

## 2025 年度臨床研究推進研究費報告書

提出年月日: 2026 年 4 月 24 日

代表者	氏名	房知輝	所属	放射線学教室
	内線	5236	e-mail	tomoki.bo@vetmed.hokudai.ac.jp
研究課題	放射線抵抗性イヌがん細胞の樹立と放射線抵抗性基盤の解明			
研究チーム参加者	氏名	所属		役割
	房 知輝	放射線学教室		実験全般、データ解析
	大脇 稜	外科学教室		腫瘍細胞提供、抵抗性因子の解析分担
研究期間	2025 年 6 月 ~ 2026 年 3 月			
研究目的と成果の概要 (400 字以内)	放射線治療の抵抗性は、腫瘍細胞が放射線抵抗性を獲得、または元来保有していることが要因と考えられるが、その予測や克服は困難である。本研究では、イヌ由来がん細胞に対して分割照射を行い、生存細胞から放射線抵抗性株を樹立し、抵抗性メカニズムを解明することを目的とした。その結果、樹立した細胞株は親株と比較して放射線感受性の低下を示した。抵抗性メカニズムの解析として、照射前後の ATP 量を測定したところ、抵抗性株では X 線照射後の ATP 減少が有意に抑制されていた。一方で、抵抗性に関わる細胞死様式の特定を試みたところ、放射線照射後のアポトーシスおよびフェロトーシスの誘導には親株と明確な差は認められなかった。以上の結果から、分割照射により放射線抵抗性株の樹立ができた。また、その抵抗性には、アポトーシスやフェロトーシスといった細胞死機構は寄与しておらず、ATP 産生能の維持あるいは亢進が寄与する可能性が示唆された。			

研究方法、結果、考察、成果の公表（上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい）

### 【方法】

#### 1. イヌ腫瘍細胞株を用いた分割照射による抵抗性株の作出

イヌ骨肉腫 (HMPOS) 細胞株に対して 2.5 Gy の X 線照射を 3 日に一回の頻度で行い、20 回繰り返した。長期培養下で生存した細胞株 (RR 株) を用いて、コロニー形成法により細胞生残率を評価した。細胞を直径 60 mm 培養ディッシュに播種し、6 時間後に細胞接着を確認後に X 線を照射した。10 日後に培地を除去し、メタノールで 10 分間静置し、固定した。培養ディッシュは風乾後に 2% ギムザ染色液 (0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.4) により染色した。コロニーのうち 50 個の細胞数以上から構成されるものを生存した細胞集団とみなしてカウントした。得られたコロニー数から、各線量における放射線照射後の細胞生存率を算出した。

#### 2. 放射線照射後の ATP 量の評価

HMPOS-WT, RR 株を用いて、5 Gy の X 線照射を行い、24 時間後の ATP 量について ATP-luciferase 法を用いて測定した。トリプシン処理により浮遊させた細胞を 15 mL チューブに回収し、遠心した。その後のサンプリングは氷上で行った。上清をアスピレートし、得られたペレットを 1 mL の無血清 RPMI 培地で懸濁した。細胞数を計測し、懸濁液が  $3.5 \times 10^5$  個/mL の濃度になるよう調整した。96 穴プレートに細胞懸濁液を 100  $\mu$ L 加えた後に、ATP 測定試薬を 100  $\mu$ L 加えた。ホタル・ルシフェラーゼ発光は Victor NivoTM マルチモードプレートリーダー (Perkin Elmer Life Science, Boston, MA, USA)

を用いて測定し、既知の ATP 濃度を測定することで得られた標準直線を用いて、細胞内 ATP 量を算出した。

### 3. Annexin V, PI 染色による放射線照射前後のアポトーシス細胞の評価

直径 60 mm 培養ディッシュに細胞を播種後し、16 時間後に 5 Gy または 10 Gy の X 線照射を行った。X 線照射を行った 0、8、16、24 時間後に、50 mL 遠心チューブに培養上清、細胞を回収し遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁して細胞数を調整し、再度遠心を行った。その後氷冷下にて Binding Buffer, Annexin V-FITC (MBL) ならびに Propidium Iodide を混合した染色液で 15 分間染色した。染色後の細胞はフローサイトメーター-CytoFLEX (BECKMAN COULTER, Brea, CA, USA) を用いて測定し、Annexin (+)、PI (-) を早期アポトーシス細胞、Annexin (+)、PI (+) を後期アポトーシス細胞として計測した。

#### 【結果と考察】

2.5 Gy×20 回の分割照射後に生存した細胞(HMPOS-RR)の放射線抵抗性を評価するため、コロニー形成法により放射線感受性を親株(HMPOS-WT)と比較した。その結果、いずれの線量においても放射線照射後の生存率が WT 群と比較して有意に増加することが明らかとなった (図 1)。このことから、放射線抵抗性株が作出できていることが明らかとなった。

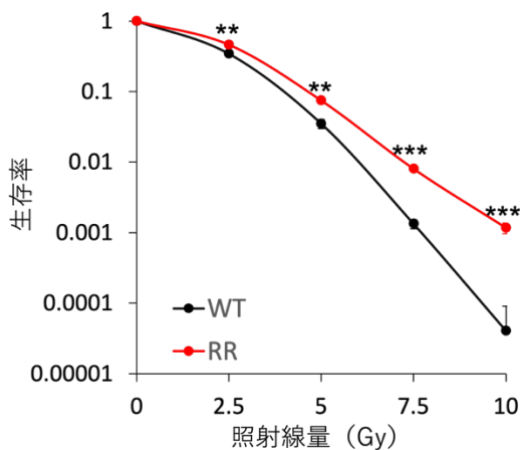


図 1. コロニー形成法による放射線感受性の評価

HMPOS-WT または HMPOS-RR 細胞株に対し、線量を変えて放射線照射を行い (0, 2.5, 5, 7.5, 10 Gy)、10 日間培養した。培養後の細胞をメタノールにより固定、ギムザ染色により可視化した。50 細胞以上の集団をコロニー陽性としてカウントし、細胞生存率を算出した。

次に、RR 群で観察された放射線抵抗性のメカニズムを解明するために、放射線照射前後の細胞内 ATP 量を測定した。その結果、両細胞群ともに X 線照射により細胞内 ATP 量が低下した。しかしながら、X 線照射による ATP 低下率を算出すると、WT 群では 54.5% に対して RR 群では 33.4% と有意に減少していた。以上の結果から、RR 群で観察された放射線抵抗性に ATP 産生能の亢進が寄与する可能性が示唆された。

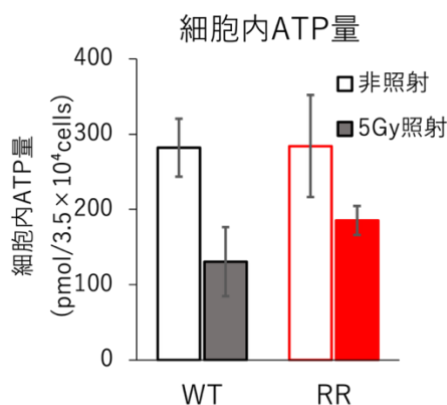
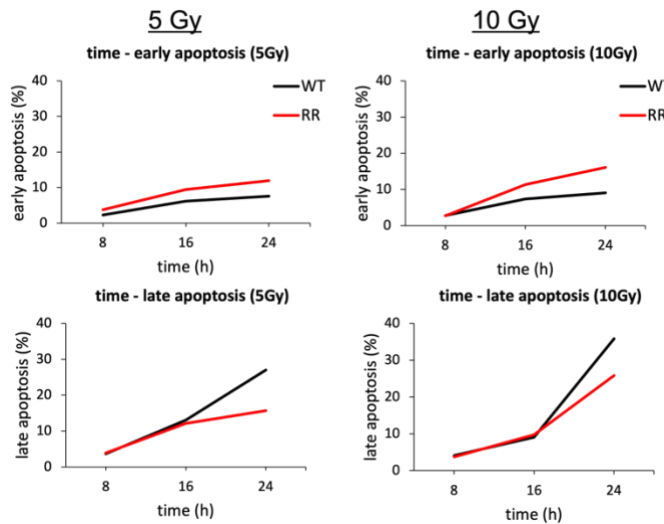


図 2. 放射線照射前後の細胞内 ATP 量の評価

HMPOS-WT または HMPOS-RR 細胞株に対し、5 Gy の放射線照射を行い、24 時間培養した。培養後の細胞をトリプシン処理により回収し、ATP luciferase 法により細胞あたりの ATP 量を測定した。

最後に、放射線照射前後のアポトーシス細胞の割合を Annexin V, PI 染色を用いて測定した。図 3 に示すように、X 線照射後に早期アポトーシスは経時的に増加していたものの、その割合は 10%以下であった。また、WT 群と比較して RR 群で大きな変化は見受けられなかった。一方で、ネクローシス等も含む後期アポトーシスは WT 群で照射 24 時間後では 30%程度観察されたのに対し、RR 群では 10%程度に留まった。以上の結果から、RR 群の放射線抵抗性にはアポトーシスは関与しておらず、他の細胞死様式が寄与している可能性が考えられた。

以上の結果をまとめると、分割照射により放射線抵抗性株の樹立ができた。また、その抵抗性には、アポトーシスやフェロトーシスといった細胞死機構は寄与しておらず、ATP 産生能の維持あるいは亢進が寄与する可能性が示唆された。計画していた解析の一部が完了していないものの、放射線抵抗性獲得の解明に向けて基礎的なデータの獲得ができた。今後も引き続き、抵抗性メカニズム解明に向けて検討を実施していく予定である。



**図 3. Annexin V, PI 染色による放射線照射後のアポトーシスの評価**

HMPOS-WT または HMPOS-RR 細胞株に対し、5 Gy または 10 Gy の放射線照射を行い、16 時間または 24 時間培養した。培養後の細胞を回収し、Annexin V および PI により染色し、フローサイトメトリーにより解析した。Annexin (+)、PI (-) を早期アポトーシス細胞、Annexin (+)、PI (+) を後期アポトーシス細胞として割合を算出した。

**【成果の公表（代表的なもの）】**

- ・ 論文発表
- なし
- ・ 学会発表
- なし