

【研究紹介】

# 犬のがん幹細胞を標的とした放射線治療に向けた基礎研究

出口 辰弥<sup>1)</sup> 細谷 謙次<sup>1)</sup> 金 尚昊<sup>2)</sup> 奥村 正裕<sup>2)</sup>

1) 北海道大学大学院 獣医学研究院附属動物病院 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

2) 北海道大学大学院 獣医学研究院獣医外科学 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

## 要 約

Cancer stem-like cells (CSC) は、がん組織の中で非常に少ない集団であるにも関わらず、放射線治療に抵抗性を示す。しかし、分離が困難であることから獣医領域におけるCSCの放射線感受性についての情報は限定的である。そこで本研究は犬の腫瘍細胞から Sphere formation を用いて分離した球状コロニーの細胞 (SC) について、通常条件の接着培養の細胞 (AC) と比較し、以下の解析を行った。CSCの形質についてCSCsマーカーの発現量、および腫瘍形成能の評価し、放射線反応性についてX線暴露下における生存曲線およびDNA損傷の蓄積を評価した。SCは、ACと比較してCSCの形質である *CD133* を始めとした幹細胞マーカーを高発現しており、高い腫瘍形成能を有していた。また、X線暴露下においてSCはACと比較して高い生存率を示し、X線暴露後のDNAの損傷蓄積が少ない結果となった。これらの結果から、SCがCSCの形質および放射線抵抗性を有するCSCモデルとして適した細胞群であることが示唆され、犬の腫瘍において、CSCsが放射線感受性を決定する重要な因子であることが示された。

北海道大学大学院 獣医学研究院附属動物病院では、2014年に高度放射線治療システム (Elekta SynergyR : キヤノンメディカルシステムズ、栃木) を導入し、犬を中心とした小動物の自然発生がんに対して、回転式強度変調照射法および定位放射線治療などの従来の通常リアックでは実施できない新治療を実践してきた。このような治療機器の発達および照射技術の進歩によって、獣医療における放射線治療は腫瘍の臨床病期や患者因子に応じて治療方法を決定することが可能となり、治療初期は患者に対し良好な反応を示し、臨床症状を改善することができるようになった。しかし、犬の鼻腔腫瘍をはじめほとんどのがんが腫瘍の縮小を認めるものの、腫瘍の消失には至らず、治療後の残存病変から再発を認めている。一方で、放射線治療の際に動物には全身麻酔が必要であり、これは照射回数の制限要因となるため、絶対的な線量を増やした治療を行うことは困難である。そこで、獣医療における放射線治療効果の改善には、放射線治療抵抗性の細胞の同定とそれらの抵抗性の機序を解析し、放射線治療抵抗性細胞に有効な治療を探索することが必要である。

Cancer stem-like cells (CSC) はがん細胞の治療感受性を決定する重要な因子として多くの研究がなされてき

た。CSCはがん組織の中で非常に少ない集団であるにも関わらず、自己複製能と分化能を有し、がんの不均一性を決定する。また、CSCはDNA損傷修復能や酸化ストレスを回避する能力が高いことなどから、様々な外因性の刺激や治療に耐性を示すとされている<sup>[1]</sup>。そのため、治療をしても非CSCは死滅するが、それらの治療から生き残ったCSCが新たながん細胞を生み出すために、完治することなく再発の起因と成っていると考えられている (図1)。したがって、CSCの存在を証明し、その放射線抵抗性を解析し、標的とする治療戦略を確立することは、治療効果の大幅な改善ひいてはがんの根治

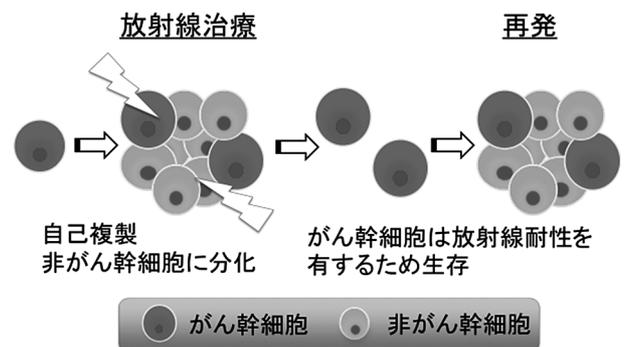


図1. がん幹細胞 (Cancer stem-like cells : CSC) の放射線治療抵抗性

につながると考えられる。そこで本稿では、CSCの放射線抵抗性に関する研究を簡略に解説するとともに、筆者が北海道大学大学院 獣医学研究院獣医外科学教室において博士課程学位論文作成の過程で行った研究について紹介する。

## 1. CSCの放射線耐性機序の研究動向

X線による細胞傷害の大部分は活性酸素種 (ROS) によるDNA損傷によって引き起こされ、DNAに障害を受けた細胞の中でDNA損傷を修復することができず、増殖能を失った細胞が細胞死に至るとされている。CSCの概要については前述のとおりであるが、ヒトにおいてCSCは放射線による細胞死の過程を様々な機構によって回避していることが報告されている。CSCはグルタチオン合成能力が高く、ROSを除去することで、放射線による細胞傷害を回避しているとされている<sup>[2]</sup>。また、CSCは放射線によって生じるDNA二本鎖断裂の非同相末端結合を介した修復能が高いことが示されている<sup>[3]</sup>。さらに、細胞増殖能においても、CSCは放射線照射後にMammalian target of rapamycin (mTOR) 経路を活性化することで、照射後の細胞増殖を促進させる<sup>[4]</sup>。これらのCSCの持つ性質は、放射線照射による細胞への障害を軽減し、細胞死を回避する機構として重要であり、CSCの放射線耐性機構を解明することは、放射線治療における新たなブレイクスルーを生み出す可能性を有した研究領域であると考えられている。

## 2. 犬CSCの放射線感受性における研究について

犬のCSCの形質の解析においても様々な研究が行われている。犬乳腺腫瘍の細胞株中に、CSCマーカーである*CD133*、*CD34*、および薬剤の治療抵抗性に関与するMDR遺伝子を発現するドキシソルピシンに耐性を示すCSCが存在することが証明された<sup>[5]</sup>。また、自然発生の犬メラノーマおよび骨肉腫の生検組織において、CSCマーカーである*CD133*、*CD24*、および*Oct-4*を発現する細胞が存在することが認められた<sup>[6]</sup>。さらに、犬肥満細胞腫においては*Oct-4*の発現と予後に関連がみられている<sup>[7]</sup>。このようにCSCの特異的とされる表面タンパクおよび転写因子を解析することで、様々な犬の固形がんにおいてCSCの存在は証明され、治療抵抗性、予後との関連が示唆されてきている。

ヒトやマウスのがんからCSCを分離する方法については、細胞表面抗原を用いたCell sorting<sup>[8]</sup>、Hoechst

色素を用いたSide population<sup>[9]</sup>、およびアセトアルデヒド脱水素酵素の活性を用いた手法<sup>[10]</sup>などがあるが、分離後の細胞活性を維持することが困難といった問題点がある。本研究で用いたSphere formationは上記の分離方法に比べて細胞活性を維持した上でCSCを分離する手法として近年、注目を集めている。Sphere formationは無血清の培地、低接着性の培養プレートを用い、成長因子のみを添加した培養条件下において生存し、かつ球状コロニーを形成した細胞 (Spheroid cells : SC) をCSCとして分離培養できる。Sphere formationは犬の乳腺癌<sup>[5]</sup>、肺腺癌、骨肉腫<sup>[11]</sup>らの固形がんにおいて応用されてきたが、分離したSCのCSCの形質、特に放射線反応性における研究は限定的である。そこで著者らは犬の異なる種類の腫瘍細胞株からSphere formationを用いて分離したSCのCSC形質の有無ならびに放射線感受性を評価することで、SCが犬の放射線耐性を有するCSCのモデルとして有用であることを証明することを目的とし、以下の検討を行った。

### 2.1. 材料と方法

犬の骨肉腫 (HMPOS)、メラノーマ (CMeC)、移行上皮癌 (MegTCC) および肺腺癌 (CLAC) の4種細胞株を用いた。まず、血清を含まず成長因子のみを添加した非足場細胞培養であるSphere formationを用いて分離したSCについて、通常条件の血清含有の接着培養の細胞 (Adherent cell : AC) と比較し、以下の検討を行った。CSCの形質の解析のために、RT-PCRを用いたCSCマーカー (*CD133*、*Oct-4*、*Sox-2*、*c-myc*、*CD34*、*CD44*) の発現量、ヌードマウスへの腫瘍移植試験を用いて腫瘍形成能の評価を実施した。続いて、放射線反応性の解析のため、コロニー形成法を用いたX線暴露下 (X線 : 2.5、5、7.5、10 Gy) における生存曲線、p53-binding protein (53BP1) の集積によるX線1 Gy暴露後のDNA損傷蓄積を評価した。統計解析はsphapiro-wilk検定を実施し、正規分布を示した2群間の検定にはstudent-t検定を、正規分布を示さないもしくはサンプルサイズが少ない2群間の検定にはMann-Whitney U検定をそれぞれ用いた。

### 2.2. 結果

Sphere formationによる14日間の培養によって、すべての細胞株は球状コロニーを形成した。一方で、成長因子を添加しないSphere formationにおいて、全ての細胞株において、球状コロニーはほとんど形成されなかった (図2)。

SCの幹細胞性を評価するために、CSCマーカーの発

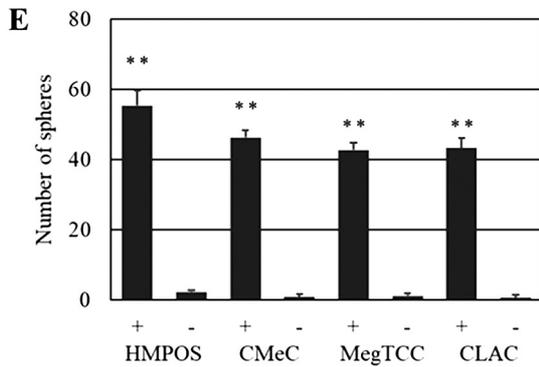
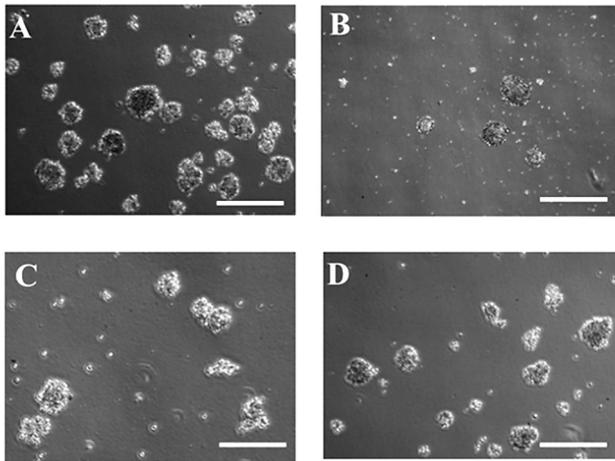


図2. Sphere Formationによって形成されたSphere (A: HMPOS、B: CMeC、C: MegTCC、D: CLAC)  
 下図Eは成長因子を添加(+)、非添加(-)における各細胞株のSphereの数  
 Student's *t*-test. \**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01  
 Bar = 300 μm

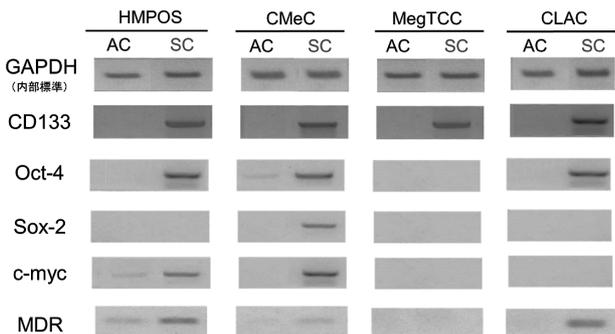


図3. 各細胞群のSCおよびACにおけるCSCマーカー遺伝子の発現

現と腫瘍形成能を評価した。RT-PCRによって、腫瘍の種類により細かな発現パターンは異なるものの、CSCマーカーはSCによく発現する傾向を認め、特にCD133はすべての細胞株においてSCのみに発現が認められた(図3)。また、腫瘍形成能においては4種細胞株のSCとACを100または1,000個をヌードマウスの皮下に移植

表1. 各細胞群のSCおよびACにおける腫瘍形成能の比較

細胞	細胞数	腫瘍形成	腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )
HMPOS	SC 1 × 10 <sup>2</sup>	4 / 4	1865.4 ± 155.8
	AC 1 × 10 <sup>2</sup>	0 / 4	-
CMeC	SC 1 × 10 <sup>3</sup>	4 / 4	958.9 ± 620.7
	AC 1 × 10 <sup>3</sup>	3 / 4	93.6 ± 92.1
MegTCC	SC 1 × 10 <sup>3</sup>	2 / 4	1158.5 ± 1151.4
	AC 1 × 10 <sup>3</sup>	0 / 4	-
CLAC	SC 1 × 10 <sup>2</sup>	4 / 4	557.2 ± 241.5
	AC 1 × 10 <sup>2</sup>	2 / 4	17.4 ± 28.5

移植細胞数、各細胞群4匹中の腫瘍形成能の有無、腫瘍体積(平均±標準偏差)を示す

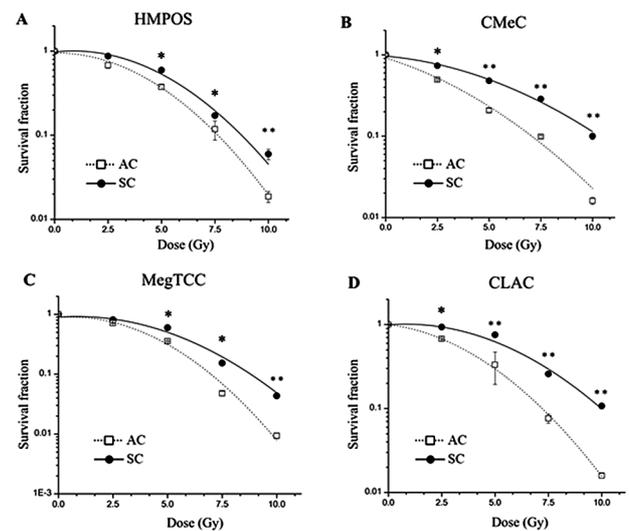


図4. 各細胞群のSC (●) およびAC (□) におけるX線照射後の生存曲線 (A: HMPOS、B: CMeC、C: MegTCC、D: CLAC)  
 Mann-Whitney *U* test. \**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01

した後に、腫瘍形成の有無を観察し、その体積を計測した。SCを移植した群では4種の細胞株全てにおいて腫瘍形成が確認された。一方で、ACはCMeCとCLACにおいてのみ腫瘍形成が認められたが、いずれもSCの形成した腫瘍と比較して有意に小さく、SCは少数の細胞で腫瘍を形成する能力を有することが示された(表1)。

SCの放射線反応性を評価するために、X線照射後の生存率とDNA損傷蓄積を評価した。コロニー形成法を用いて計測したX線照射後のコロニー数を直線二次曲線モデルにあてはめて生存曲線を作成した後に、X線の各線量における生存率を算出したところ、全ての細胞株においてSCはACと比較して有意に高い生存率を示した(図4)。X線照射後のDNA損傷蓄積は、53BP1を用いて評価した。53BP1はDNA損傷に反応してDNA二本

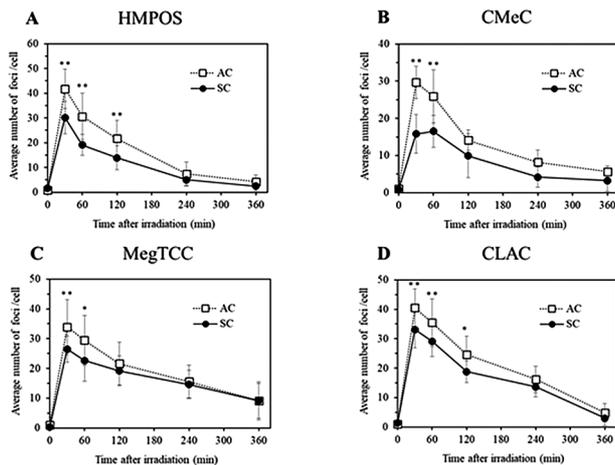


図5. 各細胞群のSC(●)およびAC(□)におけるX線照射後の53BP1のフォーカス数(A: HMPOS, B: CMeC, C: MegTCC, D: CLAC) Mann-Whitney *U* test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

鎖断裂部位のクロマチンに結合するため、53BP1のフォーカスを数えることで放射線照射後の各細胞あたりのDNA二本鎖断裂数を評価することができる。何れの細胞も照射後の30分もしくは60分において、DNA二本鎖断裂数は最も多くなり、その後時間経過とともに減少した。すべての細胞株において、SCはACと比較して放射線照射後のDNA二本鎖断裂数の最大数が有意に少なかった(図5)。

### 2. 3. 考察

Sphere formationはCSCを分離する手法の一つとして広く用いられてきたが、その原理は未だ完全には解明されていない。今回用いた全ての腫瘍細胞株は非足場培養のSphere formationによって球状コロニーを形成することができたが、成長因子が添加されていない培地においては球状コロニー形成が認められなかった。これらの結果からSphere formationの原理は非足場培地の培養条件が細胞の接着により活性化するシグナル経路を抑制することで通常のがん細胞の増殖を抑制し、成長因子がCSCの選択的な増殖を促進していることが示唆された[12,13]。

*CD133*はヒトの骨肉腫、肺腺癌、神経膠腫において予後との関連性が示唆されており、腫瘍細胞の非対称的な分裂、DNA損傷修復において重要な因子であり、CSCの幹細胞性を維持する重要な機能を有するとされている[14,15]。また、CSCの特徴の一つとして、腫瘍形成能が高いことが示されている。通常、腫瘍細胞における腫瘍形成に必要な移植細胞数は $10^6$ 個以上とされている。しかし、CSCは100個以下の少ない細胞で腫瘍を形成することができる[16]。今回、全ての細

胞株から分離したSCにおいては*CD133*の発現が認められ、少数の細胞で腫瘍を形成した。これらの結果から、Sphere formationを用いて分離したSCはCSCの特性を有したCSCモデルとして有用であることが示された。

CSCの放射線感受性については、MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assayを用いて、犬骨肉腫のSCが放射線耐性であることが示されている[11]。今回、コロニー形成法を用いて、異なる種類の4種細胞株から分離したSCにおいても、同様に放射線耐性は認められた。さらに、コロニー形成法はミトコンドリアの活性を基に細胞の生存を定量するMTT assayと比較して、放射線治療後の細胞の増殖活性を評価することができる優れた手法とされている。今回の結果からCSCが犬の腫瘍の放射線感受性を決定する因子として重要なことが示唆された。

53BP-1によるDNA二本鎖修復のキネティクス解析はX線照射後のDNA修復の指標として広く使用されており、53BP-1のフォーカスの最大数は細胞のROS除去能を、フォーカス数の時間依存的な減少の速度は細胞のDNA損傷修復能を反映している[17]。また、X線の細胞傷害の約70%はROSを介したものとされており、腫瘍細胞の放射線感受性とROSは密接に関連していると考えられる。今回、全てのSCはX線照射後のフォーカス数の最大値がACと比較して少ない結果となった。これらからCSCの放射線耐性機序においてROSの除去能が重要な因子であることが示唆された。

### 3. まとめと今後の展望

本研究により、Sphere formationを用いて分離したSCがCSCの形質および放射線抵抗性を有するCSCモデルとして適した細胞群であることが示唆された。これは犬の腫瘍においてCSCが放射線感受性を決定する重要な因子であることを示唆するものであり、犬CSCの放射線耐性機序の解明をすることで、CSCを標的とした放射線治療開発の足掛かりになるものと考えられる。現在、筆者はCSC放射線耐性機序の解明のために、犬骨肉腫のSCを用いたミトコンドリアの代謝に着目した研究を行っている。データ未発表ではあるが、SCはX線照射時において、ミトコンドリアの呼吸活性を亢進する能力が高いことが示され、その呼吸活性を阻害する薬剤を添加するとSCの放射線抵抗性が消失することを確認した。今後、CSCを確実に障害する新規放射線治療を開発し、臨床応用することで小動物だけでなくヒトの治療成績の向上を目指した研究を進めていきたいと考える。

今回紹介させていただいた研究内容は、筆者が博士課程において北海道大学獣医学研究院獣医外科学教室に所属していた際に行ったものです。多大なご指導を賜りました北海道大学大学院 獣医学研究院放射線学教室の稲波 修教授、安井博宜准教授に深謝を申し上げます。また、ここまで読んでくださった皆様にも感謝を申し上げます。

#### 4. 引用文献

- [1] Chang CH, Zhang M, Rajapakshe K, Coarfa C, Edwards D, Huang SX, Rosen JM: Mammary stem cells and tumor-initiating cells are more resistant to apoptosis and exhibit increased DNA repair activity in response to DNA damage, *Stem Cell Reports*, 5, 378-391 (2015)
- [2] Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Sue-matsu M, Baba H, Saya H: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth, *Cancer Cell*, 19, 387-400 (2011)
- [3] Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, Ronchini C, Ronzoni S, Muradore I, Monestiroli S, Gobbi A, Alcalay M, Minucci S, Pelicci PG: Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells, *Nature*, 457, 51-52 (2009)
- [4] Wang Z, Lai ST, Ma NY, Deng Y, Liu Y, Wei DP, Zhao JD, Jiang GL: Radiosensitization of metformin in pancreatic cancer cells via abrogating the G2 checkpoint and inhibiting DNA damage repair, *Cancer Lett*, 369, 192-201 (2015)
- [5] Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H, Katsunoto T, Ichikawa H, Ohkusu-Tsukada K, Nakagawa T, Sasaki N, Takahashi K: Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines, *Res Vet Sci*, 91, 254-260 (2011)
- [6] Guth AM, Deogracias M, Dow SW: Comparison of cancer stem cell antigen expression by tumor cell lines and by tumor biopsies from dogs with melanoma and osteosarcoma, *Vet Immunol Immunopathol*, 161, 132-140 (2014)
- [7] Vargas T, Pulz L, Barra C, Kleeb S, Xavier J, Catao-Dias J, Fukumasu H, Nishiya A, Strefezzi R: Immunohistochemical expression of the pluripotency factor OCT4 in canine mast cell tumours, *J Comp Pathol*, 153, 251-255 (2015).
- [8] Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ: Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res*, 65, 10946-10951 (2005)
- [9] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M: Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system, *Stem Cells*, 24, 506-513 (2006)
- [10] Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PK: Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform, *Cell Cycle*, 10, 1378-1384 (2010)
- [11] Tanabe A, Deguchi T, Sato T, Nemoto Y, Maruo T, Madarame H, Shida T, Naya Y, Ogihara K, Sahara H: Radioresistance of cancer stem-like cell derived from canine tumours, *Vet Comp Oncol*, 14, 93-101 (2016)
- [12] Ruoslahti E, Reed JC: Anchorage dependence, integrins and apoptosis, *Cell*, 77, 477-478 (1994)
- [13] Soeda A, Inagaki A, Oka N, Ikegame Y, Aoki H, Yoshimura SI, Nakashima S, Kunisada T, Iwama T: Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells, *J Biol Chem*, 283, 10958-10966 (2008)
- [14] Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, Fazioli F, Pirozzi G, Papaccio G: Human primary bone sarcomas contain CD133(+) cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo, *Faseb J*, 25, 2022-2030 (2011)
- [15] Mizugaki H, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi J, Moriya J, Hatanaka K.C, Kikuchi E, Kinoshita I, Oizumi S, Dosaka-Akita H, Matsuno Y, Nishimura M: CD133 expression: a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers, *Int J Clin Oncol*, 19, 254-259 (2014)
- [16] Nemoto Y, Maruo T, Sato T, Deguchi T, Ito T, Sugiyama H, Ishikawa T, Madarame H, Watanabe T, Shida T, Sahara H: Identification of cancer stem cells derived from a canine lung adenocarcinoma

- 
- cell line, *Vet Pathol*, 48, 1029-1034 (2011)
- [17] Martin OA, Ivashkevich A, Choo S, Woodbine L, Jeggo PA, Martin RF, Lobachevsky P: Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity, *DNA Repair*, 12, 844-855 (2013)