

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15653

研究課題名(和文)オートファジーによる細胞防護効果の分子機構の解明と新規治療法への展開

研究課題名(英文) Evaluation of cytoprotective effect of autophagy and its application for novel cancer therapy

研究代表者

鈴木 基史 (Suzuki, Motofumi)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90807801

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)：がん細胞の有する放射線抵抗性のメカニズムを明らかにすることは、放射線治療を改善する上で重要である。本研究では、放射線によって誘導される細胞周期チェックポイントとオートファジーの間に相互作用が存在するのか、またそれらがどのように放射線抵抗性に関与するかを評価した。その結果、(1)G2期チェックポイントとオートファジーが同時に誘導されること、(2)オートファジー依存的に放射線照射後の細胞内ATP濃度が増加すること、(3)両機構にはクロストークが存在し、G2期チェックポイントによる放射線抵抗性の少なくとも一部にオートファジーが関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では核内で生じる細胞周期チェックポイントと細胞質で生じるオートファジーという異なる細胞防護機構にクロストークが存在することを明らかにした。本研究により得られた知見はこれまで明らかとなっていなかったオートファジーによる細胞防護機構の機序解明につながる。また、がん細胞の有する放射線抵抗性の機序解明に大きく寄与するものであり、今後の放射線治療増感剤の開発や治療プロトコルの作成において新たな指標となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A better mechanistic understanding of cellular resistance to radiotherapy should facilitate the development of novel, individualized treatment approaches. Cell-cycle checkpoint and autophagy act in concert to confer radioresistance to cells. In this study, I investigated the functional interaction between both pathways. As a result, I revealed as follows; (1) X-irradiation synchronously induced autophagy and G2 checkpoint. (2) Radiation-induced autophagy produced the ATP required for cell survival. (3) A biological crosstalk exists between G2 checkpoint and autophagy after X-irradiation, and autophagy appears to be responsible, at least in part, for G2 checkpoint-induced radioresistance.

研究分野：放射線生物学

キーワード：オートファジー 細胞周期チェックポイント 放射線治療 放射線増感剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の放射線治療における物理工学的な技術の進歩に伴い、その最適化には放射線生物学の知識が重要となる。特に、放射線治療の有効性を決定づける放射線抵抗性獲得メカニズムについて理解することが重要である。

細胞周期チェックポイントは放射線抵抗性を決定づける因子の一つである。放射線によりチェックポイントが活性化すると、細胞周期が一時的に停止し、細胞はこの間に DNA 損傷などを治すとされている。そのためチェックポイントは、がんの放射線抵抗性を助長すると考えられている。しかし我々はこれまでに、チェックポイントを抑制しても DNA の修復は正常に行われるという、異なる見解を得た。このことから我々は、チェックポイントによる細胞周期停止は、細胞死を防ぐ他の機構を誘導しているのではないかと推察した。本研究課題では、その候補としてチェックポイントと同様に放射線抵抗性に寄与するとされるオートファジーに着目した。

オートファジーは細胞の受けたストレスを鋭敏に感知し、ストレスから細胞を守る。事実、放射線を照射された細胞でもオートファジーが誘導される。またオートファジーの抑制は、がんの治療抵抗性を改善することも明らかにされている。そのためオートファジーは、がん細胞を治療から防護すると考えられている。しかし、この分子メカニズムについては明らかになっていない点も多い。この点について解明することは、将来的にオートファジーを治療ターゲットとして考える上で重要であると言える。

上述の様に細胞周期チェックポイントとオートファジーは共にがん細胞の治療抵抗性に関与する。また両者とも細胞へのストレスを感知してから速やかに誘導され、細胞をストレスから守るといった共通のフェノタイプを示す。さらに、ほ乳類の発生過程において、細胞周期の進行とオートファジーの間には相互作用があることも分かっている。しかし、細胞周期チェックポイントとオートファジーの間の相互作用と、それが細胞の防護につながる可能性については全く議論がなされていない。この点について解明することは、新しいがん治療法の開発や、被ばく事故などにおいて重要な放射線防護などへと役立てることができると考えられた。

### 2. 研究の目的

上記の背景を元に、申請者は放射線を照射されたがん細胞では、細胞周期チェックポイントによる細胞周期停止の間にオートファジーが誘導され、放射線による細胞死を防ぐのではないかと仮説をたてた。この仮説を立証するため、本課題では、がん細胞に放射線を照射した後に生じる細胞周期チェックポイントとオートファジーに相互作用があるのかを検証し、またそれらが放射線抵抗性に繋がるメカニズムについて主に分子生物学的手法により解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 放射線照射後の細胞周期チェックポイントおよびオートファジー活性の評価

放射線治療標的のがん細胞として複数のヒト由来膵がん細胞 (MIA PaCa-2、SUIT-2) を使用した。細胞をプラスチックシャーレに接着させて 6 Gy の X 線を照射した。照射から 24 時間後まで経時的にサンプリングした細胞を RIPA buffer により回収し、作成した細胞抽出液をウエスタンブロットに供した。その際、オートファジーマーカーとして LC3 ならびに p62、G2 期チェックポイントマーカーとして p-cdc2 並びに p-chk1、DNA 損傷マーカーとして  $\gamma$ H2AX を使用した。また、同様のタイムスケジュールで細胞をトリプシンにて回収後、70%メタノールにて固定と RNase 処理を行い、ヨウ化プロピジウム染色後にフローサイトメトリーを用いて細胞周期の解析を行なった。次にカバーガラス上に細胞を播種し、6 Gy の照射から 12 時間後に細胞を 4% PFA にて固定後、免疫細胞化学に供した。その際、オートファジーマーカーとして LC3、G2 期マーカーとして CENP-F を使用し、核を DAPI により染色した。

#### (2) 放射線照射後の細胞内 ATP 濃度の評価

X 線照射後の細胞内 ATP を可視化するため、照射から 12 時間後にキナクリンを添加し 37° C、10 分間加温し、4% PFA にて固定後、カメラ付き蛍光顕微鏡により撮像した。次に細胞内 ATP 濃度を測定するため、細胞内 ATP 測定発光試薬 (CellTiter-Glo<sup>®</sup>2.0、Promega) により細胞を溶解し、指示書の示す方法にてプレートリーダーを用いて検出した。

#### (3) 細胞周期進行とオートファジーの相互作用の評価

培地にチミジン (2 mM) を添加して 18 時間培養し、培地を新鮮培地に変えてから 9 時間培養し、再び培地にチミジン (2 mM) を添加して 18 時間培養することで細胞周期を G1/S 期に同調した (ダブルチミジンブロック法)。培地を新鮮培地に交換し、細胞周期同調を解除した後から経時的にサンプリングを行い、細胞周期の解析とウエスタンブロットに供した。

#### (4) 放射線照射後のオートファジーまたは細胞周期チェックポイントの抑制が放射線感受性に与える影響の評価

X 線照射後のオートファジーを抑制する低分子化合物としてクロロキン、細胞周期チェックポイントを抑制する阻害剤として Chk1 阻害剤または Wee1 阻害剤を使用した。X 線照射後の細胞周期チェックポイントを抑制した際のオートファジーへの影響をウエスタンブロットにより評価した。またその際の放射線感受性への影響についてはコロニー形成法により評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 放射線照射後の細胞周期チェックポイントおよびオートファジー活性の評価

2 種類の膵がん細胞株に X 線を照射した 12 時間後に LC3 の有意な増加と p62 の減少が観察され、オートファジー活性がピークに達することが明らかとなった(図 1A)。また照射から 12 時間後に p-cdc2 がピークに達し、細胞周期解析からも細胞集団のほとんどが G2 期にいることから G2 期チェックポイントが活性化しており(図 1A 下段)、免疫細胞化学の結果からもオートファジーと G2 期チェックポイントが同じタイミングで活性化することが明らかとなった(図 1B)。

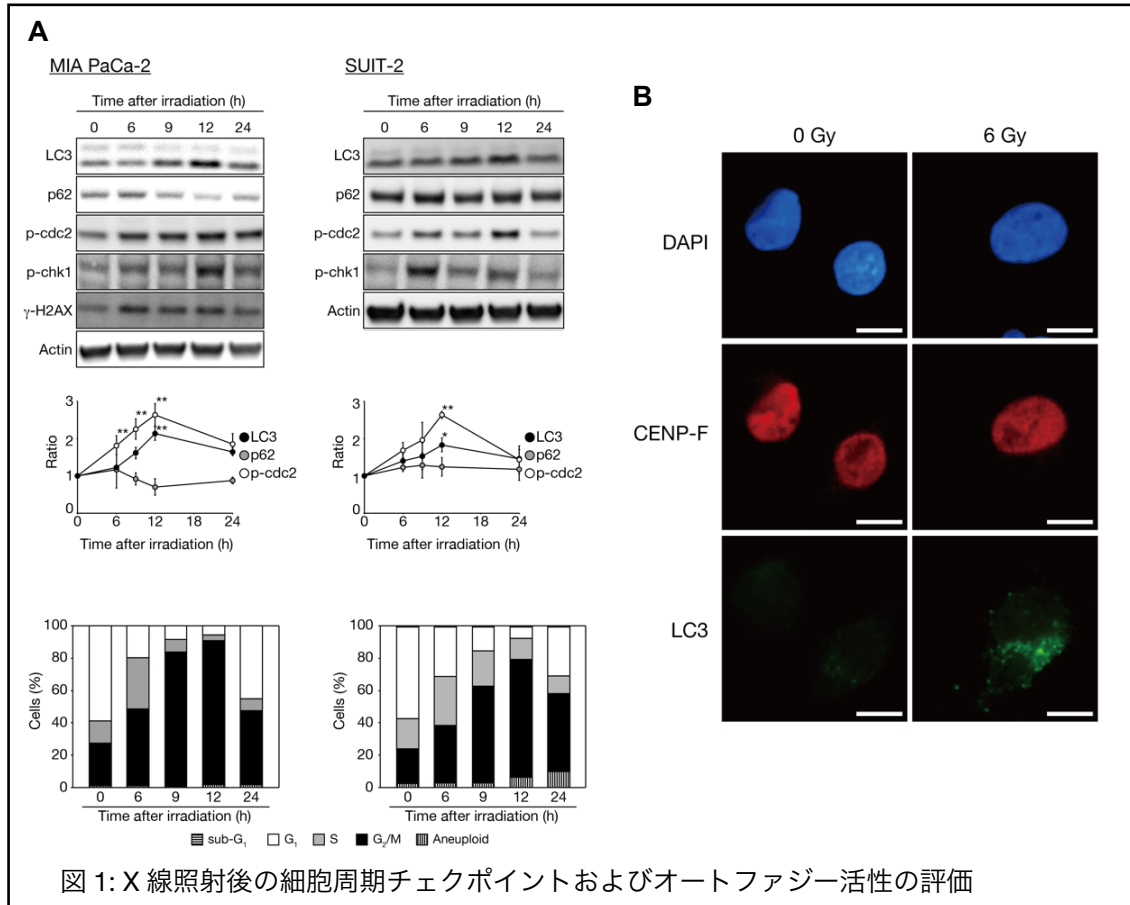


図 1: X 線照射後の細胞周期チェックポイントおよびオートファジー活性の評価

##### (2) 放射線照射後の細胞内 ATP 濃度の評価

オートファジーは本来、細胞飢餓などが生じた際に自己の細胞内成分を溶解することで ATP を産生し、細胞生存につなげる機構である。そこで X 線照射後の細胞内 ATP 量を評価した。細胞周期チェックポイントとオートファジー活性が最も高かった 6 Gy の照射から 12 時間後の細胞内 ATP をキナクリン染色により可視化したところ、ATP 量が顕著に増加していることが明らかとなった(図 2A)。次に細胞を溶解して発光試薬を用いて細胞内 ATP 濃度を算出したところ、X 線照射により細胞内 ATP 量は 1.92 倍に増加すること、またオートファジー阻害剤 Chloroquine (CQ) を併用するとこれが定常状態まで戻ることが示された(図 2B)。このことから、細胞周期チェックポイントとオートファジーが同時に起こっている際にオートファジー依存的に細胞内 ATP が増加していることが明らかとなった。

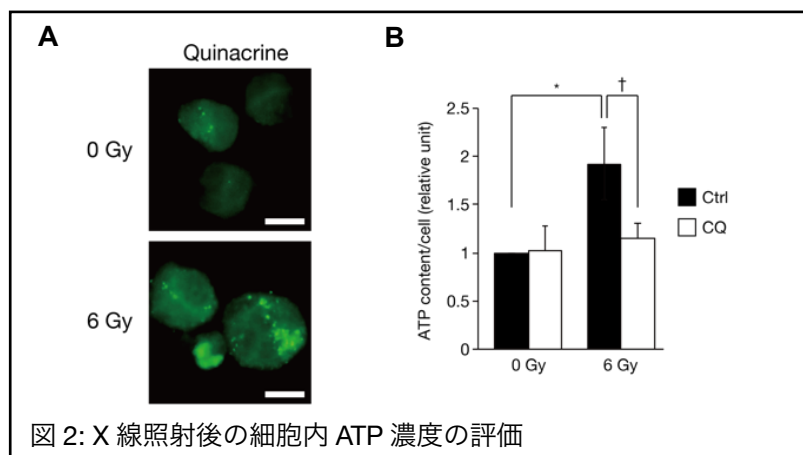


図 2: X 線照射後の細胞内 ATP 濃度の評価

### (3) 細胞周期進行とオートファジーの相互作用の評価

これまでの報告ではオートファジー活性は細胞周期進行と密接な関係があるとされている。そこで X 線照射から 12 時間後に生じるオートファジー活性が細胞周期進行依存的または細胞周期チェックポイント依存的に生じるのかを評価するため、ダブルチミジンプロック法 (DTB) により細胞周期を G1/S 期に同調し、そこからリリースして細胞周期進行する際のオートファジー活性を評価した。細胞周期解析または細胞周期 M 期マーカーである p-H3 の増加のタイミングから、リリースから 6 時間では細胞集団の多くが G2 期にあることが分かる (図 3A, B)。この時のオートファジー活性はコントロールに比べて低かった (図 3B)。このことから、X 線照射後に生じるオートファジーは細胞周期ではなく細胞周期チェックポイント依存的に生じることが示唆された。

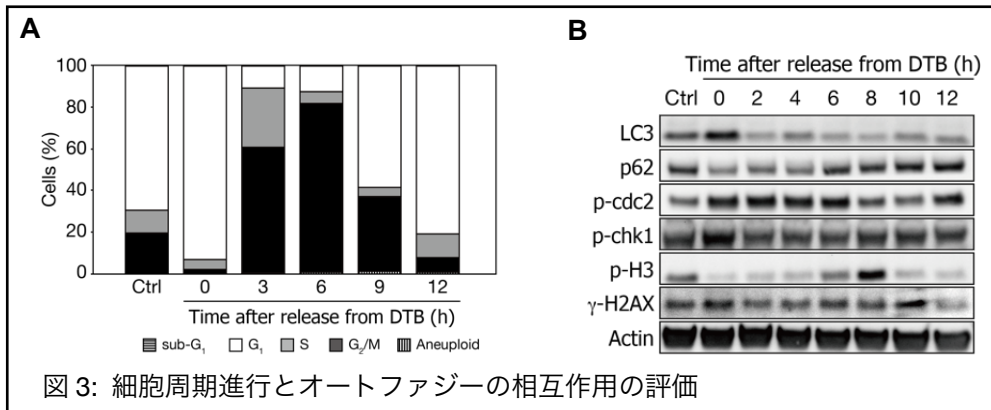


図 3: 細胞周期進行とオートファジーの相互作用の評価

### (4) 放射線照射後のオートファジーまたは細胞周期チェックポイントの抑制が放射線感受性に与える影響の評価

これまでの結果からオートファジーが細胞周期チェックポイントと同時に活性化されることが明らかとなったため、細胞周期チェックポイントを抑制した際のオートファジー活性を評価した。その結果、両 G2 期チェックポイント阻害剤 (MK および SCH) によりオートファジーは有意に抑制された (図 4A)。またこの時の放射線感受性を評価したところ、増感比は MK では 1.23、SCH では 1.43 であった (図 4B)。オートファジー阻害剤 CQ を併用した際の増感比が 1.14 であり、チェックポイント阻害剤との併用に比べて小さかったことから、細胞周期チェックポイントによる放射線抵抗性の少なくとも一部にオートファジーが関与する可能性が示唆された。

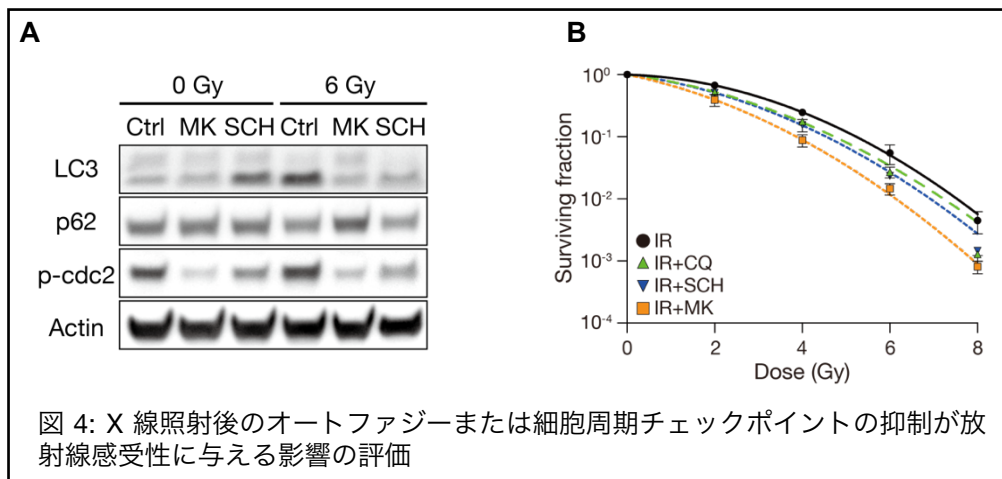


図 4: X 線照射後のオートファジーまたは細胞周期チェックポイントの抑制が放射線感受性に与える影響の評価

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takashima Yuta, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Suzuki Motofumi, Kikuchi Hajime, Maeda Makie, Shoji Tetsuaki, Furuta Megumi, Kinoshita Ichiro, Dosaka Akita Hirotooshi, Sakakibara Konishi Jun, Konno Satoshi	4. 巻 146
2. 論文標題 Bromodomain and extraterminal domain inhibition synergizes with WEE1 inhibitor AZD1775 effect by impairing nonhomologous end joining and enhancing DNA damage in nonsmall cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1114 ~ 1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1002/ijc.32515">https://doi.org/10.1002/ijc.32515</a>	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 Kono Yusuke, Yokoyama Kazuha, Suzuki Motofumi, Takakura Hideo, Ogawa Mikako	4. 巻 43
2. 論文標題 Surface Modification of Liposomes Using IR700 Enables Efficient Controlled Contents Release Triggered by Near-IR Light	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 736 ~ 741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00864">https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00864</a>	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 Tomita Mayu, Suzuki Motofumi, Kono Yusuke, Nakajima Kohei, Matsuda Takuma, Kuge Yuji, Ogawa Mikako	4. 巻 10
2. 論文標題 Influence on [18F]FDG uptake by cancer cells after anti-PD-1 therapy in an enforced-immune activated mouse tumor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EJNMMI Research	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) <a href="https://doi.org/10.1186/s13550-020-0608-4">https://doi.org/10.1186/s13550-020-0608-4</a>	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木基史, 松本謙一郎, 中西郁夫, 長谷川純崇
2. 発表標題 放射線によって誘導されるオートファジーと細胞周期チェックポイントとの相互制御機構の解明
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木基史, 松本謙一郎, 中西郁夫, 長谷川純崇
2. 発表標題 X線によって誘導されるオートファジーと細胞周期チェックポイントとの相互制御機構の解明
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motofumi Suzuki, Ken-ichiro Matsumoto, Ikuo Nakanishi, Sumitaka Hasegawa
2. 発表標題 The crosstalk between radiation-induced autophagy and G2 checkpoint and its application for radiotherapy in pancreatic cancer.
3. 学会等名 International Congress of Radiation Research (ICRR2019)
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----