

## 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 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年～平成 24 年

課題番号：22591864

研究課題名（和文） $\gamma$ H2AX を用いた抗癌剤作用機序の解明と個別治療への応用、および治療効果判定研究課題名（英文）DNA damage detected with  $\gamma$ H2AX induced by anticancer drugs on ovarian clear cell carcinoma.

研究代表者

杉山 徹 (SUGIYAMA TORU)

研究者番号：岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：40162903

研究成果の概要（和文）：卵巣癌(明細胞腺癌)、子宮体癌、子宮頸癌治療における抗癌剤作用機序を DNA 傷害、アポトーシス誘導、および細胞周期の変化を関連させて検討ができた。細胞周期と関連づけて DNA 傷害を検出することが可能となり、また抗悪性腫瘍薬によって引き起こされる DNA 傷害の存在を免疫組織化学的手法によって明瞭な個々のドットとして捉えることが可能であった。卵巣癌では carboplatin (CBDCA)は cisplatin (CDDP) 耐性の明細胞腺癌株にも効力を発揮し、かつ S 期および G2/M 期細胞に DNA 傷害を引き起こし apoptosis へ移行させるという結果が得られた。しかし、CDDP と CBDCA は細胞株間で感受性の違いがみられ、また paclitaxel (PTX) も殺細胞効果より細胞周期停止効果が主体であり、日本人に多い卵巣明細胞腺癌に特化した解析では TC 療法に低感受性である可能性が示唆された。 $\gamma$ H2AX の免疫組織学的検出は DNA 傷害程度を判定量的に評価できる可能性が示唆された。子宮類内膜腺癌では key drug である doxorubicin は細胞株によりアポトーシスと senescence の両方、あるいはいずれかを誘導することが示された。CDDP を添加すると全細胞株で明らかな  $\gamma$ H2AX の増加がみられ、 $\gamma$ H2AX の増加を維持したまま細胞周期が進行し、後にアポトーシスに陥っていくのが観察された。 $\gamma$ H2AX のグラフは馬蹄形を呈しており S 期を中心とした  $\gamma$ H2AX の上昇を示していた。同一薬剤であっても作用する細胞周期の違い、アポトーシスや senescence 誘導の有無において細胞間で違いがみられ、患者間で差があることが示唆された。子宮頸癌放射線治療後  $\gamma$ H2AX の免疫組織学的検出は DNA 傷害程度を判定量的に評価できる可能性が示唆された。本手法は、抗がん薬の抗腫瘍効果をみる上で極めて有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Differences in the incidences and types of DNA damage induced by antitumor agents for clear cell carcinoma (CCC) of the ovary, endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus, and squamous cell carcinoma of the cervix were determined using phosphorylation of histon H2AX ( $\gamma$ H2AX).

1. Clear cell adenocarcinoma of the ovary (CCC): After administration of cisplatin (CDDP), DNA damage was frequent in S-phase cells, while cell-cycle arrest occurred in the G1 and G2/M phases and  $\gamma$ H2AX did not increase in CDDP-resistant cells. Sensitivities to CDDP

and carboplatin(CBDCA) differed between the two cell lines. The antitumor effect of paclitaxel (PTX) is induced by G2/M arrest, and combination treatment with CBDCA, inducing DNA damage in G2/M-phase cells, might be effective. This is the first study in Japan to evaluate the antitumor activity of anticancer agents by focusing on the relationship between the cell cycle and DNA damage using  $\gamma$ H2AX as an indicator. The immunocytochemical method used in this study detects  $\gamma$ H2AX, which indicates DNA damage even at very low concentrations and with high sensitivity. Therefore, a promising method of easily and rapidly identifying agents potentially effective against CCC.

2. Endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus: The study revealed significant differences among the cell lines in the effects of DNA damage vis-a-vis cell cycle phase specificity, induction of apoptosis or senescence following drug treatment. doxorubicin (DOX) treatment showed little cell cycle specificity in terms of induction of  $\gamma$ H2AX, and its mechanism, which is similar to another anthracycline DNA topoisomerase II inhibitor mitoxantrone, may involve oxidative DNA damage modulated by other factors. Treatment with CDDP and 5-fluorouracil (5-FU) led to phosphorylation of H2AX preferentially in S-phase cells, consistent with the induction of replication stress. The response of Ishikawa cells expressing wt p53 was different compared to other cell lines. The data suggest that the treatment of endometrioid adenocarcinoma with these drugs may have to be customized to individual patients.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床・産婦人科学

キーワード：癌、病理学、酵素、核酸

#### 1. 研究開始当初の背景

婦人科がんの治療は手術と化学療法が重要である。化学療法においてはタキサン製剤に加えてDNAに障害を及ぼす白金製剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤等が用いられる。これらの薬剤の作用機序は概ね判明しているが、個々の腫瘍における

詳細な細胞増殖抑制機序は不明な点が多い。抗がん剤の推奨は多くの臨床試験結果に基づいており、薬剤自体の作用機序に基づくことは少ない。

その一方、婦人科がん領域でも分子標的薬の開発が加速しており、特に高頻度である high-grade serous では BRCA

mutation/methylation が問題となっている。血管新生阻害剤とともに poly(adenosinediphosphate {ADP}-ribose) polymerase (PARP) は DNA 修復に重要な役割を有することが明らかにされ、この阻害も重要な治療戦略と期待されており、DNA 障害を惹起する抗がん剤との併用の検討がその機序を含めて重要な研究に位置づけられる。これらの背景から以下に示す本研究を行ない、今後の分子標的薬への研究と繋げる。

いずれの抗がん剤も一次的あるいは二次的に DNA を標的とするが DNA 傷害の詳細は殆ど解明されていない。その一つの要因として DNA 傷害 (DNA 断裂) を検出する有効な方法がなかったことが挙げられる。今まで DNA 断裂の検出にはコメットアッセイが用いられてきたが、この方法はゲルに個々の細胞を包埋し断裂した DNA を電気泳動することで断片化した DNA によってできるスメアを測定して DNA 断裂の程度を調べるものであり感度は高くはない。

近年、DNA 傷害のうち最も重篤な二本鎖断裂 (DSB) の際には ataxia telangiectasia mutated protein (ATM) が活性化し、活性化 ATM が DSB 周辺の DNA コアヒストンを形成するヒストン H2AX の特定部位をリン酸化することが判明した (図 1)。このリン酸化ヒストン H2AX は  $\gamma$ H2AX と呼ばれる。 $\gamma$ H2AX の作用は不明であるが DNA 修復に係わることが想定されている。活性化 ATM は同時に Chk2, p53 など細胞周期関連タンパクを活性化し細胞周期を停止させる作用も有する。すなわち ATM からのカスケードは薬剤や放射線などによって惹起された DNA 傷害の際に細胞周期を停止させて DNA 修復を行う極めて重要な機構である。DSB の際には DSB 周囲のメガベースレベルの領域のヒストン H2AX がリン酸化されるため、 $\gamma$ H2AX の特異抗体を用いれば個々

の DSB を可視化することができ、また  $\gamma$ H2AX 量を測定することで DSB を定量化できる。

本研究ではこのことに着目し、培養細胞に各種抗がん剤を加えて培養した後、 $\square$ H2AX と DNA を蛍光二重染色により FCM で同時測定し、DNA 量を指標にした細胞周期の上から  $\gamma$ H2AX 量を検出することで抗癌剤の作用機序を解明することを第一の目的とする。図 2 に本方法を用いた予備的実験結果を示す。この実験ではトポイソメラーゼ阻害剤により S 期細胞のみに特異的に DSB が生じているのが分かる。4 時間後にはトポイソメラーゼ阻害剤によって生じた一次的 DBS の検出量を遙かに超えた量の  $\gamma$ H2AX を有する細胞集団がみられる。これらの細胞集団がアポトーシスであることは今までの実験で証明している (Huang X, et al Cell Prolif 2005)。

このように本方法は DNA 傷害因子によってもたらされる一次的 DSB はもとより、アポトーシスによる DSB も検出でき、両者は  $\gamma$ H2AX 検出量の違いによって明確に区別されるのである。すなわち細胞周期の如何なる時期に DSB が生じアポトーシスになるのか、DNA 傷害を主たる作用効果とする抗がん剤の作用機序解明に欠かせない細胞周期、DSB、およびアポトーシスの三者を解析できる優れた方法である。培養細胞を用いて基礎的実験を行った後は、本方法を用い個別治療への応用を検討する。さらに今までは病理切片のヘマトキシリンエオジン染色によっていた抗がん剤や放射線の治療効果判定を、病理切片上で免疫組織化学的に  $\gamma$ H2AX を検出することによってより客観的に評価する方法を確立する。

## 2. 研究の目的

DNA 損傷マーカー  $\gamma$ H2AX を用いて、(1)婦人科腫瘍に用いられる抗癌剤の作用機序を細

胞周期における DNA 傷害の点から明らかにし、(2)個別治療への応用を図るとともに、(3)病理切片上での治療効果判定法を確立する。婦人科で用いられる抗癌剤の多くは DNA を標的とするが、DNA 損傷を検出するよい方法が無かったため詳細な DNA 傷害の機序は不明である。γH2AX は免疫化学的に検出できる優れた DNA 損傷マーカーでありフローサイトメトリー (FCM) により細胞周期とともに検出することで詳細な薬剤の作用を調べる。また γH2AX を組織切片に応用することで腫瘍細胞の DNA-傷害状況を把握でき抗癌剤効果を客観的に評価できる。

### 3. 研究の方法

(1) 抗癌剤の作用機序を DSB に焦点を置き細胞周期との関連において解析する

卵巣漿液性・明細胞腺癌、子宮内膜癌の培養細胞株に、臨床で用いられる抗癌剤を加えて培養し、FCM により細胞周期の変化や、DSB およびアポトーシスを細胞周期との関連から調べる。

(2) 細胞間で抗がん剤効果が異なる機序を調べる

1 の結果細胞間での抗がん剤の効果の違いが見られた場合、p53 等のがん抑制遺伝子の欠失や、細胞周期関連蛋白の発現の相違が抗がん剤応答の違いになって表れる可能性が考えられ、これらの蛋白の発現を調べることで抗がん剤の作用機序に迫る。

(3) 細胞増殖停止がアポトーシスか senescence によるものかを調べる

1 の結果、アポトーシスによらない細胞周期停止が見られた場合、senescence の可能性がある。そこで senescence のマーカーである p16 や senescence β-galactosidase の発現

を細胞化学的に調べる。

(4) 病理組織切片での γH2AX の免疫組織化学的検出による抗がん剤や放射線効果の判定

### 4. 研究成果

DNA 傷害の定量的な検出法はなく、いかに標的細胞で DNA 傷害が誘導され細胞増殖抑制が導かれるかの詳細な検討は行われてこなかった。コアヒストン蛋白の構成要素の一つにヒストン H2AX 蛋白がある。近年、DNA 二本鎖断裂時、断裂部位近傍のヒストン H2AX の 139 番セリンのリン酸化が生じる事がわかり、γH2AX と呼ばれる。一カ所の DNA 二本鎖断裂が生じた際にその近傍に数千分子の γH2AX が生じるため、γH2AX の特異抗体を用いれば DNA 二本鎖断裂部位をドット状に検出できる。γH2AX を蛍光抗体で検出すれば蛍光顕微鏡下に DNA 二本鎖断裂部位をドット状に観察することも可能であり、フローサイトメトリーでは DNA 二本鎖断裂の程度を判定的に測定できる。さらにアポトーシスによる二本鎖断裂においても γH2AX が生じ、かつその量は抗癌剤等によってもたらされる一次的な二本鎖断裂を遙かに凌ぐ断裂を生じるために、検出される γH2AX の量的違いとして認識可能である。

最終年度、培養腫瘍細胞に抗癌剤を加え、経時的に γH2AX と DNA 量をフローサイトメトリーで検出することにより、細胞周期と関連して DNA 二本鎖断の判定的測定およびアポトーシス誘導の測定により抗癌剤効果を調べた。本研究では婦人科系腫瘍における、本法による抗癌剤作用機序を DNA 傷害、アポトーシス誘導、および細胞周期の変化を関連させて検討した。また、子宮頸がん放射線治療後の病理組織検体を用い、DNA 傷害を免疫組

組織学的に  $\gamma$ H2AX を検出することによって治療効果を調べた。抗  $\gamma$ H2AX 抗体を用いた免疫染色では、HE 染色所見で放射線効果がみられるものは  $\gamma$ H2AX が強く検出された。さらに HE 染色で核に明かな異常がない腫瘍細胞にも  $\gamma$ H2AX が検出されるものがあった。よって  $\gamma$ H2AX の免疫組織学的検出は DNA 傷害程度を判定量的に評価できる可能性が示唆された。

#### 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 7 件)

1. Tadahiro Shoji, Eriko Takatori, Tatsunori Saito, Hideo Omi, Masahiro Kagabu, Fumiharu Miura, Satoshi Takeuchi, Toru Sugiyama. Neoadjuvant chemotherapy using platinum- and taxane-based regimens for bulky stage Ib2 to IIb non-squamous cell carcinoma of the uterine cervix. 査読有, Cancer Chemotherapy and Pharmacology:12/2012
2. Toru Sugiyama. Second-Line Chemotherapy for Platinum- and Taxane-Resistant Epithelial Ovarian Cancer: Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD), Irinotecan, and Combination Therapies at Lower Doses. 02/2012; , ISBN: 978-953-307-810-6
3. Eriko Takatori, Tadahiro Shoji, Seisuke Kumagai, Takashi Sawai, Akira Kurose, Toru Sugiyama. Are platinum agents, paclitaxel and irinotecan effective for clear cell carcinoma of the ovary? DNA damage detected with  $\gamma$ H2AX induced by anticancer agents. 査読有, Journal of Ovarian Research; 5(1):16. 2012
4. Tadahiro Shoji, Seisuke Kumagai, Akira Yoshizaki, Yoshihito Yokoyama, Toshiro Fujimoto, Tadao Takano, Npbuo Yaegashi, Kenji Nakahara, Hiroshi Nishiyama, Toru Sugiyama. Efficacy of neoadjuvant chemotherapy followed by radical hysterectomy in locally advanced non-squamous carcinoma of the uterine cervix: a retrospective multicenter study of Tohoku Gynecologic Cancer Unit. 査読有, European journal of gynaecological oncology. 33(4):353-7. 2012
5. Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, Atsushi Kittaka.  $\beta$ -PNA: peptide nucleic acid (PNA) with a chiral center at the  $\beta$ -position of the PNA backbone. 査読有, Bioorganic & medicinal chemistry letters; 21(24):7317-20. 2011
6. Masahiko Shibasaki, Chihaya Maesawa, Kiyomi Akasaka, Shuya Kasai, Shinji Yasuhira, Kiminori Kanno, Ikue Nakayama, Toru Sugiyama, Go Wakabayasi, Tomoyuki Masuda, Nozomu Mori. Transcriptional and post-transcriptional regulation of  $\beta$  III-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells. 査読有, International Journal of Oncology; 40(3):695-702. 2011
7. 高取恵里子、黒瀬頭、庄子忠宏、杉山徹 DNA 損傷修復マーカーを用いた卵巣明細胞腺癌に対する抗癌剤の細胞効果の検討. 岩手医学会誌、査読有、62(1)47-58、

2010

8. Maki Ikeda, Akira Kurose, Eriko Takatori, Toru Sugiyama, Frank Traganos, Zbigniew Darzynkiewicz, Takashi Sawai. DNA damage detected with gammaH2AX in endometrioid adenocarcinoma cell lines. 査読有, International Journal of Oncology; 36(5):1081-8. 2010

[学会発表] (計5件)

1. 高取恵里子、永沢崇幸、小見英夫、利部正裕、本田達也、諸原雄一、庄子忠宏、三浦史晴、竹内聡、吉崎陽、杉山徹、佐藤顕. 局所進行子宮頸がんに対する術前化学療法 (NAC) の位置付け. 第64回日本産婦人科学会総会、平成24年4月14日、神戸市、
2. E. Takatori, T. Shoji, S. Kumagai, S. Takeuchi, T. Sugiyama. Are platinum agents, paclitaxel, and irinotecan effective for clear cell carcinoma of the ovary? DNA damage detected with  $\gamma$ H2AX. The 17th international meeting of the European Society of Gynecological Oncology, 平成23年9月30日、イタリア、ミラノ
3. 高取恵里子、庄子忠宏、熊谷晴介、竹内聡、杉山徹. DNA 損傷マーカー  $\gamma$ H2AX を用いた卵巣明細胞腺癌における抗癌剤の抗腫瘍効果解析. 第63回日本産婦人科学会総会、平成23年8月30日、大阪市
4. 黒瀬 顕. サイトメトリ的細胞動態解析と臨床病理への応用. 第28回北日本病理研究会. 平成23年6月10日、弘前市
5. 黒瀬 顕. 細胞核 DNA 傷害を可視化・定量化する. シンポジウム3「細胞診にお

けるクロマチンの意義]. 第52回日本臨床細胞学会総会. 平成23年5月21日、福岡市

[図書] (計2件)

1. 杉山徹. 苛原稔、原田省、鈴木直、川名敬. 中外医学社. EB M婦人科疾患の治療2013-2014. 2013、377-383
2. 杉山徹. 中外医学社. 婦人科がん科学療法ハンドブック. 2011. 160-164

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 徹 (SUGIYAMA TORU)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40162903

(2) 研究分担者

黒瀬 顕 (KUROSE AKIRA)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号: 70244910

(3) 研究分担者

熊谷 晴介 (KUMAGAI SEISUKE)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10326647