

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06528

研究課題名（和文）ATM、DNA-PKに着目した低酸素性癌細胞における放射線抵抗性の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of radioresistance mechanisms in cancer cells focusing on ATM and DNA-PKcs under hypoxic conditions

研究代表者

橋本 拓磨（Hashimoto, Takuma）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50799145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、DNA修復酵素であるATMおよびDNA-PKcsについて、複数の細胞株で低酸素状態がこれら酵素の発現や活性化に影響を及ぼすことを明らかにした。また、低酸素状態では、Src、Caveolin-1、EGFR、PDK1、AktおよびAMPKの発現や活性が亢進することを見出した。Srcファミリー特異的な阻害剤であるPP2や、AMPKをターゲットとしたsiRNAの処理により、低酸素状態におけるATM、DNA-PKcsの活性の亢進が抑制されることを明らかにした。また、ATMについては、低酸素状態における発現の亢進もAMPKのノックダウンにより抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の低酸素細胞の放射線抵抗性は、酸素存在下でのラジカル反応だけでは説明がつかないため、生物学的要因が示唆されているが、低酸素における放射線抵抗性を制御する分子機序は明らかになっていない。本研究により、低酸素性癌細胞において、ATM、DNA-PKcsがSrc、AMPKを介して制御されていることが示唆された。ATM、DNA-PKcsが放射線照射によって誘導されるDNA修復に重要な役割をもつことから、低酸素における放射線抵抗性にこれら修復酵素の制御が重要である可能性が考えられる。これら研究成果は、効率の良い癌の放射線治療に向けて新たな知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：Severe hypoxia increased expression and activities of ATM, DNA-PKcs, Src, Caveolin-1, EGFR, PDK1, Akt and AMPKa. A specific Src inhibitor, PP2 suppressed activation of ATM, DNA-PKcs, Caveolin-1, EGFR and Akt under severe hypoxia. Treatment with siRNA for AMPK suppressed activation of ATM and DNA-PKcs and increase of ATM expression under severe hypoxia.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線抵抗性 低酸素 ATM DNA-PKcs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 固形腫瘍内には、不十分な血管新生により十分に酸素が供給されない低酸素領域が存在する。酸素濃度が 0.1% 未満の低酸素状態では、腫瘍細胞は放射線抵抗性を示すことが知られている(引用文献)。放射線抵抗性の細胞の存在は、癌の放射線治療において重要である。癌の低酸素細胞の放射線抵抗性は、酸素存在下でのラジカル反応だけでは説明がつかないため、生物学的要因が示唆されているが、低酸素における放射線抵抗性を制御する分子機序は明らかになっていない。

(2) 腫瘍組織においては、低酸素状態の細胞は血管から遠く離れた領域に存在するため、低酸素状態であるとともに必ず低栄養状態にあると考えられている。従来、低酸素細胞の放射線抵抗性の原因は、酸素によるラジカル反応の修飾の他に低酸素誘導因子-1 (Hypoxia Inducible Factor-1, HIF-1) の関与が重要と考えられていた。しかし、近年では HIF-1 は低酸素かつ低栄養状態では発現しないことが明らかにされた(引用文献)。低酸素状態が原因で放射線抵抗性を示す腫瘍細胞は、低酸素かつ低栄養のために壊死したと考えられる細胞から、1~2 細胞分程度の距離に位置することを考えると(引用文献)放射線抵抗性の低酸素細胞は低栄養のために HIF-1 を発現していないと考えられる。このため、臨床的低酸素状態での放射線抵抗に対する HIF-1 の寄与は極めて限定的と考えられる。

(3) DNA2 重鎖切断修復酵素(ATM、DNA-PKcs)は、放射線照射によって生じた DNA2 重鎖切断を修復することで、放射線抵抗性や細胞の生存に寄与する(引用文献)。また、低酸素状態において、DNA-PKcs リン酸化部位が、低酸素状態において亢進することが報告されている(引用文献)。このことは、低酸素状態による DNA2 重鎖切断酵素の活性化が放射線抵抗性の誘導に寄与していること示唆するが、低酸素状態による DNA 修復酵素の活性化を制御する分子機序は明らかにされていない。また、低酸素状態では、細胞の生存シグナルに参与する Akt が活性化することが報告されており(引用文献)細胞は、低酸素環境下で生き残るために種々の生存シグナルや DNA 修復酵素を活性化させている可能性が高い。

(4) 低酸素による細胞の放射線抵抗性の獲得は放射線治療にとって重要なテーマである。本研究課題では、低酸素による放射線抵抗性の原因解明を目的として、低酸素状態が DNA2 重鎖切断修復酵素の発現や活性に及ぼす影響、並びにその情報伝達経路の解明を目指す。

2. 研究の目的

(1) 低酸素状態が DNA2 重鎖切断修復酵素である ATM・DNA-PK、および生存シグナル Akt に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 低酸素状態において DNA2 重鎖切断修復酵素である ATM・DNA-PK の活性化を制御する情報伝達経路を解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞としては、SV40 でトランスフォームした正常ヒト線維芽細胞 LM217、LM205、胎児由来の正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF を用いた。

(2) 癌細胞における酸素濃度は 0-6% である(引用文献)。また、酸素濃度が 0.1% 未満の低酸素状態で腫瘍細胞は放射線抵抗性を示すことから、本研究においても低酸素状態としては、可能な限り臨床的な放射線抵抗性細胞がおかれている低酸素状態に近づけた。具体的には、各細胞株を酸素濃度 0.05% 未満の低酸素環境下で 12 時間、または 24 時間培養した。そのような条件下で、ATM、DNA-PKcs、Akt の発現量と活性に参与する部位のリン酸化に及ぼす影響を解析した。タンパク質の発現およびリン酸化を指標とした活性については、Western blotting により評価した。

4. 研究成果

まず、LM217 細胞、LM205 細胞、NHDF 細胞を用いて、低酸素状態が ATM、DNA-PKcs に及ぼす影響を検討した。その結果、いずれの細胞株においても低酸素処理をして 24 時間後に、ATM、DNA-PKcs の発現およびリン酸化が亢進した(図 1)。0.05% 未満の低酸素状態では、ATM、DNA-PKcs の発現量は増加し、活性化することが示唆された。

次に、低酸素状態に応答する DNA 修復酵素の上流因子の探索を行った。低酸素処理が、がん原遺伝子チロシンプロテインキナーゼ(Src) や、生存シグナル Akt、エネルギーセンサー AMPK の発現および活性に与える影響を確認したところ、Src、Caveolin-1、EGFR、PDK1、Akt、AMPKα の発現およびリン酸化が亢進した(図 2)。Caveolin-1 や EGFR は Src と、PDK1 は Akt と直接相互作用し活性化するタンパク質として知られていることから、Src および Akt は、低酸素状態で活性化していることが示唆された。一方、mTOR の発現および活性は抑制された。pS2448-mTOR は、AMPKα の活性化に依存して抑制されることが知られていることから、AMPKα は低酸素状態で活性化することが示唆された。

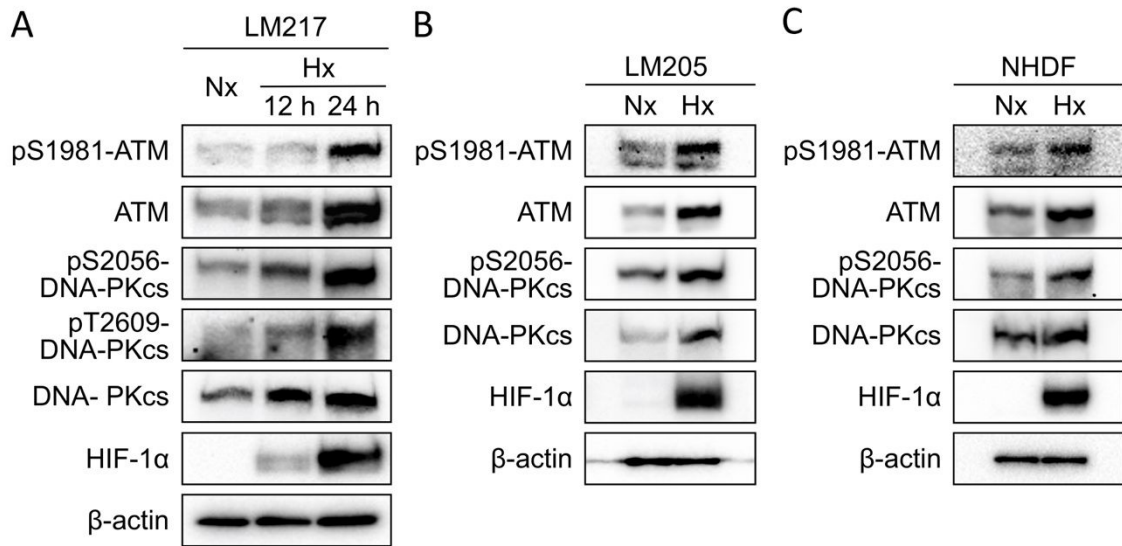


図1 . 低酸素状態が ATM、DNA-PKcs に与える影響。

A: LM217 細胞において、低酸素処理（12 時間、24 時間）が ATM、DNA-PKcs に与える影響。B: LM205 細胞において、低酸素処理が ATM、DNA-PKcs に与える影響。C: NHDF 細胞において、低酸素処理が ATM、DNA-PKcs に与える影響。Nx; Normoxia. Hx; Hypoxia.

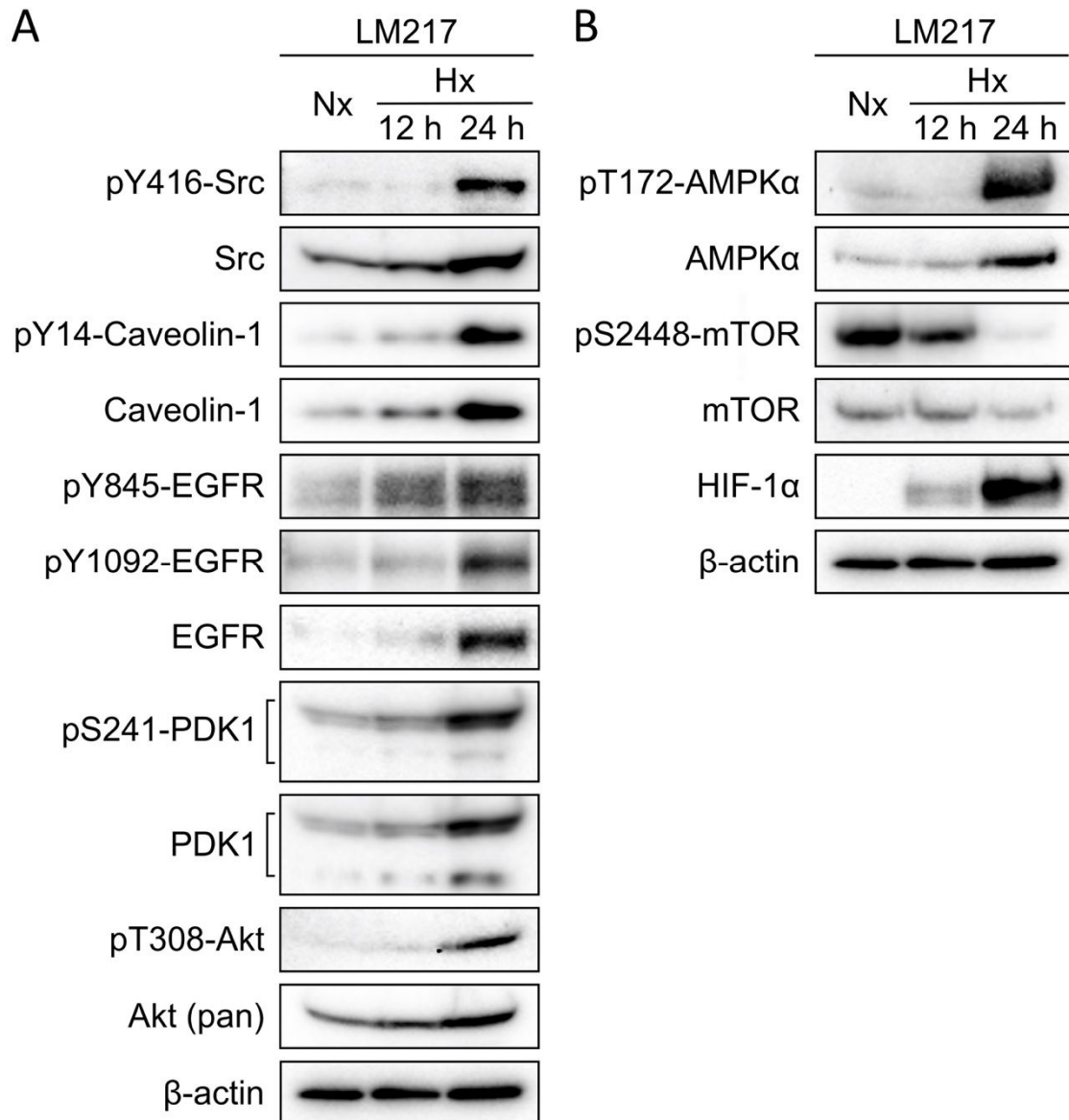


図2 . 低酸素状態が Src、Caveolin-1、EGFR、PDK1、Akt、AMPK、および mTOR に与える影響。

A: LM217 細胞において、低酸素処理（12 時間、24 時間）が Src, Caveolin-1, EGFR, PDK1, Akt に与える影響。B: LM217 細胞において、低酸素処理が AMPK, mTOR に与える影響。Nx; Normoxia. Hx; Hypoxia.

Src ファミリー特異的な阻害剤である PP2 を添加し低酸素処理をしたところ、ATM、DNA-PKcs、Caveolin-1、EGFR、PDK1、Akt のリン酸化の亢進は抑制された（図 3 A）。また、AMPK α をターゲットとした siRNA で処理し低酸素処理をしたところ、低酸素状態において ATM、DNA-PKcs のリン酸化の亢進は抑制された（図 3 B）。低酸素状態における ATM、DNA-PKcs の活性化の制御は、AMPK α や Src シグナル伝達経路を介していることが示唆された（図 4）。また、ATM については、低酸素状態における発現の亢進も AMPK α のノックダウンにより抑制された（図 3 B）。低酸素状態において、ATM と DNA-PKcs は異なる分子機構により発現制御が行われている可能性がある。

以上のことから、0.05%未満の低酸素状態では、DNA 二重鎖切断修復酵素である ATM や DNA-PKcs の発現および活性が亢進し、それら活性化は Src や AMPK α を介したシグナル伝達経路に依存していることが明らかになった。ATM や DNA-PKcs は放射線照射によって誘導される DNA 二本鎖切断修復に重要な役割を担うことから、低酸素状態の腫瘍細胞においても、Src や AMPK α を介した ATM、DNA-PKcs の活性化の制御機構が細胞の放射線抵抗性に関与している可能性が考えられる。

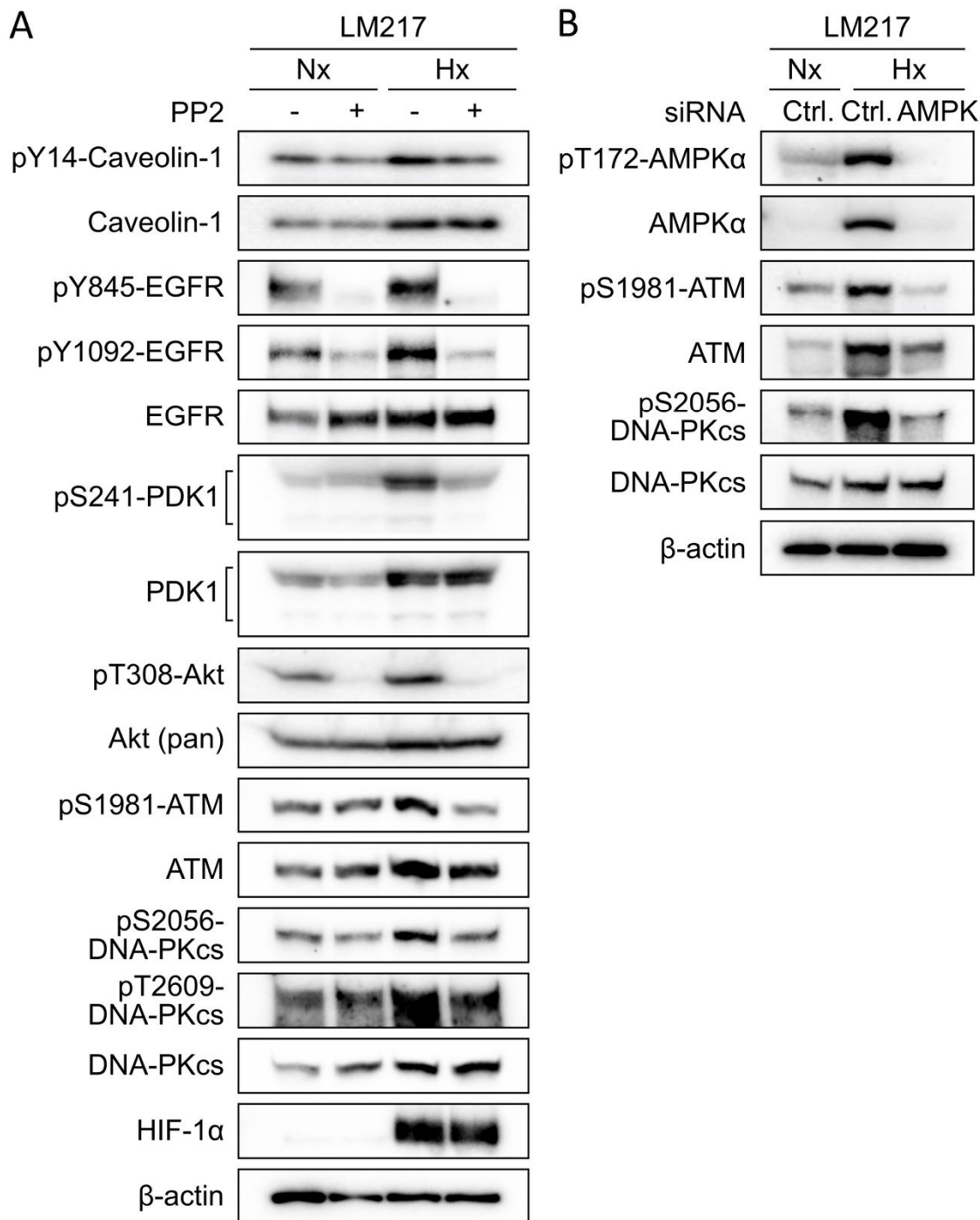


図3 . 低酸素状態において、Src ファミリー特異的な阻害剤である PP2 または、AMPK α をターゲットとした siRNA が ATM および DNA-PKcs に与える影響。
 A: LM217 細胞において、Src ファミリー特異的な阻害剤 PP2 を添加後の低酸素処理 (24 時間) が ATM, DNA-PKcs に与える影響。B: LM217 細胞において、AMPK をターゲットとした siRNA の処理および低酸素処理 (24 時間) が ATM, DNA-PKcs に与える影響。Ctrl; Control. Nx; Normoxia. Hx; Hypoxia.

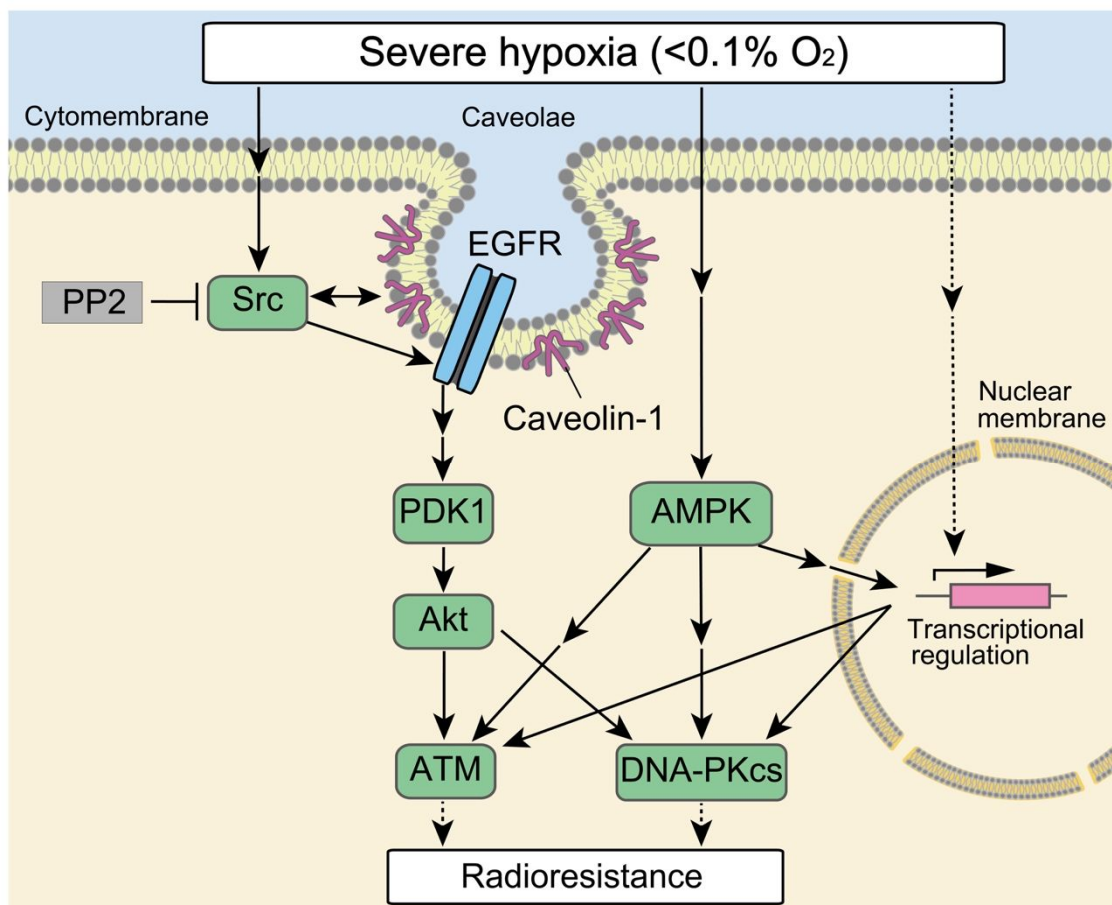


図4 . 低酸素状態において、Src または AMPK α を介して ATM および DNA-PKcs を制御するシグナル伝達経路のモデル図

引用文献

E.M. Hammond et al., Clin. Oncol, 26: 277-288, 2014.
 Harada H. J. Radiat. Res., 52: 545-556, 2011.
 Y. Murata, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 495: 2566-2572, 2018.
 Hall EJ. et al., Radiobiology for the Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
 M.M. Olcina et al., Mol. Cell. Oncol., 1: e29903, 2014.
 Bouquet F. et al., J. Cell Sci., 124: 1943-1951, 2011.
 Minakata K. et al., Cancer Sci., 103: 1946-1954, 2012.
 Bencokova Z. et al., Mol. Cell Biol., 29: 526-537, 2009.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Murata Yasuhiko, Hashimoto Takuma, Urushihara Yusuke, Shiga Soichiro, Takeda Kazuya, Jingu Keiichi, Hosoi Yoshio, Knockdown of AMPK α decreases ATM expression and increases radiosensitivity under hypoxia and nutrient starvation in an SV40-transformed human fibroblast cell line, LM217, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、495、2018、2566-2572
 10.1016/j.bbrc.2017.12.141

Hashimoto Takuma, Murata Yasuhiko, Urushihara Yusuke, Shiga Soichiro, Takeda Kazuya, Hosoi Yoshio, Severe hypoxia increases expression of ATM and DNA-PKcs and it increases their activities through Src and AMPK signaling pathways, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、505、2018、13-19
 10.1016/j.bbrc.2018.09.068

〔学会発表〕(計3件)

武田 一也、村田 泰彦、橋本 拓磨、漆原 佑介、志賀 壮一郎、神宮 啓一、細井 義夫、低酸素・低栄養環境下における DNA-PKcs を介した Hsp90 α のリン酸化制御機構、創生応用医学研究センター 第1回若手研究者交流会、2018年

橋本 拓磨、村田 泰彦、漆原 佑介、志賀 壮一郎、武田 一也、細井 義夫、低酸素状態が ATM と DNA-PKcs の発現と活性化に及ぼす影響、日本放射線影響学会第61回大会、2018年

村田 泰彦、橋本 拓磨、漆原 佑介、志賀 壮一郎、細井 義夫、低栄養状態において活性化された DNA-PKcs によるゴルジ体膜タンパク質 GOLPH3 の制御、日本放射線影響学会第61回大会、2018年

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/t.hashimoto>

<http://www.radbio.med.tohoku.ac.jp/index.html>