

機関番号：22101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20591497

研究課題名 (和文) サイクリン依存性キナーゼ阻害剤の放射線感受性増強とその分子メカニズム

研究課題名 (英文) Radiosensitization by cyclin-dependent kinase inhibitors and its molecular mechanism

研究代表者

窪田 宜夫 (KUBOTA NOBUO)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：20046139

研究成果の概要 (和文) : サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase:CDK) はセリン・スレオニンキナーゼで、サイクリンと呼ばれる調節サブユニットと結合して活性化され、哺乳動物の細胞周期進行に働いている。このことからCDKは古くから制癌剤の標的として注目されてきている。また細胞周期の調節にはCKI (CDK inhibitor) と呼ばれるブレーキ役の阻害たんぱく質が結合してキナーゼ活性を調節している。スルフォラファンをはじめ、イソチオシアネート類の発癌予防効果にはCKIの発現増強が関与していることが知られている。今回、我々はこれらの植物由来化学物質には、ヒト由来がん細胞に対して細胞致死効果、および放射線増感効果を有することを見出した。

研究成果の概要 (英文) : Isothiocyanates (ITCs) exhibit tumor prevention activity. ITCs induce the upregulation of tumor suppressors CKI (CDK inhibitor) such as p21 and p27, and provide a protective effect to normal cells against cancer. Here, we report that Sulforaphane (SFN) and Benzyl isothiocyanate (BITC), enhance radiosensitivity in human tumor cells by repair inhibition of radiation-induced DNA double strand breaks through the impairment of nonhomologous end joining (NHEJ) and homologous recombination repair (HRR) pathways. SFN and BITC also synergistically increase the radiation-induced apoptosis in human tumor cells. Our data suggest the potential use of SFN and BITC as an adjuvant to radiation therapy in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：CDK 阻害剤、イソチオシアネート、放射線増感

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は物理的な線量配分に関して、コンピューターサイエンスの発展により、IMRTなどに代表されるように、著しい発展を遂げてきている。しかし、癌は放射線抵抗

性を示すものも多く、物理的線量配分の向上をもってしても治療効果の向上に結び付かないものも多く存在する。このような癌に対して、放射線抵抗性を引き起こす分子レベルのメカニズムを探る研究が活発に行われて

きていた。多くの癌で放射線抵抗性を引き起こす遺伝子の発現増強、アポトーシスを引き起こす遺伝子の変異等が観察されていることが明らかにされてきた。それに伴い、放射線抵抗性に関与する遺伝子を攻撃する薬剤を用いて、放射線感受性を高める研究が考えられた。

細胞周期の調節には CKI (CDK inhibitor) と呼ばれる細胞周期進行のブレーキ役の阻害タンパク質が結合してキナーゼ活性を調節している。スルフォラファン (SFN) をはじめ、イソチオシアネート類の発癌予防効果には CKI の発現増強が関与していることが知られている。近年、注目されているイソチオシアネート類は、疫学的研究などから現在最もがん予防効果の期待される食品成分である。イソチオシアネート類は特異な芳香のイソチオシアネート基を有する化合物の総称である。イソチオシアネート類は特にアブラナ科植物を中心に普遍的に含まれているが、側鎖の違う百数十もの類縁体が報告されているが、黒マスタード、ワサビに多く含まれるアリル イソチオシアネート、キャベツ、クレソンに含まれるフェニル イソチオシアネート、ブロッコリーに多く含まれるスルフォラファン、パパイアのベンチル イソチオシアネートなどが著名である。

一方、イソチオシアネート類には、ヒトの癌細胞に対して積極的にアポトーシスを誘導すると言った作用があることが最近、次々と明らかにされ、発癌予防に大きく関与していることが示唆されている。我々はイソチオシアネート類のこれらの作用は、発癌予防ばかりでなく、癌の治療にも有効に働くと考えた。そこで、我々はイソチオシアネート類の放射線治療への応用として、ヒト癌細胞に対する放射線増感効果について研究することを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、サイクリン依存性キナーゼの阻害剤、およびサイクリンキナーゼ阻害作用を有する植物由来物質であるイソチオシアネート類の放射線増感効果を調べ、その分子メカニズムについて検討することである。そして本研究のゴールは臨床応用可能な放射線増感剤を提唱することである。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

実験にはヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞、ヒト膵臓癌由来の MIA PaCa-2 および PANC-1 細胞を使用した。

(2) 実験方法

実験は *in vitro* 培養細胞で行った。培養

液はアルファMEM あるいは RPMI1640 に 10% 牛胎児血清を添加したものを使用した。

(3) 細胞生存率

細胞生存率はコロニー形成法によった。50 個以上の細胞からなるコロニーを一つの生存細胞由来として、生存率を求めた。

(4) DNA 二重鎖切断測定

DNA 二重鎖切断測定は低電圧電気泳動法および γ -H2AX focus assay 法によった。低電圧電気泳動法では、細胞をアガロースに取り込み、Lysis buffer 処理後、0.6%ゲルで 0.6V/cm の条件で 36 時間泳動した。その後、臭化エチジウムで染色後、UV イルミネーター上で撮影し、流れ出た DNA 量をもとに、DNA 二重鎖切断量を求めた。 γ -H2AX focus assay 法は蛍光免疫染色法によった。Anti- γ -H2AX 抗体は Invitrogen より購入し、2 次抗体として Alexa488 anti-mouse goat antibody を鏡で観察し、細胞核内の focus 数を DNA 二重鎖切断数としてカウントした。

(5) アポトーシス測定

アポトーシス測定には flow cytometry による sub-G1 の定量、PARP, Caspase 3 の cleaved type のウエスタンブロットによる検出によった。また実験によっては、DAPI 染色による核の断片化を蛍光顕微鏡下で測定して、細胞あたりのアポトーシス細胞の割合を求めた。

(6) Western blot 法

タンパク質の発現測定には Western blot 法を用いた。Whole cell を lysis buffer で溶解し、タンパク質サンプルを取得後、タンパク質濃度を測定した。一定のタンパク質をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF 膜に転写した。一次抗体としては、anti-Ku80, anti-Ku70, anti-phosphospecific DNA-PKcs, anti-Rad51, anti-PARP, anti-XIAP, anti-Apaf-1 等を使用した。2 次抗体は rabbit IgG-HRP, mouse IgG-HRP を使用した。1 次抗体、2 次抗体処理後、サンプルは ECL detection system (GE Healthcare) を用いて目的のタンパク質を検出した。

(7) *in vivo* xenograft 腫瘍モデル

8 週齢の Balb/c-nu/nu ノードマウスの下肢に 10^6 個の HeLa 細胞を移植し、腫瘍体積を非処理、SFN 投与、放射線照射、および両者の併用群について経時的に測定した。腫瘍体積は長径 (mm) \times 短径 (mm)²/2 の式で求めた。

4. 研究成果

(1) SFN の放射線増感

SFN はブロッコリー(特にブロッコリースプラウト)に多量に含まれることがよく知られている。ジョーンズ・ホプキンス大学のタラレーらががん予防に有効であることを発見して以来、多くの注目が集められている。そこで我々は最初に SFN のがん治療への可能性について検討することにした。

SFN のヒト膵臓癌由来の MIA PaCa-2 と PANC-1 細胞に対する殺細胞効果は 24 時間処理で 10 - 20 μ M で濃度依存的に増加した。そこで X 線と SFN の併用実験を行った。MIA PaCa-2 と PANC-1 は SFN により、放射線感受性が増強され、濃度が高いほうが放射線増感効果はより大きかった(図 1)。

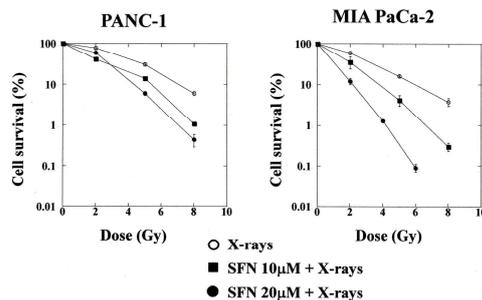


図 1 ヒト膵臓がん細胞に対する SFN の放射線増感

また HeLa 細胞でも同様に放射線増感効果が観察された。放射線と SFN の併用により、MIA PaCa-2 細胞ではアポトーシス数の増加が見られた。そのため、アポトーシス関連タンパク質の発現量を調べたところ、MIA PaCa-2 細胞では PARP の断片化が見られ、PANC-1 細胞では観察されなかった。このことから MIA PaCa-2 細胞の SFN による放射線増感にはアポトーシスの増強が関与していることが考えられる。Caspase-3 の働きを抑制する XIAP タンパク質の減少、Caspase 活性化因子である Apaf-1 の増加が観察され(図 2)、SFN は p53 非依存的にアポトーシスを誘導すると考えられる。

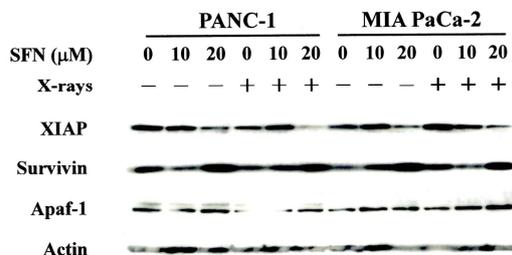


図 2 ヒト膵臓がんにおけるアポトーシス関連蛋白発現におよぼす SFN の作用

これらの結果より、SFN は癌細胞で亢進して

いる抗アポトーシスシグナルを抑制し、アポトーシス促進因子の発現を増強することにより、放射線感受性の増強を引き起こすと考えられる。

また HeLa 細胞では SFN と放射線を併用すると、放射線で誘発される DNA 二重鎖切断の修復が、有意に低下することが観察された。DNA 二重鎖切断の修復には 2 種類の修復経路、すなわち非相同末端結合 (Non-homologous end joining: NHEJ) と相同組換え修復 (Homologous recombination repair: HRR) がある。HRR のキー蛋白である Rad51 は放射線照射後にフォーカスを形成し、修復後に消失するが、SFN と放射線を併用すると、Rad51 のフォーカスが照射後 24 時間でも残っていた。また NHEJ に関わる DNA-PKcs のリン酸化フォーカスも照射後に長く残っていた(図 3)。このことから、SFN は放射線照射後の HRR と NHEJ の両方を阻害して放射線増感効果が引き起こされることが示された。

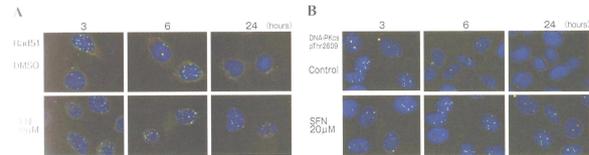


図 3 放射線 2 Gy 照射後の Rad51 と DNA-PKcs foci の消失におよぼす SFN の影響

さらに、HeLa 細胞のヌードマウス移植系の実験で、放射線照射単独に比して SFN と放射線の併用群では、腫瘍の増殖が有意に抑制される結果が得られた。

これらのデータは、SFN が放射線治療の放射線増感剤としての可能性を示すものと考えられる。

(2) ベンチル イソチオシアネートの放射線増感

我々は発癌防護作用のある SFN がヒト癌細胞に対して、すぐれた放射線増感作用を有することを見出した。SFN はイソチオシアネート類に属するが、SFN 以外にも多くの類縁体が存在する。そこで、SFN 以外の代表的なイソチオシアネートの放射線増感効果について検討した。調べたイソチオシアネートはフェニチル イソチオシアネート (PITC)、アリル イソチオシアネート (AITC)、ベンチル イソチオシアネート (BITC) である。実験にはヒト膵臓癌由来細胞の MIA PaCa-2 と PANC-1 を用いた。調べた 3 つのイソチオシアネートすべてで 2 つの細胞の放射線感受性の増強が観察させたが、BITC が最も大きい効果が見られた(図 4)。

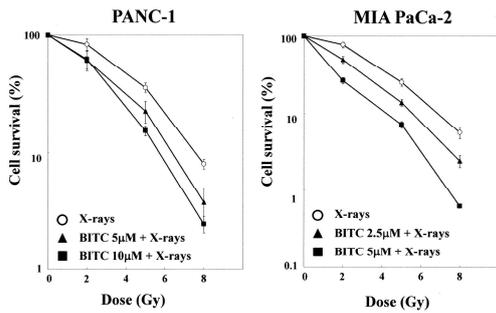


図4 ヒトすい臓がん細胞に対するBITCの放射線増感

BITC と放射線の併用によるアポトーシスの誘導を照射後 24 時間に調べた。放射線は 6 Gy、BITC の濃度 2.5、または 5.0 μM とした。PANC-1、MIA PaCa-2 とともに両者の併用で有意にアポトーシス細胞の相乗的な増加が観察された(図 5)。

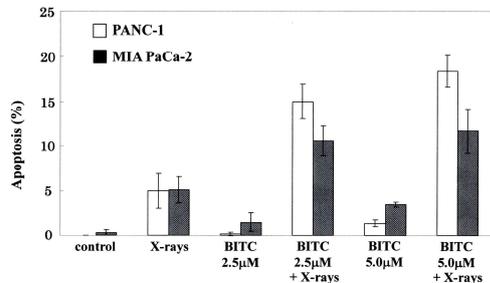


図5 放射線とBITC処理によるアポトーシス

図 5 の結果より、BITC の放射線感受性の増強にはアポトーシスの増強が関与していることが考えられた。またアポトーシスの指標である PARP の断片化を調べると、PANC-1 細胞では BITC 処理により明らかに断片化が見られた。

アポトーシス関連蛋白について、その発現に及ぼす放射線と BITC の併用について調べると、アポトーシス促進に働く Apaf-1 の増加が観察された。またアポトーシス抑制に働く XIAP の発現抑制が見られた(図 6)。

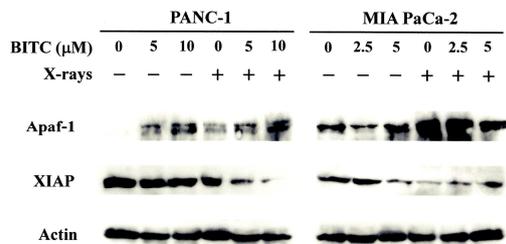


図6 アポトーシス関連蛋白発現に及ぼす放射線とBITCの影響

Apaf-1 はチトクローム C と結合して活性化され、caspase 9 を活性化する。活性化された caspase 9 は caspase 3 を活性化してアポトーシスを誘導する。また XIAP は、カスパーゼに直接に結合してそのプロテアーゼ活性を阻害すると同時に、ユビキチンリガーゼ活性によってカスパーゼの分解を促進することで、その高いアポトーシス抑制活性を発揮するタンパク質である。

こうして、BITC は Apaf-1 の発現増強、XIAP の発現抑制を介してアポトーシスを誘導し、放射線と併用すると、放射線誘導アポトーシスを引き起こし、結果として放射線感受性の増強が引き起こされると考えられる。

イソチオシアネート類は疫学的研究から、現在最もがん予防効果が期待される食品成分である。今回の研究から、SFN と BITC にヒト子宮頸癌 HeLa 細胞と膵臓癌 MIA PaCa-2 細胞と PANC-1 細胞で大きな放射線感受性増強作用があることが見出された。今後、さらに他のイソチオシアネートについても検討を行い、臨床的に有用な放射線増感剤の開発に結び付けることが求められる。

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 10 件)

① Kuribayashi T, Ohara M, Sora S, Kubota N, Scriptaid, a novel histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to radiation. *Int J Mol Med* 査読有 201, 25(1), 25-29.

② Fujii Y, Kato T, Kubota N, Fujimori A, Okayasu R, p53 independent radio-sensitization of human lymphoblastoid cell lines by Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Oncol Rep* 査読有 2010, 23(1), 199-203.

③ Fujii Y, Kato T, Ueno A, Kubota N, Fujimori A, Okayasu R, Ascorbic acid gives different protective effects in human cells exposed to X-rays and heavy ions. *Mutat Res* 査読有 2010, 699(1-2), 58-81.

④ Yu D, Sekine-Suzuki E, Xue L, Kubota N, Okayasu R, Chemopreventive agent sulforaphane enhances radiosensitivity in human tumor cells. *Int J Cancer* 査読有 2009, 125(5), 1205-1211.

⑤ Iijima K, Muranaka C, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K, Matsuura S, Kubota N,

Tauchi H, NBS1 regulates a novel apoptotic pathway through Bax activation. DNA Repair 査読有 2008, 7, 1705-1716.

⑥Sekine-Susuki E, Yu D, Kubota N, Okayasu R, Anzai K, Sulforaphane induces DNA double strand breaks predominantly repaired by homologous recombination pathway in human cancer cells. Biochem Biophys Res Com 査読有 2008, 377(2), 341-345.

〔学会発表〕(計 15 件)

①瀬川達矢, 田中 彩, 大西 健, 窪田宜夫, Hsp90 阻害剤 Celastrol のヒト腫瘍細胞の放射線増感、第 13 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2011 年 2 月

②大西 健, 窪田宜夫, 竹森 洋, 秦野 修、放射線増感作用を示す植物生理活性物質、特にフラボノイドの分子標的放射線増感剤としての有用性、第 13 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2011 年 2 月

③窪田宜夫, 田中 彩, 干 冬, 岡安隆一、Isothiocyanate 類によるヒト腫瘍細胞の放射線増感、第 12 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2010 年 2 月

④大西 健, 窪田宜夫, 竹森 洋, 秦野 修、放射線増感作用を示す植物生理活性物質、特にフラボノイドの分子標的放射線増感剤としての有用性、第 13 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2011 年 2 月

⑤大西 健, 窪田宜夫, 秦野 修, 竹森 洋、抗がん作用を持つフラボノイド類のスクリーニング、第 53 回日本放射線影響学会(京都) 2010 年 11 月

⑥大原麻希, 木村慎一、窪田宜夫、田内広、ヒト腫瘍細胞でのイソチオシアネートによる放射線増感、平成 21 年度日本原子力学会北関東支部若手研究者発表会(水戸) 2009 年 4 月

⑦窪田宜夫、大原麻希、木村慎一、関根恵美子、干 冬、岡安隆一、ヒト腫瘍細胞における Benzyl Isothiocyanate の放射線増感に関する研究、第 48 回日本医学放射線学会生物部会(富山) 2009 年 6 月

⑧大原麻希、木村慎一、窪田宜夫、ヒト腫瘍細胞での benzyl isothiocyanate の放射線増感効果、第 51 回日本放射線影響学会(北九州) 2008 年 11 月

⑨関根絵美子、干 冬、二宮康晴、窪田宜夫、藤森亮、岡安隆一、安西和記、スルフォラファンと重粒子線との併用における放射線増感による抗腫瘍効果の検討、第 51 回日本放射線影響学会(北九州) 2008 年 11 月

⑩干 冬、関根絵美子、師 連、藤森亮、窪田宜夫、岡安隆一、DNA 損傷修復経路によるスルフォラファンの放射線腫瘍増感作用、第 51 回日本放射線影響学会(北九州) 2008 年 11 月

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ipu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 宜夫 (KUBOTA Nobuo)
茨城県立医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：20046139

(2) 研究協力者

岡安隆一(OKAYASU RYUICHI)
放射線医学総合研究所・粒子線生物・
グループリーダー

大原麻希 (OHARA MAKI)
茨城県立医療大学・保健医療学部・
嘱託助手

田中彩(TANAKA AYA)
茨城県立医療大学・保健医療学部・
嘱託助手