

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659588

研究課題名(和文) ATM阻害による放射線抵抗性のG0期癌細胞・癌幹細胞の放射線増感法の開発

研究課題名(英文) Radiosensitization of radioresistant cancer stem cells by inhibition of ATM

研究代表者

細井 義夫 (HOSOI, Yoshio)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50238747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：MOLT-4は50 μ M以上の濃度でアポトーシスの誘導が起こり、200 μ M以上で致死率はほぼ一定となった。さらに、ATM、Chk2は50 μ M以上のH₂O₂で活性化し、p53と H2AXは100 μ M以上のH₂O₂で活性化した。ATMは主に核、ミトコンドリア、peroxisomeに存在し、50 μ MのH₂O₂ではミトコンドリアに存在するATMのみ活性化し、Chk2が活性化した。また、放射線照射した場合には、ミトコンドリアと核に存在するATMが活性化し、Chk2、H2AX、p53が活性化した。これらの研究成果は2014年にBBRC誌で公表した(433: 1286-1290)。

研究成果の概要(英文)：We report herein that ATM can be activated when exposed to hydrogen peroxide without inducing nuclear DDR in Hep G2 cells, and the oxidized cells could be subjected to subcellular fractionation. The first detergent-based fractionation experiment revealed that active, phosphorylated ATM was located in the second fraction, which also contained both mitochondria and peroxisomes. An alternative fractionation method involving homogenization and differential centrifugation, which permits the light membrane fraction containing peroxisomes to be produced, but not mitochondria, revealed that the light membrane fraction contained only traces of ATM. In contrast, the heavy membrane fraction, which mainly contained mitochondrial components, was enriched in ATM and active ATM, suggesting that the oxidative activation of ATM occurs in mitochondria and not in peroxisomes. In Rho 0-Hep G2 cells, which lack mitochondrial DNA and functional mitochondria, ATM failed to respond to hydrogen peroxide.

研究分野：放射線科学

科研費の分科・細目：放射線生物

キーワード：放射線

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞はニッチと呼ばれる幹細胞を維持するための特殊な微小環境に存在する。癌幹細胞はニッチ内で細胞周期上 G₀ 期に位置し、低活性酸素状態にある点でも正常組織における幹細胞と共通の性質を有する。癌幹細胞は放射線治療と化学療法に対して抵抗性を示すがその機序は明らかでない。

(2) 毛細血管拡張運動失調症 (ataxia telangiectasia: AT) は、放射線高感受性と細胞周期チェックポイント異常を示す遺伝病である。AT の原因遺伝子 ATM のノックアウト (ATM(-/-)) マウスでは、様々な組織で活性酸素が上昇していることと、骨髄における造血幹細胞が機能不全/枯渇状態にあることが報告されている (Ito et al, Nature 431:997-1002, 2004)。

(3) ATM(-/-) マウスでの造血幹細胞異常は抗酸化剤の投与により消失することと ATM(-/-) 細胞は活性酸素に対して高感受性であることから、ATM が抗酸化作用発現に重要な働きをしていると考えられる。

(4) AT 患者で認められる小脳性運動失調や毛細血管拡張は酸化ストレスで起こりうるということが報告されている。近年、G₀ 期維持に作用する Myc と p27 に ATM が作用して G₀ 維持に関与している可能性が指摘されている (Maclean et al, Mol Cancer Res 5:705-711, 2007)。

(5) 以上のことから、ATM は抗酸化能亢進と G₀ 期維持を介して幹細胞維持に関与し、さらに抗酸化能亢進が癌幹細胞の放射線抵抗性の原因となっている可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 放射線高感受性と細胞周期チェックポイント異常を示す遺伝病 AT の原因遺伝子 ATM のノックアウトマウスにおいて骨髄等の幹細胞枯渇と活性酸素上昇が報告されていることから、ATM が幹細胞の G₀ 期での細胞周期停止と低活性酸素状態の維持に寄与していると考えられる。

(2) 本研究では、ATM がそれらに関与する情報伝達経路を明らかにし、ATM 阻害またはその情報伝達経路阻害による放射線抵抗性な G₀ 期癌細胞・癌幹細胞に対する放射線増感法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ATM を直接活性化することが報告されている活性酸素種である H₂O₂ を用いて実験を行った。

(2) 細胞としては、放射線や活性酸素に対して感受性が高く、アポトーシスを起こしやすい

いために細胞の生死を迅速に定量できる MOLT-4 及び HepG2 細胞を用いて実験を行った。

(3) H₂O₂ は 30 分間処理し、放射線に関しては 2 Gy 照射し、30 分培養した後に実験に用いた。

(4) ATM の基質である Chk2、H2AX のリン酸化をウエスタンブロットで調べることと、ATM の 1981 番目セリンのリン酸化を調べることで ATM の活性化を評価した。

(5) ATM キナーゼ活性阻害剤である KU55933 (20 μM) は放射線照射又は H₂O₂ 処理の 30 分前に培地中に加えた。

(6) detergent を用いて 1~3 フラクシオンの 3 つ細胞分画に分けた。

(7) ミトコンドリアのマーカーとして、COX、HSP60、VDAC1 を用いた。核のマーカーとして H2AX、ペルオキシソームのマーカーとして catalase、細胞質のマーカーとして Apaf-1 を用いた。

4. 研究成果

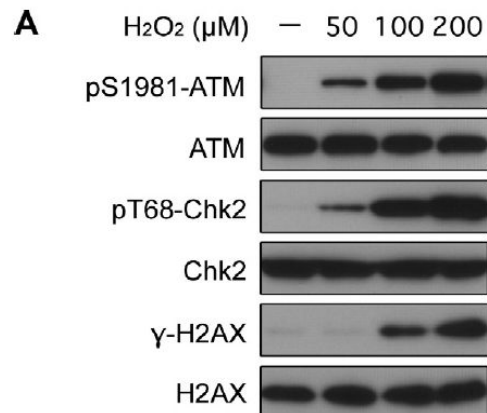
(1) MOLT-4 は 50 μM 以上の濃度でアポトーシスの誘導が起こり、200 μM 以上で致死率はほぼ一定となった。

(2) ATM、Chk2 は 50 μM 以上の H₂O₂ で活性化し、p53 と H2AX は 100 μM 以上の H₂O₂ で活性化した。(図 1)

(3) ATM は主に核、ミトコンドリア・peroxisome に存在し、50 μM の H₂O₂ ではミトコンドリアに存在する ATM のみ活性化し、Chk2 が活性化した。(図 2 - 4)

(4) 放射線照射した場合には、ミトコンドリアと核に存在する ATM が活性化し、Chk2、H2AX、p53 が活性化した。(図 1 - 2)

(5) 以上のことから、ミトコンドリアに存在する ATM は核に存在する ATM とは別の機能を担っている可能性が示唆された。



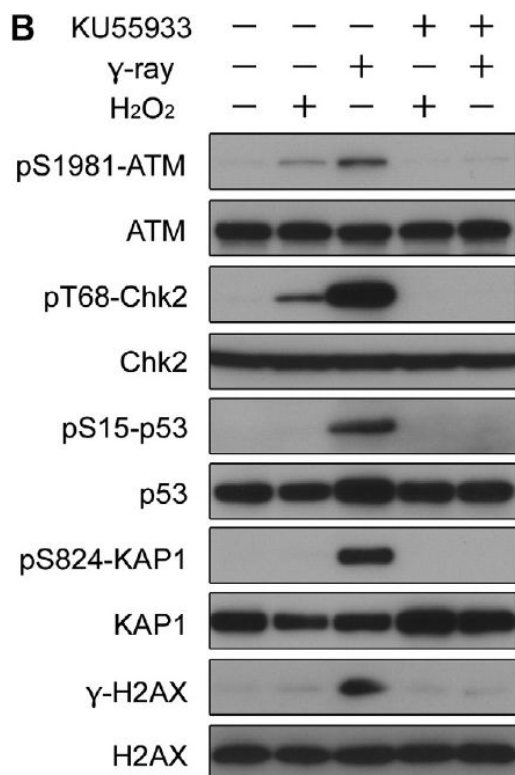


図1 DNA損傷によらない活性酸素によるATMの活性化。(A) ATMとATMの基質であるChk2、H2AXのリン酸化。HepG2細胞は図中に示された濃度のH₂O₂で30分間処理した。(B) 50 μMのH₂O₂がATM, その基質に及ぼす影響。HepG2細胞を50 μMのH₂O₂で30分間処理した。照射実験では2 Gy照射後30分間培養した後に実験に用いた。ATMキナーゼ活性阻害剤であるKU55933 (20 μM)は放射線照射又はH₂O₂処理の30分前に培地中に加えた。

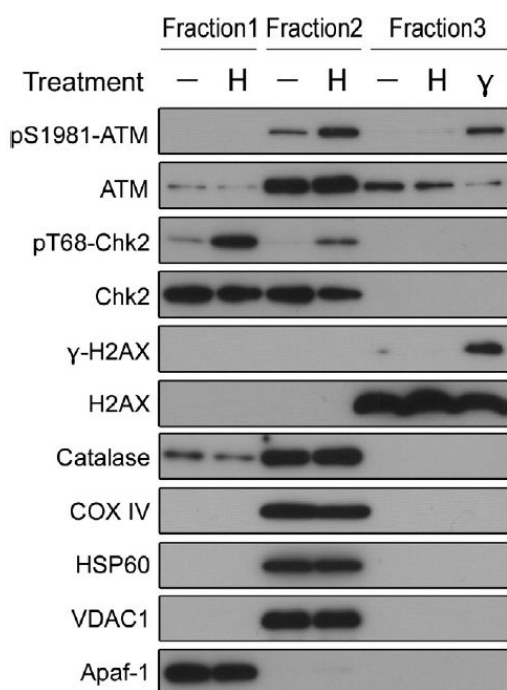


図2 detergentを利用した細胞分画の分離とATM. HepG2細胞を50 μMのH₂O₂で30分処理した後、又は2 Gy照射して30分培養した後に、細胞を1~3のフラクションに分け、ウエスタンブロットに用いた。ミトコンドリアのマーカースとして、COX、HSP60、VDAC1を用いた。核のマーカースとしてH2AX、ペルオキシソームのマーカースとしてcatalase、細胞質のマーカースとしてApaf-1を用いた。フラクション1は主に細胞質分画で、フラクション2は主にミトコンドリアとペルオキシソームの分画で、フラクション3は主に核の分画である。

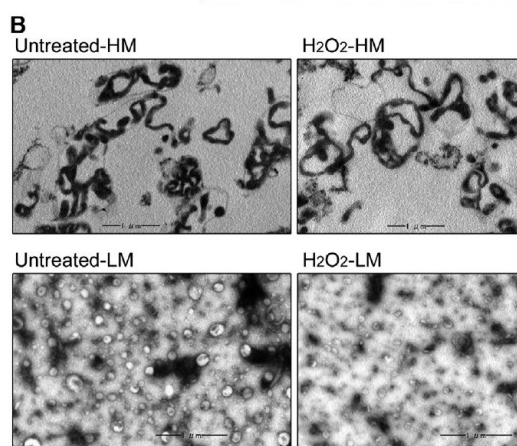
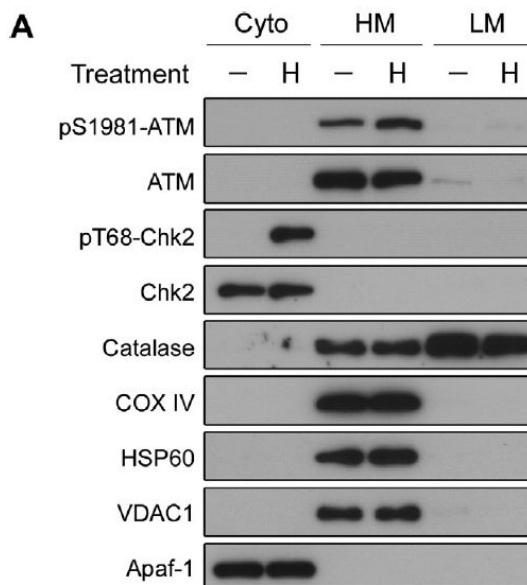


図3 homogenizeとdifferential centrifugationによって分離されたlight membrane fraction分画の分離。light membrane fraction分画にはperoxisomeを含むがATMと活性化ATMはごく少量しか含まれない。(A) HepG2細胞を50 μMのH₂O₂で30分間処理し実験に用いた。細胞を分画に分離し、ウエスタンブロットに用いた。COX、HSP60、VDAC1はミトコンドリアのマーカースとして用いた。catalaseはペルオキシソームのマーカースとして用い、Apaf-1は細胞質のマーカースとして用いた。Cyt: 細胞質分画(cytosolic fraction)、HM: heavy membrane

fraction, LM: light membrane fraction.
 (B) HM と LM の電子顕微鏡写真。HM は 20,000 倍、LM は 25,000 倍。図中の bar は 1 μ m を示す。

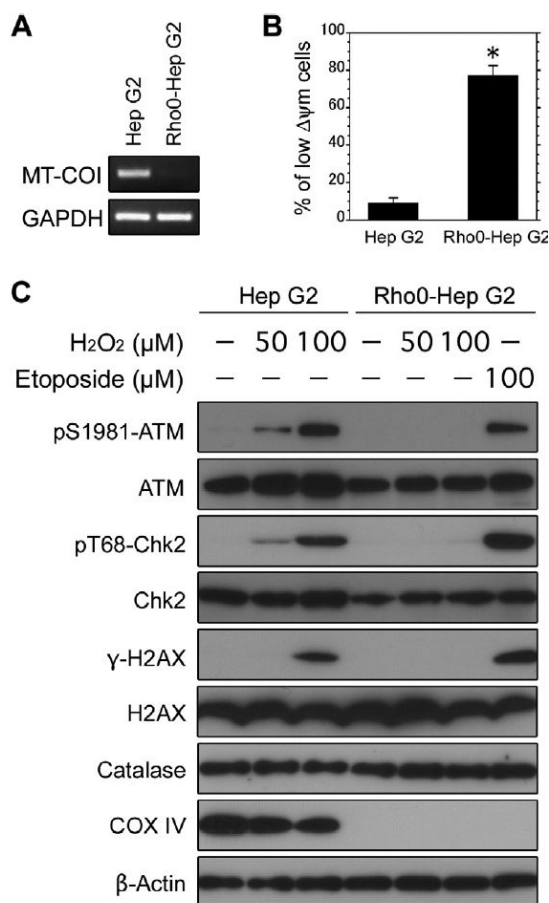


図4 . Hep G2 細胞から作成された Rho-0 細胞では H₂O₂ により ATM は活性化しない。(A) ミトコンドリア DNA は MT-CO1 遺伝子を PCR で増幅することにより検出した。(B) JC-1 染色を用いた Δ ym の解析。低 Δ ym 細胞の比率 (%) はフローサイトメータにより測定した。mean \pm SD、* : p<0.05。(C) Hep G2 細胞と Hep G2 細胞から作成した Rho 0 細胞のウエスタンブロットによる解析。細胞は図中に示された濃度の H₂O₂ またはエトポシドで 30 分間処理してから実験に用いた。

5 . 主な発表論文

[雑誌論文](計4件)

Morita A, Murakami T, Morinaga T, Tanimoto K, Hosoi Y: Requirement of mitochondria for ATM activation by extranuclear oxidative stress in cultured human hepatoblastoma cell line HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443: 1286-90, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.139. Epub 2014 Jan 6. (査読あり)

Morita A, Ariyasu S, Ohya S, Takahashi I, Wang B, Tanaka K, Uchida T, Okazaki

H, Hanaya K, Enomoto A, Neno M, Ikekita M, Aoki S, Hosoi Y: Evaluation of Zinc (II) chelators for inhibiting p53-mediated apoptosis. *Oncotarget* 4: 2439-2450, 2013.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3926839/> (査読あり)

Enomoto A, Fukasawa T, Takamatsub N, Ito M, Morita A, Hosoi Y, Miyagawa K: The HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin modulates radiosensitivity by downregulating serine/threonine kinase 38 via Sp1 inhibition. *European Journal of Cancer* 49: 3547-3558, 2013. doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.034. Epub 2013 Jul 22. (査読あり)

Wang B, Tanaka K, Morita A, Ninomiya Y, Maruyama K, Fujita K, Hosoi Y, Neno M: Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *J. Radiat. Res.* 54: 620-629, 2013. doi: 10.1093/jrr/rrs140 (査読あり)

[学会発表](計3件)

森田明典、佐藤元俊、谷本圭司、細井義夫: 過酸化水素・放射線による ATM を介した p53 Ser-15 のリン酸化とアポトーシス . : 日本放射線影響学会第 54 回大会、平成 23 年 11 月 19 日神戸市 .

細井義夫、森田明典、谷本圭司: 過酸化水素による ATM を介した p53 Ser-15 のリン酸化 . 第 17 回国際癌治療増感研究会、平成 23 年 6 月 24 日仙台市 .

佐藤元俊、川口弦、青山英史、笹井啓資、細井義夫: 過酸化水素・放射線による ATM を介した p53 Ser15 のリン酸化 . 第 49 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、平成 22 年 7 月 9 日札幌市 .

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

細井 義夫 (HOSOI, Yoshio)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 5 0 2 3 8 7 4 7

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし