

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19967

研究課題名（和文）放射線抵抗性の軟骨肉腫細胞におけるDNA修復とバystanダー効果のメカニズム解明

研究課題名（英文）Mechanism elucidation of bystander effects focusing on DNA repair in radioresistant chondrosarcoma cells

研究代表者

池田 裕子（Ikeda, Hiroko）

近畿大学・理工学部・助教

研究者番号：90806465

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）：照射細胞から放出された細胞間シグナル伝達物質を介して非照射細胞へ放射線影響を引き起こす「放射線誘発バystanダー効果」は、放射線抵抗性の腫瘍へ有害な影響を与える可能性が懸念されている。本研究では、軟骨肉腫を含む放射線抵抗性のがん細胞に対する良好な治療効果を得るための基盤的知見の取得に向けて、「細胞周期と連動したDNA損傷応答タンパク・DNA損傷応答キナーゼの挙動」に着目した。原因経路と細胞間情報伝達物質の関与を探ることにより、放射線誘発バystanダー効果の応答耐性メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

照射された細胞における細胞周期依存的な放射線感受性（殺細胞効果）の知見が、非照射細胞の細胞応答でも同様に生じ、放射線誘発バystanダー効果（RIBE）の誘導に関与するか否かについて明らかにされていない。RIBEによって非照射細胞に誘導されるDNA損傷のプロセスや修復経路の寄与を本研究で探ることで、得られた知見から従来の放射線治療では限界のあった腫瘍に対しても効果的な治療のアプローチを提案できる可能性があり、基礎研究と医学的応用の両観点から見て意義がある。

研究成果の概要（英文）：“Bystander effects” are caused by radiation influences through intercellular communication to nearby non-irradiated cells, and may cause a decrease in the therapeutic effect on radiation-resistant tumors. This study focused on “DNA damage/repair response linked to the cell cycle” to obtain basic knowledge about radiation-resistant cancer cells such as chondrosarcoma and osteosarcoma. By narrowing down the causal pathway and the involvement of intercellular signals, this study aimed to clarify the resistance mechanism of radiation-induced bystander effects.

研究分野：放射線生物学

キーワード：バystanダー効果 放射線抵抗性 DNA損傷・修復 染色体分裂異常

### 1. 研究開始当初の背景

照射細胞だけでなく、その周辺の非照射細胞にも細胞間シグナル伝達物質を介して放射線影響が生じるバイスタンダー効果 (Radiation Induced Bystander Effect; RIBE) は、非照射細胞に着目した解析研究の重要性を示している。非照射正常細胞において細胞分裂異常 (微小核形成) および DNA 損傷マーカーである  $\gamma$ H2AX フォーカス形成が上昇し、生存率が低下すること [Yang et al., *Oncogene*, 2005] や、非照射がん細胞の増殖率が增加すること [Shao et al., *Radiat. Environ. Biophys.*, 2003] など、放射線がん治療の観点で有害な RIBE も報告されているが、その細胞応答メカニズムには、未だ多くの不明な点が残されている。

申請者が所属していた研究グループでは、正常線維芽細胞 AG01522 と、放射線抵抗性を示すヒト軟骨肉腫細胞 HTB94 に対して、X 線をはじめ、様々な線種の放射線を照射後、RIBE の有無を検証してきた (微小核試験, 53BP1 フォーカス形成比較)。結果として、照射した放射線抵抗性の軟骨肉腫細胞はバイスタンダーシグナルを放出するが、非照射細胞では RIBE が誘導されない可能性が示唆された [Wakatsuki et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2012]。

近年、細胞周期のチェックポイント機構や「DNA 修復」を制御するために重要な「DNA 損傷応答キナーゼ」として知られる Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)、Ataxia Telangiectasia and rad3 Related (ATR) および DNA 活性化プロテインキナーゼ (DNA-PKcs) の動態に着目した RIBE の解析も進められてきた [Tu et al., *Mutat. Res.*, 2016]。非照射細胞では、照射細胞の DNA 損傷形成や修復過程とは異なるパスウェイが働き、複製ストレスによって損傷が蓄積する可能性も示唆されている [Burdak-Rothkamm et al., *Oncogene*, 2007] が、それらの分子メカニズムについては分かっていない。放射線抵抗性の腫瘍に対して治療効果を高めるためには、非照射細胞の RIBE の誘導や DNA 損傷修復メカニズムを細胞レベル・分子レベルで明らかにすることが必須である。

### 2. 研究の目的

これまでに報告された知見から、RIBE を誘導するか否かを決定する主要因を明らかにするには、照射細胞から放出されたバイスタンダーシグナルを受け取った後の「非照射細胞」に着目した解析が必要不可欠である。非照射細胞における細胞周期分布を同時に調べることによって、RIBE 誘導に対する DNA 損傷・修復経路の寄与を把握でき、放射性抵抗性細胞における RIBE 応答耐性の分子メカニズムを明らかにできるのではないかとこの着想に至った。本研究の目的は、放射線抵抗性がんに対する放射線治療の良好な臨床効果を得るための基盤的知見の取得に向けて、「細胞周期と連動した DNA 損傷応答タンパク・DNA 損傷応答キナーゼの挙動」に着目し、RIBE 誘導を細胞レベル・分子レベルで解析することである。原因経路と細胞間情報伝達物質の関与を探ることで、RIBE の応答耐性メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) RIBE 誘導の検証と細胞周期依存性の把握

同じ培地を共有しながら、照射細胞と非照射細胞を非接触共培養し、RIBE 誘導を検証した (図 1)。

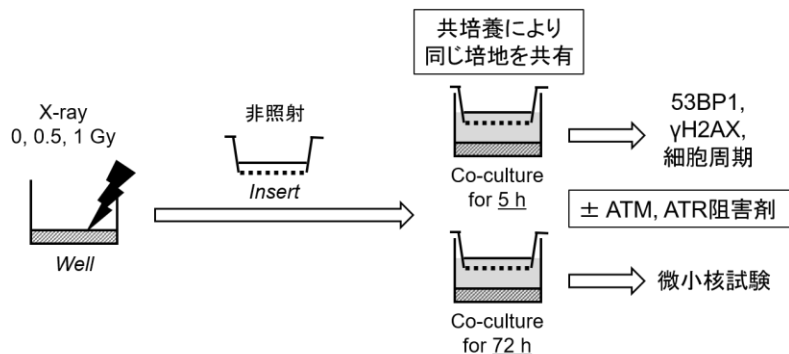


図 1. 培地経由の RIBE 検出のための共培養システム

本研究では、まず低線量の X 線 0.5 Gy, 1 Gy 照射を基にして RIBE の検出実験を開始した。細胞分裂異常に関しては、微小核試験を実施する。Cytochalasin-B 存在下で細胞質分裂は阻害されるが、細胞核は分裂を続けた状態で 72 時間培養し、固定・核染色後、微小核を伴う二核細胞の数を定量することで、RIBE 誘導を検証した。次に、蛍光免疫染色法により DNA 損傷マーカー 53BP1 や  $\gamma$ H2AX のフォーカス形成の頻度を比較した。RIBE の誘導と非照射細胞の細胞周期依存性に対して、照射した細胞との共培養実験 (5 時間) を行った。細胞周期マーカーで多重染色し、その動態を比較した。

(2) RIBE の原因経路の探索

RIBE による 53BP1 や  $\gamma$ H2AX のフォーカス形成変化が S 期に顕著に見られた場合には、複製フォーク進行の遅延や停止を引き起こす「複製ストレス」が主な原因として考えられる。そこで、DNA 損傷応答キナーゼとして知られる ATR シグナル経路に着目する。複製ストレスの発生マーカーである RPA や、ATR 経路の下流に位置する Chk1 のリン酸化 (S345) について、5 時間の共培養後に蛍光免疫染色で解析した。また、ATR 阻害剤で処理した場合と比較することで、バイスタンダー効果に対する ATR 経路の活性化の関与を明らかにする。また、バイスタンダーで誘発された複製ストレスの蓄積による DNA 損傷 (二本鎖切断) を確認するため、ATM や DNA-PKcs シグナル経路に着目し、同様の実験を実施した。S 期以外で 53BP1 や  $\gamma$ H2AX のフォーカス形成の変化が見られた場合、原因候補の経路として「転写」に着目する。

4. 研究成果

(1) 放射線抵抗性のヒト軟骨肉腫細胞 HTB94 における RIBE 誘導について

X 線照射 (0.5 Gy, 1 Gy) した細胞と「同細胞種間」共培養した非照射 HTB94 では、対照群と比較し、微小核形成試験 (72 時間) において、バイスタンダー効果の誘導が観察されず、その結果は先行研究を再現していた (図 2-Control-By)。放射線抵抗性の HTB94 の場合、非照射細胞にバイスタンダー損傷シグナルが伝達されても、正常細胞と比べ DNA 修復経路の活性が高いため、すぐに修復されてしまい、バイスタンダー効果として影響が検出できないのではないかと考えた。その仮説が正しければ、DNA 修復経路を阻害することで、軟骨肉腫細胞でもバイスタンダー応答が検出できるようになるはずである。そこで、DNA 損傷応答キナーゼの ATR シグナル経路の阻害剤 (VE821; 2  $\mu$ M) 存在下にて、同様に照射細胞との共培養を実施したところ、非照射バイスタンダー細胞において微小核を有する二核細胞の割合が有意に増加し、RIBE の誘導が確認された (図 2-ATRi-By)。

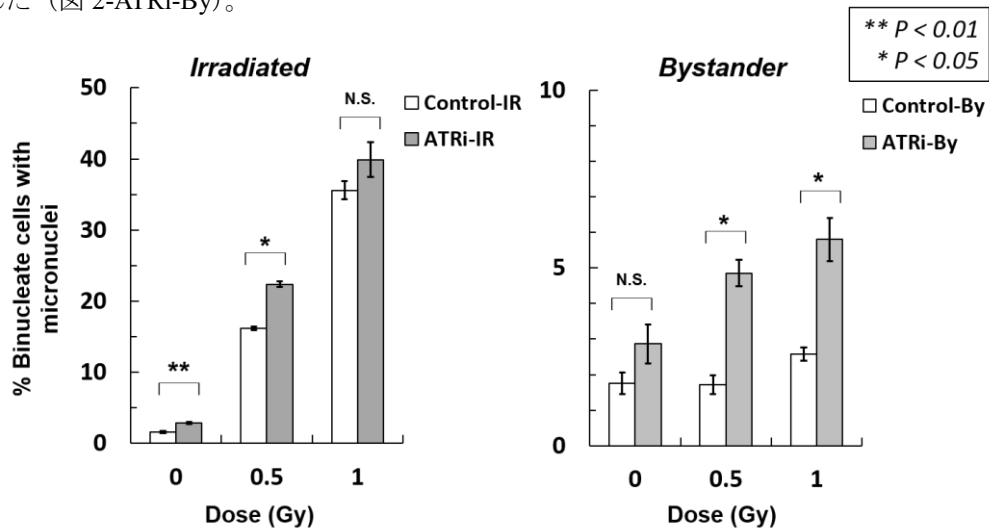


図 2. HTB94 における共培養後の微小核形成の変化

次に、53BP1 のフォーカス形成 (5 時間) に着目して共培養を実施したところ、ATR 阻害剤の有無に関わらず、対照群と比較して有意な差は見られず、RIBE の誘導はなかった (図 3)。

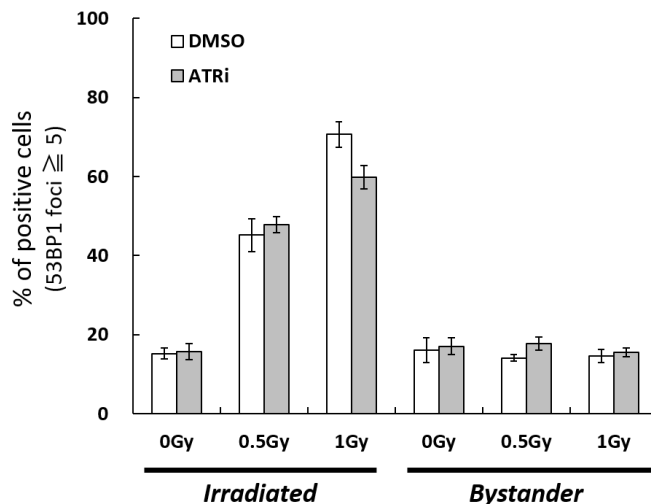


図 3. 共培養による HTB94 の 53BP1 形成頻度の変化

## (2) RIBE の原因経路の探索

細胞周期マーカーによる多重蛍光免疫染色から「複製ストレス」に着目し、発生マーカーである RPA や、ATR 経路の下流に位置する Chk1 のリン酸化 (S345) について、5 時間の共培養後に解析した。その結果、バスタンダー細胞においては、対照群および ATR 阻害剤処理の両方で RIBE の誘導は観察されなかった。

HTB94 の修復経路 (ATR-Chk1) の活性化を阻害することで、フォーク崩壊による二次的な DNA 二本鎖切断が生じ、RIBE として観察される場合には検出までに時間を要する可能性が考えられた。そのため、共培養時間を 5 時間からより長く設定した (12~72 時間)。ATR 阻害剤の有無によらず、照射細胞では 53BP1 陽性細胞の割合は 5 時間でピークに達した後、徐々に修復されることで減少した。しかしながら、非照射のバスタンダー細胞では共培養時間が 5 時間からより長くなった 72 時間までの経過をみても、RIBE は誘導されなかった。

以上のように、ATR 阻害剤の存在下における共培養 (72 時間) による微小核試験のみで、HTB94 に RIBE が誘導された。ATR 阻害剤の添加により、S 期/G2 期がスキップされることで、M 期に進んだ細胞が多くなり、RIBE として染色体分裂異常が観察された可能性が考えられたため、照射後の共培養 (24, 48, 72 時間) において経時的に細胞周期の変化を追いかける必要がある。これまでの蛍光免疫染色による評価のみならず、フローサイトメーターを用いた細胞周期に関する解析を検討中であり、細胞間情報伝達物質として放出された活性酸素種の定量を進めている。

軟骨肉腫細胞 HTB94 の他に、研究室内で扱う複数種のがん細胞株 (ヒト肺がん細胞株 A549, 骨肉腫細胞株 MG63 および膵がん細胞株 PANC-1) に対してコロニーアッセイによる放射線感受性の評価を行った。その結果、骨肉腫細胞株 MG63 が他の 2 種類の細胞株よりも放射線抵抗性を示すことが分かった。そこで、この MG63 株を用いて同様に同細胞種間共培養実験を実施した。ATM 阻害剤や ATR 阻害剤実験と細胞周期分布から RIBE 誘導の検証を進めている。放射線抵抗性を示す細胞株であっても、RIBE 誘導に関して異なるふるまいを見せる可能性が出てきた。放射線抵抗性の腫瘍に対して治療効果を高めるための基礎的な研究として、今回得られた知見をもとに、さらに解析を進めることで、RIBE の応答耐性メカニズムの一端を明確にしていきたい。

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 0件）

1. 著者名 Minami Kanako, Ueda Nanami, Ishimoto Kaichi, Kurisu Rio, Takamoto Miyu, Ikeda Hiroko, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 118
2. 論文標題 Roles of endothelial cells in the regulation of cell motility via lysophosphatidic acid receptor-2 (LPA2) and LPA3 in osteosarcoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	6. 最初と最後の頁 104596 ~ 104596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexmp.2020.104596	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田裕子, 上田七海, 栗栖梨緒, 高本美友, 辻内俊文
2. 発表標題 Effects of lysophosphatidic acid (LPA) signaling via LPA2 on the enhancement of chemoresistance in osteosarcoma cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学理工学部 <a href="https://www.kindai.ac.jp/science-engineering/education/teachers/detail/04_ikeda_hiroko.html">https://www.kindai.ac.jp/science-engineering/education/teachers/detail/04_ikeda_hiroko.html</a> 近畿大学理工学部生命科学科 分子腫瘍学研究室 <a href="https://www.life.kindai.ac.jp/laboratory/tsujiuchi/publication.html">https://www.life.kindai.ac.jp/laboratory/tsujiuchi/publication.html</a>
--

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