

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19814

研究課題名(和文)低線量・低線量率の放射線治療効果向上を目的とした新規放射線増感剤の開発

研究課題名(英文)Development of novel radiosensitizers for improving radiation therapy

研究代表者

齋藤 陽平 (SAITO, Yohei)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10613698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線併用治療の効果向上と適応拡大を目的とした放射線増感剤開発のため、がん細胞に高発現するとがん細胞の生存や転移に寄与することが知られているトランスグルタミナーゼ2(TG2)の放射線抵抗性とその作用機序解析を目標に研究を行った。TG2の高発現は放射線照射後の細胞生存率を高めるが、その作用発現にTGase活性やGTPase活性の欠損に影響しない。しかしながら、放射線耐性細胞に対するTG2-C277Sの発現は、放射線照射後の細胞死を増加させた。また細胞膜結合型TG2の発現は、血清飢餓条件下における細胞死に強い抵抗性を示したが、放射線照射誘導性の細胞死は抑制することができないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To development of radiosensitizers for the purpose of improving the effectiveness of combination therapy with radiation and expanding of indications, we studied the effect of transglutaminase 2, which contributed to cancer cell survival and metastasis, on the radioresistance and its mechanism. Although TG2 overexpressing enhanced the cell viability after ionizing radiation, TGase activity or GTPase activity of TG2 is not necessary for the action. However, TG2-C277S expressing increased cell death after ionizing radiation on clinically-radioresistant cell. Membrane-anchored TG2 expressing cells showed the strong resistance to cell death under serum starvation condition, but did not suppress the anticancer drugs- or ionizing radiation-induced cell death.

研究分野：細胞生物学

キーワード：放射線耐性 細胞死 トランスグルタミナーゼ2

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍の主要な治療法である放射線療法は、DNA合成阻害剤などの抗がん剤と併用する化学放射線療法として行われることが多い。この化学放射線療法は、共にDNA傷害作用を利用しているため、細胞増殖が盛んな細胞ほど影響を受けやすい。従って、DNA修復能の高いもしくは細胞増殖能の低いがん細胞は、影響を受けにくいと考えられる。また低線量率における放射線照射は、線量率効果による生物効果の減弱とDNA変異による悪性化の可能性があるため、放射線治療後に放射線抵抗性細胞も出現することも問題となっていた。そこでDNA損傷に依存しない放射線増感剤の開発が放射線治療効果の向上につながるものと考えた。

(2) 悪性腫瘍の低酸素状態が放射線治療に対して抵抗性を示すことが報告されているが、低酸素及び低栄養状態などのストレスに対する生存率が高い細胞は、放射線に対しても抵抗性があることが知られている。トランスグルタミナーゼ2 (TG2) は、様々な役割を持つ複雑な多機能酵素であり、タンパク質の架橋化活性やGTPase活性を有し、がんや神経変性疾患などの病態に寄与することが知られている。一般的にがん細胞におけるTG2発現量は低いが、その発現の上昇が細胞死、薬剤耐性に寄与することが報告されている。また、放射線感受性の高いリンパ球では発現が低く、放射線感受性の低い結腸直腸腺癌ではTG2のmRNAの発現が高いことも報告されている。さらに臨床的放射線耐性肝がん細胞株においてもTG2の発現上昇が見られたことから、放射線照射による細胞死抑制に寄与することも考えられた。

放射線照射によりダメージを受けた細胞に対し効率よく細胞死を誘導できれば、治療効果を高めることが可能となる。リンパ球など放射線感受性の高い細胞では、低線量の照射でDNA傷害なく間期死が引き起こされることがあることが知られている。この詳細なメカニズムは不明であるが、アポトーシスに対する感受性の高さが要因の一つであると推測されている。

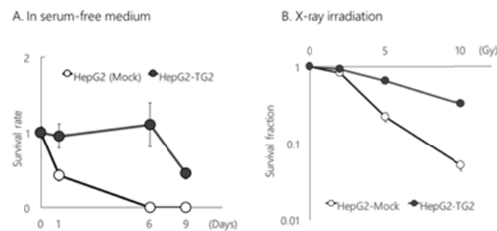
2. 研究の目的

(1) 上記の背景を受けた研究を始め、TG2の高発現は、放射線誘導性細胞死を抑制することが明らかになった。本研究で開発目標とする放射線増感剤は、放射線によるゲノムDNA傷害を増強し増殖死を引き起こさせるのではなく、それ以外のターゲットに作用し細胞死への感受性を増大させるものである。そのため、放射線照射により誘導され、細胞死抑制に寄与する分子をターゲットにし、アポトーシスなどのプログラム細胞死に対する感受性をあげる薬剤を開発し、悪性腫瘍に送

達するのを目標としている。

このため、TG2による放射線誘導性アポトーシス抑制の作用機序の解析を行い、またTG2機能を抑制することによる放射線感受性の変化及び種々のストレスに対する細胞死に与える影響を調査した。

(2) 新規細胞膜局在型TG2を用い、がん細胞の細胞増殖・細胞死、薬剤耐性、転移に及ぼす影響を解析するだけでなく、神経変性疾患における病態の発生、細胞死についてTG2の関与を検証することを目指した。



3. 研究の方法

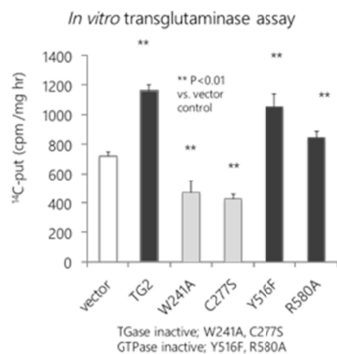
(1) TG2によるアポトーシス抑制作用の詳細な分子機構を明らかにするため、放射線感受性細胞、及び放射線耐性細胞にTG2、TGase活性欠損もしくはGTPase活性欠損変異体(W241A, C277S, Y516F, R580A)を過剰発現させた安定発現細胞株を作成した。具体的には肝がん細胞株HepG2及び臨床的放射線耐性肝がん細胞株HepG2-8960-R¹⁾にcDNA library (human placenta)からPCRで増幅したTG2配列をpcDNA6.2/V5/GW/D-TOPOに組み込んだプラスミドを作成しトランスフェクションを行なった。また変異導入用プライマーを用い上記プラスミドに点変異を入れたプラスミドを作成しトランスフェクションすることで安定発現株を作成した。作成した細胞のTGase活性は、放射線標識したputrescine取り込み試験により評価した。次に作成した細胞を用いて抗がん剤や様々な線量の放射線照射に対する感受性を調べるため、アポトーシスや細胞死への影響を評価した。

(2) 血清飢餓条件下での細胞死に対して強い抵抗性を示した細胞膜局在型TG2による細胞機能への影響を調べるため、作成した細胞における細胞膜局在型TG2の発現分布を調べた。さらに(1)と同様に抗がん剤や放射線照射を行い細胞死への影響を調べた。また、神経膠芽腫細胞株のTG2発現細胞株の樹立を行い、抗がん剤の感受性試験を行った。

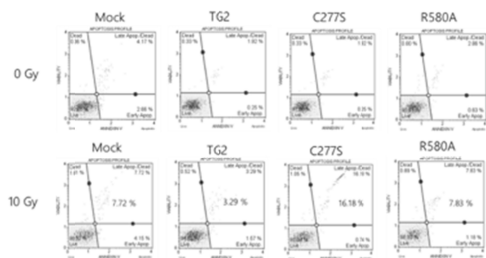
4. 研究成果

ヒト肝がん細胞株HepG2に対してTG2及びTG2変異体(W241A, C277S, Y516F, R580A)を発現する各プラスミドを導入し安定発現細胞株を樹立した。

これらの細胞株間で細胞増殖速度に有意な差は認められなかった。TGase 活性は期待した通りに W241A 及び C277S 発現細胞で低かった。また G タンパク質として機能するとき、結合することが知られている calreticulin のタンパク質発現はこれらの細胞では検出限界以下であった。



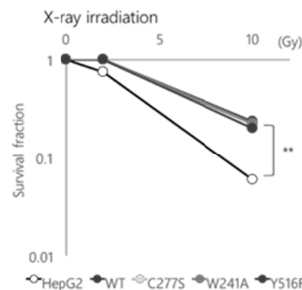
細胞培養中における血清濃度の低下や欠乏は、HepG2 においてアノキスを引き起こすことが知られているが、TG2 の過剰発現株 HepG2-TG2 及び TGase 活性欠損 TG2 過剰発現細胞株 HepG2-TG2-C277S ではこの脱着性細胞死を抑制する作用があった。この条件下における細胞内シグナルの変動を調べたところ、TG2 及び変異体発現細胞株全てで血清飢餓に伴う IκBa の発現上昇が抑制されることなど、TGase 活性、GTPase 活性に影響されない変化が多く観察された。また、collagen type I コート上に播種した場合には血清非存在下での細胞増殖が顕著に見られ、1 週間後の生存細胞数は、播種細胞の約 5 倍ほどであった。HepG2-TG2-C277S も HepG2-TG2 と同様の作用を示したが、HepG2-TG2-R580A には、血清非存在下における細胞増殖は認められなかった。



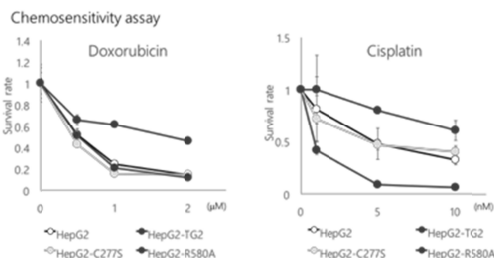
Apoptotic cells were increased after irradiation in C277S mutant expressing cells.

放射線照射実験において、HepG2-TG2 では照射後 1 日目でのアポトーシスの増加の抑制が見られ、また HepG2-TG2-C277S は、アポトーシスの促進が見られる。しかしながら、HepG2 と比較すると放射線抵抗性を示しており、放射線照射後の細胞生存率が高かった。放射線誘導性細胞死に対する抵抗性は、HepG2-TG2 及び HepG2-TG2-W241A, HepG2-TG2-Y516F でも高く、TGase 活性、GTPase 活性に影響されない作用であること

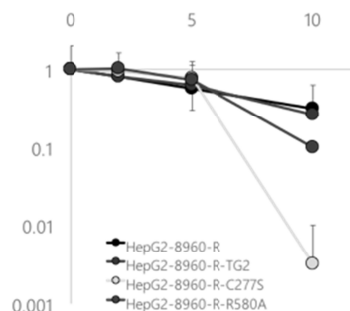
が推察された。また、2Gy の放射線照射でも放射線抵抗性が観察できたが、細胞内シグナル分子の活性化動態に有意な差は確認できなかった。



種々の抗がん剤に対する感受性を調べたところ、HepG2-TG2 は doxorubicin に対して感受性が低下しているが、cisplatin に対しては感受性が高くなっていった。HepG2-TG2-C277S には、TG2 の高発現によって見られる感受性の変化は認められず、これらの抗がん剤に対する感受性は、親株である HepG2 と同程度であった。一方、HepG2-TG2-R580A 細胞では、doxorubicin の感受性が増加し、cisplatin に対する抵抗性が増加するなど HepG2-TG2-C277S の結果と全く逆の結果が観察された。



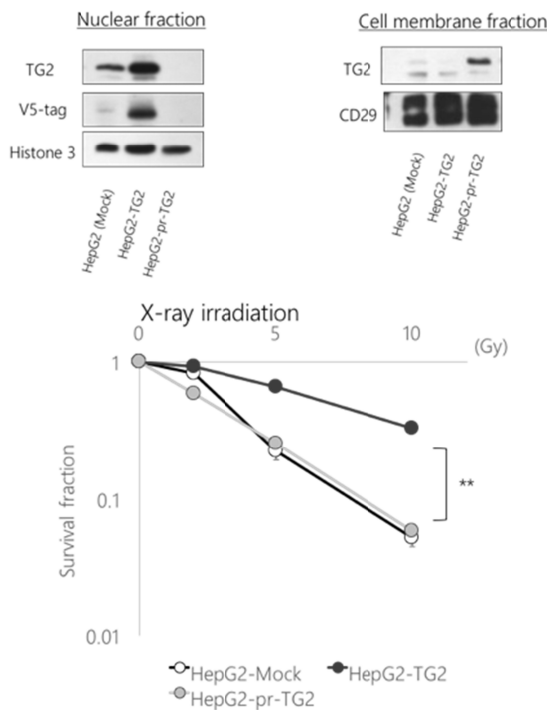
次に臨床的放射線耐性肝がん細胞である HepG2-8960-R に対し TG2 及び TG2 変異体 (W241A, C277S, Y516F, R580A) を導入し安定発現細胞株を樹立した。TG2 の過剰発現は、それ以上の放射線耐性を上昇させることはなかった。この放射線耐性細胞は、TG2 の発現が上昇したため放射線耐性能を獲得したわけではないが、TG2-C277S の発現により放射線照射後の細胞死を増加させることがで



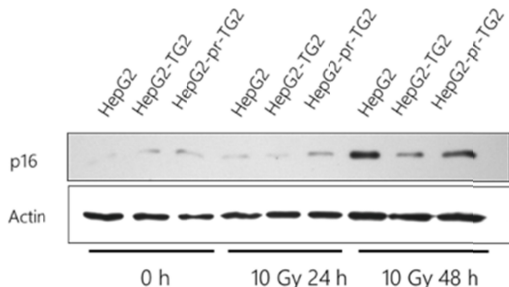
きた。

詳細な作用機序はまだ明らかにできてはいないが、放射線耐性細胞の感受性改善に期待できる結果が得られた。

TG2 は、BH3 ドメインを持っていること、また核内でアポトーシスに寄与することが報告されている。血清飢餓条件下において強い細胞死抵抗性を示す細胞膜結合型 TG2 (pr-TG2) を発現させた HepG2-pr-TG2 は、doxorubicin, cisplatin 及び放射線に対しても HepG2 と同程度の感受性であり、TG2 発現細胞におけるような細胞死抵抗性の変化は認められなかった。核内での局在がなく細胞接着機能を亢進させる pr-TG2 の発現は放射線照射による細胞死を抑制しないことが明らかになった。



そこで、放射線感受性が増加しない作用機序を調べるため研究を行った。HepG2 では放射線照射後に p53 の活性化と CDKN2A(p16) の発現が上昇するが、TG2 発現細胞ではこれらが抑制された。



しかしながら、pr-TG2 発現細胞では、p16

の発現抑制は見られなかった。TG2 の2つの活性の阻害で影響はしなかったが、TG2 を局在化させることで放射線誘導性の細胞死抵抗性を喪失させることができた。

また TG2 発現細胞において誘導されるタンパク質が、pr-TG2 の発現では全く誘導されないことも新たに明らかになった。このタンパク質が細胞死抵抗性にどの程度影響するかはわからないが、DNA 修復にも寄与することが報告されているため、解析の対象にする必要があると考えている。

さらに TG2 の発現の低い神経膠芽腫 T98G 細胞を親株とした TG2 発現細胞の作成と解析も行った。これらは、現在解析中である。

本研究では、TG2 による放射線耐性の作用機序の一部が明らかになり、放射線抵抗性の改善や放射線増感剤の開発につながることを考えられるが、今後も解析を続けていく必要があると考える。

<引用文献>

1) Kuwahara Y *et al.* Clinically relevant radioresistant cells efficiently repair DNA double-strand breaks induced by X-rays. *Cancer Sci* 2009; 100: 747-752. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01082.x

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. Kuwahara Y., Roudkenar M., Suzuki M., Urishihara Y., Fukumoto M., Saito Y., Fukumoto M.

The involvement of mitochondrial membrane potential in cross-resistance between radiation and docetaxel

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 66: 556-563 (2016)

DOI: 10.1016/j.ijrobp.2016.07.002.

他2件

[学会発表](計2件)

1. Transglutaminase 2 による放射線耐性への影響

齋藤 陽平

日本分子生物学会 第39回年会
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
2016年11月

2. 老化による脂肪蓄積が肝細胞に及ぼす影響の解析

齋藤 陽平

日本薬学会 第 136 年会

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2016 年 3 月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 陽平 (SAITO, Yohei)

東北医科薬科大学 薬学部・助教

研究者番号：10613698