

機関番号：22101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591502

研究課題名 (和文) 変異型 p53 細胞を標的とした siRNA による放射線/温熱/抗がん剤増感の研究

研究課題名 (英文) Study on the radiation/heat/anti-cancer drug sensitivity enhanced by siRNA in mutated-p53 cancer cells

研究代表者

大西 健 (OHNISHI KEN)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50152195

研究成果の概要 (和文)：細胞生存シグナル伝達因子を標的とした *NBS1*-siRNA、*XIAP*-siRNA による変異型 *p53* 細胞優位な放射線増感のメカニズムについて調べた。その結果、(1) *p53* タンパク質と細胞生存シグナル伝達のキータンパク質である AKT タンパク質が細胞内で結合していること、(2) AKT 阻害剤 (Wortmanin、LY294002) によって正常型 *p53* 細胞と変異型 *p53* 細胞の両細胞に放射線増感が見られることが分かった。これらの結果から、変異型 *p53* 細胞優位な放射線増感の一因として、*p53* と AKT 間のタンパク質結合が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study is to examine the mechanism that contributes to radio-sensitization by *NBS1*-siRNA or *XIAP*-siRNA observed more effectively in human lung cancer cells having mutated *p53* than in those having wild-type *p53*. This study showed that (1) *p53* associates with AKT intracellularly and (2) AKT inhibitors (Wortmannin, LY294002) enhances radio-sensitization in both of wild-type *p53* and mutated *p53* cells. From these results it was suggested that the association between *p53* and AKT is a cause of the predominant radio-sensitization observed mutated *p53* cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：p53、増感、RNA 干渉、siRNA、シグナル伝達因子、AKT

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトがんの約半数に *p53* 遺伝子の変異が見られ、変異型 *p53* をもつ患者は治療効果も低く、治療予後も悪いとされている。実際、培養細胞において、変異型 *p53* 遺伝子を持つがん細胞は放射線・温熱・抗がん剤に対して抵抗性を示すことをこれまで報告してきた (Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.,

1997; Apoptosis, 2002; Anticancer Res., 2002.)。臨床的にも、*p53* 遺伝子型ががん治療の先行指標となりえることが示唆されている (J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1998; Br. J. Cancer, 1999; Cancer, 2000)。このような背景から、正常型 *p53* 細胞を保有する患者に対しては比較的良好な治療効果を期待することができる。しかしながら、変異型

*p53* 細胞を保有する患者に対するより効率の良い治療法についてはまだ十分に検討されていない。これまで、変性タンパク質構造を正常なタンパク質構造に戻すはたらきのある分子シャペロン(グリセロール、C末端*p53*ペプチド)を用いることにより、変異型 *p53* タンパク質に正常型 *p53* タンパク質の正常機能を回復させ、正常型 *p53* 細胞と同程度にまで変異型 *p53* 細胞の放射線・温熱・抗がん剤感受性を高めることができることを報告してきた (Radiat. Res., 1999; Int. J. Radiat. Biol., 1999; Brit. J. Cancer, 2000)。本研究課題ではさらに、変異型 *p53* がん細胞を標的とした RNA 干渉法による新たな放射線・温熱・抗がん剤増感法について検討した。

## 2. 研究の目的

*NBS1* 標的 siRNA (*NBS1*-siRNA) および *XIAP* 標的 siRNA (*XIAP*-siRNA) は非小細胞肺癌細胞 (H1299) の放射線感受性を高めることを既に報告した (Radiat. Res., 2006; Oncol. Rep., 2008)。興味深いことにこれらの細胞生存シグナル伝達因子を標的とした siRNA による放射線増感効果は変異型 *p53* を導入した H1299 細胞 (H1299/*mp53*) の方が正常型 *p53* を導入した H1299 細胞 (H1299/*wtp53*) よりも顕著であった。この結果は、変異型 *p53* 細胞優位な放射線増感を得るには細胞生存シグナル伝達因子の発現を抑制することが有効な手段であることを示唆している。この変異型 *p53* 細胞優位な放射線増感メカニズムについて検討した。

## 3. 研究の方法

*p53* タンパク質による細胞生存シグナル伝達因子の抑制がどのようなメカニズムで生じているのかを検討するため、*p53* タンパク質と細胞生存シグナル伝達の中心的な役割を果たしている AKT タンパク質が細胞内で結合しているかを免疫沈降法、Western blot 法によって調べた。本研究では正常型あるいは変異型 *p53* 遺伝子を *p53* 欠損ヒト肺癌細胞 (H1299) に導入した H1299/*wtp53*、H1299/*mp53*、H1299/*neo* 細胞あるいは変異型 *p53* 遺伝子を導入したヒト舌扁平上皮がん細胞 (SAS) 用いた。*p53* タンパク質と AKT タンパク質が結合していることが分かれば、*p53* 依存的放射線感受性の一因が正常型 *p53* タンパク質による AKT 活性阻害であることが推察できる。さらに、AKT 阻害剤 (Wortmanin、LY294002) による放射線増感効果をコロニー形成法により H1299/*wtp53* と H1299/*mp53* で比較した。

## 4. 研究成果

(1) *p53* タンパク質と細胞生存シグナル伝達の中心的な役割を果たしている AKT タンパ

ク質が細胞内で結合していることが免疫沈降法によって明らかとなった (図 1)。

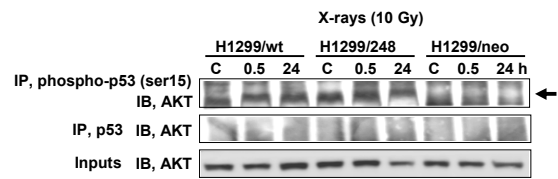


図 1. ヒト非小細胞肺癌細胞における *p53* と AKT の結合。全細胞抽出液を *p53* リン酸化セリン 15 認識抗体によって免疫沈降後、AKT 認識抗体で Western blot した結果、H1299/*wtp53* と H1299/*mp53* に AKT バンドが見られたが H1299/*neo* (*p53* 欠損) には見られなかった。この結果から、リン酸化 *p53* と AKT は細胞内で結合していることが示唆される。さらに、放射線照射後の AKT バンドは上方にややシフトしているため、放射線照射によって AKT はリン酸化していることが示唆される。

(2) AKT の阻害剤である Wortmanin と LY294002 を用いて AKT 活性阻害が及ぼす *p53* 依存的放射線感受性への影響を *p53* 遺伝子導入した舌扁平上皮がん細胞 (SAS) と非小細胞肺癌細胞 (H1299) で調べた。その結果、SAS 及び H1299 の正常型 *p53* 細胞と変異型 *p53* 細胞ともに Wortmanin ならびに LY294002 により放射線感受性が *p53* 非依存的に増強された (図 2)。

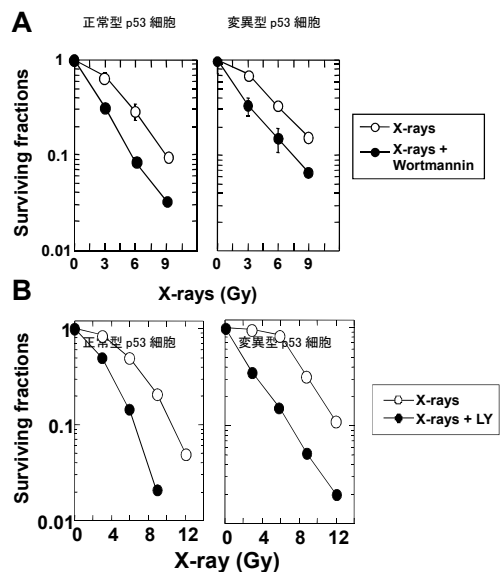


図 2. AKT 阻害剤、Wortmannin (A)、LY294002 (B) による放射線増感効果。放射線増感が SAS 細胞 (A) および H1299 細胞 (B) の正常型 *p53* 細胞、変異型 *p53* 細胞で *p53* 非依存的に見られる。

(3) 以上の結果から、*NBS1*-siRNA/*XIAP*-siRNA による変異型 *p53* 細胞優位な放射線増感の一因として、*p53* と AKT 間のタンパク質結合が示唆された。

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 24 件)

- ① Okamoto N, Takahashi A, Ota I, Ohnishi K, Mori E, Kondo N, Noda T, Nakagawa Y, Uemura H, Yane K, Hosoi H, Ohnishi T.: siRNA Targeted for NBS1 enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *International Journal of Hyperthermia*, 査読有, in press.
- ② Fujita Y, Yamamoto N, Kato I, Iwai S, Ono K, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y.: Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy. *International Journal of Radiation Biology*. 査読有, 87, 293-301, 2011.
- ③ Noda T, Takahashi A, Kondo N, Mori E, Okamoto N, Nakagawa Y, Ohnishi K, Zdzienicka, MZ, Thompson LH, Helleday T, Asada H, Ohnishi T.: Repair pathways independent of the Fanconi anemia nuclear core complex play a predominant role in mitigating formaldehyde-induced DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 404, 206-210, 2011.
- ④ Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, Taniguchi S.: Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status. *International Journal of Oncology*. 査読有, 37, 1001-1010, 2010.
- ⑤ Kondo N, Takahashi A, Mori E, Noda T, Su X, Ohnishi K, McKinnon P, Sakaki T, Nakase H, Ono K, Ohnishi T.: DNA ligase IV is a potential molecular target in ACNU sensitivity. *Cancer Sci*. 査読有, 101, 1881-1885, 2010.
- ⑥ Takahashi A, Mori E, Su X, Nakagawa Y, Okamoto N, Uemura H, Kondo N, Noda T, Toki A, Ejima Y, Chen JD, Ohnishi K, Ohnishi T.: ATM is the predominant kinase involved in the phosphorylation of histone H2AX after heating. *J Radiat Res (Tokyo)*. 査読有, 51, 417-422, 2010.
- ⑦ Su X, Takahashi A, Guo G, Mori E, Okamoto N, Ohnishi K, Iwasaki T, Ohnishi T.: Biphasic effects of nitric oxide radicals on radiation-induced lethality and chromosome aberrations in human lung cancer cells carrying different p53 gene status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 査読有, 77, 559-565, 2010.
- ⑧ Masunaga S, Tano K, Nakamura J, Watanabe M, Kashino G, Takahashi A, Tanaka H, Suzuki M, Ohnishi K, Kinashi Y, Liu Y, Ohnishi T, Ono K. Usefulness of hexamethylenetetramine as an adjuvant to radiation and cisplatin in the treatment of solid tumors: its independency of p53 status. *J Radiat Res*, 査読有, 51, 27-35, 2010.
- ⑨ Takahashi A, Ohnishi K, Kondo K, Mori E, Noda T, Ohnishi T.: Effective new cancer therapies which are independent of p53 gene status. *J Nara Med Assoc*, 査読有, 61, 19-33, 2010.
- ⑩ Horike N, Kumagai A, Shimono Y, Onishi T, Itoh Y, Sasaki T, Kitagawa K, Hatano O, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano KI, Nagaoka Y, Kawahara H, Takemori H. Downregulation of SIK2 expression promotes the melanogenic program in mice. *Pigment Cell Melanoma Res*, 査読有, 23: 809-819, 2010.
- ⑪ Sasaki T, Takemori H, Yagita Y, Terasaki Y, Uebi T, Horike N, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano K, Hatano O, Oyama N, Sugiyama Y, Sakoda S, Kitagawa K. SIK2 is a new key regulator for neuronal survival after ischemia *via* TORC1-CREB. *Neuron*, 査読有, in press, 2010.
- ⑫ Fujita Y, Kato I, Iwai S, Ono K, Suzuki M, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y, Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol*, 査読有, 4, No.63, 2009.電子ジャーナル
- ⑬ Kondo N, Takahashi A, Mori E, Ohnishi K, McKinnon PJ, Sakaki T, Nakase H, Ohnishi T, DNA ligase IV as a new molecular target for temozolomide, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 387, 656-660, 2009.
- ⑭ Oyama T, Kagawa N, Sugio K, Uramoto H, Hatano O, Harada N, Kaneko K, Kawamoto T, Yasumoto K. Expression of aromatase CYP19 and its relationship with parameters in NSCLC. *Front Biosci*, 査読有, 14: 2285-2292, 2009.
- ⑮ Nakakura T, Sato M, Suzuki M, Hatano O, Takemori H, Taniguchi Y, Minoshima Y, Tanaka S. The spatial and temporal expression of delta-like protein 1 in the rat pituitary gland during development. *Histochem Cell Biol*, 査読有, 131:141-153, 2009.
- ⑯ Takahashi A, Yamakawa N, Kirita T, Omori K, Ishioka N, Furusawa Y, Mori E, Ohnishi K, Ohnishi T, DNA damage recognition proteins localize along heavy ion induced

- tracks in the cell nucleus, *J Radiat Res*, 査読有, 49, 645-652, 2008.
- ① Kajihara A, Takahashi A, Ohnishi K, Imai Y, Yamakawa N, Yasumoto J, Ohnishi T, Kirita T, Protein microarray analysis of apoptosis-related protein expression following heat shock in human tongue squamous cell carcinomas containing different p53 phenotypes, *Int J Hyperthermia*, 査読有, 24, 605-612, 2008.
- ①⑧ Takahashi A, Mori E, Somakos GI, Ohnishi K, Ohnishi T, Heat induces  $\gamma$ H2AX foci formation in mammalian cells, *Mutat Res/Genet Toxicol and Environ Mutagen*, 査読有, 656, 88-92, 2008.
- ①⑨ Ohnishi K, Nagata Y, Takahashi A, Taniguchi S, Ohnishi T, Effective enhancement of X-ray-induced apoptosis in human cancer cells with mutated p53 by siRNA targeting XIAP, *Oncol Rep*, 査読有, 20, 57-61, 2008.
- ②⑩ Yamakawa N, Takahashi A, Mori E, Imai Y, Furusawa Y, Ohnishi K, Kirita T, Ohnishi T, High LET radiation enhances apoptosis in mutated p53 cancer cells through Caspase-9 activation, *Cancer Sci*, 査読有, 99, 1455-1460, 2008.
- 21 Takahashi A, Yamakawa N, Mori E, Ohnishi K, Yokota S, Sugo N, Aratani Y, Koyama H, Ohnishi T, Development of thermotolerance requires interaction between polymerase-beta and heat shock proteins, *Cancer Sci*, 査読有, 99, 973-978, 2008.
- 22 Mori E, Takahashi A, Kitagawa K, Kakei S, Tsujinaka D, Unno M, Nishikawa S, Ohnishi K, Hatoko M, Murata N, Watanabe M, Furusawa Y, Ohnishi T, Time course and spacial distribution of UV effects on human skin in organ culture, *J Radiat Res*, 査読有, 49, 269-277, 2008.
- 23 Ohnishi T, Takahashi A, Mori E, Ohnishi K, p53 targeting can enhance cancer therapy via radiation, heat and anti-cancer agents, *Anticancer Agents Med Chem*, 査読有, 8, 564-570, 2008
- 24 Nakayama H, Hamada M, Fujikake N, Nagai Y, Zhao J, Hatano O, Shimoke K, Isosaki M, Yoshizumi M, Ikeuchi T. ER stress is the initial response to polyglutamine toxicity in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 377: 550-555, 2008.
- [学会発表] (計 36 件)
- ① 大西健, 放射線増感作用を示す植物生理活性物質、特にフラボノイドの分子標的放射線増感剤としての有用性. 第13回癌治療増感研究シンポジウム. 2011, 奈良
- ② 瀬川達矢, Hsp90阻害剤Celastrolのヒト腫瘍細胞の放射線増感. 第13回癌治療増感研究シンポジウム. 2011, 奈良
- ③ 近藤夏子, DNA修復を標的としたアルキル化剤の増感効果. 第12回癌治療増感研究シンポジウム. 2010, 奈良.
- ④ 岡本倫朋, ヒト甲状腺未分化がん細胞におけるDNA修復遺伝子NBS1を標的としたsiRNAによる温熱増感効果(第2報) - NBS1siRNAとDSBの指標である $\gamma$ H2AXとの関連について-. 第12回癌治療増感研究シンポジウム. 2010, 奈良.
- ⑤ Su X, Cell cycle effects on radioadaptation or radioenhancement of cell survival and chromosomal aberrations choreographed by NO radicals. 12<sup>th</sup> Symposium on Sensitization of Cancer Treatment in Nara. 2010, Nara.
- ⑥ Noritomo Okamoto, siRNA targeted for NBS1 enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. The 5<sup>th</sup> Asian Congress of Hyperthermic Oncology (ACHO) & The 27<sup>th</sup> Japanese Congress of Thermal Medicine (JCTM). 2010, Fukuoka.
- ⑦ 野田太一, ホルムアルデヒド誘導DNA損傷はFANCD1, D<sup>2</sup>とGを介したHRによって修復される. 第69回日本癌学会学術総会. 2010, 大阪.
- ⑧ 岡本倫朋, ヒト甲状腺未分化がんにおけるNBS1標的siRNAの温熱増感効果. 第69回日本癌学会学術総会. 2010, 大阪.
- ⑨ 大西健, 抗がん作用を持つフラボノイド類のスクリーニング. 日本放射線影響学会第53回大会. 2010, 京都.
- ⑩ Su X, NO radicals choreograph p53-different radio-sensitivity in human lung cancer cells. 2nd Asian Congr Radiat Res. 2009, Seoul, Korea.
- ⑪ Kajihara A, Protein microarray analysis of apoptosis-related protein expression following heat shock in human tongue squamous cell carcinomas containing different p53 phenotypes. 2nd Asian Congr Radiat Res. 2009, Seoul, Korea.
- ⑫ Kondo N, The therapeutic target of DNA repair pathways against alkylating agents. 2nd Asian Congr Radiat Res. 2009, Seoul, Korea.
- ⑬ Nagata Y, Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity in lung cancer cells bearing different p53 gene status. 2nd Asian Congr Radiat Res. 2009, Seoul, Korea.
- ⑭ Noda T, Formaldehyde-induced DNA damage and its repair. 2nd Asian Congr Radiat Res. 2009, Seoul, Korea.

- ⑮ Ota I, Rapamycin inhibits proliferation and enhances cisplatin-induced apoptosis in human head and neck cancer cells. 2nd Asian Congr Radiat Res. 2009, Seoul, Korea.
- ⑯ 高橋昭久, がん細胞の生と死の制御. 日本放射線影響学会第 52 回大会. 2009, 広島.
- ⑰ 近藤夏子, Fanconi anemia 経路を標的としたアルキル化剤の増感効果. 日本放射線影響学会第 52 回大会. 2009, 広島.
- ⑱ Takahashi A, ATM dominantly phosphorylate histone H2AX after heat treatment. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009, 横浜
- ⑲ Kondo N, Identification of a new molecular target of alkylating agents, TMZ and fotemustine. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009, 横浜
- ⑳ 高橋昭久, あらかじめの温熱前処理による放射線および温熱抵抗性の獲得. 第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会. 2009, 富山
- 21 Su X, Biphasic effects of NO radicals on radiation-induced cell lethality and chromosome aberrations in H1299/wtp53 cells. 第 15 回癌治療増感研究会. 2009, 京都
- 22 近藤夏子, DNA 二本鎖切断修復を標的としてアルキル化剤 TMZ の増感効果. 第 15 回癌治療増感研究会. 2009, 京都
- 23 長田陽子, p53 遺伝子型の異なる肺がん細胞における Akt/mTOR シグナル抑制による増殖抑制効果. 第 15 回癌治療増感研究会. 2009, 京都
- 24 大西健, 分子シャペロン p53C 末端ペプチドと放射線併用による変異型 p53 腫瘍の増殖遅延. 日本放射線影響学会第 51 回大会. 2008, 北九州市
- 25 高橋昭久, 哺乳細胞における温熱誘導  $\gamma$ H2AX フォーカス形成. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008, 名古屋.
- 26 高橋昭久, 哺乳細胞における温熱誘導  $\gamma$ H2AX フォーカス形成. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008, 名古屋市
- 27 高橋昭久, 温熱によるヒストン H2AX リン酸化機構の解明. 日本ハイパーサーミア学会第 25 回大会. 2008, 名古屋市
- 28 大西健, 界面活性剤 Tween80 と温熱の併用処理による細胞増殖抑制のメカニズム. 第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会. 2008, 高知市
- 29 高橋昭久, 低線量放射線前照射による温熱抵抗性の獲得. 第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会. 2008, 高知市
- 30 大西健, p53C 末端ペプチドと放射線併用による変異型 p53 保有移植腫瘍の増殖抑制. 第 14 回癌治療増感研究会. 2008, 鈴鹿市
- 31 Ohnishi K, Tween80 enhances heat-induced arrest of cell proliferation through regulating Akt and NBS1 signaling pathways. 10th Int Congr Hyperthermic Oncol. 2008, Munich, Germany.
- 32 Takahashi A, The study of target genes deciding heat-sensitivity. 10<sup>th</sup> International Congress on Hyperthermic Oncology. 2008, Munich, Germany
- 33 Ohnishi T, Localization of DSB-recognizing proteins in the nucleus after heat treatment. 10<sup>th</sup> International Congress on Hyperthermic Oncology. 2008, Munich, Germany
- 34 Ohnishi K, Tween80 enhances heat-induced arrest of cell proliferation through regulating AKT and NBS1 signaling pathways. 10<sup>th</sup> International Congress on Hyperthermic Oncology. 2008, Munich, Germany
- 35 Mori E, Development of thermotolerance requires interaction between polymerase  $\beta$  and heat shock proteins. 10<sup>th</sup> International Congress on Hyperthermic Oncology. 2008, Munich, Germany
- 36 Ohnishi T, Molecular chaperon therapy against human cancer cells. 4th Int Congr Stress Resp Biol Med. 2008.

〔図書〕(計 2 件)

- ① 大西健, 分著, 毎日健康サロン、がん温熱療法ガイドブック、2008、pp.130-131.
- ② 大西健, 分著, 診断と治療社、がんの温熱免疫療法、2008、pp.6-9.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 健 (OHNISHI KEN)

研究者番号 : 50152195

(2) 研究分担者

秦野 修 (HATANO OSAMU)

研究者番号 : 40164850