

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07623

研究課題名（和文）RIG-I様受容体経路を基盤とする放射線感受性制御機構の解明と癌放射線治療戦略

研究課題名（英文）The mechanisms by which RIG-I-like receptor pathways modulate cellular radiation response

研究代表者

吉野 浩教 (Yoshino, Hironori)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：10583734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は細胞質のウイルスセンサーとして機能するRIG-I様受容体（RLR）の刺激因子がヒト肺癌細胞に対する放射線の致死効果を増強することをこれまでに見出したが、そのメカニズムについては未解明である。本研究では、その機構解明に取り組み、RLR刺激因子が肺癌細胞の放射線抵抗性を制御するミトコンドリアリボソームタンパク質DAP3の発現を低下させることで、放射線致死効果を増強させることを明らかにした。加えて、RLR刺激因子と放射線の併用に加えて、アポトーシス誘導因子Fasリガンドを組み合わせることで、抗癌効果増強に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、RLRの刺激因子による放射線感受性制御機構の解明に取り組み、ミトコンドリアリボソームタンパク質DAP3がヒト肺癌細胞の放射線抵抗性を制御すること、RLR刺激因子がDAP3の発現低下を介して細胞の放射線応答を制御していることを世界で初めて明らかにした。放射線応答におけるミトコンドリア関連因子の新たな役割を示すことができたため、本成果の学術的意義は高いと考える。加えて、ヒト肺癌細胞に対する放射線増感の標的や放射線致死効果を高めるための新たな戦略を見出すことができたため、本研究は放射線治療の発展に資する社会的意義のある研究であったと考える。

研究成果の概要（英文）：Although we found that agonist of RIG-I-like receptor (RLR) enhances radiation-induced cell killing effect in human lung cancer cells, it remains unknown the mechanisms. In the present project, we demonstrated that RLR agonist enhances radiosensitivity of lung cancer cells by decreasing mitochondrial ribosome protein DAP3 that regulates cellular radioresistance of lung cancer cells. In addition, we showed that additional treatment with apoptosis-inducing agent Fas ligand enhanced antitumor effects against the lung cancer cells co-treated with RLR agonist and ionizing radiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：RIG-I ミトコンドリア 放射線増感 アポトーシス Fas DAP3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) 様受容体 (RLR) は細胞質のウイルスセンサーとして機能し、ミトコンドリアを介して抗ウイルス応答を誘導する。また、近年では、RLR の活性化による抗癌効果も明らかとなっており、RLR は癌治療の標的として期待されている。申請者はこれまでに、RLR 刺激因子がヒト肺癌細胞に対する放射線の致死効果を増強させることを見出したが (Yoshino et al., *Oncol. Lett.*, 2018; 15: 4697-4705), そのメカニズムについては未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RLR 経路が介在する放射線応答制御機構を解明するとともに、RLR 活性化と放射線の併用による抗癌効果をより高めるための戦略を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト肺癌細胞 A549 は理研バイオリソースセンターより、H1299 は ATCC より購入した。A549 細胞は 10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地で、H1299 細胞は 10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地で培養した。

(2) 各種ノックダウン細胞の調製

各種ノックダウン細胞の調製は、各タンパク (Mitofusin-1, Dynamin-related protein 1; Drp1, Death-associated protein-3; DAP3, Fas) に対する Silencer Select Pre-designed siRNA (Ambion 社) と RNAiMAX (Invitrogen) を用いて行った。

(3) 細胞への放射線照射

放射線照射は X 線発生装置 (MBR-1520R-3) を使用して行った。一部実験では、RLR 刺激因子 Poly(I:C)-HMW/LyoVec (InvivoGen) 250 ng/ml (以後、Poly(I:C)) を照射一時間前に添加した。また、アポトーシス誘導因子 Fas リガンドは X 線照射 24 時間後に添加した。

(4) Fas の細胞表面発現解析

細胞表面の Fas 発現は、各処理細胞 (放射線照射, 薬剤処理, またはその併用) を蛍光標識 Fas 抗体 (BioLegend 社) で染色後、フローサイトメーター Cytomics FC500 (ベックマンコールター社) を用いて解析した。

(5) 細胞死解析

細胞死解析は、各処理細胞 (放射線照射, 薬剤処理, またはその併用) を蛍光標識 Annexin V 及びヨウ化プロピジウムで染色後、フローサイトメーター Cytomics FC500 を用いて解析した。

(6) 各種タンパクの発現解析

タンパク発現解析はウエスタンブロット法に解析した。ローディングコントロールとして、 α -actin を使用した。DAP3 の抗体は Sigma-Aldrich 社より、その他抗体は Cell Signaling Technology Japan より購入した。

(7) DAP3 の mRNA 発現解析

DAP3 の mRNA 発現は Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems Inc.) と Step One Plus[™] system (Applied Biosystems Inc.) を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) RLR 刺激因子による放射線応答制御におけるミトコンドリア動態制御因子の関与の検討

ミトコンドリア動態が RLR の抗ウイルス応答に重要な働きをすることが報告されているため、まず、ミトコンドリア動態制御因子に着目して解析を行った。Poly(I:C), X 線照射, および併用処理細胞におけるミトコンドリア融合因子 (Mitofusin-1 及び Optic atrophy protein 1) 及びミトコンドリア分裂因子 Drp1 のタンパク発現を解析したところ、Poly(I:C) 処理群では Drp1 のタンパク発現が顕著に低かった。そこで、Drp1 の発現抑制 A549 細胞を調製し、放射線誘発細胞死を評価したが、Drp1 の発現抑制による放射線誘発細胞死の増強は認められなかった。以上の結果より、ヒト肺癌細胞に対する RLR 刺激因子の放射線応答制御におけるミトコンドリア動態制御因子の関与は低いと考えられた。

(2) RLR 刺激因子による放射線応答制御におけるミトコンドリアリボソームタンパク DAP3 の関与の検討

次に、放射線感受性との関連が知られているミトコンドリアリボソームタンパク DAP3 に着目し、解析を進めた。DAP3 のタンパク発現解析により、Poly(I:C)処理がヒト肺癌細胞の DAP3 発現を低下させることが明らかとなったため、DAP3 の発現を抑制した A549 及び H1299 細胞を調製し、放射線誘発細胞死を評価した。その結果、DAP3 の発現抑制により放射線誘発細胞死が増強すること、そして DAP3 発現抑制細胞では Poly(I:C)による放射線致死効果増強が減弱することが明らかとなった。これら結果より、DAP3 がヒト肺癌細胞に対する RLR 刺激因子の放射線応答制御に関与していることが示された。

(3) RLR 刺激因子によるミトコンドリアリボソームタンパク DAP3 の発現制御機構の探索

次に、Poly(I:C)による DAP3 のタンパク発現低下のメカニズムについて検討した。まず、DAP3 の mRNA 発現を解析したところ、Poly(I:C)処理群における DAP3 の mRNA 発現は対照群と同程度であったことから、Poly(I:C)は転写制御非依存的に DAP3 のタンパク発現低下を引き起こすと考えられた。そこで、mRNA の翻訳の抑制に関わるリン酸化型 eukaryotic initiation factor-2 (eIF-2) のタンパク発現を解析したところ、Poly(I:C)処理群では、DAP3 の発現低下に先立ちリン酸化型 eIF-2 の発現増加が観察された。以上より、Poly(I:C)はリン酸化型 eIF-2 を増加させることで、DAP3 の mRNA の翻訳を抑制し、DAP3 のタンパク発現を低下させることが示唆された。

(4) RLR 刺激因子と放射線の併用による抗癌効果を高めるための Fas に着目した戦略

Poly(I:C)はデスレセプター Fas 非依存的に放射線誘発細胞死を増強することがわかったため (Sato et al., Mol. Med. Rep., 2018; 18: 5286-5294), Poly(I:C)と放射線の併用に加え、Fas リガンド処理を行うことで抗癌効果がさらに高まるのではと作業仮説を立てた。その仮説を検証したところ、期待した通りに、Poly(I:C)と放射線で併用処理したヒト肺癌細胞 (A549 及び H1299) をさらに Fas リガンドで刺激することで、アポトーシスを含む細胞死をさらに増強させることに成功した。さらに、Fas の発現抑制細胞を用いた実験から、この細胞死増強は Fas に依存すること、また Fas リガンド誘発アポトーシスの増強は Poly(I:C)に対する細胞応答ではなく、放射線に対する細胞応答に起因することが明らかとなった。

(5) まとめ

本研究により、RLR 刺激因子は放射線抵抗性を制御するミトコンドリアリボソームタンパク DAP3 の発現を低下させることで、ヒト肺癌細胞の放射線致死効果を増強させることが明らかになった。加えて、RLR 刺激因子と放射線の併用に加えて、アポトーシス誘導因子 Fas リガンドを組み合わせることで、抗癌効果のさらなる増強に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Kashiwakura Ikuo, Tsuruga Eichi	4. 巻 22
2. 論文標題 DAP3 Is Involved in Modulation of Cellular Radiation Response by RIG-I-Like Receptor Agonist in Human Lung Adenocarcinoma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 420 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010420	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 Hazawa Masaharu, Yoshino Hironori, Nakagawa Yuta, Shimizume Reina, Nitta Keisuke, Sato Yoshiaki, Sato Mariko, Wong Richard W., Kashiwakura Ikuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Karyopherin- 1 Regulates Radioresistance and Radiation-Increased Programmed Death-Ligand 1 Expression in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 908 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12040908	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 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Tsuruga Eichi, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Fas Ligand Enhances Apoptosis of Human Lung Cancer Cells Cotreated with RIG-I-like Receptor Agonist and Radiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Cancer Drug Targets	6. 最初と最後の頁 372 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1568009620666200115161717	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 -
1. 著者名 Hazawa Masaharu, Sakai Kie, Kobayashi Akiko, Yoshino Hironori, Iga Yoshihiro, Iwashima Yuki, Lim Kee Sing, Chih-Cheng Voon Dominic, Jiang Yan-Yi, Horike Shin-ichi, Lin De-Chen, Wong Richard W.	4. 巻 39
2. 論文標題 Disease-specific alteration of karyopherin- subtype establishes feed-forward oncogenic signaling in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2212 ~ 2223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-1137-3	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 Yoshino Hironori、Nawamaki Mikoto、Murakami Kanna、Kashiwakura Ikuo	4. 巻 1
2. 論文標題 Effects of irradiated cell conditioned medium on the response of human lung cancer cells to anticancer treatment in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Academy of Sciences Journal	6. 最初と最後の頁 92-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/wasj.2019.11	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 吉野 浩教	4. 巻 54
2. 論文標題 制がんにおけるRetinoic acid-inducible gene-1 様受容体の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Yoshino Hironori、Konno Haruka、Ogura Koya、Sato Yoshiaki、Kashiwakura Ikuo	4. 巻 19
2. 論文標題 Relationship between the Regulation of Caspase-8-Mediated Apoptosis and Radioresistance in Human THP-1-Derived Macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3154~3154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19103154	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 Sato Yoshiaki、Yoshino Hironori、Kazama Yuka、Kashiwakura Ikuo	4. 巻 18
2. 論文標題 Involvement of caspase-8 in apoptosis enhancement by cotreatment with retinoic acid-inducible gene-1-like receptor agonist and ionizing radiation in human non-small cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 5286-5294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2018.9536	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 -

1. 著者名 Yoshino Hironori, Murakami Kanna, Nawamaki Mikoto, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of Nrf2 knockdown on the properties of irradiated cell conditioned medium from A549 human lung cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 461-465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2018.1073	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 Yoshino Hironori, Iwabuchi Miyu, Kazama Yuka, Furukawa Maho, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of retinoic acid-inducible gene-1-like receptors activations and ionizing radiation cotreatment on cytotoxicity against human non-small cell lung cancer in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 4697-4705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.7867	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 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 2件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 吉野浩教
2. 発表標題 扁平上皮癌細胞の放射線応答における核輸送因子KPNB1の役割
3. 学会等名 金沢大学 新学術創成研究機構 異分野融合セミナー(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Tsuruga Eichi.
2. 発表標題 Death-associated protein 3 is involved in radioresistance of human lung adenocarcinoma cell lines
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Tsuruga Eichi, Kashiwakura Ikuo.
2. 発表標題 Effect of Fas ligand to enhance apoptosis of human lung cancer cells cotreated with retinoic acid-inducible gene-1-like receptor agonist and X-ray irradiation.
3. 学会等名 The 3rd Workshop on Radiation Research and Its Related Issue 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshino Hironori, Nakagawa Yuta, Nitta Keisuke, Kashiwakura Ikuo.
2. 発表標題 In vitro radiosensitization effect of importin- 1 inhibitor in the human head and neck squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Kashiwakura Ikuo.
2. 発表標題 The underlying mechanisms of synergistic antitumor effects by cotreatment with retinoic acid-inducible gene-1-like receptor agonist and ionizing radiation.
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉野浩教, 今埜遼香, 小倉巧也, 佐藤嘉晃, 柏倉幾郎.
2. 発表標題 ヒト単球系細胞THP1由来マクロファージにおける放射線抵抗性獲得とcaspase-8介在性アポトーシス制御との関連
3. 学会等名 令和元年度若手放射線生物学研究会専門研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤嘉晃, 吉野浩教, 柏倉幾郎.
2. 発表標題 RIG-I様受容体刺激因子によるX線誘発細胞死増強機構の探索
3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤嘉晃, 吉野浩教, 柏倉幾郎.
2. 発表標題 RIG-I様受容体刺激因子とX線併用による抗腫瘍効果増強機構の探索
3. 学会等名 第48回制癌シンポジウム・第57回生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽澤勝治, 酒井貴恵, 吉野浩教, 小林亜希子, Richard W Wong.
2. 発表標題 Disease-specific alteration of karyopherin- subtype establishes feed-forward oncogenic signaling in squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第48回制癌シンポジウム・第57回生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshino Hironori
2. 発表標題 Relationship between the regulation of caspase-8-mediated apoptosis and radioresistance in human THP1-derived macrophages
3. 学会等名 2019 KIRAMS-Hirosaki University Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉野 浩教, 岩淵 美憂, 風間 祐佳, 古川 真帆, 柏倉 幾郎
2. 発表標題 RIG-I様受容体刺激因子と放射線の併用によるヒト肺癌細胞に対する抗癌効果
3. 学会等名 平成30年度若手放射線生物学研究会専門研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Kazama Yuka, Kashiwakura Ikuo
2. 発表標題 Cotreatment with retinoic acid-inducible gene-1-like receptor agonist and ionizing radiation effectively induces apoptosis through caspase-8 mediated apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549
3. 学会等名 The 5th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Kazama Yuka, Kashiwakura Ikuo
2. 発表標題 IONIZING RADIATION ENHANCES SYNTHETIC DOUBLE-STANDARD RNA-INDUCED APOPTOSIS IN HUMAN LUNG CANCER CELLS THROUGH CASPASE-8 ACTIVATION.
3. 学会等名 9th International Conference on High Level Environmental Radiation Areas (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉野 浩教
2. 発表標題 パターン認識受容体に及ぼす放射線の影響解明と癌放射線治療への応用
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第61回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap (吉野 浩教)
<https://researchmap.jp/2010>
ORCID (Hironori Yoshino)
<https://orcid.org/0000-0003-2705-9929>
publons (Hironori Yoshino)
<https://publons.com/researcher/1548891/hironori-yoshino/>
弘前大学 研究者総覧
http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000291_ja.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------