

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08214

研究課題名(和文)がん抑制遺伝子CDKN2A変異がんに対する重粒子線の細胞死誘導機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the cell death mechanism induced by heavy ion beams for CDKN2A mutant carcinoma

研究代表者

矢島 浩彦 (Yajima, Hirohiko)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所・主幹技術員

研究者番号：30261895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CDKN2Aは膵癌では90%以上、乳癌では30～40%が変異を有するがん抑制遺伝子であり、放射線抵抗性の原因遺伝子でもある。本研究では、CDKN2A変異がん細胞(MCF7)に対する重粒子線の生物効果と、細胞死誘導機構への影響を解析した。MCF7は、X線およびガンマ線照射に対して耐性があるが、重粒子線は複雑なDNA損傷を発生させることにより、DNA損傷応答シグナルATRを高度に活性化し、p53の安定な高発現を維持、p21の発現上昇を促進することで、アポトーシスおよび細胞老化を誘導することを明らかにした。これらの結果から、CDKN2A変異がんに対する重粒子線の優位性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療は個別化治療が進んでいる。放射線治療にも個別の遺伝子変異に応じた照射条件を適応する治療が望まれている。CDKN2Aの変異率が特に高い膵癌は5年生存率が10%未満のアンメッドメディカルニーズの高い腫瘍であるが、重粒子線治療は治療後5年生存率が50%程度と良好な治療成績が収められている。本研究により、CDKN2A変異がんに対する重粒子線の優位性が示され、CDKN2A変異が多い、膵癌への重粒子線適応を後押しし、さらに膵癌に対して効果の高い量子メス開発・化学療法免疫療法との併用療法開発の基盤となると期待している。

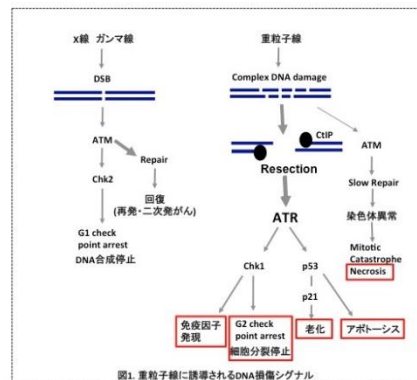
研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the biological effects of heavy ion irradiation on CDKN2A mutant cancer cells (MCF7), which are the causative genes of radiation resistance, and their effects on the mechanism of cell death induction. MCF7 is resistant to X-ray and gamma irradiation. On the other hand, it was clarified that heavy ion irradiation induce apoptosis and cellular senescence by inducing activation of the complex DNA damage response signal ATR, thereby maintaining a stable high expression of p53 of MCF7 and promoting increased expression of p21.

研究分野：医学

キーワード：がん治療 放射線 重粒子線 DNA損傷応答

### 1. 研究開始当初の背景

将来的にがん治療は患者の遺伝背景とがんの遺伝子変異等に基づく特性に沿ったオーダーメイドの治療プロトコールが望まれている。重粒子線治療は、重粒子ビームの物理学的特長を用いた正常組織への侵襲が少ない放射線治療として知られている。加えて、同エネルギーのX線・ガンマ線治療と比較して、2-3倍もの高い生物効果があり、この高い生物効果は、DNA 損傷応答に基づくことが近年明らかにされつつある。X線・ガンマ線は、標的細胞にDNA 損傷を誘導し、DNA 損傷シグナルATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) を主に活性化する。活性化された ATM は、p53 を始めとしてさらに下流のシグナル伝達経路を活性化し、DNA 修復・アポトーシス・増殖停止・細胞老化を誘導する。一方で、重粒子線は、DNA 損傷末端が平滑のDNA 二重鎖切断に加えて、局所的にDNA 一重鎖切断と塩基損傷を混在した複雑なDNA 損傷(Complex DSB)を誘導する。複雑なDNA 損傷は修復の過程で、DNA 損傷末端の削り込み(リセクション)が行われ、露出した一本鎖DNAによって細胞周期調節因子ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein) が高度に活性化する(図1)。そのため、重粒子線誘導性のDNA 損傷応答は、下流シグナル伝達経路がX線誘導性の経路と異なり、重粒子線誘導性の細胞死はこのDNA 損傷応答に起因すると考えられる(Yajima H. et al., *DNA repair* 2013)。

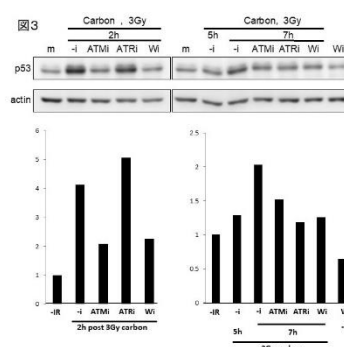
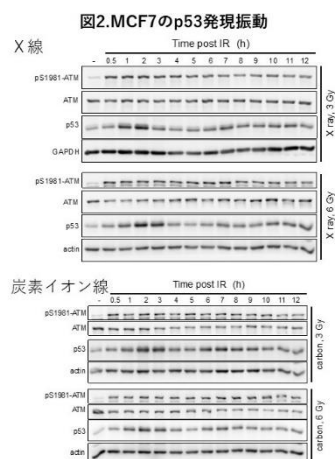


### 2. 研究の目的

*CDKN2A*(Cyclin dependent kinase inhibitor 2A)は p16INK4a(以下 p16)と p14ARF(以下 p14)をコードするがん抑制遺伝子であり、がんにおける *CDKN2A* 変異は p53 に次いで多い。p16 は、細胞周期を調節し、細胞老化を誘導する機能を持つ。p14 は Mdm2 による p53 の分解を防ぐことで p53 の安定的発現を調節し、がん細胞の増殖を抑制する。*CDKN2A* は内因性の遺伝子不安定性を監視し排除するサーベイランスシステムとして機能していると考えられ、機能欠損は発がんにつながる。30~40%の乳がんは p14 の機能を欠損し、膵がんの 90%以上は、変異・遺伝子欠損によりp16機能を欠損していると言われている。放射線治療において、p16 は DNA 損傷応答シグナルを受けて、細胞老化を誘導し、細胞増殖を抑制する。p14 は p53 依存性のアポトーシス誘導をサポートする。そのため、p16/ p14 欠損はアポトーシス・細胞老化抵抗性を誘導する。すなわち *CDKN2A* 変異がんは悪性度が高いガンであり、*CDKN2A* 変異に応じた治療法の適応が望まれる。本研究では、*CDKN2A* 変異がん細胞に対する重粒子線の生物効果を評価した。

### 3. 研究の方法

ヒト由来の正常細胞と *CDKN2A* 野生型の骨肉腫細胞株 U2OS の培養細胞と、*CDKN2A* に変異を有するヒト由来乳がん細胞株 MCF7,ヒト由来膵癌細胞株 MIA-Paca2 を使い、ゲノム編集により *CDKN2A* の cDNA を強制発現させて、放射線応答への影響を評価した。放射線照射は低線エネルギー付与放射線(LET)と



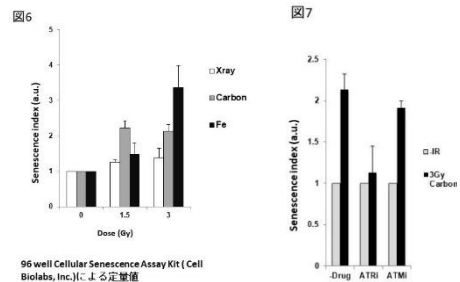
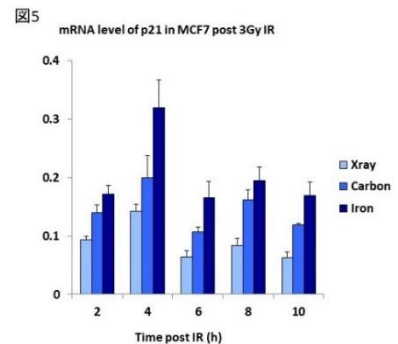
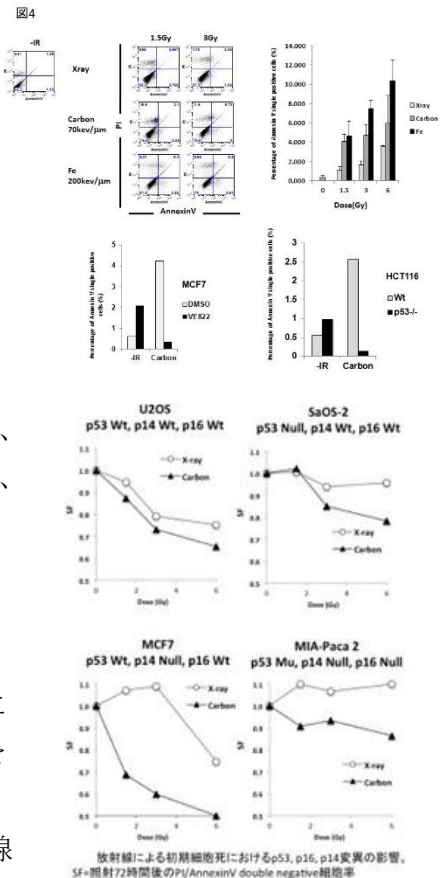
してX線および、ガンマ線を照射し、高 LET 放射線として約 70 keV/ $\mu$ m の炭素イオン線、200 keV/ $\mu$ m の鉄線を照射した。照射後、細胞内 p53 を始めとする DNA 損傷応答因子のリン酸化および発現量を WB 法にて解析した。細胞死形態は、細胞膜表面の AnnexinV 発現をフローサイトメーターにて観察した。細胞老化は  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色を顕微鏡にて観察した。

#### 4. 研究成果

CDKN2A 正常細胞 HFLIII および U2OS の p53 は放射線照射後、3-4 時間後にリン酸化されその後8時間は安定的高発現が維持される。この p53 の発現量の変化はX線と炭素イオン線で大きな差は観察されなかった。一方で、MCF7 はガンマ線応答により、p53 発現が照射後 4 時間をピークに上昇し、その後発現低下、数時間後に再度上昇する「p53 振動」を繰り返す現象が観察された。MCF7 に重粒子線を照射すると、p53 発現は振動しながらも高いレベルを維持されていた(図2)。この p53 振動は、DNA 損傷応答因子、ATR 阻害剤によって、p53 発現上昇が阻害されたため(図3)、ATR を介した p53 の安定化によるものと示唆された。

CDKN2A 正常細胞 HFLIII と U2OS ではX線と炭素イオン線による初期アポトーシス誘導率に有意な差は認められなかった。MCF7 と MIA-Paca2 では、X 線照射によるアポトーシスに抵抗性を示し、炭素イオン線・鉄線による細胞死と有意な差を認めた(図 4)。MCF7 の重粒子線によるアポトーシスは ATR 阻害剤によって抑制された(図 4)また、MCF7 に炭素イオン線を照射後、p21 の mRNA の上昇が認められ(図 5)、細胞内老化が観察された(図6)。ガンマ線、X線では細胞内老化は誘導されなかった。MCF7 に野生型 CDKN2A を導入した細胞では、X線照射により、p53 の高発現が維持され、またアポトーシス、細胞老化誘導の有意な上昇が認められた。炭素イオン線に誘導されるアポトーシス(図 4)、細胞老化はいずれも ATR 阻害剤によって抑制された(図 7)。

このことから、重粒子線は、ATR を高度にリン酸化することにより、p16/p14 非依存性に p53 の安定化を維持し、アポトーシス、細胞老化を誘導していることが明らかになった。



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 Nakajima Nakako Izumi, Yamauchi Motohiro, Kakoti Sangeeta, Cuihua Liu, Kato Reona, Permata Tiara Bunga Mayang, Iijima Moito, Yajima Hirohiko, Yasuhara Takaaki, Yamada Shigeru, Hasegawa Sumitaka, Shibata Atsushi	4. 巻 91-92
2. 論文標題 RNF8 promotes high linear energy transfer carbon-ion-induced DNA double-stranded break repair in serum-starved human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102872 ~ 102872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2020.102872	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 菜花子, 下川 卓志, 小此木 範之, 村田 和俊, 山田 滋, 長谷川 純崇
2. 発表標題 重粒子線治療による子宮頸がんの免疫原性の変化
3. 学会等名 第44回 癌免疫外科研究会, 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	中島 菜花子  (Nakajima Nakako)  (50402863)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・QST病院・研究員   (82502)	

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