

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591575

研究課題名（和文） 食道癌に対する癌抑制遺伝子 NPRL2 を用いた新規放射線治療の開発

研究課題名（英文） Development of the new radiation therapy using tumor suppressor gene NPRL2 for esophageal cancer

研究代表者

上田 健太郎 (UEDA KENTARO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20438279

研究成果の概要（和文）：ヒト食道癌細胞株10株で、放射線に対するIC50は1.58Gyから9.28Gyの範囲であった。一方、これらの腫瘍株でNPRL2蛋白は発現を認めず、Rad51蛋白は、全ての腫瘍株で強発現を認めた。以上よりNPRL2あるいはRad51発現量と放射線感受性に相関関係はなかった。ヒト食道癌細胞株に対するNPRL2ベクターの腫瘍増殖抑制効果は約30%でありIC20の放射線治療の併用で、抑制効果は60%前後まで増強された。我々が作製したRad51-siRNAベクターは、Rad51の発現抑制効果はほとんど認めなかった。放射線治療とNPRL2ベクターの併用効果におけるメカニズムを検討するため、1)control群、2)放射線療法(IC20)、3)NPRL2群、4)NPRL2+放射線療法の4群を設定した。NPRL2+放射線療法群は他群と比較して、DNA damage pathwayが活性化され、著明なG2停止とアポトーシスを認めた。

研究成果の概要（英文）：In 10 human esophageal cancer cell lines, the IC50 of radiation ranged from IC50 1.58Gy to 9.28Gy. There were no expression of NPRL2 protein in these cell lines, on the other hand, Rad51 protein showed strong expression in all cell lines. The levels of NPRL2 or Rad51 expression did not correlate with radiosensitivity. Tumor growth inhibition rate of NPRL2 vector was about 30% for human esophageal cancer cells, and combination therapy of NPRL2 vector and IC20 of radiation therapy enhanced this inhibitory effect to around 60 percent. We prepared some Rad51-siRNA vectors, however, these Rad51-siRNA vector did not inhibit expression of Rad51 protein. To investigate the mechanism of combined effect of NPRL2 vector, we made four groups; 1) control group, 2) radiation therapy (IC20), 3) NPRL2 group, 4) NPRL2 + radiotherapy. NPRL2 + radiation therapy group activated DNA damage pathway, and showed a strong G2 arrest and apoptosis, compared with the other group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：NPRL2 遺伝子、食道癌、放射線治療

1. 研究開始当初の背景

(1)Chromosome 3p21.3 regionに属する遺伝子はヒト前癌段階で様々な遺伝子異常による発現欠損が認められ、腫瘍抑制遺伝子の機能を持つと考えられている(Ji L, *Cancer Res* 2002;62:2715)。近年、申請者は3p21.3 遺伝子の一つ NPRL2 が40種の非小細胞肺癌細胞株における蛋白発現量とシスプラチンの感受性に強い相関があり、NPRL2 非発現癌を用いた胸膜播種モデルにおいて NPRL2 遺伝子導入はそれ自体強い腫瘍抑制遺伝子としての働きがあり、シスプラチンとの併用においてアポトーシスを介した劇的な相乗効果をもたらすことを証明した(Ueda K, *Cancer Res* 2006; 66: 9682)。さらに NPRL2 遺伝子導入による過剰蛋白発現は、非小細胞肺癌細胞株で DNA damage pathway の重要分子である Chk2, Chk1 の活性化を誘導し、Chk2 ノックアウト細胞では NPRL2 の腫瘍抑制効果は完全に消失することが確認された。以上より、NPRL2 蛋白は DNA damage pathway を活性化するメカニズムにおいて必須である可能性が示唆された(Ueda K, *PLoS One* 2010; 5: pii: e11994)。(2)癌細胞ではDNA損傷作用剤に対してDNA障害修復遺伝子が過剰発現しているため細胞周期停止やアポトーシスへの進行が阻害され治療効果に耐性が生じる。最近、シスプラチン処理した癌細胞におけるDNA障害修復遺伝子Rad51発現の増加、Rad51の強発現によるシスプラチン抵抗性が確認され、これら癌細胞にRad51のsiRNA (RNA干渉)を導入すると、シスプラチン感受性が10倍以上に増強されることが報告された(Ito M, *J Gene Med* 2005; 7:1044)。これらの結果はNPRL2遺伝子がDNA損傷作用剤の耐性を解除するメカニズムとしてRad51を含むDNA障害修復遺伝子の発現を抑制している可能性が示唆される。(3)癌細胞におけるプログラム細胞死はアポトーシスが大部分だと考えられてきたが実際臨床データでは DNA 損傷作用剤で誘導される癌細胞死におけるアポトーシスの比率は高くないことが判明した(*Cancer Biology & Therapy* 2003;2:477)。そしてオートファジーの癌細胞死に対する働きが注目を集めこの細胞死の概略が明らかにされつつある(*Nature Review Cancer* 2005;5:726)。

2. 研究の目的

食道癌に対する補助療法における放射線療法の有用性は数多く報告されてきている。これらの療法による癌細胞死のメカニズムは癌細胞の DNA 損傷を介して起こるアポトーシスによるものであるとされているが、それぞれの癌細胞に対する放射線療法の感受性を同定できるマーカーは見つかっていない。また、大きな問題点として DNA 損傷作用剤に対する強力な耐性と全身副作用の出現が

あり、未だにこれらの問題は解決されていない。そこで今回我々は以下のことについての検討を行う。

(1)新規癌抑制遺伝子 NPRL2 と DNA 障害修復遺伝子 Rad51 の蛋白発現と放射線感受性の相関関係について詳細に調べ、治療効果を予想できる有効なマーカーであるか否かを検討する。

(2)NPRL2 非発現食道癌に対する NPRL2 遺伝子導入が放射線治療の効果を相乗的に増強するかを検討する。そして、そのメカニズムを解析するため DNA damage pathway の重要分子の活性化を明らかにした上でアポトーシス (タイプ1細胞死) の強力な誘導を認めるかを詳細に検討する。また最近注目を集めているオートファジー (タイプ2細胞死) の関与はあるかを詳細に検討する。

(3)腫瘍特異的に Rad-51-siRNA を導入し、NPRL2+放射線療法に併用することの治療効果増強を検討する。

3. 研究の方法

1. ヒト食道癌細胞株における endogenous の NPRL2 発現量と放射線療法感受性、Rad 51 発現量との相関関係の検討 :

ヒト食道癌細胞株を10種RIKEN BioResource Centerより購入し、Western blottingでまず NPRL2 の発現レベルを同定し、放射線療法に対する IC50 と IC20 を XTT assay (Cell Proliferation Kit II, Roche Molecular Biochemicals) で測定する。これらの相関関係は Spearman R で検定する。さらに Rad51 の発現レベルも同定し、NPRL2 発現、放射線療法感受性との相関関係を検定する。

2. NPRL2 遺伝子導入による DNA 損傷修復遺伝子の発現量の検討 :

NPRL2 非発現食道癌細胞株に NPRL2 ベクターを transfection し、3日後に DNA 損傷修復遺伝子 (Rad51, Rad52, Rad50) の発現量を Western blotting で定量し、NPRL2 の DNA 損傷修復に対する作用を明らかにする。

3. 細胞増殖抑制・細胞周期停止・アポトーシスにおける放射線治療と exogenous NPRL2 の併用効果の検討 (in vitro) :

1)control群、2)放射線療法(IC20)、3)NPRL2群、4)NPRL2+放射線療法の4群を設定する。Day0: NPRL2発現食道癌株とNPRL2非発現食道癌株をそれぞれ2種ずつseedする。Day1:NPRL2ベクターをDC-nanoparticleに包埋して、細胞に transfection する。Day2:細胞に CDDP あるいは放射線処理を行う。Day4:細胞・蛋白を回収し効果判定。腫瘍増殖抑制効果は trypan blue exclusion assay で評価し、細胞周期・アポトーシスは APO-BRDU KIT (BD Biosciences Pharmingen) を用いて FACS で検討する。カスパーゼの活性化は Western blotting と ApoAle

rt caspase profiling assay (BD Biosciences) でCDK/cyclin複合体はImmunoprecipitationで検討する。

4. DNA damage pathwayに関する重要分子の検討：

上記の実験3と同様のプロトコールでDay4に計4群の細胞よりそれぞれ蛋白を回収する。まずWestern blottingでDNA damage pathwayが活性化されると発現するP-ATM, γ -H2AX, P-Chk2, P-Chk1の発現量を検討する。 γ -H2AXに関しては免疫細胞染色でも比較する。また, Chk1, Chk2においてはK-LISA Checkpoint Activity Kit (EMD Biosciences)を用いてKinase Activityを測定する。

5. siRNA発現プラスミドベクターの作製：

Rad51に対するsiRNA配列を様々な情報源からそれぞれ3種類設定し、siRNA発現ベクターに挿入し作製する。これらのベクターを食道癌細胞株にtransfectionし、Western blottingでRad51の発現抑制効果を検討し、最適なsiRNAを決定する。しかしながら、現在までの経験上siRNA発現ベクターをDC-nanoparticleに包埋してtransfectionした場合、十分な発現抑制効果が得られないことがほとんどである。そこで本研究では、HVJ Envelope vector (GenomONE-Neo: 石原産業株式会社)を用いて、siRNAをtransfectionすることを検討している。HVJ Envelope vectorはセンダイウイルスを完全に不活化、精製し外膜の細胞融合能だけを残したものに、transfectionしたい分子を封入し膜融合を介して細胞に導入するツールであり、siRNAを高効率で導入し特異的かつ顕著に目的蛋白発現を抑制する(J Immunol 2003;170:3653)。そして食道癌細胞株でこのHVJ Envelope vectorの有用性を検討する。

4. 研究成果

食道癌細胞株におけるendogenousなNPRL2・Rad51発現量と放射線感受性の相関関係：

ヒト食道癌細胞株10株で、放射線に対するIC50をXTT assayで測定した。IC50はそれぞれ1.58Gyから9.28Gyの範囲であった。一方、それぞれの腫瘍株のNPRL2蛋白発現を3種類のNPRL2抗体を用いてWestern blotで検証したが、一律にほとんど発現を認めなかった。Rad51蛋白発現レベルは、全ての腫瘍株で強発現を認めた。以上より、NPRL2あるいはRad51発現量と放射線感受性に相関関係は認めなかった。

NPRL2ベクター・Rad51-siRNAベクターの効果：

ヒト食道癌細胞株 (TE1, TE3) にNPRL2ベクターを、DC-nanoparticleに包埋してtransfectionを行うと、導入効率は約25%で腫瘍増殖抑制効果は約30%であった。IC20の放射線治療を併用し相乗効果を検討した結果、抑制効果は60%前後まで増強された。また、Rad51に対

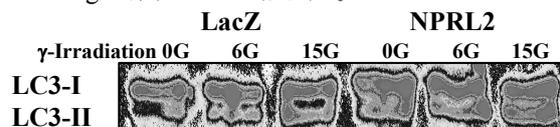
する3種類のsiRNA配列を設定し、それぞれのsiRNA発現ベクターを作製した。これらをヒト食道癌細胞株 (TE1, TE3) にtransfectionしたが、Western blotでRad51の発現抑制効果はほとんど認めなかった。また、IC20の放射線治療にRad51-siRNAベクターを併用しても、腫瘍抑制効果の増強は認めなかった。

細胞周期停止・アポトーシス・DNA damage pathwayにおける放射線治療とNPRL2ベクターの併用効果の検討：

1)control群、2)放射線療法(IC20)、3)NPRL2群、4)NPRL2+放射線療法の4群を設定した。細胞周期・アポトーシスはAPO-BRDU KIT (BD Biosciences Pharmingen)を用いたFACSにおいてNPRL2+放射線療法群は著明なG2停止とアポトーシスを認めた。また、Western blottingでこの群における有意なカスパーゼ3、9活性化の上昇とIPでCDK/cyclin複合体の形成増加を確認した。次に、Western blottingでDNA damage pathwayが活性化されると発現するP-ATM, γ -H2AX, P-Chk2, P-Chk1の発現量を検討した結果、NPRL2+放射線療法群は他群と比較して著明な増加を認めた。また、同群ではChk1, Chk2におけるKinase Activityの上昇を認めた。

オートファジー増強の確認：

Atg8の哺乳類ホモロブの1つであるLC3には細胞質に存在するLC3-Iフォームとオートファゴソーム膜に結合したLC3-IIフォームの2つのフォームが存在しており、オートファジーはLC3-IをLC3-IIに変換する。したがってLC3-IIの多寡はオートファジーの程度とよく相関する。また、NPRL2と同じくChromosome 3p21.3に属する101F6遺伝子を用いた研究でアポトーシスと共にオートファジーが誘導されることが証明された。そこで、NPRL2遺伝子導入が放射線によるLC3-II発現を増強することをWestern blottingで確認した(図1)。



(図1)

本研究結果のまとめ：以上より、NPRL2ベクターはDNA damage pathwayの活性化を介して強力な細胞周期停止・アポトーシスを引き起こすことで食道癌放射線治療の効果を増強することが、本研究で証明された。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 健太郎 (UEDA KENTARO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20438279

(2)研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

岩橋 誠 (IWAHASHI MAKOTO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70244738

中森 幹人 (NAKAMORI MIKIHITO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10322372

中村 公紀 (NAKAMURA MASAKI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80364090