

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15612

研究課題名(和文)クリプトーム解析を用いた陽子線に対するがん細胞応答の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of cancer cell response to proton beam using transcriptome analysis

研究代表者

北條 秀博 (Hojo, Hidehiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：60638774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌細胞株KYSE450に対してX線、陽子線、重粒子線照射を行い、照射後6時間、24時間、72時間、5日、7日時点でmRNA seqによる遺伝子発現解析を行った。またSTING、STAT1 knockout cellでの応答についても比較検討した。放射線照射後6時間後に変動する遺伝子、biological pathwayは3つの線種で大きく異なっていた。一方で24時間後から5日かけてその共通性は高くなり、免疫応答関連遺伝子の発現も類似していた。陽子線、重粒子線照射でもSTING、STAT1ノックアウト細胞株での免疫応答は大きく低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療において、陽子線治療や炭素線治療は治療の選択肢の一つとして一般化されつつある。また、免疫チェックポイント阻害剤は放射線治療の増感剤として使用されているが、陽子線、炭素線照射後の免疫応答やそのメカニズムについては不明な点が多い。そこで我々は、それぞれの線質での免疫応答を比較解析する目的で研究を行った。結果、照射後6位時間時点で変動する遺伝子や生物学的経路は3つの線種で異なっていたが、24時間後からその共通性が高くなり、免疫応答関連遺伝子の発現も類似していた。このことから、X線で併用される免疫療法と同様に、陽子線、重粒子線治療との併用でも効果をあげることが期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：We aimed to compare the immune responses after irradiation (IR) with X-ray, protons, and carbon ions in an oesophageal cancer cell line and the underlying mechanisms. An oesophageal cancer cell line, KYSE450, was irradiated with 1 fraction/15 GyE (Gy equivalent) of X-ray, proton, or carbon-ion beams, and then, the cells were harvested for RNA sequencing and gene enrichment analysis. We also knocked out STING and STAT1 in the quest for mechanistic insights. RNA sequencing data revealed that gene expression signatures and biological processes were different in KYSE450 irradiated with X-ray, proton, and carbon-ion beams 24 h after IR. However, after 3 days, a common gene expression signature was detected, associated with biological pathways involved in innate immune responses. Gene knock-out experiments revealed that the STING-STAT1 axis underlies the immune reactions after IR. X-Ray, proton, and carbon-ion IRs induced similar immune responses, regulated by the STING-STAT1 axis.

研究分野：放射線治療

キーワード：粒子線治療 免疫応答 トランスクリプトーム 食道癌 陽子線 重粒子線 炭素線

1. 研究開始当初の背景

陽子線治療の生物学的効果比 (RBE) は X 線と比較して 1.1~1.2 倍と大きな差がないことが示されたため(Pagenetti et al. IJROBP 2002; 53(2): 407-421)、陽子線治療では、X 線による放射線治療のこれまでの基礎ならびに臨床データなどが外挿しやすいと認識されている。このため、線量分割や総線量なども X 線による治療データに基づくものも少なくない。一方で粒子線である陽子線は、物理学的性質が X 線と大きく異なることが知られている(Girdhani et al. Radiat Res 2013; 179(3):257-272)(図 1)。放射線生物学的に陽子線治療は、その性質や細胞応答にも X 線と比較して相違点があるとの報告も散見される。申請者は食道癌細胞株において、RBE が X 線と比較して 1.03-1.40 倍程度であり、拡大 Bragg peak(SOBP)内では均一でなく、遠位となるに従って増加する事を示した(Hojo et al. Radiat Oncol 2017; 12(1):111) [JSPS KAKENHI 15K19838]。また、線エネルギー付与(LET)は SOBP 遠位に行くに従って上昇し、RBE と正の相関も見られた。

細胞内で引き起こす DNA 切断も X 線は間接作用(間接作用寄与率: 58%)、陽子線は直接作用(間接作用寄与率: 38%)による二重鎖切断が主であるとされている(Iwata et al. IJROBP (95)1:95-102, 2016)。DNA 損傷後に誘導される DNA 複製経路に関して、X 線は非相同末端結合修復(NHEJ)が主であり、陽子線は相同組み換え修復(HR)への依存

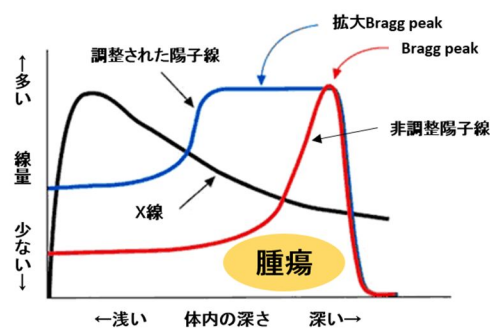


図1

が大きいことが知られており、生化学的経路の違いが示唆される(Gross et al. IJROBP 88(1): 175-181, 2014)。これらの相違が X 線と陽子線の細胞応答を介して、最終的な感受性に影響することが考えられる。この分子メカニズムの探索法として、マイクロアレイを用いたトランスクリプトームによる遺伝子転写産物(mRNA)の網羅的解析結果は散見され、X 線では陽子線と比較し、アポトーシス、細胞周期、DNA 損傷応答に関連する遺伝子発現が多いことが報告された(Finnberg et al. Cancer boil Ther 7(12): 2023-2033, 2008)。上記の陽子線に関する細胞応答の研究結果は、細胞死をエンドポイントにした効果は X 線とほぼ同等でも、DNA 損傷を起点とする細胞死の過程は必ずしも同じではない可能性を示唆している。

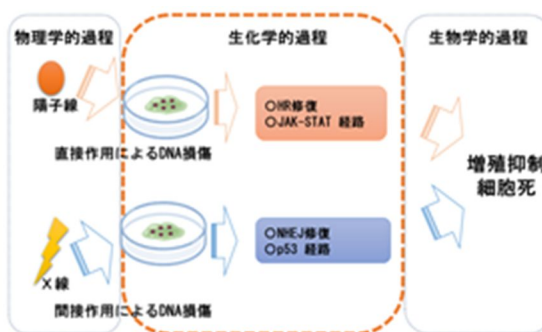
この課題に対して申請者は、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンシングを行うことで、未知遺伝子を含むトランスクリプトームによる mRNA の網羅的解析を実施し、X 線、陽子線照射後の細胞の遺伝子変異や RNA 発現の差を解析し、X 線と陽子線の細胞死に至る生化学的経路の違いを明らかにする本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

本研究では X 線と陽子線の細胞死に至る生化学的経路の違いを明らかにすることを目的とした。その方法として、陽子線照射後の細胞に対し、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンシングのデータから、トランスクリプトームによる mRNA の網羅的解析を行い、これまで明らかにされていない陽子線の感受性に関わる特異的な DNA 損傷とその修復プロセスおよび密接に関連する分子や遺伝子を解明することを目的とした(図 2)。

さらに本研究では炭素線による細胞応答も比較対象とし、X 線、陽子線、炭素線の 3 つ選手を比較解析することで細胞死に関わる経路の相違や関与する重要な分子や遺伝子の違いが明確になると考えた。

このように本研究の学術的な特色は、これまで必ずしも十分に解析が行われていない、陽子線、炭素線に対する細胞応答とその分子メカニズムを明確にし、X 線との比較解析から陽子線治療で特異的に、発現が変動する遺伝子や分子を同定することである。このように 3 つ線種で作用する放射線による細胞死を誘導するもの、抵抗性に関与する遺伝子や biological pathway は陽子線治療や炭素線治療に特異的なターゲット遺伝子となり、より効果的な併用療法の開発に



トランスクリプトームによる mRNA の網羅的解析 (RNA シークエンシング)
→ 細胞死に至る経路の解析

図2

繋がれると考え本研究を行った。

3. 研究の方法

食道癌細胞株 KYSE450 を 25 cm² のフラスコもしくは 96-well の培養皿に培養し、それに対し X 線、陽子線、炭素線の照射を行った。臨床で用いる RBE が陽子線:1.1, 重粒子線:2.38 であることを考慮し、食道扁平上皮癌細胞株 KYSE450 に対してそれぞれ 15.0, 13.6, 6.8 Gy の線量を用いた。照射後 6 時間、24 時間、72 時間、5 日、7 日後の時点で、mRNA シークエンス (RNA-seq) による遺伝子解析を行った。RNA の質的解析には、Bioanalyzer 2100 system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用い、RNA-seq 施行前に検討した。すべてのデータは FASTQC、FASTQ ツールキットを用い、フィルタリング、トリミングを行い、R を用いて解析を行った。

また、STING、STAT1 ノックアウト細胞を作成し、野生株と同様に 3 線種の放射線照射後、比較解析を行った。

統計学的解析は Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) と R (The R Foundation, Vienna, Austria) を使用し、2 群間の比較では Student t-test を用いた。P<0.05 を有意と定義した。

4. 研究成果

食道癌細胞株に対し、X 線、陽子線、炭素線を照射後 6 時間、3 日、5 日の RNA-seq を行い、主成分分析 (principal component analysis: PCA) を施行した。その結果、照射 6 時間後の PCA プロットは共通部位がほとんどみられず、3 日後、5 日後では近い位置に収束してきた。この結果は、異なる線質を照射した 6 時間から 24 時間は異なる反応が起こり、その後は共通した反応が起こることを示している。

次に、非照射細胞と照射後の細胞の遺伝子発現をそれぞれの時間で比較した結果 (Differentially expressed genes: DEGs)、6 時間後の X 線、陽子線、炭素線照射を行った細胞では、それぞれ 23、20、40 の遺伝子発現が認められ、5 つの経路が X 線と炭素線で共通していた。3 日後、5 日後においてはそれぞれ、10、83 の遺伝子がどの線種でも共通して発現していた。その共通する遺伝子発現の内、免疫反応に関連するものが上位 5 つを占めていた (図 1)。

照射後の免疫反応を確認するため、放射線関連免疫遺伝子を検討した。HMGB2 は陽子線照射 6 時間後に、X 線、炭素線照射 24 時間後に増加していた。また、照射後 3 日で OAS1、ISRE、HLA-B、MHC class1 の遺伝子発現も認められた。PD-L1、PD-L2 遺伝子発現に関しては、X 線照射後 5 日目にピークを迎えたが、陽子線、炭素線の照射後は 7 日後も増加し続けた。遺伝子オンロジーエンリッチメント解析では、照射後の I 型 IFN 応答が特定された。また、I 型 IFN 応答に関する遺伝子発現の分析も行ったところ、照射後 6 時間から 24 時間で I 型 IFN 関連遺伝子 (IRF3、6 や TREX1 など) が増加した。HLA-B や IRF1 などの他の主要な I 型 IFN 関連遺伝子は照射後 24 時間後には誘導されなかったが、3 日後には増加した。

このように X 線、陽子線、炭素線の照射直後は異なる遺伝子発現応答を誘導し、3 日から 5 日程度で共通した遺伝子発現応答に変化し、特に Type I IFN 応答に関連する免疫応答が 3 つの線種で共通しているという特徴的な結果を得た。Stimulator of interferon genes (STING) は自然免疫応答関連遺伝子であり、DNA ウィルス検出に参与する I 型インターフェロントリガーである。放射線照射により、損傷した DNA と小核形成が STING 経路を活性化し、STAT と IRF を介して免疫応答を誘導する。X 線、陽子線、炭素線いずれの照射後にも小核形成が見られ、STING 経路が放射線誘導免疫応答に関連していることが示唆された。

この仮説を検証するため、STING 及び STAT1 ノックアウト (KO) KYSE450 細胞を樹立し、X 線、陽子線、炭素線の照射を行った。さらに、放射線誘導免疫応答に対する STING、STAT1 KO の影響を RNA-seq により検証した。その結果、それぞれの放射線を照射後、STING、STAT1 KO 細胞において、OAS1、HLA-B、PD-L1、PD-L2 の発現を減少させた。さらに KO の結果、抑制された遺伝子は、体液性免疫応答、好中球活性化、インターフェロンシグナル伝達などの免疫応答関連する遺伝子群であった。これらの発見は STING-STAT1 経路が、免疫応答に対する X 線、陽子線、炭素線照射後の影響に不可欠であることを示す結果であった。

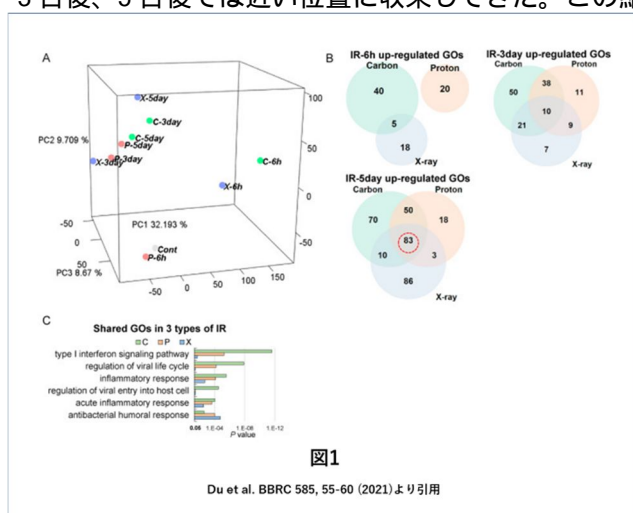


図1

Du et al. BBRC 585, 55-60 (2021)より引用

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Du Junyan, Kageyama Shun-Ichiro, Hirata Hidenari, Motegi Atsushi, Nakamura Masaki, Hirano Yasuhiro, Okumura Masayuki, Yamashita Riu, Tsuchihara Katsuya, Hojo Hidehiro, Hirayama Ryoichi, Akimoto Tetsuo	4. 巻 585
2. 論文標題 Comparative analysis of the immune responses in cancer cells irradiated with X-ray, proton and carbon-ion beams	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.004	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北條秀博、影山俊一郎、杜君顔、茂木厚、中村匡希、中村直樹、全田貞幹、木部優一、奥村真之、秋元哲夫
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析を用いた陽子線に対するがん細胞応答の網羅的解析
3. 学会等名 第47回放射線による制癌シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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