

令和元年5月29日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15026

研究課題名(和文)放射線増感作用を有する新規分子標的薬の探索

研究課題名(英文) Screening for radiosensitizing molecular target drug

研究代表者

小野寺 貴恵(山内貴恵)(ONODERA, Takae)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・特任研究員

研究者番号：20535736

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文): これまでに当研究室で放射線増感の新たな標的分子候補として見出されたAPOBEC3G(A3G)について、そのノックダウンにおける放射線増感の検証を行った。A3Gノックダウンを行うことで特定のがん細胞株において、線感受性の亢進が認められ、A3Gの機能阻害が確かに放射線増感作用を示すことを明らかにした。また、A3GがDNA二本鎖切断修復に関与していることを示唆する結果が得られた。A3Gを阻害する低分子化合物探索のためのスクリーニング系の構築を行った。本研究課題にて構築したスクリーニング系を用いて検討を進めることで、A3Gを標的とした新規放射線増感剤の同定につながる事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の放射線感受性を選択的に増強する放射線増感剤は、放射線治療と併用することで治療効果を高める効果が期待されるが、現時点では臨床に定着した増感剤はほとんどない。本研究では、これまでに申請者の所属する研究室で行われた研究結果から標的候補として見出されたAPOBEC3Gが放射線増感の標的として有効であることを示した。また、今後、臨床研究に展開できる放射線増感剤が見出せれば、放射線治療成績の向上に大きく貢献できると期待される。また、APOBEC3G阻害剤は医療への応用だけではなく、基礎研究でも利用できるものであり、様々な分野への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文): In our previous research, APOBEC3G was identified as a new target molecule for radiosensitization. In the current study, validation of this finding was carried out. Repression of APOBEC3G expression with siRNA increased the sensitivity of specific cancer cell lines to irradiation. Furthermore, flow cytometric study suggested that APOBEC3G is involved in DNA double-strand break repair. These results show that APOBEC3G is a potential target gene for radiosensitization. In addition, fluorescence-based screening assay for identifying small molecule inhibitors of APOBEC3G was prepared.

研究分野：生化学、腫瘍学、分子生物学

キーワード：放射線増感 APOBEC3G

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

1. 研究開始当初の背景

がん治療において手術、化学療法と並ぶ三大療法の一つである放射線治療は、がん細胞に DNA 損傷を与えて細胞死を誘発することを目的に行われ、近年では高精度の放射線技術の開発による物理的精度の向上により治療成績も向上している。放射線治療が適用される患者数は増加しており、手術や化学療法と比較して侵襲性が低く身体的負担も小さいことから、今後さらにその重要性が増すことが期待される。しかしながら、人体に照射できる照射線量には限界があり、限界まで照射した場合でも完全に腫瘍を縮退できない場合もある。放射線増感剤は腫瘍の放射線感受性を選択的に増強することから、放射線治療と併用することで放射線による治療効果を高める効果を持つ薬剤であり、放射線増感剤を使用することで照射量、投与量の低減化による副作用の減少や局所制御率の向上につながると期待される。しかしながら現時点では臨床に定着した増感剤はほとんどない。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、申請者の所属する研究室ではこれまでに広く網羅的に増感標的遺伝子の検索を行っており、shRNA library をトランスフェクションしたがん細胞に 線を照射した後にマイクロアレイ解析を行い、ノックダウンにより放射線増感を示した遺伝子群を機能ネットワーククラスターによりさらに解析することで、複数の標的候補遺伝子を得ている。得られた候補遺伝子の中でも *APOBEC3G* は放射線の主作用である DNA 二本鎖切断修復との関連が近年明らかになりつつあることから、放射線増感の標的候補として有力であると期待される。そこで、本研究では *APOBEC3G* に着目し、その機能阻害下における放射線増感作用の検証と分子標的放射線増感剤としての応用を目指した阻害剤スクリーニング系の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *APOBEC3G* の機能阻害：*APOBEC3G* の機能阻害は、siRNA により *APOBEC3G* の発現を抑制することにより行なった。qRT-PCR により *APOBEC3G* の発現が抑制されていることを確認した。

(2) コロニー形成法：解析対象の細胞を 6 well plate に播種した後に 線を照射し、10 日間培養した。4%中性緩衝ホルマリンで固定し、クリスタルバイオレットで染色した後、50 細胞以上からなるコロニー数を計数することで細胞生存率を解析した。

(3) 細胞周期解析：解析対象の細胞を ethanol 固定し、propidium iodide で DNA を染色した。FACS を用いて染色した細胞の細胞周期の比率を測定した。

(4) *APOBEC3G* 阻害剤スクリーニング系の構築：スクリーニングに用いる *APOBEC3G* は大腸菌発現系により調製した。また、当初計画ではポリアクリルアミド電気泳動を用いて基質 DNA の移動度を比較することにより酵素活性を測定する予定であったが、両末端を蛍光標識した DNA を基質として用い、基質の FRET の有無を測定することによる活性測定法に変更し、スクリーニング系の構築を行った。

4. 研究成果

APOBEC3G 発現量と放射線抵抗性の相関関係：これまでの研究で、11 株の複数のがん種を含むヒト由来がん細胞株を対象に *APOBEC3G* の発現レベルを qRT-PCR により解析したところ、約 70% の細胞株で高い発現レベルを示すことが明らかになっている。リンパ腫細胞株において *APOBEC3G* の発現量と放射線抵抗性が正の相関を示すことが報告されていることから、*APOBEC3G* 発現量ががん細胞において放射線感受性を推定するバイオマーカーになりうるかを検証するため、数種類の固形がん細胞株について *APOBEC3G* の発現量と放射線抵抗性の相関を解析したところ、弱い正の相関関係が認められた。

コロニー形成法による *APOBEC3G* 発現抑制下における放射線増感効果の評価：siRNA による *APOBEC3G* のノックダウン条件下において、肺がん細胞株や悪性黒色腫細胞株を含む特定のがん細胞株がガンマ線照射に対して増感効果を示すことがコロニー形成法において認められた。しかしながら、発現抑制した際の放射線増感の度合いは各細胞の無処理状態における *APOBEC3G* 発現量には依存せず、一部の細胞株では *APOBEC3G* の発現抑制は放射線感受性に影響を与えなかった。*APOBEC3G* の機能阻害による放射線増感効果の有無を決定づける要因は、本研究を応用に展開する際に必要な知見となると考えられ、今後解明が必要な課題である。

APOBEC3G の発現抑制と 線照射による細胞周期への影響の解析：*APOBEC3G* は DNA 二本鎖切断修復に関与すると報告されていることから、*APOBEC3G* の発現抑制による放射線増感効果は DNA の修復阻害に起因する可能性が考えられる。*APOBEC3G* ノックダウン下で 線照射を行なった際の細胞周期解析を行なったところ、*APOBEC3G* ノックダウン条件下の細胞では G2/M 期で停止している細胞の割合が増加していたことから、ガンマ線照射後の DNA 修復応答が阻害されている可能性が示された。

APOBEC3G 阻害剤スクリーニング系の構築：まず、活性測定に用いる APOBEC3G タンパク質全長（A3G）と、活性ドメインのみを含む C 末端側ドメイン（A3G-CD2）の二種類の調製を試みた。実験当初、A3G、A3G-CD2 はともに大腸菌内で封入体として発現したが、コンストラクトや発現条件を検討して最適化することで、可溶性のタンパク質として大量に発現させる発現条件を決定することが出来た。

次に、APOBEC3G 阻害剤スクリーニング系の構築を行った。当初計画ではポリアクリルアミド電気泳動を用いて基質 DNA の移動度を比較することにより酵素活性を測定する予定であったが、両末端を蛍光標識した DNA を基質とし、基質の FRET を測定することによる活性測定法に変更した。FRET を用いる方法では酵素反応から検出までを同一プレート上で行うことができることや、電気泳動を用いる方法よりも少量の試薬での実験が可能であることから、当初計画よりも短時間で多数のサンプルの酵素活性を定量的に測定することが可能となり、より効率的なスクリーニング系を構築することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 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：がん治療における放射線増感標的遺伝子の包括的探索の研究、第 37 回分子病理学研究会、2018
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、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017

〔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：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：今道 祥二
ローマ字氏名：IMAMICHI, Shoji
研究協力者氏名：菊原 颯太
ローマ字氏名：KIKUHARA, Sota

研究協力者氏名：佐々木 由香
ローマ字氏名：SASAKI, Yuka
研究協力者氏名：藤森 浩彰
ローマ字氏名：FUJIMORI, Hiroaki
研究協力者氏名：益谷 美都子
ローマ字氏名：MASUTANI, Mitsuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。