

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007年度 ～ 2008年度  
 課題番号：19591469  
 研究課題名（和文） 制癌剤と放射線の併用によるアポトーシス誘導とギャップ結合の役割  
 研究課題名（英文） Role of gap junctions in apoptosis induced by anticancer drugs combined with radiation  
 研究代表者  
 小川 貴彦（OGAWA TAKAHIKO）  
 財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・来所研究員  
 研究者番号：90399626

## 研究成果の概要：

放射線照射とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACi）がアポトーシスおよびギャップ結合に及ぼす影響について検討した。その結果、HDACi および放射線はそれぞれが腫瘍細胞に細胞死を誘導し両者の併用によりその作用は増強した。一方、正常細胞では HDACi により細胞死は誘導されずコネキシン遺伝子発現によりギャップ結合機能を亢進した。以上よりギャップ結合機能を介した選択的アポトーシス誘導という点で放射線治療への応用が期待された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療学、放射線、制癌剤、HDAC 阻害剤、ギャップ結合、アポトーシス、コネキシン、アセチル化ヒストン

## 1. 研究開始当初の背景

ギャップ結合は細胞の増殖、分化及び分化した細胞の適応応答の調節に係る基本的生物機能の一つと考えられる。さまざまな腫瘍細胞においてギャップ結合が阻害されていることが知られるようになり、ギャップ結合の阻害を介した細胞機能の変化が腫瘍細胞増殖に係ると考えられる。さらに、コネキシン(Cx)蛋白欠損腫瘍細胞への Cx 遺伝子導入により Cx 蛋白の細胞増殖抑制効果が示唆されている。腫瘍細胞の増殖と生存にはギャップ結合の減少/消失が不可欠であり、

一方、周囲の正常細胞でのギャップ結合の維持あるいは増強は腫瘍の増殖や浸潤の抑制に貢献すると考えられる。しかし、ギャップ結合調節機構および細胞死との関係について詳細な研究は行われておらず不明な点が多い。最近、我々はギャップ結合能(GJIC)のある正常細胞と正常細胞に *ras* 癌遺伝子を導入した GJIC の抑制されている細胞における細胞死誘導の差異について検討した。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性を有する制癌剤が正常細胞の GJIC を高め細胞死を抑制する一方、GJIC の低い *ras* 遺

伝子導入細胞では細胞死を誘導することを見出した。すなわち HDAC 阻害に基づく制癌剤応答性にギャップ結合が重要な役割を果たしており、正常細胞と腫瘍細胞の応答の違いが重要であることが示唆されている。

一方で放射線とギャップ結合の関係については、低線量の放射線を照射した細胞の隣接する細胞に突然変異が生じるというバイスタンダー効果についての研究が進んでいる。しかしながら、放射線による細胞死誘導機構について GJIC の観点からの研究はほとんどなされていない。また、癌治療において、放射線と制癌剤併用の治療法が進んでいる中で、それぞれ単独での細胞死誘導の研究はあるが、その併用による細胞死誘導の作用機構について、特に細胞間相互作用の観点からの研究はなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、放射線及び制癌剤によるアポトーシス誘導に対する応答性の差異にギャップ結合がどのような役割を果たすのかを、正常細胞と腫瘍細胞株を用いて明らかにする。すなわち、Cx 発現細胞、癌遺伝子導入細胞、腫瘍細胞株を用いて、放射線と制癌剤応答性へのギャップ結合の与える影響を検討し、ギャップ結合のアポトーシス誘導における意義を明らかにするとともに、ギャップ結合増強効果のある制癌剤と放射線併用の有用性を明らかにする。この研究により、ギャップ結合増強による正常細胞のアポトーシス抑制と腫瘍細胞のアポトーシス誘導という観点から正常細胞の応答を取り入れた放射線治療の新しいモデルを構築する。

## 3. 研究の方法

放射線照射と HDAC 阻害剤 (trichostatin A (TSA), HDACi-A およびその誘導体である HDACi-B) を用い、それぞれ、および両者の併用が細胞死および GJIC 機能の誘導にどのような影響を及ぼすかについて、ヒト正常腹膜中皮細胞 (HPMC)、正常ラット肝細胞 (WB: Cx43 発現)、癌遺伝子 *ras*, *myc*, *src*, *neu* を形質導入し、GJIC 機能が阻害された正常ラット肝細胞 (WB-*ras*, -*myc*, -*src*, -*neu*)、HeLa 細胞およびヒトの乳腺正常細胞 (184A1)、乳癌細胞 (MCF-7、T47D) を用いて以下のように検討した。

(1) HPMC, 184A1, MCF-7, T47D における TSA, HDACi-A, HDACi-B に対する応答性と GJIC の関係を調べた。応答性の差は細胞増殖能と死細胞の割合により比較した。GJIC は、FRAP assay\*により、Cx (Cx26, Cx43) mRNA 発現量変化はリアルタイム PCR により調べた。

(2) HPMC における HDACi-A, HDACi-B 処理によ

る GJIC の変化と Cx 発現の関係を調べた。クロマチン免疫沈降 (ChIP)\*\*によりアセチル化されたヒストンに Cx43 遺伝子が含まれるかを調べ、HDAC 阻害剤処理の Cx への直接的な作用を検討した。

(3) ラット肝細胞株群を用いた放射線および HDAC 阻害剤応答性と GJIC の関係

GJIC<sup>+</sup>である WB (Cx43 発現)、GJIC<sup>-</sup>である WB-*ras*, *myc*, *src*, *neu* の放射線、HDACi-A, HDACi-B に対する応答性の違いを調べた。応答性の差は生細胞の割合により比較した。

(4) HeLa 細胞群 (D98, ESH15, CGL3, CGL2, CGL4G5, CGL4CL5) を用いて放射線、HDAC 阻害剤 (HDACi-A, HDACi-B) の単独および両者の併用による放射線応答性の変化とギャップ結合の関係を調べた。HDACi-B で 24~48 時間処理し、放射線応答性の変化と GJIC の関係を調べた。応答性の差は生細胞の割合により比較した。

(5) 研究の総合的まとめ

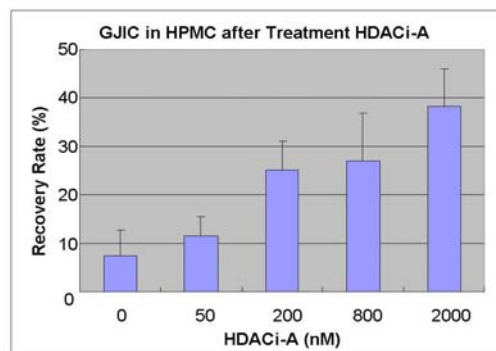
上記の実験データから、放射線と HDAC 阻害剤が正常細胞および腫瘍細胞に誘導するアポトーシスにギャップ結合がどのように関係しているかを総合的に検討した。

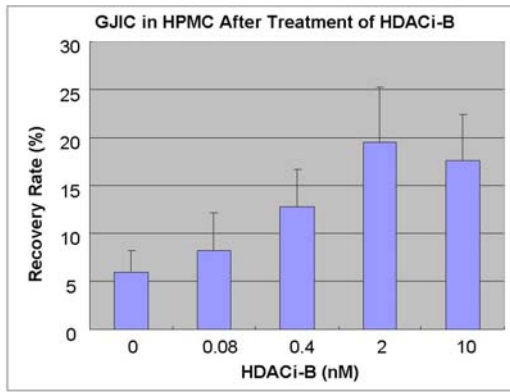
\*FRAP assay : あらかじめ細胞を蛍光色素で染色し、コンフォーカル顕微鏡を用いて、その中の数個の細胞をランダムに選びレーザーで消光した後、蛍光を有する細胞から消光細胞への蛍光物質の流入を定量的に求めることにより、GJIC を測定した。

\*\*クロマチン免疫沈降 (ChIP) : アセチル化ヒストン蛋白と Cx 遺伝子など特定のゲノム領域との結合を検出するために用いた。アセチル化ヒストンに対する抗体で免疫沈降したクロマチン分画から DNA を精製し、Cx 遺伝子の有無および濃度をリアルタイム PCR 法で定量した。

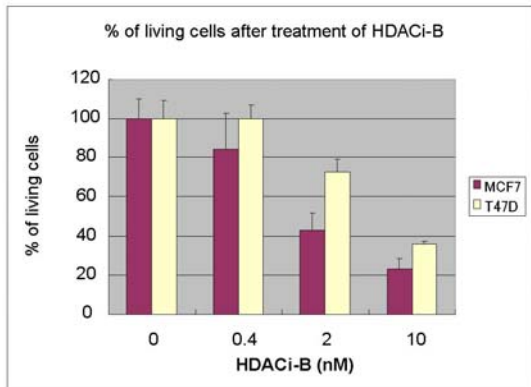
## 4. 研究成果

(1) TSA は低濃度で HPMC にアポトーシスを誘発したが、HDACi-A および HDACi-B はアポトーシスを誘発せず GJIC 機能を亢進させた。

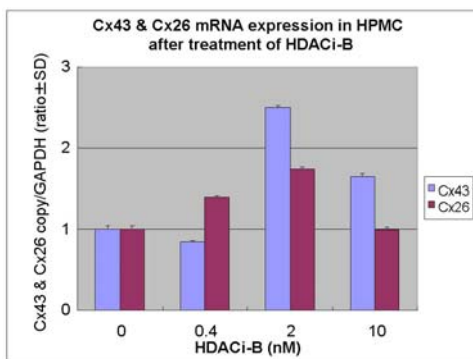
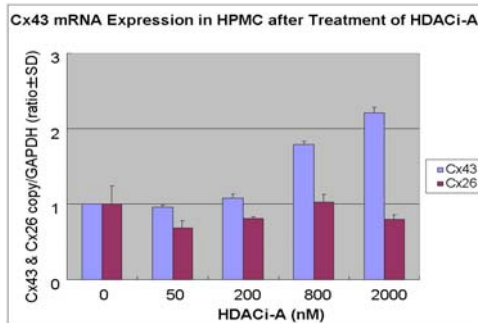




(2) MCF-7 および T47D に TSA、HDACi-A および HDACi-B を投与した場合、アポトーシスが誘導されたが GJIC 機能の顕著な亢進は観察されなかった。



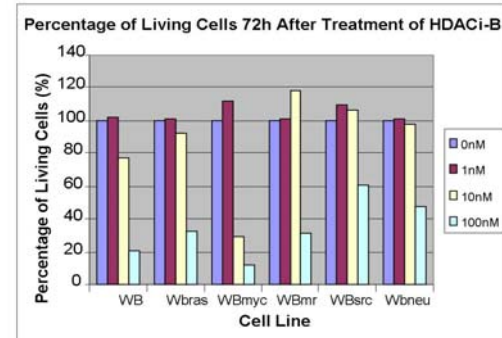
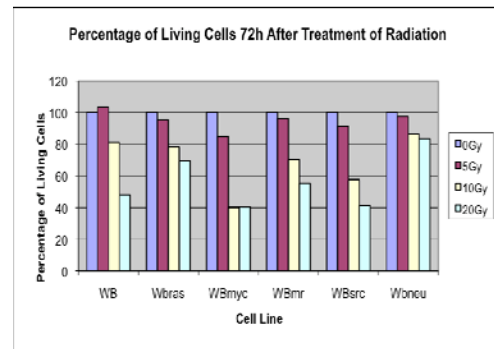
(3) HDACi-A, B は HPMC, 184A1, MCF-7、T47D における Cx43mRNA の発現を増強した。



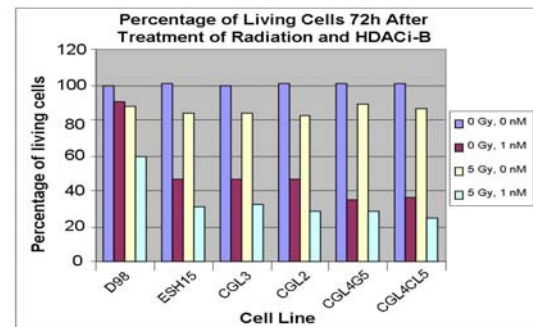
(4) HDACi-A を投与した HPMC では、クロマチ

ン分画におけるアセチル化ヒストンの量は濃度依存性に増加した。2. アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により得られた DNA 画分において Cx43 遺伝子の DNA が検出され、Cx43DNA 量は濃度依存性に増加した。

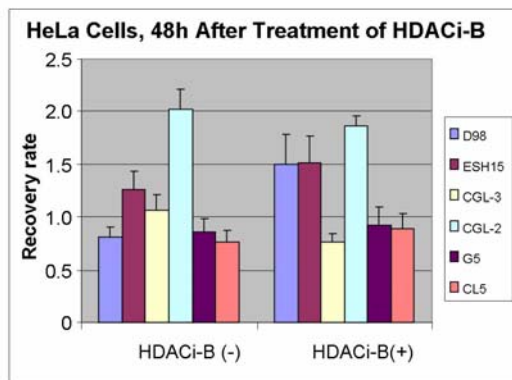
(5) WB、癌遺伝子導入 WB 細胞の放射線応答性と制癌剤応答性の違いを調べた。GJIC<sup>+</sup>の WB 細胞と比較して、特に GJIC<sup>-</sup>の癌遺伝子導入 WB-neu と WB-ras 細胞は放射線に対し強い抵抗性を示した。WB, WB-ras, -myc は HDACi-B に感受性で WB-src, -neu は WB に比し HDACi-B に低感受性であった。



(6) HeLa 細胞は放射線および HDACi-B に感受性を示したが、HDACi-A では高濃度でのみアポトーシスを誘導し得た。一方、細胞を放射線照射前にアポトーシスを誘導しない低濃度の HDACi-B で前処理することにより単独の場合に比べて高率にアポトーシスが誘導された。



(7) 細胞死を誘発しない低濃度の HDACi-B は HeLa 細胞において GJIC 機能の顕著な亢進は認められなかった。



(8) HDACi-A, -B いずれも正常細胞にアポトーシスを誘導しない。低濃度の HDACi-A, -B により GJIC 機能亢進を認め、前者ではヒストンアセチル化領域における Cx43 遺伝子発現増強を認めた。すなわち HDAC 阻害剤は Cx43 遺伝子にエピジェネティックな影響を及ぼすことにより GJIC 機能を亢進させアポトーシス抑制に働くと推察された。一方、HDAC 阻害剤により癌細胞にアポトーシスが誘導されるが、同時に GJIC 機能の顕著な亢進は認められなかった。

以上より HDAC 阻害剤による癌細胞へのアポトーシス誘導は GJIC 機能とは独立したメカニズムの存在が示唆された。さらに、HDAC 阻害剤と放射線照射との併用がそれぞれを単独に作用させた場合に比べてより高率に癌細胞にアポトーシスを誘導したことは、ギャップ結合増強による正常細胞のアポトーシス抑制と腫瘍細胞のアポトーシス誘導という観点から正常細胞の応答を取り入れた放射線治療の新たなモデルを構築出来る可能性を示唆した。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yokoyama Y, Masaki T, Kiribayashi K, Nakashima A, Kokoroishi K, Ogawa T, Kohno K, and Yorioka N 15-Deoxy- $\Delta$  12,14- prostaglandin J2 Inhibits Angiotensin II-induced Fibronectin Expression via Hepatocyte Growth Factor Induction in Human Peritoneal Mesothelial Cells. Therapeutic Apheresis and Dialysis. 2009 in press. 査読有
- ② Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y. Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: current progress in

molecular epidemiology studies. Mutat Res. 2008 Jul-Aug;659(1-2):109-17. 査読有

- ③ Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T, Imai K, Kuzuhara T, Nishizono A, Fujiki H. TNF- alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from H. pylori, enters gastric cancer cells. Int J Cancer. 2008 Jul 1;123(1):117-22. 査読有
- ④ Yorioka N, Kiribayashi K, Naito T, Ogata S, Yokoyama Y, Kyuden Y, Ogawa T, Wada K, Hayashi K, Hirabayashi A. An oral adsorbent, AST-120, combined with a low-protein diet and RAS blocker, for chronic kidney disease. J Nephrol. 2008 Mar-Apr;21(2):213-20. 査読有
- ⑤ Kusunoki Y, Hayashi T. Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: implications for disease development among atomic bomb survivors. Int J Radiat Biol. 2008 Jan;84(1):1-14. 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 貴彦 (OGAWA TAKAHIKO)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・来所研究員  
研究者番号：90399626

### (2) 研究分担者

林 奉権 (HAYASHI TOMONORI)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・免疫学研究室長  
研究者番号：70333549

吾郷 里華 (AGO RIKA)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学分子疫学部・来所研究員  
研究者番号：00421917

中地 敬 (NAKACHI KEI)

財団法人放射線影響研究所・プロジェクト代表研究者  
研究者番号：00142117

### (3) 連携研究者

なし