

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861053

研究課題名(和文)パターン認識受容体に着目したがん放射線治療の有効性向上

研究課題名(英文) Enhancement of radiation therapy for cancer treatment by focusing on pattern recognition receptors

研究代表者

吉野 浩教 (Yoshino, Hironori)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：10583734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、病原体特有の分子を認識するToll様受容体(TLR)およびRIG-I様受容体(RLR)の2種類のパターン認識受容体に及ぼす放射線の影響をヒト単球系細胞を用いて検討した。その結果、放射線がTLRに影響を与え、その影響は細胞の分化に依存することが明らかとなった。一方、RLRに関しては放射線による顕著な影響は観察されなかった。以上の結果から、がん放射線治療中におけるRLRを標的とした制がん増強の可能性を考え、ヒトがん細胞に及ぼすRLRのアゴニストの作用を検討した。その結果、RLRのアゴニストはヒト肺がん細胞に対して抗腫瘍効果を示し、その効果はX線と協働的に作用することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The innate immune system recognizes pathogen-associated molecular patterns through pattern recognition receptors such as Toll-like receptors (TLRs) and retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors (RLRs). In the present study, we investigated the effects of ionizing radiation (IR) on TLRs and RLRs in human monocytic cells. We demonstrated that IR affected TLRs depending on differentiation state of monocytic cells. On the other hand, IR hardly affected RLRs in human macrophages. These results led us to a possibility that RLRs agonist have potential to be an effective immunostimulant during radiation therapy. Therefore, we next investigated the anticancer effects of RLRs agonist and cotreatment with RLRs agonist and IR. We demonstrated the anticancer effects of RLRs agonists against human lung cancer cells. Furthermore, we found that IR synergistically acted with RLRs agonist in suppressing the growth of human lung cancer cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：パターン認識受容体 Toll様受容体 RIG-I様受容体 単球 マクロファージ poly(I:C) 放射線 放射線治療

### 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは自然免疫と獲得免疫により構成される。このうち自然免疫担当細胞は、細菌やウイルスにおいて高度に保存された病原菌関連分子パターンを認識する病原体認識受容体(パターン認識受容体)を細胞表面または細胞質内に発現しており、その受容体を介して病原体関連分子に強力に応答し、病原体の排除に努める。

放射線治療は外科的手術療法、化学療法とともにがん治療における主要な治療法であるが、照射領域の正常な細胞も傷つけてしまう。また、治療により寛解状態に至ったとしても、再発の可能性もある。そのため、がんの再発予防を含む良好な予後のためには、治療後の免疫力が重要になってくる。

獲得免疫を担うTリンパ球やBリンパ球は放射線に対する感受性が非常に高い一方、自然免疫担当細胞は放射線に対して比較的抵抗性であることが知られている。しかしながら、放射線が自然免疫担当細胞に発現するパターン認識受容体に及ぼす影響についての詳細は不明である。この影響解明は、がん放射線治療中の免疫機能において非常に重要となってくる。

### 2. 研究の目的

背景で述べたように、パターン認識受容体は病原体に対する生体防御として重要な役割を担っているものの、放射線がパターン認識受容体に及ぼす影響は不明である。そこで本研究では、代表的なパターン認識受容体で細菌等の構成成分を認識するToll様受容体および細胞質のウイルス核酸認識受容体であるRIG-I (Retinoic acid-inducible gene-1) 様受容体に及ぼす放射線の影響をヒト単球系細胞株THP1を用いて検討した。さらに、パターン認識受容体の中でRIG-I様受容体が放射線による影響を受けにくい事が明らかとなったため、がん放射線治療中におけるRIG-I様受容体を標的とした制がん増強の可能性を考え、ヒト肺がん細胞におけるRIG-I様受容体の応答性およびその応答性に及ぼす放射線の影響を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

ヒト単球系細胞 THP1 およびヒト肺がん細胞 A549 は理研バイオリソースセンターより購入した。THP1 単球は 10%ウシ胎児血清含有 RPMI 1640 培地で、A549 細胞は 10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地で培養した。

#### (2) マクロファージへの分化誘導

THP1 単球を 100 ng/ml ホルボールエステル (Sigma Aldrich) 存在下で 2 日間培養し、マクロファージへ分化させた。

#### (3) 細胞への放射線照射

X線照射はX線発生装置(MBR-1520R-3,日

立メディコ)を使用して行った(線量率は約 100 cGy/分)。

一部の実験では、MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) の阻害剤を照射前 30 分に添加した。MAPK 阻害剤として、PD98059 (ERK 阻害剤)、SB203580 (p38 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)を使用した。

#### (4) 細胞表面の Toll 様受容体 2 (TLR2) および Toll 様受容体 4 (TLR4) の発現解析

THP1 単球またはマクロファージに X 線照射を行い、照射 24 時間後の細胞表面の TLR2 および TLR4 の発現を解析した。蛍光標識された各種抗体 (eBioscience) で細胞を染色した後、フローサイトメーター (Cytomics FC500, Beckman Coulter) を用いて解析した。

#### (5) TLR2 および TLR4 のアゴニストに対する応答性の評価

TLR2 および TLR4 のアゴニストとして、FSL-1 (InvivoGen) およびリポ多糖 (Sigma Aldrich) をそれぞれ使用した。アゴニストに対する応答性は炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF-) の産生により評価した。細胞内 TNF- 量は Fixation and Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™ (BD Biosciences) を用いて、培養上清中に産生された TNF- 濃度は Quantikine Human TNF- ELISA Kit (R&D Systems) を用いてそれぞれ測定した。

#### (6) リポ多糖誘導性のインターフェロン (IFN-) の発現解析

リポ多糖刺激後の IFN- の発現解析は RT-PCR 法または real time RT-PCR 法により評価した。ハウスキーピング遺伝子として、 $\beta$ -actin を使用した。

#### (7) 細胞内のリン酸化 MAPK の発現解析

細胞内のリン酸化 MAPK の発現は BD Cytofix buffer (BD Biosciences) および Perm Buffer III (BD Biosciences) を用い、附属のプロトコールに従って処理を行い、フローサイトメーターで解析した。なお、各リン酸化 MAPK に対する一次抗体および蛍光標識 2 次抗体は Cell Signaling Technology Japan または Invitrogen より購入した。

#### (8) RIG-I 様受容体の発現解析

放射線非照射および照射マクロファージの RIG-I 様受容体 (RIG-I および MDA5) の mRNA およびタンパク質発現は、RT-PCR 法またはウエスタンブロット法にてそれぞれ解析した。ハウスキーピング遺伝子またはローディングコントロールとして  $\beta$ -actin を使用した。なお、RIG-I 様受容体および  $\beta$ -actin に対する一次抗体および HRP 標識 2 次抗体は Cell Signaling Technology Japan または Santa Cruz より購入した。

(9)RIG-I 様受容体のアゴニスト誘導性 IFN- $\gamma$  の発現解析

RIG-I および MDA5 のアゴニストとして、poly(I:C)-LMW/LyoVec (InvivoGen) および poly(I:C)-HMW/LyoVec (InvivoGen) をそれぞれ使用した。アゴニスト刺激後の IFN- $\gamma$  mRNA 発現は RT-PCR 法により解析した。

(10)A549細胞の細胞増殖に及ぼすRIG-I様受容体アゴニストの影響

ヒト肺がん細胞 A549 を RIG-I 様受容体アゴニスト poly(I:C)-LMW/LyoVec または poly(I:C)-HMW/LyoVec (125 - 1000 ng/ml) 存在下で 3 日間培養し、生細胞数をトリパンブルー色素排除法にて評価した。

一部の実験では、RIG-I 様受容体アゴニスト添加 1 時間後に X 線照射を行った。

(11)A549細胞に対するRIG-I様受容体アゴニストの細胞死誘導効果

A549細胞をRIG-I様受容体アゴニスト(125 - 1000 ng/ml)存在下で3日間培養し、細胞を回収した。回収した細胞を蛍光標識 Annexin V (BioLegend)とヨウ化プロピジウムで染色し、細胞死をフローサイトメーターを用いて解析した。

#### 4. 研究成果

(1) X 線は THP1 単球の TLR2 および TLR4 発現を増加させるとともに、アゴニストに対する応答性を高める

THP1 単球に X 線を照射し、照射 24 時間後の TLR 2 および TLR 4 の細胞表面発現を解析したところ、それら受容体の発現は X 線 5 Gy 照射により増強した。X 線照射により TLR2 および TLR4 の発現が増強したため、TLR2 のアゴニストである FSL-1 および TLR 4 のリガンドであるリポ多糖に対する応答性を TNF- $\alpha$  の産生により評価した。X 線 5 Gy 照射 24 時間後に FSL-1 又はリポ多糖で刺激したところ、照射群では非照射群と比べて細胞数が約 50% 低下しているにもかかわらず、培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度は非照射細胞と同程度であった。また、細胞内に TNF- $\alpha$  を発現している細胞の割合は非照射対照群と比べて高かったことから、TLR の発現増強と共にアゴニストに対する応答性の増強が示された。

(2) X 線はマクロファージの TLR2 および TLR4 発現を低下させ、リポ多糖誘導性 IFN- $\gamma$  発現を低下させる

次に、THP1 単球と比較して病原体関連分子に対して強く応答するマクロファージで同様の解析を行った。マクロファージに X 線を照射 (1 - 10Gy) し、照射 24 時間後の細胞表面の TLR2 および TLR 4 発現を解析したところ、THP1 単球の結果とは異なり、それら受容体の発現量は X 線照射によって減少した。しかしながら、アゴニスト誘導性 TNF- $\alpha$  産生の低下は観察されなかった。

TLR4 がリポ多糖を認識すると TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを産生する経路と、IFN- $\gamma$  などの抗ウイルス性サイトカインを産生する経路の両方が活性化されるために、リポ多糖刺激後の IFN- $\gamma$  mRNA 発現を解析した。その結果、X 線曝露マクロファージではリポ多糖刺激後の IFN- $\gamma$  mRNA 発現が非照射群と比べて低かった。

(3) X 線照射による TLR 発現制御における MAPK の関与

X 線照射による MAPK の関与を調べた。まず、X 線 5Gy 照射 THP1 単球のリン酸化 MAPK の発現を解析したところ、リン酸化型 JNK および ERK の発現が非照射群と比べて 5Gy 照射群で 2 割程度高かった。次に、各 MAPK の阻害剤を用いて検討を行ったところ、JNK の阻害剤処理により X 線誘発 TLR の発現増強が抑制された。以上の結果より、放射線による THP1 単球の TLR 発現増強に JNK が関与することが明らかとなった。

次に、放射線曝露後マクロファージの TLR 発現低下に MAPK が関与するかを検討した。まず、各 MAPK の阻害剤でマクロファージを処理し、TLR の発現を解析した。その結果、JNK および p38 の阻害剤により、TLR2 および TLR4 の発現が低下したことから、マクロファージの恒常的な TLR 発現に JNK と p38 が関与することが明らかとなった。さらに、X 線曝露マクロファージのリン酸化 MAPK の発現を解析したところ、X 線 1 時間および 3 時間後のリン酸化型 JNK の発現が非照射群と比べて照射群で 2 割程度低下していた。以上の結果より、放射線によるマクロファージの TLR 発現低下に JNK が関与することが示唆された。

(4) マクロファージの RIG-I 様受容体に及ぼす放射線の影響

細胞質のウイルス核酸認識受容体である RIG-I 様受容体に及ぼす放射線の影響を THP1 由来マクロファージを用いて検討した。X 線照射 24 時間後の RIG-I および MDA5 の mRNA およびタンパク質発現を解析したところ、X 線照射 (1 - 10Gy) による顕著な発現変化認められなかった。

次に、X 線曝露マクロファージの RIG-I および MDA5 のアゴニストに対する応答性を IFN- $\gamma$  mRNA 発現により評価した。その結果、X 線曝露マクロファージのアゴニスト誘導性 IFN- $\gamma$  発現は非照射群と同程度であった。

(5) A549細胞の細胞増殖に及ぼすRIG-I様受容体アゴニストの影響

これまでの結果より、RIG-I と MDA5 のウイルスセンサーは放射線曝露マクロファージでも機能することを示唆されたため、がん放射線治療中における RIG-I 様受容体を標的とした制がん増強の可能性を考え、次にヒトがん細胞に及ぼす RIG-I 様受容体のアゴニストの作用を検討した。

ヒト肺がん細胞 A549 を RIG-I のアゴニスト poly(I:C)-LMW/LyoVec および MDA5 のアゴニスト poly(I:C)-HMW/LyoVec 存在下で培養したところ、アゴニスト非存在下と比べて細胞数が低下し、その効果は濃度依存的であった。さらに、回収した細胞を用いて細胞死解析を行ったところ、アゴニスト刺激により Annexin V 陽性の細胞死集団が顕著に増加したことから、RIG-I 受容体アゴニストはヒト肺がん細胞に対して抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった。

#### (6) RIG-I 様受容体アゴニストの抗腫瘍効果における X 線の併用効果

最後に、RIG-I 様受容体アゴニストの抗腫瘍効果に及ぼす放射線の影響を検討した。その結果、RIG-I 様受容体のアゴニスト (250ng/ml) と X 線 4Gy を併用した場合、各単独と比べて細胞数が低下し、Annexin V 陽性の細胞死集団は顕著に増加した。以上の結果より、RIG-I および MDA5 のアゴニストによる抗腫瘍効果は X 線と協働的に作用することが示唆された。

#### (7) 結論

放射線が Toll 様受容体発現に影響することが明らかとなった。さらに、その影響は細胞の分化に依存し、放射線が単球系細胞またはマクロファージに発現する Toll 様受容体を介して炎症反応の増強または免疫応答の低下を引き起こす可能性が示唆された。

一方で、RIG-I 様受容体に対しては放射線による顕著な影響は観察されなかった。

RIG-I 様受容体アゴニストはヒト肺がん細胞 A549 に対して抗腫瘍効果を示し、またその効果は放射線と協働的に作用することが明らかとなった。従って、がん放射線治療中における RIG-I 様受容体を標的とした制がん増強の有効性が示唆された。

#### 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 4 件)

Yoshino H, Saitoh T, Kozakai M, Kashiwakura I. Effects of ionizing radiation on retinoic acid-inducible gene-1-like receptors. *Biomedical Reports*, 査読有, 3:59-62, 2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4251266/>

Fukushi Y, Yoshino H, Ishikawa J, Sagisaka M, Yoshizawa A, Kashiwakura I. Effects of liquid crystallinity on anticancer activity of benzoate derivatives possessing a terminal hydroxyl group. *Liquid Crystals*, 査読有, 41:1873-1878, 2014.

DOI: 10.1080/02678292.2014.956350

Yoshino H, Chiba K, Saitoh T, Kashiwakura I. Ionizing radiation affects the expression of Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytic cells through c-Jun N-terminal kinase activation. *Journal of Radiation Research*, 査読有, 55:876-884, 2014.

DOI: 10.1093/jrr/rru040

Fukushi Y, Yoshino H, Ishikawa J, Sagisaka M, Yoshizawa A, Kashiwakura I. Synthesis and anticancer properties of phenyl benzoate derivatives possessing a terminal hydroxyl group. *Journal of Materials Chemistry B*, 査読有, 2:1335, 2014.

DOI: 10.1039/C3TB21736A

##### [学会発表](計 6 件)

Yoshino H, Saitoh T, Kozakai M, Kashiwakura I. Effects of ionizing radiation on retinoic acid-inducible gene-1-like receptors. The 9th International Symposium on the Natural Radiation Environment (NRE-IX), 2014 年 9 月 22 日-26 日, ホテルニューキャッスル(青森県弘前市).

吉野 浩教, 柏倉 幾郎. ヒト肺がん細胞のウイルス核酸認識受容体の応答性に及ぼす放射線の影響. 第 43 回制癌シンポジウム・第 52 回生物部会学術大会, 2014 年 7 月 11 - 12 日, メルパルク京都(京都府京都市).

村上 翔, 吉野 浩教, 山口 平, 西山 彩香, 横山 昂生, 柏倉 幾郎. マウス骨髄細胞由来肥満細胞の分化・増殖に対する放射線の影響. 第 43 回制癌シンポジウム・第 52 回生物部会学術大会, 2014 年 7 月 11 - 12 日, メルパルク京都(京都府京都市).

Yoshino H, Kashiwakura I. Beneficial effects of ionizing radiation to enhance anti-cancer effects of RIG-like receptor stimulus. 55th ASH annual meeting and exposition, 2013 年 12 月 7 日-10 日, ニューオーリンズ, アメリカ合衆国.

小倉巧也, 吉野浩教, 今埜遼香, 柏倉幾郎. ヒト単球系細胞の分化に伴う放射線抵抗性獲得機序の解明. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013 年 10 月 18 日-20 日, ホテルクラウンパレス青森(青森県青森市).

古川真帆, 吉野浩教, 小堺雅貴, 柏倉幾郎. ウイルス核酸認識受容体に及ぼす放射線の影響. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013 年 10 月 18 日-20 日, ホテルクラウンパレス青森(青森県青森市).

##### [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

研究室ホームページ

<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~kashiwakura/>

弘前大学 研究者詳細 吉野浩教

[http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000291\\_ja.html](http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000291_ja.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

吉野 浩教 (YOSHINO HIRONORI)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：10583734

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA IKUO)

弘前大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：00177370

門前 暁 (MONZEN SATORU)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：20514136