

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659876

研究課題名（和文）異常ハンチンチン発現による口腔癌放射線増感法の開発

研究課題名（英文）Radiosensitization of oral cancer cells by expressing abnormal Huntingtin

研究代表者

三浦 雅彦（MIURA MASAHIKO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10272600

研究成果の概要（和文）：本研究は、異常ハンチンチン遺伝子が細胞内で発現すると、DNA二重鎖切断(DSB)修復に必要なKu70タンパクが枯渇することから、放射線が照射された場合、DSB修復が抑制され、腫瘍細胞が放射線増感増を示すのではないかという仮説を検証するものである。検討の結果、核内封入体が形成されている細胞では、放射線によるDSBの修復が抑制され、放射線増感を示すことがわかった。より高い発現を効率よく誘導する必要があると考えられ、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to explore the hypothesis that tumor cells should be radiosensitized by expressing the abnormal Huntingtin protein because the repair of DNA double strand breaks (DSB) is reported to be inhibited in neurons expressing such a protein due to exhaustion of Ku70 essential for the DSB repair. We found that tumor cells forming nuclear inclusion bodies exhibit inhibition of DSB repair and radiosensitization. Efficient expression must be obtained as a radiosensitizing strategy and further study is required.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科：歯学 細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学、放射線増感

1. 研究開始当初の背景

最近、日本の癌治療において、放射線治療を受ける患者が急増している。その理由として、臓器の機能温存が可能なため、治療後のQOLが極めて高い治療法であることが認識されてきたこと、治療における体力的負担が軽いこと、放射線治療技術が著しく進歩し、治療成績が向上してきたことが挙げられる。こう

した背景において、生物学的に放射線感受性を高めるための具体的な方法論が求められており、様々な観点から研究が進められている。

2. 研究の目的

本研究は、日本人には比較的まれな常染色体優性遺伝病である、神経症状を主症

状とするハンチントン病の病態を、口腔癌細胞に再現し、放射線による癌細胞の細胞死誘導効率を高めることができないかという仮説を検証するものである。2010年5月に報告されたハンチントン病の病態メカニズムは、神経細胞内に形成されるポリグルタミン核内凝集体が、内因性に形成される2重鎖切断(DSB)の修復に必須なKu70というタンパクをトラップ、分解するために、DSB修復が抑制されることで神経細胞死が起こるといものである。放射線による細胞死の原因は、DSB修復不全であり、Ku70はこの過程で必須の役割をはたしていることから、ハンチントン病の病態を口腔癌細胞中に作り出せば、放射線増感が可能ではないかとの発想に至った。これまで、放射線腫瘍学において神経疾患を主症状とするハンチントン病が注目されることは一度もなかったが、今回初めて明確な接点が生じ、放射線治療への応用の可能性が浮かび上がってきた。放射線照射後にも異常ハンチンチンの発現によってDSB修復抑制が確認されれば、有用な放射線治療増感法の候補となりうる。

3. 研究の方法

(1)細胞株

CAGを88回繰り返し配列する第1エクソンを、ドキシソルビシン(DOX)処理した時にのみ発現する腫瘍細胞HeLa(Tet-on EGFP-88Q)、対照として正常な配列数17回を有する細胞HeLa(Tet-on 17Q)ならびに舌癌細胞株(SAS)を用いた。

(2)DSB修復能

放射線照射後のDSB修復能は、抗53BP1抗体を用いた蛍光免疫染色により、2Gy照射後、核内に観察されるフォーカス数を計測することによって定量した。蛍光像は、蛍光顕微鏡BZ-9000(KEYENCE)により取得した。

(3)放射線感受性

DOX処理、未処理のHeLa(Tet-on EGFP-88Q)細胞にX線照射(130 kV, 5 mA, 0.5 mm Alフィルター付加)し、コロニー形成法によって生存率を求めた。50個以上の細胞からなるものをコロニーとして計数した。

4. 研究成果

(1)Tet-onシステムにおける異常ハンチンチ

ンの発現

ハンチントン病の原因遺伝子ハンチンチンの第1エクソンには、正常において11-34のCAGという配列のコピーが存在するが、患者ではこの繰り返しが37-876コピーにも増加する。その結果、この遺伝子からは、アミノ末端のグルタミンの連続が長くなったタンパクが作られ、ハンチンチンタンパクは凝集を引き起こしやすくなり、このポリグルタミンは、他のタンパク質にも影響を与えることが知られている。岡澤らのグループは、DSB修復に必須の役割を果たすKu70というタンパクが、この凝集体に吸着されるため、核内でのKu70が枯渇することにより、神経細胞が内因性のDSB修復ができずに細胞死を引き起こし、ハンチントン病を引き起こすモデルを提唱した(Enokido et al., J Cell Biol, 2010)。そこで、CAGを88回繰り返し配列する第1エクソンを、ドキシソルビシン(DOX)処理した時にのみ発現する腫瘍細胞HeLa(Tet-on EGFP-88Q)を100 ng/ml DOXで処理し、48時間後にEGFPの発現を蛍光顕微鏡で観察した。図1に示すように、多くの細胞の細胞質や核に蛍光が観察された。割合としては少ないものの、核封入体として強い発現を示すものも認められた。これ以上のDOX濃度で処理して、も発現パターンに大きな差は認められなかった。

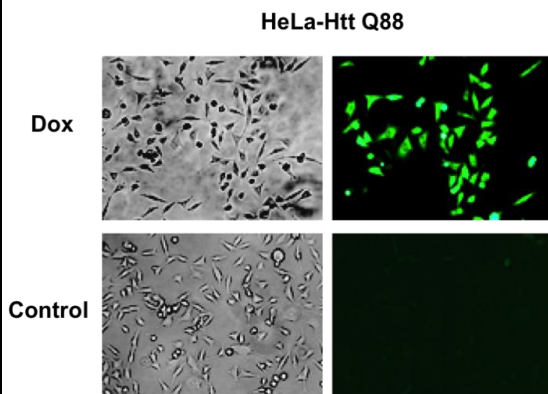


図1 Tet-on EGFP-88Q細胞におけるDOX処理後の異常ハンチンチンの発現
左が明視野像、右は蛍光像を示す。

(2)異常ハンチンチン発現細胞の放射線感受性

DOX処理によって異常ハンチンチンの発現

が認められたことから、DOX 処理 48 時間後に種々の線量を X 線照射し、コロニー法によって生存率を求めた。その結果を図 2 に示す。DOX 処理細胞は、未処理細胞に比べ、わずかに放射線感受性を示すことが判明した。

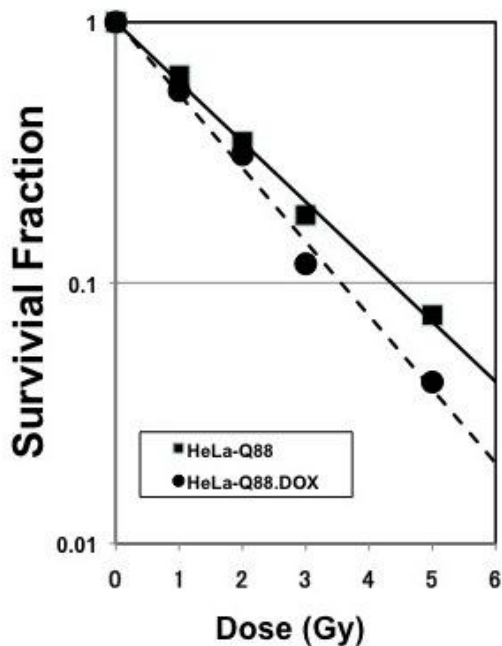


図 2 Tet-on EGFP-88Q 細胞における DOX 未処理、処理 48 時間後の線量-細胞生存率曲線

(3) 異常ハンチンチン発現が 2Gy 照射後の DSB 修復能に与える影響の解析

線量-細胞生存率曲線において認められた放射線感受性の差がわずかであったことから、異常ハンチンチン発現のパターンによって、増感の程度に差が出る可能性が考えられた。そこで、DOX 処理 48 時間後、異常ハンチンチンの発現が細胞質に認められた細胞、核内に封入体として認められた細胞に分け、2Gy 照射し、1, 3, 6, 24 時間後に細胞を固定し、抗 53BP1 抗体によって免疫染色を行って、DSB 修復能に相違が認められるかを調べた (図 2)。フォーカス形成を定量的に解析した結果、核内封入体を形成した場合のみ、フォーカス形成の消失が有意に抑制されることがわかった (図 3)。また、コントロールとして、正常な CAG リピート数を有するエクソン 1 を発現させた場合には、当然ながら核内封入体は認められず、細胞質にのみ発現が認められたが、その際の DSB 修復能は、DOX 未処理細胞と変わらなかった (図 4)。

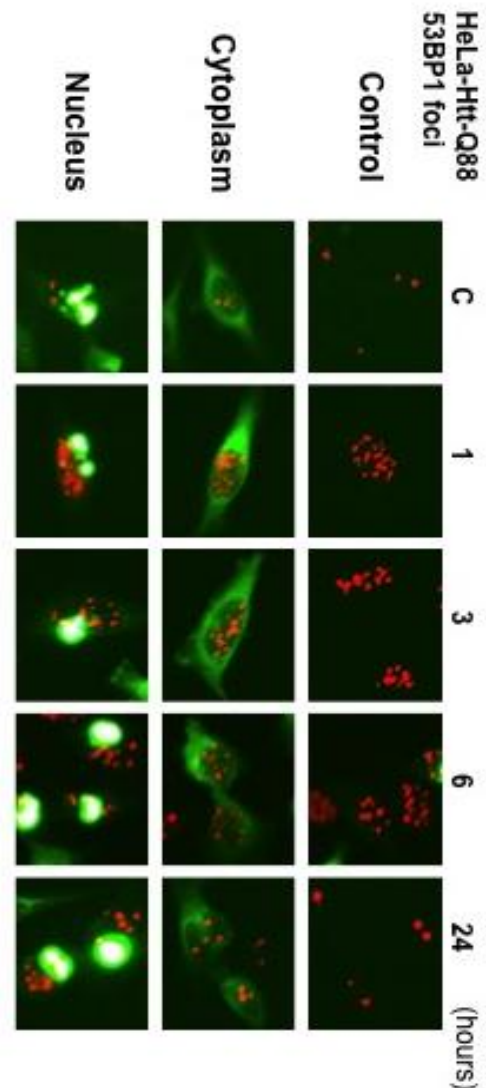


図 3 Tet-on EGFP-88Q 細胞における 53BP1 フォーカス形成の時間経過

Tet-on EGFP-88Q 細胞を 100 ng/ml 処理 48 時間後に 2Gy 照射し、種々の時間後、細胞を固定した後、抗 53BP1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。緑：EGFP (異常ハンチンチン Ex1) ;

赤：53BP1

(4) 舌癌細胞株への異常ハンチンチンの発現次に、CMV ベクターを用いて EGFP-88Q をリポフェクタミンを用いて、舌癌細胞株 (SAS) にトランスフェクションしたが、発現効率が低く、わずかに細胞質に蛍光が認められるものが得られたが、核内封入体を示すものは認められなかった。

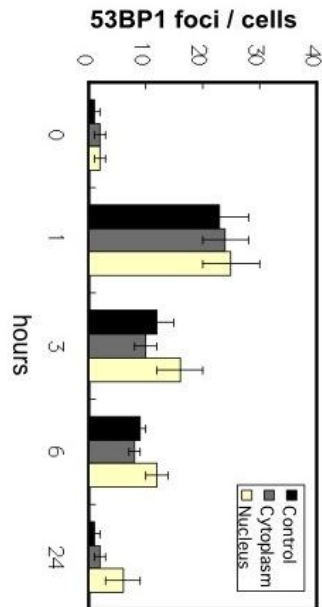


図3 Tet-on EGFP-88Q 細胞における 2Gy 照射後の 53BP1 フォーカス数の定量

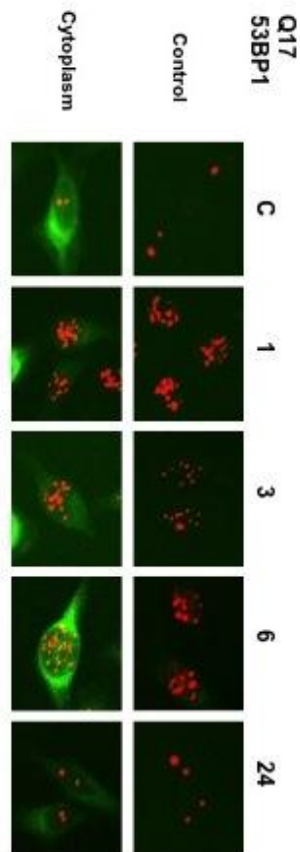


図4 Tet-on EGFP-17Q 細胞における 2Gy 照射後の 53BP1 フォーカス形成の時間経過
緑：正常 Ex1；赤：53BP1

(5) 結論

Tet-on EGFP-88Q 細胞を用いた解析から、DOX 処理して異常ハンチンチンを発現させたとしても、核内封入体を形成する程に高い

発現を示した細胞のみが、DSB 修復の抑制を示すと考えられた。おそらく、異常ハンチンチン凝集体が Ku70 をトラップする能力は、それほど高いものではないと推測される。DOX 処理したすべての細胞を用いて放射線感受性を調べても、増感の程度がわずかであったのは、この理由によるものと考えられた。舌癌細胞株に CMV プロモーターでドライブされる EGFP-88Q を発現させようとリポフェクタミンにてトランスフェクションを試みたが、核内封入体を有するものは得られなかった。ウイルスベクターを用いる等、より効率よく強力に発現させる戦略が必要であると考えられ、放射線増感戦略としてこの手法を応用するためには、さらなる研究が必要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

三浦雅彦 シンポジウム：放射線による細胞死を考える その3 治療戦略に向けて
日本放射線影響学会第 55 回大会 平成 24 年 9 月 6 日～9 月 8 日 仙台

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 雅彦 (MIURA MASAHIKO)

研究者番号：10272600