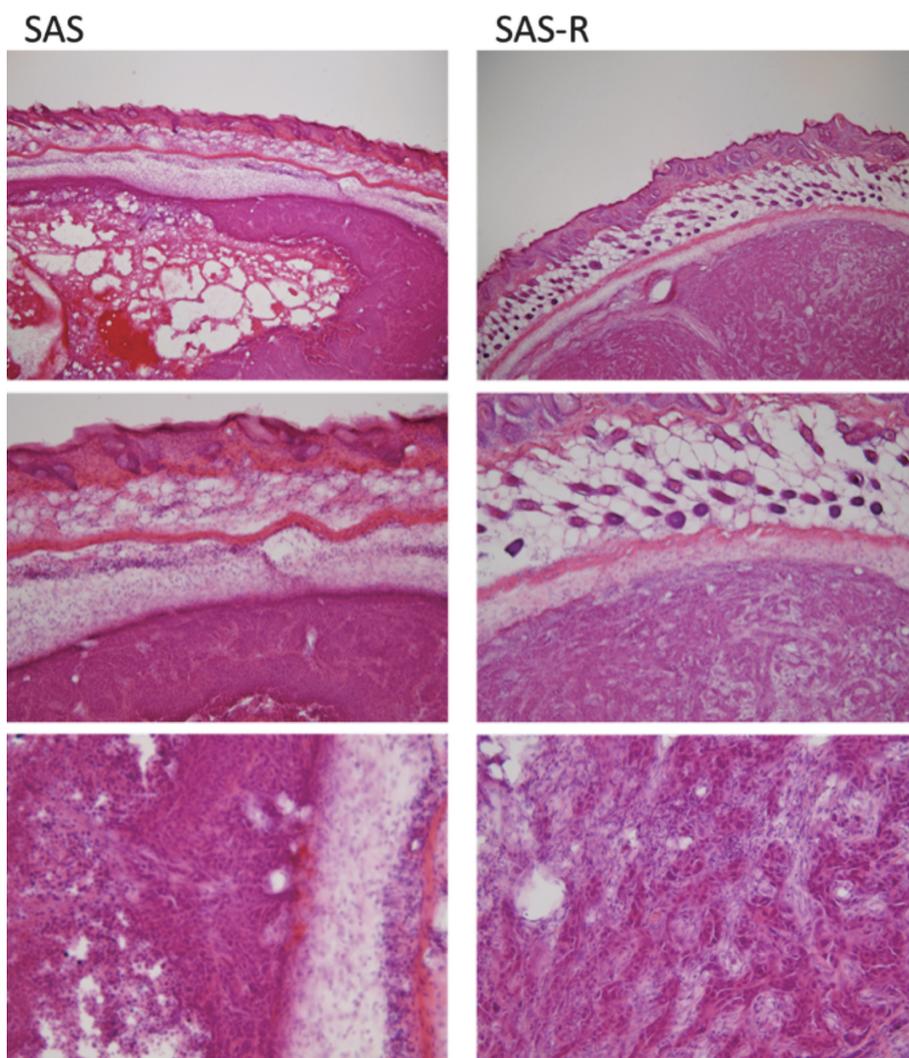


Fig. 3. Hematoxylin and Eosin stained histology of SAS and SAS-R tumor. Upper panel; $\times 40$, middle panel; $\times 100$, lower panel; $\times 200$.

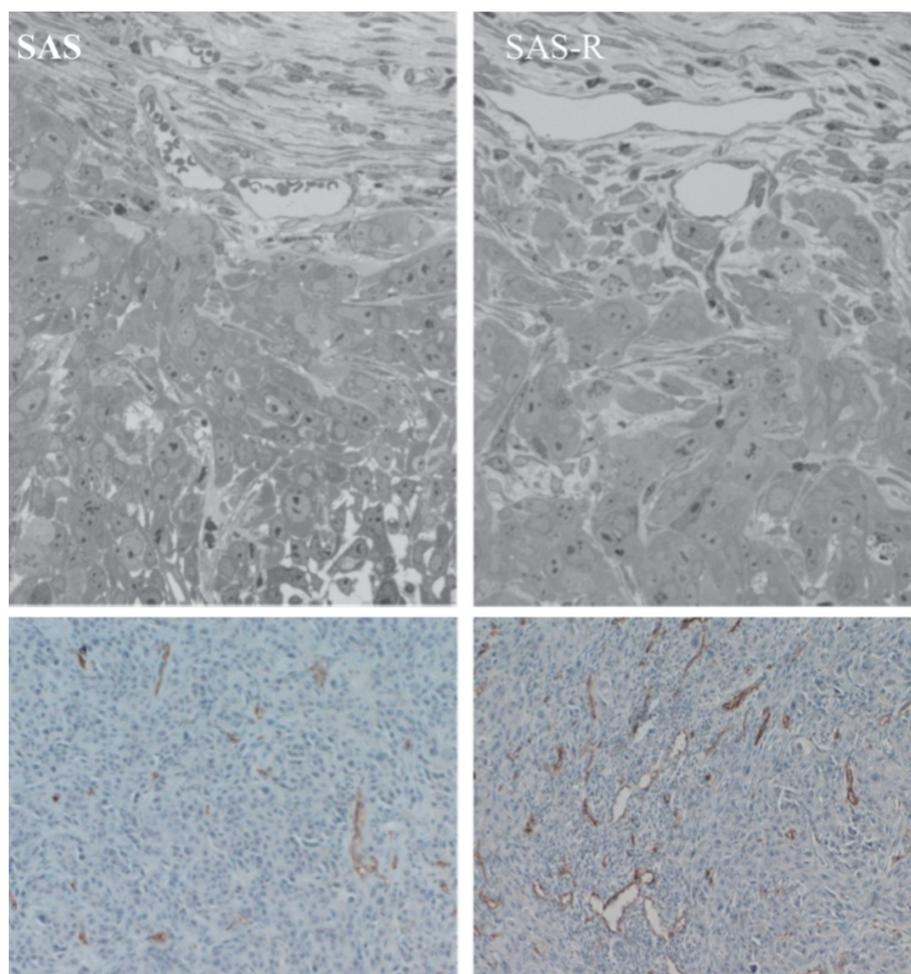


Fig. 4. Upper panel. Semi-thin section of SAS and SAS-R tumor. ($\times 600$) Lower panel. Tissue expression of CD34 in SAS and SAS-R tumor visualized by immunohistochemistry.

ん細胞と間質細胞との相互作用は考慮されておらず、^{31,32)} 生体内でのがん細胞の複雑な挙動を理解するには制限がある。腫瘍内の間質細胞ががん細胞に働きかけ、放射線療法の予後を左右しているという報告もあり、^{33,34)} 腫瘍の放射線感受性を理解する上で間質細胞は無視できない存在である。臨床問題となる放射線抵抗性腫瘍を理解するためには、ヌードマウスを用いた異種移植モデルが必要不可欠である。^{35,36)}

ヒト舌がん由来 SAS 細胞と SAS 細胞から樹立した CRR 細胞である SAS-R 細胞をヌードマウス背部皮下に移植して、放射線抵抗性腫瘍モデルの構築を試みた。³⁷⁾ 移植した腫瘍部分以外を鉛板で遮蔽して、2 Gy/日の X 線 (1 Gy/分) を局所照射した。総照射線量が 20 Gy (2 Gy \times 10 日) 程度までは、SAS および SAS-R 腫瘍の体積増加が見られた (Fig. 2)。しかし、SAS-R 腫瘍は SAS 腫瘍に比べて、腫瘍体積の増加速度が遅かった (Fig. 2)。総照射線量が 20 Gy を超えると、SAS 腫瘍は急激に

縮小するのに対して、SAS-R 腫瘍は腫瘍体積をそのまま維持した。総照射線量が 60 Gy (2 Gy \times 30 日) に達した時点では、SAS-R 腫瘍の体積は減少していないのに対して、SAS 腫瘍の体積は照射前の体積よりも減少した。このことから、X 線抵抗性腫瘍モデルの構築に成功したと考えられる。このモデルは、放射線抵抗性腫瘍を抗がん剤で克服する解析においても極めて有用であると考えられる。また、SAS-R 細胞は *in vivo* でも X 線分割照射に抵抗性を示すことが明らかになった。

X 線照射していない SAS および SAS-R 腫瘍を組織学的に解析すると、SAS-R 腫瘍では SAS 腫瘍に比べて結合組織の多いことが分かった。また、SAS 腫瘍の中心部は X 線を照射していないにもかかわらず広範囲にわたって壊死が生じているのに対して、SAS-R 腫瘍に壊死は見られなかった (Fig. 3)。このことから、SAS 腫瘍の中心部は低酸素状態または貧栄養状態にあるのではないかとということが示唆された。Semithin section を作製し組織構

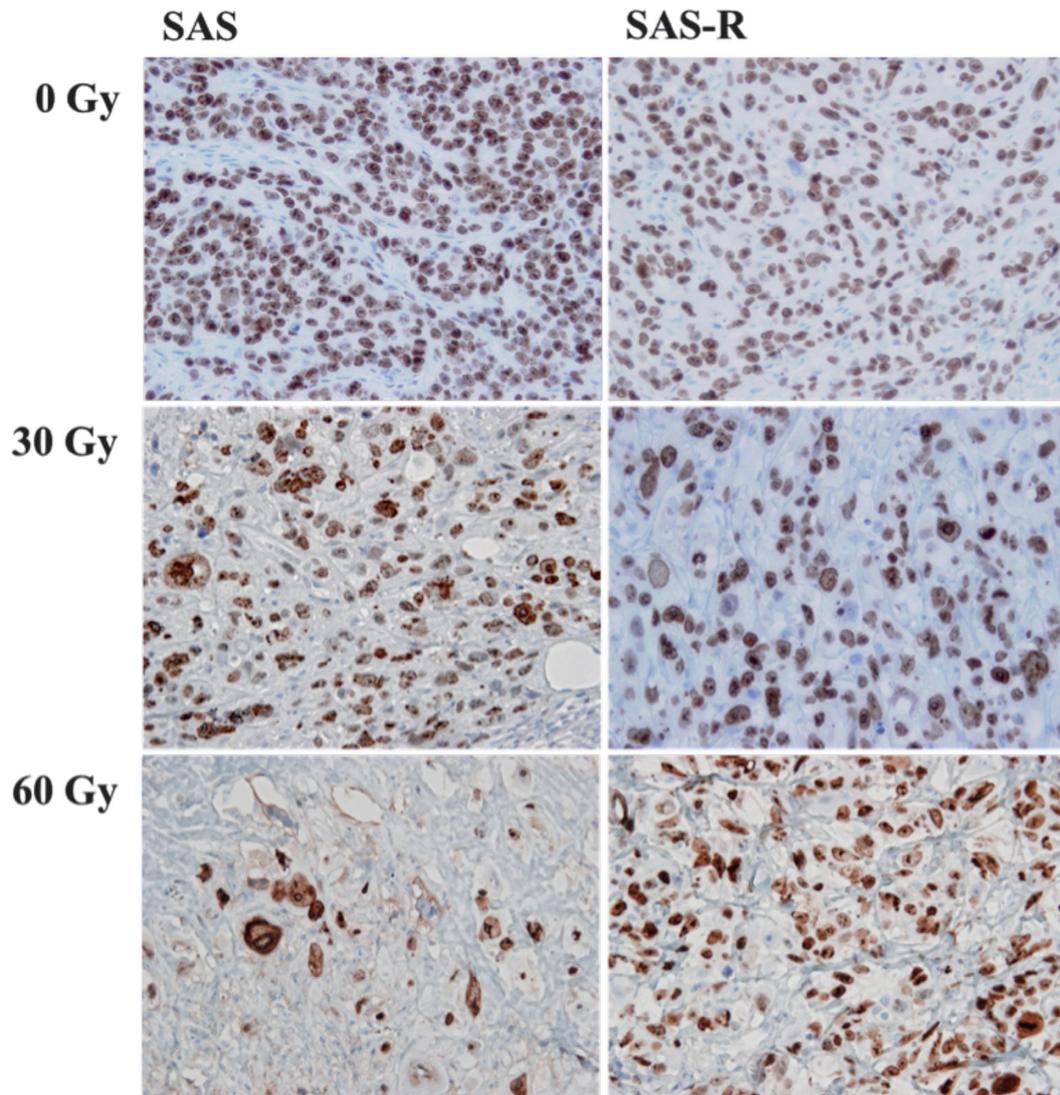


Fig. 5. Tissue expression of Ki67 in SAS and SAS-R tumor visualized by immunohistochemistry. SAS and SAS-R tumor were exposed to 2 Gy/day of X-rays for 30 days. Brown stains indicate Ki67 positive cells.

築を調べると、SAS腫瘍およびSAS-R腫瘍の組織構築は、血管の形態も含めて特に大きな差は見られなかった (Fig. 4)。ただ、SAS-R細胞の核は、SAS細胞の核に比べてやや大きい印象があり、SAS腫瘍はSAS-R腫瘍に比べて細胞密度が高い傾向にあった。毛細血管内皮細胞を検出するため、腫瘍切片を抗CD34抗体を用いて免疫染色すると、SAS腫瘍に比べてSAS-R腫瘍では血管密度の高いことが示された (Fig. 4)。また、FITC標識したTomato-Lectinを尾静脈から投与すると、血流のある血管を蛍光で観察することができる。³⁸⁾ この手法を用いても、SAS-R腫瘍はSAS腫瘍に比べて血管密度の高いことが示されている。³⁷⁾ このことは、SAS-R腫瘍内はSAS腫瘍内に比べて、栄養状態が良好であり、さらに酸素分圧が高いことを示唆し

ている。一般的に、放射線抵抗性のがん細胞は酸素効果により酸素分圧が低いと考えられているが、³⁹⁾ X線に抵抗性を示すSAS-R腫瘍には当てはまらないことが示唆された。ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 解析の結果、SAS-R腫瘍内で血管密度が高い要因として、SAS-R細胞が血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) を分泌しているからだということが明らかになっている。

Ki67タンパク質は、細胞増殖能マーカーで増殖中の細胞の全ての細胞周期で存在する反面、細胞増殖を休止しているG0期では存在しない。⁴⁰⁾ 抗Ki67抗体を用いて免疫染色すると、放射線治療を行う前のほぼ全てのSASおよびSAS-R細胞は増殖期に入っていることが示された (Fig. 5)。総照射

線量が 30 Gy 時点では、SAS および SAS-R 腫瘍共に増殖期の細胞に大きな差は見られなかったものの、どちらの腫瘍内にも Ki67 で染色されない結合組織の明らかな増加が見られた。ヌードマウス由来の細胞が X 線照射により繊維化を起こしていることが示唆される。⁴¹⁾ 総照射線量が 60 Gy (2 Gy×30 日) に達すると、増殖期に入っている SAS 細胞は顕著に減少しているのに対して、SAS-R 腫瘍ではかなり存在することが示された。一般的に、X 線照射を受けるとがん細胞の核は大きくなる。⁴²⁾ SAS 由来の腫瘍ではこの傾向が見られた。一方、SAS-R 由来の腫瘍では核の大きな細胞の増加は顕著でなかった。宿主が同じであるヌードマウスを用いた解析から、腫瘍の放射線感受性は間質細胞に規定されるというよりは、むしろがん細胞自身の放射線感受性に規定されることが示された。⁴³⁾

SAS-R 腫瘍は、2 Gy/日の X 線分割照射に明らかな抵抗性を示したため、抗がん剤を用いてその克服を目指した。mTOR 阻害剤である rapamycin を用いた *in vitro* の解析から、autophagy 細胞死の誘導は CRR 細胞の克服に有効であることが示されている。⁴⁴⁾ 従って、autophagy の誘導は *in vivo* でも有効であると考えられる。SAS および SAS-R 細胞を背部皮下に移植したヌードマウスに rapamycin の誘导体である Everolimus (RAD001) を経口投与して、2 Gy/日の X 線を照射した。その結果、Everolimus 単独でも抗腫瘍効果が見られ、2 Gy/日の X 線分割照射を併用した場合、数日以内に SAS-R 腫瘍は縮小することが分かった。*In vitro* の解析から、autophagy の誘導は rapamycin 処理後、少なくとも 5 日以上経過してから見られるため、⁴⁴⁾ *in vivo* で見られた早期の腫瘍縮小は autophagy 細胞死によるものではない。2 Gy/日の X 線分割照射と Everolimus を併用した腫瘍を電子顕微鏡で観察すると、腫瘍が縮小している時期に autophagy を誘導している細胞の増加は見られなかった。詳細な組織学的解析を行うと、SAS-R 腫瘍内の血管内皮細胞には apoptosis が生じており、さらに血管内に血栓が存在することが分かった。この血栓により血流が遮断されていると考えられる。SAS-R 腫瘍では、Everolimus の経口投与により血管内皮細胞に apoptosis が誘発され、それに伴い血栓が生じたと考えられる。その結果、血流遮断が生じ、多くの栄養と酸素を必要とする SAS-R 細胞は壊死し、急激に腫瘍体積が縮小したと考え

られる。SAS 腫瘍内にも血栓は生じるものの、腫瘍の縮小は SAS-R 腫瘍に比べて緩やかであった。SAS 細胞は、SAS-R 細胞ほど栄養または酸素要求性が高くないためであると考えられる。*In vitro* の解析から、SAS-R 細胞は SAS 細胞に比べて栄養要求性が高いことはすでに分かっている。

これまでに分かった放射線抵抗性腫瘍の不思議な性質

一般的に、低酸素状態 (hypoxia) のがん細胞は X 線に抵抗性である。^{45,46)} HepG2, SAS, HeLa 細胞およびそれらから樹立した CRR 細胞を、およそ 2 週間 1% O₂ の条件で培養した。Modified High-Density Survival Assay 法で細胞の放射線感受性を解析すると、⁴⁷⁾ 親株は X 線抵抗性になったにもかかわらず、CRR 細胞の放射線感受性は変化しなかった。このことから、CRR 細胞には酸素効果がないことが分かる。1% O₂ の培養条件で 2 Gy/日の X 線を照射すると、親株および CRR 細胞共に細胞の増殖能は低下し、30 日以内にほぼ全て死滅した。従って、CRR 細胞が分割照射に抵抗性を示すためには酸素が必要不可欠であると考えられる。このことは、低酸素領域の細胞は放射線に抵抗性を示すという今までの考えと異なる。

まとめ

①放射線照射後に生じる ROS の発生源の一つである mt の機能は CRR 細胞で低下していると考えられる。しかし、mtDNA を完全に除去すると CRR 形質は失われる。②CRR 細胞は X 線に明らかな抵抗性を示す。しかし、X 線と作用機序が似ている抗がん剤には抵抗性を示さない。③樹立した全ての CRR 細胞は微小管脱重合阻害剤である DTX に抵抗性を示す。④一般的に低酸素細胞は放射線に抵抗性を示す。しかし、CRR 細胞には酸素効果はみられず、1% O₂ の培養条件で 2 Gy/日の X 線を分割照射すると 30 日以内にほぼ全ての細胞が死滅する。⑤腫瘍内では血管から離れた位置に存在する低酸素領域の細胞が放射線に抵抗性を示す。しかし、CRR 腫瘍は血管密度が親株由来の腫瘍に比べて高く、酸素分圧が高いと考えられる。

方 法

Fig. 1 で示した染色体の構造解析は、細胞周期中期の細胞をメタノール・酢酸固定液で固定後、ス

ライドグラス上に染色体を展開した。風乾後、トリプシン処理を行い、ギムザ染色した。

Fig. 2 で示した腫瘍体積の評価は、参考文献 37 に準じて行った。

Fig. 3 で行った移植腫瘍の組織学的解析は、参考文献 37 に準じて行った。

Fig. 4 に示した semi thin section の標本作製は参考文献 37 の電子顕微鏡標本の作製に準じて行った。切片は 0.5% トルイジンブルーで染色した。CD34 染色は参考文献 37 に準じて行った。

Fig. 5 に示した Ki67 染色は、参考文献 37 に準じて 4 μ m のパラフィン組織切片を作製後、ベンタナベンチマーク SS を用いて行った。組織切片の画像は BZ-Analyzer (Keyence) を用いて取得した。

謝辞 本研究は科研費 16K00538, 16K11513, 16K15571, 21710055 の助成を受けたものである。

利益相反

ありません。

REFERENCES

- Windholz F., *Radiology*, **48**, 398–404 (1947).
- Peters L. J., Withers H. R., Thames H. D., Jr., Fletcher G. H., *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, **8**, 101–108 (1982).
- Bergman P. J., Harris D., *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **27**, 47–57 (1997).
- Tang L., Wei F., Wu Y., He Y., Shi L., Xiong F., Gong Z., Guo C., Li X., Deng H., Cao K., Zhou M., Xiang B., Li X., Li Y., Li G., Xiong W., Zeng Z., *J Exp Clin Cancer Res.*, **37**, 87 (2018).
- Chen G. Z., Zhu H. C., Dai W. S., Zeng X. N., Luo J. H., Sun X. C., *J Thorac Dis.*, **9**, 849–859 (2017).
- Chaiswing L., Weiss H. L., Jayswal R. D., Clair D. K. S., Kyprianou N., *Crit Rev Oncog.*, **23**, 39–67 (2018).
- Seiwert T. Y., Salama J. K., *Vokes E. E. Nat Clin Pract Oncol.*, **4**, 86–100 (2007).
- Zhang X., Wang J., Li X., Wang D., *Cancer Lett.*, **439**, 39–46 (2018).
- Kuwahara Y., Roudkenar M. H., Urushihara Y., Saito Y., Tomita K., Roushandeh A. M., Sato T., Kurimasa A., Fukumoto M., *Med Mol Morphol.*, **50**, 195–204 (2017).
- Marcial V. A., Komaki R., *Cancer.*, **76**, 2152–2158 (1995).
- Connell P. P., Hellman S., *Cancer Res.*, **69**, 383–392 (2009).
- Kuwahara Y., Li L., Baba T., Nakagawa H., Shimura T., Yamamoto Y., Ohkubo Y., Fukumoto M., *Cancer Sci.*, **100**, 747–752 (2009).
- Zheng H. C., *Oncotarget.*, **8**, 59950–59964 (2017).
- Zahreddine H., Borden K. L., *Front Pharmacol.*, **4**, 28 (2013).
- Senthebane D. A., Jonker T., Rowe A., Thomford N. E., Munro D., Dandara C., Wonkam A., Govender D., Calder B., Soares N. C., Blackburn J. M., Parker M. I., Dzobo K., *Int J Mol Sci.*, **19**, 2861 (2018).
- Senthebane D. A., Rowe A., Thomford N. E., Shipanga H., Munro D., Mazeedi M. A. M. A., Almazayadi H. A. M., Kallmeyer K., Dandara C., Pepper M. S., Parker M. I., Dzobo K., *Int J Mol Sci.*, **18**, 1586 (2017).
- Galletti E., Magnani M., Renzulli M. L., Botta M., *ChemMedChem.*, **2**, 920–942 (2007).
- Orr G. A., Verdier-Pinard P., McDaid H., Horwitz S. B., *Oncogene.*, **22**, 7280–7295 (2003).
- Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., Kroemer G., *Oncogene.*, **31**, 1869–1883 (2012).
- Shen D. W., Pouliot L. M., Hall M. D., Gottesman M. M., *Pharmacol Rev.*, **64**, 706–721 (2012).
- McDermott M., Eustace A. J., Busschots S., Breen L., Crown J., Clynes M., O'Donovan N., Stordal B., *Front Oncol.*, **4**, 40 (2014).
- Kuwahara Y., Roudkenar M. H., Urushihara Y., Saito Y., Tomita K., Roushandeh A., Sato T., Kurimasa A., Fukumoto M., *Int J Med Phys Clin Eng Radiat Oncol.*, **6**, 377–391 (2017).
- Kuwahara Y., Roudkenar M. H., Suzuki M., Urushihara Y., Fukumoto M., Saito Y., Fukumoto M., *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, **96**, 556–565 (2016).
- Chen Q., Chai Y. C., Mazumder S., Jiang C., Macklis R. M., Chisolm G. M., Almasan A., *Cell Death Differ.*, **10**, 323–334 (2003).
- Tominaga H., Kodama S., Matsuda N., Suzuki K., Watanabe M., *J Radiat Res.*, **45**, 181–188 (2004).
- Vignard J., Mirey G., Salles B., *Radiother Oncol.*, **108**, 362–369 (2013).
- Olive P. L., *Radiat Res.*, **150**, S42–51 (1998).

- 28) Fernández-Moreno M., Hermida-Gómez T., Gallardo M. E., Dalmao-Fernández A., Rego-Pérez I., Garesse R., Blanco F. J., *PLoS One*, **11**, e0164199 (2016).
- 29) King M. P., Attardi G., *Science*, **246**, 500–503 (1989).
- 30) Robin E. D., Murphy B. J., Theodore J., *J Cell Physiol*, **118**, 287–290 (1984).
- 31) Bussard K. M., Mutkus L., Stumpf K., Gomez-Manzano C., Marini F. C., *Breast Cancer Res.*, **18**, 84 (2016).
- 32) Yuan Y., Jiang Y. C., Sun C. K., Chen Q. M., *Oncol Rep.*, **35**, 2499–2515 (2016).
- 33) Jossion S., Sharp S., Sung S. Y., Johnstone P. A., Aneja R., Wang R., Gururajan M., Turner T., Chung L. W., Yates C., *J Oncol.*, **2010**, 232831 (2010).
- 34) Ogawa K., Boucher Y., Kashiwagi S., Fukumura D., Chen D., Gerweck L. E., *Cancer Res.*, **67**, 4016–4021 (2007).
- 35) Jung J., *Toxicol Res.*, **30**, 1–5 (2014).
- 36) Morton C. L., Houghton P. J., *Nat Protoc.*, **2**, 247–250 (2007).
- 37) Kuwahara Y., Mori M., Kitahara S., Fukumoto M., Ezaki T., Mori S., Echigo S., Ohkubo Y., Fukumoto M., *Cancer Med.*, **3**, 310–321 (2014).
- 38) Kitahara S., Suzuki Y., Morishima M., Yoshii A., Kikuta S., Shimizu K., Morikawa S., Sato Y., Ezaki T., *Mol Cancer*, **13**, 99 (2014).
- 39) Moeller B. J., Richardson R. A., Dewhirst M. W., *Cancer Metastasis Rev.*, **26**, 241–248 (2007).
- 40) Scholzen T., Gerdes J., *J Cell Physiol*, **182**, 311–322 (2000).
- 41) Straub J. M., New J., Hamilton C. D., Lominska C., Shnayder Y., Thomas S. M., *J Cancer Res Clin Oncol*, **141**, 1985–1994 (2015).
- 42) Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Wang Y. W., Kumar P., Murray D., *Int J Mol Sci.*, **18**, 360 (2017).
- 43) Gerweck L. E., Vijayappa S., Kurimasa A., Ogawa K., Chen D. J., *Cancer Res.*, **66**, 8352–8355 (2006).
- 44) Kuwahara Y., Oikawa T., Ochiai Y., Roudkenar M. H., Fukumoto M., Shimura T., Ohtake Y., Ohkubo Y., Mori S., Uchiyama Y., Fukumoto M., *Cell Death Dis.*, **2**, e177 (2011).
- 45) Rockwell S., Dobrucki I. T., Kim E. Y., Marrison S. T., Vu V. T., *Curr Mol Med.*, **9**, 442–458 (2009).
- 46) Brown J. M., *Methods Enzymol.*, **435**, 297–321 (2007).
- 47) Kuwahara Y., Mori M., Oikawa T., Shimura T., Ohtake Y., Mori S., Ohkubo Y., Fukumoto M., *J Radiat Res.*, **51**, 297–302 (2010).

