

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20909

研究課題名(和文) 多層オミクス手法による放射線治療耐性化機序の解明と臨床バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of radioresistance in cancer cells using trans-omics approach and development of clinical biomarkers for radiotherapy.

研究代表者

金光 祥臣 (Kanemitsu, Yoshitomi)

東北大学・薬学研究科・助手

研究者番号：30752943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんの放射線耐性化に関する分子の同定とそのメカニズムの解明を目的とした。継続的放射線照射によって耐性能を獲得 (Clinically Relevant Radioresistant, CRR) したがん細胞株とその親株を資材として、プロテオームとメタボロームを比較した。CRR 細胞では、シャペロンや酸化ストレスに関するタンパク質が増加していることが明らかになった。また、CRR 細胞では、脂肪酸や複数のアミノ酸の細胞内濃度が、より増加していることをメタボローム解析によって明らかにした。これらの分子は、放射線耐性化マーカーおよび新規治療ターゲットとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify the molecules involved in radioresistance of cancer cells and to elucidate its mechanism. Here, we quantitatively compared the proteomes and the metabolomes of clinically relevant radioresistant (CRR) cell lines and their parent strains. In CRR cells, the chaperones and the proteins involved in oxidative stress were higher than control cell lines. Pathways such as amino acid metabolism and fatty acid metabolism were found to be highly enriched in CRR cells. These molecules can be expected as radiation tolerance markers and/or new targets for cancer therapies.

研究分野：医療薬学

キーワード：放射線耐性 プロテオミクス メタボロミクス 脂肪酸合成酵素 がん細胞

## 1. 研究開始当初の背景

臨床では、がんの放射線治療に耐性を示し、予後不良となる症例が存在する。さらに、放射線の治療効果を臨床的に予測するバイオマーカーが未だ得られていないため、患者個々に最適な照射線量や照射期間を選択できない、という課題もある。したがって、放射線耐性化機序の解明と特異的バイオマーカーの開発は、放射線がん治療の進展および放射線個別化治療につながる重要な研究課題である。

研究協力者である福本らは、低線量 X 線の継続照射により、親株と背景ゲノム構造が同一である放射線耐性細胞株の樹立に、世界で初めて成功した (*Cancer Sci.*2009 100:747-752, *Med Mol Morphol.* 2017 50:195-204)。この細胞株は、標準的な放射線治療線量である 2 Gy の X 線を毎日照射しても、安定して生存し続けることから、放射線耐性化メカニズムを解析するための臨床的モデルがん細胞として非常に有用な資材である。これらの、Clinically Relevant Radioresistant (CRR) 細胞とその親株細胞のメタボロームとプロテオームを解明し、それぞれの変動機序を相互に補完し合う、多層オミクス手法を駆使すれば、より論理的な分子メカニズムに基づく放射線耐性化のバイオマーカーや創薬ターゲットの発見が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム解析および LC-MS を用いたプロテオミクス・メタボロミクス手法によって、CRR 細胞における放射線耐性化に関与する分子の同定・量的変動を明らかにする。さらに耐性化能獲得に至るまでの時間的な変化を捉えることで、各分子の寄与度や時間的な分子間の関係性を明確し、機序解明へと迫る。この機序解明を応用して、新規治療標的や治療選択に有用なバイオマーカーの開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) 細胞と X 線照射装置

本研究では、以下の異なる組織由来のがん細胞および CRR 細胞 (-R と標記) を使用した (肝がん由来細胞株 HepG2 および HepG2-R、口腔がん由来細胞 SAS および SAS-R)。5% FBS を含む RPMI 培地で、標準的方法による培養、継代を行った。X 線照射は、MX-80 LaboGLASSLESS (mediXtec) を使用した。耐性能の評価は、継続的な X 線照射後の細胞数計測や H2AX の免疫染色にて行った。

### 2) プロテオーム比較解析

CRR 細胞を安定同位体標識したリジン・アルギニン含有培地で少なくとも 7 日間以上培養した。各細胞の細胞質基質画分、膜・オルガネラ画分、核画分それぞれのタンパク質を抽出した後、nanoLC-MS/MS (LTQ orbitrap velos, Thermo) に附し、Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture (SILAC) 法に準じて、タンパク質同定・比較定量解析を行った。

### 3) メタボローム比較解析

各細胞の継代後 3 日間に渡る経時的なメタボローム情報を LC-MS (QExactive, Thermo) 測定によって取得し、CRR 細胞と親株間に量的な差があるイオンピーク (feature) を多変量解析により抽出した。また、TCA 回路関連代謝物やアミノ酸について、精密質量の絞込によってピーク面積を算出し、比較を行った。さらに、細胞の主要なエネルギー代謝経路である解糖、ミトコンドリアによる好気呼吸の状態を、細胞外フラックスアナライザー (XFe24, Agilent Technologies) を用いて比較した。

### 4) 次世代シーケンサーによる 15 のがん関連遺伝子配列の比較

HepG2-R および SAS-R と各親株細胞の DNA を抽出し、固形がん変異が頻出する 15 の変異遺伝子 (AKT1、GNA11、NRAS、BRAF、GNAQ、PDGFRA、EGFR、KIT、PIK3CA、ERBB2、KRAS、RET、FOXL2、MET、TP53) を次世代シーケンサー (MiSeq, illumina) を用いて解読した。健常者リファレンス配列と比較し、各細胞に存在する遺伝子変異の状態について明らかにした。

### 5) 脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase; FASN) 阻害剤の感受性比較

FASN 阻害剤である Fasnil, orlistat の細胞毒性感受性を MTT assay によって評価した。

## 4. 研究成果

### 1) SILAC 法によるプロテオーム解析

各画分から約 1000 (計 3000) のタンパク質が同定された。この中から、2 種以上のペプチドによって相対定量が可能であり、かつペプチド間の強度比の変動率が 30% 以内のものを絞込んだ結果、それぞれの画分から約 500 のタンパク質が抽出された。次いで、CRR 細胞において、親株より発現量が 1.5 倍以上に増加しているタンパク質を画分から抽出した (表 1)。

表 1: CRR 細胞において 1.5 倍以上増加した各画分のタンパク質数

Cell	No. of proteins		
	Cytosol	Membrane	Nucleus
HepG2-R	35	40	60
SAS-R	49	90	21

これらの生理機能の特徴を捉えるために Gene Ontology ツリー解析を行った結果、HepG2-R、SAS-R 共にいずれの画分においても核酸、RNA、DNA、タンパク質などとの結合に関わるものが主に増加していることが明らかになった。また、細胞質画分および膜画分においては、酸化還元代謝や酸化ストレスに関わるタンパク質群が増加し、核画分においては脂肪酸合成に関わるタンパク質群が増加していることが明らかになった。このうち 18 種のタンパク質は、HepG2-R と SAS-R の各画分において共に親株よりも増加していたことから、これらは CRR の放射線耐性能の形質獲得に重要な役割を担っている可能性がある。

細胞質画分において親株細胞との発現量比が最も大きかった Thioredoxin domain-containing protein 5 (TXNDC5) は、ウェスタンブロットによっても発現量が増加していることを明らかにした (図 1)。TXNDC5 は、Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリータンパク質の一つであり、小胞体におけるタンパク質の酸化的フォールディング反応触媒システムに重要な役割を担っている。近年、様々ながん細胞で発現が増加していることやがんの悪性度との相関が報告されているが、放射線耐性との関連性については未解明な点が多い。現在、shRNA 処理や過剰発現細胞の作製に着手しており、放射線耐性能への関与や耐性化バイオマーカーとしての有用性について解析を進めている。

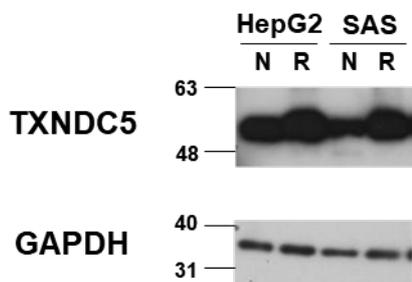


図 1 ウェスタンブロットによる TXNDC5 および GAPDH の発現量比較  
N: 親株細胞、R: CRR 細胞

## 2) メタボローム比較解析

LC の分離カラムに、オクタデシルシリル基と陽イオンおよび陰イオン交換樹脂を有するミックスモードカラム

SS-C18 (Imtakt) を用いることで、一般的な単一固定相カラム分析では成し得なかった幅広い極性の細胞内代謝物を検出することが可能となった。また、カラムの劣化や MS 検出感度などに起因するデータの変動を補正するソフトウェア Quantbolome (*PLOS ONE*, 2016 11(8)) を用いることで、より精度の高い比較解析が可能であった。

各細胞の継代後 24h、48h、72h の 3 つの時間ポイントにおけるメタボローム情報に対し、OPLS 判別分析 (SIMCA) を実施し、S-plot を記述した (図 2)。

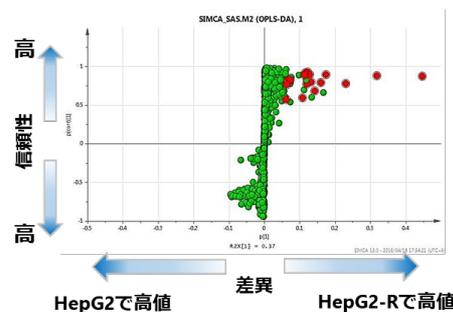


図 2 SAS および SAS-R メタボロームの OPLS 判別分析結果 (S-plot)

3 つの時間ポイントにおいて SAS-R で発現量が高い代謝物 (feature) を赤丸で描写

この S-plot から CRR 細胞において発現量が増加している代謝物候補 (feature) を可視的に抽出した。それらは 継代後の 3 つの時間ポイントで共通して高いことを確認されたため、親株よりも CRR 細胞で恒常的に多く存在している代謝物群である可能性が高い。精密質量を基に Human Metabolome Database から候補代謝物の化合物推定をした結果、CRR 細胞では、ある種のリン脂質やアシルグリセロールなど脂肪酸関連代謝物が親株よりも多く存在していることが示唆された。また、CRR 細胞では活性酸素種から細胞を保護する補助的役割を果たすグルタチオンの細胞内濃度も高く維持されていることが示唆された。これらについては、今後標品を用いた化合物同定やイオンモビリティ MS 測定による同定を行う予定である。

HepG2-R では、パルミチン酸やリノール酸などの長鎖脂肪酸の細胞内濃度が高いことが示唆され、プロテオミクスによって明らかにした脂肪酸合成酵素の発現量増加と関連性があると考えられた。近年、脂肪酸代謝能の亢進が、がんの悪性度や薬物治療耐性に関連することが明らかにされており、放射線耐性においても同様なメカニズムが存在する可能性がある。

同様にしてプロテオミクスにより、HepG2-R 細胞ではアスパラギンの生成

に關する酵素群の発現量が高値であることが示唆されたため、精密質量推定のアスパラギンのイオンピーク強度を確認した所、HepG2-R で有意に高いことを明らかにした (図 3)。このことから、本研究で得られたプロテオーム情報とメタボローム情報は、それぞれの変動機序を相互に補完し得る重要な知見となることが示唆された。

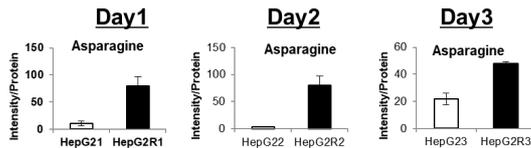


図 3 継代後 24 h、48 h、72 h 後の HepG2 と HepG2-R 中アスパラギンの相対定量  
縦軸：イオンピーク強度を総タンパク量で補正した値

乳がんの転移や進展には、アスパラギンが重要な役割を果たしていることから (*Nature* 2018 554: 378-38)、今後アスパラギンの代謝変動と CRR 細胞の形質獲得との関連性を詳細に解析していく予定である。

また、細胞外フラックスアナライザーを用いて CRR 細胞と親株細胞のエネルギー代謝経路である解糖、ミトコンドリアによる好気呼吸の状態を計測した結果、SAS と SAS-R 間には有意な差が認められなかったが、HepG2-R では親株細胞と比較して解糖能が高いことが明らかになった (図 4)。

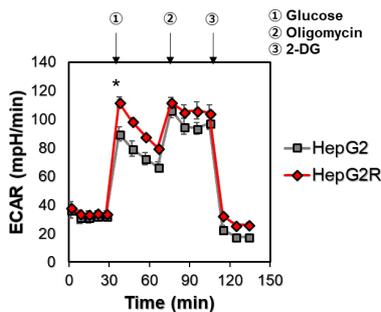


図 4 HepG2 および HepG2-R の解糖能の評価  
n = 3, 各プロットは、Mean ± SD

今後これらに關する酵素群の発現量および代謝能変動と放射線耐性との関連性も追求していく予定である。

### 3) 次世代シーケンサーによる 15 のがん関連遺伝子配列の比較

健常者リファレンス配列と比較して、HepG2-R では、EGFR、PDGFRA、TP53 に SAS-R では MET、TP53 に親株には存在していない新たな変異が生じていることが明らかとなった。逆に、親株に存在していた TP53 のいくつかの変異

が消失していることも明らかとなった。TP53 は、アルギニン生合成経路を活性化し、アルギニンを供給することで、AKT の活性化を抑制している機能が報告されている (*Science Advances*. 2017;3(5))。CRR 細胞の TP53 に生じている変異が直接的にアルギニン代謝変動に關しているか否かは未解明ではあるが、本研究では、HepG2-R の細胞内アルギニン濃度が親株よりも高いことを明らかにした (図 5)。

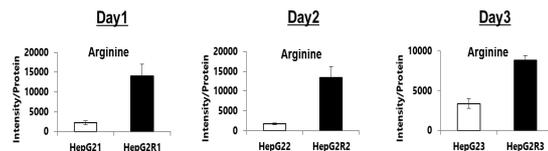


図 5 継代後 24 h、48 h、72 h 後の HepG2 と HepG2-R 中アルギニン相対定量  
縦軸：イオンピーク強度を総タンパク量で補正した値

AKT はがん増殖やアポトーシス回避に重要な役割を担うが、細胞内の活性酸素を増加し、その除去を抑制することも知られている (*Nature Reviews Cancer* 2009; 76-77)。CRR 細胞では、放射線による活性酸素の障害を抑えるために、AKT の活性化を抑える形質を獲得している可能性が考えられたため、現在 AKT や p-AKT の発現量について解析中である。

### 4) FASN 阻害剤の感受性比較

本研究では、プロテオミクスおよびウェスタンブロットから CRR 細胞の核画分においてのみ、FASN が親株よりも高い発現量であることを明らかにした (図 6)。FASN は、細胞内で NADPH 存在下においてアセチル CoA とマロニル CoA からパルミチン酸を生合成する酵素である。がん細胞では、FASN が過剰に発現していることが知られており、その特異的阻害剤は、新たながん治療選択として注目されている。

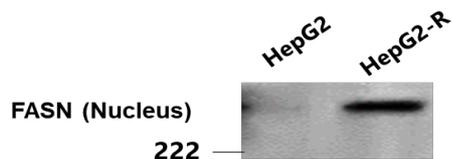


図 6 ウェスタンブロットによる FASN の発現量比較

そこで、FASN 特異的阻害剤である Fasnil および非特異的阻害剤である Orlistat について、その細胞毒感受性の差を MTT アッセイで比較した結果、特に HepG2-R では親株と比較して Fasnil に対する感受性が高いことが明

らかとなった (図 7)。

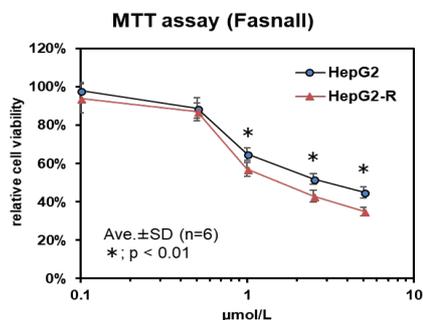


図7 HepG2 及び HepG2-R の MTT アッセイによる Fasnall (FASN 阻害剤) の細胞毒性感受性評価

このことから、FASN 阻害剤は、放射線耐性細胞の治療薬または、新たな化学放射線治療法の開発の一助となり得ることが示唆された。

## 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 5 件)

1. Eikan Mishima, Shinji Fukuda, Yoshitomi Kanemitsu, Daisuke Saigusa, Chikahisa Mukawa, Kei Asaji, Yotaro Matsumoto, Hiroki Tsukamoto, Tatsuki Tachikawa, Tsukimi Tomoya, Noriko Fukuda, Hsin-Jung Ho, Koichi Kikuchi, Chitose Suzuki, Fumika Nanto, Takehiro Suzuki, Sadayoshi Ito, Tomoyoshi Soga, Yoshihisa Tomioka, and Takaaki Abe  
Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model  
American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2017 Nov 22:ajprenal003142017. 査読有

2. Yoshitomi Kanemitsu, Kei Asaji, Yotaro Matsumoto, Hiroki Tsukamoto, Daisuke Saigusa, Chikahisa Mukawa, Tatsuki Tachikawa, Takaaki Abe, and Yoshihisa Tomioka  
Simultaneous quantitative analysis of uremic toxins by LC-MS/MS with a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange tri-modal mixed-mode column  
Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2017 Nov;1068-1069:1-8. 査読有

3. Eikan Mishima, Shinji Fukuda, Chikahisa Mukawa, Akinori Yuri, Yoshitomi Kanemitsu, Yotaro Matsumoto, Yasutoshi Akiyama, Noriko N. Fukuda, Hiroki Tsukamoto, Kei Asaji, Hisato Shima, Koichi Kikuchi, Takehiro Suzuki, Yoshihisa Tomioka, Tomoyoshi Soga, Sadayoshi Ito and Takaaki Abe  
Evaluation of the impact of gut microbiota o

n uremic solute accumulation by CE-TOFMS-based metabolomics approach  
Kidney International, 2017 Sep;92(3):634-645. 査読有

4. Hiroki Tsukamoto, Yuki Yamagata, Ippo Ukai, Shino Takeuchi, Misaki Okubo, Yohei Kobayashi, Sao Kozakai, Kanae Kubota, Muneo Mumasaki, Yoshitomi Kanemitsu, Yotaro Matsumoto and Yoshihisa Tomioka  
An inhibitory epitope of human Toll-like receptor 4 resides on leucine-rich repeat 13 and is recognized by a monoclonal antibody  
FEBS Lett. 2017 Aug;591(16):2406-2416. 査読有

5. Daisuke Jinno, Yoshitomi Kanemitsu, Kazuki Saitoh, Shinnosuke Nankumo, Hiroki Tsukamoto, Yotaro Matsumoto, Takaaki Abe, Yoshihisa Tomioka  
Rapid and selective simultaneous quantitative analysis of modified nucleosides using multi-column liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
Journal of Analytical Science and Technology, 2017 Jan;8(1), 1-9. 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 富岡佳久<sup>1</sup>、金光祥臣<sup>1</sup>、松本洋太郎<sup>1</sup>、桑原 義和<sup>2</sup>、福本 学<sup>3</sup>、塚本宏樹<sup>1</sup>(1 東北大薬、2 東北医科薬・医、3 東京医科)  
多層オミクス手法による放射線耐性化関連分子の探索  
第 3 回 治療耐性がん細胞研究協議会セミナー、2018 年 2 月 24 日、成田富里徳洲会病院

2. 金光祥臣<sup>1</sup>、浅地圭<sup>1</sup>、松本洋太郎<sup>1</sup>、塚本宏樹<sup>1</sup>、三枝大輔<sup>2</sup>、阿部高明<sup>3</sup>、富岡佳久<sup>1</sup>(1 東北大薬、2 東北メガバンク、3 東北大医)  
ミックスドモード ODS カラムを用いた LC-MS/MS による尿毒症物質一斉定量系の構築  
第 56 回日本薬学会東北支部大会、2017 年 10 月 21 日、青森

[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

金光 祥臣 (KANEMITSU, Yoshitomi)  
東北大学・大学院薬学研究科・助手  
研究者番号：30752943

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

富岡 佳久 (TOMIOKA, Yoshihisa)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：00282062

松本 洋太郎 (MATSUMOTO, Yotato)  
東北大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号：90420041

塚本 宏樹 (TSUKAMOTO, Hiroki)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：70423605

福本 学 (FUKUMOTO, Manabu)  
東京医科大学・医学部・特任教授  
研究者番号：60156809

桑原 義和 (KUWAHARA, Yoshikazu)  
東北医科薬科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00392225