

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00565

研究課題名(和文)放射線応答性免疫因子MICAのヒストン修飾による転写調節機構の解析

研究課題名(英文) Inhibition of the HDAC/Suv39/G9a pathway restores the expression of DNA damage-dependent major histocompatibility complex class I-related chain A and B in cancer cells

研究代表者

中島 菜花子(Nakajima, Nakako)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・研究員(任常)

研究者番号：50402863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：MICA(Major histocompatibility complex class I Chain-related gene A)はがん細胞に高発現し、放射線や化学療法剤処理により発現増加し、腫瘍免疫の腫瘍排除活性を高める機能を持つことから、MICA発現の人為的制御により放射線治療によって体内の腫瘍免疫を調節することも可能になると期待されている。本研究ではMICA遺伝子プロモーター領域の、ヒストン構造を修飾し発現調節に関わる酵素を同定し、またMICA発現調節における放射線応答/DNA複製ストレスシグナル因子の分子機能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
免疫療法の奏効率は2割程度であり、免疫監視機構からの腫瘍のエスケープが免疫療法の奏効を妨げる原因の一つとなっている。腫瘍細胞上に発現するMICAは腫瘍免疫を活性化する分子であるが、腫瘍によってはMICA低発現細胞が存在する。本研究の結果から、放射線応答とヒストン修飾酵素阻害剤によって、低発現細胞のMICA発現を回復できることが明らかになった。このことは放射線治療とヒストン修飾酵素阻害剤の併用による新たな免疫療法を開発するための基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)：The upregulation of major histocompatibility complex class I-related chain A and B (MICA/B) expression after DNA damage is associated with NK cell-mediated killing of cancer cells. However, the regulation of DNA damage-induced MICA/B expression has not been fully elucidated in the context of the types of cancer cell lines. In this study, screening in terms of chromatin remodeling identified that inhibitors related to chromatin relaxation via post-translational modification on histone H3K9, i.e. HDAC, Suv39 or G9a inhibition, restored DNA damage-dependent MICA/B expression in insensitive cells. In addition, we revealed that the restored MICA/B expression was dependent on ATR as well as E2F1, a transcription factor. Collectively, manipulation of chromatin status by therapeutic cancer drugs may potentiate the antitumor effect by enhancing immune activation following radiotherapy and DNA damage-associated chemotherapy.

研究分野：放射線医学

キーワード：放射線治療 DNA損傷 腫瘍免疫 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線応答には照射野外の組織・臓器に影響が及ぶアブスコパル効果と呼ばれる現象がある。放射線治療においては照射野外の転移巣が消失する現象として報告されている。この現象は、放射線応答により腫瘍免疫が活性化することで起こると考えられている。MICA(Major histocompatibility complex class I Chain-related gene A) は腫瘍細胞に高発現する傾向が認められている膜貫通型タンパクであり、放射線応答および DNA 複製ストレスによって発現増加することから、アブスコパル効果を引き起こす因子の一つと考えられている。MICA は、NKG2D(Natural Killer Group 2 member D)のリカンドの一つとして同定された分子である。NKG2D は腫瘍免疫のエフェクター細胞である NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞等に発現している活性化型受容体であり、MICA は NKG2D に結合しエフェクター細胞の細胞傷害活性を高める。すなわち MICA は放射線治療によって腫瘍排除能を活性化する機構の中心的役割を有し、MICA 発現の人為的制御によってアブスコパル効果を高め、癌治療に応用することも期待できる。しかし、MICA の発現制御機構の全容は未解明であり、MICA 低発現腫瘍の存在や、環境要因による MICA 発現の低下も指摘されている。

2. 研究の目的

放射線応答による MICA の転写調節の分子メカニズムを明らかにし、MICA 低発現腫瘍の放射線応答による MICA 発現回復を応用した治療法の開発に役立てる。

遺伝子発現は遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾により調節されている。本研究では、ヒト腫瘍細胞、MICA 低発現腫瘍細胞および正常細胞の MICA プロモーター領域のヒストン修飾と放射線応答による変化を解析する。

遺伝子発現調節に関わる放射線応答は、DNA 損傷応答のシグナル伝達経路とさらに下流の細胞周期制御経路が予想された。本研究では、予想される経路因子の阻害剤を用いて、MICA 発現およびプロモーター領域のヒストン修飾に影響する経路因子を明らかにする。

MICA プロモーター領域のヒストン修飾に関わるヒストン修飾酵素を、阻害剤スクリーニングによって選び、関連が示唆された候補修飾酵素の、転写因子との結合・核内局在の放射線応答による変化を解析し、DNA 損傷シグナル因子の分子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

・**MICA 発現解析** 細胞膜に発現している MICA タンパクは、培養細胞を抗 MICA 抗体標識し、フローサイトメーターにより解析した。MICA 遺伝子発現は、細胞核内の mRNA を RNA SCOPE(ACD): *in situ* 高感度ハイブリダイゼーションシステムにより検出し、細胞周期マーカー EdU(DNA 合成期マーカー)及び CyclinB(G2 期マーカー)と多重染色を行い、蛍光顕微鏡下で細胞周期別に mRNA 発現量を解析した。

・**MICA プロモーター領域のヒストン修飾** ChIP Assay Kit (CST)および CUT & RUN Assay Kit (CST)を用いて解析した。

4. 研究成果

・**細胞周期による発現調節** *in situ* ハイブリダイゼーション法により細胞周期別に MICA 発現量の変化を解析したが、放射線応答による発現量の変化に細胞周期の影響は認められなかった。また、細胞周期因子阻害剤による発現量の変化は認められなかった。

・**DNA 損傷応答シグナル伝達経路因子による発現調節** DNA 損傷応答により活性化する因子 ATM・ATR・Chk1 の阻害剤により、MICA の放射線応答による発現増加が阻害された。

・**プロモーター領域のヒストン修飾** 骨肉腫細胞 U2OS は MICA 高発現細胞であり、放射線応答により MICA 発現がさらに増加する。U2OS の MICA プロモーター領域に結合するヒストンは放射線応答によって H3K4me2 の増加が認められた。

・ ヒストン修飾酵素による発現調節

MICA 低発現腫瘍 T98G の MICA 発現はヘテロクロマチンの形成に関わるヒストン修飾酵素 HDAC(Vorinostat, TSA)・G9a(Bix-01294)・SUV39H(Chaetocin)の阻害剤処理により放射線応答(図 1 A, B)・DNA 損傷応答(図 1 D, E)が回復した。T98G を HDAC 処理するとプロモーター領域のヒストン 3 リジン 4 のメチル化(H3K4me2)の増加が認められた。U2OS においても

HDAC 阻害剤により MICA 発現と放射線応答がさらに増加した(図 1 C)。HDAC 阻害剤処理により MICA 発現回復した T98G のプロモーター領域では H3K4me2 の増加が認められた。

このことから、MICA プロモーター領域のヒストンは HDAC・G9a・SUV39H の系

によりヘテロクロマチン化され、発現抑制されていることが示唆された。HDAC 阻害剤による MICA 発現回復は、ATR 阻害剤 VE821 により阻害された(図 2. A. B.)。MICA プロモーター領域は転写因子 E2F1 との結合配列を有するが、E2F1 の RNAi 干渉法による発現抑制は HDAC 阻害剤の MICA 発現回復効果を抑制した(図 2. C. D. E.)。一方で、クロマチン構造を弛緩する酵素 KAT5, p300, GCN5 の阻害剤(NU9056)によって、U2OS および HDAC にて発現回復した T98G の MICA 発現回復は阻害された。また、H3K4me2 の増加が認められたため、H3K4 をメチル化する酵素 LSD1 の阻害剤を U2OS および T98G 処理したところ、MICA 発現および放射線応答の増加が見られた。これらのことから、MICA 発現抑制は KAT5・p300/GCN5 により解除され、LSD1 により発現調節されていることが示唆された。

本研究の結果は、ヒストン修飾酵素阻害剤を用いて MICA 発現を回復しアブスコパル効果を増強する治療法の開発につながる事が期待される。

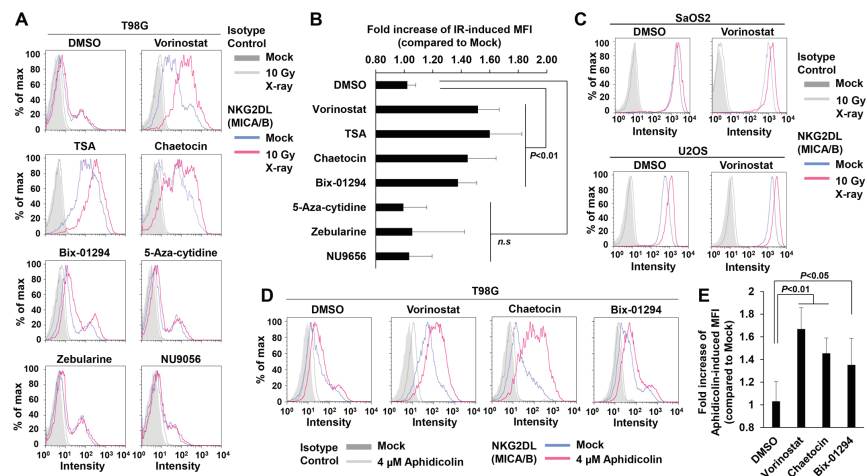


図1. A.低発現腫瘍 T98G の MICA 発現に対するヒストン修飾酵素阻害剤および放射線応答の影響 B. 増加回復効率 C. 高発現腫瘍 SaOS2, U2OS の MICA 発現に対するヒストン修飾酵素阻害剤の影響 D. E. DNA 合成阻害剤による DNA 損傷応答に対するヒストン修飾酵素の影響

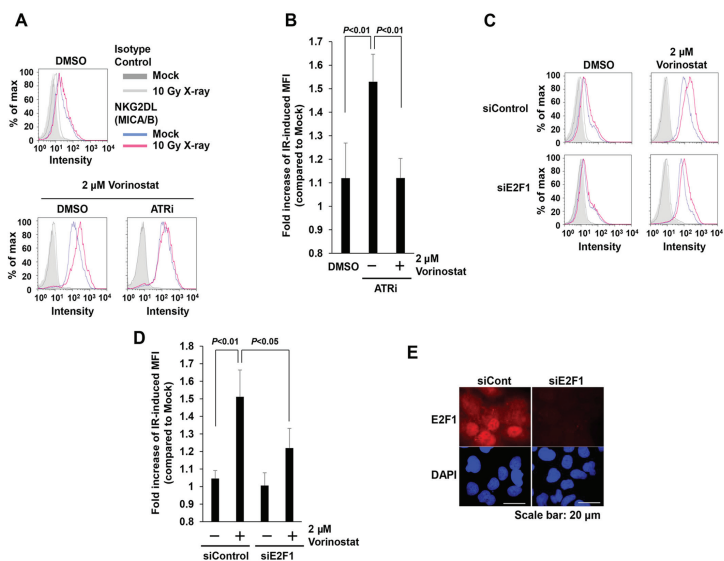


図 2. A.B. 低発現腫瘍 T98G の HDAC 阻害剤(Vorinostat)による MICA 発現回復に対する DNA 損傷シグナル ATR の阻害剤の影響 C. D. 転写因子 E2F1 の発現抑制は HDAC 阻害剤の発現回復を阻害する E. siE2F1 の発現抑制効率の確認

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Nakako Izumi, Niimi Atsuko, Isono Mayu, Oike Takahiro, Sato Hiro, Nakano Takashi, Shibata Atsushi	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of the HDAC/Suv39/G9a pathway restores the expression of DNA damage-dependent major histocompatibility complex class I-related chain A and B in cancer cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 693 ~ 702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3892/or.2017.5773	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 菜花子
2. 発表標題 骨肉腫の腫瘍免疫賦活化因子発現における重粒子線の影響
3. 学会等名 第 56 回 日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 菜花子
2. 発表標題 放射線と免疫の併用療法のための基礎研究 ~放射線と腫瘍免疫の相乗効果を利用した 新規治療法の開発に向けて~
3. 学会等名 第22回菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020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
連携研究者	柴田 淳史 (Shibata Atsushi) (30707633)	群馬大学・未来先端研究機構・准教授 (12301)	