

機関番号：11301
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21710054
 研究課題名(和文) 長期放射線被ばくの生物影響：サイクリン D1 過剰発現による放射線耐性機構の解明
 研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms of acquired radioresistance induced by fractionated radiation
 研究代表者
 志村 勉 (SHIMURA TSUTOMU)
 東北大学・加齢医学研究所・助教
 研究者番号：40463799

研究成果の概要(和文)：放射線治療によるがんの根絶には、がん細胞の放射線耐性の抑制が必要である。我々は X 線反復照射で、ヒトがん細胞が放射線耐性を獲得することを明らかにした。獲得放射線耐性は AKT/GSK3beta/cyclin D1 経路の恒常的活性化が原因で、AKT 阻害剤は放射線耐性の抑制に有効である。

本研究により、AKT、GSK3beta、cyclin D1 を分子標的に、放射線耐性を抑えたより有効な放射線療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that tumor radioresistance can be suppressed by down-regulation of AKT/GSK3beta/cyclin D1 pathway. Manipulation of cyclin D1 is useful to enhance the efficacy of radiotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線、化学物質影響科学

キーワード：放射線、がん

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は、広範囲ながんを治療対象とし、組織の機能温存性に優れている利点を持つ。通常の放射線治療では、1日 2Gy で総線量 60Gy 程度の X 線を分割して照射する分割照射法が用いられる。分割照射により照射の間隔を設けることで、正常細胞の放射線傷害からの回復を利用し、がん細胞を選択的に殺すことが可能となる。しかし、がんの治癒線量と正常組織における耐用線量を考慮し、治療を行うため、がん細胞の放射線感受性によ

り治療の成否が決定される。

放射線治療における最大の難問はがん細胞の放射線耐性であり、がんの再発を引き起こし、放射線治療の失敗の原因となる。このため、がんの根絶にはがん細胞の放射線耐性の分子機構を解明し、その克服が必要である。

2. 研究の目的

これまでの放射線生物影響研究では、高線量一回照射の放射線応答の解析が行われている。しかし、一般的な放射線治療では分割

照射が用いられ、分割照射の放射線応答の解明が重要である。我々は分割照射の放射線応答を解析し、がん細胞の獲得放射線耐性の分子機構を解明することを研究目的とする。

以上の解析から放射線耐性抑制のための標的分子を明らかにし、放射線耐性を抑制したより有効な放射線治療法の確立が可能であるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 放射線耐性細胞の樹立

ヒト肝がん細胞株 HepG2 とヒト子宮頸部がん細胞株 HeLa に 0.5Gy の X 線を 12 時間毎に 1 月間分割照射し、分割照射細胞を作成した。一月間分割照射した細胞（長期分割照射細胞）は、放射線照射後の細胞死の誘導が抑制され、親株と比較し放射線耐性を示した。我々はこの分割照射細胞を放射線耐性細胞として使用した。

(2) コロニーアッセイ

細胞を培養ディッシュにまき、10 日間培養し、顕微鏡下で 50 個以上の細胞からなるコロニー数を計測した。放射線照射後のコロニー数の減少から、がん細胞の放射線感受性を解析した。

(3) ウェスタンブロッティング

タンパク質のリン酸化や発現変化を、特異的抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法で検出した。

(4) 細胞死の解析

細胞の核をヘキストで染色した後、蛍光顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、死細胞を解析した。TUNEL 法、アネキシン-PI 染色法を用いて、細胞を染色し、DNA の断片化や細胞膜の透過性を指標にアポトーシス細胞、ネクローシス細胞を定量した。

(5) ノードマウスに作成したヒト腫瘍片における抗腫瘍効果の検討

ヒトがん細胞をノードマウスの皮下に移植し、ヒト腫瘍を作製した。移植片が 40mm³ 以上の大きさで実験を開始し、放射線単独、AKT 阻害剤単独、放射線と AKT 阻害剤併用による抗腫瘍効果を腫瘍体積を測定し、検討した。

4. 研究成果

(1) サイクリン D1 過剰発現による放射線耐性の獲得

我々はがん細胞が分割照射によって一月以内に放射線耐性を獲得し得ることを明らかにした。

我々が樹立した獲得放射線耐性細胞では、細胞周期の進行を制御する G1 サイクリン、サイクリン D1 が過剰発現している。サイクリン D1 の発現量はグリコーゲン合成酵素リン酸化酵素 GSK3beta によるリン酸化によって制御される。サイクリン D1 は GSK3beta にリン酸化された後、核外に排出され、ユビキチン依存性に分解される。しかし、獲得放射線耐性細胞では分割照射で誘導される DNA 損傷が DNA 損傷センサーである DNA-PK を介して、AKT 経路を活性化する。AKT は GSK3beta をリン酸化し、不活性化するため、GSK3beta によるサイクリン D1 の分解は抑制される。このため、分割照射による AKT 経路の活性化によって、サイクリン D1 は過剰発現する（図 1）。

サイクリン D1 は本来 G1 期に蓄積し、DNA 合成期（S 期）への進行を促進し、S 期において分解される。しかし、獲得放射線耐性細胞では AKT 経路が活性化されサイクリン D1 の分解が抑制されるため、DNA 合成期においてもサイクリン D1 の発現が観察される。このサイクリン D1 の発現異常は DNA 複製を阻害し、DNA 損傷を誘導する。サイクリン D1 過剰発現による DNA 損傷は DNA 損傷応答を誘導し、DNA 修復機構が活性化される。このため、獲得放射線耐性細胞では、放射線で新たに誘導される DNA 損傷は既に活性化している DNA 修復機構によって素早く修復され、細胞死の誘導が起こらず、放射線耐性を示す。

図 1 に我々が明らかにした、サイクリン D1 過剰発現による獲得放射線耐性の分子経路を示す。

以上の結果により、がん細胞の獲得放射線耐性はサイクリン D1 過剰発現が原因であることを明らかにした。サイクリン D1 過剰発現は恒常的な DNA 損傷応答と効率的 DNA 修復を引き起こし、がん細胞は放射線耐性を獲得する。

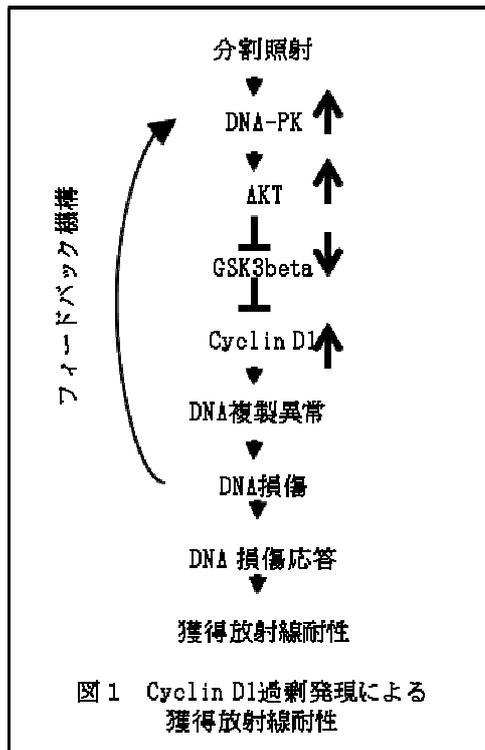
(2) AKT 阻害剤による獲得放射線耐性の抑制

がん細胞の獲得放射線耐性はサイクリン D1 過剰発現が原因であることから、サイクリン D1 を標的に放射線耐性の抑制が可能であることが示唆された。我々はサイクリン D1 の siRNA や AKT 阻害剤を用いて、獲得放射線耐性細胞のサイクリン D1 の発現を抑制した。これらの処理によって、親株と同様に獲得放射線耐性細胞では放射線照射後に細胞死が誘導され、放射線耐性を消失することを明らかにした。

放射線耐性細胞をノードマウスに移植したヒト腫瘍では、分割照射後に腫瘍体積が増加することから、放射線耐性を示した。しかし、放射線と AKT 阻害剤を併用することで、

腫瘍の放射線耐性は抑制されることから、AKT/GSK3beta/サイクリンD1経路を標的に生体内においても、放射線耐性の抑制は可能であることを明らかにした。

以上の結果より、我々は分割照射による放射線耐性には AKT/GSK3beta によるサイクリン D1 過剰発現が原因であることを明らかにした。この経路を標的にすることで、放射線耐性を抑制した、新たな放射線治療法の確立が期待される。



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)

[雑誌論文] (計6件)

1. Shimura T, Kakuda S, Ochiai Y, Kuwahara Y, Takai Y, Fukumoto M. Targeting the AKT/GSK3 β /cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway for eradication of tumor radioresistance acquired by fractionated radiotherapy *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 80:540-548, 2011 査読有

2. Bronze-da-Rocha E, Lin CM, Shimura T,

Aladjem MI. Interactions of MCP1 with Components of the Replication Machinery in Mammalian Cells. *Int J Biol Sci*;7:193-208, 2011 査読有

3. Shimura T, Kakuda S, Ochiai Y, Nakagawa H, Kuwahara Y, Takai Y, Kobayashi J, Komatsu K, Fukumoto M. Acquired radioresistance of human tumor cells by DNA-PK/AKT/GSK3beta-mediated cyclin D1 overexpression. *Oncogene* 29:4826-4837, 2010 査読有

4. Maruko A, Ohtake Y, Kawaguchi M, Kobayashi T, Baba T, Kuwahara Y, Nakagawa H, Shimura T, Fukumoto M, Ohkubo Y. X-radiation-induced down-regulation of the EGF receptor in primary cultured rat hepatocytes. *Radiat Res* 173:620-8, 2010 査読有

5. Kuwahara Y, Mori M, Oikawa T, Shimura T, Ohtake Y, Mori S, Ohkubo Y, Fukumoto M. The modified high-density survival assay is the useful tool to predict the effectiveness of fractionated radiation exposure. *J Radiat Res (Tokyo)* 51:297-302, 2010 査読有

6. Kuwahara Y, Li L, Baba T, Nakagawa H, Shimura T, Yamamoto Y, Ohkubo Y, Fukumoto M. Clinically relevant radioresistant cells efficiently repair DNA double-strand breaks induced by X-rays. *Cancer Sci* 100:747-52, 2009 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 志村勉、角田智、落合泰史、桑原義和、高井良尋、福本学、AKT 阻害剤と Cdk4 阻害剤によるヒトがん細胞の放射線耐性の抑制、日本放射線影響学会、2010 年 10 月 21 日、京都

2. 志村勉、桑原義和、高井良尋、福本学、DNA-PK/ATK/GSK3 β /Cyclin D1 経路を標的としたヒトがん細胞の獲得放射線耐性の克服、日本癌学会、2010 年 9 月 24 日、大阪

3. 志村勉、角田智、高井良尋、桑原義和、福本学、DNA-PK/AKT/GSK3b/cyclinD1 経路を標的としたヒトがん細胞における放射線耐性の克服、日本放射線影響学会、2009 年 11 月 11 日、広島

4. 志村勉、落合泰史、桑原義和、福本学、長期分割放射線被ばくによるがん細胞の放射線耐性の獲得、日本放射線影響学会、2009 年 11 月 11 日、広島

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/organization/pathology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

志村 勉 (SHIMURA TSUTOMU)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：40463799

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：