

## 総 説

### 2 Gy/日の X 線分割照射に抵抗性を示すがん細胞の樹立と解析

桑原 義和,<sup>a,b\*</sup> 富田 和男,<sup>b</sup> 漆原 佑介,<sup>c</sup> 齋藤 陽平,<sup>d</sup>  
佐藤 友昭,<sup>b</sup> 栗政 明弘,<sup>a</sup> 福本 学<sup>e</sup>

#### Radioresistant Cell Lines which Continue to Proliferate under Exposure to 2 Gy/day of X-Rays

Yoshikazu KUWAHARA,<sup>a,b\*</sup> Kazuo TOMITA,<sup>b</sup> Yusuke URUSHIHARA,<sup>c</sup> Yohei SAITO,<sup>d</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>Laboratory for Radiation Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku University; <sup>d</sup>Department of Radiopharmacy,  
Faculty of Pharmaceutical Science, Tohoku Medical and Pharmaceutical University; <sup>e</sup>Department of Molecular  
Pathology, Tokyo Medical University.

(Received November 20, 2017)

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. Conventional fractionated RT consists of 2-Gy X-rays, fractionated once a day, 5 days a week for 5-7 weeks in total 60 Gy. The efficacy of RT depends on the existence of radioresistant cells, which remains one of the most critical obstacles in RT and radio-chemotherapy. To improve the efficacy of RT understanding the characteristics of radioresistant cells is one of the important subjects in radiation biology. However, the concordant mechanisms of cellular radioresistance have not been clarified yet, presumably because radioresistance has been studied among cells with different genetic backgrounds, that is, cells from different origins. Recently, a system to compare between radioresistant and sensitive cells with the isogenic background was established. In this review, some aspects of cellular radioresistance mainly focusing on clinically relevant radioresistant (CRR) cell lines that can continue to proliferate even under exposure to 2-Gy X-rays, once a day, for more than 30 days are described.

**Key words** — cancer radiotherapy, clinically relevant radioresistant (CRR) cell line, fractionated radiation, radioresistance

#### はじめに

がんの治療は大きく手術療法、化学療法、放射線療法に分けられる。それぞれの特徴から、手術療法と放射線療法は局所療法、化学療法と放射線療法は非観血療法として包括される。がんの治療には、がんの種類によりそれぞれの治療法が単独に、あるいは集学療法として組み合わせて用いられている。放射線療法は、正常組織と腫瘍組織の放射線に対する感受性と反応性の差を利用して行う治療法であり、がんができた臓器の形や働きを

保ちながら、がんを治療することができるという大きな利点がある。近年では、がんに限局して放射線療法を行う装置や技術開発の目覚ましい発展がみられ、定位放射線療法あるいは強度変調放射線療法と呼ばれている。また、抗がん剤と併用した放射線化学療法も急速に進行している。しかし、放射線療法には問題点もある。放射線に抵抗性を示す細胞の出現や存在はその一つであり、今なお克服すべき課題である。

放射線に抵抗性を示すがん細胞の研究は以前から行われており、現在も進行中である。<sup>1-5)</sup> ほとんどの研究では、由来する臓器は同じであるが放射線感受性が異なり、かつゲノム背景も異なるがん細胞株を比較対象としている。そのため、放射線抵抗性への関与が疑われる様々な因子が報告されている。前立腺がんではPI3K/Akt/mTOR経路

<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>東北大学大学院医学系研究科放射線生物学分野, <sup>d</sup>東北医科薬科大学薬学部放射薬品学教室, <sup>e</sup>東京医科大学分子病理学講座

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

が、<sup>2)</sup> また、肺がんでは RAF1/ERK/IKK/NF $\kappa$ B 経路ががん細胞の放射線抵抗性に関与していることが示唆されていることから、<sup>6)</sup> 放射線抵抗性には様々な経路が関与していると考えられる。また、がんの放射線抵抗性にはがん幹細胞の関与も知られるようになった。<sup>7-9)</sup>

ゲノム背景が同一であるがん細胞株を比較対象とした研究では、10 Gy など比較的高い線量の X 線や  $\gamma$  線を細胞に照射して、生き残った細胞を放射線抵抗性細胞として解析している場合もある。これらの研究においても、がん細胞の放射線抵抗性には複数の因子の関与が知られている。<sup>10)</sup> 上述した研究で得られた解析結果は、放射線生物学上たいへん重要であることは否定できない。しかし、標準的放射線療法とは照射条件が異なるため、解析結果をそのまま臨床応用できるのかは疑問である。

放射線療法時に存在する放射線抵抗性細胞を克服するために、ゲノム背景が同一であり、2 Gy/日の X 線照射を 30 日以上行っても増殖するがん細胞株の樹立に取り組んだ。臓器特異性を省き放射線抵抗性の普遍性を明らかにするために、複数の臓器に由来するがん細胞株を樹立に用いた。がんの標準的な分割放射線療法は、1日 2 Gy、週に 5 日、合計 60-80 Gy の X 線を照射することで行われる。これまでに、2 Gy/日の X 線を 30 日以上照射し続けても増殖するがん細胞の報告例はない。

数年の歳月をかけて、2 Gy/日の X 線を毎日照射し続けても増殖するがん細胞の樹立に成功した。

既に樹立法は確立しており、最短 3 カ月で樹立することができる。本総説では樹立した放射線抵抗性細胞に関する、これまでに集積された知見を紹介する。

### CRR (Clinically relevant radioresistant 臨床的放射線耐性) 細胞の樹立

がん細胞に比較的低い線量の X 線を照射し続けると、照射された細胞は照射されていない細胞に比べて X 線に抵抗性を示す。志村らは、12 時間間隔で 0.5 Gy の X 線をおよそ 1 カ月間照射し続けると、cyclin D1 の過剰発現が誘導され、照射されたがん細胞は X 線に抵抗性 (ARR; acquired radioresistance 獲得耐性) を示すことを報告している。<sup>11)</sup> しかし、ARR 細胞に 2 Gy/日の X 線を分割照射すると 30 日以内に死滅してしまうことから、ARR 細胞は臨床問題となる放射線抵抗性細胞のモデルにはなりえないと考えられる。また、cyclinD1 を高発現した乳がん細胞では、高発現していない細胞に比べて放射線感受性になるという研究もあり、<sup>12)</sup> ARR 細胞の性質と矛盾する。

0.5 Gy/日の X 線 (線量率 1 Gy/分) 照射から、徐々に照射線量を上げていくことで、2 Gy/日の X 線照射を行っても増殖する細胞が樹立できるのではないかと考えた (Fig. 1)。ほぼ確実に樹立できる方法として、以下の手法があげられる。0.5 Gy/日の X 線を 30 日間がん細胞に照射した。この線量では細胞は問題なく増殖した。さらに、1 Gy/日の

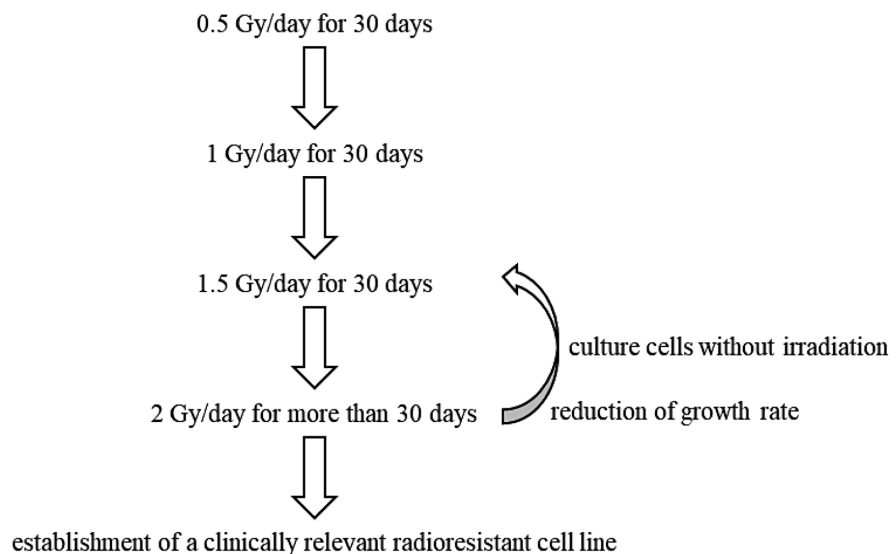


Fig. 1. Schematic illustration for the establishment of clinically relevant radioresistant cell lines. Establishment of CRR cell lines are conducted by step-wise increase of X-ray dose of fractionated radiation from 0.5 to 2 Gy/day *in vitro*. (based on Kuwahara *et al* 2017 with some modifications)

X 線を 30 日間照射した。ヒトのがんに由来する培養細胞では、1 Gy/日の X 線照射までは問題なく増殖した。さらに、1.5 Gy/日の X 線を 30 日間照射した。1.5 Gy/日の X 線照射で細胞の増殖率は急激に低下した。しかし、20 日以上 1.5 Gy/日の X 線を照射し続けると、細胞の増殖率は回復してきた。1.5 Gy/日の X 線照射を行っても問題なく増殖する細胞に 2 Gy/日の X 線を照射した。2 Gy/日の X 線を照射すると、ほとんどの細胞の増殖率は急激に低下し細胞分裂は停止した。再増殖の見込みがない場合には照射線量を 1.5 Gy/日に下げ、再び分裂しはじめるのを待ち、2 Gy/日の X 線を照射した。2 Gy/日の X 線を 30 日以上照射し続けても増殖した場合、CRR 細胞の樹立に成功したと考えた。<sup>13)</sup> これまでに、ヒト由来のがん細胞で CRR 細胞を樹立できなかった例はない。口腔がんとして使用されていた KB 細胞は、後に HeLa 細胞の垂株だと判明したものの、<sup>14,15)</sup> HeLa 細胞に比べて極めて X 線に高感受性である。この KB 細胞からも CRR 細胞

の樹立に成功している。従って、ヒトがん細胞は潜在的に 2 Gy/日の X 線に抵抗性になる可能性があることが示唆される。また、CRR 細胞は ARR 細胞とは異なり cyclinD1 の高発現は見られないことから、cyclinD1 は臨床上問題となるがん細胞の放射線抵抗性にはあまり関与していないことが示唆された。

CRR 細胞は X 線抵抗性の形質を維持するため、2 Gy の X 線を毎日照射し続けており、総照射線量が 2,000 Gy に達する細胞もいる。しかし、形質を維持するための照射を止めても、少なくとも半年間は X 線に抵抗性を示した。また、CRR 細胞は X 線分割照射のみならず、単回照射にも抵抗性を示した。<sup>16)</sup>

樹立に成功した CRR 細胞を Table 1 に示す。ヒト由来のがん細胞は、3.5 Gy/日の X 線照射まで耐えられることが分かった。また、マウス由来の MM102 細胞では、9.5 Gy/日という高線量の X 線を照射し続けても増殖した。

Table 1. clinically relevant radioresistant cell lines.

parental cell line	origine	clinically relevant radioresistant cell line
A549	Human alveolar adenocarcinoma	A549-R (2 Gy/day)
COS7	derived from monkey kidney tissue	COS7-R (2 Gy/day)
H1299	Human non-small cell lung carcinoma	H1299-R (2 Gy/day)
HeLa	Human cervix adenocarcinoma	HeLa-R (2 Gy/day) HeLa-R-3 (3 Gy/day) HeLa-R2 (2 Gy/day) HeLa-tmp-R (2 Gy/day)
HepG2	Human hepatocellular carcinoma	HepG2-8960-R (2 Gy/day) HepG2-8960-R-3 (3 Gy/day) HepG2-R (2 Gy/day) HepG2-400-R HepG2-A-R HepG2-tmp-R
HSC2	Human oral squamous cell carcinoma	HSC2-R (2 Gy/day)
HSC3	Human oral squamous cell carcinoma	HSC3-R (2 Gy/day)
HSC4	Human oral squamous cell carcinoma	HSC4-R (2 Gy/day)
KB	HeLa contaminant	KB-R (2 Gy/day)
LS174T	Human colon adenocarcinoma	LS174T-tmp-R (2 Gy/day)
MM102-R	Mouse breast cancer	MM102-R (9.5 Gy/day)
PC3	Human prostate adenocarcinoma	PC3-R (2 Gy/day)
SAS	Human tongue carcinoma	SAS-R (2 Gy/day) SAS-R-3 (3 Gy/day) SAS-R2 (2 Gy/day) SAS-tmp-R (2 Gy/day)
U2OS	Human bone osteosarcoma	U2OS-R (2 Gy/day)

(based on Kuwahara *et al* 2017 with some modifications)

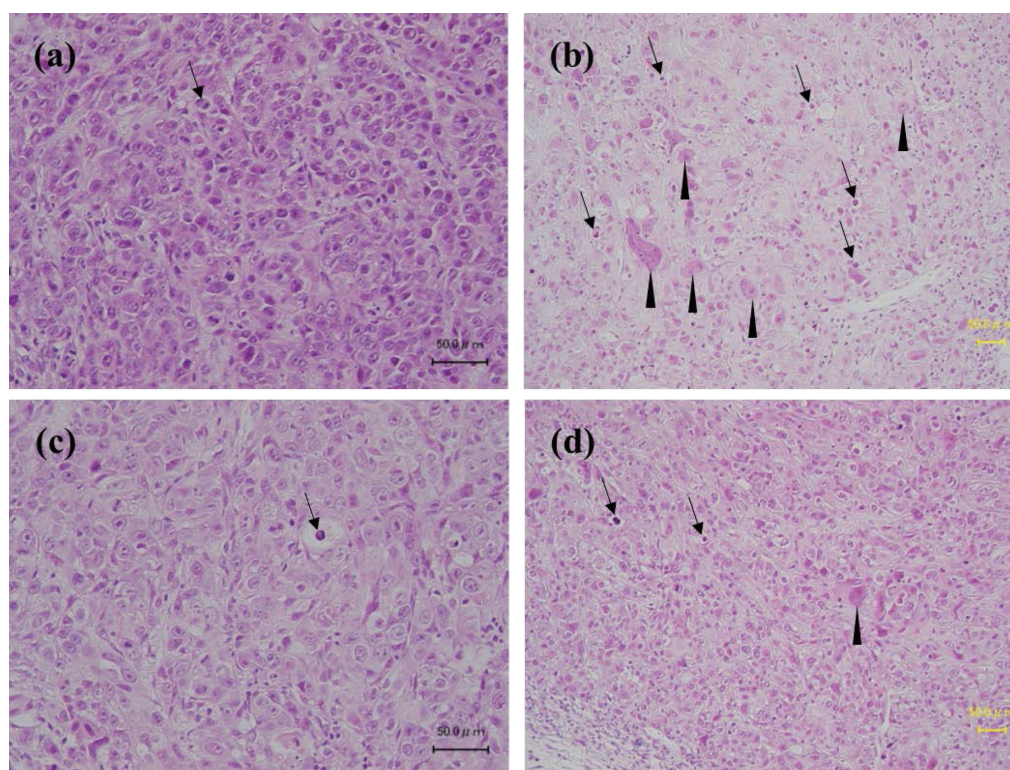


Fig. 2. *In vivo* model of clinically relevant radioresistant tumors. Parental SAS and radioresistant SAS-R cells were subcutaneously injected into the backs of immunodeficient nude mice. (a) SAS tumor without X-irradiation. (b) SAS tumor with 30×2-Gy of X-rays. Many pyknotic cells (arrows) and giant cells (arrow heads) are observed. (c) SAS-R tumor without X-irradiation. (d) SAS-R tumor with 30×2-Gy of X-rays. Unlike SAS tumor exposed to total 60 Gy of X-rays pyknotic or giant cells are seldom observed. (based on Kuwahara *et al* 2017 with some modifications)

### *In vivo*でのCRR細胞

CRR細胞をヌードマウス背部皮下に移植すると腫瘍を形成する。この腫瘍は2 Gy/日のX線照射に抵抗性を示した。従って、*in vivo*でのX線抵抗性腫瘍モデルの構築に成功したと考えられる。標準的放射線療法に明らかな抵抗性を示す腫瘍は今までに報告がなく、生体の代謝を考慮することができる*in vivo*での放射線化学療法の評価に極めて有用なモデルである。

ヒト口腔がん由来SAS細胞およびそのCRR細胞であるSAS-R細胞をヌードマウス背部の左右に皮下移植した。数日で細胞は生着し腫瘍を形成する。腫瘍部以外を鉛の板で遮蔽し、2 Gy/日のX線を局所的に分割照射した。その結果、SAS腫瘍は照射線量に応じて縮小し、総照射線量が60 Gyに達する前に腫瘍はほぼ消滅した。一方、SAS-R腫瘍に2 Gy/日のX線を分割照射しても腫瘍は縮小せず、総照射線量が60 Gyに達しても消滅することはなかった。<sup>17)</sup>

X線分割照射を行う前の腫瘍を摘出して組織学的解析を行うと、SAS-R腫瘍ではSAS腫瘍に比べて血管密度が高かった。従って、X線に抵抗性を

示すSAS-R腫瘍では、腫瘍内酸素濃度の高いことが示唆された。一般的に低LET (linear energy transfer) 放射線に抵抗性を示す腫瘍、特に血管から離れた部分のがん細胞は低酸素状態にあるというこれまでの知見と矛盾する。さらに、SAS-R腫瘍は栄養要求性が高いことも示唆された。これは*in vitro*の解析からも示されている。

標準的放射線療法を開始したSASおよびSAS-R腫瘍の組織構築を経日的に調べると、SAS腫瘍では、照射線量に応じて死細胞であるpyknotic cellや多核細胞の増加が目立つのに対して、SAS-R腫瘍ではこれらの顕著な増加は見られなかった (Fig. 2)。また、SAS腫瘍では照射線量に応じて結合組織の増加が見られた。

### X線照射で生じたDNA損傷の修復能とX線抵抗性

電離放射線により切断された染色体の断片は、有糸分裂の過程で取り残され、小核として観察されることがある。小核は、照射された細胞内で生じたDNA二本鎖切断が修復されない場合に生じるものであり、細胞のDNA二本鎖切断 (DNA

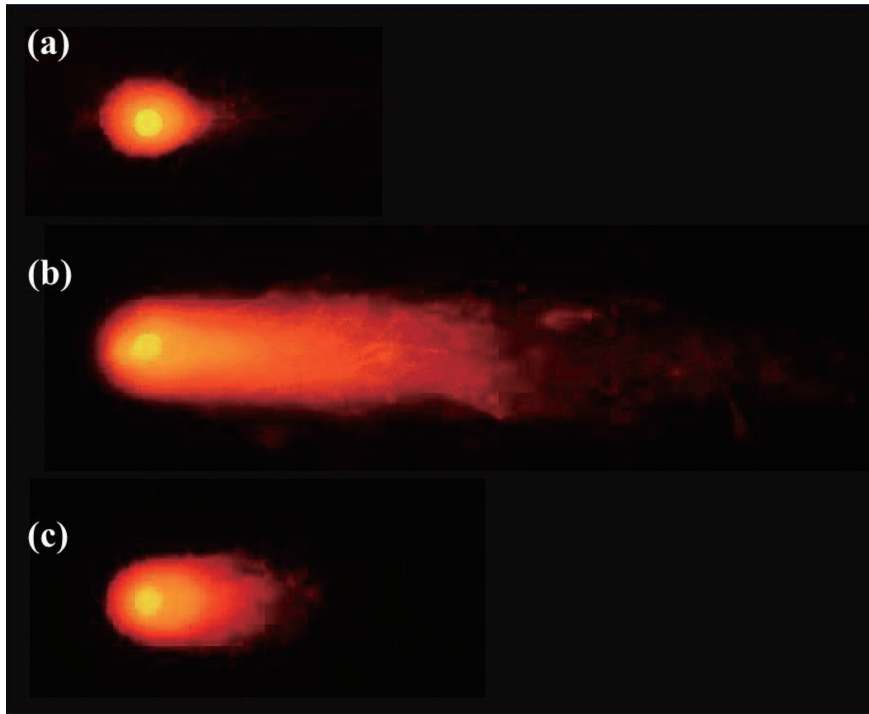


Fig. 3. Representative photographs of a comet showing DNA migration pattern in HepG2 cells stained with ethidium bromide. Comet tail indicates DNA double strand breaks in HepG2 cell. (a) HepG2 cells without irradiation. (b) HepG2 cells immediately after exposure to 10 Gy of X-rays. (c) HepG2 cells 6 hours after exposure to 10 Gy of X-rays.

double strand breaks; DNA dsbs) 修復能を反映する指標の一つであると考えられている。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞および CRR 細胞である HepG2-8960-R 細胞に 2 Gy/日の X 線を分割照射すると、HepG2 細胞では照射線量に応じて小核を有する細胞頻度の増加がみられるのに対して、HepG2-8960-R 細胞では増加はみられなかった。<sup>16)</sup> この傾向は 10 Gy の X 線単回照射でも見られた。

DNA dsbs の指標の一つとして、H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) が知られている。<sup>18)</sup>  $\gamma$ -H2AX のフォーカス形成を免疫細胞化学的に解析した。標準的放射線療法を行った HepG2 細胞では照射線量に応じて  $\gamma$ -H2AX の増加が見られたのに対して、HepG2-8960-R 細胞では基底状態以上の増加は見られなかった。この傾向は、SAS-R 細胞など他の CRR 細胞でも同様であった。

HPRT 遺伝子座の突然変異頻度を解析したところ、HepG2 細胞では標準的放射線療法で突然変異頻度が増加するのに対して、HepG2-8960-R 細胞では基底状態以上の増加は見られなかった。<sup>19)</sup> また、10 Gy などの X 線単回照射では、HepG2-8960-R 細胞での誘発突然変異頻度は HepG2 細胞に比べて低かった。HPRT 遺伝子座に突然変異のある細胞の

mutation spectrum を PCR で解析すると、HepG2-8960-R 細胞では HepG2 細胞に比べて欠失型突然変異の誘発頻度が低かった。

CGH (comparative genomic hybridization) 解析の結果から、HepG2-8960-R 細胞では、HepG2 細胞と比較してゲノムの再構成が生じていた。しかし、これは CRR 細胞を樹立する過程で生じたものであり、樹立後は、2 Gy/日の X 線照射を受けても安定的なゲノムが維持されることが分かった。<sup>13)</sup> 以上から、CRR 細胞は親株に比べて X 線で誘発される DNA 損傷の修復能が高いということが示唆された。

DNA dsbs の再結合を経時的に電気泳動で定量化することのできる neutral comet assay を用いた解析では (Fig. 3), HepG2-8960-R 細胞に生じた DNA dsbs は HepG2 細胞に生じた DNA dsbs よりもゆっくり修復されることが示された。このような DNA repair kinetics を示す細胞は、メダカで報告されている。<sup>20)</sup> このメダカから単離した培養細胞は、 $\gamma$  線に抵抗性を示した。

#### Autophagy 細胞死と X 線抵抗性

古典的放射線生物学では、細胞の増殖に着目した 2 種類の細胞死、つまり増殖死と間期死が定義

されている。放射線による細胞致死効果の評価には細胞分裂の破綻を示す増殖死が重要である。放射線を照射された細胞は、1~数回分裂した後、分裂を止めてしまう一方で、このような細胞でも核酸・タンパク質合成などの代謝活動は継続し続けている。つまり、細胞の代謝は継続しつつも、分裂する能力を失っている状態を増殖死と定義している。一方、間期死は細胞が分裂することなく不活化し死ぬことと定義されている。大線量の放射線を照射され細胞機能が失われた場合や、小線量の放射線照射によるリンパ球の細胞死は間期死に区分される。

分子生物学の発展により、細胞死には多様性のあることが知られるようになった。放射線を照射されたがん細胞の細胞死は apoptosis を中心に解析されてきた。しかし、実際には apoptosis の誘発頻度は考えられていたよりも低く、<sup>21)</sup> 多様な細胞死が誘発されることが分かってきた。<sup>22)</sup> 放射線照射による apoptosis はリンパ球<sup>23)</sup> や精巣、<sup>24,25)</sup> 小腸<sup>26,27)</sup> など分裂の盛んな正常組織で顕著に見られるが、がん細胞での apoptosis の誘発頻度は低い。がん細胞に誘発される細胞死として、apoptosis のほかに、necrosis や autophagic cell death, また、mitotic catastrophe が知られている。<sup>28-30)</sup>

X線照射後に誘発される apoptosis を annexin-V 染色で定量的に解析すると、HepG2 細胞および HepG2-8960-R 細胞共に、10 Gy の X 線単回照射および 2 Gy/日の X 線を 5 回分割照射した後、顕著な apoptosis 細胞の増加は見られなかった。<sup>31)</sup>

10 Gy の X 線を照射して HepG2 細胞の形態変化を経日的に観察すると、照射 48 時間以内では細胞の顕著な変化は見られなかった。<sup>32)</sup> 一般的に、照射 48 時間以内に細胞死が誘発されると考えられているが、SAS, HepG2, HeLa 細胞の形態変化を調べた限り、この時間に死細胞が誘発されることはなかった。照射後 3 日目に M 期と思われる球状の形態を示す細胞の増加が見られた。照射 4 日目で apoptosis の指標である apoptotic body を伴う死細胞と伴わない死細胞の増加が見られ、後者の頻度が多い傾向にあった。このことから、分裂しようとした細胞がうまく分裂できずに細胞死を誘発したのではないかと考えられる。照射 4 日目から多核を有する細胞の増加が見られた。多核細胞は、分裂しようとした細胞がうまく分裂できず融合した細胞であり、<sup>33)</sup> タイムラプス解析を行うとしばしば見ることができる。一方、HepG2-8960-R 細胞では、apoptotic body を伴わない死細胞の増加がわずかに見られた。また、顕著な多核細胞の増加は

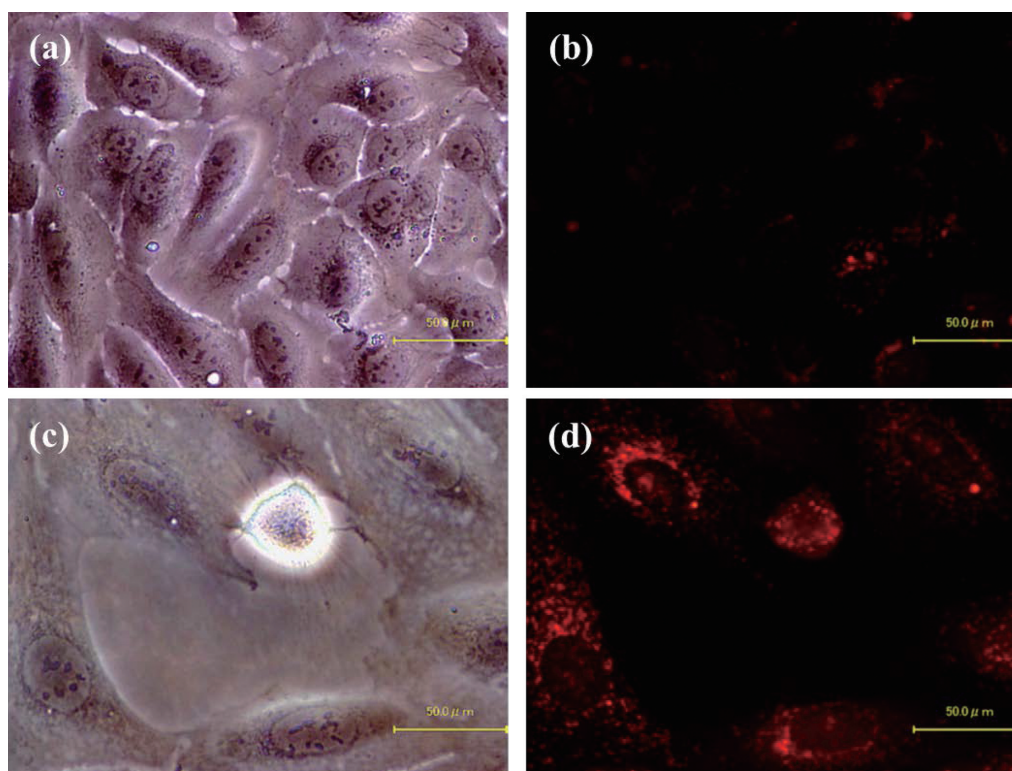


Fig. 4. X-Irradiation induced autophagy in RFP-LC3 expressing U2OS cells. (a) and (b) RFP-LC3 expressing U2OS cells without irradiation. (c) and (d) RFP-LC3 expressing U2OS cells 5 days after exposure to 10 Gy of X-rays.

見られなかった。

Apoptotic body を伴わない死細胞がどのような様式の死細胞なのかを明らかにするために、autophagic cell death に注目した。Autophagy の誘発は、電子顕微鏡による細胞質内 autophagosome の増加の有無や、ウエスタンブロッティングによる p62 の減少、LC3-I から LC3-II への変換で検出することができる。<sup>31)</sup> また、GFP-LC3 や RFP-LC3 を細胞に導入し、autophagosome の増加を蛍光顕微鏡下でリアルタイムに検出することで解析することができる (Fig. 4)。<sup>34)</sup>

抗 LC3 抗体を用いて細胞質内の autophagosome を免疫細胞化学的に可視化し、X 線で誘発される autophagy 細胞死を解析した。細胞質内が autophagosome で満たされている細胞を autophagy 細胞死とした。その結果、親株では 10 Gy の X 線を照射すると、4 日目あたりから autophagy 細胞死が検出されはじめてくるのに対して、CRR 細胞では基底状態以上の増加は見られなかった。また、2 Gy/日の X 線分割照射でも親株には autophagy 細胞死が誘発されるが、CRR 細胞では誘発されないことが分かった。このことから、autophagy が細胞の放射線感受性に関与していることが強く示唆された。そこで、autophagy を誘導する rapamycin 処理を行い、放射線抵抗性を克服することができるのではないかと考えた。CRR 細胞を rapamycin

処理して、X 線感受性を調べると、親株と同程度に X 線単回照射に感受性になることが分かった。また、親株に autophagy を抑制する 3-methyladenine 処理すると、CRR 細胞と同程度に X 線単回照射に抵抗性になることが分かった。このことから、autophagy が CRR 細胞の放射線感受性に関与していることが強く示唆された。しかし、これまでのところ autophagy の誘導は細胞死に関与しているという報告と、がん細胞の生存に関与しているという報告があり、今なお未知の部分が多い。<sup>35-37)</sup>

### X 線抵抗性と抗がん剤

CRR 細胞はなぜ X 線に抵抗性を示すのか、そのメカニズムを明らかにするために、作用機序の異なる複数の抗がん剤との交差耐性を WST (water soluble tetrazolium salts) assay および modified high density survival assay<sup>38)</sup> で調べた。X 線抵抗性と交差耐性を示す抗がん剤を特定することができれば、その抗がん剤の作用機序から X 線抵抗性のメカニズムに迫れると考えた。シスプラチンやブレオマイシンなど、がん細胞への作用機序が異なる複数の殺細胞性抗悪性腫瘍薬を用いたスクリーニング結果から、樹立した全ての CRR 細胞はタキサン系の抗がん剤であるドセタキセル (docetaxel; DTX) に交叉耐性を示した。DTX は、tubulin の重合を促進して微小管を安定化する。<sup>39)</sup>

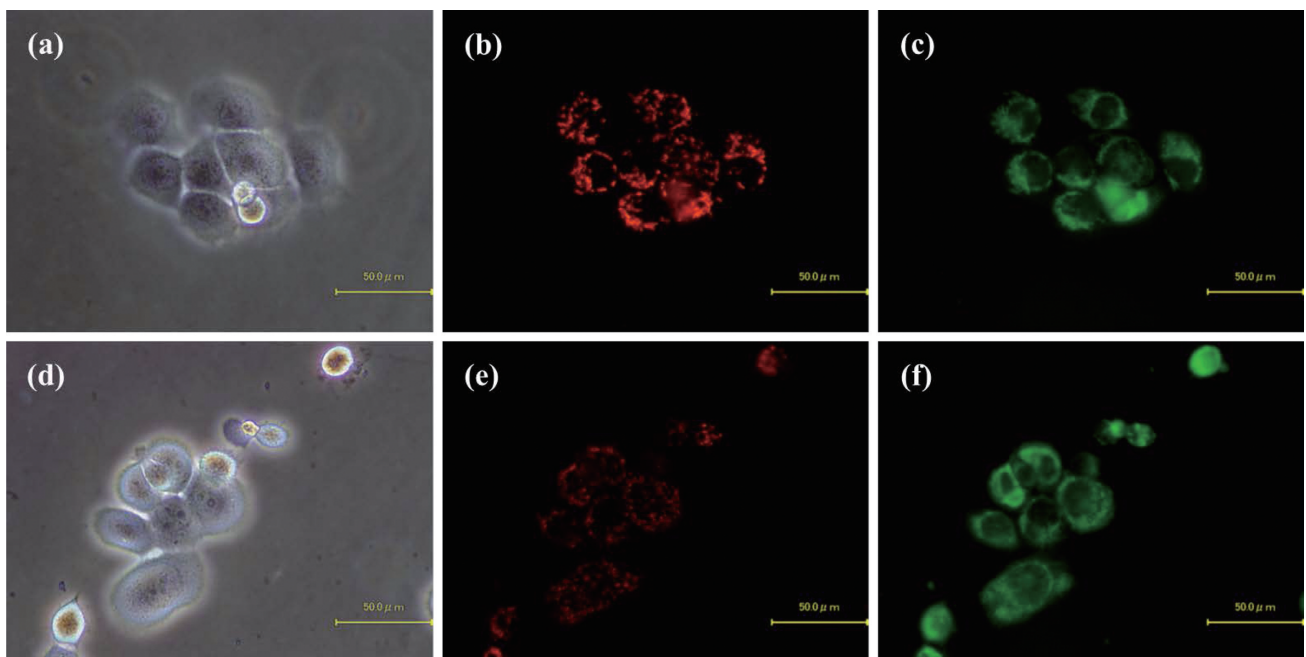


Fig. 5. Membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of mitochondria in parental SAS (a-c) and clinically relevant radioresistant SAS-R (d-f) cells determined by 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) staining. To represent the mitochondrial mass MitoTracker green staining was performed.

その結果, 細胞分裂が停止しがん細胞に apoptosis を誘導する抗がん剤である. がん細胞の DTX 抵抗性獲得のメカニズムは古くから調べられており, 薬剤排出ポンプである P-糖タンパク質 (P-glycoprotein; P-gp) の過剰発現が知られている.<sup>40)</sup> また,  $\beta$ -tubulin の薬剤結合部位の変異や過剰発現もがん細胞の DTX 抵抗性に関与している.<sup>41)</sup> そこで, CRR 細胞で薬剤排出ポンプまたは  $\beta$ -tubulin の過剰発現が検出できるのか遺伝子発現を調べたが, それらの関与は否定された.

DTX 抵抗性には, ミトコンドリア (mitochondria; mt) の関与も知られている.<sup>42)</sup> JC-1 染色で mt の膜電位 ( $\Delta\Psi_m$ ) を検出すると, CRR 細胞の  $\Delta\Psi_m$  の低下がみられ, mt の機能低下が示唆された (Fig. 5). MitoSOX red 染色で, X 線照射後および DTX 処理後に mt 由来の活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) を解析すると, 親株では検出されるのに対して CRR 細胞では検出されなかった. このことから, mt が CRR 細胞の X 線および DTX 抵抗性に関与していることが強く示唆された.<sup>43)</sup>

細胞内に mt は存在しているが, mtDNA を欠失している  $\rho 0$  細胞でも<sup>44)</sup>  $\Delta\Psi_m$  の低下が知られている. そこで,  $\rho 0$  細胞を樹立して X 線感受性および DTX 感受性を解析した.  $\rho 0$  細胞は, 細胞を低濃度の ethidium bromide 処理することで容易に樹立することができる.<sup>45)</sup> HeLa- $\rho 0$  細胞や SAS- $\rho 0$  細胞は, その親株である  $\rho+$  細胞に比べて X 線単回照射および DTX に抵抗性を示した. しかし, HeLa- $\rho 0$  細胞や SAS- $\rho 0$  細胞に標準的放射線療法を行うと死滅した. また, HeLa-R より樹立した HeLa-R- $\rho 0$  細胞は X 線単回照射に抵抗性を示すが, 標準的放射線療法には抵抗性を示さなかった. このことから, mt の機能を完全に抑制してしまうと X 線単回照射には抵抗性になるものの, X 線分割照射に対する抵抗性には mt の機能が不可欠であることが推測された.

### CRR 細胞の今後

CRR 細胞は, 放射線療法時に出現するがん細胞の X 線抵抗性を明らかにする上で大変有用な細胞株である. 今までの解析から, mt が CRR 形質に関与していることが強く示唆されている. mt が X 線抵抗性に関与していれば大変興味深い発見であり, より有効な放射線療法の開発に貢献できると考えられる. 齋藤らは, HepG2-8960-R 細胞では,

プロモーター領域のメチル化に伴う EGFR の発現低下を明らかにし, セツキシマブは CRR 細胞に有効性を示さないことを報告している.<sup>46)</sup> 福本らは, GBP1 の高発現が CRR 細胞の放射線抵抗性に関与していることを報告している.<sup>47)</sup> また, 高橋らは炭素線照射が CRR 細胞に有効であることを報告している.<sup>48)</sup> 現在, 複数の研究機関で CRR 細胞の解析が行われている.

### 謝辞

本研究は科研費 16K11513, 16K15571, 16K00538, 24659174, 16K15571, 26670184 の助成を受けたものである.

### 利益相反

ありません.

### REFERENCES

- 1) Yamamoto V. N., Thylur D. S., Bauschard M., Schmale I., Sinha U. K., *Oral Oncol.*, **63**, 44–51 (2016).
- 2) Chang L., Graham P. H., Ni J., Hao J., Bucci J., Cozzi P. J., Li Y., *Crit Rev Oncol Hematol.*, **96**, 507–517 (2015).
- 3) Hatanpaa K. J., Burma S., Zhao D., Habib A. A., *Neoplasia.*, **12**, 675–684 (2010).
- 4) Milas L., Raju U., Liao Z., Ajani J., *Semin Oncol.*, **32**, S78–81 (2005).
- 5) Bergman P. J., Harris D., *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **27**, 47–57 (1997).
- 6) Tsolou A., Liousia M., Kalamida D., Pouliliou S., Giatromanolaki A., Koukourakis M., *Cancer Biol Med.*, **14**, 293–301 (2017).
- 7) Diehn M., Cho R. W., Lobo N. A., Kalisky T., Dorie M. J., Kulp A. N., Qian D., Lam J. S., Ailles L. E., Wong M., Joshua B., Kaplan M. J., Wapnir I., Dirbas F. M., Somlo G., Garberoglio C., Paz B., Shen J., Lau S. K., Quake S. R., Brown J. M., Weissman I. L., Clarke M. F., *Nature.*, **458**, 780–783 (2009).
- 8) Qi X. S., Pajonk F., McCloskey S., Low D. A., Kupelian P., Steinberg M., Sheng K., *Radiother Oncol.*, **124**, 455–461 (2017).
- 9) Tyagi A., Vishnoi K., Kaur H., Srivastava Y., Roy B. G., Das B. C., Bharti A. C., *Sci Rep.*, **7**, 4781 (2017).
- 10) McDermott N., Meunier A., Lynch T. H., Hollywood



- D., Marignol L., *Int J Radiat Biol.*, **90**, 115–126 (2014).
- 11) Shimura T., Kakuda S., Ochiai Y., Nakagawa H., Kuwahara Y., Takai Y., Kobayashi J., Komatsu K., Fukumoto M., *Oncogene*, **29**, 4826–4837 (2010).
- 12) Coco Martin J. M., Balkenende A., Verschoor T., Lallemand F., Michalides R., *Cancer Res.*, **59**, 1134–1140 (1999).
- 13) 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).
- 14) Vaughan L., Glanzel W., Korch C., Capes-Davis A., *Cancer Res.*, **77**, 2784–2788 (2017).
- 15) Masters J. R., *Nat Rev Cancer.*, **2**, 315–319 (2002).
- 16) Kuwahara Y., Li L., Baba T., Nakagawa H., Shimura T., Yamamoto Y., Ohkubo Y., Fukumoto M., *Cancer Sci.*, **100**, 747–752 (2009).
- 17) Kuwahara Y., Mori M., Kitahara S., Fukumoto M., Ezaki T., Mori S., Echigo S., Ohkubo Y., Fukumoto M., *Cancer Med.*, **3**, 310–321 (2014).
- 18) Rothkamm K., Lobrich M., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **100**, 5057–5062 (2003).
- 19) Kuwahara Y., Roudkenar M. H., Urushihara Y., Saito Y., Tomita K., Roushandeh A. M., Sato T., Kurimasa A., Fukumoto M., *Int J Med Phys Clin Eng Radiat Oncol.*, **6**, 377–391 (2017).
- 20) Hidaka M., Oda S., Kuwahara Y., Fukumoto M., Mitani H., *J Radiat Res.*, **51**, 165–171 (2010).
- 21) Roninson I. B., Broude E. V., Chang B. D., *Drug Resist Updat.*, **4**, 303–313 (2001).
- 22) Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nuñez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G.; Nomenclature Committee on Cell Death 2009., *Cell Death Differ.*, **16**, 3–11 (2009).
- 23) Yamada T., Ohyama H., *Gan To Kagaku Ryoho.*, **21**, 602–607 (1994).
- 24) Hasegawa M., Wilson G., Russell L. D., Meistrich M. L., *Radiat Res.*, **147**, 457–467 (1997).
- 25) Kuwahara Y., Shimada A., Mitani H., Shima A., *Radiat Res.*, **157**, 386–392 (2002).
- 26) Potten C. S., Booth C., *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, **118**, 473–478 (1997).
- 27) Potten C. S., Grant H. K., *Br J Cancer.*, **78**, 993–1003 (1998).
- 28) Balcer-Kubiczek E. K., *Exp Oncol.*, **34**, 277–285 (2012).
- 29) Eriksson D., Stigbrand T., *Tumour Biol.*, **31**, 363–372 (2010).
- 30) Amaravadi R. K., Thompson C. B., *Clin Cancer Res.*, **13**, 7271–7279 (2007).
- 31) 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).
- 32) 桑原義和, 漆原佑介, 齋藤陽平, 山本由美, 富田和男, 佐藤友昭, 山本文彦, 栗政明弘, 福本 学, *東北医薬大研究誌*, **63**, 63–70 (2016).
- 33) Hurwitz C., Tolmach L. J., *Cell fusion. Biophys J.*, **9**, 1131–1143 (1969).
- 34) Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T., *EMBO J.*, **19**, 5720–5728 (2000).
- 35) Xin Y., Jiang F., Yang C., Yan Q., Guo W., Huang Q., Zhang L., Jiang G., *J Cancer Res Clin Oncol.*, **143**, 2147–2157 (2017).
- 36) Ondrej M., Cechakova L., Durisova K., Pejchal J., Tichy A., *Radiother Oncol.*, **119**, 265–275 (2016).
- 37) Yang Y., Yang Y., Yang X., Zhu H., Guo Q., Chen X., Zhang H., Cheng H., Sun X., *Tumour Biol.*, **36**, 4079–4087 (2015).
- 38) Kuwahara Y., Mori M., Oikawa T., Shimura T., Ohtake Y., Mori S., Ohkubo Y., Fukumoto M., *J Radiat Res.*, **51**, 297–302 (2010).
- 39) Pazdur R., Kudelka A. P., Kavanagh J. J., Cohen P. R., Raber M. N., *Cancer Treat Rev.*, **19**, 351–386 (1993).
- 40) Fojo T., Menefee M., *Ann Oncol.*, **18**, 3–8 (2007).
- 41) Galletti E., Magnani M., Renzulli M. L., Botta M., *Chem Med Chem.*, **2**, 920–942 (2007).
- 42) Mizumachi T., Suzuki S., Naito A., Carcel-Trullols J., Evans T. T., Spring P. M., Oridate N., Furuta Y., Fukuda S., Higuchi M., *Oncogene.*, **27**, 831–838 (2008).
- 43) 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).

- 44) Tomita K., Kuwahara Y., Takashi Y., Tsukahara T., Kurimasa A., Fukumoto M., Nishitani Y., Sato T., *Biochem Biophys Res Commun.*, **490**, 330–335 (2017).
- 45) King M. P., Attardi G., *Science.*, **246**, 500–503 (1989).
- 46) Saito Y., Abiko R., Kishida A., Kuwahara Y., Yamamoto Y., Yamamoto F., Fukumoto M., Ohkubo Y., *Cell Biochem Funct.*, **33**, 73–79 (2015).
- 47) 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., *Cancer Sci.*, **105**, 1351–1359 (2014).
- 48) Takahashi A., Ma H., Nakagawa A., Yoshida Y., Kanai T., Ohno T., Kuwahara Y., Fukumoto M., Nakano T., *Int J Med Phys Clin Eng Radiat Oncol.*, **3**, 133–142 (2014).