

令和元年6月6日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16479

研究課題名（和文）放射線防護剤・抗がん剤開発を目指した新しい発がんメカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of new radiation carcinogenic mechanisms for the purpose of development of radiation protective and anticancer agents

研究代表者

齋藤 陽平（SAITO, YOHEI）

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10613698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：放射線被曝に対するがん化リスクの大きさは、疫学だけではなく細胞レベルの解析においてもDNA損傷修復機構や突然変異率の変化の解析などこれまで広く研究されてきた。本研究では、放射線が直接的な遺伝子への損傷だけではなく、二次的な遺伝子損傷によって突然変異やがん化に寄与すると考え研究を行った。がんリスク要因や悪性化促進因子として考えられているAPOBEC3Bは、がん細胞に対する放射線による突然変異に強く影響していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって、放射線により生き残った細胞が突然変異しやすくなること、放射線照射後に抗がん剤や放射線に対して抵抗性の獲得した細胞が出現することに対する細胞レベルでの作用機序の一部が明らかになった。今後、更なる解析を続けることで放射線のがん化リスクの評価や解析だけではなく、放射線治療におけるがん細胞の放射線や抗がん剤抵抗性を含む悪性化の抑制を可能とする治療や創薬につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Rising cancer risk from radiation has been widely studied not only in epidemiology but also in cell level analysis including changes in DNA damage repair mechanisms and mutation rates. We considered that radiation contributes not only to direct DNA damage but also to indirect DNA damage to mutation via APOBEC3. In this study, APOBEC3B, which is a cancer risk factor and an accelerator for malignant transformation, has been shown to strongly influence mutations caused by radiation on cancer cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 突然変異 APOBEC3

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線による被曝は、がんリスクを上昇させる。しかし、被曝後すぐにがんが発生するわけではなく、その他のがんリスクファクターと同様に将来のリスクを上昇させるだけである。放射線によるがんリスクへの寄与は、細胞レベルではDNAの損傷修復を起因とする突然変異の増加に依存する。放射線照射後、正常な修復が行われないと、細胞死や突然変異が引き起こされる。放射線照射による染色体異常や遺伝子突然変異の解析は、今日まで広く行われてきた。放射線によるDNA損傷形態は様々であるが、放射線に誘発された遺伝子突然変異の多くは欠失による変異が含まれる。そしてその原因となる非同相末端結合(NHEJ)などによる修復機構なども明らかになってきている。しかしながら、放射線によるがんへの寄与は、放射線による遺伝子の欠失だけでなく、更なる要因による遺伝子の突然変異が必要だと考えられているが、その詳細はわかっていない。したがって放射線被曝によるがんリスクは、例えば、単に修復されなかった遺伝子損傷の数のみで決定されるわけではないのだろう。

(2) 放射線照射は、細胞周期やアポトーシス制御などの放射線応答に関与する転写因子の活性化や多くの遺伝子の発現を変動させることが報告されている。この放射線応答が正常に働かないと細胞死や突然変異の増加に繋がる。本研究を始めるのにあたり、我々は放射線照射を繰り返すことでDNA修復能が高く放射線耐性を持つに至ったがん細胞株(臨床的放射線耐性細胞株 HepG2-8960-R¹)においてAPOBEC3Bの発現が高いこと、さらに放射線照射後の複数のがん細胞において、APOBEC3Bを含むAPOBEC3ファミリーの発現が著しく上昇することを見出した。

(3) APOBEC3はC(シチジン)からU(ウリジン)への脱アミノ作用を媒介するシチジンデアミナーゼの一つであり、そのファミリー分子が様々なウイルスに対する抗ウイルス因子として働く事が知られていた。近年の網羅的ゲノムシーケンスによって、乳がんなどにはkataegisという特徴的なゲノムDNAの突然変異パターンがあり、この変異を誘導する因子としてAPOBEC3Bの関与が考えられている。がん細胞における突然変異パターンは、変異因子やその変異メカニズムの違いより一定の傾向を示す。がん細胞におけるAPOBEC3Bの高発現はGC>AT変異と相関があり、DNA複製時にラギング鎖に変異が導入されると考えられている。しかしながら、放射線被曝とAPOBEC3によるがんリスクの関与は不明であった。

2. 研究の目的

(1) 放射線によるがんリスクは、がん化に向かう細胞の蓄積する突然変異の一部に、放射線によるDNA損傷部位の突然変異が上乘せされることに原因があると考えられている。しかしながら、本研究では、放射線による突然変異の一部は、放射線によって発現量が増加したAPOBEC3Bによって突然変異が増幅されている可能性を考え、これを検証した。

3. 研究の方法

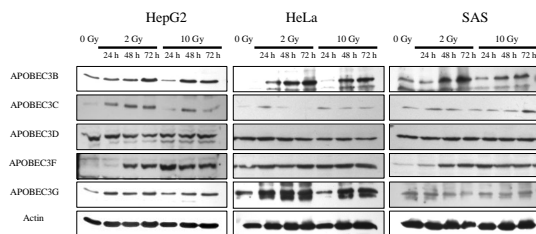
(1) APOBEC3B KO細胞およびAPOBEC3B過剰発現細胞を用い、放射線照射による突然変異への影響をHPRT突然変異試験を用い調査した。また、APOBEC3B-GFP発現ベクターの作製と放射線照射後の同タンパク質の発現細胞の細胞内局在化について調査した。

4. 研究成果

(1) 放射線照射によりAPOBEC3Bを含むAPOBEC3ファミリーのmRNAの発現変動を確認するため、HepG2-8960Rの親株であるHepG2、ヒト子宮頸がん上皮細胞HeLa、ヒト口腔扁平上皮がん細胞SASを用いて、10 Gy (Gy/min)のX線照射を行った。照射後6、24時間でAPOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3Fの発現はすべての細胞において約2倍以上上昇した。APOBEC3GはHepG2のみで上昇したが、HeLa、SASではPCRによる増幅が確認できなかった。APOBEC3Dは、HepG2、HeLaではほとんど変化ないか、SASでは低下する傾向にあった。APOBEC3A、APOBEC3Hでは、有意な増加は確認できなかった。次にタンパク質の発現量を確認するため、2 or 10 Gyの放射線照射後24、48、72時間後の細胞を回収しウエスタンブロットを行った。APOBEC3Bは、全ての細胞で放射線照射後24-72時間の間で発現が上昇していた。APOBEC3Cは、HepG2では照射後に上昇するが、HeLa、SASでは大きな上昇は見られなかった。APOBEC3Dは、全ての細胞で放射線照射による影響は見られなかった。APOBEC3Fは、HepG2、SASでは、放射線照射により上昇する。24時間後に、2 Gyでは、わずかな上昇しか見られないが、10 Gyでは、著しい上昇が見られた。その後、72時間後でも発現は高いままであった。HeLaでは、大きな変化は見られなかった。APOBEC3Gは、HepG2、HeLaでは、照射に応答して上昇した。SASは、大きな変化は見られなかった。放射線に応答し3つ全ての細胞に共通して上昇したのは、APOBEC3Bのみであった。

(2) 放射線照射後のAPOBEC3ファミリーの発現上昇は、自然突然変異率に影響を与えることが考えられる。*in vitro*においてAPOBEC3Bの発現やshRNAによる抑制が、突然変異率に影響を

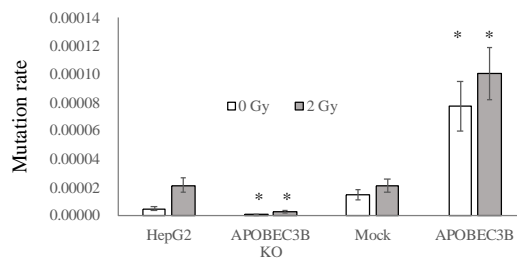
与えることが報告されている。本研究では、放射線照射による APOBEC3B の発現上昇が、放射線照射後の突然変異率の上昇に寄与するかを調べるため、HepG2 を用いて CRISPR Cas9 を介したゲノム編集により APOBEC3B をノックアウトした細胞を作成した。A3B ノックアウトの確認は、編集領域付近の PCR で増幅が見られないこと及びウエスタンブロットによる APOBEC3B タンパク質の発現が見られないことで確認した。



ウエスタンブロットによる APOBEC3B タンパク質の発現が見られないこと

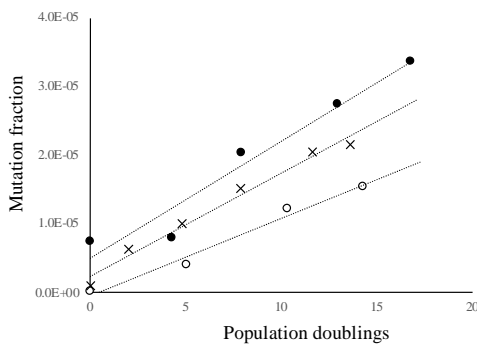
(3) APOBEC3B は、G:C > A:T 変異を引き起こすが、近傍の塩基に対する配列特異性があることが報告されている。放射線による APOBEC3B の上昇による突然変異が引き起こされるなら、放射線照射後の突然変異の中に APOBEC3B ターゲット配列の G:C > A:T 変異が含まれており、KO 細胞ではそれが見られないことになる。HPRT deficiency は、Lesch-Nyhan disease の原因となるため、HPRT 遺伝子の変異パターンが調べられている。これらのデータや HPRT 試験の多くの論文において、一塩基置換の G:C > A:T 変異があり、APOBEC3B のターゲット配列の変異も存在する。これは、APOBEC3B による突然変異により HPRT deficiency の可能性があるということである。そこで、本研究では、APOBEC3B の発現による突然変異について、HPRT 遺伝子の変異を指標とした突然変異試験を行った。

(4) 親株として用いた HepG2 は、放射線照射前にも低レベルの APOBEC3B の発現は認められる。従って APOBEC3B KO 細胞では親株と比べて自然突然変異率がわずかに低下すると考えられる。そこでまず自然突然変異率の測定を行った。HepG2 と APOBEC3B KO 細胞は、HAT 添加培地で 2 週間以上培養し、HPRT 遺伝子変異細胞を除去した。次に細胞分裂回数と 6TG 添加により HPRT 遺伝子の自然突然変異頻度を定期的に測定した。回帰分析で傾き (mutation rate) を求めたところ、HepG2 $1.68 \pm 0.23 \times 10^{-6}$ 、APOBEC3B KO $1.13 \pm 0.10 \times 10^{-6}$ という結果が得られ、APOBEC3B KO は、有意に自然突然変異率を低下させることがわかった。CRISPR-Cas9 処理が与える影響を見るため、ゲノム編集と同様の操作をしてできた細胞のうち Cas9 が安定的に高発現している細胞株をコントロールとして用いた。HepG2 より突然変異率は低下するが、APOBEC3B KO ほどは低下しなかったことがわかった。



(5) APOBEC3B の高発現は細胞生存率を低下させることが報告されている。確かに APOBEC3B の非照射群において細胞生存率が若干低下する。さらに抗がん剤に対する抵抗性を調べたところ、APOBEC3B KO 細胞では、いくつかの抗がん剤に対する抵抗性が低下することが明らかになった。また APOBEC3B の自然突然変異率を測定する実験において、6TG 耐性となった HPRT 変異細胞は、コロニーがある程度大きくなってから増殖が停止してしまう (増殖死) が多く見られるだけではなく、実験ごとのバラツキが大きく、この実験では自然突然変異率を求めることはできなかった。放射線照射後の細胞生存率は、5 Gy 照射後、APOBEC3B KO 細胞は生存率が低下し、APOBEC3B 発現細胞では、わずかに高くなった。10 Gy 照射では、どの細胞生存率にも有意差はなかった。

(6) 放射線照射による突然変異の増加は、照射後一週間の発現期間ののち、HPRT 法により解析した。HepG2 は、非照射群で 4.84×10^{-6} であり、2 Gy の放射線照射により 2.16×10^{-5} まで上昇した。APOBEC3B KO は非照射群で 6.46×10^{-7} であり、照射しても 2.70×10^{-6} までしか上昇しない。APOBEC3B KO 細胞は、放射線照射による APOBEC3B の発現誘導がない。したがって、この結果は、放射線照射後の突然変異形成の過程で APOBEC3B の関与があることを示している。また APOBEC3B の過剰発現は、非照射群で 7.76×10^{-5} と著しく上昇しており、放射線照射により 1.01×10^{-4} と上昇するが、統計的な有意差は見られなかった。Mock で親株と比べ少し突然変異率が上昇したのは、plasmid を導入したことによるゲノム不安定性が影響したのかもしれない。



(7) APOBEC3B は、シチジンデアミナーゼ活性を持っており、一本鎖 DNA の C>U に変化させる作用がある。APOBEC3B は、その発現の高いがん細胞や *in vitro* の研究によりゲノム内への修

飾作用も示されている。放射線照射による HPRT 遺伝子に突然変異に APOBEC3B のシチジンデアミナーゼ活性が寄与しているかを調べるため、HPRT 遺伝子の変異パターンを調べた。最初に 9 つの exon の有無を PCR を用い調べた。HepG2、Mock、APOBEC3B では、大きな欠失のないクローンは、それぞれ非照射群で 64%、54%、54%だったのに対し、APOBEC3B KO は 4%だった。つまり APOBEC3B KO では、一塩基置換や短い欠失挿入は起こりにくい。2 Gy の照射により、HepG2、Mock、APOBEC3B、APOBEC3B KO の欠失のないクローンは、30%、19%、23%、15%だった。さらに、一塩基置換なのか短い欠失挿入なのかを調べるため、全ての exon の検出ができたクローンの exon の DNA シーケンス解析を行った。これらの変異のいくつかは、Lesch-Nyhan disease の患者に見られた変異と同様のものもあった。APOBEC3B の発現にかかわらず、検出された点変異に特定の傾向が見られることなかった。これは、予測の範囲内であった。もし、放射線により発現が増加した APOBEC3B のシチジンデアミナーゼ活性により、放射線照射後の突然変異が影響されるなら、既に点変異に偏りがあることが報告されているはずである。APOBEC3B の発現増加は、一塩基置換や欠失挿入を増加させた。逆に APOBEC3B KO は、親株と比べて放射線照射後の突然変異、特に一塩基置換を著しく抑制した。これらの結果は、放射線によって増加した APOBEC3B が DNA 変異を引き起こすというより、APOBEC3B が放射線による DNA 修復に干渉している可能性があることを示唆していると考えた。

(8) そこで APOBEC3B の発現が DNA 修復に影響するかを調べた。5 Gy の放射線照射後、DNA 損傷修復の指標として核あたりの H2AX の数をイメージングアナライザーにより継続的に数えた (400 -1200 cells/ samples)。放射線照射 30 分後 HepG2 は 29.78/nucleus であり、1 時間後には 24.18/nucleus に低下するが、APOBEC3BKO は、29.43/nucleus から 29.18/nucleus になり、あまり低下しなかった。その後、24 時間後には、HepG2、APOBEC3BKO は、5.73/nucleus、7.92/nucleus となった。また、Mock、APOBEC3B は、照射後 30 分にそれぞれ 30.03/nucleus、27.40/nucleus であり、1 時間後は、26.16/nucleus、23.03/nucleus だった。APOBEC3B KO は、放射線照射から 1 時間以内の修復が遅延する。逆に APOBEC3B は、修復が早くなった。全ての細胞は、48 時間後では修復が進んでおり、APOBEC3B の発現による影響は大きくはなかった。

(9) 本研究では、がん細胞において放射線照射による DNA 損傷修復や突然変異に APOBEC3B が影響していることを示した。本研究の結果は、APOBEC3B を標的とした新しい放射線防護剤、放射線増感剤、抗がん剤開発の基礎となる。

〔引用文献〕

- 1) Kuwahara Y、Li L、Baba T、Nakagawa H、Shimura T、Yamamoto Y、Ohkubo Y、Fukumoto M. 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

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yoshikazu Kuwahara、Mehryar Habibi Roudkenar、Yusuke Urushihara、Yohei Saito、Kazuo Tomita、Amaneh Mohammadi Roushandeh、Tomoaki Sato、Akihiro Kurimasa、Manabu Fukumoto、Clinically relevant radioresistant cell line: a simple model to understand cancer Radioresistance、*Medical Molecular Morphology*、査読有、Vol. 50、2017、pp.195-204
DOI: 10.1007/s00795-017-0171-x

Yoshikazu Kuwahara、Mehryar Habibi Roudkenar、Yusuke Urushihara、Yohei Saito、Kazuo Tomita、Amaneh Mohammadi Roushandeh、Tomoaki Sato、Akihiro Kurimasa、Manabu Fukumoto. X-ray induced mutation frequency at the HPRT locus in clinically relevant radioresistant cells、*International Journal of Medical Physics、Clinical Engineering and Radiation Oncology*、査読有、Vol. 6、2017、pp.377-391
DOI: 10.4236/ijmpcero.2017.64034

Yohei Saito、Yoshikazu Kuwahara、Yamamoto Yumi、Manabu Fukumoto、Fumihiko Yamamoto、10% fat diet-fed ddY mice exhibit high p27KIP expression and delayed hepatocyte DNA synthesis during liver regeneration、*Metab Syndr Relat Disord*、査読有、Vol. 6、2018、pp.303-313
DOI: 10.1089/met.2017.0131

Yoshikazu Kuwahara、Kazuo Tomita、Shintaro Takahashi、Yusuke Urushihara、Yohei Saito、Mehryar Habibi Roudkenar、Amaneh Mohammadi Roushandeh、Tomoaki Sato、Akihiro Kurimasa、Manabu Fukumoto、Mitochondrial dysfunction in cross-resistance of clinically relevant radioresistant cells to X-rays and docetaxel、*J Cancer Sci Ther*、

査読有、Vol. 10、2018、pp.366-373
DOI: 10.4172/1948-5956.1000571

[学会発表](計3件)

齋藤陽平 他、放射線照射による突然変異に対する APOBEC の関与、第 40 回日本分子生物学会年会 神戸、2017 年 12 月

齋藤陽平 他、放射線照射によるがん細胞の突然変異に対する APOBEC 3 の影響、日本薬学会 第 139 年会、石川、2018 年 3 月

齋藤陽平 他、放射線照射による突然変異パターンに対する APOBEC3B の影響、第 41 回日本分子生物学会年会 横浜 2018 年 11 月

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。