

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24249067

研究課題名(和文)放射線癌治療効果を高める因子の基礎研究

研究課題名(英文)Basic research to explore factors to improve effectiveness of radiation therapy

研究代表者

岡安 隆一 (OKAYASU, RYUICHI)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：50356135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：世界をリードする重粒子線治療をさらに有効にするため、重粒子線照射とヒートショック蛋白90阻害剤の併用に関する生物実験を行い、細胞と動物レベルでこの併用が癌治療に有効であること、その作用機序がDNA修復阻害にあることを示した。多くのヒートショック蛋白阻害剤のうちTAS-116と呼ばれる薬品が重粒子線、X線との併用で有用で、副作用も少なく、臨床応用に提案できると判断した。DNA修復阻害剤と放射線併用により癌細胞を老化に導き成長抑制させる研究では、低濃度の阻害剤で併用効果があり、その機序が細胞周期上での異常、またある種の癌細胞で、老化様の細胞の増加が示され、今後の新治療域発展への基礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the world leading heavy ion radiotherapy, we studied the combination regimen of Hsp90 inhibitor and carbon-ion irradiation. After screening and studying various inhibitors, we found that most Hsp90 inhibitors can cause tumor specific radio-sensitization with heavy ions and the cause of this was shown to be inhibition of DNA double strand break (DSB) repair by the inhibitors. Among these we suggest that an Hsp90 inhibitor TAS-116 might be most recommendable clinically due to its low toxicity.

We also studied the combination effects of a DNA DSB repair inhibitor NU7441 and radiation including heavy ions. Our investigation indicated that a non-toxic concentration of NU7441 radio-sensitized tumor cells and the cause seems to be related to disturbed cell cycle progression. Moreover, some tumor cells show senescence like appearance after the combination treatment. Our study forms a biological basis for a new combination cancer therapy including particle radiation.

研究分野：放射線治療生物学

キーワード：Hsp90阻害剤 重粒子線 放射線増感 TAS-116 DNA二重鎖切断修復 DNA-PK阻害剤 細胞周期 細胞老化

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

- (1) 研究代表者らは2006年にヒートショック蛋白90 (Hsp90) の阻害剤 17AAG と X 線照射との併用で癌細胞特異的に放射線増感が起きること、またその原因が DNA 二重鎖切断 (double strand break: DSB) の修復阻害、特に相同組換え修復 (Homologous recombination repair: HRR) 経路阻害、によることを細胞レベルで示した (Noguchi et al 2006)。しかしながら日本がリードする重粒子線照射と HRR 修復経路阻害の併用効果は不明であった。予備実験では細胞レベルで HRR 修復阻害と重粒子線併用による放射線増感効果は確認していた。そこで代表者らは、細胞レベル動物レベルで、様々な Hsp90 阻害剤等と重粒子線の併用効果を検討することにした。
- (2) Azad らは DNA DSB 修復経路のうち非相同末端修復 (NHEJ) 蛋白 DNA-PK の特異的阻害と放射線の組み合わせが癌細胞の老化 (senescence) を促進し (Azad et al Mol. Cancer Res 2011)、その増殖を停止させる提案をした。代表者らは DNA-PK 阻害剤と X 線及び重粒子線を用い、この仮説が成り立つかどうかを検討することとした。

2. 研究の目的

- (1) 相同組換え修復 HRR の抑制と重粒子線（炭素線）照射を組み合わせることで、更なる癌細胞の放射線増感を図り、より高い癌治療率に貢献する。
- (2) 非相同末端結合 (NHEJ) 修復蛋白 DNA-PK を特異的に抑制することにより放射線照射された癌細胞の老化を図り、その増殖を大幅に阻害し臨床応用の基礎を築く。

3. 研究の方法

基本的に培養細胞（細胞バンクより入手）、また動物実験はヌードマウス（詳細は以下）を用いて研究を行った。

細胞培養：ヒト癌細胞株 A549、H1299（以上肺癌）、HeLa 細胞（子宮頸癌）、ヒト正常細胞として HFL-I、HFL-III 細胞が用いられた。いずれも理研セルバンクより提供を受け、炭酸ガスインキュベーター（5% CO₂ 37°C）で培養された。

薬品、放射線照射：Hsp90 阻害剤 17AAG、PU-H71、TAS-116、DNA-PK 阻害剤：

NU7441 他は全て一般業者より購入された。これらの阻害剤は放射線照射前に培養細胞に加えられた。放射線照射は放射線医学総合研究所（放医研）の X 線発生装置、また重粒子線照射は放医研の HIMAC の生物実験専用ポートが用いられ、線量・線量率等は実験ごとに正確に管理された。

細胞生存率：培養細胞の薬品/放射線照射後の生死はコロニー形成法を用いて定量化され、プレート効率（処理なしの際のコロニー形成の割合）を持って補正され、グラフ化された。

DNA DSB 修復：DSB マーカーの YH2AX フォーカス法（免疫染色法）を用いて切断数を定量。HRR 修復経路の定量は Rad 51 蛋白のフォーカスのカウントで、NHEJ 修復経路はリン酸化 DNA-PKcs 抗体を用いて、定量化された。一般的にフォーカス数の減少により修復が起こったと判断した。YH2AX 抗体、Rad51 抗体、DNA-PKcs 抗体は業者より購入された。さらに Western blot 法を用いて DNA DSB 修復関連蛋白 (Ku70/Ku80, DNA-PKcs, EGFR, ERK 等) 発現の定量化を行い、修復阻害の状況をさらに詳しく調べた。

細胞周期解析：放射線或いは薬品/放射線併用療法後の細胞周期進行異常は、細胞を色素 (propidium iodide) で染色し、フローサイトメーターを用いて定量化した。さらにマイトーテイクカストロフィーの定量は細胞核の崩壊を定量化することにより判断する。

アポトーシス解析：アポトーシス様細胞死に関しては上記の細胞周期解析の後 subG1 期相 (G1 期の細胞より少ないレベルの DNA を持った細胞の割合) の定量によるものと、アポトーシス関連蛋白の発現を用いて判断した。

細胞老化解析：SA-βGal の発現をフローサイトメーターを用いて定量化する。さらに p21 蛋白発現の定量も行った。

動物実験：ヌードマウス (BALB/c-nu/nu マウス) の足にヒト癌細胞を移植し、その成長度合いを放射線/薬品処理後の癌の体積を計時的にノギスで測り定量化した。(Hirakawa et al Cancer Med 2015 発表論文⑧参照)

4. 研究成果

(1) **Hsp90 阻害剤 17AAG と重粒子線照射との併用実験**: この結果に関しては 2015 年に論文発表 (Hirakawa et al Cancer Med. 2015 発表論文^⑧)があるので、ここではごく一部を記述する。この阻害剤を用いて癌細胞レベルでも、動物レベルでも併用効果が観察された。この事実ともに、正常細胞を用いた実験では放射線作用を強める効果は、ほとんど見られなかった。ここでは *in vivo* 動物実験の結果を図 1 に示す。

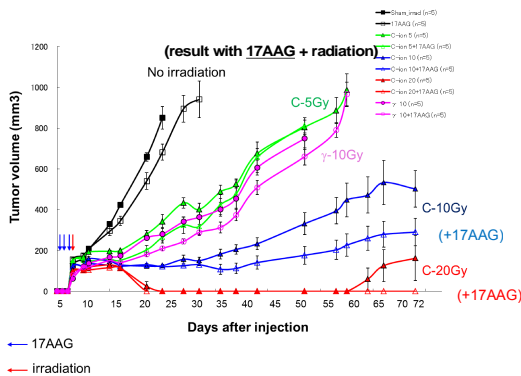


図 1 : 17AAG 前処理(照射前 3 日間)後、様々な線量の炭素線を局所照射した後の移植された癌細胞でできた腫瘍の成長曲線

17AAG で前処理してから炭素線局所照射 (1 回) すると、炭素線の場合より癌の成長がより抑制されることが判った。この原因の一つとして、DNA DSB の修復阻害が示された。特に HRR 経路が大きく阻害されていることが、図 2 の Rad51 蛋白の発現結果より推測される。

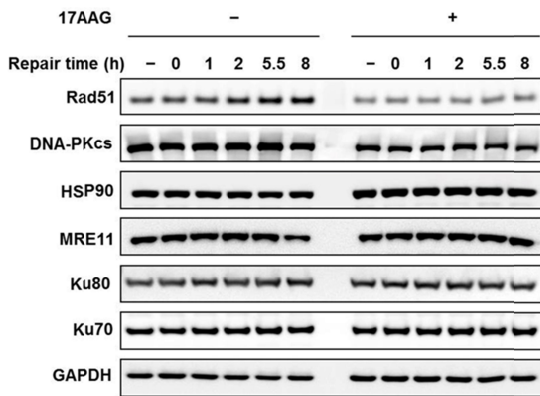


図 2 : Western blot 法による 17AAG 処理、未処理(+炭素線照射)後の様々な修復蛋白の発現比較

この論文の結論は 17AAG と重粒子線照射との併用が優れた癌抑制効果を示すということであり、その原因の一つが 17AAG による HRR 経路の阻害らしいと判断された。

(2) **Hsp90 阻害剤 PU-H71 と重粒子線照射の併用に関する基礎実験**: この結果に関しては現在論文投稿中 (Lee et al 2016 Radiotherapy and Oncology)であり、その概略を述べる。PU-H71 と重粒子線の併用においても、17AAG と同様、典型的なヒト癌細胞で放射線増感効果が観測できたが、正常細胞では併用効果は観測できなかった (図 3)。

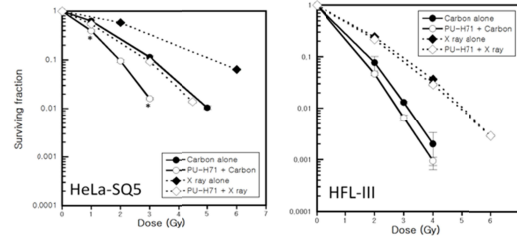


図 3 : 癌細胞(HeLa-SQ5)及び正常細胞(HFL-III)を用いた炭素線照射後の細胞生存率曲線; PU-H71 処理後(●), 未処理後(□)の比較。[参考: X 線のデータは点線で表示]

このことは PU-H71 が癌細胞特異的に重粒子線照射の効果を増強していることがわかる。この原因として、DNA DSB 修復の阻害が考えられ (図 4)、特に PU-H71 を用いたデータからは HRR 経路の修復のみならず、NHEJ 経路にも PU-H71 の影響が及んでいることが、照射後の DNA-PK (NHEJ の代表的蛋白)リン酸化の抑制によって示された (図 5)。

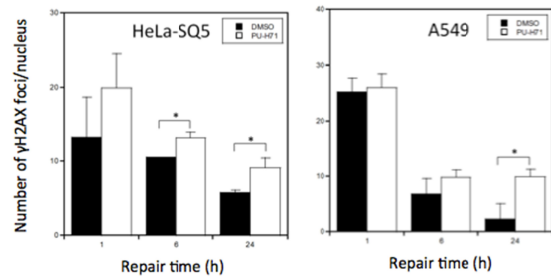


図 4 : DSB マーカー H2AX フォーカス法による PU-H71 処理 (白抜)・未処理(黒)と炭素線照射併用後の DSB の計時的変化の比較

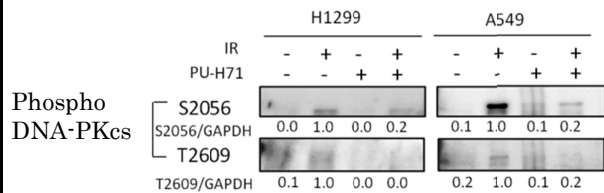


図 5 : NFEJ 蛋白 DNA-PKcs のリン酸化抗体 (S2056, T2609 サイトの 2 か所)による DNA-PK リン酸化の度合いを PU-H71 処理(+). 未処理(-)/重粒子照射(+). 非照射(-)後で比較

(3) **Hsp90 阻害剤 TAS-116 と重粒子線及び X 線照射併用による癌抑制効果**: 様々な Hsp90

阻害剤をスクリーニングする途中で Hsp90 及び の特異的阻害剤 TAS-116 に遭遇し、この薬品を用いて実験を始めたところ、これまで十分なデータが収集できたので、そのハイライトを記述する。この結果に関しては現在論文投稿準備中であり、次の 1、2 ヶ月で Cancer Research 系の雑誌に投稿予定である。細胞生存率の実験では、図 6 に示されているように TAS-116 と炭素線との併用では、2 種類の癌細胞で確実に併用効果が観察された。このことは X 線でも同様であり、また他の Hsp90 阻害剤と同じように正常細胞では、併用効果は見られなかった。

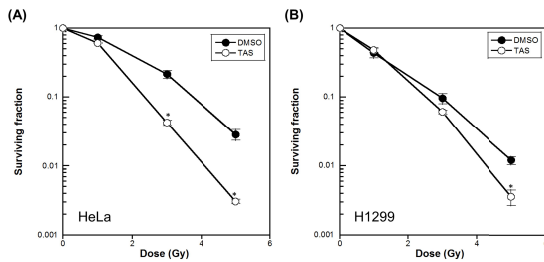


図 6：炭素線による放射線生存率曲線を 2 種類の癌細胞 (HeLa, H1299) を用いて示し、TAS-116 前処理(○)と非処理(●)の間で比較

さらに DNA DSB 修復に影響があり、PU-H71 と同様に、RAD51 の発現の減少 (図 7) より HRR 経路が、また DNA-PKcs 発現の減少 (図 8) により NHEJ 経路が TAS-116 によりかなり阻害を受けていることが判る。

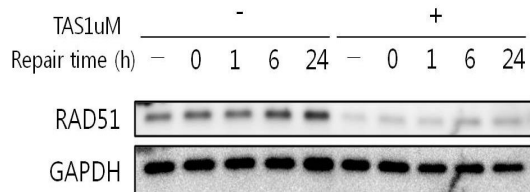


図 7：TAS-116 処理、非処理後に炭素線照射した HeLa 細胞での RAD51 発現の計時的変化の比較

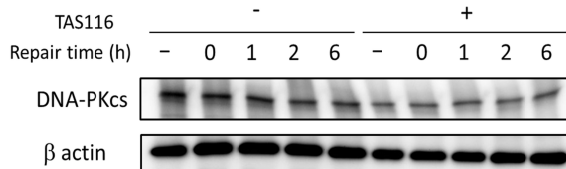


図 8：TAS-116 処理、非処理後に炭素線照射した HeLa 細胞における DNA-PKcs 発現の計時的変化の比較

またヌードマウスの足にヒトの腫瘍を移植

する動物実験の比較では炭素線 10 Gy のみの局所照射に比べ、TAS-116 で前処理したマウスでは明らかに、腫瘍の成長が遅れていることが示された (図 9)。



45 days after tumor injection

図 9：マウス移植腫瘍によるヒト癌細胞成長の比較。移植腫瘍には TAS-116 腹腔投与後に炭素線 10Gy (1 回) が局所照射され、その後の計時的変化が観測された。ここでは腫瘍細胞注入後 45 日目の腫瘍の大きさを比較

TAS-116 は最近の研究で比較的毒性が低いことが示されており (Ohkubo et al 2015)、放射線、特に重粒子線との併用においても、適切な併用療法剤の候補になると考えられる。

(4) DNA-PK 阻害剤と放射線の併用によるヒト腫瘍細胞の成長抑制の研究

この結果に関しては現在論文投稿中 (Sunada et al Cancer Sci. 2016) であり、その概要を述べる。興味深い発見としては、他の研究で使用されているよりもかなり低濃度 (0.3 uM) の DNA-PK 阻害剤 NU7441 前処理で X 線でも重粒子線照射後でも放射線増感が起こることが確認できた (図 10)。またこの現象は P53 欠損 H1299、P53 正常 A549 の両細胞株で起こるので、P53 の依存性はないことが判る。

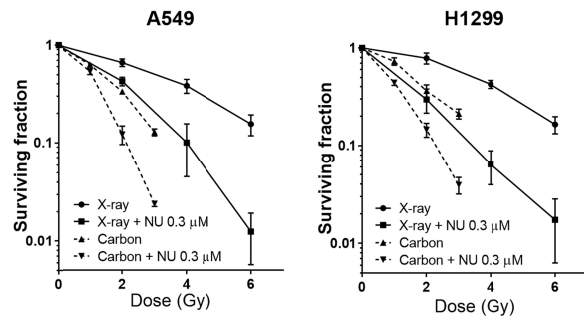


図 10：ヒト肺癌細胞 A549 (P53 野生型)、H1299 (P53 なし) を用い、低濃度 (0.3 uM) の NU7441 で前処理 (非処理) し、X 線 (実線) 及び炭素線 (点線) を照射した際の細胞生存率の比較

この実験では特に低濃度の DNA-PK 阻害剤を用いているので、ここで見られる放射線増感の原因が、よく考えられているような DNA DSB の修復阻害ではなく、細胞周期の異常に起因しているらしいことが発見できた (図 11)。どちらの細胞も NU7441 処理後、放射線照射後の G2 遅延が著しく増大し、この傾向は

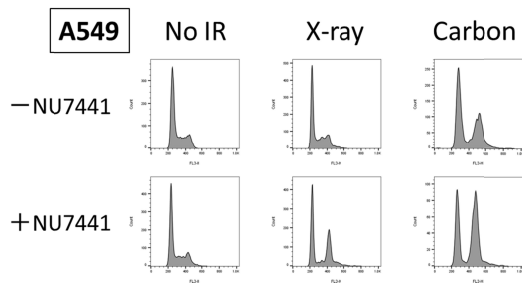
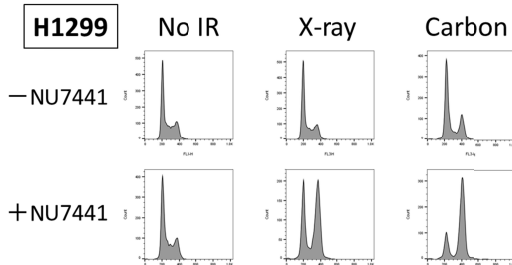


図 11 : A549, H1299 細胞を NU7441 前処理(未処理)し、放射線(X線或は炭素線)照射した後の細胞周期相の分布をフローサイトメーターで分析した際のヒストグラム

特に重粒子線照射後の H1299 細胞により強く現れている。長い G2 遅延の後、細胞の傷が直されないまま、分裂期に移行する際に、細



胞死に導かれ、放射線増感が起こる可能性が考えられる。さらに細胞老化の指標である SA-βGal 陽性の細胞を観察すると、特に H1299 細胞で炭素線照射後 NU7441 の影響がより観察されることがわかる (図 12)。

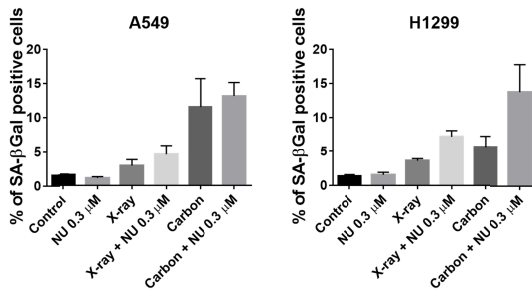


図 12 : A549, H1299 細胞を様々な条件で処理し、放射線 (4Gy) 照射 3 日後に老化様 (SA-βGal 陽性) の細胞の割合を比較

以上の結果より、細胞の生存率に影響を与えない濃度の DNA-PK 阻害剤と放射線を併用することにより、放射線増感 (併用効果促進) が複数の癌細胞で確認され、その原因の一つが細胞周期の異常であるらしいこと、また多くの癌細胞に見られるように P53 が働かない細胞では、老化様の細胞の割合が増えること等が判った。これらの結果は特に癌細胞へのターゲットが得意な粒子線治療と DNA-PK 阻害剤との組み合わせが有効な治療法である

可能性を示唆している。

以上の主研究のほかに、当科研究費のリソースを用いて多くの実験研究が行われ、以下の主な発表論文(査読付き 13 編)等でもわかるように、重粒子線の生物作用に関する基礎的貢献や、他の薬剤を用いた併用療法への提案等、多くに貢献でき、当科研究費支援に感謝である。

< 引用文献 >

- Noguchi M, Yu D, Hirayama R, Ninomiya Y, Sekine E, Kubota N, Ando K, Okayasu R. Biochem Biophys Res Commun. 2006 351:658-63
 Azad A, Jackson S, Cullinane C, Natoli A, Neilsen PM, Callen DF, Maira SM, Hackl W, McArthur GA, Solomon B. Mol Cancer Res. 2011 9:1696-707
 Ohkubo S, Kodama Y, Muraoka H, Hitotsumachi H, Yoshimura C, Kitade M, Hashimoto A, Ito K, Gomori A, Takahashi K, Shibata Y, Kanoh A, Yonekura K. Mol Cancer Ther. 2015 14:14-22

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文] (計 13 件) 全て査読有の論文
 Fujii Y, Genet MD, Roybal EJ, Kubota N, Okayasu R, Miyagawa K, Fujimori A, Kato TA. Comparison of the bromodeoxyuridine-mediated sensitization effects between low-LET and high-LET ionizing radiation on DNA double-strand breaks. Oncol Rep. 2013 29:2133-9. DOI: 10.3892/or.2013.2354
 Shirai H, Fujimori H, Gunji A, Maeda D, Hirai T, Poetsch AR, Harada H, Yoshida T, Sasai K, Okayasu R, Masutani M. Parg deficiency confers radio-sensitization through enhanced cell death in mouse ES cells exposed to various forms of ionizing radiation. Biochem Biophys Res Commun. 2013 435:100-6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.048
 Shimizu N, Nakajima NI, Tsunematsu T, Ogawa I, Kawai H, Hirayama R, Fujimori A, Yamada A, Okayasu R, Ishimaru N, Takata T, Kudo Y. Selective enhancing effect of early mitotic inhibitor 1 (Emi1) depletion on the sensitivity of doxorubicin or X-ray treatment in human cancer cells. J Biol Chem. 2013 288:17238-52. DOI: 10.1074/jbc.M112.446351
 Liu C, Kawata T, Furusawa Y, Zhou G, Inoue K, Fukada J, Kota R, George K, Cucinotta F, Okayasu R. Chromosome aberrations in normal human fibroblasts analyzed in G0/G1 and G2/M phases after exposure in G0 to radiation with different linear energy transfer (LET). Mutat Res. 2013 756:101-7. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.05.005

Nakajima NI, Brunton H, Watanabe R, Shrikhande A, Hirayama R, Matsufuji N, Fujimori A, Murakami T, Okayasu R, Jeggo P, Shibata A. Visualisation of γ H2AX foci caused by heavy ion particle traversal; distinction between core track versus non-track damage. PLoS One. 2013 8:e70107 DOI:10.1371/journal.pone.0070107.eCollection 2013

Yajima H, Fujisawa H, Nakajima NI, Hirakawa H, Jeggo PA, Okayasu R, Fujimori A. The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. DNA Repair (Amst). 2013 12:936-46. DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.08.009

Sato K, Imai T, Okayasu R, Shimokawa T. Heterochromatin domain number correlates with X-ray and carbon-ion radiation resistance in cancer cells. Radiat Res. 2014 182:408-19. DOI: 10.1667/RR13492.1

Hirakawa H, Fujisawa H, Masaoka A, Noguchi M, Hirayama R, Takahashi M, Fujimori A, Okayasu R. The combination of Hsp90 inhibitor 17AAG and heavy-ion irradiation provides effective tumor control in human lung cancer cells. Cancer Med. 2015 4:426-36. DOI: 10.1002/cam4.377

Xue L, Furusawa Y, Okayasu R, Miura M, Cui X, Liu C, Hirayama R, Matsumoto Y, Yajima H, Yu D. The complexity of DNA double strand break is a crucial factor for activating ATR signaling pathway for G2/M checkpoint regulation regardless of ATM function. DNA Repair (Amst). 2015 25:72-83. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.11.004

Fujisawa H, Fujimori A, Okayasu R, Uesaka M, Yajima H. Novel characteristics of CtIP at damage -induced foci following the initiation of DNA end resection. Mutat Res. 2015 771:36-44. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.12.001.

Fujisawa H, Nakajima NI, Sunada S, Lee Y, Hirakawa H, Yajima H, Fujimori A, Uesaka M, Okayasu R. VE-821, an ATR inhibitor, causes radiosensitization in human tumor cells irradiated with high LET radiation. Radiat Oncol. 2015 10:175. DOI:10.1186/s13014-015-0464-y

Allen CP, Tinganelli W, Sharma N, Nie J, Sicard C, Natale F, King M 3rd, Keysar SB, Jimeno A, Furusawa Y, Okayasu R, Fujimori A, Durante M, Nickoloff JA. DNA Damage Response Proteins and Oxygen Modulate Prostaglandin E2 Growth Factor Release in Response to Low and High LET Ionizing Radiation. Front Oncol. 2015 5:260. DOI: 10.3389/fonc.2015.00260

Fujimori H, Sato A, Kikuhara S, Wang J, Hirai T, Sasaki Y, Murakami Y, Okayasu R, Masutani M. A comprehensive analysis of radiosensitization targets; functional inhibition of DNA methyltransferase 3B radiosensitizes by disrupting DNA damage regulation. Sci Rep. 2015 5:18231. DOI: 10.1038/srep18231

〔学会発表〕(計 15 件) 紙面の都合で国際学会発表 1 編/年度のみ記入

Okayasu R et al. Hsp90 inhibitor may enhance the effectiveness of heavy ion treatment. Rad. Res. Soc. Ann. Meeting San Juan (Puerto Rico) 2012-10-3

Okayasu R. Biological basis for heavy ion radiotherapy. Int. Sympo. Rad. Sci. Taipei (Taiwan) 2013-5-21

Okayasu R et al. Effectiveness of the combined treatment with Hsp90 inhibitor and heavy ion radiation. Amer. Assn. Cancer Res. San Diego (USA) 2014-4-8

Okayasu R. Radiobiology update for radiation oncologist. 15th ICRR Kyoto (Japan) 2015-5-28

〔図書〕(計 2 件)

Allen CP, Fujimori A, Okayasu R, Nickoloff JA. Radiation-Induced Delayed Genome Instability and Hypermutation in Mammalian Cells. *Stress-Induced Mutagenesis*, Springer 183-198, 2013

岡安隆一 HIMAC20 年の歩み:HIMAC20 周年記念・研究成果要覧 p27-34 2015

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡安隆一 (OKAYASU, Ryuichi)
放射線医学総合研究所・主任研究員
研究者番号: 50356135

(3) 連携研究者

藤森亮 (FUJIMORI, Akira)
放射線医学総合研究所・チームリーダー
研究者番号: 50314183

崔星 (SAI, Sei)
放射線医学総合研究所・主任研究員
研究者番号: 20342735

矢島浩彦 (YAJIMA, Hirohiko)
放射線医学総合研究所・主任研究員
研究者番号: 30261895

(4) 研究協力者

JEGGO, Penny (英国)、NICKOLOFF, Jac (米国)、Lee, Younghyun (韓国)、正岡綾、砂田成章、平川博一、Huizi Li 他