

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390229

研究課題名（和文）癌治療のための放射線、温熱および超音波による細胞死の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Molecular Mechanism of Cell Death induced by Radiation, Hyperthermia and Ultrasound for Cancer Therapy

研究代表者

近藤 隆（KONDO TAKASHI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授

研究者番号：40143937

研究成果の概要（和文）：

細胞死に関する放射線、温熱および超音波の分子応答機構解明を検討した。HeLa 細胞における TAK1 の安定的ノックダウンは、放射線によるコロニー形成能の低下とアポトーシスの割合も増加させた。同細胞で DNA-PK を阻害は温熱アポトーシスを増強し、これに関係する遺伝子として NR1D1 を同定した。さらに NR1D1 ノックダウンと温熱を併用すると、アポトーシスの増強効果が得られた。超音波による細胞死については、DNA-PK/Akt 経路が優位に働いて調節していることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Molecular mechanism of cell death induced by ionizing radiation, heat or ultrasound was examined. Stable knockdown of TAK1 caused increase in subG1 fraction and apoptosis induced by X-rays in HeLa cells. Inhibition of DNA-PK increased heat-induced apoptosis in HeLa cells and the knockdown of an identified gene, NR1D1, also enhanced apoptosis. For the cell death induced by ultrasound, cell death signal is modulated by the balance between p53 and Akt via ATM and DNA-PK and the pathway of DNA-PK/Akt is predominant in sonicated cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	10,200,000	3,060,000	13,260,000

研究分野：放射線治療生物学

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：放射線腫瘍学、超音波治療学、温熱治療学

1. 研究開始当初の背景

超音波はその利用技術が進み、現代医療において診断領域のみならずがん治療や骨折治療など、治療にも用いられるようになってき

た。当初、細胞に対しては Lysis（溶解）を起こすだけと思われていた超音波も細胞内の遺伝子発現を変化させ、アポトーシスやオートファジーを誘導することも報告される

ようになってきた。また、最近では、放射線と同様に DNA 二本鎖切断が起こることが判明した。これらの知見は放射線や温熱と同様の生物学的効果である。放射線や温熱は癌治療に用いられており、その生体作用は異なる。一方、細胞の損傷応答は共通性があるものの、詳細な機構は依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

細胞死に関する放射線、温熱および超音波の分子応答機構解明を目的とする。当研究室では放射線、温熱、および超音波誘発アポトーシスについて細胞内活性酸素が、その増感と防護に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかし、その制御機構、特に分子間の相互関係について、体系的に十分解明されたとはいえない。ここに用いた 3 因子の作用機構は本質的に異なるが、DNA 二本鎖切断の生成やアポトーシス実行過程は共通している。問題は上流の細胞内情報伝達にある。本研究では放射線、温熱、および超音波によるアポトーシス(細胞死)の分子機構と関連する遺伝子の相互作用について網羅的遺伝子発現ネットワーク解析法により、特に細胞内酸化ストレスによる制御に注目して比較検討する。

3. 研究の方法

実験にはヒトリンパ腫細胞株 U937、子宮癌由来の HeLa 細胞を用いた。細胞死はコロニー形成法により検討を行った。アポトーシスをカスパーゼ 3 の切断と SubG1 期の細胞の割合を指標として定量した。細胞周期の変化はフローサイトメトリーにて検討した。また遺伝子発現変化を GeneChip を用いたマイクロアレイにて解析した。

4. 研究成果

(1) TAK1 による放射線誘発細胞周期停止と細胞生存の促進

Transforming growth factor beta 1 activated kinase 1 (TAK1) は、NF- κ B, p38 MAPK, JNK などのリン酸化に関与し、種々のストレスに対して細胞保護的な役割を果たすことが知られている。しかしながら、放射線照射下における TAK1 の役割については不明な点が多い。そこで我々は、TAK1 を安定的に発現抑制した HeLa 細胞を用いて、放射線感受性および遺伝子発現変化について検討を行った。TAK1 の安定的ノックダウン(KD)は、放射線によるコロニー形成能の低下とカスパーゼ 3 の切断を促進し、SubG1 期の細胞の割合も増加させた。また TAK1 KD により放射線により誘発される細胞周期の停止が部分的に抑制されたことから、放射線感受性増加の一因として TAK1 KD によるチェックポイント機構の抑制が考えられる。一方で TAK1 の下流分子とされる NF- κ B, p38 MAPK, ERK リン酸化の誘導に関しては、TAK1 KD による抑制は認められず、TAK1 KD による放射線感受性の増加は他の標的分子が役割を担っていると考えられる。GeneChip による網羅的遺伝子解析手法により、TAK1 KD 細胞と対照細胞において、放射線照射による細胞周期関連遺伝子の発現変化に差が認められた。バイオフィオマテイクスツールを用いてネットワーク解析を試みたところ、CDKN1A (p21) を中心とした遺伝子ネットワークが対照細胞で同定された一方、TAK1 KD 細胞ではネットワークが断片的であった。実際に対照細胞において、p21 の発現を siRNA により抑制したところ、放射線による細胞周期の停止を抑制し、SubG1 期の細胞の割合を増加させた。以上より、TAK1 は NF- κ B、p38 MAPK、ERK のリン酸化状態にかかわらず、p21 の転写を介して、放射線誘発細胞死に対して防御的に働

いているものと推測される。

(2) 温熱による DNA 損傷とアポトーシス

温熱による p53 を介したアポトーシス調節機構は古くから研究されている。温熱に対する感受性における ATM の関与は種間で差があるものと思われる。DNA-PK に関しては、その構成因子である Ku サブユニットが特に熱感受性であり、温熱処理後は一過的に機能が抑制され、その後経過時間依存的にリン酸化能が回復することが知られている。マウスの DNA-PKcs/Ku 欠損株では温熱感受性が増加することが報告されており、そのメカニズムとして DNA-PK を介した転写因子 HSF1 の活性調節が示されている。しかし、ヒト細胞においても DNA-PK が HSF1 の活性化に寄与するかについては疑問であった。そこで DNA-PK が温熱誘発細胞死をヒト細胞株でも調節しているかどうか検証した。HeLa 細胞に、DNA-PK 特異的阻害剤である Nu7026 および Nu7441 を前処理し、44°C で 60 分間温熱処理した。処理後 24 時間時点で、薬剤併用群におけるクロマチン凝縮の割合の増加と切断型カスパーゼ 3 発現の増加が認められた。DNA-PKcs を標的とした siRNA (siDNA-PKcs) を導入した HeLa 細胞でも同様の現象が認められたが、一方で HSF1 下流である HSP70 および HSP40 タンパク発現の減少は認められなかった。siRNA 導入後、温熱処理した HeLa 細胞における遺伝子発現データを取得したが、HSP70 をコードする HSPA1A/HSPA6、HSP40 をコードする DNAJB1、HSP27 をコードする HSPB1 遺伝子の mRNA 発現量に関しては、いずれも DNA-PKcs ノックダウン細胞で抑制が認められなかった。このことから、DNA-PK を介した HSF1 の調節はげっ歯類細胞のみに見られる現象であり、ヒト細胞では別の細胞死調節機構が存在すると考えられた。そこで、コントロール

siRNA および siDNA-PKcs を導入した両細胞間において、温熱処理 6 時間後に発現変化する遺伝子を網羅的に同定し、パスウェイ解析により遺伝子ネットワークを形成した。その結果 NR1D1 や BIRC3 を含む、アポトーシス抑制に関連する遺伝子のネットワークを同定した。これらの遺伝子は、コントロール siRNA 導入細胞では温熱処理により発現上昇していたが、siDNA-PKcs 導入細胞では発現上昇がなかったことから、DNA-PKcs の下流として発現調節を受けている可能性が高いと思われる。実際にこの分子群がアポトーシスの抑制に寄与しているかを検討するために、ネットワーク内に含まれる NR1D1 と BIRC3 についてノックダウンを試みたところ、温熱処理条件下でアポトーシスの増強を認めた。

(3) 温熱による細胞周期チェックポイントの活性化

温熱が ATM や Chk2 を活性化する事はこれまでに報告されているが、ATR-Chk1 の活性化や、それらの G2/M arrest への関与はこれまで検討されていなかった。そこで我々はまず、ヒトリンパ腫細胞株 Jurkat を 44°C で 30 分処理後、ATR のリン酸化が起こるかどうかを検討した。興味深い事に、活性化の指標である ATR Ser428 部位のリン酸化は温熱処理直後から観察され、ATM Ser1981 部位のリン酸化よりも早く起きていることがわかった。下流のエフェクター分子である Chk1 や Chk2 についても同様に、Chk1 の Ser345 部位のリン酸化が温熱処理直後から起こる一方、Chk2 の Thr68 部位のリン酸化は温熱処理直後ではわずかであった。Chk1 リン酸化は Ku55933 処理でわずかに減少するが、シザンドリン B や CGK733 の前処理により大幅に減少することから、温熱による Chk1 リン酸化についても、ATM より ATR 依存的であることが明らかとなった。温

熱処理 12 時間後では、G2 期の細胞の割合は未処理の細胞と比較して約 10%増加していたが、Chk1 阻害剤 SB218078 前処理や Chk1 を標的とした siRNA の導入によって、未処理の細胞とほぼ同程度となった。一方、Chk1 を抑制した細胞群では SubG1 期の細胞の割合が増加していたことから、チェックポイント機構の破綻により細胞死が誘発されたと考えられる。この現象は HeLa 細胞や前立腺癌細胞株 PC3、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 でも同様に認められた。このことから、ATR-Chk1 経路が、温熱処理した細胞において、G2/M 期での細胞周期停止と細胞生存の促進に関与していることが明らかとなった。これまで温熱領域では、ATM に着目した研究がなされてきており、我々も ATM 阻害剤による Chk1 のリン酸化の減少や、Annexin V 陽性アポトーシス細胞の割合の増加を確認している。しかし、温熱処理した細胞では、ATR の活性化は ATM よりも早期に観察される。また ATR を阻害した場合には、Chk1 のリン酸化が ATM を阻害した場合よりも抑制されることに加え、Annexin V 陽性細胞の割合の増加も見られることから、温熱誘発細胞死の制御には ATR が重要な役割を担っていると考えられる。

(4) 超音波による DNA 二本鎖切断の誘発と細胞死の関係

超音波における DNA 損傷に関連するアポトーシス調節機構についての検討は殆どない。そこで p53 を欠失する U937 細胞、野生型 p53 を有する Molt-4 細胞 (Molt-4/V)、p53 を安定的に KD した Molt-4 細胞 (Molt-4/shp53) を用いて、ATM や DNA-PK が超音波誘発アポトーシスを調節しているか検討した。U937 細胞に超音波を照射した場合に、X 線照射と同様、Akt の Ser473 部位がリン酸化されることが判明した。一方 Molt-4/V

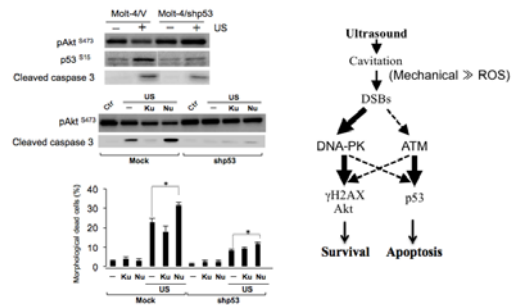


図 1. 超音波による DNA 損傷により活性化される細胞死のシグナル伝達。

(左上)超音波照射後 1 時間時点における Akt のリン酸と、6 時間における p53 のリン酸化。

(左中・下) Ku55933 および Nu7026 が、超音波照射した細胞の Akt リン酸化と細胞死に及ぼす影響。(右) 超音波による DNA 損傷を介したアポトーシス調節シグナル。超音波による二本鎖切断の特徴として、DNA-PK が ATM よりも強く活性化される結果、Akt による細胞生存シグナルが優位となる。

細胞に照射した場合には、照射後一過的にリン酸化の減少が見られたが、Molt-4/shp53 細胞では照射 1 時間で増加していることから、既報の p53 を介した Akt リン酸化抑制機構が同様に働いていると思われる。Nu7026 により DNA-PK を抑制した時、いずれの細胞においても Akt のリン酸化レベルが低下し、切断型カスパーゼ 3 の増加、断片化 DNA の増加、および SubG1 期の割合の増加が認められた。DNA-PK に対する siRNA の導入によっても同様の減少が認められたことから、超音波により活性化した DNA-PK は、p53 の有無にかかわらず、Akt をリン酸化することで細胞死を負に調節していると考えられる。超音波照射した Molt-4/V 細胞において、DNA-PK の p53 リン酸化能は低く、照射 6 時間時点において Nu7026 による抑制は認められなかった。一方、Ku55933 処理により照射後いずれの時点にお

いても p53 のリン酸化が抑制された。しかし Ku55933 前処理による切断型カスパーゼ 3 の低下はあったが、Akt のリン酸化レベルも同時に低下しており、死細胞の数に関しては減少傾向で有意差は見られなかった。以上より、ATM と DNA-PK を介した p53 と Akt の活性化のバランスによって、超音波による細胞死誘導のシグナルが調節されているが、超音波照射した細胞では DNA-PK/Akt 経路がより優位に働いていると考えられる (図 1)。

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 13 件)

- ① Morii A, Ogawa R, Watanabe A, Cui Z-G, Takasaki I, Doi T, Kondo T, Fuse H: Utilization of microRNAs whose expression levels decrease in response to X-ray irradiation for fine-tuning radiation-controlled gene regulation. *Int J Mol Med* (in press)(doi: 10.3892/ijmm.2013.1360) 査読有
- ② Okazawa S, Furusawa Y, Kariya A, Hassan MA, Arai M, Hayashi R, Tabuchi Y, Kondo T, Tobe K: Inactivation of DNA-dependent protein kinase promotes heat-induced apoptosis independently of heat-shock protein induction in human cancer cell lines. *PLoS One* 8(3): e58325, 2013. (doi:10.1371/journal.pone.0058325) 査読有
- ③ Yunoki T, Kariya A, Kondo T, Hayashi A, and Tabuchi Y: The combination of silencing BAG3 and inhibition of the JNK pathway enhances hyperthermia sensitivity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett*(in press)(doi:10.1016/j.canlet.2013.01.049) 査読有
- ④ Furusawa Y, Wei ZL, Sakurai H, Tabuchi Y, Li P, Zhao Q-L, Zhao, Nomura T, Saiki I, and Kondo T: TGF-beta-activated kinase 1 promotes cell cycle arrest and cell survival of X-ray-irradiated HeLa cells dependent on p21 induction but independent of NF-kB, p38 MAPK and ERK phosphorylations. *Radiat Res* 177: 766-774, 2012 (doi:10.1667/RR2792.1) 査読有
- ⑤ Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, Zhao Q-L, Tabuchi Y, Nomura T, and Kondo T: Inhibition of checkpoint kinase 1 abrogates G2/M checkpoint activation and promotes apoptosis under heat stress. *Apoptosis* 17: 102-112, 2012 (doi: 10.1007/s10495-011-0660-7) 査読有
- ⑥ Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui ZG, Kagiya G, Kondo T, Doi N, and Feril LB Jr: Regulation of gene expression in human prostate cancer cells with artificially constructed promoters that are activated in response to ultrasound stimulation. *Ultrason Sonochem* 20: 460-467, 2013 (doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.05.007) 査読有
- ⑦ Hosoki A., Yonekura S.-I., Zhao Q.-L., Wei Z.-L., Takasaki I., Tabuchi Y., Wang L.-L., Hasuike S., Nomura T., Tchibana A., Hashiguchi K., Yonei S., Kondo T., and Zhang-Akiyama Q.-M.: Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells. *J Radiat Res.* 53: 58-71, 2012 (doi: 10.1269/jrr.11034) 査読有
- ⑧ Furusawa Y, Fujiwara Y, Campbell P, Zhao Q-L, Ogawa R, Hassan MA, Tabuchi Y, Takasaki I, Takahashi A, and Kondo T: DNA double-strand breaks induced by cavitation mechanical effects of ultrasound in cancer cell lines. *PLoS One* 7: e29012, 2012 (doi:10.1371/journal.pone.0029012) 査読有
- ⑨ Hassan MA, Furusawa Y, Minemura M, Rapoport N, Sugiyama T, and Kondo T: Ultrasound-induced new cellular mechanism involved in drug resistance. *PLoS One* 7: e48291, 2012 (doi: 10.1371/journal.pone.0048291) 査読有
- ⑩ Furusawa Y, Fujiwara Y, Hassan MA, Tabuchi Y, Morita A, Enomoto A, and Kondo T: Inhibition of

DNA-dependent protein kinase promotes ultrasound -induced cell death including apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Lett* 322: 107-112, 2012 (doi:10.1016/j.canlet.2012.02.020) 査読有

- ⑪ Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, Hassan MA, Tabuchi Y, Nomura T, and Kondo T: Ultrasound activates ataxia telangiectasia mutated- and Rad-3 related (ATR)-checkpoint kinase 1 (Chk1) pathway in human leukemia Jurkat cells. *Ultrason Sonochem* 19: 1246-1251, 2012 (doi:10.1016/j.ultsonch.2012.04.003) 査読有
- ⑫ Morii A, Ogawa R, Watanabe A, Kakutani S, Zhao Q-L, Kume K, Kondo T, and Fuse H.: Regulation of gene expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation. *Gene Ther.* 19: 219-227, 2012 (doi: 10.1038/gt.2011.89) 査読有
- ⑬ Hassan MA, Ahmed IS, Campbell P, Kondo T: Enhanced gene transfection using calcium phosphate co-precipitates and low-intensity pulsed ultrasound *Eur J Pharmaceut Sci* 47: 768-773, 2012 (doi:10.1016/j.ejps.2012.08.007) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kondo T, Hassan MA, Zhao QL, Ogawa R, Tabuchi Y, and Furusawa Y: Roles of intracellular oxidative stress in DNA Damage and apoptosis induced by different physical stressors; ionizing radiation, hyperthermia and ultrasound. 28th RBC-NIRS International Symposium, Radiation-associated Repair Proteins and DNA Repair Network 2012, 11, 29-30, Kyoto, Japan.
- ② Kondo T: Roles of intracellular oxidative stress in the enhancement of hyperthermia-induced apoptosis. (ASHO award Lecture). The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (ICHO) & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine, 2012, 8, 28-31, Kyoto,

Japan.

[図書] (計 2 件)

- ① Feril LB Jr., Tachibana K, Kondo T, and Campbell P: Chapter 12: Sonodynamic Therapy in Therapeutic Ultrasound: Mechanisms to Applications (Public Health in the 21st Century), Editor, Frenkel V. 279-295, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011.
- ② Furusawa Y, Fujiwara Y, Zhao Q-L, Hassan MA, Ogawa R, Tabuchi Y, Takasaki I, Takahashi A, Ohnishi T, and Kondo T: Ultrasound-induced DNA damage and signal transductions indicated by gamma H2AX. 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU2010) Editors, Matsumoto Y, Crum LA, and ter Haar GR, 322-325, AIP Conf Proc 1359, American Institute of Physics, New York, 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/radsci/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 隆 (KONDO TAKASHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授
研究者番号 : 40143937

(2) 研究分担者

田渕 圭章 (TABUCHI YOSHIAKI)
富山大学・生命科学先端研究センター・准教授
研究者番号 : 20322109

趙 慶利 (ZHAO QING-LI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教
研究者番号 : 90313593

高崎 一郎 (TAKASAKI ICHRO)
富山大学・生命科学先端研究センター・助教
研究者番号 : 00397176