

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05674

研究課題名(和文)ミトコンドリアにおけるROS増幅の誘導に基づく放射線増感法の確立

研究課題名(英文)Radiosensitization by mitochondrial ROS amplification

研究代表者

小野寺 康仁(Onodera, Yasuhito)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：90435561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌等において発現亢進するArf6およびAMAP1は、インテグリンの細胞膜への再輸送を促進して浸潤・転移に寄与する。一方、インテグリン下流のシグナルは、がん細胞の放射線や薬剤への耐性にも寄与している。本研究では、Arf6-AMAP1経路の阻害によりインテグリンシグナルが減弱すると、ミトコンドリアの細胞内分布が阻害され核周辺に顕著な集積を起し、放射線によって生じる活性酸素が増幅することを新たに見出した。また、インテグリンの下流でミトコンドリア輸送に寄与する分子群と、それらの相互作用の様式を明らかにした。さらなる研究により、ミトコンドリア集積と活性酸素増幅に基づく放射線増感法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Arf6 and AMAP1 are highly expressed in different cancers including breast cancer, and mediate integrin recycling to plasma membrane to promote cancer invasion and metastasis. On the other hand, signaling downstream of integrins is well known to contribute to resistance to radiation and chemotherapy. In this study, we have shown that reduction of the integrin signaling by blockade of the Arf6-AMAP1 pathway inhibits intracellular mitochondrial distribution, resulting in aggregated mitochondria around the nucleus, which induces amplification of the reactive oxygen species (ROS) produced by ionizing radiation. We have also revealed molecules involved in the regulation of mitochondrial distribution downstream of integrins, and how they interact with each other. Further analyses may lead to the establishment of a new modality for radio-sensitization, which is based on the ROS amplification mediated by mitochondrial aggregation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ミトコンドリア 活性酸素 放射線

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、浸潤性の高い乳癌細胞において、低分子量 G タンパク質 Arf6 とそのエフェクターである AMAP1 が発現亢進しており、インテグリンの細胞膜への再輸送(リサイクリング)を促進することによって、浸潤や転移に寄与することを報告してきた (Onodera et al, J Cell Biol. 2012 197(7):983-96)。また、乳癌細胞の3次元培養系を用いて、解糖系におけるグルコース代謝がインテグリンの発現亢進および下流のシグナル経路の活性化に必要不可欠であることを明らかにした (Onodera et al, J Clin Invest. 2014 124(1):367-84)。その後の解析から、そのような糖代謝によるインテグリンの制御において、リサイクリングの促進が寄与していることを示唆する結果を得ている (論文準備中)。

一方で、インテグリン下流のシグナルはがん細胞の様々な悪性形質に深く関与しており、グルコース代謝の亢進を含む種々の代謝変化にも寄与している。また、インテグリンを介した細胞の生存性に関するシグナル経路(生存シグナル)の活性化は、薬剤や放射線等の治療に対する抵抗性と密接に関与している (Nam et al, Cancer Res. 2010 70(13):5238-48 など)。メカニズムの代表的な例としては、PI3K-Akt シグナル経路を介する NF κ B や Bcl-2、Bad 等の制御が挙げられ、細胞死を促進する経路の阻害という様式である。

2. 研究の目的

本研究では、インテグリンを介したがん細胞の放射線抵抗性について、上記のような従来着目されてきた「生存シグナル」の機能とは異なる視点から解析を行った。具体的には、インテグリンやそれを制御する Arf6-AMAP1 経路の働きにより、放射線照射によって生じる活性酸素への応答が影響さ

れ、酸化ストレスそのものを軽減することによって放射線耐性に寄与するとの仮説を立て、これを検証した。予備的結果として、実際に Arf6-AMAP1 経路の阻害によりミトコンドリアにおける活性酸素の産生が著しく亢進すること、その際ミトコンドリアの細胞内分布が大きく変化し、核周辺において顕著な集積を生じることが明らかとなっていた。そこで本申請においては、これらの現象に着目して、インテグリンを介する活性酸素制御についての具体的なメカニズムや放射線増感への応用の可能性についての検討を行った。

3. 研究の方法

上述のようなインテグリン制御経路の阻害による活性酸素の産生亢進とミトコンドリアの集積について因果関係を明確にするため、ミトコンドリアの集積を任意に誘導できる実験系 (Spronsen et al, Neuron. 2013 77(3):485-502) を確立し、活性酸素量の変化や放射線耐性への影響を解析した。インテグリンやそれを制御する Arf6-AMAP1 経路の阻害は細胞接着に強く影響するため、解析過程における洗浄のステップで多くの細胞が浮遊してしまい測定結果に影響する。そこで活性酸素量の測定については、dihydroethidium (DHE) や dichlorofluorescein (DCF) などの活性酸素を検出可能な蛍光色素による染色や、roGFP 等の ratiometric な解析が可能な蛍光タンパク質を用いて行うことで洗浄のステップを省略し、接着の弱い細胞からのシグナルについても検出できるよう配慮した。同様に、放射線照射後の細胞死の解析についても、洗浄のステップを必要としない検出試薬 (CytoTox-Glo, Promega) を用いて行った。インテグリンを介してミトコンドリア分布が制御されるメカニズムの解析については、ミトコンドリア輸送に関するモーターア

アダプタータンパク質やそれらの相互作用に着目し、GST 融合タンパク質を用いた結合解析や免疫沈降法によって検討を行った。

4 . 研究成果

ミトコンドリア集積を任意に誘導する実験系を用いた解析から、ミトコンドリアが集積すること自体によって、心筋細胞において報告されている ROS-induced ROS release (RIRR) 様の現象による「活性酸素の増幅」が起こることが示唆された。レーザー顕微鏡を用いてミトコンドリア集積蛍光色素を局所的に bleach して活性酸素を発生させた場合にも、ミトコンドリアの集積部において、レーザーによって生じた活性酸素がさらに増幅していく様子を捉えることができた。また、ミトコンドリアの集積は放射線耐性を著しく減弱すること、このとき核 DNA の二重鎖切断の形成や修復には影響がない一方、caspase-3 の活性化が顕著に起こることを確認した。すなわち、集積したミトコンドリアは放射線によって生じた活性酸素をさらに増幅し、caspase を介した細胞死を亢進することが明らかとなった。また、インテグリンがミトコンドリア分布を制御するメカニズムについては、インテグリン裏打ちタンパク質群を介したミトコンドリア上のモーターアダプタータンパク質の相互作用制御が重要であることが明らかとなった。インテグリンの集積により形成される接着斑において、モーターアダプターに何らかの変化が引き起こされ、結果としてミトコンドリアの逆行輸送を減少させることが示唆された。以上の結果は *Nature Communications* に投稿し、掲載が決定している。

本研究により、インテグリンによる細胞の生存性制御のメカニズムについて、従来と全く異なる視点に基づく知見を得ることができた。また、単一細胞における RIRR 様の現象の報告は、本件が初めての例であり、「ミ

トコンドリアの集積」が放射線や薬剤への増感に有効であることが示唆された。これらの成果の臨床応用についても、今後の研究において検討していきたい。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- 1) Onodera Y, Nam JM, Horikawa M, Shirato H, Sabe H. Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nat Commun.* 2018 (in press) (査読有)
- 2) Mazaki Y, Onodera Y, Higashi T, Horinouchi T, Oikawa T, Sabe H. ARF1 recruits RAC1 to leading edge in neutrophil chemotaxis. *Cell Commun Signal.* 2017; 15(1):36. (査読有) doi: 10.1186/s12964-017-0193-y
- 3) Wu PH, Onodera Y, Ichikawa Y, Rankin EB, Giaccia AJ, Watanabe Y, Qian W, Hashimoto T, Shirato H, Nam JM. Targeting integrins with RGD-conjugated gold nanoparticles in radiotherapy decreases the invasive activity of breast cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12:5069-5085. (査読有) doi: 10.2147/IJN.S137833

[学会発表](計 4 件)

- 1) Onodera Y. Integrin signaling and cancer metabolism. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 28 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- 2) 小野寺康仁. がん細胞における小胞輸送経路を介したミトコンドリア分布制御と活

性酸素および放射線への耐性 . 第 59 回放射線影響学会 , 2016 年 10 月 27 日 , JMS アステールプラザ (広島県・広島市)

- 3) 小野寺康仁 .ミトコンドリア分布の調節による酸化ストレスの制御, 第 32 回臨床フリーラジカル会議 . 2016 年 1 月 30 日 , 里山の休日京都・烟河 (京都府・亀岡市)
- 4) 小野寺康仁 .糖代謝と小胞輸送の相互作用を介したがん形質の誘導 . 第 3 回がん代謝研究会・金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム . 2015 年 7 月 17 日 , 石川県立音楽堂交流ホール (石川県・金沢市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://g21001.med.hokudai.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 康仁 (ONODERA, Yasuhito)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号 : 9 0 4 3 5 5 6 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

南 ジンミン (NAM, Jin-Min)

北海道大学・国際連携研究教育局

(GI-CoRE)・講師

研究者番号 : 6 0 4 1 4 1 3 2