

# RBC 放生研ニュース NEWSLETTER

The 32<sup>th</sup> International Symposium

## Growing Edge of Radiation Biology, from principles to applications

September 1 and 2, 2016,  
Hotel Co-op Inn Kyoto



### シンポジウム印象記

#### Session 1 : Molecular mechanisms of DNA repair (1)

最初の講演は、Xingzhi Xu博士 (Shenzhen University, China) による「Reversible ubiquitination modulates ATR-dependent CHK1 activation」で、複製ストレス時のチェックポイント鍵因子であるCHK1のメディエーターCLASPINが、複合的なユビキチン化によって多角的に制御されていることが明らかになった。複製ストレスに応答して、CLASPINの脱ユビキチン化酵素(DUB)USP20はE3リガーゼHERC2を介した分解からまぬがれ、結果としてCLASPINが安定化される。さらにXu博士らは、CLASPINのクロマチンへの移行を制御する新たなユビキチン化経路と、それを抑制するDUBを見出しており、

ユビキチン化に焦点を充てたCLASPINの制御によるチェックポイント機構解明の更なる展開が期待された。

続いて「DNA double-strand break repair and responses regulated by UCH family deubiquitylating enzymes」のタイトルで、Ryotaro Nishi博士 (Ritsumeikan University, Japan) の講演が行われた。博士らはsiRNAライブラリーを用い、DUB群のスクリーニングから、DNA二本鎖損傷(DSB)の主要な修復経路の一つである、非同末端連結(NHEJ)に必要な新規遺伝子を見出した。このDUBは、NHEJのマスター因子であるKuのクロマチン局在を制御するという。近年DSB修復におけるユビキチン化の機能の解明は、目覚ましい発展を遂げ

ている。現在この分野で注目が集まる脱ユビキチン化の役割を提唱しており、非常にホットで今後の展開が待望される講演であった。

このセッション最後の演題は、柴田淳史博士 (Gunma University, Japan) による「Regulation of repair pathway choice at two ended DSBs」であった。哺乳類におけるDSB修復の第一選択肢はNHEJであり、相同組換え修復 (HR) の選択には、DSB部位へのBRCA1等DNA末端プロセシング (resection) 促進因子の時空間的局在が、53BP1等の抑制因子を制御することが鍵となる。同博士のグループはsiRNAスクリーニングにより、NHEJからHRへのスイッチングに必要な新規因子を同定した。博士らは、G2期での修復がHRに移行する際に起こるresection抑制因子の核内局在の消失に着目し、その局在決定因子の脱リン酸化がHRへのスイッチとなることを証明した。この発見は、修復経路選択の解明を進展させるブレークスルーとなることが期待される。

## Session 2 : DNA repair deficiency and related diseases

当センターの高田穰教授より、ドイツの患者より見つかった新規のファンコニ貧血原因遺伝子RFWD3/FANCW (現時点で未発表) の機能解析を行った結果が報告された。ファンコニ貧血原因遺伝子としては22個目となる。ファンコニ経路のE3リガーゼとして働くこの分子は、ニワトリDT40細胞を用いた解析で、I-SceIアッセイでの修復活性の減少や染色体断裂の出現頻度の上昇から、ユビキチン化によって相同組換え活性制御に大きく寄与することが示唆された。この制御に関わる分子メカニズムを探った結果、RFWD3はRPAとRAD51をターゲットとすることが見出され、両者の除去と分解によって、相同組換え後期過程を進行させることが判明した。

名古屋大学の荻朋男教授らは、低身長・小頭症を示すコケイン様症候群患者のゲノム解析を行った結果、WDR4遺伝子に疾患発症の原因となる異常を同定した。ヒト細胞でのWDR4の機能は未知であるが、酵母のオーソログであるTrm82はtRNAメチルトランスフェラーゼの活性化に重要であることが知られている。機能解析を行った結果、WDR4は様々なDNA損傷に応答し、WDR4欠損細胞はDNA損傷誘発剤処理に対して、高い感受性を示すことが分かった。この検討から、重度の小児の発達異常を引き起こすWDR4の機能異常のメカニズムとして、ゲノムの安定化維持機構の破綻が関与している、という内容であった。

香港大学のZhongjun Zhou教授より、核ラミンAがリモデリング因子の適切な局在と機能に重要な役割を果たしていることが話された。核ラミンAをコードするLMNA遺伝子のスプライシング異常は、核ラミンAの切断型により早老症が引き起こされ、Hutchinson-Gilford Progeria症候群として知られている。核ラミンAはMOFやSIRT1, SIRT6などのヒストン修飾酵素と相互作用しており、ラミンAのtruncated formであるprogerinはこれら核蛋白と核マトリックスの結合を変え、DNA損傷時にクロマチンリモデリングが障害される。SIRT1, SIRT6の活性化は幹細胞の老化抑制に必須であり、レスベラトロールはSIRT1を活性化し、幹細胞の老化を防ぐことも報告され、治療への応用が期待される内容であった。

## Session 3 : Genetics in radiation biology

フランスCEAのRomeo Paul-Henri博士が、TNFSF10/TRAIL regulates human T4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitisの題で講演された。放射線に対する感受性の個人差は放射線の発見当初から知られていたが、その原因となる遺伝的素因はあまりよくわかっていない。放射線治療においては、標的となる細胞だけでなく、周りの正常な細胞



への照射も避けられないため、患者の細胞が放射線に対してどのような応答を示すのか治療前に予め診断しておくことができれば、治療に用いる線量や照射の計画を決定する上で非常に重要な情報になる。そこで、博士らの研究グループは、放射線に対する感受性のマーカーを探索するため、血縁関係を用いた大規模なコホート研究を行った。放射線照射後にCD4

陽性CD62L陰性CD45RA陰性のTリンパ球 (T4 effector memory lymphocyte) が起こすアポトーシスの頻度を測定したところ、放射線に対する感受性はメンデル型の遺伝をしており、原因遺伝子としてTRAIL/TNFSF10が同定された。TRAILはTNFファミリーに属するサイトカインで、細胞表面にある受容体と結合することにより、アポトーシスを引き起こすことが知られている。放射線感受性を示すグループでは、この遺伝子の発現が亢進しており、中和抗体を用いてTRAILを阻害すると放射線感受性を緩和できることから、TRAILの高発現が放射線感受性の原因であると確認された。また、この放射線感受性は



TRAIL 遺伝子内の SNPs とも相関があることも判明した。したがって、TRAIL 遺伝子の SNPs 及び TRAIL 遺伝子がアポトーシスを引き起こすシグナル伝達経路の活性化レベルを調べることによって、患者の放射線感受性を診断し、治療を最適化できる可能性が示唆された。

Session 3の2人目の演者は京大生命科学研究科の石川冬木博士で、Mitohormesis in fission yeast という題で講演された。生体がストレスに対して応答する機構はこれまで広範に解析されてきたが、その後の適応反応、とりわけ、前もって低レベルのストレスに暴露されていると、高レベルのストレスに対して耐性を示すようになる現象の背後にある機構は今も謎に包まれている。例えば、心臓のまわりをめぐる冠動脈が狭くなったり、閉塞したりすると、虚血性心疾患を引き起こすが、一過的に何度か繰り返すことで、心筋が梗塞に対してある程度耐性を示すようになることが報告されている。このいわゆる「ホルミシス」現象は、ミトコンドリアにおいても観察されており、mitohormesis と総称されている。博士らの研究グループは、制限酵素にミトコンドリア標的配列を付加することにより、分裂酵母の細胞内でミトコンドリアDNAを一過的に切断し、ミトコンドリアに低レベルのストレスを与える系を構築した。ミトコンドリアに対してこのストレスを与えた細胞は、対照細胞と比較して、経時寿命が延びており、また、他のストレスに対しても耐性を示すようになったことから、この系においても mitohormesis が起こっていると考えられた。さらに、博士らは寿命の延長効果をもたらす原因を解析することにより、細胞内の一連の応答経路を明らかにした。

#### Session 4 : Molecular mechanism of DNA repair(2)

韓国の Institute of Basic Science 所長の KJ Myung 博士の講演が予定されていたが、重要な所用が発生して来日ができなわず、同所属の Koo Young Lee 博士が、DNA 複製タンパク質 PCNA の制御の重要性について講演した。DNA 複製においては DNA ポリメラーゼや DNA リガーゼと様々なヌクレアーゼが協調し合うことでリーディング鎖とラギング鎖 DNA の合成



が効率よく行われる。これらの多くの因子を DNA 合成の現場に繋ぎ留めておくのが PCNA 三量体であり、DNA を取り囲むように結合し、複数の酵素を一箇

所に集積させ、合成作業を円滑に進めるのに寄与する。Lee 博士はこの PCNA 三量体と結合する因子としてヒトタンパク質 ATAD5 を同定した。興味深いことに ATAD5 は、使い終わった PCNA を取り外し、次の DNA 複製作業へと再利用することで効率良く DNA 複製全体を進めているというモデルを提唱し、実際に ATAD5 がノックダウンされるとゲノム全体の DNA 複製に時間がかかってしまうことを見出した。



次に、京大生命科学研究科の Peter Carlton 博士は DNA 上に起こるシトシンのメチル化修飾が脱メチル化される際の間産物である 5 ヒドロキシ

メチル化シトシン (5hmC) のゲノム損傷応答における役割を議論した。DNA の脱メチル化が Tet と呼ばれる酵素により担われること、そしてその際に 5hmC が中間産物として見られることが知られているが、5hmC が、ガンマ線による DNA 損傷部位や DNA 複製停止部位に蓄積することを見出した。Tet 酵素には 1/2/3 とあり、損傷部位での 5hmC の出現には Tet2 が必要であることが示された。また、5hmC の生理的意義を見出すため Tet1/2/3 全てをノックアウトし、5hmC が見られなくなったマウスの細胞を用いて実験を進めた。Tet1/2/3 ノックアウト細胞においてはゲノム不安定性が見られた。また、5hmC はヒストン H2AX のリン酸化のようなクロマチン上の化学修飾と比較するとゆっくり出現する。しかしながら実際どのような役割をクロマチン上で担うのかについては今後の課題であると締めくくった。

最後に、名古屋大学環境医学研究所の益谷央豪教授は、PCNA のユビキチン化の様々な制御機構についての講演だった。PCNA は DNA 複製の進行に関与するだけでなく、ゲ



ノム損傷を受けた DNA に出会った際にはユビキチン化を受け、通常の DNA ポリメラーゼの代わりに損傷乗り越えに特化した pol $\eta$  に切り替える分子スイッチとしての役割も担う。PCNA のユビキチン化には pol $\eta$  が PCNA と相互作用することが重要であり、その相互作用について PCNA 結合配列を用いて、

PCNAのユビキチン化、そして損傷部位へのpol ηの集積が効率よく行われることを示した。次にUSP7を生化学的に同定し、細胞周期非依存的にPCNAを脱ユビキチン化することを示し、USP1によるDNA複製時に見られる脱ユビキチン化活性とは異なるものであることを発表した。

## Session 5 : Frontier cancer biology

中国第四軍医大学のDr. Junye Liu は、放射線治療によって、腫瘍が放射線治療抵抗性もしくは浸潤性を獲得するかどうか、という医師としての経験も踏まえたresearch question についてご講演された。手法としてはHeLa細胞、Siha細胞に対して複数回放射線照射を行い、治療前後の比較で上昇、もしくは減少したmiRNAをスクリーニングし、その機能についてin vitro の系で解析したところ、EMT (epithelial mesenchymal transition)が増加することやbcl-2 family を介してのアポトーシス抑制が確認された。会場からは、「上述の抵抗性や浸潤能というものは同一の細胞が獲得していくのか、もしくはそういった細胞が選択されて残っているのではないか」、という質問があったが、それは現在のところまだ断定できない。また、「放射線治療によって誘導された抵抗性や浸潤能というのは安定しているのか」という質問については、可逆性でstableなものではない、との回答であった。



示されたいくつかのmicroRNAが、実際に人の放射線治療後組織において発現の上昇を認めるのかどうか、という点はまだ未解明なようであった。

本学生命科学研究科の松田道行教授は、FRET (Förster resonance energy transfer) とよばれる、2つの分子が近接している際に、その分子間で励起エネルギー移動し、一分子の時とは異なる波長の光を発する現象をもちいて、in vivo イメージングでのERKなどの活性を評価する研究についてご講演された。そのご発表の随所から、in vivo の系の重要性和とこだわりが散見される内容であったことが印象的であった。その例としては、FRET によってERK活性を観察することのできるレポーターを発現するトランスジェニックマウスを用いて、ERK活性が局所で生じたのちに同心円状に周囲にさざ波の如く、拡散していくような、cell culture の系ではとてとらえることができない現象がvivo では起きていることをご説明され

た (spatial propagation of radial ERK activity distribution: SPREADと命名された、Hiratsuka T, et al. Elife 2015)。また、ヒト由来の血管内皮細胞であるHUVECを用いたvitroの系ではVEGF (血管内皮細胞増殖因子) がPKAを活性化させるが、vivo の系ではむしろ抑制するような齟齬を例示し、vitroの系の現象に固執することへの警鐘ともいうべきメッセージが話されていた。会場からはSPREAD現象の動画を踏まえての質問が複数あり、その現象の興味深さがうかがえた。

当センターの原田浩教授は、放射線治療後のがんが再発するメカニズムとして、低酸素によって誘導される転写因子であるHIF-1が重要な役割をしていること、それを踏まえて



HIF-1を活性化させる因子の同定とその機能解析が癌の悪化や放射線治療抵抗性を改善する手掛かりになるとの内容であった。まず、HIF-1陽性低酸素がん細胞とHIF-1陰性低酸素がん細胞を光タンパク質で標識し、放射線治療後に再発してきた細胞における標識細胞の割合を定量する方法を用い、放射線治療前HIF-1陰性だった細胞が治療後にHIF-1活性を獲得し、それを引き金に腫瘍血管へ移動し始めることを示した。またHIF-1阻害剤によって放射線治療後のがんの再発を抑制できる可能性が示唆された。次に、HIF-1活性に依存して薬剤耐性遺伝子を獲得する細胞を用いた遺伝的スクリーニングにより、脱ユビキチン化酵素であるUCHL1 (ubiquitin C-terminal hydrolase-L1) がHIF-1を脱ユビキチン化することによってHIF-1活性を上昇させ、その結果転移能を獲得し、マウスモデルで肺転移が増強すること、が示されまた臨床検体を用いた方法でUCHL1の発現量と予後の関係を調べたところ、UCHL1高発現群は有意に予後不良であった。

## Session 5 : Centromere biology

Stephane Marcand博士 (CEA, France) は「Dicentric chromosomes in yeast」で講演された。ダイセントリック (二動原体型) 染色体はDNA修復機構が誤った際にできた不安定な産物である。体細胞分裂中、ダイセントリック染色体はanaphase bridgesを形成し、染色体破壊をひき起す。出芽酵母では、染色体破壊には細胞質分裂が関与することが知られており、染色体上のいくつかの部位で優先的に起こる。博士達は、



染色体破壊が起こる部位はどのように決まっているのかについて解析を進めた。テロメアタンパク質Rap1はダイセントリック染色体上の染色体破壊のホットスポットを形成する働きが知られていることから、Rap1の結合レベルを調べてみた。その結果、Rap1の結合レベルの低下が、ホットスポットにおける染色体破壊の減少を誘導することがわかった。興味深いことに、体細胞分裂中、ダイセントリック染色体を持った細胞のSPBは隔壁形成付近に近寄ってくるsnap-back現象としてとらえられた。博士達は、ダイセントリック染色体の染色体破壊部位は先天的に決められていて、細胞質分裂が完了するときに隔壁形成部位で染色体が捕捉される機会を高めている、という仮説を提唱した。

舛本寛博士 (Kazusa DNA, Japan) は「The establishment and epigenetic maintenance of centromere chromatin on alpha-satellite DNA」で講演された。

セントロメア/キネトコアは体細胞分裂期における正確な染色体分配に寄与している。博士達は、セントロメアクロマチンの集合を調べるために、ヒト人工染色体とテトラサイクリンオペレーターの反復配列を持った合成アルフォイドDNA配列を異所的に組み込む手法を組み合わせたシステムを開発した。この系を用いて、セントロメアへのCENP-Aの集合や、テトラサイクリンリプレッサー配列を持ったセントロメア因子やクロマチン修飾因子の集合による異所的な配列への新規CENP-Aの集合の制御を調べた。その結果、CENP-Aの集合に影響を及ぼす因子群が四つに分類され、多くのキネトコア構造因子は異所的な配列への新規CENP-Aを集合させた。これらは、CENP-Cを集合させ、その結果CENP-A集合因子M18BP1を集合させていることがわかった。また、CENP-Cは、キネトコアの機能と、M18BP1を介したセントロメアクロマチンのエピジェネ



ティックな維持の両方をつなぐ因子であることがわかった。さらに、M18BP1はアセチル基転移酵素 (KAT7/HBO1/MYST2) と相互作用があることがわかった。KAT7をノック

ダウンしたHeLa細胞ではセントロメアへのCENP-Aの集合が減少し、有糸分裂時の染色体不整列や微小核の形成が増加した。KAT7を異所的な配列に集めると、ヘテロクロマチンのH3K9me3修飾が除去され、新規CENP-AまたはヒストンH3.3の集合を促した。このことから、博士達は、Mis18複合体

と結合するKAT7を含むアセチル基転移酵素群は、アルフォイドDNA上でのヒストンのターンオーバーや交換活性に影響を与え、Suv39h1を介したヘテロクロマチンがセントロメアに入り込むことを防いでいることを示唆した。

松本智裕教授 (Kyoto University, Japan) は「Regulation of Cenp-A distribution」で講演された。一本の染色体に対してセントロメアのサイズと数が世代を通してきちんと維持されるように、CENP-Aの配置は厳しく管理されなければいけない。博士らは、CENP-Aの正確な配置は、CENP-Aをセントロメアに適切に取り込むメカニズムと、不適切に取り込まれたCENP-Aを取り除くメカニズムとで維持されると仮定した。後者に着目し、CENP-A発現依存的に致死性を示す分裂酵母変異株のスクリーニングを行ったところ、CENP-Aがセントロメアの40~70kbにわたって広がる変異体*rpt3-1*を単離した。*rpt3-1*変異株は、染色体不安定性を示し、遺伝子サイレンシングを亢進させた。*rpt3+* 遺伝子は19Sプロテアソームのサブユニットをコードする。

最近の出芽酵母の研究から、19Sプロテアソームがヌクレオソームを追い出すことによって遺伝子発現を管理しているという報告があった。博士らは、分裂酵



母でも19SプロテアソームがCENP-Aを含むヌクレオソームまたはCENP-Aだけを取り除いて、セントロメアでのCENP-Aの正確な配置を維持すると推測した。同様のスクリーニングで*ufd1-73*変異株も単離された。Ufd1はクロマチンからのユビキチン依存的な抽出 (UDEEC) に機能していることが知られている複合体Cdc48-Ufd1-Npl4のサブユニットの一つで、SUMO化とユビキチン化で修飾されたタンパク質を認識し、プロテアソームによるタンパク質分解に関与している。*ufd1-73 rpt3-1*二重変異株では、単独変異株よりさらにセントロメアでのCENP-Aの広がりが蛍光顕微鏡観察で見出された。これらのことから、セントロメアでのCENP-Aの正確な配置には、19SプロテアソームとUDEECの二つシステムが協調して制御している可能性が示唆された。

## 低酸素誘導性因子HIF-1による がんの悪性化と放射線抵抗性

### 1. はじめに

HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) は、固形腫瘍内の低酸素環境で活性化し、がんの悪性形質を誘導する転写因子として認識されている。近年、ある種の遺伝子の機能異常によって酸素存在下でもHIF-1が活性化し、がんの放射線抵抗性と再発が導かれる可能性が指摘され、HIF-1に益々大きな注目が集まるようになった。本稿では、私達の研究室で見出した知見も交えながら、HIF-1の作用機序と機能、および放射線腫瘍生物学における重要性に関して、最新の情報を総括する。

### 2. 細胞外酸素環境に依存した HIF-1活性の制御機構

HIF-1は $\alpha$ サブユニット (HIF-1 $\alpha$ ) と $\beta$ サブユニット (HIF-1 $\beta$ ) で構成されるヘテロ二量体の転写因子で、その活性は主にHIF-1 $\alpha$ のプロリン残基 (P402、P564) とアスパラギン残基 (N803) の酸素依存的な水酸化修飾に依存することが知られている。すなわち、酸素存在下でHIF-1 $\alpha$ は、prolyl hydroxylases (PHDs) によるP402とP564の水酸化を引き金に、von Hippel-Lindau蛋白質 (VHL) を含むE3 ubiquitin ligaseによるユビキチン化を受けて、26Sプロテアソーム系で速やかに分解される。一方、外界の酸素分圧が徐々に低下し、HIF-1 $\alpha$ 蛋白質が蓄積しはじめる環境においては、factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) によってHIF-1 $\alpha$  N803が水酸化され、その結果、転写のコアクチベーターp300/CBPがHIF-1 $\alpha$ に結合できなくなり、HIF-1 $\alpha$ の転写活性化能は依然として低く保たれる。細胞外酸素分圧がさらに低下した低酸素環境では、酸素要求性水酸化反応がいずれも不活化するため、HIF-1 $\alpha$ は安定化して転写活性化能を獲得する。そしてHIF-1 $\beta$ とヘテロダイマーを形成し、下流遺伝子の発現を誘導するようになる。

### 3. がんの悪性化や治療抵抗性における HIF-1の機能

多くの悪性固形腫瘍内部ではHIF-1 $\alpha$ が過剰発現しており、がん細胞の悪性形質を誘導していることが知られている。

#### ▶ 3.1. 血管新生の誘導

HIF-1は血管新生誘導能を持つ様々な遺伝子の発現を誘

導する。代表的な下流遺伝子は、vascular endothelial cell growth factor (VEGF)、platelet-derived growth factor B (PDGFB)、basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF2)、angiopoietin (ANGPT) などである。これらの因子を阻害する薬剤が血管新生阻害薬として開発されている。代表例は、VEGFに対する中和抗体ベバシズマブ (アバスタチン) である。

#### ▶ 3.1. 糖代謝経路の変換 (リプログラミング)

細胞は、ミトコンドリアで機能するクエン酸回路や電子伝達系を通して、酸素依存的にATPを産生する。低酸素環境ではこれが滞るため、細胞はHIF-1を活性化して酸素非依存的な解糖系へ糖代謝経路を転換し、ATPを産生することが知られている。具体的には、細胞内ヘグルコースを取り込むglucose transporter 1 (GLUT1) やGLUT3、グルコースを乳酸に変換する過程で機能するhexokinases (HK1、HK2)、phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)、lactate dehydrogenase A (LDHA) などの発現がHIF-1依存的に誘導される。一方、pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) の発現誘導によって、クエン酸回路に供給されるacetyl-CoA量を低下させ、ミトコンドリアでのATP産生を抑制する。同時にLONの発現を介して、電子伝達系で機能するCOX4-1の発現を低下させる。さらにBNIP3やBNIP3Kを誘導してミトコンドリアのオートファジーを引き起こす。これら一連の作用の結果、ミトコンドリア機能が低下し、低酸素環境に適した解糖系を中心とする糖代謝経路への転換が起こる。

#### ▶ 3.1. 上皮-間葉転換と転移・浸潤能の亢進

HIF-1は、上皮系細胞の代表的な接着分子E-cadherinの発現を抑制する遺伝子群 (TCF3、ZFHX1A、ZFHX1Bなど) やTWISTなどの発現を誘導し、上皮-間葉転換を誘導する。AMFやMETの発現誘導も相まって、細胞の運動能は劇的に向上する。これががんの転移・浸潤能の亢進に繋がる。

さらにHIF-1は、細胞外マトリックス (ECM) の分解を担うmatrix metalloprotease 2 (MMP2)、MMP9、MMP14 (MT1-MMP) や、ECMのリモデリングを担うLOX、LOXL4、がん細胞の血管内浸潤に正の影響を及ぼすVEGFやangiopoietin-2 (ANGPT2)、さらにはがん細胞の血管外遊走を担うL1 Cell

Adhesion Molecule (L1CAM) や angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) の発現を誘導して、がん細胞の遠隔転移を促す。

#### ▶0.1. 治療抵抗性

低酸素環境に曝されたがん細胞は、HIF-1の活性化を介して細胞周期を停止させる。結果的に低酸素がん細胞は、細胞増殖に依存して毒性を発揮する放射線治療や抗がん剤への抵抗性を獲得する(図1)。この他、抗がん剤の細胞外排出を担う Multi Drug Resistant gene (MDR1) の発現をHIF-1が誘導することで、抗がん剤抵抗性を導くことも知られている。

### 4. HIF-1と放射線治療抵抗性の相関

放射線照射後に腫瘍内でHIF-1が活性化し、がんの再発(再増殖)を積極的に亢進することが分かりつつある。これが放射線腫瘍学分野でHIF-1が注目を集めている一因である。Moellerらは、放射線照射後に起こる腫瘍内の酸素環境の変化(レドックス変化)に応答してHIF-1が活性化すること、またその結果

として腫瘍の放射線抵抗性が亢進すること報告している[1]。筆者らもレポーター遺伝子(5HREp-ODD-luc)を用いて腫瘍内HIF-1活性の変動を詳細に解析し、放射線照射24時間後にHIF-1が活性化することを確認している[2]。また、HIF-1陽性細胞のアポトーシスを誘導するタンパク質製剤TOP3(Tat-ODD-Procaspase-3)を担がんマウスに投与し、放射線照射後に生じたHIF-1陽性細胞にダメージを与えたところ、放射線治療後の腫瘍増殖を遅延させることができた[3]。さらに、HIF-1陽性細胞に対するシトシンデアミナーゼ遺伝子治療法においても同様の放射線増感効果を確認することが出来た[4]。これらの結果は、HIF-1によって腫瘍の放射線抵抗性が亢進する、もしくはHIF-1が放射線治療後のがんの再発において機能するという説を強く支持する。Zhangらによる“HIF-1 $\alpha$ のノックダウンは放射線治療の効果を増感する(放射線治療後の腫瘍増殖を遅延させる)”という結果[5]や、Moellerらによる“HIF-1標的薬(YC-1)が放射線治療効果を増感する”という結果[1]からも、HIF-1による放射線抵抗性機構の存在を伺うことができる。

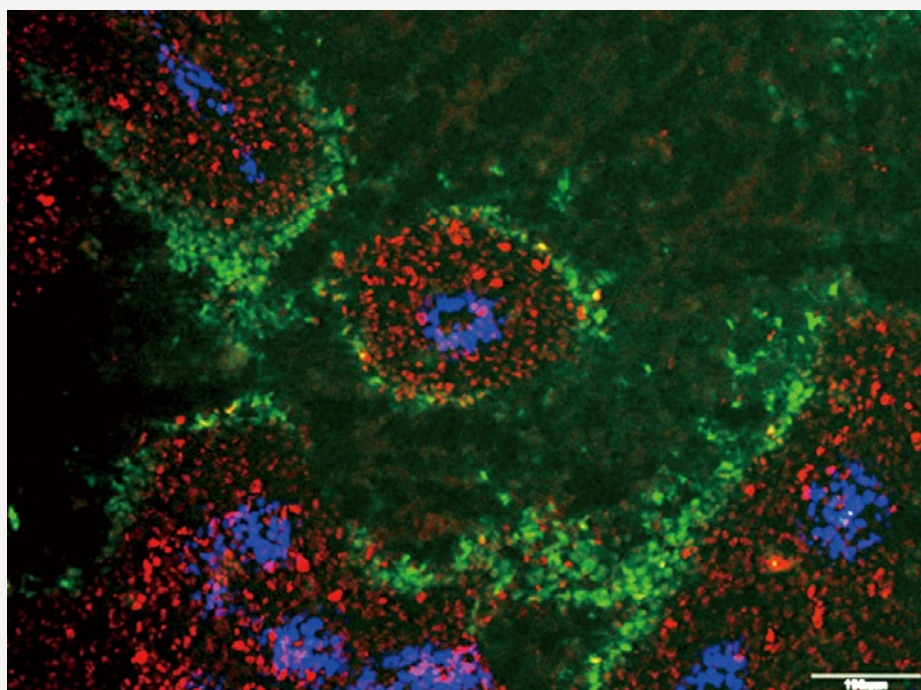


図1 血管(青)遠位の低酸素がん細胞(緑)は放射線障害(赤)を受けにくい



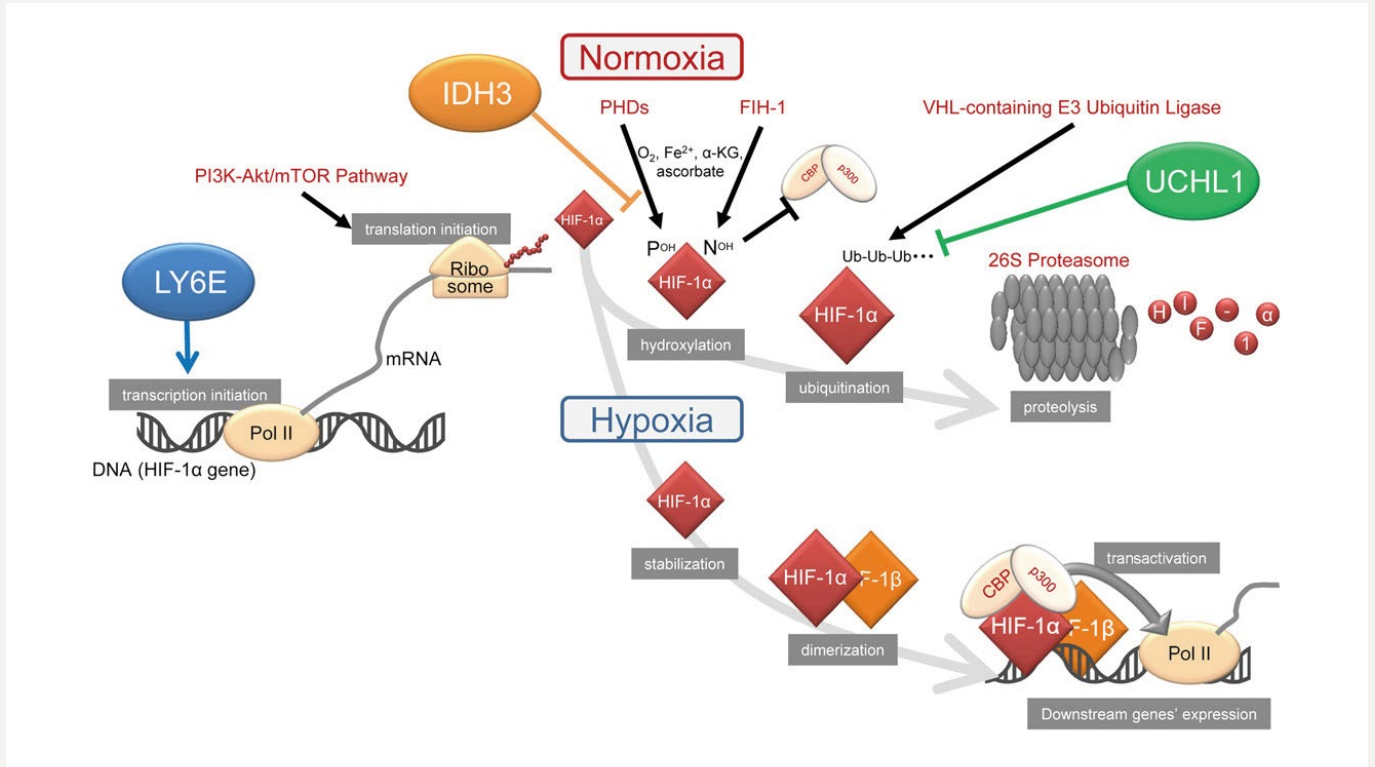


図2 がん細胞の低酸素応答と悪性化を担う遺伝子ネットワーク

### 5. 放射線抵抗性の誘導と放射線治療後のがんの再発におけるHIF-1の役割

予想に違わず、“血管新生・糖代謝経路リプログラミング・転移・浸潤を誘導するHIF-1の機能”が、がん細胞の放射線抵抗性と放射線治療後のがんの再発において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。移植腫瘍内のHIF-1活性をリアルタイムに可視化する実験系を活用して筆者らは、放射線照射後に腫瘍内で一過的に活性化したHIF-1活性がVEGFの発現を誘導し、腫瘍血管内皮細胞の放射線によるダメージを軽減、これが治療後の腫瘍再増殖を支えることを明らかにした[2]。また、HIF-1依存的にCre-ER<sup>T2</sup>を発現させる系を用いて lineage tracing 実験を実施することで、腫瘍血管の遠位に存在する低酸素がん細胞こそが、放射線治療を生き延びて再発を引き起こす源であることを証明した[6]。また放射線治療を生き延びた低酸素がん細胞が、HIF-1依存的に上皮-間葉転換をおこし、腫瘍血管に向けて遊走することでがんの再発を導くことを報告した[6]。さらに、HIF-1依存的に起こる糖代謝経路のリプログラミングを通じて、細胞内に還元型グルタチオンが蓄

積し、その抗酸化作用によってがん細胞が放射線抵抗性を獲得することを解明しつつある (unpublished)。この様に、従来から知られていたHIF-1の血管新生誘導能・転移浸潤亢進能・糖代謝リプログラミング誘導能が、いずれもがん細胞の放射線抵抗性および放射線治療後のがんの再発に関わることが明らかになってきた。HIF-1αの腫瘍内発現量と放射線治療の奏効率が逆相関するとの臨床報告も納得である。

### 6. 低酸素非依存的なHIF-1の活性化 -放射線腫瘍生物学における意味-

低酸素刺激によるHIF-1活性化機構のほか、ある種の遺伝子機能の異常もまたHIF-1を活性化することが明らかになってきた。例えばVHL遺伝子を欠損している明細胞腎がんでは、酸素環境に関わらずHIF-1αタンパク質が安定化しており、これが腎がんの悪性進展を担っていることが分かっている。また、PTENの機能喪失型変異によってPI3K-AKT-mTORシグナル伝達系が活性化し、HIF-1αタンパク質の翻訳開始効率が亢進することも報告されている。さらに、receptor of activated protein C kinase (RACK1) がVHL非依存的にHIF-1αをユビキチン化して分解を導くこと、そしてこれがheat shock



protein 90 (HSP90) に阻害されることも報告されている。最後に、mitogen-activated protein kinase (MAPK) や ataxia telangiectasia mutated protein (ATM) による HIF-1 $\alpha$  のリン酸化が、HIF-1 $\alpha$  の転写活性化能の制御に重要であることも指摘されている。

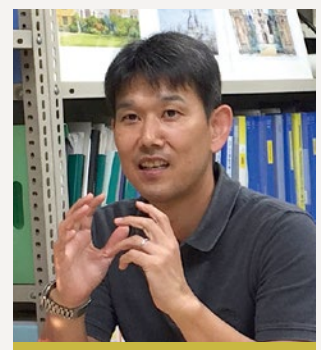
筆者らもまた、HIF-1 活性化因子を探索する遺伝学的なスクリーニング実験を通して、新たな HIF-1 活性化機構を明らかにしてきた (図2)。まず、isocitrate dehydrogenase 3 (IDH3) が異常に活性化したがん細胞の中では、 $\alpha$  ケトグルタル酸濃度が低下することで HIF-1 が活性化し、解糖系優位な状態に糖代謝経路のリプログラミングされるとともに、がん細胞の増殖が亢進することを見出した [7]。また、UCHL1 が HIF-1 $\alpha$  を脱ユビキチン化して安定化、これががんの遠隔転移能を導くことを明らかにした [8]。さらに、LY6E が HIF-1 $\alpha$  遺伝子の転写を活性化し、血管新生の誘導と腫瘍増殖の亢進を導くことを発見した [9]。IDH3-HIF-1 経路や UCHL1-HIF-1 経路の活性化によって、がん細胞の糖代謝リプログラミングを介して還元型グルタチオンが産生され、がん細胞が放射線抵抗性を獲得することも明らかになった (unpublished)。放射線治療効果の増感に繋がる新たな治療標的として、これらの新規遺伝子ネットワークを同定できた意義は大きい。

## 7. さいごに

生体の低酸素応答を司るマスター転写因子として同定されたという経緯から、HIF-1 は“悪性腫瘍内の低酸素環境で活性化して、がん細胞の悪性形質と放射線抵抗性を誘導する因子”であると認識されてきた。しかし、ヒト悪性固形腫瘍内の血管近位でも HIF-1 $\alpha$  が高発現している例が数多く認められたこと、また、酸素存在下であっても HIF-1 が活性化するメカニズムが明らかになったことにより、HIF-1 を治療標的とする意味合いは、より大きなものとなっている。近年同定されてきた“HIF-1 を活性化する遺伝子ネットワーク”を標的とすることで、悪性進展の抑制と放射線治療効果の増強につながる新たな治療法が確立されることが期待される。

## ● 引用文献

- (1) Moeller B.J. et al. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*. 5:429-442. 2004.
- (2) Harada H. et al. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 $\alpha$  protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J Biol Chem*. 284: 5332-5342. 2009.
- (3) Harada H. et al. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res*. 62:2013-2018. 2002.
- (4) Liu J. et al. Adenovirus-mediated hypoxia-targeting cytosine deaminase gene therapy enhances radiotherapy in tumour xenografts. *Br J Cancer*. 96:1871-1878. 2007.
- (5) Zhang X. et al. Enhancement of hypoxia-induced tumor cell death in vitro and radiation therapy in vivo by use of small interfering RNA targeted to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Cancer Res*. 64:8139-8142. 2004.
- (6) Harada H. et al. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat Commun*. 3:783. 2012.
- (7) Zeng L. et al. Aberrant IDH3 $\alpha$  expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 34:4758-4766. 2015.
- (8) Goto Y. et al. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 $\alpha$ . *Nat Commun*. 6:6153.2015.
- (9) Yeom C.J. et al. LY6E: a conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis. *Oncotarget*. 11670. 2016.



原田 浩

京都大学 放射線生物研究センター  
ゲノム動態研究部門 がん細胞生物学  
教授

## 新学術領域研究「宇宙に生きる」： 放射線生物学研究に追い風

### 新学術領域研究「宇宙に生きる」

昨年度、新学術領域研究「宇宙からひも解く新たな生命制御機構の統合的理解（略称名：宇宙に生きる）」の設立が認められ、平成27年度から31年度までの5カ年にわたる研究プロジェクトがすすんでいる（図1）。幸いにも計画班代表として「様々な線質、線量率の宇宙放射線の急性影響」のテーマで参画する機会に恵まれたので、本領域について紹介させていただく。

領域代表は、医師かつ宇宙飛行士の古川 聡先生である。2011年に5ヶ月半におよぶ国際宇宙ステーション（ISS）での宇宙滞在で極限的ストレスを経験された。無重力による骨格筋の萎縮、体液シフトによる頭重感、閉鎖環境による体内リズムの不調、微生物リスク、宇宙放射線被ばく等々。「これらは相乗的に作用するのでは？地上でも関連する問題があるのでは？との問いから、統合的な連携研究が必要との強い認識に至り、宇宙で遭遇する生物学的リスク・ストレスの解明とそれらの回避・軽減を目指し、同時に現代の超高齢化・ストレス社会の克服につなげたい。」そう願ひ、新学術領域研究チームの結成を決意された<sup>1)</sup>。本領域は、宇宙・極限環境に生きる生命制御機構の統合的理解を目的とし、①細胞から組織・器官のレベルにおける重力変化を中心とする物理的ストレスへの応答、②ヒトやマウス等個体レベルでの重力変化や閉鎖環境・心理的ストレス等の影響、③宇宙・閉鎖環境にともなうリスクとして微生物変遷および宇宙放射線被ばくの生物影響について、生命体が有する可

塑性（適応・修復・頑強さ）と破綻（不可逆なダメージ）を科学することを目指している。

現在、放射線生物研究の計画班として、我々のみならず、「低フルエンス粒子放射線の動物個体への影響と生体の適応に関する多面的解析（根井 充先生：放射線医学総合研究所）」との2テーマ、公募班として、「宇宙リスク管理のためのナノマイクロデバイスを用いたDNA損傷検出システムの開発（中村 麻子先生：茨城大学）」、「放射線被ばくが主要臓器に及ぼす影響に迫る「遺伝子改変動物を用いた時空間解析」（原田 浩先生：京都大学 放射線生物研究センター）」、「宇宙放射線の重粒子成分が誘発するクラスターDNA損傷の解析と生物影響（井出 博先生：広島大学）」、「宇宙放射線被ばくによる発がんリスクの推定：病理およびゲノム変異解析から（柿沼 志津子先生：放射線医学総合研究所）」の4テーマが採択されている。

### 宇宙における放射線被ばく環境

今日人類は、宇宙居住や産業における宇宙利用も視野に入れて宇宙に飛び出し、長期宇宙滞在に挑戦している。ISSでの、半年から1年程の長期滞在が可能となり、船外活動の機会も増している。さらに、再び月へ、火星へと、有人宇宙探査に対する人類の夢は尽きない。JAXAでは2030年代に月への有人探査が水面下で計画されており<sup>2)</sup>、NASAは日本も巻き込んで火星への有人探査を検討している<sup>3)</sup>。一方、宇宙空間は磁場と大気に

守られている地上とは異なり、生物学的効果の高い重粒子線（一粒子でも飛跡に沿って重篤なDNA切断を引き起こす）を含めて線質の異なる混合放射線が、低線量・低線量率で降り注いでいる。ISSでの半年から1年程の長期滞在の間に浴びる放射線量は0.1～0.2 Svと推定されており、船外活動では船内の約5倍の放射線に曝される<sup>4)</sup>。太陽表面で大規模な爆発が生じると、大量のプラズマ粒子が宇宙空間に放出され、比較的高い線量を被ばくする可能性がある。また、地球磁気圏を越えた深宇宙では、特に重粒子線の被ばく量が増す。火星までの往復（片道180日×2回）と滞在期間（500日）の合

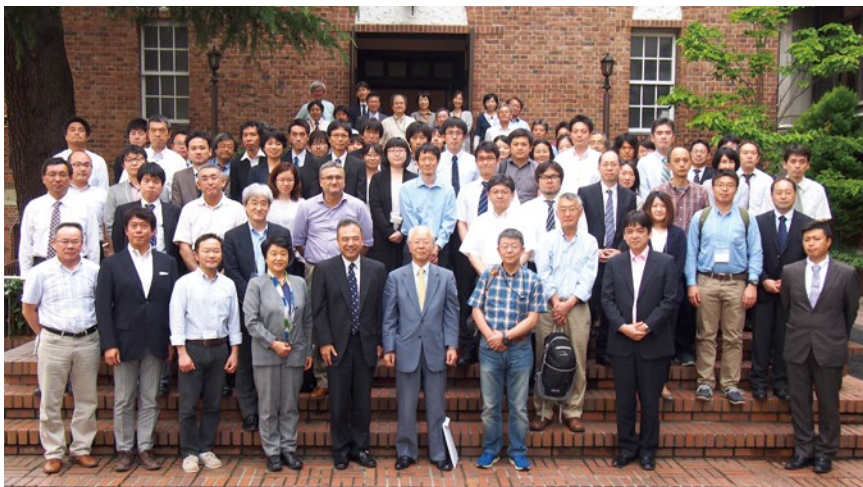


図1. 班会議での集合写真（2016年5月）。前列に古川聡計画班代表とともに、向井千秋アドバイザー、筆者は原田先生とともに最後列に。

計約2年半で約1 Svの被ばくが予測されており<sup>5)</sup>、発がんリスクがこれまでのミッション以上に高くなるのが危惧されている<sup>6)</sup>。さらに、宇宙空間は微小重力環境であり、月や火星では地上の1/6、1/3の重力環境である。今から50年程前、近藤宗平先生らによる宇宙実験では、5時間のジェミニによる宇宙飛行中に放射性同位元素を用いて血液照射すると、地上で同様に血液照射したときと比べて、線量に依存して染色体異常が増加することを報告している<sup>7)</sup>。このことから、宇宙環境（おそらく微小重力）が染色体異常の増加に影響していると考えられてきた。その後の宇宙実験でも、宇宙放射線だけでは得られないような効果が亢進するものや、逆に抑制されるものも見出されている。しかし、多くの宇宙実験が、宇宙滞在時間も短く、被ばくする放射線が少ないためか、地上サンプルと有意な差が見られず、宇宙放射線と微小重力環境との複合影響は、未だ不明な点が多い<sup>8)</sup>。

人類が安全に宇宙に進出し、活動するためには、宇宙放射線の影響を正しく評価することは喫緊の課題である。我々は、宇宙空間に特徴的な微小重力と重粒子線を含む宇宙放射線との複合影響を調べる切り札として、「世界初の疑似微小重力環境における高精度重粒子線同期照射システム」を開発した<sup>9)</sup>。疑似微小重力環境は、3Dクリノスタット装置を用いて、搭載試料が重力刺激を受ける前に、直交する2軸により3次元回転させて重力方向を連続的に変化させることで、重力影響をキャンセルした。幸いにも本学は、国内の大学で唯一の重粒子線治療装置を有しており、肺がんなど呼吸で位置が動いてしまうターゲッ

トに対する呼吸同期照射技術を確認している。この技術を利用し、3Dクリノスタットの回転センサーの情報から、生物試料が水平に位置した時にのみ、同期して照射できるように設計した(図2)。また、対照実験としてX線照射装置でも同期照射を可能とするため、高速シャッターで制御するように設計した。ようやく本装置の性能評価が完了し、生物試料での解析を開始したところである。

## 最後に

火星に行くこと、さらに宇宙で長期居住することは、今は夢物語のように感じても、そのフロンティアを真剣に考えていけば、それを通じて多くの知識を得たり、新たな技術が開発されたりするのではないかと期待する。少なくともこのような新領域について真剣に科学することを、遅ればせながらも国をあげてバックアップしてくれる時代になったことは喜ばしいことである。「宇宙に生きる」ため、宇宙放射線を正しく怖がることは大きなテーマの一つである。これを放射線生物研究分野の追い風として、本領域に興味を抱き、新たな切り口でチャレンジする人材が多数現れてくれることを期待する。また、我々の開発した装置が、プラットフォームとして本領域の研究を深化させることに寄与することを期待している。

### ● 引用文献

- (1) <http://living-in-space.jp/greeting/>
- (2) Sato N. JAXA-SP-08-013: 17-23, 2009.
- (3) <http://www.asahi.com/articles/ASJ700F3NJ7ZUHB101S.html>
- (4) Nagamatsu A, et al. Radiat Meas 59: 84-90, 2013.
- (5) Hassler DM, et al. Science 343: 1244797, 2014.
- (6) Durante M, Cucinotta FA. Nat Rev Cancer 8: 465-72, 2008.
- (7) Bender MA, Gooch PC, Kondo S. Radiat Res 31: 91-111, 1967.
- (8) Takahashi A, et al. J Radiat Res 53: 168-75, 2012.
- (9) Ikeda H, et al. *in preparation*.

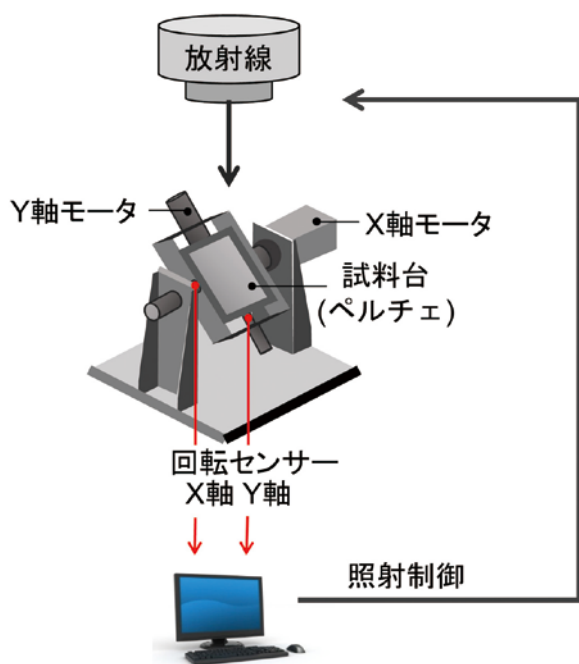


図2. 疑似微小重力環境における高精度重粒子線同期照射システムの概念図



高橋 昭久

群馬大学  
重粒子線医学研究センター  
教授



## 第39回 放射線生物研究連絡会議総会のお知らせ

下記の要領で放射線生物研究連絡会議の総会を開催します。

日時

2016年10月27日(木)

場所

JMSアステールプラザ

日本放射線影響学会第59回大会C会場

本総会は大会第2日目の昼食時に若手放射線生物学研究会総会に続いて開催する予定です。  
詳しくは影響学会第59回大会プログラムをご覧ください。

## 編集後記

放生研ニュースレター155号をお届けします。9月はじめにおこなった放生研国際シンポの印象記、原田新教授によるミニレビュー、新学術領域研究「宇宙に生きる」に関連した群馬大高橋教授によるご原稿と、盛りだくさんになりました。今後も、放生研教員、共同利用の先生がた、関連分野の研究者の方々から原稿をいただいて参りたいと考えますので、よろしく願いいたします。

毎年の国際シンポは例年11月終わりから12月はじめに開催していましたが、今年は京大本部からの国際連携サポート資金使用の都合上、9月に行うことになりました。11月では米国からの講演者招待時にThanksgivingと重なるので、という理由で断られるという経験しており、ベストな時期ではないのかもしれないという印象をもっています。しかし、9月がよかったかどうか、ご意見頂戴できればありがたいと思います。

シンポの印象記については、まだ論文発表まえの内容を、こちらが勝手に活字にするわけには行きません。内容については、すでに発表済みのもの、未発表でも講演者のかたの許可が得られたものにかざることにしました。食い足りないと思われるかもしれませんが。。。

今年度のシンポジウムでは、国内外の注目の研究を紹介するのみならず、中国、香港、韓国といった近隣の国々との連携を視野に招待講演者を選定しました。おかげで、連携への萌芽が感じられる議論ができました。今後の展開がどうなるか、楽しみです。