

Intermittent low dose irradiation enhances the effectiveness of radio- and chemo-therapy

for human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29

ヒト腺直腸がん細胞株HT-29での低線量放射線分割照射は放射線治療及び化学療法の効果有効性を高める

Wang Y¹, Yezhou Li Y², Yang L¹ and Yin D²

¹ Department of Gastroenterology, FAW General Hospital, Changchun, Jilin 130011;

² Department of Vascular Surgery, China-Japan Union Hospital of Jilin University,

Changchun, Jilin 130033, P.R. China

ONCOLOGY REPORTS 38: 591-597, 2017.

翻訳者 東京理科大学名誉教授 小島周二

要旨

低線量放射線（LDI_R）照射は生物および哺乳動物細胞株において、ホルミシスや適応応答を誘導する。特に、LDI_Rはがんにおいては正常細胞とは異なる生物学的効果を示す。例えば、LDI_Rは正常細胞には存在しない特定の細胞情報伝達経路の活性化を介して、がんの増殖を抑制する可能性がある。従って、LDI_R照射療法は臨床でのがん治療の有望な補助方法として考えられる。本研究では、実験モデルとしてヒト大腸腺がんHT-29細胞を選択し、放射線療法及び5-フルオロウラシル（5-FU）ベースの化学療法でのLDI_R（250mGy）の単回照射とLDI_R分割前照射間の生物学的作用の違いを検討した。細胞増殖の測定により、250mGyのLDI_R分割前照射により放射線療法及び化学療法での殺細胞効果は、何れの場合も有意に増加した。Western blottingによりLDI_R分割前照射は放射線療法でのATM/p53（血管拡張性運動失調症変異、ATM）経路活性化が示された。一方、5-FU化学療法ではERK及びp38MAPK経路が活性化された。各情報伝達経路に対する化学阻害剤を用いて、ATM/p53又はp38MAPK経路をブロックすると、LDI_R分割前照射により誘導された細胞増殖阻害は解除された。しかしながら、ERK経路のブロックは化学療法における細胞増殖抑制の解除に作用しなかった。

以上総括すると、LDI_R分割前照射と高線量（HDI_R）放射線療法及び5-FU化学療法との併用は、これらの療法で抵抗性を示すがん種での治療効果を高める有力な方法として高く評価される。

序論

大腸がん（CRC）は、中国で3番目に多いがんであり、先進国でのがん関連死の主要の一因となっている（1-3）。毎年、世界中で約120万の新しいCRC症例が報告されている（4）。化学療法と放射線療法に対する抵抗性は、依然として深刻な問題である。したがって、放射線療法と化学療法での感受性を高め、抵抗性を打ち破り、治療効率を上げることは臨床での大腸がん治療において大きな実用的意義がある。

LDIRがホルミシス効果と（5,6）と適応応答効果（7）を有するは明らかになっている。LDIRはがん細胞では正常細胞と異なる生物作用を示す；LDIRは正常細胞に無いある情報伝達経路の活性化を介してがん細胞の増殖を抑制する可能性がある（8,9）。しかしながら、その機序及びがんの臨床治療への応用に関しては未だ明らかでなく、これらを解明する必要がある。

本研究では、異なるLDIR照射モデルを開発した；即ち、250mGyの単回照射に代えて、LDIR放射線量を3日間隔で25mGyを10回（総線量250mGy）前照射後、2Gy の高線量放射線療法、又は5-フルオロウラシル（5-FU）の化学療法を実施した；これらの組み合わせ処理によるヒト結腸直腸腺がん細胞株HT-29での細胞増殖を測定し、治療効果を評価した。さらに、両療法後の細胞での情報伝達経路の活性化を検討した。これらの検討を行うことで、LDIRと結腸直腸がんの集学的治療の証拠に関する新しい治験が得られることが多いに期待される。

実験材料と方法

細胞培養と細胞の取扱

ヒト結腸直腸腺がん細胞株HT-29 はAmerican Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) から購入し、10%ウシ胎児血清 (FBS, Hyclone, Beijing, China)、1%抗生物質（ペニシリン・ストレプトマイシン, Invitrogen, CA, USA）を含む MyCoy'5Aで培養した。細胞は37°C加湿5%CO₂インキュベータで培養した。ATM阻害剤KU55933 (Selleck, Shanghai, China)、p53阻害剤pifithrin-α (PFT-α, Beyotime Institute of Biotechnology, Jiangsu, China)、ERK阻害剤PD98059 (Selleck) 及びp38MAPK阻害剤SB203580 (Selleck) を使用して、ATM、p53及びMEKの機能を遮断した。全ての化学的阻害剤に関する細胞培養培地中での最終濃度は10μMである。

LDIR照射

HT-29細胞は線量率12.5mGy/min（LDIRの場合）、又は500mGy/min（高線量2Gy放射線療法HDIRの場合）のX-RAD 320（Precision X-RAD, North Branford, CT, USA）で照射した。LDIRでのHT-29細胞への分割照射は3実験群で実施した；細胞を1回25mGyで3日おきに10回照射した（総線量 250mGy, A群）。細胞を30日に250mGy（25mGy×10回）になる様にLDIR分割照射（B群）、及び模擬照射（コントロール、C群）。何れの群も、その後細胞培養液を交換し、細胞を直ちに回収、又は次の実験のステップ迄培養した。

抗がん剤又はHDIR照射

化学療法薬5-FU（Sigma, Shanghai, China）をリン酸バッファー・生理食塩水（PBS）に溶解した。化学療法では、A、B又はC群から適当濃度のHT-29細胞を50 μ g/mLの5-FU溶液で24時間処理した。その後、細胞培養培地を交換し、細胞を採取、又は増殖アッセイに使用した。放射線療法では、A、B又はC群から、適当濃度のHT-29細胞に2GyのHDIR（線量率50mGy/分）を照射し、細胞を採取、又は増殖測定に用いた。

細胞増殖アッセイ

細胞増殖測定にWST-1アッセイを用いた。抗がん剤及びHDIR処理後、細胞増殖試薬WST-1（Beyotime Biotechnology）を用いて細胞増殖を評価した；測定キットの取扱説明書に従い、10 μ LのWST-1試薬を各プレートウェルに添加、100 μ Lの細胞培養液と37°Cの暗所で2.5時間インキュベートした。450及び630nmでの吸光度をマイクロプレートリーダ（Thermo Fisher Scientific）で測定した。最終吸光度（OD）は、計算式 = OD₄₅₀-OD₆₃₀-OD_{BLNAK} から求めた。

フローサイトメトリによる細胞サイクル解析

約2 × 10⁶個の細胞を採取し、1mLの冷PBSで洗浄した。細胞を遠心分離し、1mLの固定液（700 μ Lのエタノール + 300 μ LのPBS）に再懸濁した。4°Cで4時間インキュベートした後、細胞を1mLのPBSで2回洗浄した。細胞をピペティグにより充分攪拌し、0.5mLのヨウ化プロピジウム（PI、Sigma）染色液に懸濁し、溶液（50 μ g/mL PI、20 μ g/mL RNase A 及び 0.2% Triton X-100）と共に暗所で、37°Cで30分間インキュベートした。細胞周期の分布はBD FACSCalibur flow cytometer（FACScan, BD Biosciences, CA, USA）で解析した。

フローサイトメトリーによる細胞アポトシスの解析

アネキシンV-FITCとPIによる二重染色フローサイトメトリーによる放射線療法及び化学療法後のアポトーシス細胞を解析した。約 1×10^6 個/2 ml を6ウェルプレートに播種し、放射線照射又は抗がん剤 (5-FU) を処理した。48時間後に細胞遠心チューブに回収、冷PBS及び結合バッファーで3回洗浄、その後アネキシンV-FITCとPI (アネキシンV-FITC Apoptosis Detection kit, BD Bioscience) で染色し、アポトーシス細胞の解析に供した；まず初めにHT-29細胞を結合バッファーに再懸濁、次に5μLのアネキシンV-FITCを添加し、10分間インキュベートした。続いて、5 μLのPI (Sigma) を加え、15分間インキュベートした後、直ちに FlowJo FACS分析ソフトウェア (Biosciences) 付フローサイトメータ (BD) を用いて解析した。

逆転写-定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR)

細胞全RNAはRNazol (Sigma) を用いて抽出し、残存ゲノムDNAをDNase I (Roche, Shanghai, China) 用いて除去した。M-MLV逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。カスパーゼ-3とp21のmRNA発現レベルはβ-アクチンで補正した。RT-qPCR 用いたプライマー配列は以下の通りである； p21-fwd, 5'-ATGTCCGTCAGAACCCATGC-3'; p21-rev, 5'-AGTCGAAGTTC-CATCGCTCAC-3'; caspase-3-fwd, 5'-GATGATGACATGGCGTGTTCATA-3'; caspase-3-rev, 5'-GATGATGACATGGCGTGTTCATA-3'; β-actin-fwd, 5'-ATC-ACCATTGGCAATGAGCG-3'; β-actin-rev, 5'-CGTCACACTTCATGA-TGG-AGT-3'。

ウエスタンプロット分析

総タンパク質量は、タンパク質抽出キット (Thermo Fisher Scientific) により細胞より抽出し、BCAタンパク質アッセイにより蛋白質量を求めた。

キット (Bio-Rad)。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によりタンパク質を分離後、ポリビニリデン・二フッ化物 (PVDF) 膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。プロットを5%脱脂乳/TBSTで37°Cで1時間インキュベートし固定した。次に、プロットを以下に示すモノクローナル抗体で4 °Cで一晩インキュベートすることで検出した； ATM (1:500, Abcam, Shanghai, China)、p53 (1:1,500, DO7, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、p21 (1:500, C-19, Santa Cruz Biotechnology), cyclin A (1:500, Santa Cruz Biotechnology), CDK2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology)、

caspase-3 (1:1,000, Cell Signaling Technology, Beijing, China)、cleaved caspase-3 (1:1,000, Cell Signaling Technology)、ERK/phos-ERK (1:1,000, Cell Signaling Technology)、p38/phos-p38 (1:1,000, Cell Signaling Technology)、そして β -actin (1:3,000, Santa Cruz Biotechnology)。その後、TBST で 5 分間洗浄（3回）し、プロットをHRP結合ヤギ抗マウス抗体又はヤギ兔二次抗体（Santa Cruz）と室温で1時間インキュベートした。さらに、TBSTでさらに5分間洗浄（3回）洗浄した後、プロットを増強化学発光システム（ECL; Thermo Fisher Scientific）を用いて可視化した。タンパク質発現量はQuantity Oneソフトウェア（Bio-Rad）付濃度測定分析によって半定量した。

統計

全ての実験は少なくとも3回繰り返し行った。全ての数値は平均値±SDで表示した。有意差検定は、SPSS 17.0を用いた Student's-t 検定によって行った。P < 0.05 (* P < 0.05; ** P < 0.01) を統計的に有意差有りとした。

結果

LDIR単回又はLDIR分割前照射はHT-29 結腸直腸がん細胞の増殖に対して作用しない

LDIR照射後のHT-29細胞の増殖に対する影響を検討するため、250mGyのLDIR単回前照射又はLDIR分割前照射(25 mGy/1回×10回、総線量 250 mGy)を実施した。細胞増殖をWST-1キットにより測定すると、LDIR 250 mGyの単回及び分割前照射は、何れも細胞増殖には影響を及ぼさない事が明らかになった（図1A & B, P > 0.05）。

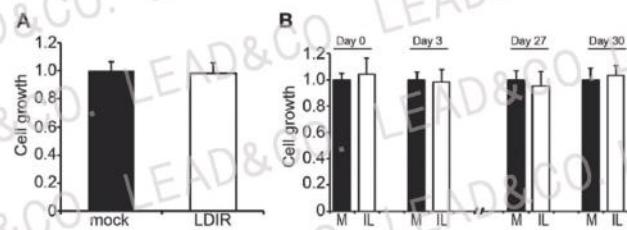


図1 LDIR (250mGy) 単回及び分割照射後のTH-29細胞増殖変化

(A) LDIR単回照射後30日目の細胞増殖。(B) LDIR分割照射 (25mGy × 10回) 後30日迄の細胞増殖。TM, 模擬照射；IL, 分割LDIR照射。

LDIRの分割前照射はその後の放射線・化学療法での治療効果を促進する

LDIRの放射線療法と化学療法との併用効果を検討する為、HT-29 結腸直腸がん細胞に高線量放射線治療又は化学療法前に1回LDIR (250mGy) 又は分

割 ($25\text{mGy} \times 10$ 回) 照射した。細胞増殖アッセイの結果を図2 Aに示す。非LDIR照射群又は 250mGy LDIR単回照射群と比較して、LDIR分割照射群 ($25\text{mGy} \times 10$ 回、総線量 250mGy) は、明らかに放射線治療及び化学療法での細胞増殖を更に有意に抑制した。細胞形態についても、同様の結果が観察された(図2C)。フローサイトメトリーによる細胞周期分布では、LDIRの分割前照射では著しいS期での停止が放射線療法(LDIR分割前照射群36.2 vs LDIR单回前照射群27.3%、図2D)と化学療法(LDIR分割前照射群40.4 vs LDIR单回前照射群27.9%、図2E)で観察された。PI-Annexin Vキットを使用細胞アポトーシスアッセイでは図2 F & Gにみられるように、LDIR分割前照射群は放射線療法及び化学療法による細胞アポトーシスを、各々46%迄及び49%迄増加させた。

LDIRの分割照射は細胞周期停止とアポトーシス経路を活性化する

LDIR分割前照射後の細胞増殖抑制の詳細機序を明らかにする為、RT-PCRとウェスタンプロット法を用いて高線量放射線(放射線療法)及び5-FU(化学療法)処理細胞での細胞周期停止とアポトーシス情報伝達経路(遺伝子発現)を検討した。両処理により、何れもp21とカスパー γ -3遺伝子の発現は増強したが、 250mGy 放射線の单回前照射は放射線療法及び化学療法での殺細胞効果を増強しなかった($P>0.05$ 、図3A & B)。しかしながら、興味深いことに、LDIRの分割前照射 ($25\text{mGy} \times 10$ 回、総線量 250mGy) は 250mGy 単回照射と比較して、有意($P<0.01$)にp21とカスパー γ -3の発現を増強した(図3 A & B)。また、細胞周期停止及びアポトーシス経路の活性化も、ウェスタンプロッティングによるp21、カスパー γ -3(断片化カスパー γ -3)、CDK2、及びサイクリンAの解析結果から確認された(図3C~F)。

分割LDIR照射は高線量放射線(HDIR)照射による放射線療法でのATM/p53経路を活性化する

ATM/p53情報伝達経路に最も関連のある放射線療法(2GyHDIR照射)をHT-29細胞で検討した。ウェスタンプロッティングにより検討すると、 250mGy のLDIR单回前照射と比較して、 25mGy のLDIR分割前照射(総線量 250mGy)はATM/p53を効率的に活性化し、又ATMとp53タンパク質発現を有意に増強さ

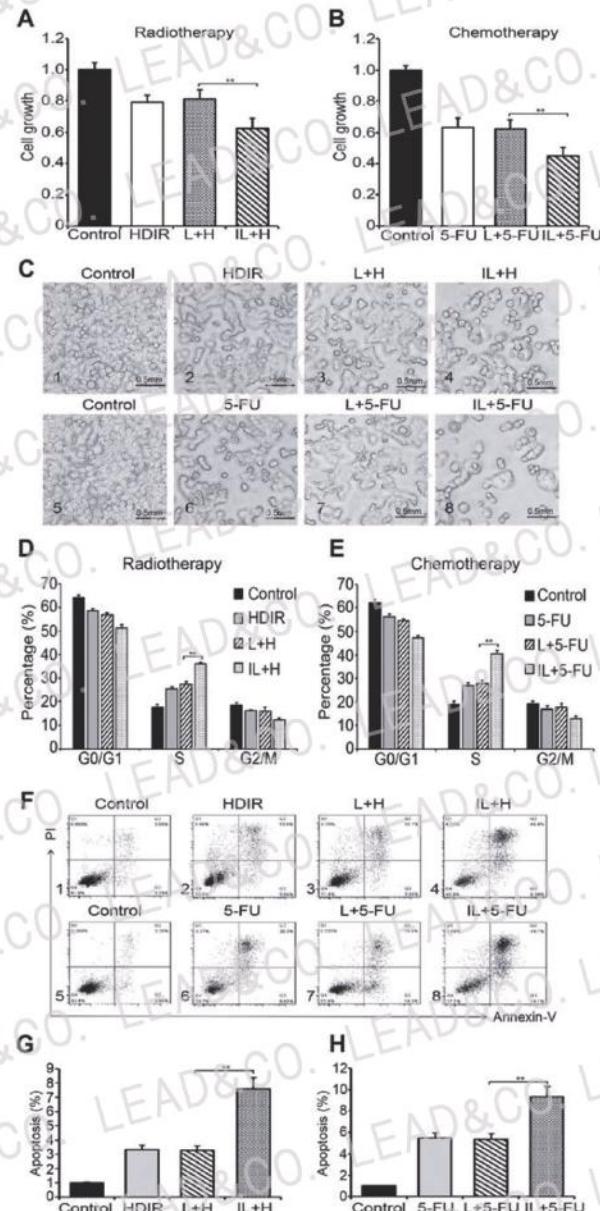


図2 LDIF (250mGy) の分割照射による放射線及び化学療法効果の増強

(A) HDIF, 単回LDIF + HDIF、及び分割LDIF + HDIF群のHT-29細胞増殖。(B) 5-FU、単回LDIF + 5-FU、及び分割照射 (25mGy x 10回) + 5-FU群のHT-29細胞増殖。(C) 細胞形態。(D) 放射線療法後の細胞周期分布。(E) 5-FU化学療法後の細胞周期分布。(F) 放射線及び化学療法後のHT-29 細胞のアポトーシス解析。(G) 放射線療法でのアポトーシス細胞の割合 (%). (H) 化学療法でのアポトーシス細胞の割合 (%).

H, HDIF; L, LDIF; IL, ILDIF; **P<0.01 VS 単回LDIF群。

せた(図4A&B)。分割照射によるATM/p53情報伝達経路の特異的活性化を確認する為に、LDIR分割前照射によって、ATMとp53に対する抑制剤を放射線療法前に細胞培養液に添加して検討した。この結果、分割照射によるATM/p53情報伝達経路の特異的活性化は遮断され、放射線療法での分割LDIR前照射で誘導された細胞増殖阻害は解除された($P<0.01$ 、図4C)。

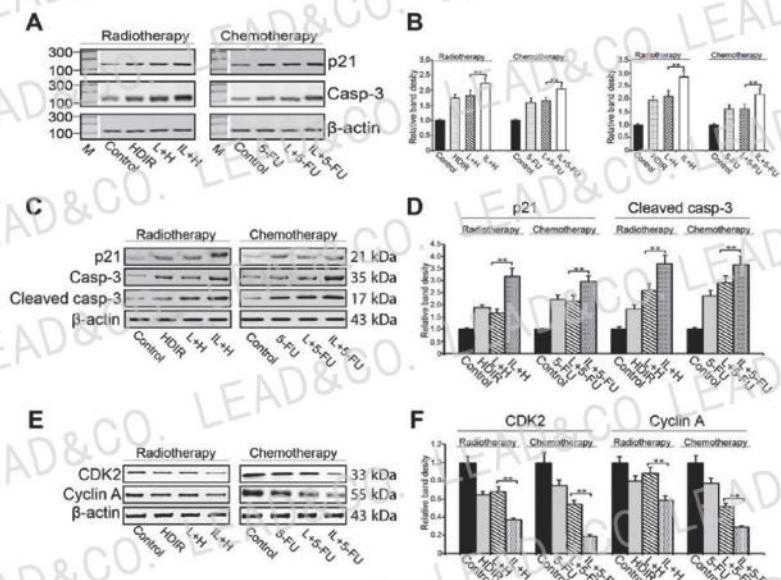


図3 LDIR分割前照射(総線量250mGy)による細胞周期休止とアポトーシスの促進

(A) RT-PCRによる細胞周期停止とアポトーシス関連遺伝子発現。(B) (A) の相対値。(C) Western blottingによる細胞周期停止とアポトーシス関連蛋白質発現。(D) (C) の相対値。(E) Western blottingによる caspase-3 及び cyclin-dependent kinase 発現。(F) (E) の相対値。M, 100 bp DNA marker ; H, LDIR; L, LDIR; IL, LDIR。** $P<0.01$ VS 単回LDIR群。

LDIR分割前照射は5-FU化学療法でのERK及びp38MAPK経路を活性化するERKとp38MAPK情報伝達経路の活性化を5-FU化学療法でWestern blotting法を用いて検討した。この結果、5-FU及び250mGyLDIR単回前照射+5-FU群と比較して、LDIR分割前照射(総線量250mGy)ではERK/p-ERK発現(図5A&B)及びP38/p-p38発現が有意に増加した(図5C&D)。しかしながら、5-FU処理でのLDIR分割前照射による細胞増殖抑制はp38MAPK経路阻害剤SB203580によって解除されたが(図5E)、ERK経路阻害剤PD98059では解除されなかった(図5F)。

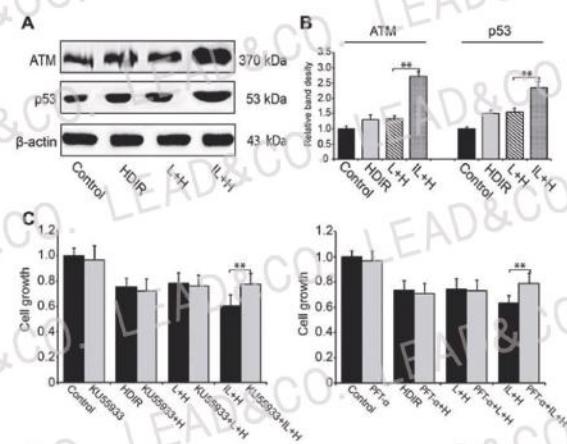


図4 分割LDIR照射（総線量250mGy）によるHDIR療法でのATM/p53経路の活性化

(A) Western blottingによるHT-29細胞でのATM/p53経路関連遺伝子発現。(B) (A)の相対値。(C) ATM/p53経路阻害剤によるHDIR放射線療法でのLDIR誘導細胞増殖阻害の解除。H, HDIR; L, LDIR; IL, LDIR。 **P<0.01 VS 単回LDIR群。

考察

CRC患者の臨床治療では、外科療法と化学療法の二療法が好ましい選択肢であるが、他の種々の療法も病態が進行性CRC患者の治療のためのアプローチとして提唱されている。5-FUは今日尚、進行性CRC患者のためのメイン療法であるが、本法の有効性は25%以下である。その結果、この薬剤への抵抗性の主要な障害となっている。CRC化学療法(10)。再発のリスクを軽減する事から、通常放射線療法が多発性腫瘍に対して使用されている。臨床治験の増加により、直腸がんの外科的治療に放射線療を追加する事で予後の改善が可能となることが明らかにされている(11)。しかしながら、顕著な初期臨床反応のも拘らず、患者の多くは放射線療法に対し“受けたくない！”と言う抵抗性を示す。

本研究では、放射線および化学療法抵抗性を克服する為に、CRC治療において、HDIR放射線療法及び5-FU化学療法との新規な併用分割LDIR前照射療法を検討し、その有効性の評価を実施した。その結果興味深い

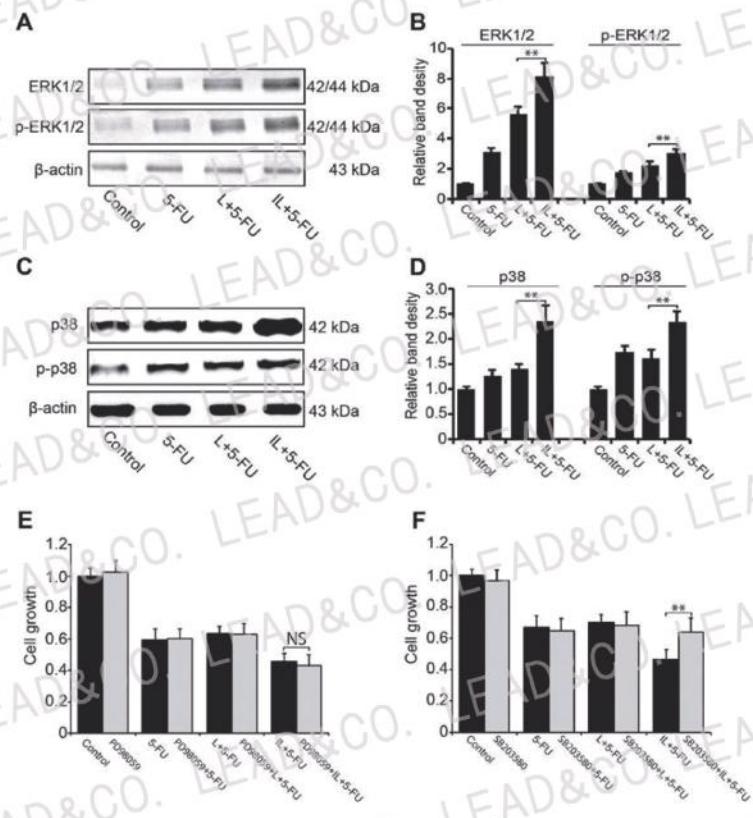


図5 LDIR分割前照射(総線量250mGy)による5-FU化学療法でのERK及びp38MAPK経路の活性化

(A) Western blottingによるHT-29細胞でのMEK/ERK経路関連遺伝子発現。(B) (A)の相対値。(C) Western blottingによるHT-29細胞でのp38MAPK経路関連遺伝子発現。(D) (C)の相対値。(E) ERK経路阻害剤によるHDIR放射線療法でのLDIR誘導細胞増殖阻害の無解除。(F) p38MAPK経路阻害剤によるHDIR放射線療法でのLDIR誘導細胞増殖阻害の解除
H, HDIR; L, LDIR; IL, LDIR。NS, 有意差無し。**P<0.01 VS 単回LDIR群。

ことに、LDIRの分割前照射が放射線・化学療法での有効性を有意に増強することが示唆された。細胞増殖アッセイにより、LDIRの分割前照射が強力なアポトーシスを介するHDIR及び5-FUの細胞殺作用を増加させることができた。次に、関与するメカニズムを分子レベルで検討した。Western blottingとRT-PCR解析の結果、LDIR分割前照射が細胞周期の停止とアポトーシス遺伝子の発現を誘導、さらに放射線療法でのATM/p53経路と化学療法でのp38MAPK経路を単回照射よりも効率的に活性化することが明らかになった。これらの情

報伝達経路（ATM/p53及びp38MAPK経路）を化学阻害剤で遮断すると、LDIRの併用分割照射により誘導された細胞増殖抑制治療効果の増加は解除された。

5-FUは、第一選択全身化学治療薬として広く使用されている抗がん剤である。本剤はウラシル類似体であり、DNAの正常な合成をブロック、RNAプロセシングを破壊、最終的にアポトーシスを誘導する事で抗がん作用を発揮する（12、13）。これ迄、JNK経路、Bcl-2・Bcl-Xの過剰発現（15）、治療による自食作用（16）、及びMAPK経路（17）の活性化等、種々の要因が5-FU耐性に寄与することが見出されている（14）。de la Cruz-Morcillo 等らは、p38MAPK活性の抑制が関連の減少と相関する結腸直腸がんでの5-FUや他の抗がん剤に誘導されるアポトーシス細胞死の低下に関与している事を示した（17）。この結果は私達の研究結果と一致する；即ち、何れの研究結果も、他のシグナル伝達経路（例えばERK経路）ではなく、5-FUに対する細胞応答を制御するのはp38-MAPKである。

放射線療法と化学療法での細胞反応に寄与する情報伝達に関する最も重要な遺伝子はATMとp53の2つである。Yang 等は、低線量放射線が示すホルミシスや適応応答現象はATMの活性化により開始されることを見出し、ATM/AKT/GSK-3 β 情報伝達経路の異なる活性化により肺がん細胞と正常肺上皮細胞間の異なる生物学的効果を説明するかも知れないと報告している（18）。

Brazina 等は、ATM、p53及びDAXX間の相互作用が電離放射線や遺伝毒性薬によるDNA損傷の調節に重要な役割を果たす事を示した（19）。Lin 等らは、慢性リンパ性白血病では、ATM/p53/p21経路の欠陥が化学療法抵抗性又は早期の再発に強く関連している事を見出した（20）。本研究では、ATMとp53の頗著なアップレギュレーションがLDIR分割前照射とHDIR放射線療法との併用後にみられ、HT-29細胞での放射線療法で誘導されるアポトーシスの制御にATM/p53経路の活性化が重要な事象である事を確認した。

結論として、LDIRの分割前照射（25mGy×10=250mGy）とHDIR又は5-FU療法との併用は、これらの治療効果を促進する有用な方法であり、この促進効果は細胞周期の進行とアポトーシスを制御するATM/p53及びp38MAPK経路の活性化に依存する。重要な事は、腫瘍細胞が遺伝的に異質である為、異なる遺伝的/エピジェネティック背景を有する異なる細胞が同量の放射線レベルで又同種の放射線に対して、異なる応答をするかも知れないと言う事である。

引用文献

1. Su XL, Wang YF, Li SJ, Zhang F and Cui HW: High methylation of the SEPT9 gene in Chinese colorectal cancer patients. *Genet Mol Res* 13: 2513-2520, 2014
2. Yang XD, Xu XH, Zhang SY, Wu Y, Xing CG, Ru G, Xu HT and Cao JP: Role of miR-100 in the radioresistance of colorectal cancer cells. *Am J Cancer Res* 5: 545-559, 2015.
3. Tang FR and Loke WK: Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *Int J Radiat Biol* 91: 13-27, 2015.
4. Guo M and Dou J: Advances and perspectives of colorectal cancer stem cell vaccine. *Biomed Pharmacother* 76: 107-120, 2015.
5. Luckey TD: Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. *Health Phys* 43: 771-789, 1982.
6. Feinendegen LE: Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol* 78: 3-7, 2005.
7. Olivieri G, Boddyote J and Wolff S: Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223: 594-597, 1984.
8. Yang G, Li W, Jiang H, Liang X, Zhao Y, Yu D, Zhou L, Wang G, Tian H, Han F, et al: Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics. *Int J Cancer* 139: 2157-2168, 2016.
9. Liang X, Gu J, Yu D, Wang G, Zhou L, Zhang X, Zhao Y, Chen X, Zheng S, Liu Q, et al: Low-dose radiation induces cell proliferation in human embryonic lung fibroblasts but not in lung cancer cells: Importance of ERK1/2 and AKT signaling pathways. *Dose Response* 14: 1559325815622174, 2016.
10. Shin YK, Yoo BC, Hong YS, Chang HJ, Jung KH, Jeong SY and Park JG: Upregulation of glycolytic enzymes in proteins secreted from human colon cancer cells with 5-fluorouracil resistance. *Electrophoresis* 30: 2182-2192, 2009.
11. Hafner MF and Debus J: Radiotherapy for colorectal cancer: Current standards and future perspectives. *Visc Med* 32: 172-177, 2016.
12. Longley DB, Harkin DP and Johnston PG: 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330-338, 2003.
13. Grem JL: 5-Fluorouracil: Forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs* 18: 299-313, 2000.
14. Sui X, Kong N, Wang X, Fang Y, Hu X, Xu Y, Chen W, Wang K, Li D, Jin W, et al: JNK

- confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. *Sci Rep* 4: 4694, 2014.
15. Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, Lacorte JM, Staedel C and Lesuffleur T: Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer* 98: 498-504, 2002.
 16. Wei MF, Chen MW, Chen KC, Lou PJ, Lin SY, Hung SC, Hsiao M, Yao CJ and Shieh MJ: Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* 10: 1179-1192, 2014.
 17. de la Cruz-Morcillo MA, Valero ML, Callejas-Valera JL, Arias-González L, Melgar-Rojas P, Galán-Moya EM, García-Gil E, García-Cano J and Sánchez-Prieto R: P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: Implication in resistance. *Oncogene* 31: 1073-1085, 2012.
 18. Yang G, Yu D, Li W, Zhao Y, Wen X, Liang X, Zhang X, Zhou L, Hu J, Niu C, et al: Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget* 7: 71856-71872, 2016.
 19. Brazina J, Svadlenka J, Macurek L, Andera L, Hodny Z, Bartek J and Hanzlikova H: DNA damage-induced regulatory interplay between DAXX, p53, ATM kinase and Wip1 phosphatase. *Cell Cycle* 14: 375-387, 2015.
 20. Lin K, Adamson J, Johnson GG, Carter A, Oates M, Wade R, Richards S, Gonzalez D, Matutes E, Dearden C, et al: Functional analysis of the ATM-p53-p21 pathway in the LRF CLL4 trial: Blockade at the level of p21 is associated with short response duration. *Clin Cancer Res* 18: 4191-4200, 2012.