

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17222

研究課題名（和文）低酸素性癌細胞の放射線抵抗性を誘導するDNA修復酵素と転写因子の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of radioresistance mechanisms in hypoxic cancer cells focusing on DNA repair enzymes and transcription factors

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：重度な低酸素状態におけるDNA修復酵素の発現/活性の亢進の制御機構を明らかにするために、ヒト脳腫瘍細胞株T98GおよびA172を用いて、ストレス応答性の転写因子Sp1とFoxO3aの役割を検討した。重度な低酸素状態では、ATM、Sp1、AMPKの発現が増加したが、FoxO3aは増加しなかった。AMPKを発現抑制すると、ATMとSp1が抑制され、細胞周期分布に影響を与えずに、放射線抵抗性が有意に低下した。Sp1の発現抑制ではAMPKは抑制されなかったが、ATMは抑制された。これらの結果から、重度な低酸素状態における放射線抵抗性に新規経路AMPK/Sp1/ATMが寄与す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

低酸素細胞は放射線抵抗性であり、その存在が癌の放射線治療成績に影響を与える。本研究は、低酸素性癌細胞における放射線抵抗性の原因として、重度な低酸素状態がDNA修復酵素やエネルギーセンサーAMPK、およびストレス応答性の転写因子に及ぼす影響を解明しようとしたもので、従来のモデルとは異なる。本研究により、低酸素状態のヒト脳腫瘍細胞株において、新規経路AMPK/Sp1/ATMが放射線抵抗性に寄与することが明らかになり、特にAMPKを分子標的とすることで低酸素性癌細胞を選択的に放射線増感させることを実証した。これらの研究成果は、より効率的な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）：To elucidate the regulatory mechanism of increased DNA double-strand repair enzymes ATM and DNA-PKcs expression and activity in severe hypoxia, we examined the role of the stress-responsive transcription factors Sp1 and FoxO3a using the human glioblastoma cell lines T98G and A172. Severe hypoxia increased the expression of ATM, Sp1, and energy sensor AMPK, but not FoxO3a. Knockdown of AMPK decreased ATM and Sp1 expression in severe hypoxia and significantly reduced radioresistance without affecting the cell cycle distribution. Knockdown of Sp1 decreased ATM expression, but not AMPK. These results reveal a novel AMPK/Sp1/ATM pathway contributing to radioresistance under severe hypoxia.

研究分野：放射線生物学

キーワード：低酸素 がん細胞 DNA修復酵素 転写因子 ATM AMPK Sp1 放射線生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍内では血管新生が行われるが、腫瘍が成長するにつれ、腫瘍血管の成長ががん細胞の増殖に間に合わず血管から離れた領域が生じる。そのような領域は、血管から酸素や栄養が供給されず、酸素濃度が著しく低くなる。特に、酸素濃度が1%未満の重度な低酸素状態では、細胞は放射線抵抗性を示すことが明らかになっている(引用文献)。低酸素状態の細胞の放射線抵抗性には、酸素存在下でのラジカルといった化学的な修飾に加えて、生物学的な因子が関与していると考えられるが、重度な低酸素状態における放射線抵抗性を制御する詳細な分子機構は明らかになっていなかった。これまでの多くの研究により、腫瘍の低酸素化は放射線治療後の患者の予後不良と相関することが明らかにされており、放射線治療の成績向上のためには、低酸素性がん細胞の放射線抵抗性の分子機構を明らかにしていくことが重要である。

(2) 従来、低酸素細胞の放射線抵抗性の生物学的な要因としては、低酸素誘導因子1(Hypoxia Inducible Factor-1、HIF-1)が重要と考えられてきた。しかし、腫瘍血管から離れた領域のうち、壊死周囲領域(壊死と低酸素の境界)ではHIF-1の発現が低下すること(引用文献)、低酸素かつ低グルコース環境下ではHIF-1の転写活性が低下すること(引用文献)、そして研究代表者らのグループにおいても、低酸素かつ低栄養状態ではHIF-1の発現が消失することが明らかになっている(引用文献)。そのため、臨床的な低酸素状態での放射線抵抗性に対するHIF-1の寄与は限定的であり、別の分子機構が存在すると考えられた。

(3) これまでに研究代表者らは、肝がん細胞株HepG2において、低酸素状態における放射線抵抗性と、低酸素かつ低栄養状態における放射線抵抗性では有意な差が見られないことを示し、とりわけ低酸素状態に着目して解析を続けてきた(引用文献)。重度な低酸素状態のヒト線維芽細胞においては、DNA二重鎖切断修復酵素であるATMおよびDNA-PKcsの発現が亢進し、活性化することを明らかにしている(引用文献)。また、エネルギーバランスセンサーであるAMPKや、がん原遺伝子Srcシグナル伝達経路、生存シグナルAktが重度な低酸素状態で発現が亢進し、活性化していることを示した。低酸素状態において、DNA2重鎖切断酵素に対するSrc情報伝達経路の役割を調べるために、低酸素環境下のLM217に対してSrc特異的な阻害剤を用いたところ、ATMおよびDNA-PKcsの活性化は抑制されたが、依然として発現は高いままであった(引用文献)。一方、AMPKを抑制した場合は、ATMの発現および活性の亢進は顕著に抑制された。本研究課題は、重度な低酸素状態による放射線抵抗性の原因解明を目的として、低酸素がストレス応答性の転写因子に及ぼす影響、並びにAMPKやSrcシグナル伝達経路が転写因子を介して、DNA2重鎖切断修復酵素の発現・活性の亢進を制御するまでの機序の解明を目指すものである。

2. 研究の目的

(1) がん細胞において、重度な低酸素状態が、DNA2重鎖切断修復酵素であるATM・DNA-PKcs、およびエネルギーセンサーAMPK α 、Src、ストレス応答性の転写因子Sp1およびFoxO3aに及ぼす影響を明らかにする。

(2) 重度な低酸素状態にあるがん細胞において、AMPK α やSrcシグナル伝達経路が転写因子を介して、DNA2重鎖切断修復酵素の発現・活性の亢進を制御するかを検証し、放射線抵抗性への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞としては、ヒトグリオーマ細胞株T98GおよびA172を用いた。

(2) がん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%未満の重度な低酸素状態では、細胞は放射線抵抗性を示す。そのため、本研究課題においては、可能な限り臨床的に放射線抵抗性のがん細胞がおかれている低酸素状態に近づけた。具体的には、Modular incubator chamber(Billups-Rothenberg)を用いて、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(37℃、5%CO₂)。このような条件下で、ATM、DNA-PKcs、Akt、Src、AMPK α 、Sp1、FoxO3aの発現量または活性に関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。

(3) 細胞の生存率については、細胞の増殖能、コロニー数を指標としたClonogenic cell survival assayで評価をした。

(4) 細胞周期は、propidium iodide(PI)染色によるDNA量を指標として、フローサイトメトリー(FACSCanto II flow cytometer system)を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) まず、研究代表者は、ヒトグリオーマ細胞株T98GおよびA172をそれぞれ重度な低酸

素環境下 (< 0.05% O₂) におき、ATM、DNA-PKcs の発現と活性化を調べたところ、いずれの腫瘍細胞株においても顕著に亢進することを明らかにした (図 1)。HIF-1 は軽度な低酸素環境下においても誘導されたが、ATM の発現の亢進は重度な低酸素環境でのみ認められた。また、エネルギーバランスセンサー AMPK α 、Akt、Src 情報伝達経路も重度な低酸素環境下の腫瘍細胞株で活性化することを明らかにした (図 2)。

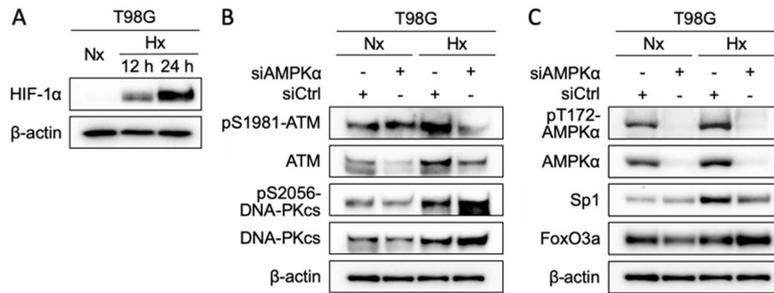


図 1 . 重度な低酸素状態において、AMPK α の発現抑制が ATM、DNA-PKcs、Sp1、FoxO3a に与える影響。Nx; Normoxia. Hx; Hypoxia.

(2) 次に、ATM の発現制御を担う転写因子の探索をおこなった。細胞ストレス応答の転写因子である Sp1 や FoxO3a は、放射線照射による DNA 損傷時に ATM と相互作用することが報告されており (引用文献) 細胞の生存に転写因子が重要な役割をもつことが示唆されていた。そのため、T98G および A172 を用いて、重度な低酸素状態が、Sp1 および FoxO3a の発現に影響を与えるかを検証したところ、Sp1 は重度な低酸素状態で発現が亢進したが、FoxO3a の亢進は認められなかった。また、Sp1 の発現抑制により ATM の発現が抑制されたが、FoxO3a では抑制されなかった (図 2)。さらに、Sp1 の発現抑制は、AMPK の発現および活性化には影響を与えなかったが、AMPK α の発現抑制は Sp1 の発現を抑制した。これらの結果から、重度な低酸素状態における AMPK α /Sp1/ATM という新規な情報伝達経路が明らかになった。

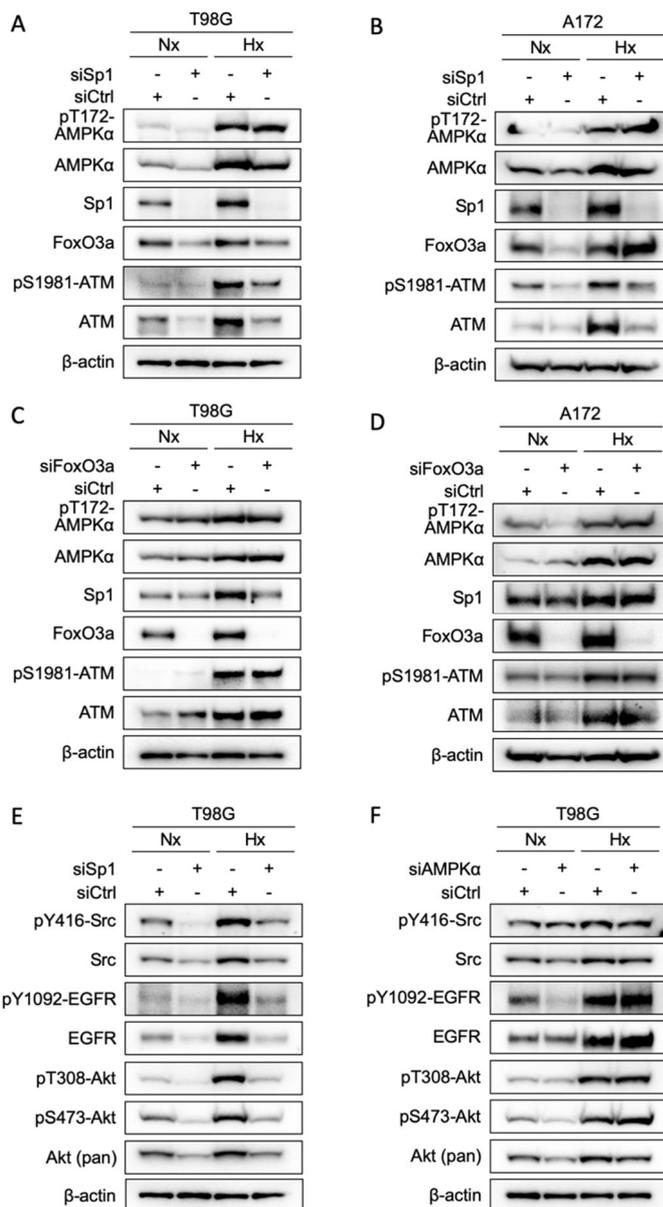


図 2 . 重度な低酸素状態において、Sp1、FoxO3a、または AMPK α の発現抑制が ATM、DNA-PKcs、Src、EGFR、Akt に与える影響。Nx; Normoxia. Hx; Hypoxia.

(4) 以上のことから、研究代表者は、重度な低酸素状態における AMPK α /Sp1/ATM という新規な情報伝達経路を示し、AMPK α の発現抑制によりヒトグリオーマ細胞株の放射線抵抗性を有意に減少させられることを明らかにした。Sp1 および ATM の上流因子である AMPK α を標的

子とすることで、臨床的に低酸素環境下にあるがん細胞を特異的に放射線増感できることが示唆された。一方で、重度な低酸素状態で活性化した DNA-PKcs、Akt、Src 情報伝達経路は、AMPK α の発現抑制では応答しなかった。そのため、ATM に加えて、DNA-PKcs 等が新規な情報伝達経路を介して放射線抵抗性に関与していると考えられる。低酸素状態での DNA-PKcs の活性化機構や Akt 情報伝達経路が明らかになれば、AMPK 阻害剤との併用で、低酸素状態の癌細胞をより特異的に放射線増感することができる可能性が考えられる。

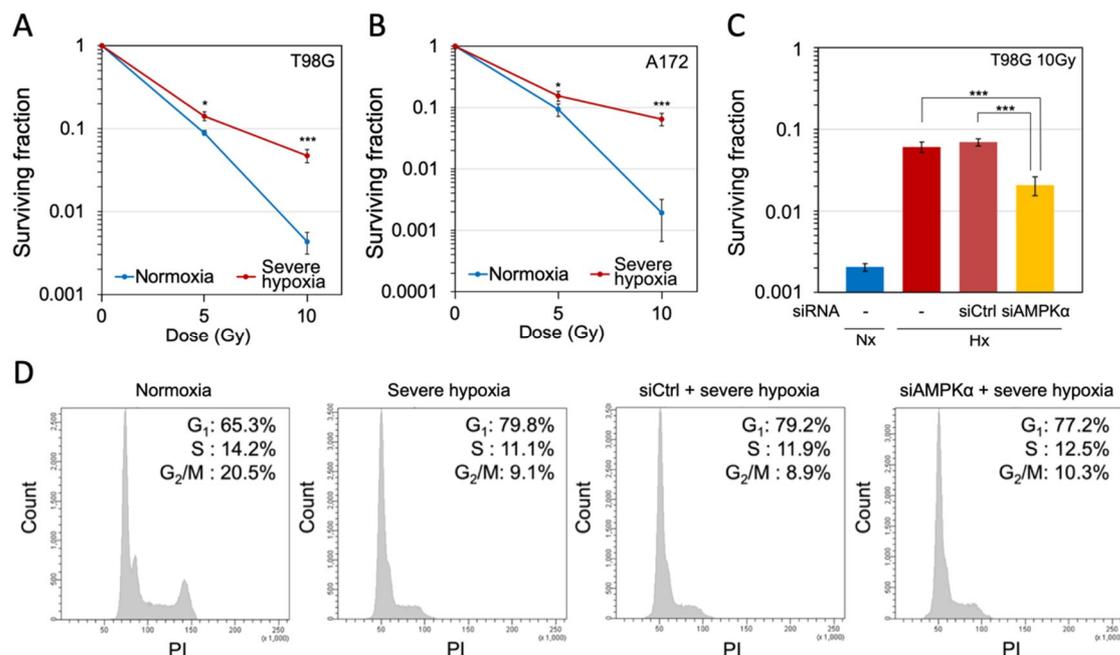


図3 . 重度な低酸素状態において、AMPK α の発現抑制が、細胞の放射線抵抗性や細胞周期の分布に与える影響。Ctrl; Control. Nx; Normoxia. Hx; Hypoxia.

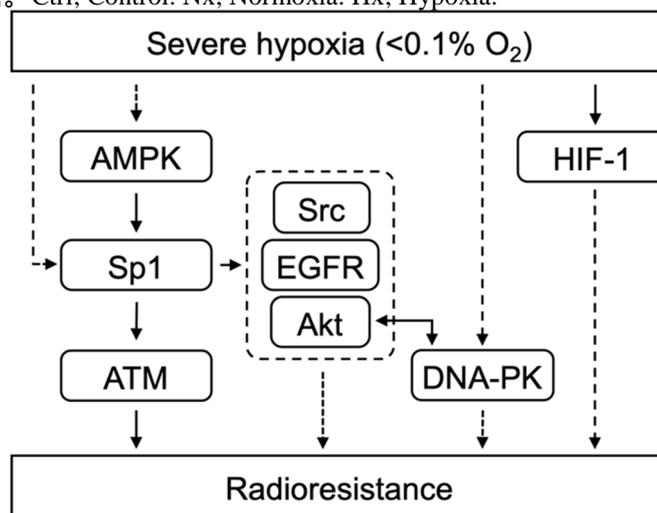


図4 . 重度な低酸素状態におけるがん細胞の放射線抵抗性に寄与するシグナル伝達経路のモデル図

引用文献

Hammond EM, Asselin MC, Forster D, *et al.*, The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol)*. 2014; 26: 277–288.

Yeom CJ, Goto Y, Zhu Y, *et al.*, Microenvironments and cellular characteristics in the micro tumor cords of malignant solid tumors, *Int. J. Mol. Sci*. 2021; 13: 13949–13965.

Zhu Y, Zhao T, Itasaka S, *et al.*, Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G1–S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells, *Oncogene*. 2013; 32: 2058–2068.

Murata Y, Hashimoto T, Urushihara Y, *et al.*, Knockdown of AMPK α decreases ATM expression and increases radiosensitivity under hypoxia and nutrient starvation in an SV40-transformed human fibroblast cell line, LM217, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2018; 495: 2566–2572.

Hashimoto T, Murata Y, Urushihara Y, *et al.*, Severe hypoxia increases expression of ATM and DNA-

PKcs and it increases their activities through Src and AMPK signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 505: 13–19.

Bencokova Z, Kaufmann MR, Pires IR, *et al.*, ATM activation and signaling under hypoxic conditions., *Mol. Cell. Biol.* 2009; 295: 26–37.

Iwahori S, Yasui Y, Kudoh A, *et al.*, Identification of phosphorylation sites on transcription factor Sp1 in response to DNA damage and its accumulation at damaged sites., *Cell. Signal.* 2008; 20: 1795–1803.

Tip A, Adamowicz M, Vermezovic J, *et al.*, NOTCH1 Inhibits Activation of ATM by Impairing the Report NOTCH1 Inhibits Activation of ATM by Impairing the Formation of an ATM-FOXO3a-KAT5 / Tip60 Complex, *CellReports.* 2016; 16: 2068–2076.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiga Soichiro, Murata Yasuhiko, Hashimoto Takuma, Urushihara Yusuke, Fujishima Yohei, Kudo Kanna, Sonohara Yaoki, Kurusu Miku, Takeda Kazuya, Jingu Keiichi, Hosoi Yoshio	4. 巻 521
2. 論文標題 DNA-PKcs is activated under nutrient starvation and activates Akt, MST1, FoxO3a, and NDR1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 668 ~ 673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.133	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Takuma, Urushihara Yusuke, Murata Yasuhiko, Fujishima Yohei, Hosoi Yoshio	4. 巻 590
2. 論文標題 AMPK increases expression of ATM through transcriptional factor Sp1 and induces radioresistance under severe hypoxia in glioblastoma cell lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 82 ~ 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.076	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 拓磨、園原 八起、漆原 佑介、藤嶋 洋平、細井 義夫
2. 発表標題 重度な低酸素状態のヒト神経膠芽腫株T98GにおけるAMPK を介したHIF-1 の発現制御の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 漆原佑介、橋本拓磨、藤嶋洋平、細井義夫
2. 発表標題 栄養飢餓状態の乳がん細胞株MDA-MB-231におけるAMPKの転写因子を介したDNA損傷応答制御
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本 拓磨、村田 泰彦、漆原 佑介、藤嶋 洋平、武田 一也、志賀 壮一郎、工藤 香菜、園原 八起、細井 義夫
2. 発表標題 低酸素状態がATMとDNA-PKcsの発現と活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 第57回生物部会・第48回制癌シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Hashimoto, Y. Urushihara, Y. Murata ¹ , Y. Fujishima, K Takeda, S. Shiga, K. Kudo, Y. Sonohara, Y. Hosoi
2. 発表標題 AMPK regulates expression of ATM and cellular radiosensitivity under severe hypoxia in glioblastoma cell line T98G.
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Urushihara, Takuma Hashimoto, Yasuhiko Murata, Yohei Fujishima, Kazuya Takeda, Soichiro Shiga, Kanna Kudo, Yaoki Sonohara, Yoshio Hosoi
2. 発表標題 Nutrient starvation activates ATM, DNA-PKcs and Src signaling pathways via AMPKa in MDA-MB-231 breast cancer cells.
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society
4. 発表年 2019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

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
---------	---------