

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07734

研究課題名(和文)APOBEC3Gを分子標的とする新たな放射線増感剤の開発研究

研究課題名(英文)Development of a new radiosensitizer targeting APOBEC3G

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(歯学系)・助教

研究者番号：20535736

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、放射線増感の標的分子候補としてAPOBEC3Gに着目し、阻害剤スクリーニング系の構築および、APOBEC3G阻害による放射線増感の分子機序の解明を目的とした研究を行った。低分子化合物のAPOBEC3G阻害作用を評価するスクリーニング系を構築したが、活性を阻害する化合物の取得には至らなかった。

APOBEC3G阻害による放射線増感作用の分子機序の解析を並行して進め、特定のがん細胞株において、siRNAを用いたAPOBEC3Gノックダウン条件下では放射線照射によるDNA損傷に対する修復経路の活性化に遅延をもたらすことで放射線に対する感受性が亢進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに研究代表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が、その作用機序からも示された。今後、臨床研究に展開できるAPOBEC3G阻害剤が見出せれば、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は抗HIV因子としても広く研究されており、その阻害剤はがん治療だけではなく抗HIV研究など様々な分野への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文): APOBEC3G was identified as a new target molecule for radiosensitization in our laboratory. In this study, a screening system using the deaminase activity of APOBEC3G as an index was constructed to evaluate the inhibitory effect of small molecules. An attempt was made to increase the throughput and optimize the screening system. However, so far compounds that inhibit the enzymatic activity of APOBEC3G have not been identified. The molecular mechanism of radiosensitization by APOBEC3G inhibition was investigated. In a particular cancer cell line, the repair process for radiation-induced DNA damage was suggested to be delayed under APOBEC3G knockdown conditions, resulting in enhanced radiosensitivity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：APOBEC3G 放射線増感

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がん治療において、がん細胞に DNA 損傷を与えて細胞死を誘発する目的で放射線治療が行われており、物理的精度の向上により早期の肺がんや単発肝腫瘍などにおいて治療成績が向上している。一方、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し、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、照射量、投与量の低減化による副作用の減少や再発時にも十分な再照射が可能なことによる局所制御率の向上につながると期待される。しかし、臨床に定着した増感剤はほとんどないのが現状である。研究代表者の所属する研究室ではこれまでに、がんの放射線治療に有用な増感標的となる遺伝子を網羅的手法で見出すため、がん細胞株に shRNA library をトランスフェクションし、ガンマ線照射後にマイクロアレイ解析を行うことで複数の放射線増感標的候補遺伝子を同定している。放射線の主作用は DNA 二本鎖切断 (DSB) であり、放射線治療において DSB の修復応答を抑制することでがん細胞死を効率的に誘発することが期待されることから、本研究課題では放射線増感標的候補のうち、DSB 修復への関与が報告されている apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) が候補として有望であると考えられた。

2. 研究の目的

シチジンデアミナーゼである APOBEC3G は抗 HIV-1 因子として知られ、広く研究されているが、これまでに国内外において APOBEC3G 阻害剤の報告例はなかったことから、APOBEC3G を標的分子とし、放射線照射時において正常細胞の増殖に影響を与えずに特異的にがん細胞の放射線感受性を増感する分子標的薬を同定することによる放射線治療の新規増感法の開発を目指して研究を行った。また、APOBEC3G の機能阻害による放射線増感の作用機序は未解明であることから、創薬のターゲットサイトを絞り込むことを目的に、APOBEC3G 阻害によるガンマ線増感作用の分子機構の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) APOBEC3G 阻害剤スクリーニング系の構築

スクリーニングには APOBEC3G のデアミナーゼ活性ドメインを大腸菌発現系により発現させて調製したものをを用いた。両末端を蛍光標識した DNA を基質として用い、基質の FRET を測定することで低分子化合物の阻害作用を評価する阻害剤スクリーニング系を構築した。また、APOBEC3G タンパク質は X 線結晶構造解析や核磁気共鳴によりその立体構造や基質認識機構が解明されており、これら構造情報を利用した focused library を構築することでスクリーニングの効率化が期待できる。そこで、プロテインデータバンク (PDB) の提供する APOBEC3G の構造データを利用し、基質認識機構及び反応機構から酵素活性に必要なと思われるアミノ酸残基をピックアップし、その三次元配置をもとに阻害剤効果が期待される予測活性化化合物のデザインを試みた。

(2) APOBEC3G 機能阻害によるガンマ線増感作用の分子機構解析

これまでに、複数の固形がん細胞株を対象に siRNA を用いた APOBEC3G ノックダウン条件下における放射線増感を検証した結果、APOBEC3G の機能阻害によってガンマ線増感作用を示すことが明らかになっている肺がん細胞株の A549 細胞および膀胱がん細胞株の MIAPaCa2 細胞を対象とし、ガンマ線に対する増感作用の分子機構を解析した。

APOBEC3G 機能阻害: APOBEC3G 機能阻害は、siRNA を用いて APOBEC3G の発現を抑制することにより行った。RT-qPCR により APOBEC3G の発現が抑制されていることを確認した。

ウェスタンブロッティング: siRNA で APOBEC3G の発現を抑制した細胞にガンマ線を照射し、各種タンパク質の発現量およびタンパク質のリン酸化状態の変化をウェスタンブロッティングにより解析した。

細胞周期解析: ガンマ線を照射した細胞をエタノールにより固定し、propidium iodide (PI) を用いて DNA 染色を行った。フローサイトメトリーを用いて、染色した細胞の細胞周期の比率を測定した。

4．研究成果

AP0BEC3G のデアミナーゼ活性を指標として低分子の AP0BEC3G 阻害作用を評価するスクリーニング系を構築し、ハイスループット化や高感度化を目指したスクリーニング系の至適化を試みた。構造情報を利用した化合物ライブラリーを構築することによるスクリーニングの効率化等を検討したが、測定系の感度の問題などにより現在のところ AP0BEC3G のデアミナーゼ活性を阻害する有望な化合物の同定には至っていない。

また、AP0BEC3G ノックダウン条件下ではガンマ線照射後に MIA PaCa2 細胞では S 期、A549 細胞では G2/M 期で細胞周期の停止が誘導された。MiaPaCa2 細胞において AP0BEC3G ノックダウン条件下では DNA 二本鎖切断マーカーである γ H2AX の誘導がコントロールと比較して長期間持続しており、DNA 修復が遅延していることが示唆された。

これらの結果は、AP0BEC3G の機能阻害により DNA 修復経路の活性化に遅延をもたらすことによってがん細胞の放射線感受性が亢進することを示唆しており、AP0BEC3G ががん治療の放射線増感の標的として有用である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Tong Ying、Kikuhara Sota、Onodera Takae、Chen Lichao、Myat Aung Bhone、Imamichi Shoji、Sasaki Yuka、Murakami Yasufumi、Nozaki Tadashige、Fujimori Hiroaki、Masutani Mitsuko	4 . 巻 23
2 . 論文標題 Radiosensitization to γ -Ray by Functional Inhibition of APOBEC3G	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6 . 最初と最後の頁 5069 ~ 5069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23095069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 小野寺貴恵、菊原 颯太、Lichao Chen、Ying Tong、佐々木由香、今道 祥二、村上康文、益谷美都子
2 . 発表標題 放射線増感標的候補としてのAPOBEC3G
3 . 学会等名 分子生物学会
4 . 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	Tong Ying (Tong Ying)		
研究協力者	菊原 颯太 (Kikuhara Sota)		
研究協力者	Chen Lichao (Chen Lichao)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	A u n g B h o n e M y a t (Aung Bhone Myat)		
研究協力者	今道 祥二 (Imamichi Shoji)		
研究協力者	佐々木 由香 (Sasaki Yuka)		
研究協力者	藤森 浩彰 (Fujimori Hiroaki)		
研究協力者	益谷 美都子 (Masutani Mitsuko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------