

平成30年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20436

研究課題名(和文)CAM/ECMによる放射線誘導性G2アレスト動態に基づいた新規放射線増感法の構築

研究課題名(英文)Establishment of novel radiosensitization based on radiation-induced G2 arrest modified by CAM/ECM

研究代表者

戒田 篤志(KAIDA, Atsushi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40632097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、具体的な関連因子の同定には至らなかったものの、細胞培養における接着環境が放射線照射後の細胞周期動態に影響することを明らかにした。さらに放射線照射後のG2アレスト動態に影響し得る化合物を機能既知な化合物ライブラリーより探索することで複数抽出することに成功した。放射線照射後の細胞周期動態にはDNA修復が大きく影響していることから、元来より生存に寄与していることはよく知られており、本研究課題にて抽出された化合物と放射線の併用効果についてより詳細な検討を進めることで、G2アレストを標的とした新規放射線増感法の構築につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I revealed the effect of some adhesion factors on radiation-induced G2 arrest kinetics using fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci). However, I could not identify the factor determining cell cycle kinetics following the irradiation. In addition, I identified some chemical candidates affecting radiation-induced G2 arrest by using a chemical library composed of 1073 function-known compounds. It is well-known that DNA repair contributes to radiation-induced cell cycle kinetics. Therefore, I will examine whether the candidates can be applied as a radiosensitizer or not, and establish a novel radiosensitization targeting its factor.

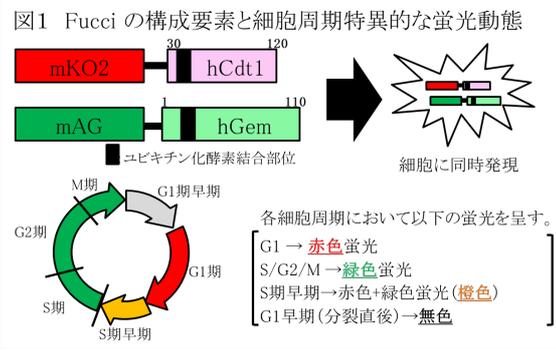
研究分野：放射線生物学

キーワード：固形腫瘍 腫瘍内微小環境 CAM/ECM 放射線治療 G2アレスト 化合物スクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

現在、放射線治療は粒子線治療をはじめとした放射線治療施設の充実化が図られ、また物理学的アプローチによりがんに対して放射線を高精度に集約させることでがんへの高線量処方が可能となり、治療効果の上昇や治療選択肢の拡大に貢献している。放射線生物学においても、コロニー形成法を基盤とした生存曲線から求められた4つの“R”(修復: Repair, 再分布: Reassortment, 再酸素化: Reoxygenation, 再増殖: Repopulation)と呼ばれる概念が古くに提唱され、実際に放射線照射された固形がん内で生じる動態を評している点は過去の大きな功績であった。しかしながら、やはりコロニー形成法は細胞生存確率を評価する一手法に過ぎず、がん細胞が死または生存という結果に到達する過程において、放射線照射によるがん細胞動態への影響は細胞運命を評価する上で決して無視することのできない要素である。将来的な新規放射線増感法の構築のためには生物学的アプローチが必須であり、特に治療抵抗性メカニズムの根幹でもある放射線治療中のがんにおける細胞動態に関して更なる理解が重要となってくる。

そこで細胞動態を追跡する上で有用なツールとなり得るのがライブイメージングであり、最近ではイメージング技術の開発は活況を極めている。私たちの研究室では、2008年に発表されたリアルタイム細胞周期イメージングシステムである Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci: 図1)に着目し、研究を進めてきた。Fucci は、細胞周期特異的に発現する Cdt1 および Geminin の2種類のタンパク質に注目しており、それぞれのユビキチン化酵素結合部位を含んだドメインに、赤色蛍光タンパク質である monomeric Kusabira Orange 2 (mKO2)および緑色蛍光タンパク質である monomeric Azami Green (mAG)を融合させた2つのプローブから構成されている。これら2



つのプローブを細胞に同時発現させると、G1期には赤色蛍光、S/G2/M期には緑色蛍光を示し、またS期早期では、赤色および緑色蛍光のいずれもが発現する橙色を呈し、分裂直後のG1早期では無色となる。このようにFucciを細胞に導入することにより生きたままで細胞周期動態を把握することが可能となる。

私たちは、Fucci 導入がん細胞を用いた多数の基礎的検討を行ってきており、その中でがん細胞の培養環境の違い(単層培養系・スフェロイド・マウス皮下移植腫瘍)に応じて放射線照射後のG2アレスト動態が異なることを初めて見出した。更にマウス皮下移植腫瘍モデルでは放射線照射後のG2アレストが持続するほど細胞生存率が上昇するという結果を得ており、この結果は放射線照射後におけるG2アレスト動態の腫瘍内微小環境による修飾が細胞生存に大きく寄与していることが示唆されている。さらに、これまでの研究結果から細胞接着因子(CAM)/細胞外マトリックス(ECM)分子が放射線照射後の細胞周期動態に影響する可能性が示唆されており、CAM/ECM分子がG2アレスト動態の修飾に寄与している可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、放射線照射後の細胞周期動態を規定する因子をCAM/ECM分子より検索することにより明らかにし、同因子を標的とした新規放射線増感法の構築を目指した。

### 3. 研究の方法

放射線照射後のG2アレスト動態に影響し得る

CAM/ECM 分子を同定するために、単層培養系においてプラスチックディッシュおよびガラスディッシュを用いた。両ディッシュにおいて Fucci 導入腫瘍細胞を培養し、放射線照射後の細胞周期動態をタイムラプスイメージングならびにフローサイトメトリーにて解析した。さらに放射線照射後の DNA 修復動態については H2AX または 53BP1 の発現を指標として検討した。また、各ディッシュで培養した細胞よりタンパク質および mRNA を抽出し、抗体アレイならびにマイクロアレイを行った。化合物探索においては、当大学にて有する化合物ライブラリー1071 種類を利用し、ArrayScanVTI を用い、放射線照射ある時間後の赤色細胞・緑色細胞の比から G2 アレスト動態への影響を推定し、G2 アレストを遷延もしくは解除し得る化合物をスクリーニングした。

#### 4. 研究成果

##### (1) ディッシュの性質に応じた放射線照射後の細胞周期動態および DNA 修復動態

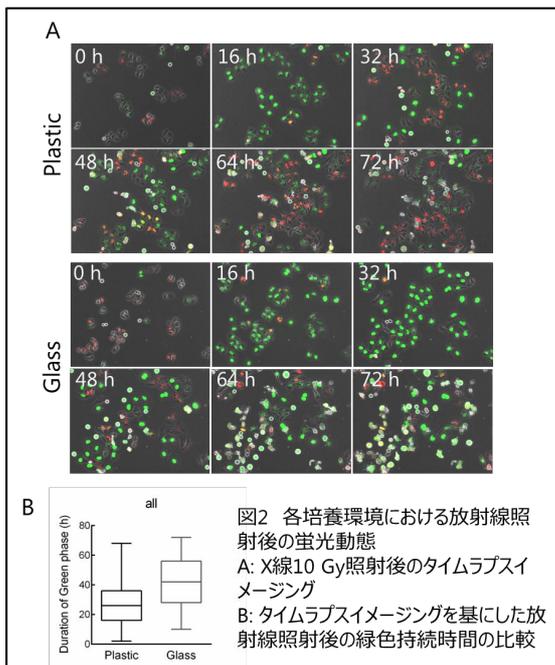


図2 各培養環境における放射線照射後の蛍光動態  
A: X線10 Gy照射後のタイムラプスイメージング  
B: タイムラプスイメージングを基にした放射線照射後の緑色持続時間の比較

ガラスディッシュで培養した細胞に放射線照射を行った結果、プラスチックディッシュと比較して、G2 アレストが遷延することが示された(図2)。さらに、放射線照射各時間後における DNA ダメージ生成量ならびに修復量を定量的に評価したところ、照射直後の DNA ダメージ生成量は

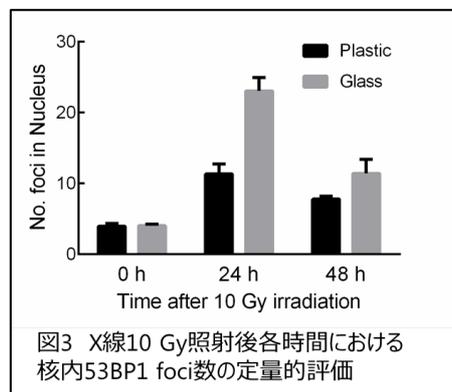


図3 X線10 Gy照射後各時間における核内53BP1 foci数の定量的評価

ずれのディッシュにおいて同等にもかかわらず、修復動態ではガラスディッシュで培養された細胞の方が有意に遅いことが示唆された(図3)。

##### (2) 放射線照射後の G2 アレスト動態規定因子の網羅的解析による同定

ガラスディッシュによる放射線照射後の G2 アレスト遷延の原因を特定するために、各ディッシュで培養された細胞よりタンパク質または mRNA を抽出し、網羅的解析を行った。抗体アレイでは 200 種類余りの CAM/ECM 分子より規定因子の同定を狙ったが、有意に変化した分子を検出することができなかった。また、マイクロアレイでは、有意に変化した分子を複数特定するには至ったが、それらの規定因子候補が G2 アレスト動態に直接的に影響しているかを検証することができなかった。

##### (3) G2 アレスト動態に影響し得る化合物の検索

本来であれば、G2 アレスト動態規定因子を標的とした化合物を検索する予定であったが、本研究期間では規定因子を特定することが困難だったため、G2 アレスト動態に影響し得る化合物を 1071 種類の化合物ライブラリーより検索した。Fucci の蛍光を指標として放射線照射後の G2 ア

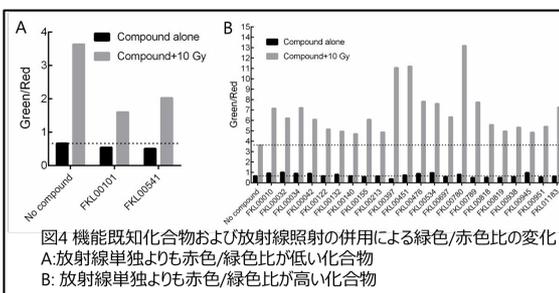


図4 機能既知化合物および放射線照射の併用による緑色/赤色比の変化  
A:放射線単独よりも赤色/緑色比が低い化合物  
B:放射線単独よりも赤色/緑色比が高い化合物

レスト動態を定量的に評価し、その結果より目的化合物を抽出した。その結果、G2 アレストを早期に解除し得る化合物を2種類、G2 アレストを遷延し得る化合物を23種類抽出することができた(図4)。

本研究課題では、ガラスディッシュでの培養が、プラスチックディッシュと比較して、放射線照射後のG2 アレスト動態ならびにDNA修復動態に影響することが示された。網羅的解析により、G2 アレスト動態を規定する因子の同定を試みたが、残念ながら、本研究期間ではできなかった。しかしながら、化合物スクリーニングを応用することにより、G2 アレスト動態に影響し得る化合物を検索した結果、複数の化合物を抽出するに至った。放射線照射後のG2 アレスト動態はDNA修復動態とも関連していることから、生存に大きく寄与していることは間違いなく、今後抽出された候補化合物について詳細に検討を進めていくことで、G2 アレストを標的とした新規放射線増感剤の樹立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)

[学会発表](計 3 件)

戒田篤志、三浦雅彦、口腔癌細胞株における放射線誘導性 G2 アレスト動態を指標とした機能既知化合物ライブラリーからの新規放射線増感剤の探索。第36回日本口腔腫瘍学会学術大会 2018.01.25 新潟市

戒田篤志、三浦雅彦、放射線誘導性 G2 アレスト動態を指標とした機能既知化合物ライブラリーのスクリーニング。若手放射線生物学会平成29年度専門研究会 2017.09.02 東京都文京区

戒田篤志、三浦雅彦、細胞接着環境により影響される放射線照射後の細胞動態とその運命。第45回放射線による制癌シンポジウム・第54回

日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会  
2016.07.06 大阪市

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/mdth/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

戒田 篤志(KAIDA, Atsushi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号:40632097

### (2)連携研究者

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