

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659577

研究課題名(和文)放射線による転移抑制機構の分子基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of the molecule mechanism on the suppression of metastasis by radiation

研究代表者

藤田 英俊 (Fujita, Hidetoshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90571802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍には、様々なジェネティック・エピジェネティックな異常、すなわち、個性が存在し、結果として、放射線に対する感受性・抵抗性に違いが出てくると考えられる。しかしながら、放射線感受性・抵抗性におけるエピジェネティックな側面からの研究はほとんどなされていない。そこで、本研究では、放射線によるエピジェネティックな転写制御の分子基盤を確立することを目的とし、放射線に応答する転移関連遺伝子・小胞体ストレス関連遺伝子の発現制御機構について検討した。

研究成果の概要(英文)：Tumor has both genetic and epigenetic abnormality, i.e. individuality. Therefore, tumor shows various sensitivity or resistance to radiation. However, research on radiation-sensitivity/resistance from a viewpoint of epigenetics is not enough. In this study, we investigated molecular mechanism of response to irradiation of metastasis-associated genes and ER stress-associated genes

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：放射線 転移関連遺伝子 小胞体ストレス シノビオリン ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

腫瘍には、様々なジェネティック・エピジェネティックな異常、すなわち、個性が存在し、結果として、放射線に対する感受性・抵抗性に違いが出てくると考えられる。これまで、放射線感受性・抵抗性に関する SNP などの遺伝子多型、ゲノムのコピー数異常など、ジェネティックな側面に関して多くの研究がなされてきている。しかしながら、放射線感受性・抵抗性におけるエピジェネティックな側面からの研究はほとんどなされていない。

これまでの多くの研究により、放射線誘発癌を含む癌の発生と進展には、癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異の蓄積、さらには、癌抑制遺伝子の高度なメチル化が重要であることが明白である。一方で、放射線に反応するエピジェネティックな遺伝子発現制御に関しては、照射後のヒストン H2AX の翻訳後修飾の解析など DNA 損傷反応に多くの研究がなされている。

近年、放射線治療において局所腫瘍の制御が重要であると同様に、放射線による転移の抑制も大きな課題になりつつある。*in vitro* の細胞実験、*in vivo* マウス実験において、腫瘍への放射線の照射により細胞の運動能 (J Radiat Res. 2011. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009) や転移能 (Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009.) が抑制されることが報告されている。しかしながら、そのメカニズムは、ほとんど明らかとされていない。

2. 研究の目的

本研究では、放射線によるエピジェネティックな転写制御の分子基盤を確立することを目的とし、放射線に反応する転移関連遺伝子群の発現を制御するエピジェネティックなメカニズムを明らかにする。

本研究にて、放射線反応遺伝子のエピジ

エネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにすることは、単に放射線反応の機能解析にとどまらず、クロマチンを介した転写研究において重要であるとともに、放射線抵抗性・感受性の研究に広く利用可能な遺伝子発現制御モデルを提供する可能性を秘めている。これまで放射線反応の研究は、主に DNA 損傷・修復メカニズムの研究が多くなされてきた。本研究により、放射線反応のメカニズムにエピジェネティックな考え方によるメスを入れることで、大きな進展をもたらすものと考えられる。さらに、同定したヒストン修飾酵素、DNA メチル化酵素の機能解析の研究に発展させることで最終的には放射線による転移抑制を分子レベルで明らかにすることができると思われる。

3. 研究の方法

マウス扁平上皮がん細胞の NR-S1 による肺転移モデルを用いた。具体的には、C3H マウスの下肢に腫瘍を移植後、2-3 週間程度で肺転移が起こるモデルである。マウス下肢に NR-S1 を移植して 1 週間後に約 7mm 腫瘍になった時点で、ガンマ線 15Gy を局所腫瘍に照射した。照射後、4 時間、24 時間後に移植した腫瘍を回収し解析を行った。

また、*in vitro* にて培養した細胞 (扁平上皮癌由来、肺癌由来) に放射線を照射後、RNA, protein を回収し解析を行った。

大きく以下の二点について解析を行った。

(1) 放射線に制御される転移関連遺伝子・小胞体ストレス関連遺伝子の発現解析

腫瘍による転移に関連する遺伝子、および、細胞外基質を分解する MMP に着目し、

解析を行う。また、近年、転移との関連が明らかになりつつある小胞体関連遺伝子についても着目し、リアルタイム PCR にて解析を行う。

(2) ヒストン修飾の解析

ヒストンの多様な修飾は遺伝子発現の活性化・抑制化に関与することが報告されている。そこで、放射線照射によるヒストン修飾の変化が遺伝子発現に関与しているかどうかを明らかとするため、各ヒストン修飾に特異的な抗体を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 放射線に制御される転移関連遺伝子・小胞体ストレス関連遺伝子の発現解析

転移関連遺伝子

照射 1 時間後と 1 日後に局所腫瘍から RNA を回収した。

腫瘍の転移に関連することが報告されている遺伝子 *Twist*, *Snail-1*, *Snail-2*, および、腫瘍が転移するときに基底膜を破壊する働きを有する *MMP2*, *MMP9* の発現をリアルタイム PCR にて検討した。

その結果、*Twist*, *Snail-1*, *MMP2*, *MMP9* ではガンマ線照射 1 日後にその発現が非照射と比較して減少した。一方で、*Snail-2* の発現は照射の有無により影響されなかった。これらの結果より、ガンマ線により転移関連遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、ガンマ線は腫瘍細胞を殺すのみではなく、転移関連遺伝子の発現を抑制することにより、転移を抑制する可能性が示唆された。

小胞体ストレス関連遺伝子

小胞体ストレス関連因子を検討した結果、小胞体ストレスにおいて不良タン

パク質のユビキチン化に機能する因子であるシノビオリンが放射線照射により抑制されることを見出した。

以上の結果は、近年明らかにされてきた腫瘍細胞が小胞体ストレスへの応答を高め、浸潤転移を行っているという結果と関連すると考えられる。すなわち、本研究にて、ガンマ線が小胞体ストレス応答因子を抑制することにより、転移を抑制する可能性が示唆された。

(2) ヒストン修飾の解析

次に、ガンマ線によるエピジェネティックな制御を明らかとすることを目的とし、ガンマ線照射後のヒストン修飾の変化を Western blotting により検討した。その結果、ガンマ線照射 1 日後において、転写活性化に関わるヒストン H3 のアセチル化、ヒストン H3 Lys4 ジメチル化が減少する傾向が認められた。

以上の結果より、ガンマ線照射によりヒストン修飾が変化することが明らかとなり、ガンマ線照射がエピジェネティックな制御機構を介して遺伝子発現に関わる可能性が考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 藤田 英俊、荒谷 聡子、中島 利博
Combination therapy of carbon-ion irradiation and dendritic cell immunotherapy in mouse lung metastatic model.
第 172 回東京医科大学医学会総会 2013 年 11 月 2 日
東京医科大学病院
2. 藤田 英俊、荒谷 聡子、西岡 久寿樹、中島 利博
放射線による転移抑制機構の解析
第 170 回東京医科大学医学会総会 2012 年 11 月 17 日

東京医科大学病院

〔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

藤田 英俊 (Fujita, Hidetoshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90571802