

## 総 説

### 臨床的放射線耐性細胞のこれまでとこれから

桑原 義和,<sup>a,b\*</sup> 富田 和男,<sup>b</sup> 高島 貴志,<sup>c</sup> 漆原 佑介,<sup>d</sup>  
五十嵐健人,<sup>b</sup> 佐藤 友昭,<sup>b</sup> 栗政 明弘,<sup>a</sup> 福本 学<sup>e</sup>

### Clinically Relevant Radioresistant Cells; Past History and Future Plans

Yoshikazu KUWAHARA,<sup>a,b\*</sup> Kazuo TOMITA,<sup>b</sup> Takashi TAKABATAKE,<sup>c</sup> Yusuke URUSHIHARA,<sup>d</sup>  
Kento IGARASHI,<sup>b</sup> Tomoaki SATO,<sup>b</sup> Akihiro KURIMASA,<sup>a</sup> and Manabu FUKUMOTO<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Division of Radiation Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Tohoku Medical and Pharmaceutical University;

<sup>b</sup>Department of Applied Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University;

<sup>c</sup>Research Center for Radiation Protection, National Institute of Radiological Sciences; <sup>d</sup>Laboratory for Radiation Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku University; <sup>e</sup>RIKEN Center for Advanced Intelligence Project.

(Received November 20, 2019)

Radiotherapy is one of the major modalities for the treatment of human cancers and has been established as an excellent local treatment for malignant tumors. To know the molecular mechanisms of radioresistant cells we made a system to compare between radioresistant and sensitive cells with the isogenic background. These cells continue to proliferate under exposure to 2 Gy/day X-rays for more than 30 days. Therefore, we named them clinically relevant radioresistant (CRR) cells. However, molecular mechanisms of CRR cell radioresistance remains to be elucidated so far. In this review new methodologies to know the molecular mechanisms of CRR cell radioresistance will be discussed.

**Key words** — Clinically relevant radioresistant cell line, chromosomal aberrations, radiation therapy

## 序 論

放射線療法は、手術療法や化学療法と並ぶ、がんの三大治療法の一つである。一般的な放射線療法は、がん細胞が正常細胞と比較して分割照射に弱いことを利用する。<sup>1)</sup>放射線療法は臓器の形態や機能を温存でき、全身への負担が少なく、病状によっては通院でも治療できるという大きな利点を持っている。しかし、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半面、放射線に抵抗性を示すがん細胞の存在や出現が今なお解決すべき課題の一つである。<sup>2)</sup>

標準的放射線療法は、1回1.5–3 GyのX線を週5回、合計6週間照射することで行われる。<sup>3)</sup>従って、がんの放射線抵抗性に関与する因子を明らか

にするためには、1.5–3 Gy/日のX線照射に抵抗性を示す放射線抵抗性細胞が必要不可欠である。我々の予備的解析から、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞など一般的に使用されているがん細胞は1.5 Gy/日のX線照射を行うと30日以内にほぼ全ての細胞が死滅した。従って、広く培養されているがん細胞の中には臨床上問題となる放射線抵抗性細胞のモデルとなりうるがん細胞は存在していないと考えられる。従来から行われているがんの放射線抵抗性に関する研究では、単回照射での放射線感受性が異なる複数のがん細胞株を比較に用いたり、<sup>4-13)</sup> 2 GyのX線を数回照射したり10 Gyなど比較的高線量のX線照射を行い、生き残った細胞を放射線抵抗性細胞として解析したりするのが一般的であった。<sup>14-20)</sup>しかし、前者はそもそもゲノム背景が異なる細胞を比較対象にしているため、得られた解析結果が別の組織に由来する放射線抵抗性細胞にも当てはまるのかは疑問である。また、単回照射の放射線に抵抗性を示したとしても、2 Gy/日のX線を照射し続けると死滅してしまう可能性が極めて高く、解析結果が臨床に応用できるのかは疑問である。また、後者の放射線を照射して生き残った

<sup>a</sup>東北医科薬科大学医学部放射線基礎医学教室, <sup>b</sup>鹿児島大学歯学総合研究科歯科応用薬理学分野, <sup>c</sup>放射線医学総合研究所放射線防護研究センター, <sup>d</sup>東北大学大学院医学系研究科放射線生物学分野, <sup>e</sup>理化学研究所革新知能統合研究センター

\*e-mail: y-kuwahara@tohoku-mpu.ac.jp

細胞を解析した場合, たまたま生き残った細胞を解析の対象にしている可能性は否めない. 生き残った細胞に2 Gy/日のX線を照射すると全ての細胞が死滅してしまう可能性が極めて高い. 実際, 我々は10 GyのX線を照射して生き残ったヒト子宮頸部がん由来 HeLa 細胞に2 Gy/日のX線を分割照射したところ, 30日以内に全ての細胞が死滅することを確認している (un-published data).

そこで我々は臨床上問題となる放射線抵抗性細胞の性質を明らかにして, より有効な放射線療法を開発するために, 2 Gy/日のX線を照射し続けても安定して増殖する新たながん細胞株の樹立に取り組んだ. そして, がん細胞へ照射するX線の線量を0.5 Gy/日から2 Gy/日まで徐々に増やしていくことにより, 2 Gy/日のX線照射を行っても増殖する細胞株の樹立に世界で初めて成功した.<sup>21)</sup> この細胞株は, 臨床上使用されている2 Gy/日のX線に抵抗性を示すため, 臨床的放射線耐性 (clinically relevant radioresistant; CRR) 細胞と名付けた.<sup>22)</sup> これまでの経験から, CRR細胞は接着系でヒト由来のがん細胞であれば, どの細胞株からも樹立することができる. 一方で, 血球系に由来するU937細胞などからのCRR細胞株の樹立には成功していない. また, ヒト由来のがん細胞では3 Gy/日まで放射線抵抗性を獲得することを確認している. CRR細胞には, ゲノム背景が同一である親株が存在しているため, CRR細胞と親株とを比較することにより放射線抵抗性の要因が容易に明らかになると考えられる. CRR細胞を解析する上で念頭に置かなければいけない点は, CRR細胞とはがん細胞をX線照射に順応させて樹立した細胞株であるという点である. 従って, 放射線療法前にX線照射を受けていない腫瘍内に存在する放射線抵抗性細胞と必ずしも性質が同じであるとは言いきれない. CRR細胞は, 標準的放射線療法である2 Gy/日のX線分割照射に抵抗性であるという利点を生かして解析を行っている. 解析結果が, 直接臨床に応用できるのかという問題点は常に残っている. しかし, X線分割照射に抵抗性を示すがん細胞の*in vitro*としてのモデルとして基礎的知見を得るには有用であると考えている. 臨床に応用するためには*in vitro*の解析結果を, ノードマウスを用いた*in vivo*の解析で再検証する必要がある. さらに, 放射線療法で放射線に抵抗性を示したヒト検体を用いた再検証も必要である.

これまでの解析から, CRR細胞はX線で誘発されるDNA損傷を効率よく修復すること,<sup>21)</sup> autophagy細胞死が誘発されにくいこと,<sup>23)</sup> また微小管脱重合阻害剤であるDocetaxelに抵抗性を示すことなどを明らかにしてきた.<sup>24)</sup> さらに, ノードマウス背部皮下に移植したCRR腫瘍は親株由来の腫瘍よりもX線分割照射に抵抗性であることも分かり, *in vivo*でもCRR形質が維持されていることが分かった.<sup>25)</sup> そして, CRR腫瘍では血管密度の高いことも分かっており, 血管新生阻害剤が放射線抵抗性腫瘍の克服に有効であることを明らかにした. しかし, これまでに多くの研究者がCRR細胞を使用して放射線抵抗性に関する因子の単離を試みているが, 樹立した全てのCRR細胞に共通する放射線抵抗性因子の特定にはいまだ至っていない. 由来組織やゲノム背景は同一であるものの, CRR細胞と親株を比較・解析することで放射線抵抗性に関する因子を特定できるのであろうか. 本総説では, この点を考察したいと思う.

## 本 論

### CRR細胞におけるX線抵抗性の形質は不可逆的吗

樹立した全てのCRR細胞は2 Gy/日のX線分割照射に抵抗性を示すだけでなく, 比較的高線量の10 GyのX線単回照射にも抵抗性を示した.<sup>21)</sup> 従って, CRR細胞がX線抵抗性の形質を獲得しているという点は間違いない. CRR細胞は, X線抵抗性の形質を維持するため, 毎日2 GyのX線を1回照射している (Maintenance Irradiation; MI). 従って, これまでの総照射線量が5,000 Gyを超えているCRR細胞も存在する. ところで, MIを行わずに培養したCRR細胞はX線分割照射に抵抗性を示すのだろうか. この疑問に答えるため, MIを行わずにCRR細胞を長期間培養し, X線感受性が変化するのかを解析した. 半年間MIを行わずに培養したCRR細胞では, 2 Gy/日のX線に抵抗性を示す形質を維持していた. しかし, 1年以上MIを行わずに培養したCRR細胞に2 Gy/日のX線を照射すると, 30日以内に全ての細胞が死滅した. また, 単回照射への放射線感受性を調べるために Modified high-density survival assay を行うと,<sup>26)</sup> 半年間MIを行わずに培養したCRR細胞は親株に比べて明らかにX線に抵抗性を示したものの, 1年以上MIを行わずに培養したCRR細胞のX線感

受性は親株と同程度であった。<sup>27)</sup> 以上から、CRR細胞におけるX線抵抗性の形質はMIにより維持されており、X線抵抗性の形質は可逆的であることが分かった。

### CRR細胞における染色体の構成

放射線照射を受けた細胞には染色体異常が誘発されることがある。<sup>28,29)</sup> 従って、2 Gy/日のX線照射を1年以上続けているCRR細胞の染色体構成が親株と同様のままであるとは考えられない。しかし、これまでの解析からCRR細胞はX線で誘発されるDNAの二本鎖切断を効率よく修復することや、X線照射で誘発される突然変異頻度の低いことが分かっている。このことから推測すると、放射線抵抗性を獲得したCRR細胞では染色体の再構成はそれほど生じていないのではないかと推測さ

れる。CRR細胞は2 Gy/日のX線照射を行っても安定して増殖し続ける細胞であるため、染色体の構成を親株と比較することは興味深い点である。そこで、G-band分染法を行い染色体数の異数性、転座、部分欠失などの異常が生じているのかを解析した。ヒトの染色体は22種類の常染色体が2本ずつと性染色体が2本で構成されている。解析の結果、親株であるHepG2細胞の染色体は正常細胞と比較して顕著な変化はなく、それぞれの染色体が何番染色体であるのかを識別することができた(Fig. 1)。しかし、CRR細胞株であるHepG2-8960-R細胞の染色体を解析すると、極めて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。HepG2-8960-R細胞では、CRR細胞の樹立過程もしくはMIにより染色体の切断と再結合が何

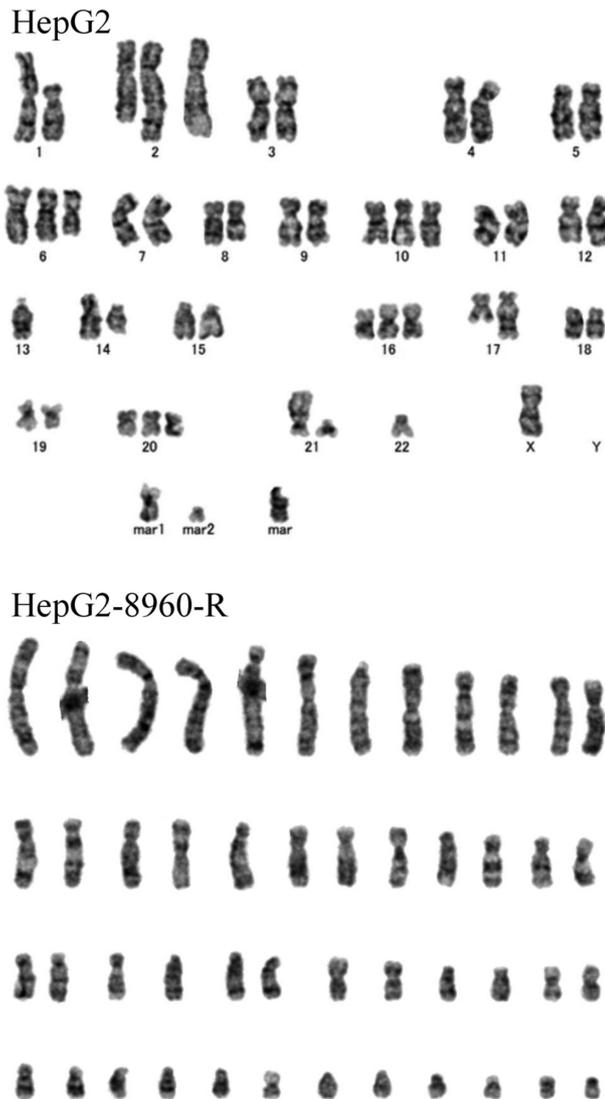


Fig. 1. Chromosome analysis of parental HepG2 and clinically relevant radioresistant HepG2-8960-R. Chromosome spreading combined with Giemsa staining was performed. Complex chromosome rearrangements are occurred in HepG2-8960-R. Based on ref. 39.

度も繰り返されていることが強く示唆された。さらに、詳細に染色体の再構成を解析するために、HepG2とHepG2-8960-Rのゲノムを用いた染色体Comparative genomic hybridization (CGH)解析を行った。染色体CGH解析では、より詳細な染色体レベルでのコピー数の減少、過剰、および増幅を検出することができる。解析の結果、HepG2-8960-R細胞のゲノムでは全ての染色体にわたってコピー数の減少、過剰、および増幅が生じていた

(Fig. 2)。さらに、特定の染色体領域におけるFluorescence *in situ* hybridization (FISH)を行った結果からも、HepG2-8960-R細胞においては染色体の増幅が生じていた (Fig. 3)。以上の結果から、CRR細胞にはゲノム背景が同一である親株が存在しているものの、染色体の構成は全く異なっており、親株とはだいぶ異なった細胞に変化していることが示された。



Fig. 2. Whole-genome idiogram of the submegabase resolution tiling array relative to the parental HepG2 cells. The array comparative genomic hybridization profiles of HepG2-8960-R cells are shown. The graphic profile represents the relative copy number of HepG2-8960-R to that of HepG2 along with each chromosome. Bars to the left show losses, and bars to the right show gains. Based on ref 22.

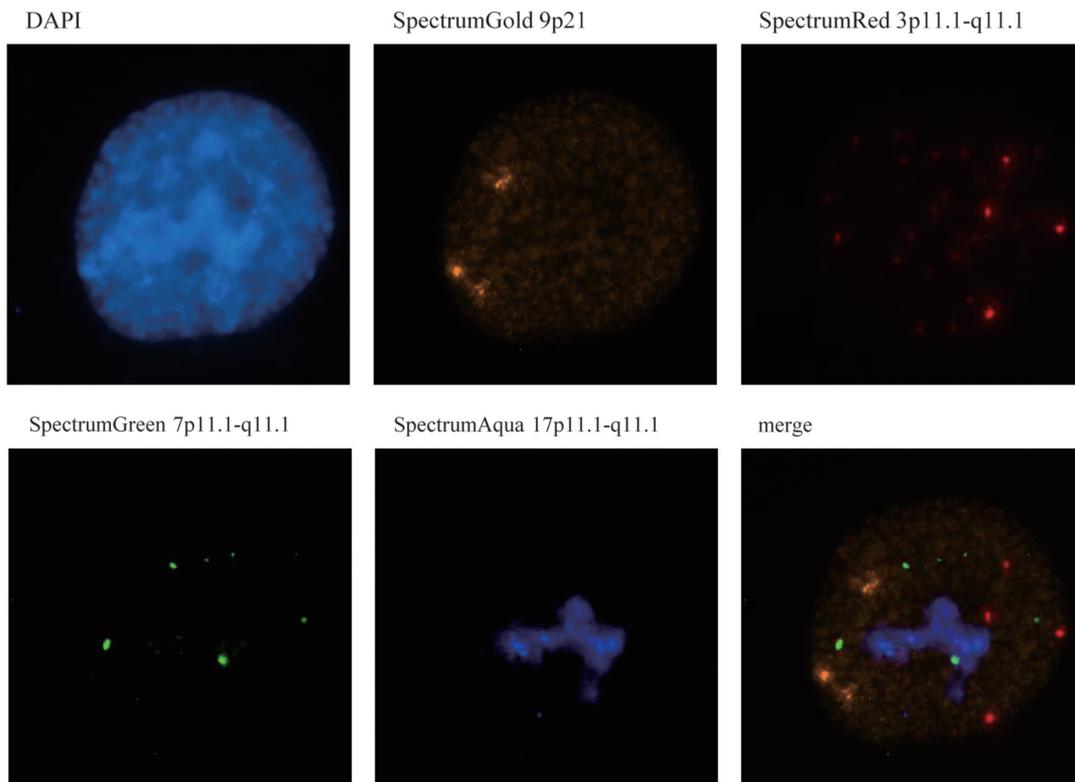


Fig. 3. Chromosome *in situ* hybridization of indicated gene loci of clinically relevant radioresistant HepG2-8960-R cells.

## 結 論

## 放射線抵抗性細胞を用いた研究のこれまでとこれから

CRR 細胞のように親株とゲノム背景が同一である放射線抵抗性細胞を樹立し、解析に用いている報告が増えている。<sup>30-32)</sup> これらの報告では、CRR 細胞のように低い線量の X 線を分割照射して、徐々に照射線量を増やしていき、放射線抵抗性細胞を樹立している場合もある。<sup>33)</sup> しかし、報告されている放射線抵抗性に関与する要因は多岐にわたっており、全ての放射線抵抗性細胞に共通する因子の報告はない。富田らは、MiR-7-5p が放射線抵抗性に関与していると報告しており、<sup>27)</sup> 一方で福本らは Guanine nucleotide-binding protein 1 が放射線抵抗性に関与していると報告している。<sup>34)</sup> 我々は放射線抵抗性の要因を特定するために、様々な組織に由来するヒトがん細胞株から CRR 細胞を複数種類樹立し解析してきた。また、複数の研究機関が CRR 細胞を用いて放射線抵抗性の要因を突き止めようとしてきた。<sup>35-37)</sup> これらの解析の中には、microarray 解析やメタボローム解析などがある。しかし、現状では樹立した全ての CRR 細胞に共通して発現が変化している遺伝子や形質は見つかっていない。また、miRNA の発現を網羅的に解析しても、同様である。

CRR 細胞は、形質維持のため毎日 MI を行っている。肺がん細胞株では、2 Gy/日の X 線分割照射を行うだけでも遺伝子発現は明らかに変化することが報告されている。<sup>38)</sup> ゲノム背景が同一であるという理由から親株と CRR 細胞を比較しても良いのであろうか。染色体解析から分かったことは、親株と CRR 細胞とでは染色体レベルではかなり異なっており、遺伝子のコピー数においても異なっている部分が多数存在することが分かった。従って、親株と CRR 細胞とを比較した場合、MI の影響や遺伝子の発現量がノイズとなり放射線抵抗性に関与する因子の特定には至らないのではないかと考察した。親株から CRR 細胞を樹立した段階で、もともとのゲノム背景は同一であるものの、両者は全く異なった細胞であると言わざるを得ない。細胞の形態においても、CRR 細胞は親株に比べて小さい。さらに、MI を行えば行うほど生じた染色体異常の頻度は増すと考えられ、1 年前の CRR 細胞と今の CRR 細胞は同じ細胞とは言えな

い。これまでは、放射線抵抗性の因子を特定するために、親株と MI を行っている CRR 細胞とを比較してきたものの、放射線抵抗性の要因が明らかになっていないのはこの比較に問題があるのではないかと推測される。それでは、どのような比較を行えばいいのであろうか。

CRR 細胞を MI なしで 1 年以上培養し続けると X 線抵抗性の形質は失われる。CRR 細胞は、過酸化水素に抵抗性の形質も持っているが、この形質も 1 年以上 MI を行わないと失われる。このことから、1 年以上 MI なしで培養し続けた CRR 細胞は CRR 形質を失っていると考えられる。また、MI なしで培養し続けた CRR 細胞は X 線照射を受けていないため、その間、染色体異常は生じにくいと考えられる。これらのことから、解析したい CRR 細胞の一部を凍結保存し、残りの細胞を CRR 形質が失われるまで MI なしで培養し続け、CRR 形質が失われた段階で凍結しておいた CRR 細胞と比較すれば、染色体やゲノム上の遺伝子のコピー数はほぼ同じであるものの、放射線感受性が異なる細胞を比較することになるのではないかと考えられる。このような比較の方法は今までになく、放射線抵抗性の要因を明らかにしやすくなるのではないかと考えられる。

**謝辞** 本研究は科研費 19K12326, 16K00538, 25340026 の助成を受けたものである。

**利益相反**

ありません。

**REFERENCES**

- 1) Bernier J., Hall E. J., Giaccia A., *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 737-747 (2004).
- 2) Windholz F., *Radiology*, **48**, 398-404 (1947).
- 3) Baskar R., Lee K. A., Yeo R., Yeoh K. W., *Int. J. Med. Sci.*, **9**, 193-199 (2012).
- 4) Guo W. F., Lin R. X., Huang J., Zhou Z., Yang J., Guo G. Z., *Radiat. Res.*, **164**, 27-35 (2005).
- 5) McKay M. J., Kefford R. F., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **31**, 345-352 (1995).
- 6) Rantanen V., Grenman S., Kulmala J., Grenman R., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **121**, 230-234 (1995).
- 7) Nunez M. I., Villalobos M., Olea N., Valenzuela M. T.,

- Pedraza V., McMillan T. J., *Br. J. Cancer*, **71**, 311–316 (1995).
- 8) Britten R. A., Liu D., Kuny S., Allalunis-Turner M. J., *Br. J. Cancer*, **76**, 1440–1447 (1997).
- 9) Tsuboi K., Tsuchida Y., Endo K., Yoshii Y., Nose T., *Brain Tumor Pathol.*, **14**, 19–25 (1997).
- 10) Kami K., Doi R., Koizumi M., Toyoda E., Mori T., Ito D., *Surgery*, **138**, 299–305 (2005).
- 11) Brondani D. R. A., Regner A., Grivicich I., Pretto S. D., Diel C., Kovaleski G., *Int. J. Oncol.*, **25**, 777–785 (2004).
- 12) Chaachouay H., Ohneseit P., Toulany M., Kehlbach R., Multhoff G., Rodemann H. P., *Radiother. Oncol.*, **99**, 287–292 (2011).
- 13) Chang H. W., Kim S. Y., Yi S. L., Son S. H., Song D. Y., Moon S. Y., *Oral Oncol.*, **42**, 979–986 (2006).
- 14) Russell J., Wheldon T. E., Stanton P., *Cancer Res.*, **55**, 4915–4921 (1995).
- 15) Mitsushashi N., Takahashi T., Sakurai H., Nozaki M., Akimoto T., Hasegawa M., *Int. J. Radiat. Biol.*, **69**, 329–336 (1996).
- 16) Wang Y., Chen Q., Jin S., Deng W., Li S., Tong Q., *Scand. J. Gastroenterol.*, **47**, 802–808 (2012).
- 17) Feng X. P., Yi H., Li M. Y., Li X. H., Yi B., Zhang P. F., *Cancer Res.*, **70**, 3450–3462 (2010).
- 18) Ogawa K., Utsunomiya T., Mimori K., Tanaka F., Haraguchi N., Inoue H., *Int. J. Oncol.*, **28**, 705–713 (2006).
- 19) Fukuda K., Sakakura C., Miyagawa K., Kuriu Y., Kin S., Nakase Y., *Br. J. Cancer*, **91**, 1543–1550 (2004).
- 20) Chang J. T., Chan S. H., Lin C. Y., Lin T. Y., Wang H. M., Liao C. T., *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 2271–2279 (2007).
- 21) Kuwahara Y., Li L., Baba T., Nakagawa H., Shimura T., Yamamoto Y., Fukumoto M., *Cancer Sci.*, **100**, 747–752 (2009).
- 22) Kuwahara Y., Roudkenar M. H., Urushihara Y., Saito Y., Tomita K., Roushandeh A. M., Fukumoto M., *Med. Mol. Morphol.*, **50**, 195–204 (2017).
- 23) Kuwahara Y., Oikawa T., Ochiai Y., Roudkenar M. H., Fukumoto M., Shimura T., Fukumoto M., *Cell Death Dis.*, **2**, e177 (2011).
- 24) 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).
- 25) Kuwahara Y., Mori M., Kitahara S., Fukumoto M., Ezaki T., Mori S., Fukumoto M., *Cancer Med.*, **3**, 310–321 (2014).
- 26) Kuwahara Y., Mori M., Oikawa T., Shimura T., Ohtake Y., Mori S., Fukumoto M., *J. Radiat. Res.*, **51**, 297–302 (2010).
- 27) Tomita K., Fukumoto M., Itoh K., Kuwahara Y., Igarashi K., Nagasawa T., Sato T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **518**, 712–718 (2019).
- 28) Sachs R. K., Hlatky L. R., Trask B.J., *Trends Genet.*, **16**, 143–146 (2000).
- 29) Koksai G., Pala F. S., Dalci D. O., *Mutat. Res.*, **329**, 57–61 (1995).
- 30) Yao F., Yu J., He Y., Liu J., Li H., Liu Q., *Oncol. Lett.*, **18**, 4825–4833 (2019).
- 31) Gray M., Turnbull A. K., Ward C., Meehan J., Martinez-Perez C., Bonello M., *Radiat. Oncol.*, **14**, 64 (2019).
- 32) de Llobet L. I., Baro M., Figueras A., Modolell I., Da Silva M. V., Munoz P., *Clin. Transl. Oncol.*, **15**, 189–197 (2013).
- 33) McDermott N., Meunier A., Lynch T. H., Hollywood D., Marignol L., *Int. J. Radiat. Biol.*, **90**, 115–126 (2014).
- 34) Fukumoto M., Amanuma T., Kuwahara Y., Shimura T., Suzuki M., Mori S., Fukumoto M., *Cancer Sci.*, **105**, 1351–1359 (2014).
- 35) Saito Y., Abiko R., Kishida A., Kuwahara Y., Yamamoto Y., Yamamoto F., Fukumoto M., Okubo Y., *Cell Biochem. Funct.*, **33**, 73–79 (2015).
- 36) Nakashima H., Yoshida R., Hirose A., Kawahara K., Sakata J., Arita H., Yamamoto T., Toya R., Murakami R., Hiraki A., Shinohara M., Ito T., Kuwahara Y., Nakayama H., *Tumour Biol.*, **41**, 1010428319826853 (2019).
- 37) Tomita K., Kuwahara Y., Takashi Y., Igarashi K., Nagasawa T., Nabika H., Sato T., *Tumour Biol.*, **40**, 1010428318799250 (2018).
- 38) Ahn S. J., Choi C., Choi Y. D., Kim Y. C., Kim K. S., Oh I. J., Ban H. J., Yoon M. S., Nam T. K., Jeong J. U., Song J. Y., Chung W. K., *Anticancer Res.*, **34**, 4939–4948 (2014).
- 39) 桑原義和, 富田和男, 北原秀治, 五十嵐健人, 漆原佑介, 齋藤陽平, 佐藤友昭, 栗政明弘, 福本学, *東北医科薬科大学研究誌*, **65**, 11–19 (2018).