

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19855

研究課題名(和文) がん放射線治療の基礎となるPLDR阻害と修復不能なDNA二重鎖切断の関わり

研究課題名(英文) The Involvement of PLDR inhibition and unreparable DNA double-strand breaks as a basis for radiotherapy

研究代表者

関原 和正 (Sekihara, Kazumasa)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20761662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：修復不能なDNA二重鎖損傷の測定を切り口として、潜在的致死損傷修復阻害が放射線による修復不能なDNA二重鎖損傷産生にどのように影響を与えるか検討した。潜在的致死損傷修復阻害が修復できないDNA二重鎖損傷数を増加させた。しかし照射直後のDSB数には有意な差が見られなかった。次にヒト前立腺がん細胞株および口腔がん細胞株を用いてヒストン脱メチル化阻害剤の放射線および抗がん剤の増強効果を検証した。いずれもヒストン脱メチル化阻害剤を処理すると、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。さらに前立腺がんに対してJIB-04が放射線の抗腫瘍効果およびDNA修復との関連性を高めることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は長年期待されていたPLDR阻害メカニズム解明に対して、最新の分子生物学を用いて挑む野心的な試みであり、放射線や抗がん剤によるがん治療に対する新しい考え方の基盤となる。それと同時に最近のホットトピックである、クロマチン構造の変化とDSB修復の関連性のより深い理解にも貢献できる。特に修復不能なDSBとの関係を検証するのは世界初の試みである。

研究成果の概要(英文)：Using the measurement of unreparable DNA double strand breaks(DNA-DSBs) as a indicator, we examined how inhibition of potentially lethal damage recovery(PLDR) affects the production of unreparable DNA-DSBs by radiation. The inhibition of PLDR increased the number of unreparable DNA-DSB. But there was no significant difference in the number of DSBs immediately after irradiation. We next tested whether histone demethylation inhibitors enhance the antitumor effects of radiation and anticancer agents in human prostate cancer and oral cancer cell lines. In both cell lines, the treatment with a histone demethylation inhibitor inhibited cell growth in a dose dependent manner. Furthermore, it was suggested that JIB-04 enhances the antitumor effect of radiation and is associated with DNA repair in prostate cancer.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA修復 潜在的致死損傷回復 クロマチンリモデリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

1980~90年代の潜在的致死損傷回復(PLDR: potentially lethal damage recovery)に関する研究により、一過性の高張処理により放射線による障害からのPLDRが阻害されるということが知られている。近年の分子生物学の進歩により、放射線によるDNA損傷からの修復機構の主要経路を解明された。しかし、PLDRの分子メカニズムとその阻害は放射線や薬剤によるがん治療における重要な因子であるにも関わらず、未だ明らかでない。

放射線照射により、修復不能でいつまでも細胞内に留まり続ける損傷があることが以前から指摘されている。申請者らの研究室では、ヒト正常線維芽細胞への放射線照射後、数か月以上経過しても消え去らない修復不能なDNA二重鎖切断(DSB: double strand break)がある程度の頻度で出現すること、これらの損傷を有する細胞は分裂せず、早期老化の形質を発現することを報告した。これらの現象から、修復不能なDSBが多数産生される細胞内環境を一時的に作ることであれば放射線治療効果のさらなる改善が期待できるのでないかという仮説を立てた。核膜はクロマチンダイナミクスに大いに関わっていることが古くから知られており、また最近、一過性の高張処理により、核膜結合性の遺伝子砂漠(gene desert)領域にDSBが増加し、修復も阻害されるという結果が報告された。そこで、申請者らがこれまで測定してきた修復不能なDNA損傷(DSB)を指標にして、核膜やクロマチン構造が関わるPLDR阻害の分子メカニズムを明らかにし、損傷の固定化を基礎とした新しい「がん細胞死」モデル実験を行う。

## 2. 研究の目的

PLDRの阻害は、放射線や抗がん剤によるがん治療効果を増強する。PLDRには細胞増殖停止が関わり、その動態解析から早い修復と比較的遅い修復機構が関与しているとされてきた。本研究では、放射線で生じる修復不能な(困難な)DNA損傷(DNA DSB)の測定を切り口として、PLDR阻害が修復不能なDSB産生にどの様に影響を与えるか検討し、核膜やクロマチン構造が関与するDNA損傷生成と保持、それに対する修復因子の発動機構を明らかにする。これにより、がん放射線治療に対する新しいアイデアを提唱する。

## 3. 研究の方法

PLDR阻害分子メカニズムの検証

まずクロマチンの凝集により、放射線誘発のdamage量が変化するか、あるいはrepair systemに変化が現れるか否かを検証した。

ヒト線維芽細胞株HCA2を0.1% FCS cultureにて1週間培養し、Go期(quiescent)にする。高張処理として0.1 M NaCl(浸透圧は通常の2倍である)が細胞の生死には影響ない)を添加し、1日後にX線6 Gy照射し、1,2週間培養した。 $\gamma$ H2AXおよび53BP1の蛍光免疫染色によりDSB foci数を測定した。さらに、放射線誘発のdamage量が変化するか、あるいはrepair systemが影響を受けるのかを調べるため、0.1 M NaCl添加条件下でX線を1 Gy照射し、照射1時間後から24時間後に残存するDSB数を観察した。

In vitroでの修復阻害薬の放射線増感作用測定

### 1) ヒストン脱メチル化阻害剤処理および放射線単独での細胞に対する効果のスクリーニング

まず対数増殖期および平衡期の前立腺がん細胞株3株(LNCaP, PC3, DU145)および口腔がん細胞株2株(OSC-19, HSC-3)に対して、濃度および作用時間を変化させてヒストン脱メチル化阻害剤である5-カルボキシ-8-ヒドロキシキノリン(IOX1)およびJIB-04を添加し、細胞生存アッセイおよびコロニー形成能アッセイを用いて解析を行った。また、同様にそれぞれの細胞に対し、線量を変えてX線を照射し、その後コロニー形成能アッセイを用いて解析を行った。これにより、適当な条件を決めた。

決めた条件で、それぞれの細胞にヒストン脱メチル化阻害剤処理および放射線照射を行い、コロニー形成能アッセイを用いて解析を行い、併用効果を観察した。

### 2) ヒストンメチル化酵素およびヘテロクロマチン関連タンパクのノックダウンによる放射線感受性への影響

ヒストンのメチル化を制御している多くのヒストンメチル化酵素が近年同定され、転写制御、ヘテロクロマチン形成、DNAメチル化の制御などの機能が明らかになってきた。その中でも本研究ではSUV39H1に着目して解析を進めた。

#### 4. 研究成果

##### PLDR 阻害分子メカニズムの検証

最初に高張処理条件を決めるため、様々な濃度の NaCl を添加したところ、0.1 M NaCl 添加（浸透圧 500 mOsmol/kg 相当）では細胞に影響ないが、それ以上になると維持できなくなった。Go 期にした HCA2 に高張処理（0.1 M NaCl 添加）条件下で X 線を 6Gy 照射し、1, 2 週間培養すると、残存する修復できない DSB 数 (repair foci 数) が約 1.5 倍に増加した（図 1）。これは高張処理により、クロマチン凝集が生じ、PLDR が阻害されたためであると考察した。さらに、0.1 M NaCl 添加条件下で X 線を 1 Gy 照射し、照射 1 時間後から 24 時間後に残存する DSB 数を観察した。0.1 M NaCl 添加した場合、照射直後（1 時間後）の DSB 数 (repair foci 数) には有意な差が見られなかった（図 2）。高張処理によるクロマチンの凝集は、放射線誘発の damage 量の変化をもたらすのではなく、その後の repair system に影響を与えるということがわかった。

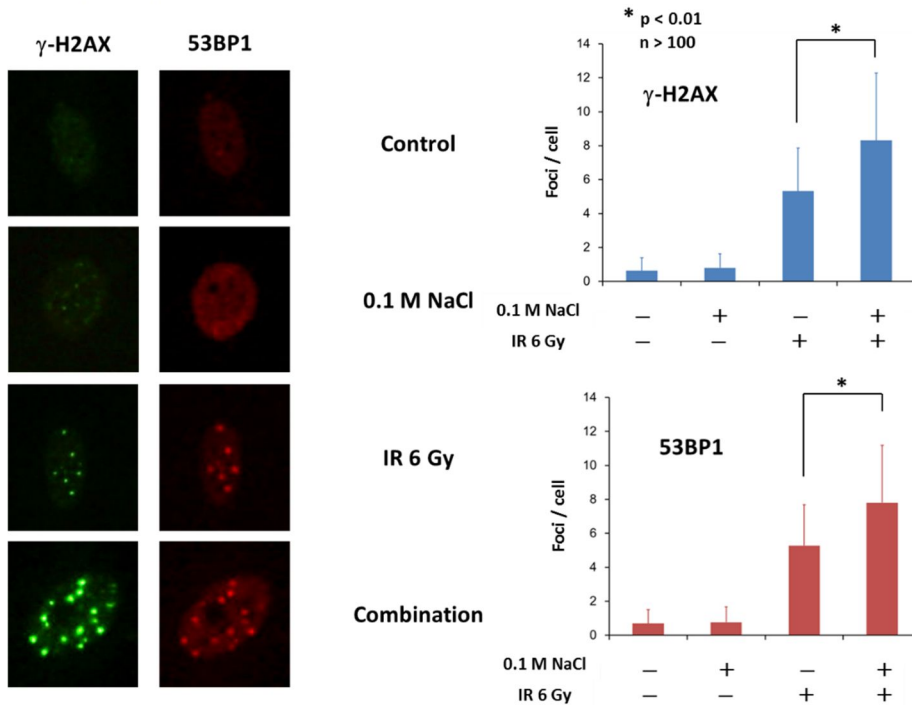


図 1：高張処理と X 線 6Gy 照射の併用の効果（照射 1 週間後）

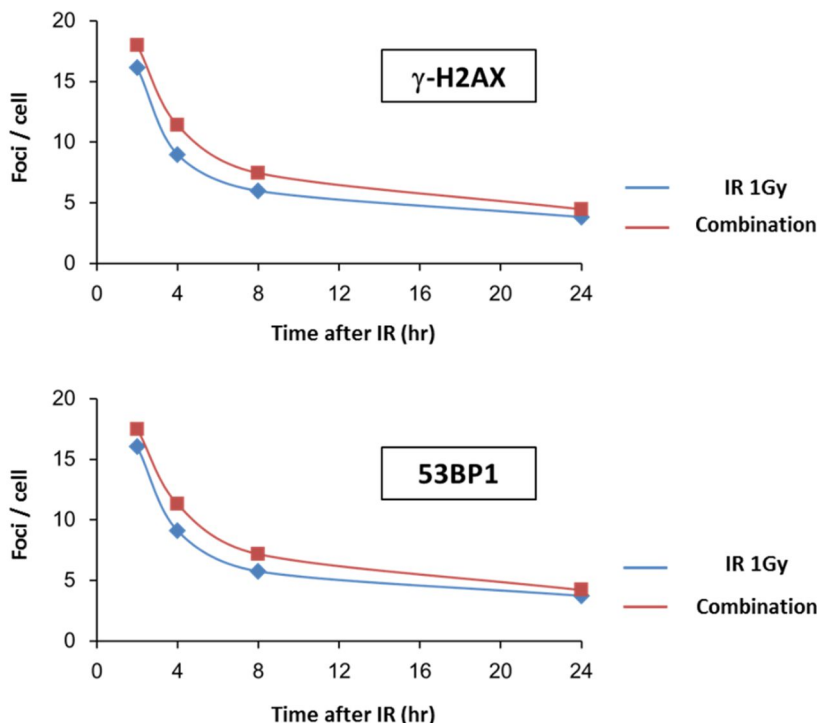


図 2：高張処理と X 線 1Gy 照射の併用の効果（照射 1 時間～24 時間後）

さらに、Go 期にした HCA2 に 0.1 M NaCl 添加条件下で X 線を 6Gy 照射し 1 週間培養した後、さらに 1 週間そのまま培養するのと 10% FCS に換え培養した場合を比較した。培地を 10%FCS に置き換えることで血清飢餓状態から解放されると、細胞周期が回りだし修復不可能な DSB の数は減少した。これは細胞が分裂しない、もしくは極めてゆっくりと分裂する状況でも作用する非相同末端結合修復 (non-homologous end joining: NHEJ) に加え、細胞周期が回ることによって相同組換え (homologous recombination: HR) による修復もできるようになることが理由であると考えられた。それでも依然として高張処理による修復疎外の影響は残っていた (図 3)。

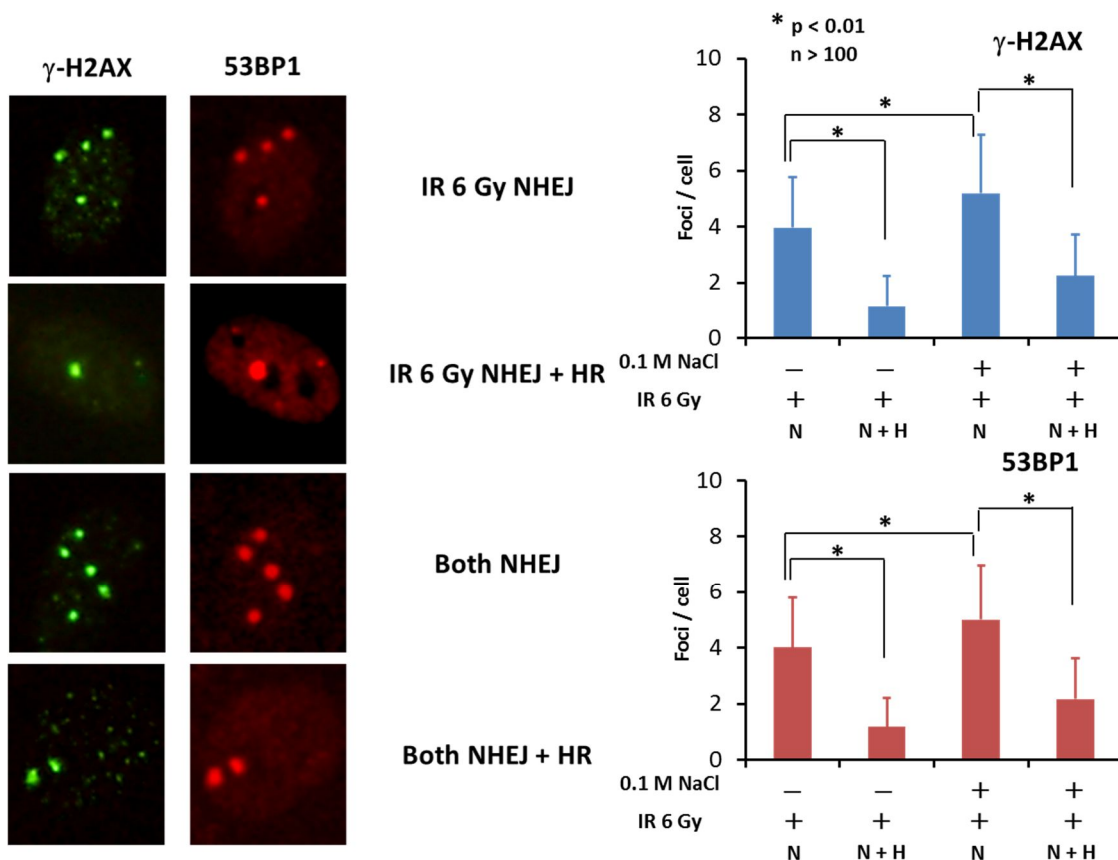


図 3 : 修復不能な DSB に対する細胞周期の影響

#### In vitro での修復阻害薬の放射線増感作用測定

- 1) ヒストン脱メチル化阻害剤処理および放射線単独での細胞に対する効果のスクリーニング

ヒト前立腺がん細胞株 (LNCaP, PC3, DU145) および口腔がん細胞株 (OSC-19, HSC-3) を用いてヒストン脱メチル化阻害剤の放射線および抗がん剤の増強効果を検証した。いずれも JIB-04 を処理すると、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。さらに前立腺がんに対して JIB-04 が放射線の抗腫瘍効果および DNA 修復との関連性を高めることが示唆された。

- 2) ヒストンメチル化酵素およびヘテロクロマチン関連タンパクのノックダウンによる放射線感受性への影響

SUV39H1 を siRNA でノックダウンし、コロニー形成能アッセイを用いて、放射線感受性への影響を観察したところ、SUV39H1 阻害により放射線感受性が増強されることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tabé Yoko, Saitoh Kaori, Yang Haeun, Sekihara Kazumasa, Yamatani Kotoko, Ruvolo Vivian, Taka Hikari, Kaga Naoko, Kikkawa Mika, Arai Hajime, Miida Takashi, Andreeff Michael, Spagnuolo Paul A., Konopleva Marina	4. 巻 8
2. 論文標題 Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35198-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sekihara Kazumasa, Saitoh Kaori, Yang Haeun, Kawashima Haruki, Kazuno Saiko, Kikkawa Mika, Arai Hajime, Miida Takashi, Hayashi Nobuhiro, Niyonsaba Francois, Sasai Keisuke, Tabé Yoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Correction: Low-dose ionizing radiation exposure represses the cell cycle and protein synthesis pathways in in vitro human primary keratinocytes and U937 cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0205581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tabé Yoko, Tafuri Agostino, Sekihara Kazumasa, Yang Haeun, Konopleva Marina	4. 巻 21
2. 論文標題 Inhibition of mTOR kinase as a therapeutic target for acute myeloid leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Therapeutic Targets	6. 最初と最後の頁 705 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/14728222.2017.1333600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sekihara Kazumasa, Saitoh Kaori, Han Lina, Ciurea Stefan, Yamamoto Shinichi, Kikkawa Mika, Kazuno Saiko, Taka Hikari, Kaga Naoko, Arai Hajime, Miida Takashi, Andreeff Michael, Konopleva Marina, Tabé Yoko	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeting mantle cell lymphoma metabolism and survival through simultaneous blockade of mTOR and nuclear transporter exportin-1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 34552 ~ 34564.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.18632/oncotarget.16602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tabbe Y, Yamamoto S, Saitoh K, Sekihara K, Monma N, Ikeo K, Mogushi K, Shikami M, Ruvolo V, Ishizawa J, Hail N Jr, Kazuno S, Igarashi M, Matsushita H, Yamanaka Y, Arai H, Nagaoka I, Miida T, Hayashizaki Y, Konopleva M, Andreeff M.	4. 巻 77
2. 論文標題 Bone Marrow Adipocytes Facilitate Fatty Acid Oxidation Activating AMPK and a Transcriptional Network Supporting Survival of Acute Monocytic Leukemia Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1453 ~ 1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 関原和正, 中島慎太郎, 來生知
2. 発表標題 治療抵抗性を誘導する骨髄細胞の流入と口腔癌幹細胞の分子メカニズム
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関原和正、斎藤香里、梁夏恩、三井田孝、笹井啓資、田部陽子
2. 発表標題 皮膚微小環境における低線量放射線の直接効果およびバイスタンダー効果
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sekihara Kazumasa, Saitoh Kaori, Yang Haeun, Miida Takashi, Sasai Keisuke, Tabbe Yoko
2. 発表標題 The direct and bystander effects of low dose radiation on skin infiltrating model
3. 学会等名 European Radiation Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sekihara K, Saitoh K, Yang H, Miida T, Tabe Y.
2. 発表標題 mTOR/XP01 dual inhibition represses pro-survival metabolism and induces antitumor effects on human mantle cell lymphoma
3. 学会等名 The 29th World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関原和正, 梁夏恩, 田部陽子.
2. 発表標題 Inhibitor of mTOR enhances the antitumor effects of XP01 inhibitor KPT-185 in mantle cell lymphoma.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sekihara K, Saitoh K, Yang H, Miida T, Andreeff M, Tabe Y.
2. 発表標題 Combinatorial Inhibition of mTOR and Exportin-1 (XP01) Represses Cell Survival Via Metabolic Modulation of Pro-survival Pathways in Mantle Cell Lymphomas.
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (ESMO) 2017 congress. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sekihara K, Saitoh K, Yang H, Miida T, Sasai K, Tabe Y.
2. 発表標題 The direct and bystander effects of low-dose radiation on the skin immune system.
3. 学会等名 4th Asian Congress of Radiation Research (ACRR) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関原和正, 斎藤香里, 梁夏恩, 三井田孝, 田部陽子.
2. 発表標題 MCLにおけるmTOR、XP01阻害によるエネルギー代謝抑制
3. 学会等名 第5回がん代謝研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関原和正、斎藤香里、三井田孝、田部陽子
2. 発表標題 マントル細胞リンパ腫のエネルギー代謝と生存シグナルを標的としたmTORおよびXP01核外輸送シグナルの同時阻害効果
3. 学会等名 第4回がん代謝研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kazumasa Sekihara, Kaori Saitoh, Takashi Miida, Michael Andreeff, Marina Konopleva, Yoko Tabe
2. 発表標題 The simultaneous blockade of mTOR and nuclear transporter exportin-1 induces synergistic antitumor effect through pro-survival metabolism in mantle cell lymphoma
3. 学会等名 The fourth annual meeting of the Society of Hematologic Oncology (SOHO 2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 関原和正、田部陽子
2. 発表標題 マントル細胞リンパ腫におけるXP01阻害剤KPT-185とmTOR阻害剤AZD-2014の併用効果
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 関原和正、斉藤香里、河島陽来、林宣宏、笹井啓資、三井田孝、田部陽子
2. 発表標題 ヒト表皮角化細胞および単球系細胞に対する低線量放射線の影響
3. 学会等名 日本放射線影響学会第59回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 河島陽来、関原和正、斉藤香里、田部陽子、林宣宏
2. 発表標題 低線量放射線が肥満細胞に及ぼす影響－プロテオミクスを用いた検討－
3. 学会等名 日本放射線影響学会第59回大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----