

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：35309

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16838

研究課題名（和文）X線誘発性細胞運動亢進に関するLINC複合体を介した細胞内反応の解析

研究課題名（英文）Analysis of intracellular reaction through LINC complex in X-ray enhanced cell migration

研究代表者

今泉 大将 (Imaizumi, Hiromasa)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・助教

研究者番号：90848160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題ではがん転移の要因となる放射線誘発性の細胞運動に関する細胞極性や小胞体ストレスといった細胞内反応にLINC複合体構成因子SUN1が関係しているか否かを検討した。その結果、SUN1が先端端におけるX線誘発性の細胞極性に必要であること、またX線によって引き起こされる小胞体ストレス応答に必要なことが明らかとなった。さらにSUN1を詳細に解析すると、特にSUN1\_888がそれらの反応に必要なことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療においてX線治療は広く利用され、良好な局所制御が可能になっている。しかしながら、X線照射によりがん転移に関連する細胞運動が亢進する現象はよく知られており、近年ではX線治療によりがん転移が誘発される可能性も報告されている。本研究課題においてLINC複合体が細胞運動に対して果たす機能の解明に取り組んだ。LINC複合体の詳細な機能を明らかにすることで、LINC複合体を利用したがん転移抑制を組み入れた放射線治療法の開発やがん転移リスク評価法の確立等が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether the LINC complex component SUN1 is involved in intracellular reactions such as cell polarity and endoplasmic reticulum stress related to X-ray enhanced cell migration which is a factor in cancer metastasis. We revealed that SUN1, especially SUN1\_888 is required for the regulation for cell polarity at the leading edge and the endoplasmic reticulum stress response.

We provided a molecular biological suggestion for the radiotherapy methods to prevent cancer metastasis and for the assessment of cancer metastatic risk, using LINC complex.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 がん転移 核膜タンパク質 LINC複合体 LINC complex SUN1

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は侵襲性の低いがん治療法であり、我が国の高齢化に伴いこれまでよりさらに選択される治療法になっていくことが予想される。放射線治療の中で最も普及している治療法がX線治療である。X線治療は技術進歩により高精度化している。その結果、治療成績も向上している一方で、あらゆる方向からX線を照射するため照射域辺縁には非常に低線量のX線が照射される領域ができる。2001年にWild-Bodeらにより低線量X線誘発性のがん転移能が報告されて以来、細胞・動物レベルにおいて低線量のX線照射によりがん転移に関わる細胞運動の亢進が明らかになっている。2018年にはX線治療により遠隔転移が生じるとしてRadiation therapy-induced metastasisが報告された。したがって、X線治療においてがん転移を抑制することはさらなる治療成績向上のために極めて重要な課題と考えた。

細胞核と細胞骨格を結合するタンパク質であるLINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) 複合体は、核膜内膜を貫通するSUNタンパク質と核膜外膜を貫通するnesprinタンパク質の2つのタンパク質から構成されるタンパク質複合体である。我々はこれまでに、LINC複合体構成因子の1つであるSUN (Sad1/UNC-84) ががん転移の要因となる細胞運動やX線誘発性の細胞運動に関係があることを明らかにしている (Nishioka<sup>#</sup>, Imaizumi<sup>#</sup>, Imada<sup>#</sup>, et al. (#共同第一著者), 2016, Nucleus ; Imaizumi, et al., 2018, Cancer Sci.). しかしながら、詳細な分子メカニズムは不明なままであり、実際のX線治療においてどのようにLINC複合体を利用できるか否か検討できる段階にはなく、さらなる解析を進めているところである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん転移の要因となる細胞運動に影響を与えるLINC複合体構成因子SUNに焦点をあてて、X線誘発性のがん転移に関係する細胞極性や小胞体ストレスといった細胞内反応に着目し、分子メカニズムを解明することである。

## 3. 研究の方法

細胞株は、ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231とヒト線維肉腫細胞株HT-1080を用いた。放射線は、放射線治療装置からのX線を用いた。

細胞運動(遊走能・浸潤能)を調べるため、遊走能にはボイデンチャンバーアッセイ、浸潤能にはマトリゲルインベージョンアッセイをそれぞれ用いた。また、タンパク質発現解析のためにウエスタンブロッティング法や蛍光免疫染色法を用いた。

LINC複合体と細胞内反応の関係を明らかにするために、タンパク質発現抑制を行うための試薬であるsiRNAの導入を実施した。試薬の導入はX線照射2日前に実施し、各種実験時にLINC複合体構成因子SUN1が発現抑制できていることを確認し、各々の実験を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) X線により誘発される細胞運動(遊走能・浸潤能)

細胞株にX線(0.5 Gyや2 Gy、10 Gy)を照射し、細胞運動能(遊走能・浸潤能)を解析した。その結果、遊走能はコントロール細胞(照射なし)と比較して0.5 Gy照射により亢進し、その後2 Gy、10 Gyと線量依存的に抑制されていくことが分かった。また、浸潤能においても、

コントロール細胞（照射なし）と比較し 0.5 Gy 照射により亢進し、その後 2 Gy、10 Gy と線量依存的に抑制されることが分かり、遊走能と同様の結果を得た（図 1）。つまり、低線量の X 線照射は、がん転移の要因となる細胞運動の亢進を引き起こすことが明らかとなった。

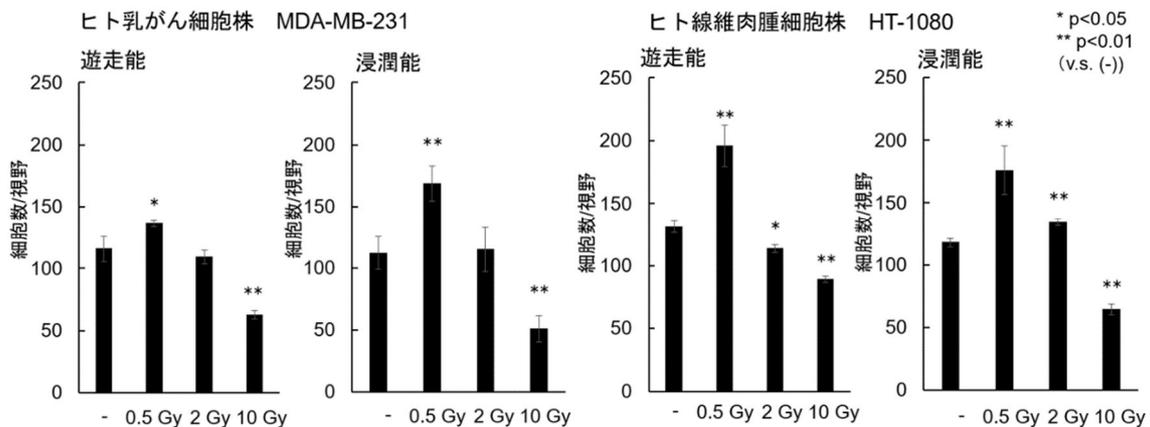


図 1 . 低線量である 0.5 Gy 照射により細胞運動（遊走能・浸潤能）は亢進する

## (2) 先導端 (leading edge) における SUN1 による X 線誘発性の細胞極性制御

細胞株に対して X 線を照射し、細胞運動において必要とされる極性形成に関してゴルジ体（ゴルジ体は細胞運動時に方向性を得るために重要である。）を用いて解析した。その結果、0.5 Gy の X 線照射がコントロール細胞の照射なしと比較して先導端 (leading edge) に位置する細胞においてゴルジ体が劇的に進行方向へ位置する（極性形成を行う）一方で、2 Gy 照射はコントロール細胞と同等の極性形成であることが分かった。

次に、LINC 複合体と細胞極性の関連を調べるために、SUN1 の発現抑制を実施した上で、ゴルジ体を用いて極性形成を解析した。その結果、SUN1 の発現抑制によりゴルジ体は分散し、X 線照射後も極性形成を行うことはなかった（図 2）。この結果より、細胞運動における細胞極性制御に SUN1 は必要とされることが明らかとなった。

さらに、SUN1 について詳細に解析した。SUN1 には種類を意味するバリエーションがあり、その中でも発現量の多い SUN1\_888 や SUN1\_916（888 や 916 はアミノ酸の数）について同様の解析を実施した。X 線照射の有無にかかわらず、SUN1\_888 の発現抑制は先導端 (leading edge) において細胞運動方向への極性形成を抑制した（図 2）。その一方で、SUN1\_916 の発現抑制はコントロール細胞の照射なしと比較して細胞運動方向への極性形成が見られ、照射しても極性形成されたままであった（図 2）。

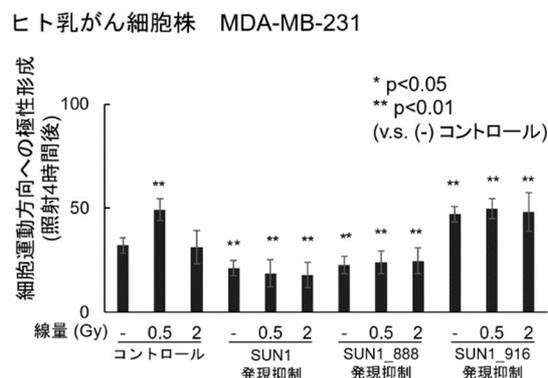


図 2 X 線照射後、先導端に位置する細胞において極性形成を行うために、SUN1 (特に SUN1\_888) が必要である

### (3) X線照射が誘発する小胞体ストレス応答へのSUN1の関与

X線照射により小胞体ストレスが引き起こされることが知られている。細胞株に対してX線(0.5 Gyや2 Gy)を照射し、4時間後に小胞体ストレス応答に関係するGRP78とPERK伝達経路のタンパク質の発現量の変化を解析した。その結果、X線照射により、小胞体ストレス応答に重要な役割を果たすGRP78やPERK伝達経路(p-PERK、p-eIF2、ATF4)のタンパク質発現量がコントロール細胞の照射なしと比較して増加することが分かり、小胞体ストレス応答が引き起こされていることが明らかとなった(図3)。

次に、LINC複合体とX線照射が誘発する小胞体ストレス応答の関連を調べるために、SUN1の発現を抑制した上で、X線を照射しGRP78とPERK伝達経路のタンパク質の発現量の変化を解析した。SUN1の発現を抑制した細胞株にX線を照射してもGRP78やPERK伝達経路のタンパク質の発現量に変化はなかった(図3)。つまり、LINC複合体構成因子SUN1はX線照射が誘発する小胞体ストレス応答に必要であることが明らかとなった。

さらにSUN1について解析を進めるため、SUN1の種類を意味するSUN1\_888やSUN1\_916の発現を抑制した細胞株にX線を照射しGRP78とPERK伝達経路のタンパク質の発現量の変化を解析した。X線照射後、SUN1\_888の発現を抑制した細胞株はGRP78やPERK伝達経路のタンパク質の発現量に変化がなくSUN1\_888はX線誘発性の小胞体ストレス応答に必要であることが示唆された。その一方でSUN1\_916の発現抑制を実施した細胞株はX線照射後、GRP78やPERK伝達経路のタンパク質の発現量に変化が生じ小胞体ストレス応答が起きていることが明らかとなった(図3)。



図3. X線照射4時間後における小胞体ストレス応答に関するタンパク質の発現量の変化

本研究課題によって、LINC複合体構成因子であるSUN1、その中でも特にSUN1\_888が細胞運動に関連する細胞極性の制御や小胞体ストレス応答といった細胞内反応に必要であることが明らかになった。これらはがん細胞の悪性化に関わることであるため、さらなるメカニズムの解明を実施する必要がある。今後引き続き、LINC複合体を利用したがん転移制御を組み入れたX線治療法を確立できるか否か研究を進めていくことが重要である。

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 Hiromasa Imaizumi, Kazumasa Minami, Miki Hieda, Naomasa Narihiro, Masahiko Koizumi.	4. 巻 64
2. 論文標題 The linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex is required for X-ray-induced epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 358-368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrac104	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 今泉 大将, 皆巳 和賢, 檜枝 美紀, 小泉 雅彦
2. 発表標題 X線照射が誘発する上皮間葉転換にはLINC複合体構成因子SUN1が必要である
3. 学会等名 第23回菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2023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
---------	---------