

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書-

受給者氏名： 崔 星



所属機関名：独立行政法人放射線医学総合研究所

所属部署名：重粒子医科学センター 職名：主任研究員

・次世代重粒子治療研究プログラム

所 在 地：千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

電 話：043-206-3231

内線：

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

癌幹細胞を標的とした肝癌の重粒子線治療の基礎的研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 崔 星

職名：主任研究員

所属機関名：独立行政法人放射線医学総合研究所

部署名：重粒子医科学センター・次世代重粒子治療研究プログラム

中国側研究者氏名： 邵 春林

職名：教授

所属機関名：復旦大学

部署名：放射線医学研究所

4. 当該研究における発表論文等

なし

5. 成果の概要

肝癌は世界で最も罹患数が多い悪性腫瘍の一つで、毎年 60 万人以上が肝癌で死亡しているが、中国がその半数以上を占め、日本でも年間死亡数は 3.4 万人と癌死亡では 3 位である。放医研では今まで 300 例近い重粒子線による肝癌治療を行っており、良好な治療成績が得られている。本研究は、肝癌細胞株 Huh7、HepG2 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線或いは X 線照射前後のコロニー形成能、spheroid 形成能、DNA 損傷の違いを調べ、また SCID マウスに移植し、腫瘍形成能の違いについて比較検討した。Huh7、HepG2 細胞において CD133+/CD90+ はそれぞれ 6.4% と 0.6%、CD44+/ESA+ 細胞は 1.5% と 0.2% であった。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は CD133-/CD90-、CD44-/ESA- 細胞に比べ有意にコロニー形成数が多く、spheroid 形成や腫瘍形成は CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞のみに認められた。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は、X 線、炭素線照射に対しても抵抗性を示すが、炭素線はより強い細胞殺傷能力が認められた。また、DNA 損傷解析では、X 線、炭素線照射後 1 時間では大きな違いを認めなかったが、X 線照射に比べて 24 時間後には炭素線照射後に明らかに多くの γ H2AX foci の残存が認められた。以上より、肝癌細胞において、CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線は X 線照射に比べより強く肝癌幹細胞を殺傷し、その機序として炭素線が修復しにくい DNA 損傷を与えることを見出した。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

中国人共同研究者は、主に HepG2 細胞の癌幹細胞を分離していない状態の X 線照射後の colony assay から生存率の解析を行い、また分離した癌幹細胞に対する炭素線や X 線照射後の DNA 損傷、修復の解析を補助してくれた。

1. Sai S, Oonishi K, Kamijo T, Yamada S, Shao CL, Kamada T.
Effects of Carbon Ion Beams on Liver Cancer Stem-Like Cells and Its Comparison with X-ray
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10 th Annual Meeting, June 13-16
in Yokohama, Japan (予定)

癌幹細胞を標的とした肝癌の重粒子線治療の基礎的研究

研究者氏名	崔 星
日本所属機関	独立行政法人放射線医学総合研究所
共同研究者名	邵 春林
中国所属機関	復旦大学 放射線医学研究所

要旨

肝癌は世界で最も罹患数が多い悪性腫瘍の一つで、毎年 60 万人以上が肝癌で死亡しているが、中国がその半数以上を占め、日本でも年間死亡数は 3.4 万人と癌死亡では 3 位である。放医研では今まで 300 例近い重粒子線による肝癌治療を行っており、良好な治療成績が得られている。本研究は、肝癌細胞株 Huh7、HepG2 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線或いは X 線照射前後のコロニー形成能、spheroid 形成能、DNA 損傷の違いを調べ、また SCID マウスに移植し、腫瘍形成能の違いについて比較検討した。Huh7、HepG2 細胞において CD133+/CD90+ はそれぞれ 6.4% と 0.6%、CD44+/ESA+ 細胞は 1.5% と 0.2% であった。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は CD133-/CD90-、CD44-/ESA- 細胞に比べ有意にコロニー形成数が多く、spheroid 形成や腫瘍形成は CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞のみに認められた。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は、X 線、炭素線照射に対しても抵抗性を示すが、炭素線はより強い細胞殺傷能力が認められた。また、DNA 損傷解析では、X 線、炭素線照射後 1 時間では大きな違いを認めなかったが、X 線照射に比べて 24 時間後には炭素線照射後に明らかに多くの γ H2AX foci の残存が認められた。以上より、肝癌細胞において、CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線は X 線照射に比べより強く肝癌幹細胞を殺傷し、その機序として炭素線が修復しにくい DNA 損傷を与えることを見出した。

Key Words : 肝癌幹細胞、重粒子、生存率、DNA 修復

緒言

肝癌は、肝臓原発の原発性肝癌と、他臓器悪性腫瘍が肝臓に転移した転移性肝癌に大きく分けられる。原発性肝癌はさらに、肝細胞癌(HCC) (95%を占める)と胆管細胞癌(3%)に大別される。肝細胞癌は世界で最も罹患数が多い悪性腫瘍の一つで、日本や中国はともに増加傾向であり、年間死亡数で中国は 35 万人、日本は 3.4 万人とがん死亡ではそれぞれ 2、3 位である。肝癌の主な原因は、ウイルス性肝炎、それも B 型肝炎と C 型肝炎とされ、日本の肝癌の原因を見ても、ウイルス性肝炎が 90% (75%が C 型肝炎、15%が B 型肝炎) を占めている。肝細胞癌治療の考え方としては、「肝機能」と「進行度」のバランスを考えて治療戦略を決定するが、初回治療で肝切除が 31%、局所壊死療法が 27%、肝動脈塞栓療法が 36%、化学療法が 5%と 90%が局所療法である。放医研では今まで 300 例近い重粒子線による肝癌治療を行っており、良好な治療成績が得られている。例えば、52.8GyE/4 回/1 週の照射法では、3 年局所制御率 96%と 3 年生存率 57%と優れた成績を得ており、さらに現在少分割短期照射 2 回/2 日照射法の第 I/II 相試験が行われている。肝切除療法の累積生存率は、1 年 93%、2 年 83%、3 年 61%(第 15 回全国原発性肝癌追跡調査報告書、2002 年、日本肝癌研究会編)であることから、重粒子線治療は肝切除に匹敵する治療効果を

有すると言える (1)。本研究は、重粒子線の肝癌に対する高い治癒率の分子機構について、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞に焦点を合わせ、これら癌幹細胞に対して、炭素線或いは X 線照射前後のコロニー形成能、spheroid 形成能、DNA 損傷の違いを調べ、また SCID マウスに移植し、腫瘍形成能の違いについて比較検討した。

対象と方法

細胞株はHepG2、Huh7の2種類の肝癌細胞株を使用し、肝癌幹細胞マーカーとされるCD133-PE、CD44-PE、ESA-FITC、CD90-FITCを用いた。まず、HepG2、Huh7細胞からFACS Ariaを用い、癌幹細胞様細胞 (CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞)、非癌幹細胞 (CD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞) を分離収集し、癌幹細胞様性質の有無をcolony 形成能、spheroid 形成能及び免疫不全SCIDマウス移植腫瘍形成能について評価した。そして、HepG2、Huh7それぞれ細胞に対し、X線或いは炭素線照射後の癌幹細胞様細胞 (CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞)の割合の変化をFACS Ariaにて解析した。さらに、HepG2、Huh7細胞から分離した癌幹細胞様細胞 (CD133+/CD90+)のX線或いは炭素線照射後のcolony形成数を求めた。炭素線照射はHIMAC (290 MeV/n, 50 keV/mm, 6-cm SOBP中心)、X線照射は200kV_p (Pantac HF-320S, Shimadzu Co., Tokyo)を使用した。FACS解析にはFACS Aria, BD Bioscience (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)を使用した。

結果

まず、HepG2、Huh7細胞をFACS Ariaを用いてCD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞の割合を測定したところ、CD133+/CD90+はそれぞれ6.4%と0.6%、CD44+/ESA+細胞は1.5%と0.2%であった。HepG2細胞からCD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞とCD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞に分離収集し、各々の細胞集団のcolony formation assayとsphere formation assayを施行した。Fig. 1A, Bに示されているようにCD133+/CD90+細胞集団はCD133-/CD90-細胞集団に比べ、colony形成能、sphere形成能がともに高いことが認められた。また、HepG2、Huh7より分離したCD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞5000個を免疫不全SCIDマウス右下腿皮下に、CD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞5000個を左下腿皮下に移植したところCD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞を移植した足にのみ腫瘍形成を認めた (Fig. 1C)。

次に、癌幹細胞様細胞 CD133+/CD90+細胞集団と非癌幹細胞様 CD133-/CD90-細胞集団に対し、炭素線と X 線照射の殺傷能力の違いについて、X 線或いは炭素線照射後の colony 数を求めた。その結果、X 線或いは炭素線照射後 CD133-/CD90-細胞集団のコロニー形成数が CD133+/CD90+細胞集団のものより有意に少なく、X 線や炭素線に対しても感受性を示した。一方、CD133+/CD90+細胞集団に関しては、Fig. 2 に示されているように炭素線 1 Gy 照射は X 線 2 Gy 照射に比べ、有意にコロニー形成数が少なく、炭素線が CD133+/CD90+細胞をより強く殺傷することが示唆された。さらに、Huh7 細胞から分離した CD133+/CD90+細胞に対し、DNA 損傷マーカーである γ H2AX foci 数を測定したところ、X 線、炭素線照射後 1 時間では大きな違いを認めなかったが、X 線照射に比べて 24 時間後には炭素線照射後の方が明らかに多くの γ H2AX foci の残存が認められた (Fig. 3)。

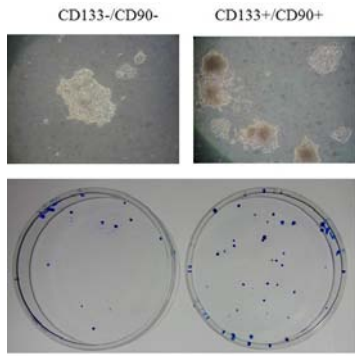


Fig. 1A

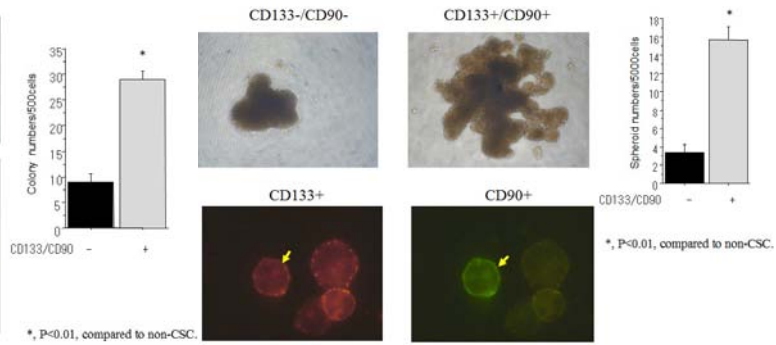


Fig. 1B

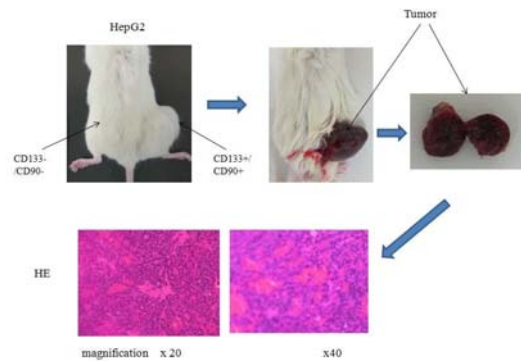


Fig. 1C

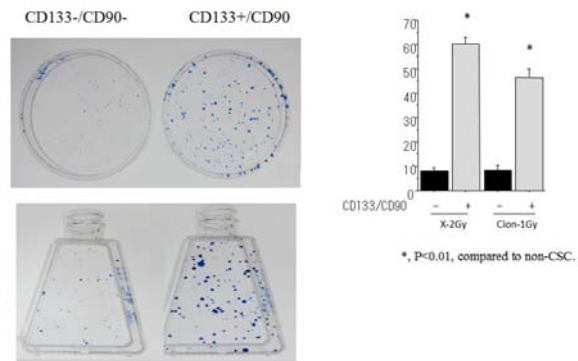


Fig. 2

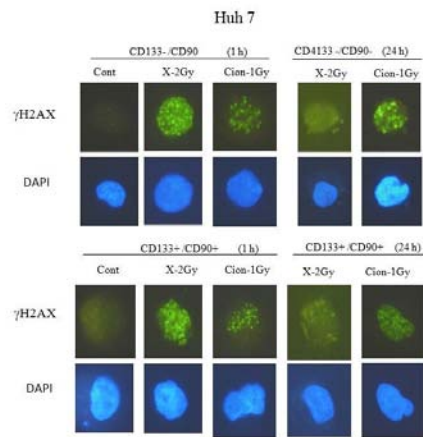
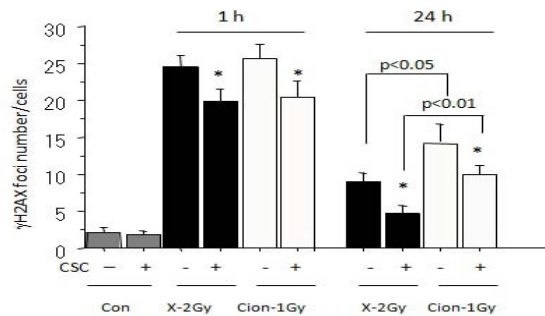


Fig. 3



考察

今回我々が使用した肝癌細胞株 HepG2、Huh7 においては CD133、CD90、CD44、ESA の 4 種類のマーカー全てが認められた。それで、我々は、HepG2、Huh7 細胞から CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ と CD133-/CD90-、CD44-/ESA- 細胞を分離収集し、癌幹細胞様性質の有無を in vitro における colony formation assay と sphere formation assay、in vivo における免疫不全 SCID マウス移植腫瘍形成能を調べたところ、CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞集団の癌幹細胞様性質が確認された。今まで、肝癌幹細胞を同定するマーカーとして、Ma らの CD133、CD44 (2)、Terris らの ESA (3) と Yang らの CD90+ (4) が報告されている。我々は、最近、術後再発性大腸癌に対し、炭素線照射により高い治癒率が得られているメカニズムについて、大腸癌幹細胞の観点から解析してきた (5)。今回、我々は重粒子線の肝癌幹細胞に対する影響について調べたが、HepG2 や Huh7 等肝癌細胞株から分離した CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細

胞集団が癌幹細胞様性質を有していることが確認された。HepG2、Huh7 細胞から分離収集した癌幹細胞様細胞 CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞集団と非癌幹細胞様 CD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞集団に対し、炭素線と X 線照射の殺傷能力をコロニー形成数で求めた結果、X 線或いは炭素線照射後 CD133-/CD90-細胞集団のコロニー形成数は CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞集団に比べ有意に少なく、X 線や炭素線に対しても感受性を示すことが分かった。CD133+/CD90+細胞集団に対し、同じ生物効果線量炭素線 1 Gy 照射後のコロニー形成数が X 線 2 Gy 照射後のものに比べ有意に少ないことが認められた。また、X 線照射に比べ、炭素線照射 24 時間後肝癌幹細胞様細胞に対して明らかにより多くの γ H2AX foci の残存が認められ、炭素線は修復困難な DNA 損傷を与えていること示唆された。

以上より、炭素線は術後の局所再発、転移、化学療法や一般放射線抵抗性と深く関わっているとされる肝癌幹細胞に修復しにくい DNA 損傷を与えることでより効果的に殺傷することが考えられ、これが炭素線の肝癌に対する高い治癒率をもたらす分子的メカニズムの一つであることを示唆した。

参考文献（下線は代表研究者と共同研究者）：

1. Kato H, Tsujii H, et al., Results of the first prospective study of carbon ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Aug 1;59(5):1468-76.
2. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology.* 2007 Jun;132(7):2542-56.
3. Terris B, Cavard C, Perret C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2010 Feb;52(2):280-1. Epub 2009 Nov 10
4. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell.* 2008 Feb;13(2):153-66.
5. Cui X, Oonishi K, Tsujii H, Yasuda T, Matsumoto Y, Furusawa Y, Akashi M, Kamada T, Okayasu R. Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3676-87.

注：本研究は以下の学会で発表。

1. 崔星、大西和彦、山田滋、鎌田正
ヒト肝細胞癌における癌幹細胞の同定及び X 線や重粒子線照射による影響
第 54 回日本放射線影響学会 2011 年 11 月 16～19 日 神戸（口頭発表済み）
2. Sai S, Oonishi K, Kamiyo T, Yamada S, Shao CL, Kamada T. Effects of Carbon Ion Beams on Liver Cancer Stem-Like Cells and Its Comparison with X-ray. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, June 13-16 in Yokohama, Japan（予定）

作成日：2012 年 3 月 14 日