



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	がん細胞集団におけるDNA量不均一性が放射線治療後の放射線抵抗性細胞出現におよぼす影響に関する研究
Author(s)	山下, 晃矢
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16470号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16470
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95487
Type	doctoral thesis
File Information	Koya_Yamashita.pdf



がん細胞集団における DNA 量不均一性が
放射線治療後の放射線抵抗性細胞出現に
およぼす影響に関する研究

(Study on the Role of DNA Ploidy Heterogeneity
in Cancer Cell Populations in the Emergence
of Radioresistant Cells after Radiotherapy)

山下 晃矢

Koya Yamashita

<目次>

目次	1
略語表	3
学位関連論文に関する記述	4
1. 緒言	5
2. 材料と方法	
2-1. 試薬	8
2-2. 細胞培養	8
2-3. 細胞周期解析および細胞の DNA 量の測定	9
2-4. X 線照射と放射線抵抗性細胞株の樹立	11
2-5. コロニー形成法	12
2-6. 増殖アッセイ	12
2-7. 染色体解析	12
2-8. アポトーシス解析	12
2-9. 細胞老化の解析	13
2-10. DNA 二本鎖切断修復の解析	13
2-11. グルタチオンの定量	14

2-12. 細胞内 ATP の定量	15
2-13. 2-Deoxy-D-glucose 取り込み量の測定	15
2-14. 細胞外フラックスアナライザーによるエネルギー代謝活性の評価	15
2-15. 統計解析	16
3. 結果	
3-1. 培養環境ががん細胞集団の DNA 量不均一性に及ぼす影響	17
3-2. X 線分割照射による放射線抵抗性がん細胞株の樹立	17
3-3. SW480RR 細胞の DNA 量および染色体数の解析	19
3-4. 細胞周期分布と放射線誘発細胞死の評価	22
3-5. DNA 二本鎖切断修復の評価	22
3-6. エネルギー代謝活性の評価	25
3-7. SW480.hu 細胞における放射線抵抗性細胞出現機構の解析	29
3-8. DNA 量の不均一性が認められない大腸がん細胞株への分割照射実験	31
4. 考察	34
5. 結論	38
謝辞	40
引用文献リスト	41
英文抄録	46

<略語表>

- 2-DG : 2-deoxy-D-glucose
- 53BP1 : p53 binding protein 1
- a.u. : arbitrary unit
- ATP : adenosine triphosphate
- BSA : bovine serum albumin
- D₁₀ : 10% survival dose
- DAPI : 4'6-diamidino-2-phenylindole · 2HCl
- DDW : deionized distilled water
- DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
- DNA : deoxyribonucleic acid
- ECAR : extracellular acidification rate
- FBS : fetal bovine serum
- GSH : glutathione (reduced glutathione)
- GSSG : glutathione disulfide (oxidized glutathione)
- SA-β-gal : senescence associated beta-galactosidase
- LQ model : linear-quadratic model
- LSC : liquid scintillation counter
- OCR : oxygen consumption rate
- PBS : phosphate buffer saline
- PI : propidium iodide
- RNA : ribonucleic acid
- Triton X-100 : Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether
- Tween 20 : Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate

<学位関連論文に関する記述>

本学位論文におけるすべての結果は、Yamashita K, Yasui H, Bo T, Fujimoto M, Inanami O. Mechanism of the Radioresistant Colorectal Cancer Cell Line SW480RR Established after Fractionated X Irradiation. Radiat Res 202, 38–50, 2024. において公表済みである。

1. 緒言

腫瘍内不均一性 (intratumor heterogeneity) は治療抵抗性と関連しており、放射線治療においてもその寄与が知られている^{21),31),38)}。腫瘍内不均一性には、腫瘍微小環境の不均一性と腫瘍を構成するがん細胞の不均一性が含まれる。腫瘍微小環境の不均一性は酸素、栄養素、情報伝達物質等の濃度が腫瘍内の部位によって異なることを指し、腫瘍組織における血管の分布や間質細胞のはたらきがその形成に寄与している^{21),24),38)}。がん細胞の不均一性は、1つの腫瘍を構成しているがん細胞の性質が一様でないことを指し、変異のような遺伝子のレベル、エピジェネティックな発現調節のレベル、ならびにトランスクリプトームのレベルにおいて、時間の経過とともに不均一性が増大することが明らかになっている^{7),14),36)}。がん細胞の不均一性が治療抵抗性に寄与する場合、既存の治療抵抗性クローンが生存してしまうような内在性の抵抗性 (intrinsic resistance) と、治療による修飾を介して抵抗性の高い細胞が新たに出現するような獲得した抵抗性 (acquired resistance) のいずれも、治療抵抗性に重要な役割を果たす可能性がある³⁸⁾。

放射線治療に高い抵抗性を示すがん細胞が腫瘍内に存在すると、そのような細胞が治療で駆逐されず生き残ることにより、治療後の再発の要因となると考えられる。ヒトの大腸がんでは、ネオアジュバント放射線療法は外科的切除単独に比べ局所再発率を半減させるが、放射線療法を行っても 5-10%の局所再発率が残ると報告されている^{12),17)}。Weichselbaum らは、放射線治療後の再発腫瘍から得られたヒト頭頸部がん細胞は、放射線治療を受ける前の患者から得られたがん細胞に比べて放射線抵抗性が高いことを報告している⁴⁹⁾。この結果は、内在性の放射線抵抗性細胞が治療の過程で選択されたか、がん細胞が治療を経て放射線抵抗性を新たに獲得したことにより、最終的に放射線抵抗性の高いがん細胞が再発腫瘍を構成するようになったことを示唆している。放射線抵抗性細胞の出現は、放射線治療後の患者のがん組織に由来するものだけでなく、大腸がん²³⁾、食道腺がん^{13),28),29)}、非小細胞肺がん^{19),26),48)}を含む多くの種類の確立されたがん細胞株への照射実験でも報告されている。

DNA ploidy heterogeneity は腫瘍内不均一性のうち、がん細胞の不均一性の一種であり、単一の腫瘍内に異なる染色体数または異なる DNA 量を持つ 2 種類以上のがん細胞が存在することを指す。DNA 量や染色体数が異なる複数の細胞集団の存在は、単一の腫瘍の複数の部位からサンプリングすることによって実際に観察されている^{11),15),16)}。放射線分割照射後に放射線抵抗性のがん細胞が出現することは上記のように報告されているが、DNA 量不均一性を有する腫瘍を構成する細胞集団が放射線分割照射後にどのように変化するのか、また

DNA 量不均一性が放射線分割照射による放射線抵抗性がん細胞出現に寄与しているのかについては、限られた情報しか得られていない。

がん細胞に放射線分割照射を行うと、照射前と比較して細胞集団の染色体数分布が変化することがある。しかし、染色体数や倍数性の変化の方向は必ずしも一貫していない^{20),22),25),34),35)}。このような染色体数分布の変化は、放射線感受性の違いによって特定の倍数性を持つクローンが選択されることによって起こる場合と³⁴⁾、電離放射線の染色体変異原性によって放射線感受性とは無関係に起こる場合がある^{20),22)}。

細胞の染色体数や DNA 量は放射線感受性に影響を与える潜在的な因子としてこれまで広く議論されてきたが、これらと放射線感受性の間に明確な関係は見出されていない。マウスの線維芽細胞である L 細胞では、DNA 量が少なくかつ内在性に放射線抵抗性が高い細胞の存在が示唆された³⁴⁾。その一方、チャイニーズハムスター細胞²⁾やマウスリンパ球性白血病細胞⁴⁾では 4 倍体細胞の方が 2 倍体細胞よりも放射線抵抗性が高いと報告されている。また、27 種のイヌ由来がん細胞株³⁰⁾や 7 種のヒト扁平上皮癌細胞株⁴⁰⁾について比較した研究では、DNA 量と放射線感受性との間に有意な関係は認められていない。しかし、ヒトのがん細胞株 8 株 (肺腺癌細胞株 1 株と頭頸部扁平上皮癌細胞株 7 株) についての比較では、染色体数の多い細胞ほど放射線抵抗性が高い傾向にあることが示された⁴¹⁾。このように、染色体数や DNA 量と放射線感受性との関連について、コンセンサスは得られていない。その理由の一つは、他の放射線抵抗性因子が同時に影響していることであると考えられる。放射線分割照射によって樹立された放射線抵抗性がん細胞の解析によって、遺伝子発現¹³⁾、細胞周期制御⁴⁸⁾、細胞死制御²⁶⁾、DNA 修復²⁹⁾、エネルギー代謝²⁸⁾などの変化が放射線抵抗性因子として報告されている。

ところで、倍数性と細胞の放射線感受性との関係を分析した研究は、異なるがん種^{30),41)}または異なる患者^{40),41)}に由来するがん細胞株の包括的な比較に基づいている。これらは患者間での腫瘍の差異を指す腫瘍間不均一性 (intertumor heterogeneity) に相当する。一方で、単発性に生じたがん細胞が増殖して形成された腫瘍内では、腫瘍を構成するがん細胞は時間の経過とともに徐々に腫瘍内での不均一性 (intratumor heterogeneity) を増していくものの、がん関連遺伝子の変異やがん幹細胞のようなある程度の背景を共有しているはずである。それゆえ、本研究では単一の腫瘍に由来する DNA 量不均一性を有する細胞集団に注目した。DNA 量不均一性のあるがん細胞集団に治療を模倣した X 線分割照射を行い、放射線抵抗性の細胞株を樹立した。単一腫瘍に由来するがん細胞集団において、DNA 量や染色体数の異なる細胞集団の割合が放射線分割照射によってどのように変化するのか、また DNA 量不均

一性が放射線分割照射による放射線抵抗性がん細胞出現にどのように寄与しているのかについて調べるために、親株と放射線抵抗性クローンの性質を比較した。

2. 材料と方法

2-1. 試薬

Normal Goat Serum (143-06561)、Phenol Red (165-01121)、ギムザ染色液 (079-04391)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (193-02845)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (192-02815)、NaCl (191-01665)、 NaHCO_3 (191-01305)、 KH_2PO_4 (169-04245)、KCl (163-03545)、Sodium pyruvate (199-03062)、L-Alanine (016-01044)、L-Asparagine monohydrate (019-04812)、1N NaOH 溶液 (192-02175)、1N 塩酸 (083-01095)、Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether (Triton X-100, 169-21105)、Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20, 167-11515)、Paraformaldehyde (168-20955)、Ethanol (99.5) (057-00456)、Methanol (131-01821) ならびに 0.25w/v% Trypsin-1 mmol/L EDTA $\cdot$ 4Na Solution with Phenol Red (201-16945) は FUJIFILM Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) から、 K_2HPO_4 (32378-00)、D (+)-Glucose (10017-00) ならびに L(+)-Glutamine (17025-30) は Kanto Chemical (Tokyo, Japan) から、Ribonuclease (DNase free) Glycerol Solution (10 mg/mL RNase 溶液) は NIPPON GENE (Tokyo, Japan) から、bovine serum albumin (BSA, A7906) および Propidium iodide (PI, P4170) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

リン酸緩衝液 (PBS) の組成は、137 mM NaCl/8.10 mM Na_2HPO_4 /2.68 mM KCl/1.47 mM KH_2PO_4 /DDW である。

2-2. 細胞培養

使用した細胞は American Type Culture Collection (ATCC: Manassas, VA) に由来するヒト結腸腺癌 SW480 細胞 ([SW-480] ATCC CCL-228) およびヒト結腸腺癌 HT29 細胞 (ATCC HTB-38) である。SW480 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS; Biosera, Nuaille, France) を添加した Leibovitz's L-15 Medium (L-15 培地, 41300-039; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して凍結保存から融解し、培養した。また、SW480 細胞の起ち上げ後、その一部は 10% FBS および 3.7 g/L NaHCO_3 を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 12800; Thermo Fisher Scientific) で培養した。この DMEM で培養された SW480 細胞は、SW480.hu 細胞として区別したうえで本研究に使用した。HT29 細胞は 10% FBS および 2.0 g/L NaHCO_3 を添加した RPMI 1640 Medium (RPMI 培地, 31800; Thermo Fisher Scientific) で培養した。L-15 培地による培養は 37°C、100% 通常大気 of インキュベーターで実施し、 NaHCO_3 を添加している DMEM および RPMI 培地による培養は 37°C、5% CO_2 、95% 通常大気 of インキュベーターで実施した。

SW480 細胞とその亜集団の実験には、コラーゲンでコーティングしたディッシュを使用した。コーティングには Cellmatrix Type I-C (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) を 1 mM HCl (pH 3.0) で 10 倍に希釈した溶液を使用し、底面をまんべんなく覆わせ直ちにこの溶液を回収し、クリーンベンチ内で 1 時間静置して乾燥させた後に PBS で 3 回洗浄してから使用した。ただし、維持のための細胞継代にはコーティングしていないディッシュを使用した。

DNA 量の変化を経時的に評価するために、SW480 細胞を異なる条件で長期間培養した。このときの細胞継代では培養上清を回収し、浮遊している細胞と接着している細胞をあわせて継代した。細胞継代は凍結保存から融解した日の翌日から開始し、その後は中 2 日の間隔で継代を行った。L-15 培地と DMEM の比較では、DMEM による培養を開始してから 71 日目まで、いずれの培地で培養する細胞も同じ日に継代を続け、71 日目の細胞をサンプリングした。組成を調整した DMEM の比較では、L-15 培地で細胞を起ち上げた後、培地を表 1 に示す 7 種類の組成の培地へ同時に変更した。これらの培地は、DMEM without glucose, L-glutamine, phenol red, sodium pyruvate and sodium bicarbonate, powder, suitable for cell culture (D5030; Sigma-Aldrich) に glucose, sodium pyruvate, alanine, asparagine, glutamine, phenol red ならびに NaHCO_3 を添加したものである。その後、いずれの培地で培養する群も同じ日に継代を続けた。培地切り替え日の継代時およびその次の継代時にサンプリングし、その後は継代 1 回おきに 69 日目までサンプリングした。DNA 量測定用のサンプリング方法は 2-3 に記述する。

2-3. 細胞周期解析および細胞の DNA 量の測定

細胞周期の分布および DNA 量の解析のため、細胞の DNA をヨウ化プロピジウム (PI) で染色し、フローサイトメトリーで蛍光強度を測定した。細胞周期解析では SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞をコラーゲンでコーティングした 60 mm dish に 3.0×10^5 cells/dish の細胞密度で播種し、72 時間培養した。DNA 量解析では SW480.hu 細胞およびその亜集団は 10 cm dish に 7.0×10^5 cells/dish の細胞密度で、HT29 細胞およびその亜集団は 10 cm dish に 12.0×10^5 cells/dish の細胞密度でそれぞれ播種し 72 時間培養した。培養期間中継続的に DNA 量を測定する実験では、対数増殖期にある細胞を継代する際に、細胞懸濁液の一部を分取して解析に使用した。

細胞はトリプシン処理により回収し、培養上清とともに 1,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。ペレットを PBS で懸濁して再び 1,000 rpm、4°C の条件で 5 分間遠心して洗浄した。ペレットを氷冷 70% エタノール 1 mL で懸濁し、-20°C にて一晩静置して細胞を固定した。

表1. 各種栄養素濃度を調整したDMEMの組成

Medium	L-15	DMEM						
		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
Features	L-15	DMEM	DMEM -Glc	L-15 like	L-15 like +Glc	L-15 like -Ala, -Asn	L-15 like -Asn	L-15 like -Ala
glucose (g/L)	-	4.5	-	-	4.5	-	-	-
galactose (g/L)	0.9	-	-	-	-	-	-	-
sodium pyruvate (mg/L)	550	110	110	550	550	550	550	550
alanine (mg/L)	225	-	-	225	225	-	225	-
asparagine (mg/L)	250	-	-	250	250	-	-	250
glutamine (mg/L)	300	584	584	300	300	300	300	300
phenol red (mg/L)	10	15	15	15	15	15	15	15
NaHCO₃ (g/L)	-	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7

*Glc, glucose; Ala, alanine; Asn, asparagine

細胞をタッピングで浮遊させた後 1,000 rpm、4°C で 5 分間遠心してエタノールを除去した後、ペレットを PBS 1 mL で懸濁した。再び 1,000 rpm、4°C で 5 分間遠心して洗浄し、続いてペレットを 100 μ L の 100 μ g/mL RNase/PBS で懸濁して、37°C で 30 分間処理した。このとき 15 分が経過した時点で一度タッピングし、細胞を浮遊させた。RNase 処理後、PBS 1 mL を加えて細胞数を血球計算盤で計数し、 1.0×10^6 cells 相当の細胞懸濁液を分取して 1,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。ペレットを 500 μ L の 50 μ g/mL PI/PBS で懸濁し、遮光して室温で 20 分間染色した後に氷上へ移した。

フローサイトメトリーは、BD FACSVerse™ フローサイトメーター (BD Biosciences, Billerica, CA) または CytoFLEX フローサイトメーター (Beckman Coulter, Brea, CA) を用いて行った。PI は波長 488 nm のレーザーにより励起した。各サンプルから 10,000 個の細胞を分析する前に、ゲーティングによってデブリとダブルットを除外した。細胞周期の各期にある細胞の数は、ヒストグラムに手動でゲーティングを施して算出した。

2-4. X 線照射と放射線抵抗性細胞株の樹立

X 線照射は、X 線発生装置 (X-Rad iR-225; Precision X-Ray, North Branford, CT) を用いて、管電圧 200 kVp、管電流 15 mA、焦点-サンプル間距離 65 cm の条件で、1.0 mm アルミニウムフィルターを使用して実施した。このときの線量率は 1.37 Gy/min であった。照射は室温にて、照射対象を載せたターンテーブルを回転させながら実施した。

放射線分割照射では、2.5 Gy/回で 20 回すなわち合計 50 Gy の X 線の分割照射を行った。各照射は細胞の播種から 2 日後に実施し、照射の翌日に細胞を再播種した。ただし、細胞数を確保するために細胞継代を延期することもあった。細胞はコーティングしていないディッシュを用いて培養した。X 線分割照射がすべて終わった後、生き残った細胞から限界希釈法によってモノクローナルな細胞を得た。具体的には、細胞を 0.8 cells/well の細胞密度で 96 穴プレートに播種し、顕微鏡による観察で単一の細胞のみが播種されたウェルを選抜した。増殖した細胞をより底面積が大きいプレート、さらにディッシュへと順に継代し、5~8 週間増殖させた。十分な細胞数が得られた時点で細胞を凍結保存した。樹立した細胞株のうち、コロニー形成法で X 線照射に対する生存率が親株よりも高い傾向を示した株を SW480RR 細胞および HT29RR 細胞と命名し、使用した。

2-5. コロニー形成法

細胞は 100 cells/dish から 10,000 cells/dish の細胞密度で 60 mm dish に播種した。細胞の接着まで 6 時間培養した後、X 線を照射した。SW480 細胞は 12 日間、SW480.hu 細胞とその亜集団は 10 日間、HT29 細胞とその亜集団は 14 日間培養した後、メタノールで固定し、ギムザ染色液 (2% ギムザ染色液/10 mM NaH₂PO₄/10 mM Na₂HPO₄/DDW) で染色した。50 個以上の細胞から成るコロニーを生存と判定し計数した。Survival fraction は、各サンプルのコロニー数を非照射細胞のコロニー形成数である平板効率によって補正して算出した。生存曲線は Origin Pro 7 (OriginLab, Northampton, MA) を用いて、重み付けをせずに直線-二次曲線モデル (LQ モデル) に基づいて描き、10%生存線量 (D₁₀) は直線-二次曲線モデルのパラメーターから算出した。

2-6. 増殖アッセイ

SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞を 3.0×10^5 cells/dish の細胞密度で、コラーゲンコーティングした 60 mm dish に播種して培養した。播種から 24 時間、48 時間ならびに 72 時間が経過した時点でトリプシン処理によって細胞を回収し、血球計算盤を用いて細胞数を計数した。細胞の倍加時間は、播種した細胞数 (0 時間) と 72 時間時点の細胞数から算出した。

2-7. 染色体解析

染色体解析はクロモソームサイエンスラボ (Sapporo, Japan) に委託した。簡単に説明すると、チミジンとノコダゾールで処理することにより細胞分裂中期の細胞を得て、低張液 [0.4% (w/v) KCl, 10 mM HEPES] で処理し、固定液 (メタノール/酢酸=3:1) で固定し、スライドグラスに滴下した。染色体を DAPI で染色し、顕微鏡で撮影した。各細胞株について 50 個の細胞が解析された。

2-8. アポトーシス解析

細胞のアポトーシスは、MEBCYTO® Apoptosis Kit (Annexin V-FITC Kit; Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan) を用いて、説明書に従って解析した。SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞をコラーゲンでコーティングした 60 mm dish に 6.0×10^5 cells、 3.0×10^5 cells ならびに 1.5×10^5 cells 播種し、その 24 時間後に 10 Gy の X 線を照射して培養を継続した。それぞれ X 線照射 24 時間後、48 時間後ならびに 72 時間後にサンプリングした。非照射群は 1.5×10^5 cells を播種して 96 時間後、すなわち照射後 72 時間の群と同じ時点でサンプリング

した。サンプリングは氷上にて行った。培養上清をチューブへ回収し、細胞を PBS 1 mL で洗浄してこれも同じチューブへ回収した。トリプシン処理により浮遊させた細胞を同じチューブへ回収し、4°Cで 5 分間、1,000 rpm で遠心した。ペレットを PBS で懸濁して細胞数を計数し、 2.0×10^5 cells を 1.5 mL チューブへ移して再度 4°Cにて 5 分間、1,000 rpm で遠心した。説明書にしたがって、細胞ペレットを Annexin V-FITC と 5 μ g/mL の PI を含む溶液で懸濁し、室温で 15 分間染色した。

測定および解析は CytoFLEX フローサイトメーターおよび CytExpert ソフトウェア (Beckman Coulter) を用いて行った。ゲーティングによりデブリを除去したうえで、各サンプルにつき 10,000 個の細胞を分析した。Annexin V-FITC 陽性かつ PI 陰性の細胞を初期アポトーシス細胞とみなし、Annexin V-FITC 陽性かつ PI 陽性の細胞を死細胞 (後期アポトーシス細胞およびネクローシス細胞) とみなした。

2-9. 細胞老化の解析

老化細胞は Senescence β -Galactosidase Staining Kit 9860 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) を用いて、老化関連 β -ガラクトシダーゼ染色 (SA- β -gal 染色) により評価した。SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞をコラーゲンでコーティングした 35 mm dish に 0.9×10^5 cells 播種し、その 24 時間後に 5 Gy の X 線を照射して、さらに 5 日間培養した。非照射群の細胞は照射群と同時に播種し、3 日間培養した時点でサンプリングした。細胞の固定および染色は付属の説明書に従って実施した。倒立型培養顕微鏡 CKX53 (Olympus, Tokyo, Japan) および顕微鏡用カメラ制御ソフトウェア MicroStudio (Wraymer, Osaka, Japan) を用いて画像を撮影した。青く染色されている細胞を SA- β -gal 染色陽性細胞として計数し、1 サンプルにつき少なくとも 100 cells について解析した。

2-10. DNA 二本鎖切断修復の解析

DNA 二本鎖切断修復は、p53-binding protein 1 (53BP1) の DNA 二本鎖切断部位への集積を、免疫蛍光染色を用いて focus として可視化することにより評価した。細胞はコラーゲンでコーティングした Round Micro Cover Glass (15 mm ϕ ; Matsunami Glass Industry, Osaka, Japan) を入れた 35 mm dish に播種した。SW480.hu 細胞、SW480RR 細胞ならびに HT29RR 細胞は 1.0×10^5 cells/dish の細胞密度で、HT29 細胞は 1.5×10^5 cell/dish の細胞密度でそれぞれ播種し培養した。播種から 24 時間後に 0.5 Gy の X 線を照射して培養を継続し、照射後 30 分、1

時間、3 時間、6 時間、12 時間ならびに 24 時間が経過した時点で細胞を固定した。非照射群の細胞は照射後 30 分の群と同時に固定した。

細胞の固定は PBS 1 mL をいれた 12 well plate にガラスディスクを移して洗浄した後、5% paraformaldehyde/PBS 中で 15 分間室温にて静置を行った。PBS 1 mL を入れ 1 分間静置して洗浄する工程を計 3 回繰り返す、その後 PBS 1 mL 中で 4℃にて保存した。5% ヤギ血清 /0.3 % Triton X-100/PBS により室温にて 1 時間振盪しながらブロッキングした。一次染色は 1% BSA/0.3% Triton X-100/PBS で 1000 倍に希釈した rabbit polyclonal anti-53BP1 antibody (ab36823; Abcam, Cambridge, UK) により、4℃で一晩振盪しながら行った。PBS 1 mL で室温にて 5 分間振盪して洗浄する工程を計 3 回繰り返した後、1% BSA/0.3% Triton X-100/PBS で 1000 倍に希釈した Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 (A11008, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) により、室温で 90 分間振盪しながら二次染色を行った。PBS 1 mL で室温にて 5 分間振盪して洗浄する工程を計 3 回繰り返した後、0.3 μM DAPI (Thermo Fisher Scientific) で室温にて 5 分間振盪しながら核を染色した。PBS 1 mL で室温にて 5 分間振盪して洗浄し、ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen) を用いてスライドガラス上に封入した。

蛍光顕微鏡画像の撮影には正立金属顕微鏡システム BX61 (Olympus) および cellSens ソフトウェア (Olympus) を使用した。DAPI 染色像と 53BP1 染色像は、同じ視野のまま別々に撮影した。すべてのサンプルは同じ設定で撮影した。少なくとも 100 個の DAPI 染色核について、53BP1 focus 数を画像上で数えた。照射後に形成された focus の数は、非照射対照 (0 時間) における focus 数のある時点の focus 数から差し引くことで計算した。Focus 数の半減時間は JMP® Pro (SAS Institute, Cary, NC) を用いて計算した。

2-11. グルタチオンの定量

細胞内グルタチオンは GSSG/GSH Quantification Kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて定量した。SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞をそれぞれ 6.0×10^5 cells/dish および 5.0×10^5 cells/dish の細胞密度でコラーゲンコーティングした 60 mm dish に播種し、48 時間培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。説明書に従いサンプルを調整し、Victor®Nivo™ マルチモードマイクロプレートリーダー (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて吸光度を測定した。検量線から総グルタチオン量および酸化グルタチオン (GSSG) の量を求め、還元型グルタチオン (GSH) の量は総グルタチオン量から GSSG 量の 2 倍を差し引くことにより算出した。

2-12. 細胞内 ATP の定量

細胞内 ATP は『細胞の』ATP 測定試薬 (TOYO B-Net, Tokyo, Japan) を用いて定量した。SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞の非照射群の細胞はそれぞれ 6.0×10^5 cells/dish および 5.0×10^5 cells/dish の細胞密度で、またそれらの照射群はそれぞれ 8.0×10^5 cells/dish および 7.0×10^5 cells/dish の細胞密度で、コラーゲンコーティングした 60 mm dish に播種した。播種から 24 時間後に 10 Gy の X 線を照射し、照射後 24 時間の時点で照射群および非照射群をトリプシン処理によって回収した。 2.0×10^4 cells を 96 穴 white-walled plate へ入れ、付属の説明書に従ってルシフェラーゼと反応させた。Victor®Nivo™ マルチモードマイクロプレートリーダー (PerkinElmer) によって発光強度を測定した。測定はデュプリケイトとし、検量線から ATP 量を求めた。

2-13. 2-Deoxy-D -glucose (2-DG) 取り込み量の測定

SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞をコラーゲンコーティングした 35 mm dish に播種し、24 時間培養した後に 40 nM ($2.4 \mu\text{Ci}$) $[1,2\text{-}^3\text{H(N)}]\text{-(2-DG)}$ (Moravek, Brea, CA) を培地に添加して 37°C、5% CO_2 で 40 分間インキュベートした。上清は捨て、細胞を冷 PBS 1 mL で 3 回洗浄して細胞に取り込まれなかった 2-DG を除去した。細胞を 1 mL の 0.1N NaOH で 10 分以上かけて完全に溶解し、全量を液体シンチレーションカウンター (LSC) 用のガラス製バイアル瓶へ回収した。LSC カクテル AQUASOL-2 (PerkinElmer) を 5 mL 加え、液体シンチレーションカウンター LSC-5100 (Hitachi ALOKA, Tokyo, Japan) を使用して ^3H 由来の β 線を計数し、外部標準線源法により放射能を求めた。結果は、同時に播種しておいた細胞の 1 dish あたりの細胞数を計数することにより、細胞数で標準化した。

2-14. 細胞外フラックスアナライザーによるエネルギー代謝活性の評価

酸素消費率 (OCR) および細胞外酸性化速度 (ECAR) の測定には Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) および Wave Desktop 2.6 software (Agilent Technologies) を使用した。アッセイ用試薬には Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies) を使用した。細胞はコラーゲンでコーティングした Seahorse XFp cell culture miniplate (Agilent Technologies) へ、測定時におよそ 2.0×10^4 cells/well になるような細胞密度でそれぞれ播種し、37°C、5% CO_2 で培養した。播種後 24 時間の時点で 10 Gy の X 線を照射し、照射後 24 時間の時点にあわせて照射群の測定を開始した。非照射群は照射群と別のプレートに播種しておき、照射群の測定が終了し次第、すなわち播種後約 48 時間後に測定を開始した。

測定の 90 分前に培地を生育培地から解析用の培地へ培地交換した。解析用の培地には、25 mM glucose, 4 mM L-glutamine ならびに 1 mM sodium pyruvate を Seahorse XF DMEM Medium pH 7.4 with 6 mM HEPES (Agilent Technologies) に添加し pH を 7.4 ± 1.0 に調整したものを使用した。培地交換後、CO₂ 制御のされていないインキュベーター中で、37°C、100% 通常大気にて 1 時間細胞をインキュベートした。測定は製造者のプロトコルに従って行い、各サンプルの OCR の値は、0.5 μ M oligomycin 添加直前の OCR からすべてのアッセイ試薬 (oligomycin、FCCP および rotenone/antimycin A; いずれも 0.5 μ M) 添加終了後の OCR の最低値を引いた差として算出した。ECAR は 0.5 μ M oligomycin 添加直前の ECAR の値を使用した。

測定結果は測定終了直後に行った crystal violet assay に基づいて、細胞数によって補正した。フラックスアナライザーによる分析の直後、細胞をメタノールで 10 分処理して固定し、染色液 (0.1% クリスタルバイオレット/20% メタノール/DDW) で 1 時間、室温にて静置して染色した。DDW で洗浄して染色液を完全に除去した後、メタノールで 20 分間、室温にて振盪しながらクリスタルバイオレットを溶出させた。この溶液を 96 穴プレートに移し、Victor®Nivo™ マルチモードマイクロプレートリーダー (PerkinElmer) によって波長 570 nm における吸光度を測定して、検量線から細胞数を求めた。

2-15. 統計解析

差の統計学的有意性は、両側 t 検定を用いて検定した。等分散性は F 検定を用いて確認した。次に、F 検定の結果に従って、Student の t 検定または Welch の t 検定を 2 群の比較に用いた。必要に応じて、二元配置分散分析と Bonferroni 補正を行った。相関を調べるために、ピアソンの相関係数を計算した。 $p < 0.05$ の場合、統計的に有意な差とみなした。

3. 結果

3-1. 培養環境ががん細胞集団の DNA 量不均一性に及ぼす影響

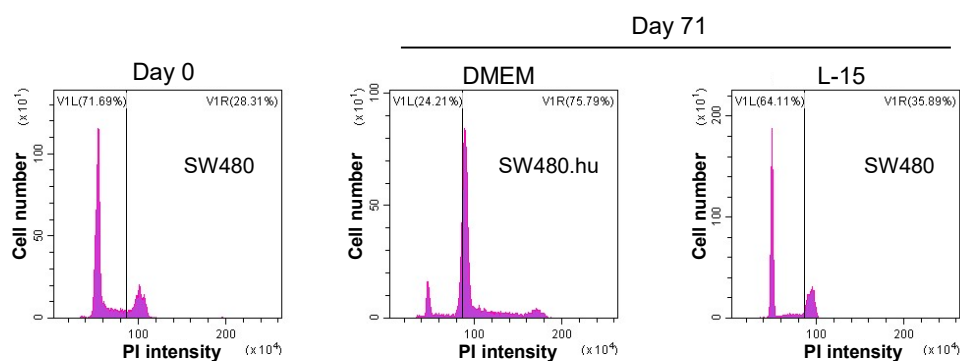
ヒト大腸癌由来 SW480 細胞では、hyper-diploid 細胞が優勢であり、細胞集団の大部分を占めることが知られている²⁷⁾。しかし、少数の hyper-tetraploid 細胞の存在も報告されており、染色体数および DNA 量に不均一性のあるがん細胞集団であるといえる^{27),47)}。本研究では X 線分割照射のために細胞を長期間培養することになるため、長期間の細胞培養が DNA 量不均一性におよぼす影響を照射実験に先立ち検討する必要がある。Leibovitz による SW480 細胞樹立時の培地²⁷⁾および細胞株の入手元である ATCC の推奨する培地は、glucose を含まない L-15 培地である。しかし、がん細胞では解糖系機能の亢進が化学療法や放射線治療への抵抗性に寄与することが報告されており、DNA 修復能への影響も確認されていることから^{8),42)}、本研究では glucose を含む DMEM を培地として使用することを計画した。

まず初めに、L-15 培地と DMEM で長期間の培養を行った際に、SW480 細胞を構成する細胞集団の割合がどのように変化するか検討した。ATCC が推奨する L-15 培地を用いた場合には hyper-diploid 細胞が優勢のままであったが、DMEM で培養するとより DNA 量の多い hyper-tetraploid 細胞の割合が次第に大きくなり、最終的には hyper-tetraploid 細胞が大部分を占めるように変化した (図 1A)。続いて、この現象が L-15 培地と DMEM の栄養成分の組成の違いに起因すると予想し、解糖系基質である glucose および pyruvate、アミノ酸である alanine、asparagine ならびに glutamine の濃度を調整した DMEM をベースとする 7 種類の培地 (表 1) で長期間の培養を実施した (図 1B)。その結果、glucose を含まない DMEM では細胞集団の割合の変化は起こらず、glucose を含む培地では変化が認められたことから、DMEM に含まれる glucose が細胞集団の割合の変化に寄与していることが明らかになった。DMEM で培養され DNA 量の多い hyper-tetraploid 細胞をより多く含むように変化した状態の SW480 細胞亜集団を SW480.hu 細胞として区別し、以降の放射線抵抗性に関する一連の実験では SW480.hu 細胞を主に使用した。

3-2. X 線分割照射による放射線抵抗性がん細胞株の樹立

放射線治療を模倣した X 線分割照射が DNA 量不均一性におよぼす影響の評価および放射線抵抗性細胞樹立のために、50 Gy の X 線を 20 回に分割して SW480.hu 細胞に照射した。生き残った細胞からクローニングを行い、最も放射線抵抗性の高い細胞株をモデルとして選択した。樹立した抵抗性株の中でも、抵抗性クローン#13 が、増殖速度、コロニー形成能、

A



B

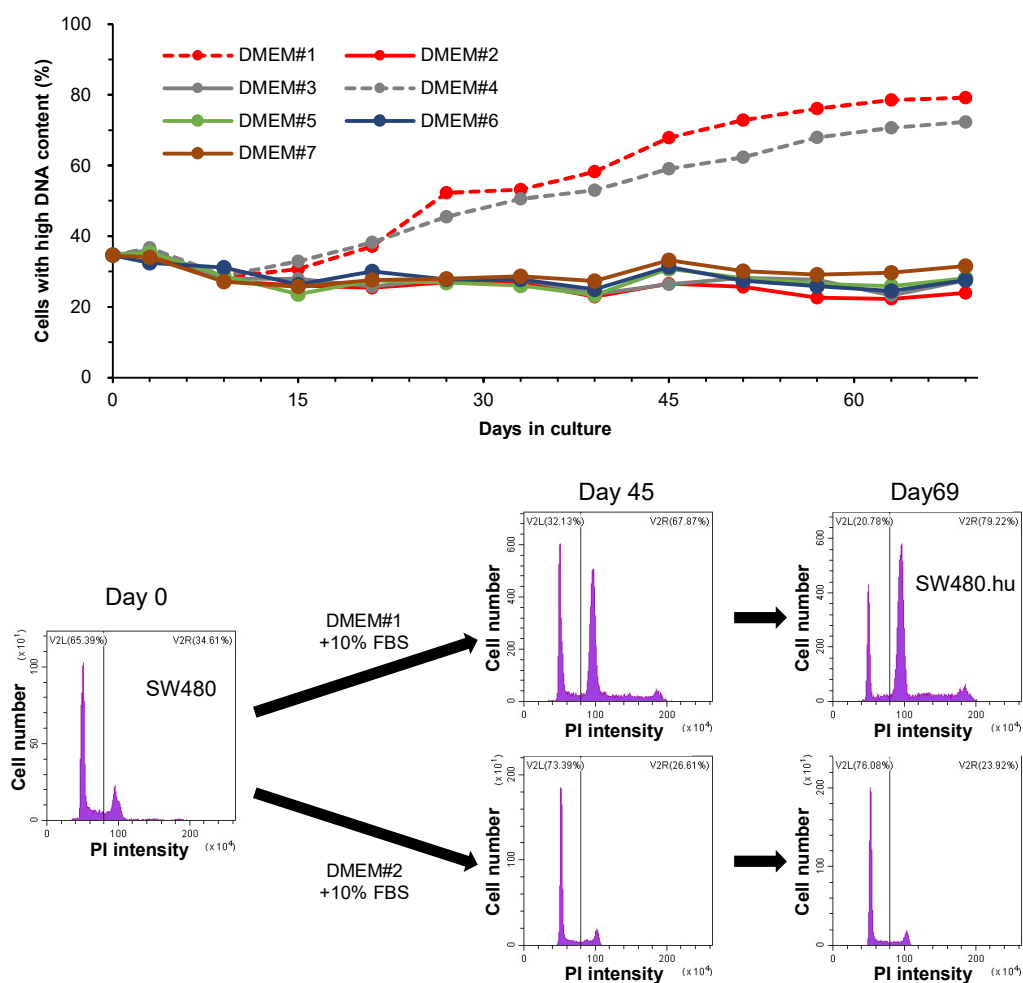


図1. 培養によるSW480細胞のDNA量分布の変化

細胞のDNAをPIで染色し、フローサイトメトリーで測定した。(A) SW480細胞を10% FBS添加DMEMで培養した場合および10% FBS添加L-15培地で培養した場合の、培養前(0日目)と71日後のDNA量の比較。(B) 10% FBSを添加したDMEMベースの各種調整培地で培養した場合のDNA量の変化。培地の組成は表1に示す。折れ線グラフは、蛍光強度の高低に基づいて細胞集団を二分したとき、蛍光強度が高い側にいる細胞の割合を示す(上段)。集団を二分する基準となる蛍光強度は、0日目のヒストグラムにおいて顕著に認められるG2/M期集団の蛍光強度の最低値を目安とした。また、DMEM#1 (25 mM glucose) またはDMEM#2 (0 mM glucose) を使用した場合の、培養前(0日目)と45日後および69日後におけるフローサイトメトリーのヒストグラムを代表として示している(下段)。

細胞の取り扱いやすさから主に使用された (以下、SW480RR 細胞と呼称する)。コロニー形成法における SW480.hu 細胞および SW480RR 細胞の平板効率はそれぞれ 74.3%および 91.9%であった。SW480RR 細胞は、SW480.hu 細胞と比較して、X 線照射後の生存率が有意に高く (図 2A)、LQ モデルを用いて 10%生存線量 (D_{10}) を求めると、SW480RR 細胞の D_{10} は 5.0 Gy で、SW480.hu 細胞における 3.4 Gy の約 1.5 倍であった。コロニー形成法の結果には、クローニングによる樹立、凍結保存の後の、再融解から約 8 週間後のデータも含まれており、SW480RR 細胞は照射が終了してから 3 か月以上が経過しても依然として高い放射線抵抗性を示した。

詳細な解析の前に、細胞の増殖能を評価した (図 2B)。同数の細胞を 72 時間培養した場合、SW480RR 細胞は SW480.hu 細胞より有意に細胞数が少なかった。細胞の倍加時間は SW480.hu 細胞の 18.9 時間に対し、SW480RR 細胞では 22.1 時間であり、有意に延長していた。

3-3. SW480RR 細胞の DNA 量および染色体数の解析

まず DNA 量や染色体数の不均一性を有する SW480.hu 細胞に対して行った X 線分割照射によって、DNA 量不均一性がどのように変化し、どのような染色体数および DNA 量を有する細胞が放射線抵抗性細胞として観察されたのか評価した。

親株 SW480.hu 細胞は、DNA 量の異なる 2 種類の細胞集団で主に構成されており、ヨウ化プロピジウムによる DNA 染色においてほとんど全ての SW480.hu 細胞は 100,000 (G1 期) -200,000 (G2/M 期) a.u.程度の蛍光強度を示し、50,000 a.u.付近の蛍光強度を示す G1 期とみられる細胞がわずかに存在していた (図 3A 上段)。これらはそれぞれ、hyper-tetraploid 細胞の G1 期~G2/M 期および hyper-diploid 細胞の G1 期に相当すると考えられる。なお、DNA 量が少ない細胞集団の G2/M 期と DNA 量が多い細胞集団の G1 期はオーバーラップしており、それぞれの集団の正確な割合は求めることが困難であった。

放射線分割照射が完了した後、クローニングを行う前の集団で DNA 量の分布を調べると、SW480.hu 細胞では DNA 量が比較的多い hyper-tetraploid 細胞が大部分を占めていたのに対し、照射完了後の集団は DNA 量の比較的小さい集団で構成されていた (図 3A 中段)。クローニングによって得られた放射線抵抗性の高い SW480RR 細胞のヨウ化プロピジウム染色強度もまた、SW480.hu 細胞の大部分を占める細胞よりも低く (図 3A 下段)、その平均蛍光強度は有意に低かった (図 3B)。SW480.hu 細胞で認められた hyper-diploid 細胞の G1 期に相当すると考えられる小集団と、SW480RR 細胞の G1 期集団が一致するヨウ化プロピジウム蛍光

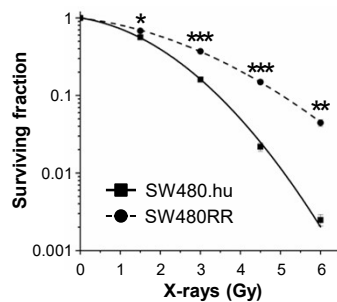
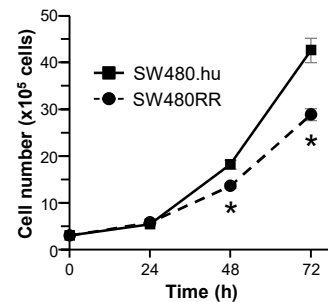
A**B**

図2. 親株SW480.hu細胞および樹立したSW480RR細胞の放射線感受性および細胞増殖能

(A) 放射線感受性をコロニー形成法を用いて評価した。細胞はX線照射後10日間培養した。曲線はLQモデルに基づいて描いた。(B) 細胞増殖を増殖アッセイで評価した。3.0×10⁵ 個の細胞を播種し (0時間)、その後24時間ごとにトリプシン処理で細胞を回収して計数した。データは、それぞれ triplicateで行った5つの独立した実験 (A)、または1回の実験における3サンプル (B) の平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ (SW480.hu細胞とSW480RR細胞の比較)。

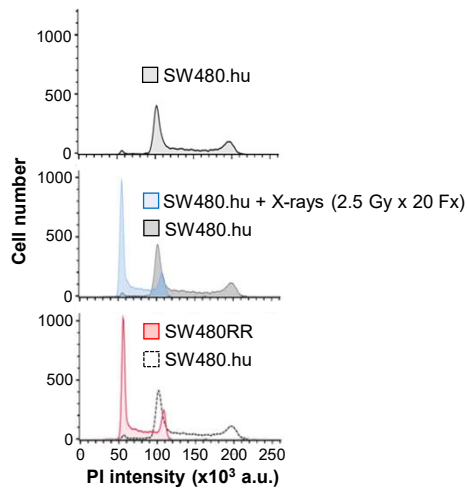
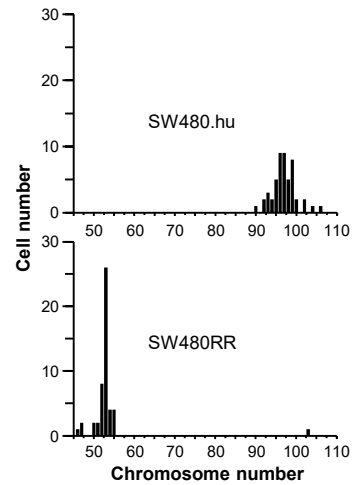
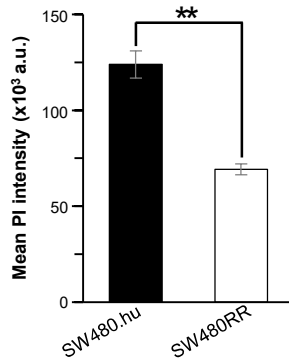
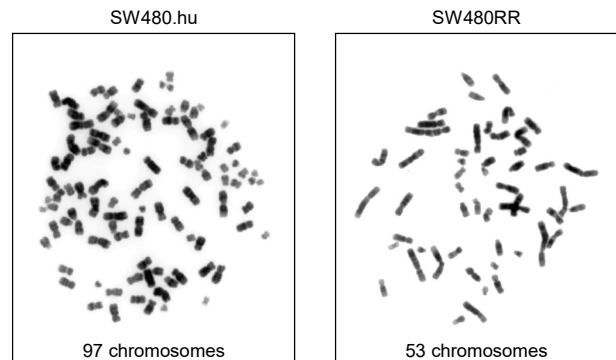
A**C****B****D**

図3. 細胞あたりのDNA量と染色体数

(A-C) PIでDNAを染色し、フローサイトメトリーで解析した。デブリとダブレットはゲーティングにより除外し、その後10,000個の細胞を分析した。親株SW480.hu細胞、X線分割照射終了後の細胞集団、ならびにSW480RR細胞におけるDNA量分布は各細胞におけるPI蛍光強度の分布としてヒストグラムで示されている。中段および下段のパネルでは、上段のパネルに示したSW480.hu細胞のヒストグラムを重ねている。(B) SW480.hu細胞およびSW480RR細胞について、10,000細胞の平均PI蛍光強度を算出した。データは3サンプルの平均±標準誤差で表した。*****p* < 0.01**。(C、D) 細胞の染色体数を計数した。各細胞株につき細胞分裂中期の50細胞の染色体を、DAPI染色により計数した。ヒストグラムは染色体数の分布を示す (C)。それぞれの細胞株において最頻値の染色体数を有する細胞の染色体像を代表として示した (D)。

強度を示したことから、SW480RR 細胞はこの hyper-diploid の親細胞集団に由来することが示唆された。

この結果と一致して、SW480RR 細胞の染色体数の最頻値は 53 本で、SW480.hu 細胞の染色体数の最頻値である 96 本と 97 本よりも少なかった (図 3C および D)。

3-4. 細胞周期分布と放射線誘発細胞死の評価

次に、SW480RR 細胞について既知の放射線抵抗性メカニズムを調べた。細胞の放射線感受性は細胞周期によって変化するため、親株と放射線抵抗性株の細胞周期分布を推定した。一般に、G2/M 期にある細胞は放射線感受性が高く、S 期の後半にある細胞は放射線抵抗性であることが知られている^{43),44),46)}。SW480.hu 細胞と SW480RR 細胞との間で、G1 期および S 期前半の細胞集団には有意な変化が観察されたが、変化の程度はわずかであり、また S 期後半および G2/M 期の細胞の割合に有意な差は認められなかった (図 4)。

続いて、放射線誘発細胞死であるアポトーシスと細胞老化の誘導を評価した¹⁰⁾。両細胞株とも 10 Gy の X 線照射後、初期アポトーシス細胞と死細胞の割合が増加した (図 5A-C)。SW480RR 細胞は SW480.hu 細胞よりも初期アポトーシスの誘導が照射 24 時間後と 48 時間後で有意に少なかったが、SW480RR 細胞は照射後 72 時間で SW480.hu 細胞よりも高い初期アポトーシスの割合を示した (図 5B)。両細胞株間の初期アポトーシスの最大差は 72 時間後における 6.5%であった。一方、死細胞の割合は照射後 72 時間において大きく異なり、SW480.hu 細胞の 63.3%に対して、SW480RR 細胞では 23.4%と有意に低い割合を示した (図 5C)。

細胞老化のマーカーである SA- β -gal が陽性の細胞の割合は、両細胞株とも 5 Gy の X 線照射後に有意に増加した (図 5D および E)。しかし、細胞株の種類と照射の有無との間に交互作用は認められなかった ($p = 0.78$)。

3-5. DNA 二本鎖切断修復の評価

親株と抵抗性株の放射線感受性の違いや放射線の標的である DNA の量の違いを考慮すると、放射線誘発 DNA 損傷やその修復にも何らかの違いがある可能性が考えられた。放射線誘発細胞死の過程は主として DNA 損傷から始まり、DNA 修復の調節が放射線抵抗性に寄与する³⁷⁾。本研究では、53BP1 タンパク質の免疫蛍光染色を行い、DNA 二本鎖切断部位への 53BP1 タンパク質の集積によって形成される focus の数から DNA 二本鎖切断の量を推定し^{1),6),32),33),39)}、放射線誘発 DNA 二本鎖切断とその修復について調べた。

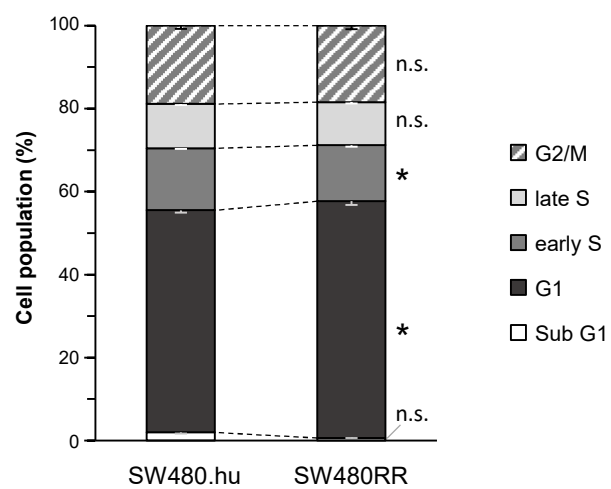


図4. 細胞周期の分布

細胞周期の各期にある細胞の割合を示す。PIでDNAを染色し、フローサイトメトリーで解析した。データは3サンプルの平均値－標準誤差で表した。* $p < 0.05$ 、n.s., not significant (SW480.hu細胞とSW480RR細胞の比較)。

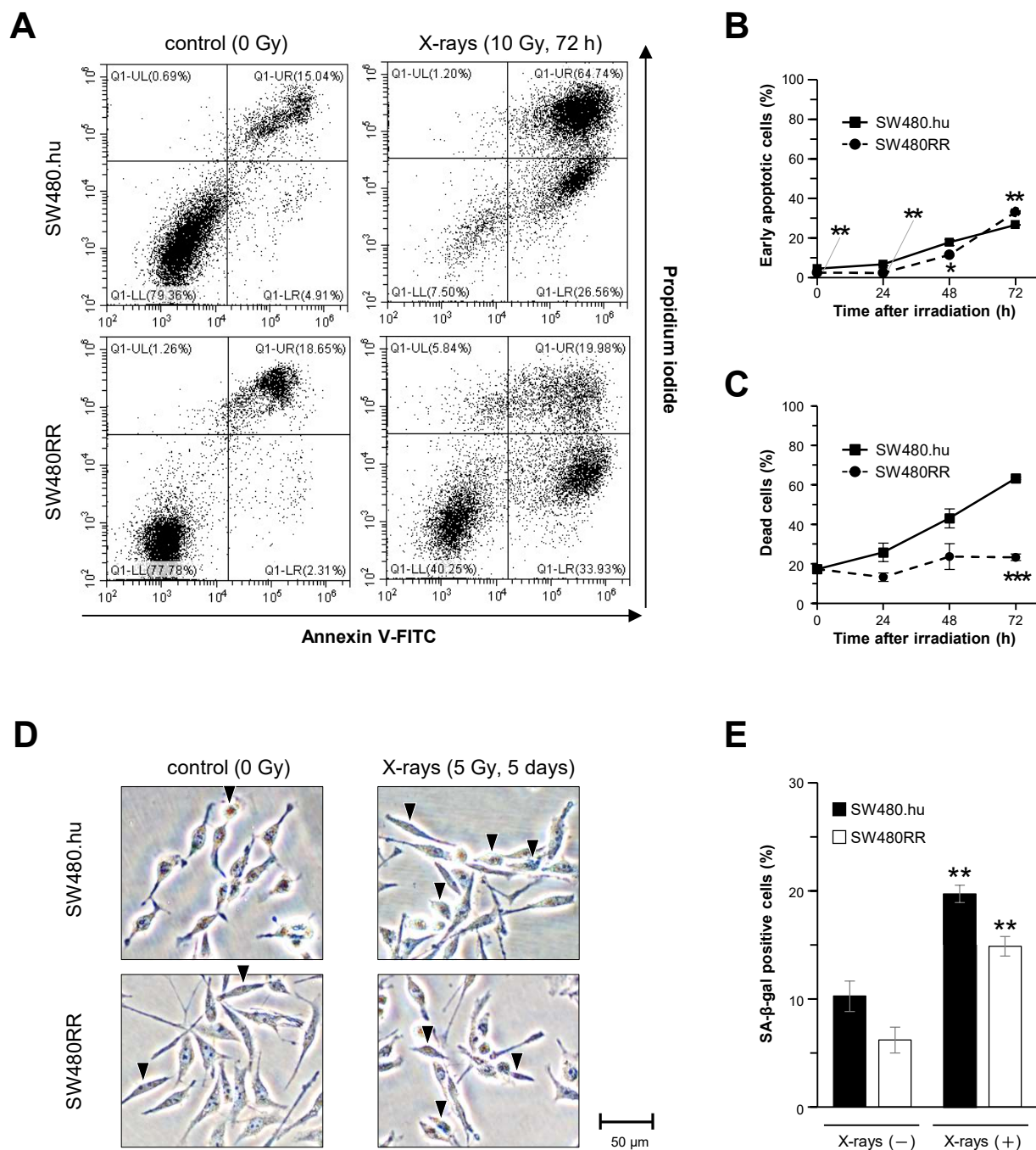


図5. 親株SW480.hu細胞と放射線抵抗性株SW480RR細胞の放射線誘発細胞死の評価

(A-C) アポトーシスの初期段階にある細胞 (B: Annexin-V FITC陽性、PI陰性) と死細胞 (C: Annexin-V FITC陽性、PI陽性) の割合をフローサイトメトリーを用いて測定した。細胞に10 GyのX線を照射し、その後24時間ごとに回収した。非照射対照と照射後72時間群について、2つの細胞株のフローサイトメトリー画像を代表として示した (A)。(D、E) SA- β -gal染色を用いて老化細胞の割合を評価した。細胞に5 GyのX線を照射し、その後5日間培養して固定した。非照射対照と照射細胞の画像を示す。青く染色された細胞 (矢頭) を、SA- β -gal陽性とみなした。各画像はそれぞれ、色がわかるように明るさとコントラストを調整している。データは、3回の独立した実験 (B、C) または1回の実験における3サンプル (E) の平均値±標準誤差で表した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ (SW480.hu細胞とSW480RR細胞の比較; カラム上のアスタリスクは非照射細胞と照射細胞の比較)。

非照射の条件における 53BP1 focus 数は、SW480RR 細胞では 1 細胞あたり 0.84 個であり、SW480.hu 細胞の 1 細胞あたり 2.39 個に比べて有意に少なかった (図 6A)。そこで、0.5 Gy の X 線照射によって誘導された新規の focus 形成数を評価するために、非照射条件 (0 h) で focus 数を照射後の各時点での focus 数から差し引いた (図 6B)。照射後 30 分の時点において、53BP1 focus の形成は SW480.hu 細胞よりも SW480RR 細胞で有意に少なく、放射線抵抗性細胞では初期 DNA 損傷量が少ないことが示唆された。その後、形成された focus は時間の経過とともに減少したが、この過程は DNA 修復の動態を反映する^{32),39)}。形成された focus の半減期について、SW480.hu 細胞 (3.69 時間) と SW480RR 細胞 (3.02 時間) の間で有意な差は認められず、SW480RR 細胞の DNA 修復効率が SW480.hu 細胞よりも高いとはいえなかった。形成された focus の数は、照射後 24 時間まで常に親株より抵抗性株で有意に少なかった。これらの結果は、SW480RR 細胞では初期 DNA 損傷が少なく、SW480.hu 細胞では残存する DNA 損傷の程度がより大きいことを示唆している。

初期 DNA 二本鎖切断の数 (照射後 30 分で形成された 53BP1 focus 数) を、3-3 で得られた平均染色体数や細胞の DNA 量を反映する平均ヨウ化プロピジウム蛍光強度の相対値 (SW480.hu 細胞を 1 とした相対値) で割って染色体あたりおよび単位 DNA 量あたりの値に換算すると、SW480RR 細胞における初期 DNA 二本鎖切断の有意な減少は観察されない (表 2)。

さらに、電離放射線に対する抗酸化物質として化学修復に関与する放射線防護トリペプチドであるグルタチオンの量を評価した⁵⁾。非照射の条件において、SW480.hu 細胞と SW480RR 細胞の間で、グルタチオン量および酸化還元レベル (GSH/GSSG) に有意な差は認められなかった (図 7)。

3-6. エネルギー代謝活性の評価

放射線抵抗性に寄与する因子として、がん細胞のエネルギー代謝と放射線抵抗性との関連性が検討されてきた。Lynam-Lennon らは、分割照射された食道腺がん OE33 細胞の放射線抵抗性に、エネルギー代謝の亢進と代謝の変化によって ATP 需要が満たされることが寄与したと報告した²⁸⁾。そこで、本研究においてもエネルギー代謝について解析を行った。

まず、エネルギー供給と充足の指標として細胞内 ATP 量を測定した (図 8A)。非照射条件において、SW480RR 細胞は有意に低い ATP 量を示し、SW480.hu 細胞の 38% であった。10 Gy の X 線照射 24 時間後、単位細胞数あたりの ATP 量は両細胞株とも有意に増加した。こ

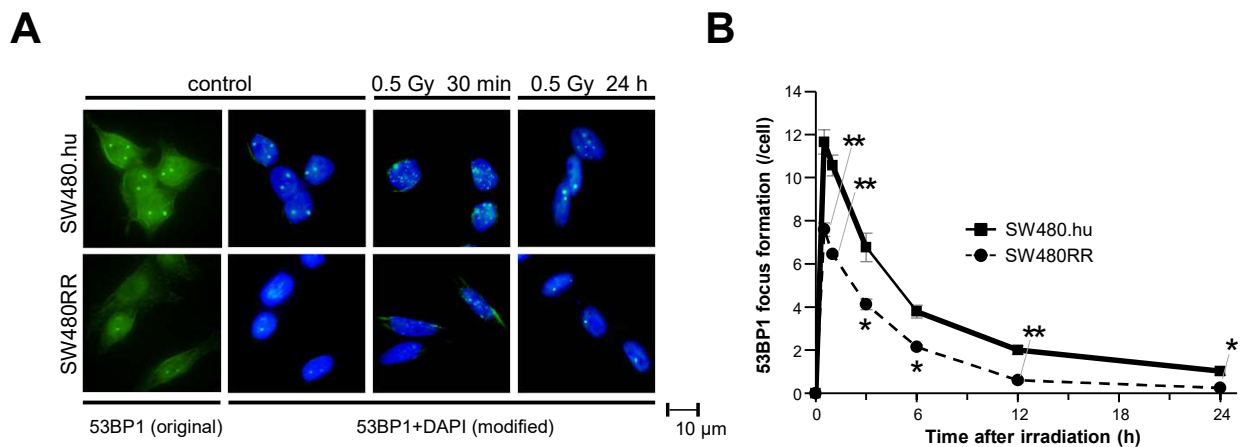


図6. X線誘発DNA二本鎖切断とその修復

0.5 GyのX線照射後のDNA二本鎖切断修復を、53BP1タンパク質の免疫蛍光染色を用いて評価した。(A) 左のパネルは元の53BP1染色像を示し、他のパネルは53BP1染色像をDAPIによる核染色像と合成し、それぞれコントラストと明度を調整してfocusを強調した画像である。非照射対照 (0時間) および照射後0.5時間または24時間の画像を代表として示す。(B) 照射後各時点のfocus数から非照射対照細胞のfocus数を差し引いて、照射後に誘導されたfocus数の増加量をプロットした。データは3サンプルの平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (SW480.hu細胞とSW480RR細胞の比較)。

表2. DNA二本鎖切断量を染色体数またはDNA量で補正した場合の数値

Cell	Mean initial focus formation	Mean chromosome number	Focus formation/ chromosome	Mean PI intensity (relative to SW480.hu)	Focus formation/ relative DNA content
SW480.hu	11.66	97.0	0.12	124×10^3 (1.00)	11.66
SW480RR	7.60	53.5	0.14	69×10^3 (0.56)	13.60

$p = 0.10$ $p = 0.12$

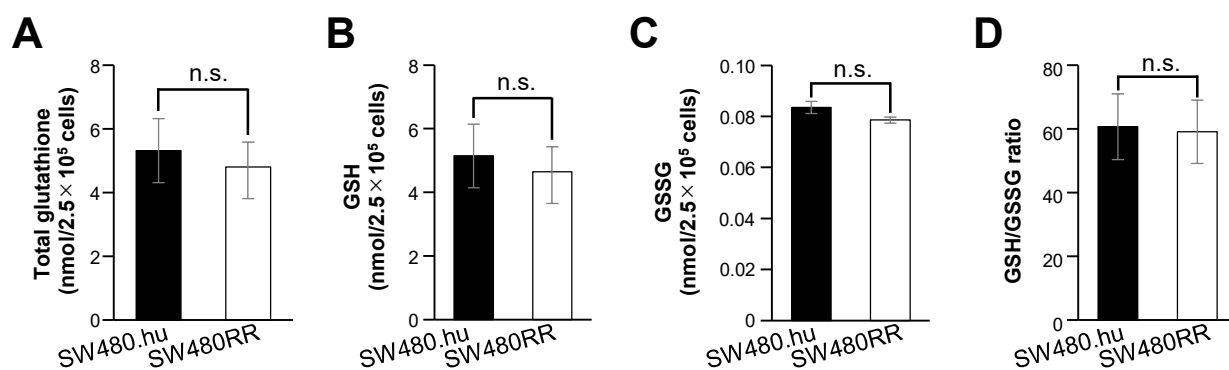


図7. 細胞内グルタチオン量

総グルタチオン (A)、還元型グルタチオン (B)、酸化型グルタチオン (C) ならびに酸化還元レベル (D) を比色定量法で定量した。n.s., not significant (SW480.hu細胞とSW480RR細胞の比較)。

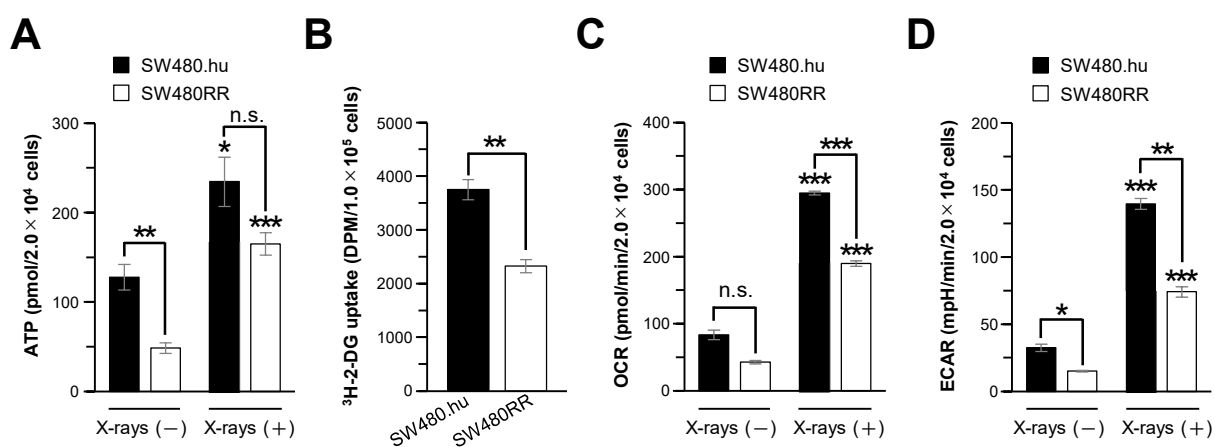


図8. エネルギー代謝活性の評価

(A) ルシフェラーゼ発光を利用した方法を用いて、細胞内ATP量を定量した。(B) Glucose取り込み能は、³H-2-DGの取り込み量から推定した。細胞を40 nMの³H-2-DGを含む培地中で40分間インキュベートし、³H由来のβ線を液体シンチレーションカウンターで測定した。(C、D) Seahorse XFp Analyzerを用いて、ミトコンドリア呼吸と解糖系の活性を、それぞれOCRとECARを指標として同時に評価した。細胞は10 GyのX線照射後24時間インキュベートした。データは、7サンプルの平均値±標準誤差 (A)、それぞれtriplicateで行った3回の独立した実験の平均値±標準誤差 (B)、または1回の実験における3サンプルの平均値±標準誤差 (C、D) で表した。**p* < 0.05、***p* < 0.01、****p* < 0.001、n.s., not significant (SW480.hu細胞とSW480RR細胞の比較; カラム上のアスタリスクは非照射細胞と照射細胞の比較)。

れは他の細胞株で既に報告されていることと一致する^{50),51)}。細胞株の種類と X 線照射の有無との間に交互作用は認められなかった ($p = 0.80$)。

親株と抵抗性株のエネルギー代謝の違いをさらに詳細に比較するため、主要なエネルギー産生経路である解糖系とミトコンドリア電子伝達系を評価した。解糖系の第一段階である細胞内への glucose 取り込みは、glucose の構造類似体である ^3H -2-DG の取り込みに基づいて評価した。SW480RR 細胞では SW480.hu 細胞よりも ^3H -2-DG の取り込みが有意に低く (図 8B)、放射線抵抗性株では glucose 取り込みが少ないことが明らかになった。ミトコンドリア呼吸による酸素消費率 (OCR) と解糖系の乳酸産生による細胞外酸性化速度 (ECAR) は、フラックスアナライザーを用いて同時に評価した (図 8C および D)。非照射条件において、SW480RR 細胞の OCR は SW480.hu 細胞よりも低い傾向にあったが、その差は有意ではなかった。また、SW480RR 細胞は SW480.hu 細胞よりも有意に低い ECAR を示した。10 Gy の X 線照射後 24 時間が経過すると、両細胞株とも OCR と ECAR が有意に増加した。X 線照射後の OCR および ECAR の増加の程度は SW480.hu 細胞のほうが SW480RR 細胞よりも大きく、細胞株の種類と X 線照射の有無との間の有意な交互作用が OCR と ECAR の両方で観察された ($p < 0.001$)。

3-7. SW480.hu 細胞における放射線抵抗性細胞出現機構の解析

SW480RR 細胞 (抵抗性クローン#13) は親株 SW480.hu 細胞のうち DNA 量が少ない hyperdiploid 細胞集団に由来することが示唆されたため、SW480RR 細胞と同時に樹立された他のクローン (#9 および#14) についても、同様の特徴が観察されるか否かを検証した (図 9)。クローン#9 と#14 については、DNA 量の分布はクローン#13 とほぼ一致しており、また染色体数の最頻値はいずれも 55 本で親株 SW480.hu 細胞よりも少なかった (図 9A-C)。分割照射を経て樹立されたこれら 2 つの細胞株は、初期 DNA 損傷が少ない傾向を示し (図 9D)、 D_{10} がそれぞれ 5.3 Gy および 6.0 Gy であったことから SW480RR 細胞 (クローン#13) と同様に放射線抵抗性であることが明らかになった (図 9E)。

3-3 で示した結果と以上の結果を総合すると、分割照射終了時に DNA 量の少ない細胞のみが残存し、そこから得られた放射線抵抗性クローンも DNA 量の少ない細胞であったことを示している。しかし、このような DNA 量の少ない放射線抵抗性細胞が、親細胞集団に元々高い抵抗性を有して存在していたのか、あるいは分割照射中に放射線抵抗性を獲得して新たに出現したのかについては不明である。この疑問を解決するため、X 線分割照射を行わずに親株 SW480.hu 細胞からクローンを直接樹立し、これらのクローンの放射線感受性と DNA

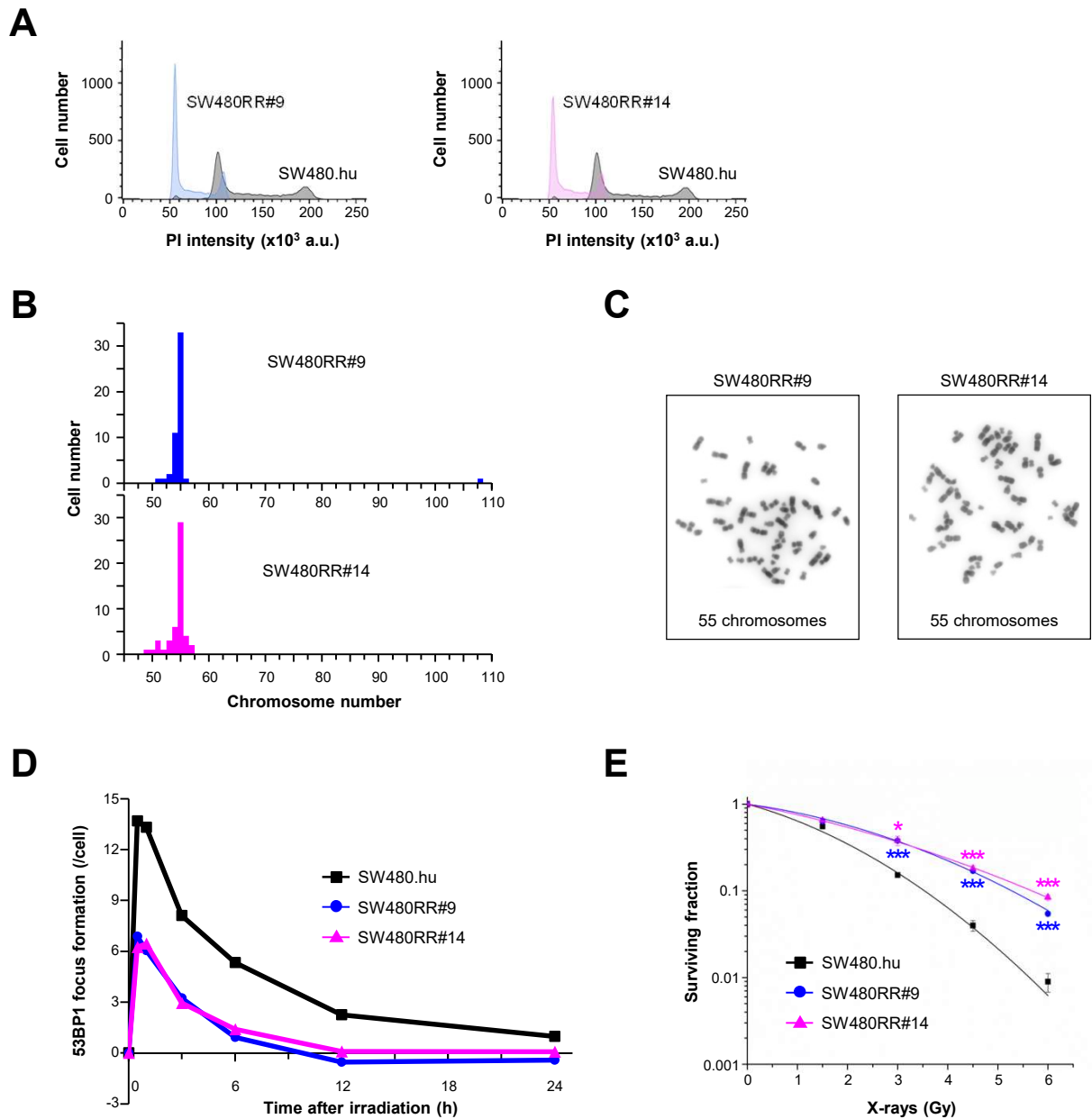


図9. X線分割照射したSW480.hu細胞から得られた他の放射線抵抗性クローンの評価

(A) 放射線抵抗性クローン#9と#14のDNA量を、図3と同様にPI染色した細胞のフローサイトメトリーにより測定した。SW480.hu細胞のヒストグラム (図3A 上段) を各細胞株のヒストグラムに重ねて示している。(B、C) 細胞の染色体数を図3と同様に計数した。ヒストグラムは染色体数の分布を示す (B)。最頻値と一致する染色体数を有する細胞の染色体像を代表として示した (C)。(D) 0.5 GyのX線照射後のDNA二本鎖切断修復を、図6と同様に53BP1タンパク質の免疫蛍光染色を用いて評価した。1回の実験のデータを示す。(E) 放射線感受性はコロニー形成法で評価した。データは、それぞれtriplicateで行った3回の独立した実験の平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。 $*p < 0.05$ および $***p < 0.001$ (SW480.hu細胞と抵抗性クローン細胞の比較)。

量の関係を調べた。限界希釈によりモノクローナルな細胞を得た後、1 か月培養して 8 個のクローン (A1、A3、A4、B1、B3、B4、C1 ならびに C2) を得た。このうち 2 つの細胞株 (A1 と B1) は高い放射線抵抗性を示した (図 10A)。3 Gy の X 線照射後の細胞生存率を、DNA 量を反映するヨウ化プロピジウムの平均蛍光強度に対してプロットすると、放射線感受性が高い 6 つのクローンは DNA 量が多い傾向を示し、親株 SW480.hu 細胞と類似していた (図 10B)。一方、2 つの放射線抵抗性クローンは DNA 量が少ない傾向を示し、放射線抵抗性 SW480RR 細胞 (クローン#13) と同様であった。すなわち、細胞あたりの DNA 量と放射線抵抗性の間には負の相関が観察された (相関係数: -0.975)。したがって、SW480.hu 細胞への放射線分割照射では、DNA 量の少ない細胞が照射以前から有する内在性の放射線抵抗性が原因となって、生き残り、選択されたことが示唆された。

3-8. DNA 量の不均一性が認められない大腸がん細胞株への分割照射実験

DNA 量の異なる複数集団が認められない、すなわち DNA 量不均一性を有さない別の大腸癌細胞株についても、分割照射の影響を検討した。SW480RR 細胞の樹立と同様に、50 Gy の分割照射を受けたヒト大腸癌 HT29 細胞から得られた 2 つのクローンを調べた。クローン #3 と #5 は、それぞれ親株 HT29 細胞の 1.2 倍と 1.1 倍の D_{10} 比で高い放射線抵抗性を示した (図 11A)。分割照射終了後の細胞集団および抵抗性クローン#5 における DNA 量の分布と、親株 HT29 細胞の DNA 量分布との間に、明らかな変化は認められなかった (図 11B)。また、抵抗性クローン #3 では、SW480RR 細胞の場合とは異なり、初期 DNA 損傷の減少が認められなかった (図 11C)。したがって、DNA 量不均一性を有していない HT29 細胞への放射線分割照射では、DNA 量不均一性を有する SW480RR 細胞の場合とは異なり DNA 量分布の変化が認められず、放射線抵抗性 HT29 細胞が出現するメカニズムも異なると考えられる。

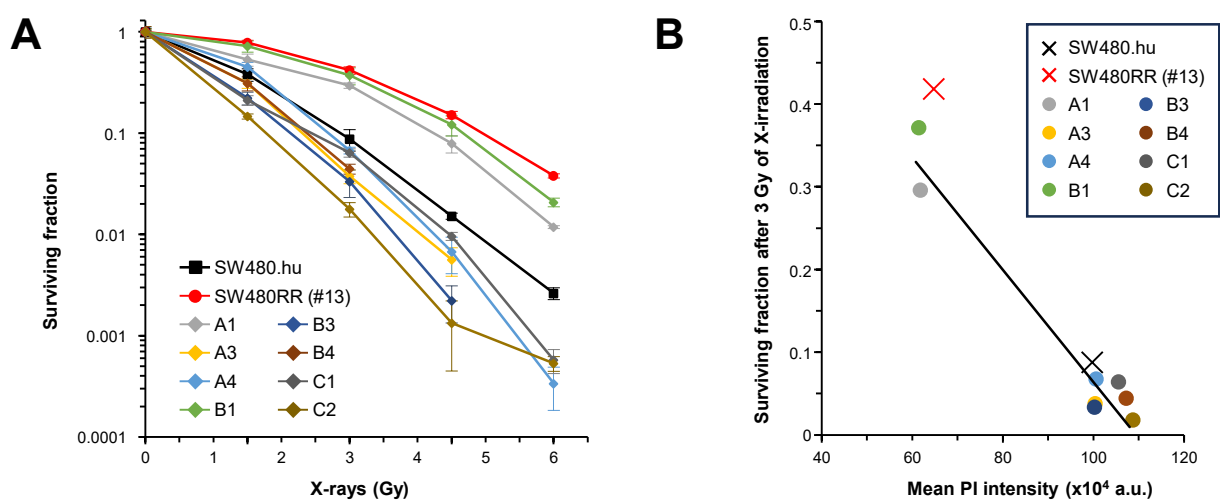


図10. 親株SW480.hu細胞から直接得られた8つのクローンの放射線抵抗性とDNA量の関係

(A) 放射線感受性はコロニー形成法で評価した。細胞は照射後10日間培養した。3つのクローン (A3、B3ならびにB4) が高線量でコロニーを形成しなかったため、結果はLQモデルにあてはめず、折れ線グラフで示した。(B) 放射線抵抗性とDNA量の関係。横軸はフローサイトメトリーにより測定したPIの平均蛍光強度、縦軸はコロニー形成法 (A) における3 Gyでの生存率を示す。親株SW480.hu細胞と放射線抵抗性株SW480RR細胞の点は×字で示している。回帰直線は8クローンのデータポイントのみで求められ、×字で示した2つのデータポイントは含まれていない。データは、1回のコロニー形成法における3サンプルの平均±標準偏差、または1回のフローサイトメトリーにおける10,000細胞の蛍光強度の平均として表した。

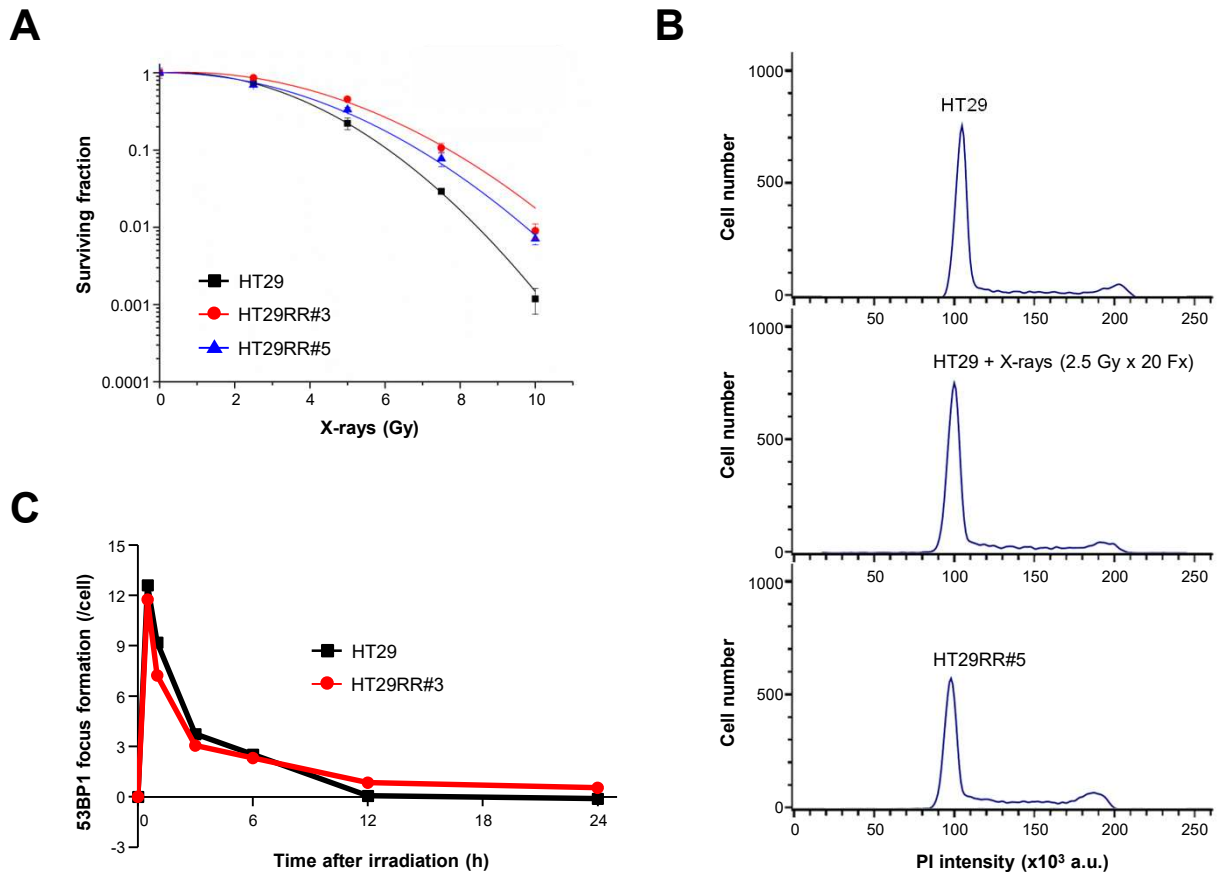


図11. ヒト大腸がん由来HT29細胞におけるX線分割照射の影響

2つのクローン#3および#5は、SW480RR細胞の樹立と同様に、総線量50 GyのX線をHT29細胞に分割照射した後、クローニングによって得た。HT29細胞は10% FBS添加RPMIで培養した。(A) 放射線感受性は、コロニー形成法で評価した。データはそれぞれtriplicateで行った2回の独立した実験の平均±標準偏差で表した。(B) PI 染色した細胞のフローサイトメトリーにより、親株 HT29 細胞 (上段)、X線分割照射終了後の HT29 細胞集団 (中段)、ならびに放射線抵抗性クローン HT29RR#5 (下段) の DNA量分布を調べた。(C) 0.5 GyのX線照射後のDNA二本鎖切断修復を、53BP1タンパク質の免疫蛍光染色を用いて評価した。1回の実験のデータを示す。

4. 考察

フローサイトメトリーによる分析の結果、DNA 量の多い細胞が親株 SW480.hu 細胞では優勢であり、DNA 量が比較的少ない細胞はわずかにのみ存在していた (図 3A)。放射線抵抗性 SW480RR 細胞の DNA 量は、この DNA 量が少ない集団に一致しており、親株 SW480.hu 細胞を構成する 2 つの主な集団のうちの小集団に由来する可能性が高い。SW480RR 細胞は、X 線照射後の初期 DNA 二本鎖切断量が少なく、照射後に残存する DNA 損傷の程度も親株より小さかった (図 6 および図 9D)。SW480RR 細胞において DNA 修復効率の亢進は認められなかったことから、照射後 24 時間まで残存する DNA 損傷が SW480RR 細胞で少ないのは、初期 DNA 二本鎖切断量の違いに起因すると考えられる。DNA 損傷は X 線照射による細胞死の最初のステップであることから³⁷⁾、初期 DNA 損傷が少ないことは SW480RR 細胞の放射線抵抗性に寄与し、その結果、分割照射終了後に SW480RR 細胞を含む放射線抵抗性の細胞集団が出現したのだと考えられる。

初期 DNA 二本鎖切断量すなわち 53BP1 focus 数を、単位 DNA 量あたりや染色体あたりに補正すると、SW480.hu 細胞に対する SW480RR 細胞での初期 DNA 二本鎖切断量の有意な減少は認められなくなった (表 2)。これらの結果は、DNA 量が多い細胞ほど、同じ線量の X 線照射でより多くの DNA 損傷を受ける可能性があることを示唆している。Hau らも同様の観察結果を報告しており、ノコダゾールにより誘導された 4 倍体のヒトがん細胞では、元の 2 倍体よりも初期 DNA 二本鎖切断の数が多かったとしている¹⁸⁾。放射線の“標的”である DNA の量と DNA 損傷との間のこのような関連性は、これまでも議論されてきた。標的へのヒットの確率を考えると、細胞の DNA 量が多ければ、同じ線量の放射線照射でもより多くのヒットを受けることができると予想される。しかし、Schwartz は、ヒト扁平上皮癌細胞株において、DNA 量と X 線照射による染色体異常発生率との間に関係はないと報告している⁴⁰⁾。このように、DNA 量と放射線誘発 DNA 損傷量の関係に関して十分なコンセンサスは得られていない。

さらに、倍数性 (染色体数) と放射線感受性の関連性に関してもコンセンサスは得られていない。マウスの L 細胞では DNA 量が少ない内在性の放射線抵抗性細胞の存在が示唆されているが³⁴⁾、一方で 4 倍体の哺乳類細胞は 2 倍体の細胞よりも放射線抵抗性が高いという報告もある^{2),4)}。本研究では、DNA 量が少ない細胞は初期 DNA 損傷が少なく、放射線抵抗性が高いことが示された。これらの知見を踏まえると、他の放射線抵抗性因子の存在を否定することはできないが、本研究では DNA 量の違いが内在性の放射線抵抗性に寄与する潜在的因子であった可能性がある。

多数の細胞株を比較した研究では、DNA 量と放射線感受性の間に有意な関係は認められなかったか^{30),40)}、染色体数の多い細胞ほど放射線抵抗性が高い傾向が示されている⁴¹⁾。これらの研究と本研究の違いは、前者が異なるがん種や異なる患者由来のがん細胞株を包括的に比較した intertumor heterogeneity の分析であるのに対し、本研究では由来を一としある程度の背景を共有するであろう、intratumor heterogeneity としての染色体数不均一性を有するがん細胞集団に着目した点である。本研究は、ヒトがん細胞集団への X 線分割照射後に放射線抵抗性細胞が出現する過程の実例であり、単一起源の腫瘍内に DNA 量不均一性が存在する場合、DNA 量が少ないことが放射線治療に対する細胞の生存に有利である可能性を示した。

いくつかの先行研究でも、培養細胞への放射線照射後に集団の染色体数分布が減少方向に変化し、同時に放射線感受性が変化したことが報告されている。Rhynas と Newcombe はマウス線維芽細胞 (L 細胞) において、放射線抵抗性の細胞がもともと存在し、その内在性の放射線抵抗性細胞が選択された可能性が高いという、本研究と類似した報告をしている³⁴⁾。しかし、内在性の放射線抵抗性細胞が選択されたためとは考えられない染色体数の減少例や²⁵⁾、電離放射線の変異原性に起因するとみられる染色体数の減少例も報告されている²⁰⁾。したがって、分割照射後の細胞集団の染色体数の減少と放射線抵抗性の増強は、必ずしも本研究の観察結果と同じメカニズムから生じるとは限らず、照射中に染色体の喪失と放射線抵抗性の獲得が同時に起こる場合もあり得ると考えられる。さらに、分割照射後に放射線抵抗性の増強が認められた報告における染色体数の変化は必ずしも減少方向ではなかったことから³⁵⁾、DNA 量の違いだけで細胞の放射線感受性が決定されるとは考えにくく、さらなる要因が複合的に放射線感受性に寄与していると考えられる⁴⁵⁾。

SW480 細胞の染色体数に関しては、樹立した Leibovitz らが、染色体数の最頻値は 55 本であり、この細胞株には少数の 4 倍体細胞が含まれると報告していた²⁷⁾。さらに Tomita らは、58 本の染色体をもつ細胞に加え、94-99 本の染色体を持つ細胞の存在を報告している⁴⁷⁾。本研究でも、起ち上げ直後の SW480 細胞は hyper-diploid 細胞が優勢で、少数の hyper-tetraploid が認められた (図 1A)。SW480 細胞を DMEM で培養した結果、これらの細胞集団の割合は逆転し、DNA 量の多い細胞が優勢な集団となった (図 1B)。DMEM での培養を経て得られた SW480.hu 細胞の染色体数の最頻値は 96 本と 97 本であり、樹立した放射線抵抗性 SW480RR クローンの最頻値は 53 本または 55 本であった (図 3C および D、図 9B および C)。これまでの報告と照らし合わせて考えると、SW480.hu 細胞における染色体数が多い優勢な細胞集団は、SW480 細胞の中にわずかに存在していた細胞に由来し、SW480RR クロー

ンは SW480 細胞における染色体数が少ない優勢な細胞集団に由来していると考えて矛盾はない。言い換えれば、染色体の分配異常によって集団内の染色体数の分布が変動したとは考えにくい。

Van den Berg らは SW480 細胞において、分割照射により誘導される一過性の放射線抵抗性の発現を報告した³⁾。その後、分割照射終了から 6 週間が経過した時点でのバルク細胞集団と非照射の親株は、放射線照射後の生存率が同程度になっていたとしている。一方、本研究では、分割照射終了後の限界希釈法の播種から凍結保存まで約 7 週間のクローニング期間が必要であった。コロニー形成法の際、SW480RR 細胞は解凍から約 8 週間が経過した時点においても高い放射線抵抗性を示した (図 2A)。したがって、本研究のクローニング期間中に一過性の放射線抵抗性が生じたかどうかは不明であるものの、観察された SW480RR 細胞の高い放射線抵抗性は Van den Berg らの場合と異なり、可逆的ものではないと考えられた。

SW480.hu 細胞への分割照射では DNA 量の少ない放射線抵抗性細胞集団の選択が起こったが、DNA 量不均一性がない HT29 細胞では、分割照射後の放射線抵抗性細胞の DNA 量や初期 DNA 損傷量に親株との明らかな差異は認められなかった (図 11)。このことは、SW480.hu 細胞で起こった細胞集団の選択という事象が、親株の DNA 量不均一性に依存していることを支持している。また、分割照射後に HT29 細胞から放射線抵抗性細胞が得られたという事実は、他のがん細胞株でも報告されているような、DNA 量不均一性と関係のない他の放射線抵抗性機構の寄与を示唆する^{13),26),28),29),45),48)}。

本研究の SW480RR 細胞においても、DNA 量や DNA 損傷量以外に放射線抵抗性因子が寄与している可能性を調べた。細胞周期、細胞死、DNA 修復能、酸化還元レベル、エネルギー代謝の変化は、分割照射によって得られた放射線抵抗性細胞を用いて既に報告されているが^{26),28),29),48)}、SW480RR 細胞ではエネルギー代謝の変化を除いて明らかな変化は観察されなかった。細胞周期の分布は変化の程度が小さく、SW480RR 細胞の高い放射線抵抗性の原因とは考えにくかった (図 4)。細胞死のうち、ネクロシスを起こす細胞の割合は SW480.hu 細胞と SW480RR 細胞で極めて大きく違っていたが (図 5C)、アポトーシスや細胞老化などのプログラム細胞死における差異はこれに比べて小さかった (図 5B、D、E)。したがって、アポトーシスと細胞老化の制御は、SW480RR 細胞の放射線抵抗性の主要な原因ではないと考えられる。Lynam-Lennon らの放射線抵抗性細胞におけるエネルギー産生の亢進に関する報告^{28),29)}とは対照的に、本研究の SW480RR 細胞では ATP 量とエネルギー代謝活性が親株よりも低下していた (図 8)。放射線照射により、SW480.hu 細胞と SW480RR 細胞の両細胞

胞株で解糖系とミトコンドリア電子伝達系の代謝活性が亢進したが、その程度は親株のほうが大きかった。X 線照射により細胞内 ATP 量は両細胞株で増加したが、X 線照射後の細胞内 ATP 量の増加の程度は、細胞株に依存しなかった。

SW480RR 細胞の特徴である低いエネルギー代謝活性が放射線抵抗性因子としての意義を有するかどうかについては、本研究では結論づけられなかった。このようなエネルギー代謝の違いは、むしろ SW480 細胞における DNA 量の異なる細胞集団の特徴であったともいえる。特に、SW480RR 細胞の glucose 取り込みの低さ (図 8B) は、培地中の glucose の有無が細胞集団の優勢さに影響するという結果と一致していた (図 1B)。SW480 細胞における細胞集団の割合は、glucose を含まない培地では変化しなかったが、glucose が存在する培地では細胞の優勢さが逆転し、DNA 量の多い細胞が大部分を占めるようになった。したがって、glucose が豊富な環境では、SW480.hu 細胞で優勢だった細胞のように、エネルギー代謝活性が高く、DNA 量の多い細胞の生育が促進されたと考えられる。また、SW480RR 細胞は実験期間中、glucose を含む DMEM で培養されたが、染色体数が SW480RR 細胞のちょうど 2 倍の倍数体細胞が少数存在した以外に、DNA 量の多い細胞が優勢になるような事象は検出されなかった。したがって、培養時の glucose 環境が細胞分裂時の染色体分配の完全性に影響を及ぼすことによって DNA 量の多い細胞が出現し大部分を占めるようになったとは考えにくい。

5. 結論

本研究では、ヒト大腸がん SW480RR 細胞の放射線抵抗性機構を解析することで、DNA 量不均一性を有するがん細胞集団に X 線を分割照射した後に認められた放射線抵抗性細胞の出現機構を検討した。その結果、放射線抵抗性 SW480RR 細胞は、親株の大部分を占める細胞集団よりも染色体数と DNA 量が少なくかつ高い放射線抵抗性を有する細胞集団に由来し、その内在性に高い放射線抵抗性を背景として分割照射の過程で生き残り、親株 SW480.hu 細胞から選択された細胞株であることが明らかになった。

SW480 細胞は DNA 量の観点から見ると主に 2 つの細胞集団で構成されているが、この細胞集団それぞれが占める割合は培養条件によって大きく変動した。本研究では glucose の有無が重要な因子であることが明らかになった。さらに、これら 2 つの細胞集団は放射線感受性が異なっており、放射線分割照射によっても細胞集団の構成比率が変動した。このように優勢ながん細胞集団が切り替わるような現象は、不均一性を有するがん細胞株全般において起こり得ると考えられ、生体内でも起こる可能性がある。例えば、腫瘍微小環境の影響によってがん細胞集団の構成が変化し、その結果、放射線治療を含む治療に対する感受性が二次的に変化することが考えられる。DNA 量不均一性を有するがん細胞集団において細胞集団の構成が治療に関連した刺激や環境の変化によって変動するという本研究で得られた知見は、がん治療への抵抗性と腫瘍を構成するがん細胞集団の可塑性が関連することを支持する。

本研究における課題として、今回得られた新知見の普遍性は追って確認する必要がある。ヒト大腸癌由来の SW480.hu 細胞においては、DNA 量の少ない内在性の抵抗性細胞が放射線治療後も生存し、優勢な集団となることを証明したが、この現象の普遍性は十分に明らかにはできていない。今後、SW480 細胞以外の大腸癌細胞や他の癌種の細胞、さらには *in vivo* 腫瘍でも DNA 量不均一性を背景とした同様の現象が起こるかどうかを慎重に検討する必要がある。次に、細胞の DNA 量と放射線感受性についてのコンセンサスは得られないままである。本研究では、放射線の主要な標的である DNA 量の intratumor heterogeneity を背景とした DNA 損傷量の違いが放射線抵抗性に寄与したと結論付けた。しかし、複数の患者や癌種に由来する細胞を使用した intertumor heterogeneity の視点での比較では、DNA 量と放射線感受性との関係についてコンセンサスが得られていない。それゆえ、1 人の患者由来の細胞の解析を重ね、intratumor heterogeneity の視点から DNA 量と放射線感受性の関係を確認できるかどうか検討していくことが、今後の重要な課題である。

さらに、本研究では 2.5 Gy/回で 20 回の分割照射を実施したが、線量、分割回数、線量率、放射線の線質が異なれば、結果も異なる可能性がある。また、DNA 損傷修復の解析には 53BP1 を用いたが、53BP1 は非相同末端結合修復に関与するタンパク質である^{1),32),33),39)}。したがって、今回の研究では相同組換え修復の関与について十分に検証できていない。加えて、照射後の細胞周期の停止、DNA 修復の正確性、化学修復の放射線応答、検討していない代謝経路の関与、遺伝子やタンパク質レベルの発現の変化など、他の放射線抵抗性因子の寄与については明らかにできておらず、これらは潜在的な寄与因子としての可能性を完全に除外することはできない。

結論として、本研究はヒト大腸癌由来 SW480 細胞株を用い、放射線分割照射後の放射線抵抗性細胞の出現と intratumor heterogeneity としての DNA ploidy heterogeneity との関連を実例で示すものである。細胞の DNA 量の差は内在性の放射線感受性の差異に寄与し、その結果、放射線分割照射の過程で放射線抵抗性の細胞集団が選択されることになる。DNA 量の不均一性は腫瘍の複数部位からサンプリングを行わないと過小評価されてしまうことが指摘されており^{9),11),15)}、本研究の知見は DNA 量不均一性の評価の適切さの重要性を示唆している。本研究の知見は、がん患者の放射線治療への感受性や抵抗性について直接説明するものではないが、治療抵抗性に関連する intratumor heterogeneity としての DNA 量不均一性について潜在的重要性を強調する。

<謝辞>

本稿を終えるにあたり、ご指導賜りました北海道大学大学院獣医学研究院応用獣医科学分野放射線学教室の稲波修教授および安井博宣准教授に深く感謝いたします。また、本論文をご校閲いただきました本研究院基礎獣医科学分野生化学教室の岡松優子教授および本研究院臨床獣医科学分野比較病理学教室の青島圭佑講師に厚く御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり、ご助言、ご協力くださいました山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所動物実験センターの房知輝助教、酪農学園大学獣医学群獣医学類の出口辰弥助教ならびに教室各位に謹んで御礼申し上げます。

<引用文献>

- 1) Anderson L, Henderson C, Adachi Y. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol* 21, 1719–29, 2001.
- 2) Bedford JS, Hall EJ. Chromosome Constitution and Gamma-Ray Sensitivity: A Possible Correlation in Hamster Cells Cultured in Vitro. *Radiat Res* 31, 679–692, 1967.
- 3) Berg J van den, Castricum KCM, Meel MH, Goedegebuure RSA, Lagerwaard FJ, Slotman BJ, Hulleman E, Thijssen VLJL. Development of transient radioresistance during fractionated irradiation in vitro. *Radiother Oncol* 148, 107–114, 2020.
- 4) Berry RJ. Quantitative studies of relationships between tumor cell ploidy and dose response to ionizing radiation in vivo: modification of radiation response in a previously irradiated tumor. *Radiat Res* 18, 236–245, 1963.
- 5) Bump EA, Brown JM. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharmacol Ther* 47, 117–136, 1990.
- 6) Cedervall B, Wong R, Albright N, Dynlacht J, Lambin P, Dewey WC. Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Radiat Res* 143, 8–16, 1995.
- 7) Chan DKH, Buczacki SJA. Tumour heterogeneity and evolutionary dynamics in colorectal cancer. *Oncogenesis* 10, 2021.
- 8) Chelakkot C, Chelakkot VS, Shin Y, Song K. Modulating Glycolysis to Improve Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 24, 2023.
- 9) Coons SW, Johnson PC. Regional heterogeneity in the DNA content of human gliomas. *Cancer* 72, 3052–3060, 1993.
- 10) Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol* 31, 363–372, 2010.
- 11) Flyger HL, Larsen JK, Nielsen HJ, Christensen IJ. DNA ploidy in colorectal cancer, heterogeneity within and between tumors and relation to survival. *Cytometry* 38, 293–300, 1999.
- 12) Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L, Cedermark B, Glimelius B, Gunnarsson U. Swedish rectal cancer trial: Long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. *J Clin Oncol* 23, 5644–5650, 2005.

- 13) Fukuda K, Sakakura C, Miyagawa K, Kuriu Y, Kin S, Nakase Y, Hagiwara A, Mitsufuji S, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. Differential gene expression profiles of radio resistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Brit J Cancer* 91, 1543–1550, 2004.
- 14) Funnell T, O’Flanagan CH, Williams MJ, McPherson A, McKinney S, Kabeer F, Lee H, Salehi S, Vázquez-García I, Shi H, Leventhal E, Masud T, Eirew P, Yap D, Zhang AW, Lim JLP, Wang B, Brimhall J, Biele J, Ting J, Au V, Vliet M Van, Liu YF, Beatty S, Lai D, Pham J, Grewal D, Abrams D, Havasov E, Leung S, Bojilova V, Moore RA, Rusk N, Uhlitz F, Ceglia N, Weiner AC, Zaikova E, Douglas JM, Zamarin D, Weigelt B, Kim SH, Cruz Paula A Da, Reis-Filho JS, Martin SD, Li Y, Xu H, Algara TR de, Lee SR, Llanos VC, Huntsman DG, McAlpine JN, Hannon GJ, Battistoni G, Bressan D, Cannell IG, Casbolt H, Jauset C, Kovačević T, Mulvey CM, Nugent F, Ribes MP, Pearson I, Qosaj F, Sawicka K, Wild SA, Williams E, Laks E, Smith A, Lai D, Roth A, Balasubramanian S, Lee M, Bodenmiller B, Burger M, Kuett L, Tietscher S, Windhager J, Boyden ES, Alon S, Cui Y, Emenari A, Goodwin DR, Karagiannis ED, Sinha A, Wassie AT, Caldas C, Bruna A, Callari M, Greenwood W, Lerda G, Eyal-Lubling Y, Rueda OM, Shea A, Harris O, Becker R, Grimaldo F, Harris S, Vogl SL, Joyce JA, Watson SS, Tavare S, Dinh KN, Fisher E, Kunes R, Walton NA, Sa’d M Al, Chornay N, Dariush A, González-Solares EA, González-Fernández C, Yoldaş AK, Miller N, Zhuang X, Fan J, Lee H, Sepúlveda LA, Xia C, Zheng P, Shah SP, Aparicio S. Single-cell genomic variation induced by mutational processes in cancer. *Nature* 612, 106–115, 2022.
- 15) Furuya T, Uchiyama T, Murakami T, Adachi A, Kawauchi S, Oga A, Hirano T, Sasaki K. Relationship between chromosomal instability and intratumoral regional DNA ploidy heterogeneity in primary gastric cancers. *Clin Cancer Res* 6, 2815–2820, 2000.
- 16) Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 366, 883–892, 2012.
- 17) Gijn W Van, Marijnen CAM, Nagtegaal ID, Kranenbarg EMK, Putter H, Wiggers T, Rutten HJT, Pählman L, Glimelius B, Velde CJH Van de. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* 12, 575–582, 2011.

- 18) Hau PM, Siu WY, Wong N, Lai PBS, Poon RYC. Polyploidization increases the sensitivity to DNA-damaging agents in mammalian cells. *FEBS Lett* 580, 4727–4736, 2006.
- 19) Henness S, Davey MW, Harvie RM, Davey RA. Fractionated irradiation of H69 small-cell lung cancer cells causes stable radiation and drug resistance with increased MRP1, MRP2, and topoisomerase IIalpha expression. *Int J Radiat Oncol* 54, 895–902, 2002.
- 20) Horikawa M, Doida Y, Sugahara T. Cytogenetic studies on radioresistant cells derived from mouse strain L cells in cell culture. *Radiat Res* 22, 478–488, 1964.
- 21) Junttila MR, Sauvage FJ De. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346–354, 2013.
- 22) Kaneta K. Studies on radioresistance II. Chromosome condition and radiosensitivity of a subline of the Yoshida sarcoma induced by pre-irradiations. *Cytologia (Tokyo)* 25, 112–118, 1960.
- 23) Khoshinani HM, Afshar S, Pashaki AS, Mahdavinezhad A, Nikzad S, Najafi R, Amini R, Gholami MH, khoshghadam A, Saidijam M. Involvement of miR-155/FOXO3a and miR-222/PTEN in acquired radioresistance of colorectal cancer cell line. *Jpn J Radiol* 35, 664–672, 2017.
- 24) Kim J, DeBerardinis RJ. Mechanisms and Implications of Metabolic Heterogeneity in Cancer. *Cell Metab* 30, 434–446, 2019.
- 25) Koiwai S, Muta N. Studies on radioresistance with HeLa cells: radiosensitivity and chromosome constitution. *Radiat Res* 59, 717–723, 1974.
- 26) Lee YS, Oh JH, Yoon S, Kwon MS, Song CW, Kim KH, Cho MJ, Mollah ML, Je YJ, Kim YD, Kim CD, Lee JH. Differential gene expression profiles of radioresistant non-small-cell lung cancer cell lines established by fractionated irradiation: tumor protein p53-inducible protein 3 confers sensitivity to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol* 77, 858–866, 2010.
- 27) Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562–4569, 1976.
- 28) Lynam-Lennon N, Maher SG, Maguire A, Phelan J, Muldoon C, Reynolds J V., O’Sullivan J. Altered mitochondrial function and energy metabolism is associated with a radioresistant phenotype in oesophageal adenocarcinoma. *PLoS One* 9, 2014.

- 29) Lynam-Lennon N, Reynolds J V., Pidgeon GP, Lysaght J, Marignol L, Maher SG. Alterations in DNA repair efficiency are involved in the radioresistance of esophageal adenocarcinoma. *Radiat Res* 174, 703–711, 2010.
- 30) Maeda J, Froning CE, Brents CA, Rose BJ, Thamm DH, Kato TA. Intrinsic radiosensitivity and cellular characterization of 27 canine cancer cell lines. *PLoS One* 11, 2016.
- 31) Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *BBA-Rev Cancer* 1805, 105–117, 2010.
- 32) Mochan TA, Venere M, DiTullio RA, Halazonetis TD. 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair* 3, 945–952, 2004.
- 33) Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 7–18, 2014.
- 34) Rhynas POW, Newcombe HB. A heritable change in radiation resistance of strain L mouse cells. *Exp Cell Res* 21, 326–331, 1960.
- 35) Richards BM, Atkin NB. DNA content of human tumours: change in uterine tumours during radiotherapy and their response to treatment. *Brit J Cancer* 13, 788–800, 1959.
- 36) Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, Young MD, Alexandrov LB, Behjati S, Mitchell TJ, Grossmann S, Lightfoot H, Egan DA, Pronk A, Smakman N, Gorp J Van, Anderson E, Gamble SJ, Alder C, Wetering M Van De, Campbell PJ, Stratton MR, Clevers H. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature* 556, 437–462, 2018.
- 37) Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 16, 20–33, 2016.
- 38) Rybinski B, Yun K. Addressing intra-tumoral heterogeneity and therapy resistance. *Oncotarget* 7, 72322–72342, 2016.
- 39) Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151, 1381–1390, 2000.
- 40) Schwartz JL. The radiosensitivity of the chromosomes of the cells of human squamous cell carcinoma cell lines. *Radiat Res* 129, 96–101, 1992.
- 41) Schwartz JL, Murnane J, Weichselbaum RR. The contribution of DNA ploidy to radiation sensitivity in human tumour cell lines. *Brit J Cancer* 79, 744–747, 1999.

- 42) Shimura T, Noma N, Sano Y, Ochiai Y, Oikawa T, Fukumoto M, Kunugita N. AKT-mediated enhanced aerobic glycolysis causes acquired radioresistance by human tumor cells. *Radiother Oncol* 112, 302–307, 2014.
- 43) Sinclair WK, Morton RA. X-Ray Sensitivity during the Cell Generation Cycle of Cultured Chinese Hamster Cells. *Radiat Res* 29, 450–474, 1966.
- 44) Sinclair WK. Cyclic X-Ray Responses in Mammalian Cells in Vitro. *Radiat Res* 33, 620–643, 1968.
- 45) 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. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J Exp Clin Canc Res* 37, 2018.
- 46) Terasima T, Tolmach LJ. Changes in X-ray Sensitivity of HeLa Cells during the Division Cycle. *Nature* 190, 1210–1211, 1961.
- 47) Tomita N, Jiang W, Hibshoosh H, Warburton D, Kahn SM, Weinstein IB. Isolation and characterization of a highly malignant variant of the SW480 human colon cancer cell line. *Cancer Res* 52, 6840–6847, 1992.
- 48) Wei Q-C, Shen L, Zheng S, Zhu Y-L. Isolation and characterization of radiation-resistant lung cancer D6-R cell line. *Biomed Environ Sci* 21, 339–344, 2008.
- 49) Weichselbaum RR, Beckett MA, Schwartz JL, Dritschilo A. Radioresistant tumor cells are present in head and neck carcinomas that recur after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol* 15, 575–579, 1988.
- 50) Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Bio Med* 53, 260–270, 2012.
- 51) Yamamoto K, Ikenaka Y, Ichise T, Bo T, Ishizuka M, Yasui H, Hiraoka W, Yamamori T, Inanami O. Evaluation of mitochondrial redox status and energy metabolism of X-irradiated HeLa cells by LC/UV, LC/MS/MS and ESR. *Free Radical Res* 52, 648–660, 2018.

Study on the Role of DNA Ploidy Heterogeneity in Cancer Cell Populations in the Emergence of Radioresistant Cells after Radiotherapy

Koya Yamashita

*Laboratory of Radiation Biology,
Department of Applied Veterinary Sciences,
Graduate School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan*

Intratumor heterogeneity is a potential cause of treatment resistance. The existence of radioresistant cancer cells are risk factors for recurrence and they are occasionally detected in recurrent tumors after radiotherapy. Heterogeneity in DNA content has also been reported in human cancer; however, little is known about the role of intratumor DNA ploidy heterogeneity in the emergence of radioresistant cells after radiotherapy. In the present study, human colorectal cancer-derived SW480 cells, which are composed of two cell populations with different chromosome numbers, were used as a model for cancer cell populations with ploidy heterogeneity. The influence of culture environment on DNA ploidy heterogeneity and the mechanism on emergence of radioresistant cells after fractionated radiotherapy to the cell population with DNA ploidy heterogeneity were examined.

Predominant cell population in SW480 cells was reversed in the culture environment with high-glucose concentration, resulting in SW480.hu cells to be obtained. Radioresistant clone SW480RR cells were established after fractionated X-irradiation of SW480.hu cells. Compared with the parental SW480.hu cell population, which mostly comprised cells with higher ploidy, the radioresistant clones showed lower ploidy and less initial DNA damage. The lower ploidy cells in the parental cell population were identified as having radioresistance prior to fractionated irradiation; thus, SW480RR cells were considered intrinsically radioresistant cells which have survived fractionated X-irradiation. The most likely mechanism is the selection of an intrinsically radioresistant population, with a background in which lower ploidy cells exhibit lower initial DNA damage.

This study highlighted the potential importance of intratumor DNA ploidy heterogeneity in radioresistance by providing a practical example indicating the link between the emergence of radioresistant cells after fractionated irradiation and intratumor DNA ploidy heterogeneity.