

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790910  
 研究課題名(和文) オートファジーを介した放射線増感作用の研究  
 研究課題名(英文) Increased radiosensitivity through autophagy

## 研究代表者

遠藤 洋子 (Endo Hiroko)  
 地方独立行政法人大阪府立病院機構  
 大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・研究員  
 研究者番号：20359300

研究成果の概要：固形腫瘍内に存在する低酸素領域は、癌の放射線抵抗性の一因である。我々は、低酸素下では insulin-like growth factor(IGF) 刺激によって癌細胞の放射線感受性が增大することを見出した。本研究では、IGF による放射線感受性増大のメカニズムを詳細に検討した。膵臓がん細胞 AsPC-1 では IGF 刺激によって誘導された小胞体ストレスおよびオートファジーによって放射線感受性が增大することが明らかとなったが、小胞体ストレスとオートファジーの直接的な関連は見出せなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	270,000	2,170,000

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・オートファジー・小胞体ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は癌治療の有効な手段の一つであるが、その治療効率を高めるためには、細胞が活発に分裂していることや組織内に分子酸素が十分に存在することが重要である。

しかし、固形腫瘍の中には、腫瘍血管の構築が不完全であることから栄養や酸素のいきわたらない、いわゆる低酸素領域が存在する。この低酸素領域の癌細胞は、細胞分裂が低下していることや、フリーラジカルの素と

なる分子酸素が欠乏していることから、放射線治療抵抗性の一因となっている。

我々の研究室では、低酸素領域の癌細胞にも有効な治療法の開発を目標として研究を進めている。

放射線照射による細胞死の様式は、一部アポトーシスであることが知られているが、そのメカニズムは未だ明らかにされていない。近年、放射線による細胞死に直接オートファジーが関与していることが報告された。

オートファジーは細胞内タンパク分解機構の一つで、自食作用とも呼ばれている。細胞内に隔離膜が現れ、細胞質を包み込んで二重膜構造体(オートファゴソーム)を形成し、後にリソソームと融合して(オートリソソーム)内部のタンパク質を分解する。オートファジーは、細胞内への異常なタンパクの蓄積を防ぎ、栄養飢餓時にはアミノ酸をリサイクルするなど、細胞の恒常性維持に関与している。一方で、オートファジーはアポトーシスとは異なる形式の細胞死を誘発することも知られており、2型プログラム死と呼ばれている。このオートファジーによる細胞死は、アポトーシス抵抗性細胞で顕著に観察されている。癌細胞は一般的にアポトーシス抵抗性であることから、オートファジーによる細胞死を癌治療に応用できる可能性がある。

これまでに我々は、低酸素下での insulin-like growth factor (IGF) 刺激は癌細胞の放射線感受性を増大させることを見出してきた。

本研究では、IGF 刺激による放射線感受性の増大効果が小胞体ストレスを介したオートファジーの誘導によって得られたものであることを示し、また、オートファジーを誘導することで低酸素下での放射線感受性を増強することを目標とした。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、無酸素下(0%O<sub>2</sub>)での IGF 刺激は膵臓がん細胞 AsPC-1 に小胞体ストレスを誘発し、CHOP/GADD153 の発現上昇により細胞死を引き起こすことを報告した。CHOP は小胞体ストレスや DNA 損傷に応答して誘導される転写因子であり、ストレス下でのアポトーシスに重要な役割を果たしている。また、低酸素下(1%O<sub>2</sub>)で培養した AsPC-1 細胞を IGF で刺激すると、放射線感受性が増大することを見出した。低酸素下の IGF 刺激は細胞に小胞体ストレスを惹起するとともに、オートファジーも誘発していた。

小胞体ストレスは細胞内の異常なタンパクの蓄積を感知するシステムであり、小胞体ストレスによる PERK/eIF2 $\alpha$  の活性化がオートファジーを誘導することが報告されている。

本研究では、

- ① 小胞体ストレス、特に CHOP を介してオートファジーが誘導されること
- ② CHOP がオートファジーを介して放射線感受性を増強すること
- ③ CHOP によるオートファジーの促進が低酸素下でも放射線感受性を増強すること

以上3点を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 細胞培養：ヒト膵臓がん細胞AsPC-1、Panc-1、ヒト乳癌細胞株MCF-7はAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) より購入した。低酸素培養は multigas incubator (ASTEC) を用い、低酸素下での操作はInVivo2 (RUSKINN) を用いた。
- (2) clonogenic assay：細胞を 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask にまき、serum free medium に交換後、recombinant human IGF2 100ng/mL を添加して 1%O<sub>2</sub> 下で 18 時間培養した。Flask の口を閉じ、X 線発生装置 MBR-1505R (HITACHI) で X 線照射を行った。照射 2 時間後に細胞をトリプシン-EDTA で回収し、clonal density で撒きなおした。Serum 存在下、20%O<sub>2</sub> で 2 週間培養し、コロニー数を計測した。
- (3) Immunoblot analysis：小胞体ストレス関連抗体 (CHOP/GADD153, CREB-2/ATF4) オートファジー関連抗体 (LC3, ATG7) を用いて Western blot を行った。
- (4) plasmid transfection：pMXs/CHOP, pMXs/flag tagged-dnPERK (C 末欠損 PERK), pSuperRetro/shCHOP をウイルスベクター法を用いて細胞に導入した。

## 4. 研究成果

### (1) 低酸素下での IGF 刺激は放射線感受性を増加させる。

膵臓がん細胞 AsPC-1 は通常酸素下 (20%O<sub>2</sub>) に比べて低酸素下 (1%O<sub>2</sub>) では放射線感受性が低下するが、IGF2 を添加すると低酸素下での放射線感受性が増加した。(図 1)

膵臓がん細胞 Panc-1 および乳がん細胞株 MCF-7 でも同様の結果が得られた。

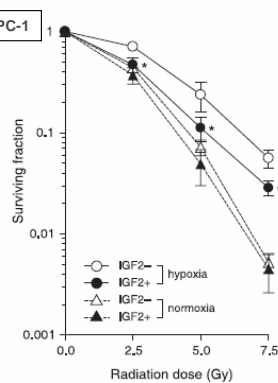


図 1

AsPC-1 細胞の低酸素下 IGF 刺激による放射線感受性は、PI3K 阻害剤である LY294002 または mTOR 阻害剤である rapamycin を添加することで低下した。つまり、PI3K-mTOR 経路が IGF 刺激による放射線感受性の増大に関与していることが明らかとなった。

**(2) 低酸素下での IGF 刺激は小胞体ストレスおよびオートファジーを誘導する。**

続いて、低酸素下の IGF 刺激が細胞にどのようなストレス応答を引き起こすのかを検討した。

AsPC-1 細胞では、IGF2 の添加により CHOP、GAD34、BiP 等の UPR (Unfolded Protein Reaction) 関連遺伝子が上昇し、XBP-1 のスプライシングも見られることから、小胞体ストレスが起きていることが確認された。

また、オートファゴソーム形成の際に検出される LC3-II も発現しており、オートファジーが進行していることが示唆された。

LY294002 または rapamycin で PI3K-mTOR 経路を阻害すると、IGF2 による小胞体ストレスおよびオートファジーの誘導は低下した (図 2)。

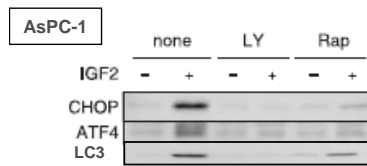


図 2

**(3) IGF 刺激による小胞体ストレスの誘導が放射線感受性の増大に関与している。**

AsPC-1 細胞に pMXs/CHOP を導入して CHOP を過剰発現させると、低酸素下 IGF2 刺激による放射線感受性が増加した (図 3a)。

一方、shCHOP または flag tagged-dnPERK を導入した AsPC-1 細胞では、放射線感受性が低下した (図 3b, 3c)。

これらのことから、低酸素下 IGF 刺激による放射線感受性の増大は小胞体ストレスを介していることが示唆された。

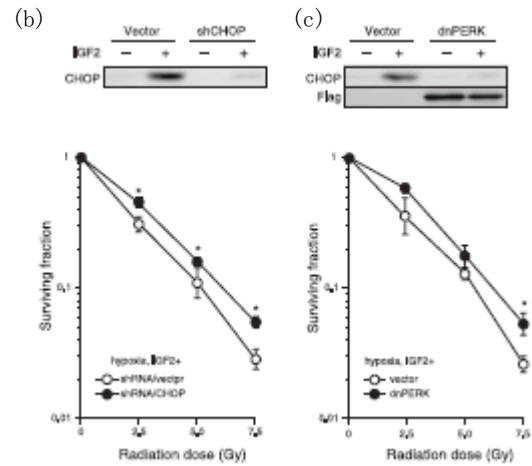
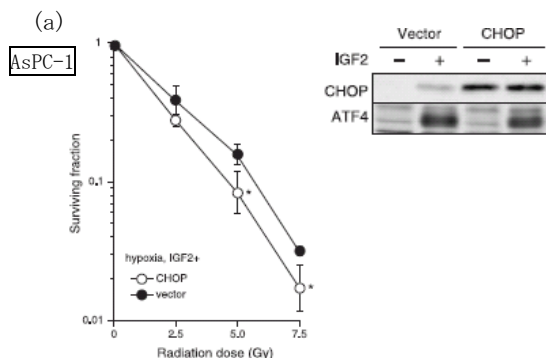


図 3

**(4) IGF 刺激によるオートファジーの誘導は放射線感受性の増大に関与している。**

AsPC-1 細胞にオートファジー関連分子である Beclin1 または ATG7 の shRNA を導入すると、放射線感受性が低下した (図 4)。

しかし、ATG7 の発現低下は LC3 のタンパク量に影響せず、オートファジーが抑制されたことが確認できなかった。

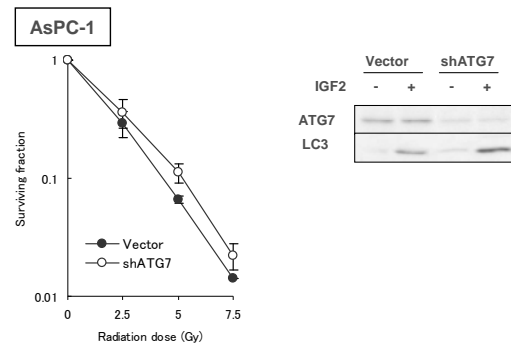


図 4

**(5) 小胞体ストレス、特に CHOP の発現上昇とオートファジーの関連を検討した。**

AsPC-1 細胞に CHOP の過剰発現または shCHOP の導入を行っても、低酸素下 IGF 刺激による LC-3 の発現量に変化は見られなかった (図 5)。

つまり、AsPC-1 細胞では小胞体ストレスとオートファジーが直接関連していないと推察された。



図 5

(6) MCF-7 細胞を用いて、小胞体ストレスおよびオートファジーによる放射線感受性増大効果を検証した。

- ① MCF-7 細胞に CHOP を過剰発現させると、CHOP タンパクの増加に伴って LC-3 の発現量が上昇した。しかし、低酸素下 IGF 刺激による放射線感受性は control と差がなかった。(図 6)

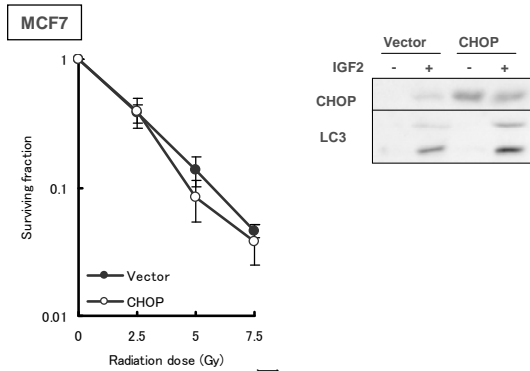


図 6

- ② MCF-7 細胞に shCHOP または shATF4 を導入すると、CHOP または ATF4 のタンパク量の低下に伴って LC-3 の発現量が低下した。しかし、IGF 刺激による放射線感受性は shCHOP では control と差がなく、shATF4 では逆に上昇した (図 7)。

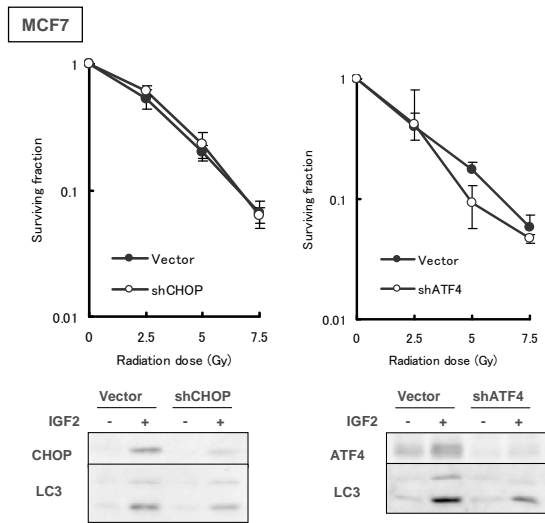


図 7

以上より、MCF-7 細胞では小胞体ストレスがオートファジーを誘導していることが示唆されたが、小胞体ストレス関連遺伝子を操作しても放射線感受性に一貫した変化は認められなかった。

細胞によって放射線感受性メカニズムやオートファジー誘導のメカニズムに多様性があり、「小胞体ストレスがオートフ

ァジーの誘導を介して放射線感受性を増大させる」という仮説を証明するには至らなかった。

## 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 3 件)

- ① Isohasi F, Endo H, Mukai M, Inoue T, Inoue M. Insulin-like growth factor stimulation increases radiosensitivity of a pancreatic cancer cell line through ER stress under hypoxic conditions. *Cancer Sci* 99; 2395-2401; 2008 査読有
- ② Koga T, Endo H, Miyamoto Y, Mukai M, Akira S, Inoue M. IGFBPs contribute to survival of pancreatic cancer cells under hypoxic conditions. *Cancer Lett* 268; 82-88; 2008 査読有
- ③ Endo H, Murata K, Mukai M, Ishikawa O, Inoue M. Activation of insulin-like growth factor signaling induces apoptotic cell death under prolonged hypoxia by enhancing endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 67; 8095-8103; 2007 査読有

[学会発表] (計 1 件)

遠藤 洋子 Activation of IGF signaling under hypoxic conditions increases radiosensitivity in AsPC-1 cells through ER stress 日本癌学会 2007 年 10 月 4 日 国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 洋子 (ENDO HIROKO)

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪府立成人病センター (研究所)・研究所・研究員

研究者番号：20359300

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし