

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390323  
 研究課題名（和文） 放射線感受性におけるヒストン修飾とゲノム損傷応答のリンケージ解析  
 研究課題名（英文） Investigation of linkage between histone modification and DNA damage after irradiation  
 研究代表者  
 晴山 雅人（HAREYAMA MASATO）  
 札幌医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：10173098

研究成果の概要（和文）：ヒストンメチル化によるヒストン修飾によって放射線感受性が変化することが明らかとなった。ヒストン修飾によって放射線感受性を人為的に変化させることが可能になることが期待される。また、放射線感受性に重要である放射線照射による DNA2 重鎖切断修復における相同組み換え（HR）と非相同末端結合（NHEJ）修復について分子生物学的な検討を行った。これらの結果より新規放射線治療のシーズとなりうる成果が得られたといえる。

研究成果の概要（英文）：This study clearly demonstrates that histone modulation, especially inhibition of histone methylation at lysine 20 in histone H4 via SUV420H2 knockdown, can increase radiosensitivity. Also, we have investigated how the ability of repair of DNA DSB influences cancer susceptibility and the radiosensitivity of tumors and normal tissues by focusing on the activity of 5-chloro-2, 4-dihydropyridine (Gimeracil) and DNA-PK. These may be useful for establishment of a novel radiotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：放射線腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：ヒストンメチル化、ヒストンアセチル化、ヒストンリン酸化、放射線感受性

### 1. 研究開始当初の背景

化学放射線療法は、放射線治療効果を高めることが明らかとなり、汎用されるようになってきたが、副作用の増大や対象となる癌種が限定される点など、解決すべき点もある。申請者らは、これらの問題点を解決すべく、

新規の併用薬剤としてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が有望であることを証明してきた。この併用によってがん細胞のクロマチン構造を変化させることにより、放射線照射後のアポトーシスが生じやすくなることを世界に先駆けて見出した (Cell Death Differ. 13:129-140, 2006; Apoptosis. 11:1349-1357,

2006; Int J Cancer. 110:301-308, 2004). 現在では、世界各地の研究グループから同様の成果が相次いで報告され、その重要性が認知されてきた。さらに、申請者らは、クロマチン構造の変化に伴う照射後のゲノム損傷自体の増加が感受性亢進に重要であることを証明した(Int J Radiat Oncol Biol Phys 65:859-866, 2006)。これらの研究成果から、クロマチン構造の違いが放射線感受性を決定する重要な因子であることが示唆される。また、ゲノムワイドにヒストン修飾の変化領域が解析できるようになってきた (Nat Protoc. 1:729-748, 2006) ことや、ヒストンメチル化などの修飾が与えるヒストン高次構造への関与が証明されてきたことが背景にある。本研究では、クロマチン修飾と放射線照射後のDNA傷害レベルの差異との相関を詳細に解析し、さらにヒストン修飾の改変による感受性の獲得を生み出すことに焦点を絞って解析することとした。さらに、新しい放射線増感であるギメラシルを用い放射線増感剤の分子メカニズムを検討した。

## 2. 研究の目的

本研究は、以下の3点に絞って研究を実施した。

1. クロマチン高次構造の違いと放射線感受性との因果関係を明らかにし、感受性を決定する重要な因子(ゲノム領域・ヒストン修飾)を明らかにすること。

2. 人為的にクロマチン高次構造を改変し、放射線感受性を亢進(さらに獲得)させる治療法を開発する基盤を築くこと。

3. DNA2重鎖切断修復における相同組み換え(HR)と非同源末端結合(NHEJ)修復について検討し放射線感受性のメカニズムを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞全体のヒストン修飾の評価

ヒストン修飾は、メチル化、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化と様々なバリエーションがあるが、本研究では、メチル化とアセチル化に焦点を絞って解析する。両者を認識する抗体は、すでに商品化されており、フローサイトメトリーを用いることによって客観的な評価ができる。すなわち、メチル化されたヒストン蛋白に特異的に結合する蛋白質HP-1 alphaをメルクマークとして評価する。HP1-alphaに対する抗体(Upstate社)は、ウェスタンブロット、免疫染色、免疫沈降のいずれにおいても、非常に良く反応する優れた抗体である。さらに抗メチル化ヒストンH3

及び抗メチル化ヒストンH4の抗体(同社)を用いて、両者のメチル化レベルの相違とHP1-alphaの発現との関連性を検討した。

(2) 特定遺伝子におけるヒストン修飾の評価

細胞全体的なヒストン修飾の解析から、特定の遺伝子領域へと絞って解析する。特定の遺伝子近傍におけるヒストン修飾の解析は、ChIPアッセイによって評価する。ターゲットとするヒストン修飾(用いる抗体)は、メチル化、アセチル化を中心に1の結果を踏まえながらダイナミックに決定してゆく。ターゲットとする遺伝子は、マルチコピー存在するリボソームrDNAと、DNA修復酵素の中からHSP70及びKu70の二つを予定している。マルチコピー遺伝子とtwo copy遺伝子との比較も興味深い。さらにシャペロン遺伝子近傍のヒストン修飾の挙動と放射線感受性との関連性も興味深い。これらの各遺伝子領域において数10箇所プライマーをデザインし、ChIPアッセイによって放射線感受性の違いとヒストン修飾との相関関係を詳細に調べた。

(3) ヒストンメチル化酵素のノックダウンによる放射線感受性への影響

申請者らは、特にヒストンメチル化をダイナミックに制御しているヒストンメチル化酵素の役割を重要視している。近年、多くのヒストンメチル化酵素が同定され、転写制御、X染色体の不活性化、ヘテロクロマチン形成、DNAメチル化の制御などの機能が明らかになってきた。この酵素群の中で、本研究では、Suv420Hに着目して解析を進める。Suv420Hは、ヌクレオゾーム内に存在するヒストンH4のリジン20をメチル化する。このメチル化は、DNA修復と密接に関わり、53BP1が特異的に結合する部位であることが証明されている(Cell 127:1361-1573, 2006)。そこで、Suv420H2をsiRNAによってノックダウンし、クロノジェニックアッセイなどを用いて放射線感受性への影響を詳細に検討する。

(4) ゲノムワイドにおけるヒストン修飾の評価

前年度の細胞全体からの結果など(ヒストンメチル化改変による影響)に基づいて、ChIP-on-chipアッセイを行う。ヒストンメチル化レベル(他の修飾も含め)が変化する遺伝子群をゲノムワイドの解析を行って特定する。焦点を絞って行った前年度の結果を検証するためにも重要であり、また将来のsiRNAを利用した治療法確立のために必須な基礎研究であると考えている。ChIP-on-Chipは、ChIPによって回収された

DNA断片をラベルし、ヒトゲノムChip 上にハイブリダイズさせ、ヒストン修飾の変化した領域を同定しうる方法である。

(5) 6種のヒト細胞株、4種類の齧歯類細胞株を用いS-1の一成分であるギメラシル放射線増感を検討した。コロニーアッセイ法、放射線誘発リン酸化ヒストン H2AX フォーカスの計測、DNA-PK アッセイ法、SCneo アッセイ法、細胞周期の同調などを行い検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞内ヒストン組成を変化させる Histone H2AX 及びそのバリエーション Histone H2AV を PCR を用いてクローニングした。PCR 産物を精製し、その発現ベクターを作製。複数の癌細胞に過剰発現し、その影響をみた。これまでの結果から、これらのヒストンの割合を変動させても放射線感受性に大きな影響を与えないことが判明した。さらに、この両ヒストンの修飾部位における点突然変異を有するクローンの作成を行った。ヒストン cDNA (野生型及び変異型) の発現ベクターを構築して過剰発現を行い、差違を検討したが、明らかな所見は得られなかった。

(2) 細胞内メチル化の変化  
メチル化ヒストン蛋白に特異的に結合する蛋白質 HP-1 alpha の発現が、様々な条件にて、変化することを見出した。特に酸化ストレス下におかれた細胞は、メチル化レベルが上昇するらしい。しかしながら、メチル化ヒストン H3 及び抗メチル化ヒストン H4 の抗体を用いた、ChIP アッセイを施行した結果では、特定できる遺伝子領域を同定できていない。したがって現時点では、明らかな放射線感受性との関連性は証明できていない。

(3) ヒストン H4 メチル化酵素のターゲティング  
本研究では、こうした観点から、放射線照射のターゲットである DNA の 3 次元的な構造へ影響を及ぼすヒストン構造に着目し、その修飾の違いと放射線感受性とのリンケージを解析した。複数のがん細胞へヒストン H4 K20 のメチル化酵素 Suv420H2 をターゲットとする siRNA の遺伝子導入後、放射線照射後に生じる DNA 2 重鎖切断を評価した。Suv420H2 は、ヌクレオゾーム内に存在するヒストン H4 のリジン 20 をメチル化する酵素である。DNA 2 重鎖切断は、リン酸化 H2AX に対する特異的抗体を用いて共焦点顕微鏡によって検出し、foci 形成の数によって評価した。その結果、いずれの細胞株においても、Suv420H2 発現の低下により、放射線照射後のヒストンのリン酸化 H2AX が持続

的に維持され、DNA 修復能が低下、もしくは DNA 損傷が増加することが判明した。

さらに、放射線照射後に再開される細胞分裂の時間を測定し、DNA 修復活性を評価した。この系においても Suv420H2 の抑制によって修復能が低下することが判明した。また、クロノジェニックアッセイにても同様な結果を得た。

すなわち、ヒストン H4 の K20 のメチル化は放射線照射後の DNA 修復に重要であることが判明した。ヒストン修飾と DNA 損傷との関わりを示した意義は高い。また、H4 K20 のメチル化は、p53BP の結合領域との報告があり、本実験結果との関わりも興味深い。

本研究の成果によって、ヒストンのエピジェネティックな調節により、放射線感受性を人為的に改変しうる可能性を提示できた意義は高い。今後はこれを発展させ、放射線治療にうまく組み込む手段を考案し、研究を進展させるべきと考えている。

(4) ギメラシルの放射線増感効果  
ギメラシルの添加時間・濃度と放射線増感効果の関係を調べたが、添加時間は 48 時間、濃度は 1.0mM に至るまで放射線増感効果が増加した。一方、実験を行った全ての細胞においてギメラシル単独での殺細胞効果は認められなかった。放射線照射後 1 時間で核内の H2AX フォーカス数は上昇し、ギメラシル添加群においてはコントロール群よりも H2AX フォーカスが多く残存し、DNA 二重鎖切断修復の遅延が示された。特に照射 24 時間後に有意な差を認めている。DNA-PK 活性欠損細胞においては、その親細胞と比較した場合に強い放射線増感効果を認めた。相同組み替え修復に欠損のある GM7166VA7 細胞においては、ギメラシルによる放射線増感効果は認められなかった。さらに、それぞれの周期にてギメラシルによる放射線増感効果をしらべたが、S 期に同調させた場合に最もギメラシルの放射線増感効果が高い事がわかった。従って、ギメラシルによる放射線増感効果は DNA 二重鎖切断修復経路の内、相同組み替え修復を阻害することにより起こる事が明らかになった。ギメラシルは実臨床上使用可能で放射線治療成績を改善することが可能な放射線増感剤である事が予想される。

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 9 件)

(1) Takagi M, Sakata K, Someya M, Tauchi

H, Iijima K, Matsumoto Y, Torigoe T, Takahashi A, Hareyama M. Gimeracil sensitizes cells to radiation via inhibition of homologous recombination. *Radiother Oncol*. 2010 (in print) 査読 有

(2) Adachi M, Liu Y, Fujii K, Calderwood SK, Nakai A, Imai K, Shinomura Y. Oxidative stress impairs the heat stress response and delays unfolded protein recovery. *PLoS One*. 4:1-11 2009 査読 有

(3) Liu Y, Adachi M, Zhao S, Hareyama M, Koong AC, Luo D, Rando TA, Imai K and Shinomura Y. Preventing oxidative stress: A new role for XBP1. *Cell Death Diff*. 16: 847-857, 2009 査読 有

(4) Wang W, Adachi M, Zhou J, and Zhu D. A novel combination therapy of arsenic trioxide with parthenolide against pancreatic cancer *Cells. Pancreas* 38:114-123, 2009 査読 有

(5) Sakata K, Someya M, Nagakura H, Nakata K, Oouchi A, Takagi M, Hareyama M. Brachytherapy for oral tongue cancer: An analysis of treatment results with various biological markers. *Jpn J Clin Oncol*. 38(6): 402-7, 2008 査読 有

(6) Adachi M, Sakamoto H, Kawamura R, Wang W, Imai K, Shinomura Y. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. *Histol Histopathol*. 22:437-442, 2007 査読 有

(7) Sakata K, Someya M, Matsumoto Y,

Hareyama M. Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity. *Radiat Med*. 25 (9):433-8, 2007 査読 有

(8) Sakata K, Yamamoto H, Matsumoto Y, Someya M, Hareyama M. cDNA analysis of gene expression associated with DNA-dependent protein kinase activity. *Int J Oncol*. 30(2):413-20. 2007 査読 有

(9) Someya M, Sakata K, Matsumoto Y, Tauchi H, Narimatsu H, Hareyama M. Association of DNA-PK activity and radiation-induced NBS1 foci formation in lymphocytes with clinical malignancy in breast cancer patients. *Oncol Rep*. 18(4):873-8. 2007 査読 有

(10) Sakata K, Yamamoto H, Matsumoto Y, Someya M, Hareyama M. cDNA analysis of gene expression associated with DNA-dependent protein kinase activity. *Int J Oncol*. 30(2):413-20. 2007 査読 有

[学会発表] (計 21 件)

(1) 坂田耕一、染谷正則、高木克、晴山雅人 低酸素及び再酸素状態での DNA-PK 活性について第 69 回日本医学放射線学会総会 2010 年 4 月 11 日 横浜

(2) 安達正晃 劉輝華 中井章 今井浩三 篠村恭久 酸化ストレスは、熱ショック後の蛋白質リフォールディング活性を抑制する 日本分子生物 学会年会 2009 年 12 月 10 日 横浜

(3) Takagi M, Sakata K, Someya M, Tauch H, Matsumoto Y, Torigoe T, Takahashi A, Hareyama M, Fukushima M. Examination of radiosensitization efficacy of Gimeracil. Annual Meeting of The American Society of Radiation Oncology Nov. 3, 2009 Chicago

(4) 高木克、坂田耕一、染谷正則、三浦勝利、小島一男、中田健生、晴山雅人、松本義久、田内広、福島正和 ギメラシルの放射線増感効果の分子生物学的検討 日本放射線腫瘍学会 第22回学術大会 2009年9月17日 京都

(5) 坂田耕一、染谷正則、高木克、中田健生、小島一男、晴山雅人、田内広、松本義久、福島正和 ギメラシルの放射線増感効果の分子メカニズムの検討 日本放射線腫瘍学会 第22回学術大会 2009年9月17日 京都

(6) 染谷正則、坂田耕一、高木克、晴山雅人、松本義久、田内広、福島正和 ギメラシルによる放射線増感効果の分子メカニズムの解析 第48回日本医学放射線学会生物部会学術大会 2009年7月10日 富山

(7) 高木克、坂田耕一、染谷正則、林潤一、小島一男、中田健生、晴山雅人、松本義久、田内広、福島正和 ギメラシルの放射線増感効果の検討 第33回日本頭頸部癌学会 2009年6月11日 札幌

(8) 安達正晃、劉 耀華、趙世光、Koong Albert, Rando Thomas, Dan Ruo, 今井浩三、篠村泰久 XBP1の新しい機能：酸化ストレス応答への関与 日本分子生物学会 年会 2008年12月11日 神戸

(9) Adachi M, Liu Y, Zhao S, Hareyama M, Koong A, Imai K and Shinomura Y. Preventing oxidative stress: A new role for XBP1 and its candidate as a molecular target for cancer. The 6<sup>th</sup> International Symposium on cancer research and therapy. Tokyo Nov 22, 2008

(10) 染谷正則、高木克、坂田耕一、晴山雅人、松本義久、田内広、福島正和 ギメラシルによる放射線増感効果の検討 第47回日本医学放射線学会生物部会学術大会 2008年6月20日 高知

(11) 安達正晃、劉 耀華、Koong Albert, 今井浩三、篠村泰久 XBP1の新しい機能 第17回日本癌病態治療研究会 2008年6月26日 京都

(12) 坂田耕一、染谷正則、高木克、中田健生、小島一男、晴山雅人、田内広、松本義久、福島正和 ギメラシルの放射線増感効果の分子メカニズム 第67回日本医学放射線学会総会 2008年4月5日 横浜

(13) 高木克、坂田耕一、染谷正則、林潤一、小島一男、中田健生、晴山雅人、松本義久、田内広、福島正和 分割照射や抗癌剤併用におけるギメラシルの放射線増感作用の検討 第67回日本医学放射線学会総会 2008年4月5日 横浜

(14) 染谷正則、高木克、小島一男、中田健生、坂田耕一、晴山雅人、田内広、松本義久、福島正和 ギメラシルの放射線増感作用の放射線誘発 H2AX フォーカスによる解析 第67回日本医学放射線学会総会 2008年4月5日 横浜

(15) 安達正晃、劉 耀華、今井浩三、篠村泰久 IL-2 シグナルと小胞体ストレスシグナル 日本分子生物学会年会 2007年12月14日 横浜

(16) 坂田耕一、染谷正則、高木克、中田健生、小島一男、晴山雅人、田内広、松本義久、福島正和 scneo レポーター法によるギメラシル放射線増感効果の検討 日本放射線腫瘍学会 第20回学術大会 2007年12月14日 福岡

(17) 染谷正則、高木克、小島一男、中田健生、坂田耕一、晴山雅人、田内広、松本義久、福島正和ギメラシルによる放射線誘発 rH2AX フォーカスの変化の検討 日本放射線腫瘍学会 第20回学術大会 2007年12月14日 福岡

(18) 中田健生、高木克、染谷正則、坂田耕一、晴山雅人、池田光、堀正和、大内敦 頭頸部癌化学放射線療法での TS1 使用経験 日本放射線腫瘍学会 第20回学術大会 2007年12月14日 福岡

(19) 高木克、小島一男、中田健生、染谷正則、坂田耕一、晴山雅人、松本義久、福島正和 DNA-PK 活性欠損細胞を用いたギメラシルの放射線増感作用の検討 日本放射線腫瘍学会 第20回学術大会 2007年12月14日 福岡

(20) 安達正晃、今井浩三、晴山雅人、篠村泰久 内在性ホルモンを利用した新たな放射線感受性亢進療法の開発 第16回日本癌病態治療研究会 2007年6月28日 東京

(21) 染谷正則、坂田耕一、松本義久、晴山雅人 乳癌患者におけるリンパ球 DNA-PK 活性、放射線誘発 NBS1 フォーカスと臨床的悪性度の関係 第66回日本医学放射線学会 2007年4月14日 横浜

〔図書〕(計 3件)

(1) 安達正晃 基質依存性増殖/アノイキス (Anoikis) 改訂 培養細胞実験ハンドブック 羊土社 135-138, 2008

(2) 安達正晃、遺伝子治療 看護のための最新医学講座 第2版 24巻 (腫瘍の臨床) 中山書店 215-227, 2008

(3) 染谷正則、晴山雅人、急性期の有害事象. 渋谷、晴山、平岡編. エビデンス放射線治療. 中外医学社 7-13. 2007

〔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

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

晴山 雅人 (HAREYAMA MASATO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10173098

### (2) 研究分担者

安達 正晃 (ADACHI MASA AKI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 70240926

坂田 耕一 (SAKATA KO-ICHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10235153