

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592766

研究課題名(和文) 口腔がん細胞のDNA損傷応答におけるHIF-DEC経路の意義

研究課題名(英文) The roles of HIF-DEC pathway on DNA repair systems in hypoxic oral cancer cells.

研究代表者

谷本 圭司 (TANIMOTO, Keiji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：90335688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮がん細胞HSC-2を用いた網羅的遺伝子発現解析により、24時間低酸素刺激により発現低下した22のDNA修復遺伝子のうち、BRCA1、RAD51、MBD4、MRE11A、MLH1、MSH2の低酸素下での転写調節機構を解析した。結果、HIF-1下流で働く転写因子DECはこれら遺伝子プロモーター活性を抑制した。さらに、低酸素前処理を行ったがん細胞の損傷応答および修復は、DEC2依存的に遅れた。一方、低酸素前処理を行ったがん細胞のガンマ線感受性は、siRNAによるDEC2抑制により増加し、低酸素前処理による放射線感受性低下機構にHIF-1-DECを介した機構が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed expression changes of numerous DNA repair-related genes under hypoxia, further noted that the effect of the changes to radiation sensitivities. Comprehensive gene expression analyses showed that 50 of 130 DNA repair-related genes were included in down-regulated genes under hypoxia. Among these genes we selected 6 genes and confirmed quantitative decreased expressions. Co-transfection reporter assay elucidated that DEC1 or DEC2 repressed those DNA repair-related genes promoter activities. In addition, knockdown of HIF1A or DEC2 attenuated hypoxic suppression of DNA repair-related gene expressions. Interestingly, detection and repair of DNA double-strand breaks by irradiations were inhibited in hypoxic pre-incubated cells. Moreover, knockdown of DEC2 increased radiation sensitivities in those cells. These data suggested that HIF-1-DEC pathway especially DEC2 play a pivotal role in radiation sensitivity via suppression of DNA repair gene expressions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：Hypoxia HIF DEC DNA repair Transcription Cancer cells

## 1. 研究開始当初の背景

口腔がんなどの固形がん治療において、より効果的な放射線療法や新しい分子標的治療薬を含む化学療法の開発は、治療後の機能温存という観点から患者の生活の質向上に大きく寄与すると期待されている。現在の抗がん治療では、効果を示す症例がある一方で、全く効果を示さない、もしくは再発・転移をきたし悲惨な結末を迎える症例も多く、治療法選択基準も曖昧な部分があり、治療抵抗性の分子機構の解明、それらを克服する画期的な治療法開発は急務である。

これまでに、固形がんの治療抵抗性に低酸素などの微小環境が大きな役割を果たしている事が明らかにされてきた (Harris AL., Nat Rev Cancer, 2002; Semenza GL., Nature Rev Cancer, 2003)。例えば、放射線の細胞障害作用が酸素分子により増強されること、逆に酸素分子が無いまたは少ない (低酸素) と放射線が効かないということは古くから知られており、腫瘍内酸素分圧と局所制御率、無病生存や全生存期間などの放射線治療予後との関連性が証明されている (Vaupel, P. et al., Cancer Metastasis Rev., 2007)。また、放射線治療抵抗性には物理的な酸素分子不足のみならず、HIF-1 経路を介したがん細胞や腫瘍内血管内皮細胞自体の放射線障害に対する抵抗性獲得が明らかとなってきた (Moeller BJ. et al. Cancer Cell, 2005)。一方、低酸素は、以前より遺伝子不安定性誘発の要因として考えられており、幾つかの DNA 修復酵素遺伝子が低酸素下で発現抑制される機構が報告された (Mihaylova et al, Mol Cell Biol., 2003; Bindra et al, Mol Cell Biol., 2004; Bindra et al, Cancer Res., 2005; Koshiji et al, Mol Cell, 2005; Bindra et al, Oncogene, 2006)。申請者も、低酸素下での転写因子 HIF-1 やその下流の転写抑制因子 DEC による *MLH1* 発現制御の分子機構を解明し報告した (Nakamura H. et al., Oncogene, 2008)。しかしながら、これら HIF-1 および DEC による DNA 修復関連遺伝子発現制御機構の詳細、DNA 損傷応答における意義、さらには治療効果にどのような影響を与えるのか、新規治療法開発へ向けた分子標的としての可能性の有無など不明であり、その解明をめざして本申請研究が着想された。

## 2. 研究の目的

本申請では、低酸素下がん細胞における放射線や抗がん剤による DNA 損傷応答機構における転写因子 HIF-1 およびその下流の転写抑制因子 DEC の意義解明をめざした。

1) 低酸素下での DNA 修復関連遺伝子発現制御機構の詳細を明らかにする。特に、HIF-1

や DEC の関与についての解明。

2) 様々な低酸素環境下口腔がんをはじめとする複数種のがん細胞株の放射線や各種抗がん剤感受性の変化と HIF-1-DEC 経路の活性の比較。

3) 低酸素環境の DNA 損傷応答への影響を、DNA 損傷認識やアポトーシス誘導へのシグナルの変化に注目して比較。

4) HIF 機能レポーター実験系を構築。

## 3. 研究の方法

DNA 損傷応答機構にかかわる、および低酸素応答 (誘導) 遺伝子・因子の発現変動について、様々な細胞株を用いて、正常酸素分圧下 (21% pO<sub>2</sub>) と低酸素分圧下 (1-5% pO<sub>2</sub>) にて比較検討した。また、それらの条件下での放射線 (X 線, γ線) や DNA 障害性薬剤に対する感受性やそれらによる DNA 損傷認識やアポトーシス誘導へのシグナルにおける HIF-1 や DEC の重要性を遺伝子ノックダウンや阻害剤などを用いて検討し、その意義を考察した。

## 4. 研究成果

口腔扁平上皮がん細胞 HSC-2 を用いた網羅的遺伝子発現解析により、24 時間低酸素刺激により通常酸素分圧下の 2/3 以下に発現低下した遺伝子群には多くの DNA 損傷応答・修復遺伝子が含まれていた。それらの DNA 修復遺伝子のうち、*BRCA1*, *RAD51*, *MBD4*, *MRE11A*, *MLH1*, *MSH2* の低酸素下での転写調節機構を、さらに解析した。その結果、HIF-1 下流で働く転写因子 DEC はこれら DNA 修復遺伝子のプロモーター活性を抑制し、そのプロモーター抑制機構は、HDAC 活性依存的、DNA 結合能依存的、および蛋白間相互作用依存的な幾つかの様式が存在する複雑な機構であることが明らかとなった。

低酸素の化学的影響を受けないように損傷刺激時には通常酸素環境下に戻す様にして低酸素前処理を行ったがん細胞の損傷応答を、γH2AX を指標に観察すると、低酸素前処理は DNA 損傷応答および修復を DEC2 依存的に遅らせることが明らかとなった。一方、低酸素前処理を行ったがん細胞のガンマ線各 1, 5, 10Gy の感受性を測定、比較した。細低酸素前処理により放射線感受性は概ね有意に低下したが、5Gy 照射でもっとも大きな差異が生じていた。siRNA による DEC2 抑制によりその感受性が増加し、低酸素前処理による放射線感受性低下機構に DEC を介した機構が関与していることが示唆された。

HIF-1-DEC を介した DNA 損傷・応答機構の詳細を明らかにし、放射線治療効果の増強のみならず、新しい防護法の開発への応用が期待され

た(論文準備中)。

## 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 12 件)

1. Akinori Morita, Keiji Tanimoto, Tomoki Murakami, Takeshi Morinaga, Yoshio Hosoi. Mitochondria are required for ATM activation by extranuclear oxidative stress in cultured human hepatoblastoma cell line Hep G2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013, 443: 1286-1290.( 査読有り )
2. Elham Khalesi, Hideaki Nakamura, Kian Leong Lee, Andika Chandra Putra, Takahiro Fukazawa, Yumi Kawahara, Yuichi Makino, Lorenz Poellinger, Louis Yuge, Keiji Tanimoto\*. The Krüppel-like zinc finger transcription factor, GLI-similar 1, is regulated by hypoxia-inducible factors via non-canonical mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013, 441: 499-506.( 査読有り )
3. Georgia Chachami, Alkmini Kalousi, Loukia Papatheodorou, Aggeliki Lyberopoulou, Vassilis Nasikas, Keiji Tanimoto, G. Simos, K. N. Malizos, E. Georgatsou. An association study between Hypoxia inducible Factor-1alpha (HIF-1 $\alpha$ ) polymorphisms and osteonecrosis. *PLOS ONE* 2013, 8: e79647. ( 査読有り )
4. Takeshi Imura, Masaya Matsumoto, Takahiro Fukazawa, Elham Khalesi, Ya-Nan Sun, Masaaki Takeda, Hiroyuki Uwatoko, Kyosuke Nakata, Keiji Tanimoto, Teruyuki Kajiume, Yumi Kawahara, Louis Yuge. Interactive effects of cell therapy and rehabilitation realize the full potential of neurogenesis in brain injury model. *Neuroscience Letters* 2013, 555: 73-78. ( 査読有り )
5. Takahiro Fukazawa, Masaya Matsumoto, Takeshi Imura, Elham Khalesi, Teruyuki Kajiume, Yumi Kawahara, Keiji Tanimoto, Louis Yuge. Electrical stimulation accelerates neuromuscular junction formation through ADAM19/neuregulin/ErbB signaling *in vitro*. *Neuroscience Letters* 2013, 545: 29-34. ( 査読有り )
6. Eisaburo Sueoka, Naoko Sueoka-Aragane, Akemi Sato, Masaru Ide, Hideaki Nakamura, Yusuke Sotomaru, Choji Taya, Hiromichi Yonekawa, Tomoyuki Kitagawa, Yasushi Kubota, Shinya Kimura, Kei Nakachi, Keiji Tanimoto\*. Development of lymphoproliferative diseases by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is associated with prolonged lymphocyte survival. *PLOS ONE* 2013, 8: e57833. ( 査読有り )
7. Andika C. Putra, Keiji Tanimoto, Marina Arifin, Budhi Antariksa, Keiko Hiyama. Genetic variations in detoxification enzymes and HIF-1 $\alpha$  in Japanese patients with COPD. *Clinical Respiratory Journal* 2013, 2013, 7: 7-15. ( 査読有り )
8. Ahmed El Sayed Mohammed, Hidetaka Eguchi, Satoru Wada, Nobuyuki Koyama, Michio Shimizu, Keiko Otani, Megu Ohtaki, Keiji Tanimoto, Keiko Hiyama, Mohammed Soliman Gaber, Masahiko Nishiyama. *TMEM158* and *FBLP1* as Novel Marker Genes of Cisplatin Sensitivity in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Experimental Lung Research* 2012, 38: 463-74. ( 査読有り )
9. Andika C. Putra, Keiji Tanimoto, Elisna Syahrudin, Sita Andarini, Yoshio Hosoi, Keiko Hiyama. A Step forward into respiratory genetics: Overview contribution of genetics in respiratory diseases. *Asian Biomedicine* 2012, 5: 639-651. ( 査読有り )
10. Ujjal K. Bhawal, Yumi Ito, Keiji Tanimoto, Fuyuki Sato, Katsumi Fujimoto, Takeshi Kawamoto, Tomonori Sasahira, Nobushiro Hamada, Hiroki Kuniyasu, Hirohisa Arakawa, Yukio Kato, Yoshimitsu Abiko. IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 2012, 113: 3246-3253. ( 査読有り )
11. Ujjal K. Bhawal, Fuyuki Sato, Yuki Arakawa, Katsumi Fujimoto, Takeshi Kawamoto, Keiji Tanimoto, Yumi Ito, Tomonori Sasahira, Takashi Sakurai, Masaru Kobayashi, Isamu Kashima, Hiroshi Kijima, Hiroki Kuniyasu, Yoshimitsu Abiko, Yukio Kato, Sadao Sato. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates CyclinD1. *Journal of Pathology* 2011; 224: 420-429. ( 査読有り )
12. Andika C. Putra, Keiji Tanimoto, Marina Arifin, Keiko Hiyama. HIF-1 $\alpha$  polymorphisms associate with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology*

2011; 16: 796-802. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 谷本圭司：低酸素研究の10年ー低酸素応答のゲノム研究ー. 第10回がんとハイポキシア研究会 特別企画シンポジウム, 横浜, 2012.12.6.
2. 谷本圭司：がん細胞における低酸素応答機構の解明. 島根大学医学部 がんプロフェッショナル養成プランセミナー, 出雲, 2012.3.22.
3. 谷本圭司, 中村秀明, 河本 健, 加藤 幸夫, 檜山 英三, 檜山 桂子, 西山 正彦, 森田明典, 細井義夫：DNA修復関連遺伝子の低酸素応答性転写抑制機構. 第54回放射線影響学会 ワークショップ 低酸素バイオロジー研究に基づく放射線生物学・放射線腫瘍学の新展開, 神戸, 2011.11.19.
4. 谷本圭司：がん細胞における低酸素応答機構の解明. 佐賀大学医学部セミナー, 佐賀, 2011.6.3.
5. 谷本圭司, 江口英孝, 和田智, 西山正彦, 檜山英三, 中村秀明, Lorenz Poellinger, 檜山桂子：がん細胞におけるVHL蛋白制御機構. 第8回がんとハイポキシア研究会, 札幌, 2011.1.30.

〔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

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
谷本 圭司 (TANIMOTO Keiji)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
研究者番号： 90335688
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者