

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17258

研究課題名(和文) がん放射線耐性克服に向けた新たな治療戦略開発；耐性細胞株で増加する分子に着眼して

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategies to overcome cancer radioresistance; focusing on molecules that are increased in resistant cell lines

研究代表者

金光 祥臣 (KANEMITSU, Yoshitomi)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：30752943

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)：本研究は、口腔扁平上皮癌細胞株 SAS およびその放射線耐性細胞株である SAS-R を用いた解析から、protein disulfide isomerase (PDI) や peroxiredoxin (Prx) 4などの酸化ストレス応答関連タンパク質が SAS-R で増加していることを明らかにした。Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞株および Prx4 過剰発現 SAS 細胞株を用いた解析により、Prx4 は、放射線によって生じる酸化ストレスの細胞障害を抑制し、他のタンパク質と関連して耐性能に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療は、がん治療における重要な治療選択肢の一つである。しかし、放射線耐性を獲得するがん細胞が存在し、これによる再発が問題となる。したがって、放射線耐性化機序の解明と新規治療戦略の開発が切望されている。本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株 SAS およびその放射線耐性細胞株である SAS-R を用いた解析から、タンパク質のフォールディングに関わる PDI ファミリータンパク質が耐性細胞株で増加していること及び過酸化水素除去能を持つことが知られている Prx4 が、耐性能に関与していることを明らかにした。これらの成果は、放射線耐性化機序の理論構築と新規治療戦略開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is an essential component of cancer therapy. However, radioresistance remains a major obstacle to effective radiotherapy. The purpose of this study was to reveal new molecular mechanisms underlying radioresistance. To identify and quantification of novel radioresistance-related proteins, we conducted quantitative proteomic profiling on SAS and radioresistant cell lines (SAS-R). We found that protein disulfide isomerase (PDI) family proteins and peroxiredoxin 4 (Prx4) were significantly increased in SAS-R cells, as compared to SAS. Further, we also showed that knockdown of Prx4 in SAS-R cells leads to decreased radioresistance and resistance to H2O2.

These results indicated that Prx4-PDI is one of the key molecules contributing to radioresistance in SAS-R cells. There is a possibility that specific suppression of Prx4 can be a novel approach to overcoming cancer radioresistance.

研究分野：医療薬学、分析化学

キーワード：放射線耐性細胞 プロテオミクス peroxiredoxin PDI

1. 研究開始当初の背景

がんに対する放射線治療は、手術療法と化学療法に並ぶ 3 大治療のひとつとして広く用いられている。しかし臨床では、放射線治療に耐性を示し、予後不良となる症例が存在する。さらに、放射線の治療効果を臨床的に予測するバイオマーカーが未だ得られていないため、患者個々に最適な照射線量や照射期間を選択できない、という課題もある (Cancer Lett. 2015)。したがって、放射線耐性化機序の解明とその克服に向けた治療法開発は、放射線がん治療の進展および「放射線個別化治療」につながる重要な研究課題である。

この研究を進めるためには、安定した放射線耐性細胞のモデルが必要不可欠であるが、その作製は、非常に困難であるとされてきた。研究協力者である福本らは、低線量 X 線の継続照射により、親株と背景ゲノム構造が同一である放射線耐性細胞株の樹立に、世界で初めて成功した (Cancer Sci. 2009, Med Mol Morphol. 2017)。この細胞株は、標準的な放射線治療線量である 2 Gy の X 線を毎日照射しても、安定して生存し続けることから、放射線耐性化メカニズムを解析するための臨床的モデルがん細胞として非常に有用な資材である。

この耐性細胞株は、X 線による DNA 二本鎖切断を受けにくいこと、過酸化水素にも耐性を示すこと、がこれまでに明らかにされている (Tumour Biol. 2018 40)。申請者は、由来組織が異なる複数の耐性細胞株とその親株細胞のメタボローム・プロテオームの多層解析を通じて、①小胞体ストレス応答を担う一連のタンパク質 (Prx4-TXNDC5 など) 及び②核内の脂肪酸合成酵素 (FASN) と複数の長鎖脂肪酸が、耐性細胞株において共通して顕著に増加していることを明らかにした。これらは、酸化ストレスや DNA 修復能力にそれぞれ重要な機能を有していることが知られており (Sci Rep. 2013, PNAS 2016)、放射線耐性化の責任分子を担っている可能性が高い。しかし、これらの周辺分子を含めた細胞内プロセス変動が耐性能に与える寄与の大きさや時空間的な関連性、そして耐性化バイオマーカーや治療標的としての意義は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究は、放射線耐性化機序と責任分子を明らかにし、がん放射線治療に実用可能なバイオマーカーと新規治療戦略の開発を目的とした。そのための方略として、由来組織が異なる耐性細胞株において共通して量的変化が際立っていた Prx4-TXNDC5 などの酸化ストレス応答関連タンパク質に着目し、この細胞内プロセス変化がもたらす放射線耐性能への寄与度を明らかにする。

- (1) PDI ファミリー及び Prx ファミリー分子のタンパク質発現解析
- (2) Prx4 過剰発現 SAS 細胞および Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞の放射線耐性能評価
- (3) 他種の臨床的放射線耐性細胞株の Prx4 発現量解析

3. 研究の方法

- (1) PDI ファミリー及び Prx ファミリー分子のタンパク質発現解析

PDI ファミリー分子とその機能的関連分子である Prx ファミリー分子のタンパク質発現を Western blot 法により解析した。

- (2) Prx4 過剰発現 SAS 細胞および Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞の放射線耐性能評価

放射線耐性における Prx4 の関与を明らかにするため、Prx4 過剰発現 SAS 細胞株および Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞株を作製した。リポフェクション法により、Prx4 発現プラスミド Prx4/pCAGGS1 もしくは Vehicle として FH/pCAGGS2 を SAS に遺伝子導入した。G418 による選別により、Prx4 過剰発現 SAS 細胞株と Vehicle を作製した。Prx4-shRNA プラスミド Prx4-shRNA/pLKO.puro もしくは空ベクターの pLKO.puro をレンチウイルスによって SAS-R に遺伝子導入した。Puromycin による選別により、Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞株 3 種類と Vehicle を作製した。放射線耐性能評価の方法として、1 ヶ月間の X 線反復照射を行った。1.5 Gy の X 線を毎日照射し、10、20、30 日目の細胞数を計測した。

- (3) 他種の臨床的放射線耐性細胞株の Prx4 発現量解析

SAS 細胞とは組織由来が異なる放射線耐性細胞 (HepG2-R) について、それぞれ親株と比較して Prx4 の発現が増加しているか Western blot 法により解析した。

4. 研究成果

(1) PDI ファミリー及び Prx ファミリー分子のタンパク質発現解析

プロテオーム解析にて同定された PDI ファミリー分子の中で、特に発現増加が大きかった上位 4 種 (TXNDC5、ERp72、PDI、ERp44) の SAS と SAS-R 間の発現量を Western blot 法にて比較したところ、SAS と比較し SAS-R で有意に増加していた (図 1A)。続いて、Prx ファミリー分子 (Prx1、Prx2、Prx3、Prx4、Prx5、Prx6) の発現量比較を行ったところ、Prx4 が SAS-R で有意に増加していることが判った。一方、Prx2、Prx3 は SAS-R で減少傾向、Prx1、Prx5、Prx6 は変化なしであった (図 1B)。SAS-R で増加していた Prx4 について、リアルタイム PCR 法により mRNA 発現比較を行ったところ、SAS と比較し SAS-R で有意に増加していることが判った (図 1C)。

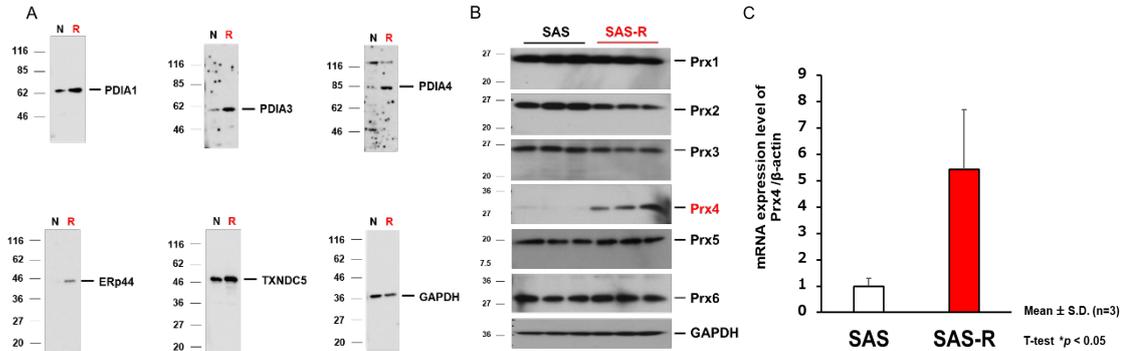


図 1 SAS と SAS-R における PDI 及び Prx ファミリー分子の発現量比較結果

(2) Prx4 過剰発現 SAS 細胞および Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞の放射線耐性能評価

作製した細胞の Prx4 発現レベルを Western blot 法により解析したところ、Prx4 過剰発現 SAS 細胞株はコントロール株と比べて増加していることが確認できた (図 2A)。また、Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞株は 3 種類ともコントロール株と比べて、Prx4 の発現が抑制されていることが確認できた (図 2B)。作製した細胞について放射線耐性能を調べた結果、Prx4 ノックダウン細胞株は 3 種類とも全滅し、耐性能の消失が示唆された (図 2C)。一方、Prx4 過剰発現細胞株は照射を開始してから、20 日でほぼ全滅しており、Prx4 単独の発現増加では耐性能を獲得できないことが示された (図 2D)。

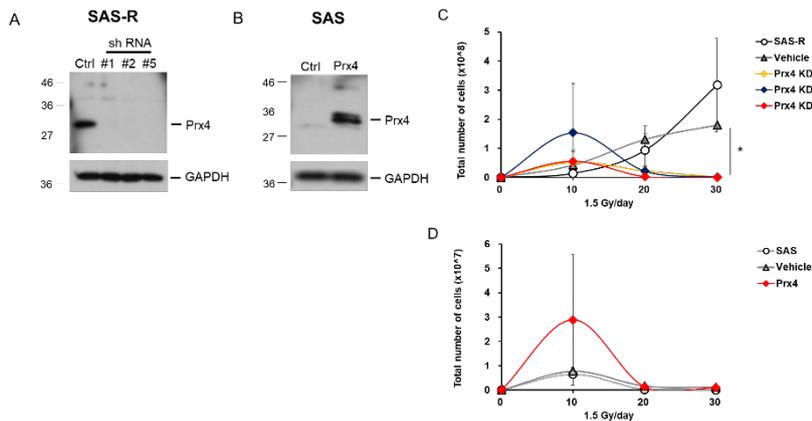


図 2 Prx4 過剰発現 SAS 細胞および Prx4 ノックダウン SAS-R 細胞の放射線耐性能評価結果

(3) 他種の臨床的放射線耐性細胞株の Prx4 発現量解析

Western blot 法による解析の結果、HepG2 と比較して HepG2-R は Prx4 の発現量が増加していることが判った (図 3)。すなわち、他の細胞種の放射線耐性化メカニズムにも Prx4 が関与していることが示唆された。

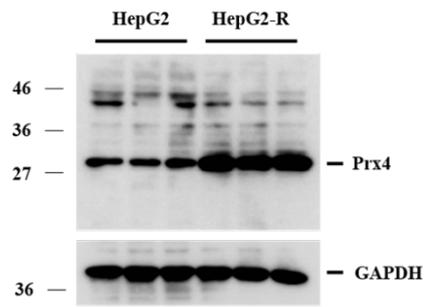


図 3 HepG2 及び HepG2-R における Prx4 の発現量比較結果

以上の結果から、Prx4 は放射線耐性を克服する治療標的分子となることが期待される。今後、耐性化に至るまでの Prx4 周辺分子の時空間的な動きを詳細に定量化し、特異的阻害剤などの検証も進めることで、新たなバイオマーカーや創薬研究に繋げていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanemitsu Yoshitomi, Mishima Eikan, Maekawa Masamitsu, Matsumoto Yotaro, Saigusa Daisuke, Yamaguchi Hiroaki, Ogura Jiro, Tsukamoto Hiroki, Tomioka Yoshihisa, Abe Takaaki, Mano Nariyasu	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive and semi-quantitative analysis of carboxyl-containing metabolites related to gut microbiota on chronic kidney disease using 2-picolylamine isotopic labeling LC-MS/MS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19075-19085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55600-1	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤裕徳、金光祥臣、桑原義和、福本学、塚本宏樹、富岡佳久
2. 発表標題 Peroxisome 4は臨床的放射線耐性口腔扁平上皮癌細胞の耐性能に寄与する
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤裕徳、金光祥臣、桑原義和、福本学、塚本宏樹、富岡佳久
2. 発表標題 放射線耐性がん細胞における Peroxisome 4 を介した放射線耐性の獲得
3. 学会等名 宮城薬剤師学術フォーラム 2019
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
---------------------------	-----------------------	----

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