

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15577

研究課題名(和文) レンチウィルスライブラリーを用いた放射線抵抗性に関わる因子の探索

研究課題名(英文) Search for factors inducing radioresistance using lentivirus libraries

研究代表者

小林 稔 (Kobayashi, Minoru)

京都大学・放射線生物研究センター・特定研究員

研究者番号：40644894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：がんの放射線抵抗性克服は重要な課題であるが、未だ細胞の放射線感受性を調節する因子については不明な点が多く残されており、放射線治療において大きな問題となっている。そこで本申請ではがん細胞の放射線抵抗性獲得に関わる遺伝子をスクリーニングし、そのメカニズムの解析を行った。その結果得られた遺伝子の一つが、HIF-1を活性化することでグルコース代謝をペントースリン酸経路優位なものに変化させ、細胞内レドックス状態を還元状態にすることで放射線抵抗性に寄与することを見出した。今後、この遺伝子をターゲットとした阻害剤を用いることで、がんの放射線抵抗性克服につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Overcoming the radioresistance of cancer is an important issue. However, regulatory factor for radiosensitivity of cells are still unclear. That is a major problem in radiation therapy. Therefore, we screened the genes involved in the regulation of radiation resistance of cancer cells and analyzed their mechanisms. One of candidate genes induce radioresistance by the increase in antioxidant property through changing intracellular redox status. Cancer cells acquire antioxidant phenotypes through metabolic reprogramming including acceleration of pentose-phosphate pathway in a HIF-1 dependent manner. We expected that inhibitors targeting this gene will be used to overcome the radioresistance of cancer.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線抵抗性 遺伝子スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、放射線治療装置の機能が高度化して、がん局所に対して大線量の放射線を照射できるようになってきている。しかしながら、例えば大線量の放射線照射を行ったとしても、がんはしばしば再発し、遠隔転移を引き起こす。この原因の一つとして、一部のがん細胞の高い放射線抵抗性が示唆されている。これまで、放射線感受性に関わる因子として、細胞周期の調節因子や DNA 損傷修復系、腫瘍内低酸素など、様々な因子が見出されているが、未だ細胞の放射線感受性を調節する因子、その因子がどのようにして放射線抵抗性を引き起こすのかについては不明な点が多く残されており、放射線治療において大きな問題となっていた。

2. 研究の目的

そのような背景のもと、本研究では正常細胞にがん遺伝子などを導入して作成する人工がん細胞などをターゲットに、レンチウイルスライブラリーを用いて cDNA 発現ライブラリーを導入、放射線抵抗性を獲得した細胞から導入された遺伝子を回収することでスクリーニングを行い、放射線抵抗性に関わる遺伝子の網羅的探索を行う。また、放射線抵抗性に関わることが知られる HIF-1 の活性を制御する因子を、同様にライブラリーを用いて探索することにより、HIF-1 の活性化因子を探索、前述した放射線抵抗性を獲得した遺伝子のスクリーニング結果と比較することによって、HIF-1 を活性化する因子が放射線抵抗性に及ぼす影響を調べる。これらの系を通じて、細胞の放射線抵抗性に関わるメカニズムの解明と、新たな化学放射線併用療法の治療ターゲットの探索に挑んだ。

3. 研究の方法

(1) 放射線抵抗性に関わる遺伝子のスクリーニング

cDNA 発現ライブラリーや shRNA ライブラリーをがん細胞に導入し、放射線抵抗性を獲得する遺伝子や、低酸素応答の制御に関わる遺伝子の探索を行った。また、細胞を低酸素条件下で培養した際に上昇する遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて解析を行い、低酸素で上昇してくる遺伝子のうち、放射線抵抗性に関わる遺伝子の探索を行った。また、二つの解析結果を相互に比較することで、低酸素による放射線抵抗性に関与する因子の探索を試みた。

(2) 放射線抵抗性獲得メカニズムの解析

上記のスクリーニング方法で得られてきた遺伝子について、過剰発現やノックダウンを行うことによって、細胞周期の制御や細胞内レドックスの制御など、放射線抵抗性に関わることが知られている経路について、Propidiumiodide (PI) を用いた細胞周期解析

や定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析、細胞内レドックス状態の指標となる NADPH/NADP 比や細胞の抗酸化物質であるグルタチオンの酸化、還元状態の比 (GSH/GSSG 比) の解析などを行うことによって、当該遺伝子がどのようなメカニズムによって放射線抵抗性の獲得に寄与するのかを検討を行った。

また、上記の検討によって得られた知見より、放射線抵抗性を担うことが予測された経路について、遺伝子の knock-down や阻害剤などを用いることで、実際に該当経路が放射線抵抗性獲得に寄与しているかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1) 放射線抵抗性に関わる遺伝子のスクリーニング

本研究の中で cDNA ライブラリー、shRNA ライブラリーを用いて遺伝子のスクリーニングを行うことによって、放射線抵抗性に関わる遺伝子の探索を行った。

その結果、いくつかの候補遺伝子が得られた。得られた候補遺伝子の中には、放射線抵抗性に関わることが知られているシグナル経路に関連した遺伝子や、放射線抵抗性との関係があることが知られている低酸素によって誘導される遺伝子なども得られた。このことから、これらの遺伝子は、今回の放射線抵抗性に関わる因子の探索という本スクリーニングにおいて、有望な候補遺伝子であることが予想される。

(2) 放射線抵抗性獲得メカニズムの解析

上記のスクリーニングによって得られてきた遺伝子のうち、HIF-1 活性にも影響を及ぼすことが判明した遺伝子の一つに着目し、過剰発現ベクターや shRNA 発現ベクターの構築を行った。これらのベクターをがん細胞に導入し、該当遺伝子の発現をコントロールすることによって、放射線に対する感受性が変化することを確認した。

さらに、当該遺伝子を過剰発現した細胞を詳細に解析した結果、GSH/GSSG 比が増大していた。このことから、該当遺伝子は細胞内レドックス状態を還元状態に変化させることによって、放射線抵抗性の獲得に寄与することが示唆された。

さらに、この GSH/GSSG 比の増大がどのようなメカニズムによるものか解析を行った結果、当該遺伝子の過剰発現によって、NADPH/NADP 比の増大、ペントースリン酸経路の有意な亢進が起こっており、ペントースリン酸経路によって生成される NADPH によって、細胞内の還元型グルタチオン量が増加することによって、細胞の抗酸化能が亢進、放射線抵抗性を獲得していることが示唆された。

ペントースリン酸経路を介した抗酸化能亢進と放射線抵抗性獲得の関与を検討するた

めに、ペントースリン酸経路の律速酵素として知られる G6pdx の阻害を行った。その結果、当該遺伝子の過剰発現によって引き起こされる NADPH/NADP 比、GSH/GSSG 比の増大、ならびに放射線抵抗性の亢進が見られなくなった。このことから、この当該遺伝子による放射線抵抗性の獲得は、ペントースリン酸経路が優位になり、その結果、抗酸化能が亢進することによって引き起こされていることが明らかになった。

(3) 放射線抵抗性獲得メカニズムにおける HIF-1 の関与の検討

また、当該遺伝子は HIF-1 活性の亢進も引き起こすことから、当該遺伝子の放射線抵抗性の亢進が HIF-1 活性を介して引き起こされているかどうかを検討するため、HIF-1 α を阻害することによる放射線抵抗性の変化を調べた。その結果、この放射線抵抗性の亢進が HIF-1 α を knock down することによって失われたことから、この放射線抵抗性の獲得が、HIF-1 経路を介して引き起こされていることが示された。

この結果は、HIF-1 が代謝経路をペントースリン酸経路優位なものにすることで、細胞内レドックス状態を還元状態に保つことにより放射線抵抗性に寄与することを示すデータである。

今後、該当遺伝子に対する阻害剤などを開発することによって、がんの放射線抵抗性克服につながることを期待される。

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)

Yeom CJ, Zeng L, Goto Y, Morinibu A, Zhu Y, Shinomiya K, Kobayashi M, Itasaka S, Yoshimura M, Hur CG, Kakeya H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H., LY6E: a conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis. *Oncotarget*、査読有、Oct 4;7(40):65837-65848.、2016、doi: 10.18632/oncotarget.11670.

Nakashima R, Goto Y, Koyasu S, Kobayashi M, Morinibu A, Yoshimura M, Hiraoka M, Hammond EM, Harada H.、UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization. *Scientific Report.*、査読有、Jul 31;7(1):6879.、2017、doi: 10.1038/s41598-017-06605-1.

Goto Y, Koyasu S, Kobayashi M, Harada H.、The emerging roles of the ubiquitination/deubiquitination system in tumor radioresistance regarding DNA damage responses, cell cycle regulation, hypoxic responses, and antioxidant properties: Insight into the development of novel radiosensitizing strategies. *Mutation Research*、査読有、Oct;803-805:76-81.、2017、doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.007.

Kobayashi M, Morinibu A, Koyasu S, Goto Y, Hiraoka M, Harada H.、A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of its downstream genes. *FEBS Journal*、査読有、Nov;284(22):3804-3816.、2017、doi: 10.1111/febs.14280.

Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H.、Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Science*、査読有、Mar;109(3):560-571.、2018、doi: 10.1111/cas.13483.

Katagiri T, Kobayashi M, Yoshimura M, Morinibu A, Itasaka S, Hiraoka M, Harada H.、HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog. *Oncotarget*、査読有、Jan 11;9(12):10525-10535.、2018、doi: 10.18632/oncotarget.24156.

[学会発表](計 8 件)

Minoru Kobayashi, Akiyo Morinibu, Sho Koyasu, Yoko Goto, Ryota Nakashima, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada、Molecular mechanisms underlying the crosstalk between circadian clock gene, PRE2, and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)、第 32 回 放射線国際シンポジウム、2016 年 9 月、京都

Minoru Kobayashi, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada、Molecular mechanisms underlying the crosstalk between circadian clock gene, PRE2, and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)、第 75 回 日本癌学会学術総会、2016 年 10 月、横浜

小林 稔, 森嶋 章代, 子安 翔, 後藤 容子, 平岡 真寛, 原田 浩、Molecular mechanisms underlying the crosstalk

between period circadian clock 2 (PRE2) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)、第14回 がんとハイポキシア研究会、2016年11月、岐阜

Minoru Kobayashi, Akiyo Morinibu, Sho Koyasu, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada、Circadian Clock Gene, PER2, activates HIF-1 by promoting recruitment of HIF-1 α to a promoter region of its downstream gene、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Adaptations to Hypoxia in Physiology and Disease (X4)、2017年3月、Canada, Whisler

Minoru Kobayashi, Syo Koyasu, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada、A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to its enhancer regions、第76回 日本癌学会学術総会、2017年10月、横浜

小林 稔, 森嶋 章代, 子安 翔, 後藤 容子, 平岡 真寛, 原田 浩、A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of its downstream genes、第15回 がんとハイポキシア研究会、2017年11月、兵庫

Minoru Kobayashi, Akiyo Morinibu, Sho Koyasu, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada、A Circadian Clock Gene, PER2, Activates HIF-1 as an Effector Molecule for Recruitment of HIF-1 α to Promoter Regions of Its Downstream Genes、第33回 放生研国際シンポジウム、2017年12月、京都

Minoru Kobayashi, Akiyo Morinibu, Sho Koyasu, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada、A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of Its downstream genes、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Therapeutic Targeting of Hypoxia-Sensitive Pathways (V1)、2018年4月、England, Oxford

〔その他〕

ホームページ等

京都大学大学院 生命科学研究科 がん細胞生物学ホームページ

http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 稔 (KOBAYASHI, Minoru)

京都大学生命科学研究科 特定研究員