

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14416

研究課題名(和文) 包括的手法によるがん治療の新規放射線増感法の研究

研究課題名(英文) A comprehensive genome-wide screen of radiosensitization targets

研究代表者

益谷 美都子 (MASUTANI, Mitsuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：60238904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療において、物理的精度の向上や低侵襲性という面からも今後、放射線治療の大きな増加が見込まれる。一方、放射線治療の増感剤としては臨床に定着した増感剤はほとんどない。本研究においては種々の機能を持つ遺伝子を標的としてより広く網羅的に増感標的遺伝子を探索する。放射線感受性を増感させる候補遺伝子として抽出されたDNMT3b, poly(ADP-ribose) polymerase1 (PARP-1)、interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA)、APOBEC3Gの評価を進め、これらの遺伝子の機能阻害が放射線感受性を増感させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive genome-wide screen of radiosensitization targets in cancer cells using an shRNA-library has been performed and some genes were identified as candidate target. Among them, we focused on the DNMT3b, poly(ADP-ribose) polymerase1 (PARP-1), interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA) and APOBEC3G. These genes were suggested as potential targets of radiosensitization.

研究分野：薬学、生化学、腫瘍学、分子生物学

キーワード：PARP radiosensitization DNMT3b gamma-irradiation cancer

### 1. 研究開始当初の背景

がんに対する放射線療法は放射線により細胞の DNA を破壊する作用を利用し、がん組織に集中的に放射線を照射することでがん細胞を死滅させる治療法である。放射線療法は体外からの局所的な治療が可能のため侵襲性が低く、高齢化社会に向けて応用の展開が期待されている。

### 2. 研究の目的

がん治療において、物理的精度の向上や低侵襲性という面からも今後、放射線治療の大きな増加が見込まれる。一方、放射線治療の増感剤としては臨床に定着した増感剤はほとんどない。本研究においては種々の機能を持つ遺伝子を標的としてより広く網羅的に増感標的遺伝子を検索する。この新規の手法により、放射線増感の標的遺伝子候補群を機能クラスターとして同定し、機能クラスター内から増感標的候補を絞り込む。次ががん細胞株及びマウス腫瘍モデルにおいて候補 shRNA を導入し、放射線増感効果を検証し、臨床応用に適した増感標的とその組み合わせを同定する。

### 3. 研究の方法

約 10,000 遺伝子を対象にしたレンチウイルス shRNA ライブラリーをがん細胞株に導入し、puromycin で数日間選別後、非照射条件と比較して 70-80%の生存となる線量のガンマ線照射を行い、数日間培養する。細胞を回収し DNA を抽出後、各 shRNA ベクターの遺伝子に対応するバーコード配列領域の増減を PCR 法により増幅し、各ベクターのバーコード量を定量する。これにより、ノックダウンにより放射線増感を示す遺伝子群と耐性を付与する遺伝子候補群を同定する。作用機序の検討により、これらの機能クラスター内からより標的性の高い増感候補遺伝子を選定する。次に *in vivo* 腫瘍モデルで放射線増感効果を検

証し、臨床応用に適した増感標的を見いだす。ヒト試料の遺伝子解析は直接予定していないが、研究の進捗と展開状況により、増感標的遺伝子の発現や変異を解析する可能性がある。その場合には、試料を匿名化する等、個人情報の保護等について、十分に配慮して行う予定である。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守して行う。組換え DNA 実験については所属機関の遺伝子組み換え実験安全管理規程を遵守する。

### 4. 研究成果

新規の放射線増感の標的を同定し、放射線増感剤の開発を検討するために網羅的な放射線増感因子の探索をレンチウイルス shRNA ライブラリーを用いたマイクロアレイ解析により行った。放射線感受性に影響を与える候補遺伝子が網羅的探索系により、複数抽出され、これらの増感標的候補について検証と解析を行った。

HeLa 細胞において、ノックダウンにより放射線増感を示す遺伝子標的として、DNA メチル化転移酵素 DNMT3B を見出した。DNMT3B の機能阻害により、HeLa 以外に A549、及び HCT116 細胞株 においてもガンマ線照射に対して増感効果を認めた。DNMT3B の機能阻害によりガンマ線照射後の HP1 $\beta$ 、 $\gamma$ H2AX、Rad51 の foci 形成が減少した。DNMT3B の機能阻害下では DNMT3B -HP1 $\beta$ の相互作用が低下し、ガンマ線照射後 TP63、BAX、PUMA、NOXA の発現が誘導された。DNMT3B の機能阻害下で放射線増感が起きる機構として、HP1 $\beta$  と  $\gamma$ H2AX の foci 形成不全が重要であることが示された。DNMT3B のノックダウンを行った A549 細胞ではマウスの xenograft モデルにおいて放射線増感効果が認められた。DNMT3B 遺伝子はがんでしばしば過剰発現

を示すことから、DNMT3B 阻害剤は放射線増感の標的の候補となりうると考えられる。放射線感受性を増感させる候補遺伝子として抽出された *poly(ADP-ribose) polymerase1 (PARP-1)*、*interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA)*、*APOBEC3G* の評価を進めた。*IL27RA* の siRNA によるノックダウン条件下で複数の肺がん細胞株においてガンマ線照射に対し増感効果がコロニー形成法で示された。

PARP-1 の阻害剤はガンマ線や炭素線以外に、陽子線に対する増感作用を明らかに DNA 修復応答阻害を伴い示した。

*IL27RA* の発現抑制はガンマ線照射後の特定の複数のサイトカインの発現誘導に照射 2-4 日の範囲で影響を与えた。*APOBEC3G* の siRNA によるノックダウン条件下では、特定の肺がん細胞株と前立腺がん細胞株においてガンマ線照射に対し増感効果をコロニー形成法で認めた。*APOBEC3G* の siRNA 処理条件下ではガンマ線照射後の細胞周期停止が影響を受け、DNA 修復応答の阻害の可能性が示唆された。11 株の複数のがん種を含むヒトがん細胞株で *APOBEC3G* の発現レベルをリアルタイム PCR 法で検討したところ、約 70% の株で高い発現レベルを示し、増感標的候補となることが示された。今後、*APOBEC3G* の機能阻害による DNA 修復経路や細胞死誘導への影響をさらに検討し、放射線増感に適するがん種について検討し、臨床応用への可能性を検討する必要がある。

#### 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 2 件)

1. Hirai T, Saito S, Fujimori H, Matsushita K,

Nishio T, Okayasu R, Masutani M: Radiosensitization by PARP inhibition to proton beam irradiation in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478(1): 234-40, 2016 (査読有り)

2. Fujimori H, Sato A, Kikuhara S, Wang J, Hirai T, Murakami Y, Okayasu R, Masutani M: A comprehensive analysis of radiosensitization targets; functional inhibition of DNA methyltransferase 3B radiosensitizes by disrupting DNA damage regulation. *Scientific Reports* 5:18231, 2015 (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

1. 小野寺 貴恵, 菊原 颯太, 藤森 浩彰, 佐々木 由香, 今道 祥二, 村上 康文, 益谷美都子: 放射線増感標的としての *IL27RA*. 第 76 回日本癌学会学術総会 演題番号 J-2011 横浜 2017.
2. 小野寺 貴恵, 菊原 颯太, 藤森 浩彰, 佐々木 由香, 今道 祥二, 村上 康文, 益谷美都子: *APOBEC3G* の発現抑制による放射線増感検証と作用機序の解析. 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 演題番号 4P2T26-09 (3P-0946), 2017.
3. 小野寺 貴恵, 菊原 颯太, 藤森 浩彰, 佐々木 由香, 今道 祥二, 村上 康文, 益谷美都子: *IL27RA* の機能阻害による放射線感受性の増感作用. 第 39 回日本分子生物学会年会 演題番号 2LBA-102, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：

菊原 颯太 (KIKUHARA, Sota)

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

益谷 美都子 (MASUTANI, Mitsuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
教授

研究者番号：602338904

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

藤森 浩彰 (FUJIMORI, Hiroaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・  
研究所・研究員

研究者番号：00590043

### (4)研究協力者

小野寺 貴恵 (ONODERA, Takae)

佐々木 由香 (SASAKI, Yuka)

平井 崇久 (HIRAI, Takahisa)

今道 祥二 (IMAMICHI, Shoji)