

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08100

研究課題名(和文)カルシウムイメージングとプロテオミクスの融合による放射線感受性メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of Radiosensitivity Mechanisms by Calcium Imaging and Proteomics

研究代表者

榎本 敦(Enomoto, Atsushi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：20323602

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)：本研究では様々な培養細胞を用いて、エックス線と温熱の単独・併用時によるタンパク質の挙動についてプロテオーム解析により分析した。その結果、温熱処理特異的にMAP3KメンバーであるMEKK2、RAF1、TAK、ASK1、MLK-3の発現量が低下した。これらのMAP3K発現低下はプロテアーゼ阻害剤によって抑制された。一方、エックス線照射ではこれらのMAP3Kメンバーはむしろ活性化を示した。MAP3Kの発現をsiRNAにより抑制したところ、細胞増殖やコロニー形成能が顕著に抑制された。以上の結果より、温熱はエックス線によるMAP3K活性化を阻害し、放射線増感をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古くから温熱療法は抗腫瘍効果や放射線による治療効果を亢進させる働きがあることが知られている。温熱に関してはタンパク質の変性を誘導するものの、何故、再合成や再構成が可能なタンパク質の一時的な構造的変化が細胞致死あるいは放射線増感を引き起こすのかは未解明な点が多い。本研究により、放射線で活性化し、細胞増殖を正に制御するRAF1、MEKK2をはじめ複数のMAP3ksが温熱処理により発現や活性が低下することが判明した。この発見は温熱感受性の重要な標的分子となるだけでなく、ハイパーサーミアが有効ではない部位におけるがん治療や放射線増感に向けた分子標的薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify how biochemical changes triggered by heat and radiation stimulate antitumor activity. Hyperthermia decreased the expression levels of MAP3K such as TAK1, RAF1, and MEKK2 but not the downstream MAP2K and MAPK members. The hyperthermia-induced degradation of TAK1 and MEKK2 was rescued by either the proteasome inhibitor MG132 or the calpain inhibitor ALLN; however, RAF1 was not affected by the inhibitors. Heat induced downregulation of RAF1. X-irradiation

did not significantly change the expression of MAPK family members. Hyperthermia increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and calpain I expression. An in vitro cleavage assay demonstrated that TAK1 and MEKK2 are calpain I substrates. Knockdown of TAK1, RAF1, and MEKK2 suppressed cell proliferation and clonogenicity. MAP3Ks such as TAK1, RAF1, and/or MEKK2 play crucial roles in cell proliferation and clonogenicity and are potential molecular targets for hyperthermia-induced radiosensitization.

研究分野：放射線生物学

キーワード：Calcium Calpain MAPK family radio-sensitization

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでリン酸化プロテオーム情報を基盤とした放射線シグナル伝達の研究と細胞応答制御のメカニズムについて研究を進めてきた。その中で放射線によって活性化する新規の酵素 STK 38 (Serine Threonine Kinase 38) の同定 (Enomoto et al, Oncogene, 2008) とその基質である CDC25A のリン酸化を介した DNA 損傷誘発 G2 チェックポイントの制御機構を明らかにしてきた (Fukasawa et al, Cell Signal, 2015)。さらに STK38 は温熱処理に対しては極めて高感受性を示し、N 端の制御ドメインの脱リン酸化に続いてカルパインにより速やかに分解されることや STK38 の発現量低下は細胞の増殖遅延を誘導することを明らかにしてきた (Enomoto et al, Sci. Rep. 2019)。これらの結果は、放射線や温熱によって誘導される翻訳後修飾の細胞応答制御における重要性を示している。

一方、放射線や温熱処理後のリン酸化プロテオームの研究を進めるなかで、カルシウムシグナルの増強やカルシウム依存性タンパク質分解酵素であるカルパインの活性化に伴う翻訳後修飾にしばしば直面した。そこで放射線や温熱処理に替わってカルシウムイオノフォア (A23187) で細胞を処理したところ、放射線の初期応答に活性化するいくつかの修復タンパク質やシグナル伝達因子において放射線や温熱処理と同様の翻訳後修飾 (リン酸化・タンパク質の分解) を再現することができた。一方、近年、蛍光試薬の安定性や細胞内局在マーカー特異性が向上し、細胞や動物個体内におけるイメージングが容易になってきた。特にカルシウムは刺激によって細胞内濃度が 10 ~ 1000 倍に上昇し、その濃度差もイメージングで捉えられるようになってきた。そこで放射線、温熱やカルシウムイオノフォアによる細胞・生体内カルシウムスパークの時空間的ダイナミクスをイメージング技術で捉え、かつ内的な変化をリアルタイムなプロテオミクスで網羅的に解析することによりカルシウムシグナルによる放射線初期応答や温熱増感のメカニズムに迫ることができるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

カルシウムイメージングは、神経や脳科学の分野においては必須のアイテムとして、単にカルシウム濃度の分布や変化を測定するだけでなく細胞の活動状態の指標として用いられている。一方、ストレスとりわけ放射線や温熱処理に対するカルシウムの時空間的なライブイメージングやそれに続くタンパク質のダイナミクスを同時に追求し、細胞応答を統合的に解析した例はこれまでにほとんどない。そこで申請者はライブイメージング顕微鏡を用いて生細胞におけるカルシウムの時空間的な解析とリアルタイムなプロテオミクス解析による放射線や温熱による細胞初期応答におけるカルシウムの役割と責任タンパク質の解明を目指す。

一方、これまで EDTA などの金属イオンのキレート剤が放射線によるアポトーシスを抑制した報告があるが、カルシウム特異的な拮抗剤やカルシウムイオノフォアなどカルシウム濃度を選択的に変化させる薬剤による放射線・温熱感受性については報告がない。そこで放射線や温熱などのストレス刺激とカルシウム拮抗剤またはイオノフォアの併用処理による感受性修飾について解析・評価を行い、放射線応答メカニズムにおけるカルシウムの役割について統合的な理解と増感法・感受性指標確立への基盤構築を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 生細胞を用いたライブイメージングによるカルシウムの時空間分布：ヒト培養細胞を予めカルシウムインジケーター (Thermo Fisher Sci) で前処理したのち、エックス線照射 (Pantac HF350, Shimadzu)、温熱またはカルシウムイオノフォア処理を施す。生細胞のまま固定することなく、ライブイメージング蛍光顕微鏡 (EvOS Cell Imaging Systems, Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞内のカルシウムの局在や濃度変化を経時的に解析する。

(2) カルシウムシグナルにフォーカスしたプロテオーム解析による放射線初期応答制御因子の同定：これまでに申請者は、リン酸化プロテオーム解析を通じて、X 線照射によりリン酸化状態が変化するタンパク質を複数同定しており、プロトコールは確立している。本研究においてはカルシウムシグナルに焦点を当て、様々な刺激 (未処理、X 線照射、温熱処理、カルシウムイオノフォア処理) を施し、(1) のイメージング結果に同調したタイミングで細胞からトータルタンパク質を調製し、高分離能 ZOOM IEF Fractionator (Invitrogen) を用いた二次元電気泳動により篩い分けする。このように等電点・分子量に従って分離したタンパク質を高感度蛍光色素 (Sypro Ruby, Thermo Fisher Sci) を用いて可視化する。そしてゲル画像解析装置 (BioRad) を用いて、細胞内カルシウム濃度が高い時に複数共通して変化するタンパク質のスクリーニングを行い、候補となるタンパク質をゲルスポットカッター (BioRad) により切り出し、精製する。次に精製したタンパク質をトリプシンで消化後、質量分析装置 (島津製作所、AXIMA-CFR MALDI-TOF/MS) による解析を行い、分子量情報を得る。トリプシン消化物の分子量データベースをもとにした質

量分析用検索エンジン (MASCOT Research) を用いて、タンパク質の同定と翻訳後修飾の種類を推定する。次に同定したタンパク質に対する Western blotting 解析を行い、二次元電気泳動で得られた結果に対する再現性を確認する。次に、カルシウム依存的に構造変化するタンパク質について、リン酸化タンパク質染色やタンパク質分解阻害剤等による影響を評価し、翻訳後修飾の種類を同定する。

(3) カルシウムシグナルによる放射線初期応答制御・温熱増感の分子メカニズムの解明：DNA 二重鎖切断のマーカーである  $\gamma$ -H2AX を指標とした免疫染色や Comet assay による DNA 修復能の解析、フローサイトメーターを用いて細胞周期分布を指標としたチェックポイント制御や細胞死の解析を通じて、放射線感受性の修飾や温熱増感がどの応答プロセスの破綻によるものかを検討する。

(4) カルシウムシグナルを標的とした放射線増感法・感受性指標の確立：カルシウムは細胞内の多くの生理的機能制御に関わっていることからカルシウムを標的とした拮抗剤や増強剤 (イオノフォア) は、多くの分子に作用して多面的な効果をもたらすことが期待できる。そこで各種カルシウム阻害剤やイオノフォアなどを用いてライブイメージングでカルシウム濃度・局在をモニターしながら放射線照射を行い、カルシウムが感受性に与える影響をコロニー形成法により評価する。そしてカルシウムを指標・標的とした新しい増感法の基盤を構築する。次に、同定したタンパク質をコードする遺伝子を過剰発現あるいは遺伝子ノックダウンした細胞を作成して放射線感受性の評価を行い、カルシウム依存性の放射線感受性制御因子を同定する。さらに細胞内カルシウム濃度・同定したカルシウム依存性の放射線感受性制御因子の発現量および翻訳後修飾のレベルを多重蛍光免疫染色法により同時に解析し、放射線感受性との相関について評価を行う。

#### 4. 研究成果

本研究においてエックス線や温熱などの単独あるいは併用時によるタンパク質の挙動について二次元電気泳動および質量分析装置を使用したプロテオーム解析を実施した結果、エックス線照射では変化なくかつ温熱処理特異的に発現量が低下する因子として MAPK キナーゼカスケードを構成し、MAP3K メンバーである MEKK2、RAF1、TAK1、ASK1、MLK-3 を同定した。これらの温熱による発現量の減少に先立って細胞内カルシウムの上昇が見られたが、エックス線照射時にはカルシウム濃度にほとんど変動は認められなかった。また温熱処理時に他の MAPK カスケード構成因子 MAP2K である MEK5、MKK4 や MAPK に属する JNK、ERK1/2 などにも発現変化は認められなかった。これら温熱特異的な MAP3K の発現低下のうち、MEKK2 と TAK1 についてはタンパク質分解酵素の阻害剤である ALLN や Calpeptin などによって、ASK1 はプロテアソーム阻害剤 MG132 によって抑制されたことから、タンパク質分解経路による翻訳後修飾によるものであることが判明した。さらにカルシウムイオノフォアとして知られる A23187 は TAK1 や MEKK2 のタンパク質の発現を低下させ、それは Calpeptin によって阻害された。温熱処理とは異なりエックス線照射は TAK1、ASK1、RAF1 は活性化させることから MAP3K の活性化に関しては温熱とエックス線では相反する反応を示した。さらに MEKK2、TAK1、RAF1 の発現を siRNA により抑制したところ、細胞増殖やコロニー形成能が顕著に抑制された。以上の結果より、温熱によるカルシウム濃度の上昇による MAP3Ks の発現低下は細胞増殖の抑制に寄与することから、温熱はエックス線による MAP3K 活性化を阻害し、放射線増感をもたらす可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 T. Fukasawa, A. Enomoto, A. Yoshizaki-Ogawa, S. Sato, K. Miyagawa, A. Yoshizaki.	4. 巻 15
2. 論文標題 The role of STK38 in DNA damage response and targeting for radio-sensitization.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2054
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15072054	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 -
1. 著者名 A. Enomoto and T. Fukasawa.	4. 巻 2
2. 論文標題 The role of calcium-calpain pathway in hyperthermia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Mol. Med.	6. 最初と最後の頁 1005258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmmed.2022.1005258	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 -
1. 著者名 A. Enomoto, T. Fukasawa, H. Terunuma, K. Nakagawa, A. Yoshizaki, S. Sato, K. Miyagawa.	4. 巻 39
2. 論文標題 Decrease in MAP3Ks expression enhances the cell death caused by hyperthermia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hyperthermia	6. 最初と最後の頁 200-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02656736.2021.2024281	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 -
1. 著者名 T. Fukasawa, A. Yoshizaki, S. Ebata, A. Yoshizaki-Ogawa, Y. Asano, A. Enomoto, K. Miyagawa, Y. Kazoe, K. Mawatari, T. Kitamori, S. Sato.	4. 巻 10
2. 論文標題 Single cell level protein analysis revealing the roles of autoantigen-reactive B lymphocytes in autoimmune disease and the murine model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e67209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.67209	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎本 敦
2. 発表標題 細胞シグナル系
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第13回放射線生物学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎本 敦、宮川 清
2. 発表標題 ハイパーサーミアによるMAP3Ks発現低下は細胞死を増強させる
3. 学会等名 日本癌学会第81回学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎本 敦
2. 発表標題 リン酸化プロテオーム解析を基盤とした放射線感受性メカニズム解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------