

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591454  
 研究課題名（和文） DNA 損傷修復蛋白を分子標的とした食道癌に対する新規化学放射線療法  
 の開発  
 研究課題名（英文） New chemoradiotherapy for esophageal cancer targeting DNA repair  
 proteins  
 研究代表者  
 檜原 淳 (HIHARA JUN)  
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師  
 研究者番号：10322744

### 研究成果の概要（和文）：

食道癌細胞株をシスプラチンおよび 5-FU で処理した際に、DNA 損傷の指標である  $\gamma$ -H2AX と DNA 修復蛋白 Rad51 発現の経時的変化が抗癌剤感受性と相関することが明らかとなった。さらに、従来代謝拮抗剤として考えられていた 5-FU も DNA の二重鎖切断を引き起こしていること、相同組換え修復経路が CDDP/5-FU の相乗効果と深く関わっていることが明らかとなった。

### 研究成果の概要（英文）：

The kinetics of  $\gamma$ -H2AX and Rad51 was found to correlate with sensitivity to chemotherapeutic agents in esophageal cancer cell lines when treated with cisplatin and 5-FU. Furthermore, it was found that 5-FU, which has been considered as an antimetabolite, also caused DNA double-strand breaks and homologous recombinational repair pathway was involved in the synergistic effect of cisplatin and 5-FU.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012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：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：食道外科学

#### 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA は、1日1細胞あたり最大 50 万回程度の損傷が発生することが知られているが、その損傷は常にモニターされており、様々な修復機構によって速やかに修復されている。DNA 損傷のうち、二重鎖 DNA 切断 (double-strand breaks; DSBs) がもっとも重篤であり、修復されないまま残存すると、細胞は apoptosis に陥る。相同組換え修復機構 (homologous recombinational repair; HR)

は DSBs に対する最適な修復機構であり、その中心的役割を担っているのが Rad51 蛋白である。

DNA 損傷により癌細胞の apoptosis を誘導させることが放射線治療や抗癌剤治療の原理となっている。シスプラチン (CDDP) に代表されるプラチナ製剤は、塩基間架橋を形成することによって DNA に損傷を加えるが、それらは DSBs に変換され、HR によって修復されると考えられている。また、Rad51 蛋白の発

現亢進は種々のがん組織および細胞株で認められており、抗癌剤に対する耐性や放射線治療に対する感受性の低下と関連することが報告されている。

食道癌における化学放射線療法(CRT)は、表在癌に対しては食道温存を目的とした根治的CRTとして用いられ、切除可能進行癌では手術と組み合わせる集学的治療の一環として、切除不能癌では治癒の可能性のある唯一の治療として各ステージで広く用いられている。このように食道癌におけるCRTの効果を増強させることは、食道癌全体の治療成績向上の鍵を握っているといえる。

## 2. 研究の目的

本研究は、抗癌剤(CDDP, 5-FU)を単独あるいは併用添加し、食道癌細胞株におけるDNA損傷の指標である $\gamma$ H2AXとDNA修復蛋白Rad51 focusの量的変化(kinetics)と細胞内動態を経時的に測定し、抗癌剤併用の相加・相乗効果を評価するとともに、各抗癌剤の細胞内作用部位を明らかにすることを目的とする。

また放射線照射後の食道癌細胞株においても同様の検討を行い、抗癌剤(CDDP, 5-FU)添加による相加・相乗効果を評価するとともに、細胞内作用部位を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 食道癌細胞株におけるCDDP, 5-FUによる抗腫瘍効果と $\gamma$ H2AX, Rad51発現の経時的变化の検討：食道扁平上皮癌細胞株TE-1およびTE-11を用い、5 $\mu$ MのCDDP(1時間)および3 $\mu$ Mの5-FU(24時間)を添加し、抗腫瘍効果をcolony formation assayにて7日後に評価した。また、上記と同様の条件でCDDP, 5-FUで処理したTE-1, TE-11において、0, 1, 12, 24, 36, 48, 72時間後に細胞を固定し、 $\gamma$ H2AXとRad51 focusの量的変化(kinetics)を経時的に観察した。

(2) 食道癌細胞株におけるribonucleotide reductase M1 (RRM-1)蛋白発現の解析：5-FU処理を行ったTE-11細胞株における5-FU代謝関連酵素RRM-1蛋白の発現レベルをimmunoblotting analysisで定量し、5-FU未処理の細胞株と比較した。

3) 食道癌細胞株におけるRRM-1蛋白のノックダウン：TE-11細胞株においてsiRNAを用いてRRM-1をノックダウンし、CDDPおよび5-FU処理時の $\gamma$ H2AXとRad51フォーカス形成の変化と抗癌剤感受性の変化を評価した。

4) Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)-1阻害剤による抗癌剤感受性の変化：TE-11細胞株においてPARP-1阻害剤を単独あるいはCDDPとともに添加し、 $\gamma$ H2AXとRad51フォーカス形成の変化と抗癌剤感受性の変化を評価した。

## 4. 研究成果

1) 代表的な食道扁平上皮癌細胞株であるTE1およびTE11を用い、CDDPおよび5-FUに対する感受性を検討したところ、TE1がTE11と比較して高感受性を示した。

2) TE1, TE11ともに $\gamma$ H2AXフォーカス陽性細胞数は抗癌剤処理後およそ12時間まで増加し続けるが、TE11ではその後速やかにフォーカスの消退を認めるのに対して、感受性の高いTE1ではさらに36時間までそのフォーカス陽性細胞数は増加し続けた。

3) TE11では経時的なRad51フォーカス陽性細胞数の増加が認められたが、TE1においてはcontrolと比較してほとんどRad51フォーカスの発現は認められなかった。

4) TE11において、5-FU処理後の $\gamma$ H2AX蛋白発現は5-FU代謝関連酵素ribonucleotide reductase M1 (RRM-1)蛋白の発現レベルと相関し、RRM-1が5-FUによるDNA損傷に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらにTE11でRRM-1をノックダウンすると、RAD51フォーカス形成の減少を認め、5-FU/CDDP併用に対する感受性が抑制された。

5) Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)-1阻害剤はCDDPと協同してTE11の感受性を増強させ、この効果はCDDPと5-FUを組み合わせる場合と同様であった。さらにRad51をノックダウンすると、TE11のCDDP/5-FUおよびCDDP/PARP-1阻害剤に対する感受性が増強し、相同組換え修復がCDDP/5-FUの相乗効果に関与していると考えられた。

以上の結果より、 $\gamma$ H2AXの経時的变化が抗癌剤感受性と相関することが新たに明らかとなり、今後抗癌剤感受性のバイオマーカーとなる可能性がある。また、Rad51の発現低下によるDNA修復能の低下が抗癌剤感受性と関わっている可能性が示された。

さらに、従来代謝拮抗剤として考えられていた5-FUもDNAの二重鎖切断を引き起こしていること、およびRRM-1発現の程度により5-FUの抗癌作用機序が異なってくることが示唆された。さらに相同組換え修復経路がCDDP/5-FUの相乗効果と深く関わっており、5-FUはCDDPによりもたらされたDNA損傷をRAD51蛋白が関与するタイプに修飾することが明らかとなった。

## 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12件)

1. Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H,

Ikura T, Niida H, Nakanishi M, Okada M, Tashiro S: Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. *Int J Oncol* 42:1951-1960, 2013 (査読・有)

2. Sasada S, Miyata Y, Tsutani Y, Tsuyama N, Masujima T, Hihara J, Okada M: Metabolic analysis of dynamic response and drug resistance of gastric cancer cells to 5-fluorouracil. *Oncol Rep* 29:925-31, 2013 (査読・有)

3. Hamai Y, Hihara J, Aoki Y, Taomoto J, Kishimoto I, Kobayashi Y, Miyata Y, Aikata H, Chayama K, Okada M: Airway stenting for tracheal obstruction due to lymph node metastasis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 33:1761-4, 2013 (査読・有)

4. Tsubokawa N, Hamai Y, Hihara J, Emi M, Miyata Y, Okada M: Laparoscopic thoracic duct clipping for persistent chylothorax after extrapleural pneumonectomy. *Ann Thorac Surg* 93:e131-2, 2012 (査読・有)

5. Hamai Y, Hihara J, Emi M, Aoki Y, Okada M: Esophageal reconstruction using the terminal ileum and right colon in esophageal cancer surgery. *Surg Today* 42:342-50, 2012 (査読・有)

6. Hamai Y, Hihara J, Emi M, Aoki Y, Miyata Y, Okada M: Airway stenting for malignant respiratory complications in esophageal cancer. *Anticancer Res* 32:1785-90, 2012 (査読・有)

7. Hamai Y, Hihara J, Emi M, Aoki Y, Kushitani K, Tanabe K, Okada M: Leiomyosarcoma of the sigmoid colon with multiple liver metastases and gastric cancer: a case report. *BMC Gastroenterol* 12:98, 2012 (査読・有)

8. Emi M, Hihara J, Hamai Y, Aoki Y, Okada M, Kenjo M, Murakami Y: Neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 69:1499-505, 2012 (査読・有)

9. Aoki Y, Hihara J, Sakogawa K, Taomoto J, Hamai Y, Emi M, Okada M: Advanced esophageal cancer with an esophago-bronchial fistula successfully treated by chemoradiotherapy following esophageal bypass surgery: report of a case. *Surg Today* 42:1088-90, 2012 (査読・有)

10. Tsutani Y, Miyata Y, Misumi K, Ikeda T, Mimura T, Hihara J, Okada M: Difference in prognostic significance of maximum standardized uptake value on [18F]-fluoro-2-deoxyglucose positron

emission tomography between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol* 41:890-6, 2011 (査読・有)

11. Hamai Y, Hihara J, Emi M, Okita R, Shimizu K, Okada M: Successful management of multiple esophagorespiratory fistulas using two types of stent: report of a case. *Surg Today* 41:560-2, 2011 (査読・有)

12. Aoki Y, Hihara J, Emi M, Sakogawa K, Hamai Y, Okada M: Advanced esophageal cancer with situs inversus totalis successfully treated with chemoradiotherapy followed by esophagectomy: case report. *Hiroshima J Med Sci* 60:21-4, 2011 (査読・有)

[学会発表] (計 18 件)

1. Hihara J, Hamai Y, Emi M, Aoki Y, Miyata Y, Okada M: Esophageal bypass operation prior to definitive chemoradiotherapy in advanced esophageal cancer with airway invasion. 13th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, Venice, Italy, 2012/10/163.

2. 檜原淳, 恵美学, 浜井洋一, 青木義朗, 宮田義浩, 岡田守人: 進行食道癌に対する術前治療の成績と課題. 第 67 回日本消化器外科学会総会, 富山, 2012/7/18

3. 青木義朗, 迫川賢士, 檜原淳, 浜井洋一, 恵美学, 岡田守人, 田代聡: 5-Fluorouracil の抗腫瘍効果における Ribonucleotide reductase-M1 の役割. 第 66 回日本食道学会学術集会, 軽井沢, 2012/6/22

4. 檜原淳, 浜井洋一, 恵美学, 青木義朗, 岡田守人: 切除不能局所進行食道癌に対する docetaxel+5-FU と放射線同時併用療法の臨床第 II 相試験. 第 66 回日本食道学会学術集会, 軽井沢, 2012/6/21

5. 青木義朗, 迫川賢士, 檜原淳, 恵美学, 浜井洋一, 岡田守人, 田代聡: 5-Fluorouracil 作用時の DNA 障害における ribonucleotide reductase-1 の役割に関する検討, 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 千葉, 2012/4/12

6. 迫川賢士, 青木義朗, 濱井洋一, 恵美学, 檜原淳, 岡田守人, 田代聡: 食道癌細胞株における抗癌剤感受性と DNA 二本鎖切断修復に関する検討 併用効果について, 第 49 回日本癌治療学会学術集会, 名古屋, 2011/10/29

7. Hihara J, Hamai Y, Emi M, Aoki Y, Sakogawa K, Miyata Y, Okada M: Neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced esophageal cancer: analysis of pattern of recurrence and prognostic factors for survival. 2011 European Multidisciplinary

Cancer Congress, Stockholm, Sweden, 2011/9/26

8. 迫川賢士, 青木義朗, 濱井洋一, 恵美学, 檜原淳, 岡田守人, 田代聡: 食道癌細胞株における抗癌剤感受性と DNA 二本鎖切断に関する検討 2 剤併用効果について, 第 65 回日本食道学会学術集会, 仙台, 2011/9/26

9. 青木義朗, 田代聡, 迫川賢士, 檜原淳, 恵美学, 濱井洋一, 岡田守人: DNA 二重鎖切断に着目した 5-Fluorouracil の作用機序と感受性に関する検討, 第 65 回日本食道学会学術集会, 仙台, 2011/9/26

10. 檜原淳, 濱井洋一, 恵美学, 青木義朗, 迫川賢士, 宮田義浩, 岡田守人: 術前化学放射線療法の治療成績と問題点. 第 65 回日本食道学会学術集会, 仙台, 2011/9/26

11. 檜原淳, 濱井洋一, 恵美学, 青木義朗, 伊富貴雄太, 迫川賢士, 宮田義浩, 岡田守人: 食道癌に対する術前化学放射線療法適応症例の検討, 第 66 回日本消化器外科学会総会, 名古屋, 2011/7/15

12. 迫川賢士, 青木義朗, 濱井洋一, 恵美学, 檜原淳, 岡田守人: 食道癌細胞株における抗癌剤感受性と DNA 二本鎖切断の修復に関する検討 2 剤併用効果について, 第 66 回日本消化器外科学会総会, 名古屋, 2011/7/13

13. 青木義朗, 迫川賢士, 檜原淳, 恵美学, 濱井洋一, 岡田守人, 田代聡: DNA 二重鎖切断に着目した 5-Fluorouracil の作用機序の解明, 第 66 回日本消化器外科学会総会, 名古屋, 2011/7/13

14. 迫川賢士, 青木義朗, 濱井洋一, 恵美学, 檜原淳, 岡田守人, 田代聡: 食道癌細胞株における抗癌剤感受性と DNA 二本鎖切断の修復に関する検討 2 剤併用効果について, 第 111 回日本外科学会定期学術集会, 東京 (紙上開催), 2011/5/27

15. 檜原淳, 恵美学, 濱井洋一, 青木義朗, 迫川賢士, 岡田守人, 西淵いくの, 村上祐司, 権丈雅浩, 永田 靖: 再発形式からみた術前化学放射線療法の問題点と対策. 第 48 回日本癌治療学会総会, 京都, 2010/10/28

16. Hihara J, Hamai Y, Emi M, Aoki Y, Miyata Y, Okada M: Clinical results of neoadjuvant chemoradiotherapy for advanced esophageal squamous cell carcinoma. 12th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, Kagoshima, Japan, 2010/9/3

17. Hihara J, Hamai Y, Emi M, Aoki Y, Miyata Y, Okada M: Clinical result of neoadjuvant chemoradiotherapy for resectable esophageal cancer. 9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, Gifu, Japan, 2010/8/27

18. 檜原淳, 濱井洋一, 恵美学, 青木義朗, 迫川賢士, 鈴木崇久, 田邊和照, 岡田守人:

進行食道扁平上皮癌に対する術前化学放射線療法の治療成績と問題点, 第 65 回日本消化器外科学会総会. 下関, 2010/7/14

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/genge/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

檜原 淳 (HIHARA JUN)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号: 10322744

### (2) 研究分担者

岡田 守人 (OKADA MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 70446045

### (3) 連携研究者

田代 聡 (TASHIRO SATOSHI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 20243610