

解糖系の抑制による放射線耐性の克服

志 村 勉

東北大学加齢医学研究所 助教
(現 国立保健医療科学院生活環境研究部衛生環境管理研究分野)

緒 言

日本人における死因の第1位はがんである。がん征圧の研究推進が行われているが、いまだにがんに対する決定打となる治療法は確立されていない。がんの3大治療法の1つである放射線治療は、放射線による細胞傷害性を利用してがんを制御する局所療法であり、組織の機能温存性に優れている。しかし、がん細胞は容易に放射線に耐性を獲得するため、放射線治療によるがんの根絶には、がんの放射線耐性の克服が必要とされる。我々は、ヒト肝がん細胞株 HepG2 とヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に 0.5Gy の X 線を 1 日 2 回、31 日間分割照射することで、がん細胞が放射線耐性を獲得することを明らかにした。さらに、放射線照射後の影響について解析し、分割照射を止めて 1 月以上培養した細胞においても、獲得放射線耐性形質は維持されることを明らかにした¹⁾。

これまでの我々の解析から、長期分割照射によって、細胞の生存シグナル AKT シグナル経路が恒常的に活性化し、これが獲得放射線耐性の原因であることを明らかにした^{1, 2, 3)}。AKT は細胞増殖、細胞死の抑制とともにグルコースの代謝を制御する。AKT はグルコーストランスポーター GLUT1 と GLUT4 の細胞膜への局在を制御し、グルコースの細胞内への取り込みを促進する。このため、AKT 経路が活性化している獲得放射線耐性細胞では親株細胞と比較して解糖系が亢進していることが予想される。細胞は嫌気条件下では解糖系を用いて、エネルギーを産生する。しかし、がん細胞では酸素存在下においてもミトコンドリアの機能不全が原因となり、嫌氣的解糖系でエネルギーを産生する Warburg 効果が知られている。嫌氣的解糖系の代謝産物、ピルビン酸や乳酸は抗酸化作用を持つため、放射線が水分子に作用して発生する活性酸素を補足し、放射線の間接効果を軽減することが予想される。つまり、解糖系の代謝産物が放射線防護に働き、がん細胞の放射線耐性機構に関与する

ことが考えられる。

本研究では、解糖系が放射線耐性に関わるかどうかを解析した。さらに、グルコース拮抗阻害剤 2-デオキシグルコース (2-DG) でグルコースの取り込みを抑制し、獲得放射線耐性の克服が可能であるかどうかを検討した。以上の解析から、がん細胞のエネルギー代謝経路を標的とした、より有効な放射線治療法の開発に取り組んだ。

実験方法

1. 分割照射による獲得放射線耐性細胞の樹立

ヒト肝がん細胞株 HepG2 とヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に 0.5Gy の X 線を 12 時間毎に 31 日間分割照射し、31fractionated radiation (FR) 細胞を作製した。31FR 細胞をさらに照射を休止して 31 日間以上培養し、31FR-31non-radiation (NR) 細胞を作成した。X 線照射は X 線照射装置 (X 線血液照射装置 MBR-1520R、日立メディコ社) を用いて 150kV、20mA の X 線を 0.5mmCu と 0.1mmAl のフィルターを用いて、1Gy/分の線量率で細胞に照射した。

2. 乳酸、ピルビン酸、ATP の測定

乳酸、ピルビン酸、ATP 量は Biovision 社のキットを用いて、比色法により検出した。マイクロプレートリーダーで吸光度を測定し、濃度を定量した。5Gy の X 線を照射 24 時間に、親株細胞と獲得放射線細胞それぞれについて培養上清を回収した。AKT 阻害剤と放射線の併用については、AKT 阻害剤で 24 時間処理後、阻害剤を PBS (-) で洗浄した後、放射線照射して 24 時間後の培養上清を回収し、解析した。細胞数を計測し、 1×10^6 細胞当たりの乳酸、ピルビン酸、ATP 濃度で示した。

3. Reactive oxygen species (ROS)の検出

細胞を $10\mu\text{M}$ の 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) で 37°C 、30 分間染色した。細胞をトリプシンで剥がした後、スライドガラスにのせ、カバーガラスをし、蛍光顕微鏡 (Biozero, キーエンス社) で観察した。細胞の蛍光像は 20 倍の対物レンズを用いて、CCD カメラで撮影した。

4. $\gamma\text{-H2AX}$ のウェスタンブロッティング法

細胞溶解液 [0.5% Triton X-100 (v/v), 2mM PMSF, 0.02% (w/v) Na_3N , 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail, 1% Protease Inhibitor Cocktail in PBS (-)] で細胞を溶解し、遠心によりクロマチン分画を回収した。0.2N HCL を加え、一晚 4°C でヒストンタンパク質を抽出した。Bradford 法でタンパク質を定量し、 $15\mu\text{g}$ の試料を、15% SDS-ポリアクリルアミドゲルで、定電流 25mA、1 時間の電気泳動により分離した。PVDF メンブレンへの転写は定電圧 50V、1 時間で行った。メンブレンを 5% PhosphoBLOCKER™ Blocking Reagent でブロッキングした後、1 次抗体 anti- β -actin、anti-phospho-Histone H2A.X-ser139、2 次抗体 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG、HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG で反応させ、Chemi-Lumi one (ナカライテスク社) で発色させ、LAS-4000 mini (フジフィルム社) を用い、蛍光シグナルを CCD カメラで撮影した。

5. コロニーアッセイ法

放射線照射の 3 時間前に $5\mu\text{M}$ の 2-DG を培養液に加えた。放射線照射後、細胞数を計測し、1000 個の細胞を 60mm シャーレにまいた。7 日から 10 日間、コロニー

が形成されるまで細胞を培養した。細胞を 70% エタノールで固定した後、ギムザ染色液で、染色した。実体顕微鏡下で 50 個以上の細胞から形成されるコロニーを計測した。細胞の生存率は非照射細胞群のコロニー数を 1 として求めた。

6. アネキシン V-PI染色

アネキシン V 染色はバイオビジョン社 アネキシン V-FITC 染色キットを用いて、キットのプロトコールに従って染色した。フローサイトメーター (Cytomics FC 500) を用いてアネキシン V 陽性細胞を定量した。

結 果

1. 獲得放射線耐性細胞 31FR-31NR 細胞における乳酸、ピルビン酸の蓄積

獲得放射線耐性細胞 31FR-31NR 細胞では、AKT 経路の活性化により解糖系が亢進されているかどうかを、解糖系の代謝産物であるピルビン酸と乳酸の量を測定し、解析した (図 1)。非照射コントロール HepG2 細胞 (OFR 細胞) と比較して、HepG2 31FR-31NR 細胞では、乳酸およびピルビン酸が蓄積していることを明らかにした (図 1)。さらに、5Gy の X 線を照射し、放射線照射 24 時間後の乳酸、ピルビン酸量を測定した。放射線照射後においても、OFR 細胞に比べ、獲得放射線耐性細胞の乳酸、ピルビン酸の量は多いことを明らかにした。獲得耐性細胞における乳酸、ピルビン酸の蓄積は、AKT の活性化による解糖系の亢進が原因であるかどうかを、AKT 阻害剤 (API-2) を用いて解析した。我々は、 $20\mu\text{M}$ の API-2 を 24 時間処理し、HepG2 細胞で AKT が不活性

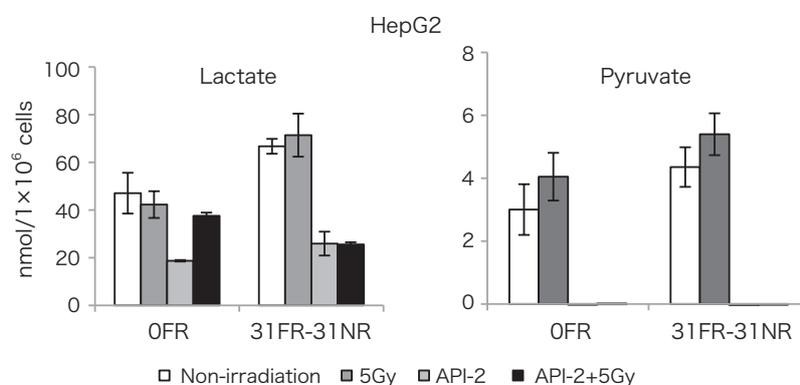


図 1 獲得放射線耐性細胞 31FR-31NR 細胞における乳酸、ピルビン酸の蓄積

X 線、AKT 阻害剤、または X 線と AKT 阻害剤を処理 24 時間後に培養上清の乳酸、ピルビン酸量を比色法により定量した。

化されることを報告した^{1,4)}。API-2 処理により、獲得放射線耐性細胞の乳酸量、ピルビン酸量は著しく低下することから、獲得放射線耐性細胞の AKT 経路が乳酸、ピルビン酸の蓄積に関与することを明らかにした。

2. 獲得放射線耐性細胞における ROS の解析

獲得放射線耐性細胞におけるピルビン酸、乳酸の蓄積が、放射線によるフリーラジカル (ROS) の誘導を抑制するのかどうかを検討した。還元型 DCFDA が酸化され蛍光を有することを利用し、ROS による DCFDA の酸化を蛍光染色により検出した (図 2)。非照射のコントロール OFR 細胞では、ほとんどの細胞で染色は観察されなかった。一方、5Gy の X 線照射 3 時間後、HepG2 細胞と HeLa 細胞では DCFDA の蛍光が観察され、放射線により ROS が誘導されることを明らかにした。獲得放射線耐性細胞では、分割照射を休止して 1 月以上経過しているにも関わらず、多くの細胞で DCFDA の染色が観察され、ピルビン酸、乳酸とともに ROS が蓄積していることを明らかにした。5Gy の放射線照射後では、獲得放射線耐性細胞に DCFDA 陽性細胞の増加は観察されなかった。

以上の結果から、獲得放射線耐性細胞では、照射前に ROS は観察されるものの、放射線による新たな ROS は誘導されないことを明らかにした。

3. 獲得放射線耐性細胞における ATP 産生

獲得放射線耐性細胞では解糖系が亢進しているため、ATP の産生量が多いことが予想された。しかし、予想

とは反し、OFR 細胞と 31FR-31NR 細胞では、ATP 量の差は観察されなかった。一方、5Gy の放射線照射後では、獲得放射線耐性細胞においてのみ ATP 量は増加することを明らかにした。この獲得放射線耐性細胞における放射線照射後の ATP 産生は、AKT 阻害剤で抑制されることから、AKT 経路が糖代謝を制御し、ATP の産生に関与することを明らかにした (図 3)。

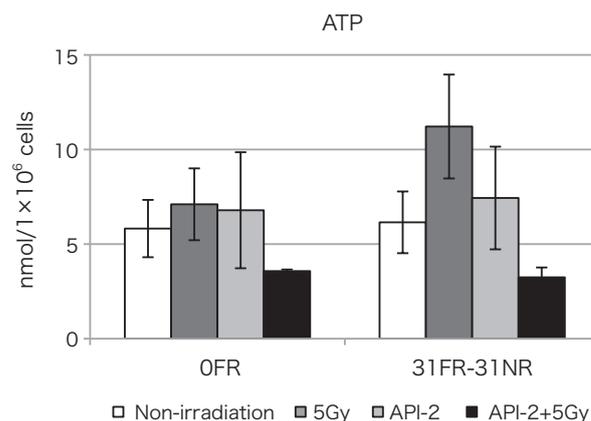


図 3 獲得放射線耐性細胞における ATP 産生

X 線、AKT 阻害剤、または X 線と AKT 阻害剤を処理 24 時間後に培養上清の乳酸、ピルビン酸量を比色法により定量した。

4. 代謝制御による放射線耐性の克服

我々は解糖系の抑制により獲得放射線耐性の克服が可能かどうかを解析するために、グルコースの拮抗阻害剤 2-DG でグルコースの取り込みを抑制し、検討した。放射線により誘導される DNA 損傷の修復能を、DNA2 重差切断の指標である γ -H2AX を用いて定量し、検討し

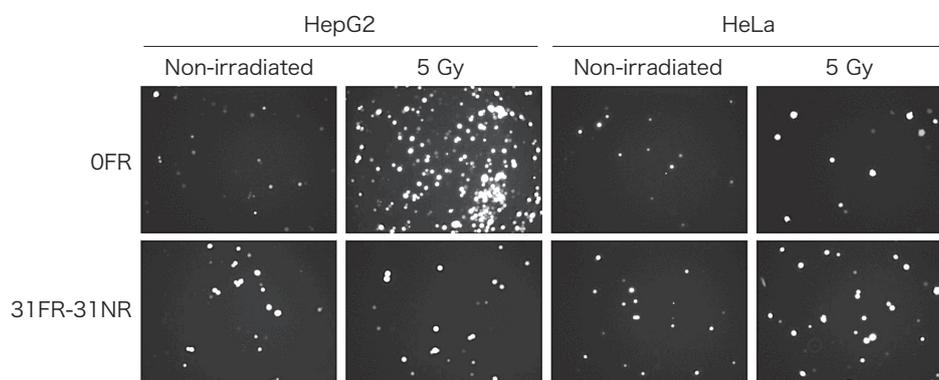


図 2 獲得放射線耐性細胞における ROS の解析

DCFDA 染色により ROS を検出し、蛍光顕微鏡で細胞の蛍光像を撮影した。コントロールの OFR 細胞では、放射線による ROS の誘導を観察した。31FR-31NR 獲得放射線耐性細胞では、5 Gy の放射線照射の前に、ROS を持つ細胞が観察され、放射線による新たな ROS の誘導は観察されなかった。

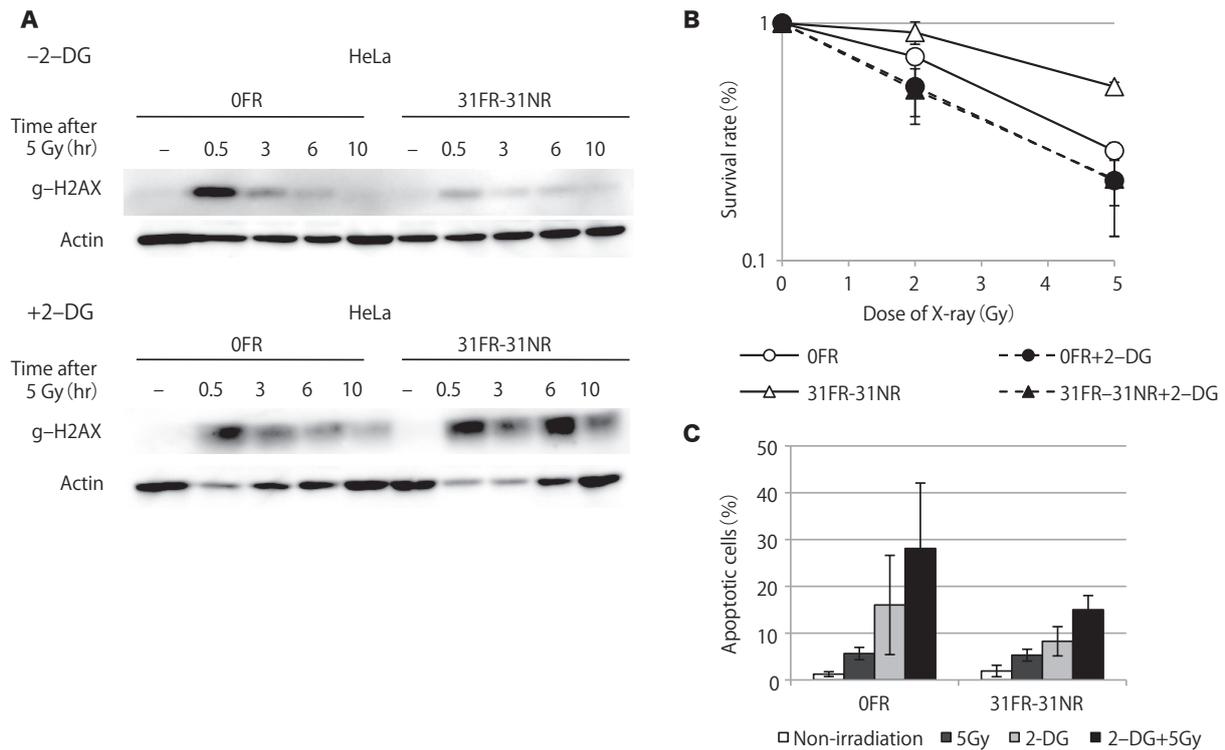


図4 2-DGによるDNA修復の阻害と放射線耐性の抑制

(A) γ -H2AXによるDNA損傷の検出。2-DGは放射線照射の30分前に添加した(下図)。(B) OFR細胞、31FR-31NR細胞の生存曲線。(C) アネキシンV-PI染色によるアポトーシスの解析

た(図4)。HeLa細胞では、5GyのX線照射30分後に γ -H2AXのシグナルが観察され、放射線でDNA損傷が誘導されることを明らかにした。 γ -H2AXのシグナルは時間経過とともに減少し、照射10時間後には消失することから、DNA損傷は修復されることを明らかにした。一方、31FR-31NR細胞では、5GyのX線照射30分後で、OFR細胞と比較して γ -H2AXのシグナルが弱く、ほとんどのDNA損傷は放射線照射後、短時間に修復されることを明らかにした。以上の結果から、親株細胞と比較して31FR-31NR細胞の修復能は高く、効率の良いDNA修復が放射線耐性に関わることが考えられる。

2-DGの添加によるDNA修復への影響を解析した。2-DG処理では、放射線照射後10時間後においても31FR-31NR細胞の γ -H2AXのシグナルが観察された。この結果から、2-DGによるグルコースの細胞内への取り込みの抑制は、31FR-31NR細胞のDNA修復を阻害することを明らかにした。

2-DGの放射線増感効果について、コロニーアッセイ法を用いて解析した。31FR-31NR細胞は親株細胞と比

較して放射線に耐性を示した。この獲得放射線耐性は2-DGと放射線の併用により消失した。さらに、アネキシンV染色でアポトーシスの解析を行った。HeLa細胞では、ヒトパピローマウイルスの感染によるp53が不活性化され、p53依存性のアポトーシスが起きないことが知られている。このような細胞では、放射線により分裂死が誘導される¹⁾。放射線によるアポトーシス抵抗性の細胞においても、2-DGと放射線の併用により、アポトーシスが誘導されることを明らかにした。

以上の結果から、2-DGによるグルコースの取り込みの阻害は、DNA修復を阻害し、細胞死を誘導し、獲得放射線耐性の抑制に有効であることを明らかにした。

考 察

1. AKT経路の活性化による解糖系の亢進

これまでのわれわれの解析から、長期分割照射した細胞では、恒常的にAKT経路が活性化することで放射線耐性を獲得することを明らかにした^{1, 3, 4)}。ヌードマウスに作成したヒト腫瘍移植片を用いた動物実験によって、AKT阻害剤と放射線の併用により、生体内におい

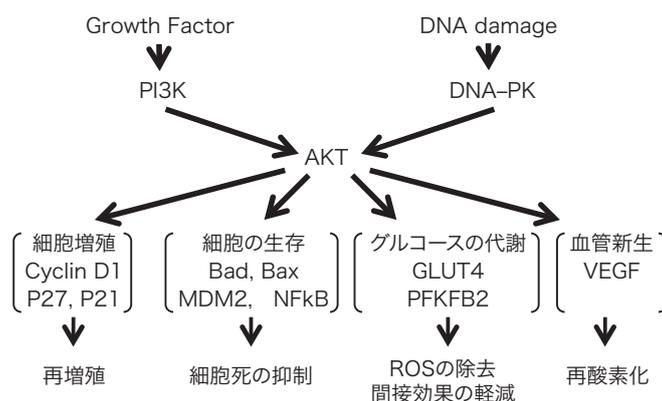


図5 放射線耐性に関わる AKT 経路

て放射線耐性の克服が可能であることを明らかにした²⁾。AKTは様々な分子を制御しており、細胞増殖、細胞の生存、グルコースの代謝、血管新生等に関わっていることが知られている(図5)。グルコースの代謝に関しては、AKTはグルコーストランスポーター GLUT1と GLUT4の細胞膜への局在を制御し、グルコースの取り込みを促進する。AKT経路が活性化している獲得放射線細胞ではピルビン酸、乳酸が蓄積し、AKT阻害剤によって抑制されることから、獲得放射線耐性細胞では解糖系が亢進していることを明らかにした。

2. 獲得放射線耐性細胞における放射線誘発ROSの抑制

放射線による細胞傷害は、放射線が直接DNA鎖を切断する直接作用と、放射線が水分子に作用してラジカルを発生し、ラジカルを介してDNAを切断する間接作用が知られている。放射線によるDNA損傷が引き金となって、アポトーシス等の細胞死が誘導される。解糖系の代謝産物ピルビン酸、乳酸は抗酸化作用を持つため、ROSを捕捉し、放射線の防護効果が期待される。我々は放射線によるROSの誘導をDCDA染色により検討した。HepG2とHeLa細胞では、放射線照射後にDCFDA陽性の細胞が観察され、放射線によってROSが誘導されることを明らかにした。一方、獲得放射線耐性細胞では、放射線によるROSの誘導は観察されなかった。獲得放射線耐性細胞では照射前にROSが蓄積していることから、ROSの排除機構である抗酸化酵素等のROSに対するストレス応答が活性化していることが考えられる。獲得放射線耐性細胞では、ピルビン酸、乳酸による抗酸化作用とともに、蓄積したROSに対するストレス応答により、新たな放射線によるROSの発生を抑制し、放射線に耐性を獲得することが考えられる。

3. 2-DGによる放射線耐性の抑制

我々はグルコースの取り込みの抑制により解糖系を抑制し、放射線耐性の克服が可能であるかどうかを検討した。2-DGはグルコースヘキソキナーゼと結合してグルコースの細胞内への取り込みを抑制する。2-DG処理により、獲得放射線耐性の高いDNA修復能は阻害され、アポトーシスが誘導されることを明らかにした。獲得放射線耐性細胞では放射線照射後にATPが産生され、このATPはDNA修復に用いられると考えられる。このため、2-DGによる解糖系の抑制によりATPは枯渇し、DNA修復が阻害されることが考えられる。また、2-DGは獲得放射線耐性細胞にアポトーシスを誘導し、獲得放射線耐性の克服に有効であることを明らかにした。

以上、本研究により、細胞のエネルギー代謝が放射線の感受性に影響を与えることを明らかにした。糖代謝に関わる分子を標的に放射線耐性細胞における放射線の増感効果が期待され、今後、新たな標的分子の探索に取り組みたい。

要約

我々は長期分割照射により、放射線耐性を獲得した獲得放射線耐性細胞では、AKTの活性化により、解糖系が亢進していることを明らかにした。獲得放射線耐性では放射線で誘導されるROSの発生が抑制されることから、解糖系の代謝産物ピルビン酸、乳酸の抗酸化作用が放射線の防護効果を持つことが考えられる。2-DGによるグルコースの細胞内への取り込みの抑制はDNA修復を阻害し、放射線増感効果を持つことを明らかにした。

以上の結果から、放射線治療によるがんの根絶には、がん細胞のエネルギー代謝の抑制が有効であることを明らかにした。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より研究助成を受け賜りましたことを深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) T. Shimura, et al.: *Oncogene*, 29, 4826-4837, 2010.
- 2) T. Shimura, et al.: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 80, 540-548, 2011.
- 3) T. Shimura. : *J. Radiat. Res. (Tokyo)* , 52, 539-544, 2011.
- 4) T. Shimura, et al.: *Oncogenesis*, doi:10.1038/oncsis, 2012.