

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650640

研究課題名(和文)放射線療法及び化学療法の新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Research for development of biomarkers for radiation therapy and chemotherapy

研究代表者

益谷 美都子(MASUTANI, Mitsuko)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：60238904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線療法及び化学療法の効果モニタリングに適したマーカーは殆どない。ポリADP-リボシル化反応はDNA損傷後活性化し、ポリ(ADP-リボース)は細胞死に伴い血中に漏出しうる。そこで本研究では、ポリ(ADP-リボース)代謝物の動態を調べ、特異的代謝物の定量系を確立し、その動態を細胞及びマウスモデルで調べた。ポリ(ADP-リボース)はマウスに静注後、血流において速やかに代謝され、蓄積が防がれていることが示唆された。LC-MS法による検出条件と感度の至適化を進め、良好な条件の確立が達成できた。ガンマ線照射後のポリ(ADP-リボース)の特異的代謝物の解析を行い、血中で代謝物の検出が行えた。

研究成果の概要(英文)：To identify a good biomarker for monitoring effectiveness of radiation therapy and chemotherapy, here we focused on the specific metabolites of poly(ADP-ribose) and evaluated their significance. We have established a measurement system for the metabolites of poly(ADP-ribose). The metabolism of poly(ADP-ribose) was analyzed in mouse bloodstream and urine. When poly(ADP-ribose) was intravenously injected into mice, poly(ADP-ribose) was rapidly degraded and the metabolites appeared in urine. We have further improved the pretreatment conditions of samples and optimized for LC-MS conditions for the measurement. After gamma-irradiation, the metabolites of poly(ADP-ribose) were detected in the mouse blood samples.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍診断学

キーワード：ポリ(ADP-リボース) PARP-1 代謝物 リボシルアデノシン リボシルイノシン 血液 尿 マウス

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の放射線療法及び化学療法の効果モニタリングに適した腫瘍細胞死を反映するマーカーは殆どない。ポリADP-リボシル化反応はDNA損傷後活性化する。ポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)はDNA修復応答に関わりPARP阻害剤はBRCA等の相同組み換え修復能が異常ながん細胞に対し合成致死を示し(Bryant et al., Nature, 2005, Farmer, et al., Nature 2005)、乳がんや卵巣がんなどを対象に臨床試験が進んでいる。ポリ(ADP-リボース)は細胞死に伴い血中に漏出する。そこで本研究ではポリ(ADP-リボース)代謝物の動態を調べ、特異的代謝物として同定したりボシルアデノシン及びリボシルイノシンの定量系を確立し、DNA損傷刺激後の動態を細胞及びマウスモデルで調べ、バイオマーカーとしての有用性を検討する。ポリ(ADP-リボース)の特異的代謝物リボシルアデノシン及びリボシルイノシンはマーカーとして新規性・優位性ともに高く、申請者らの測定手法も新規なものであり、マーカーとしての先行技術はない。また、本マーカーは細胞死を伴う、虚血性疾患、炎症、または自己免疫疾患、広範な組織障害などのモニタリングにもマーカーとして有効である可能性が高く、種々の疾病への応用の可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ポリADP-リボシル化反応はDNA損傷後活性化し、ポリ(ADP-リボース)は細胞死に伴い血中に漏出する。申請者らはポリ(ADP-リボース)の特異的代謝物としてリボシルアデノシン及びリボシルイノシンを血中、尿中において同

定した(特許査定2011年2月)。これらは抗がん剤や放射線療法の効果モニタリングのマーカーとなる可能性がある。そこでリボシルアデノシン及びリボシルイノシンのマウスモデルでの動態を調べ、放射線療法及び抗がん剤療法の効果予測マーカーとしての有効性を明らかにする。また、細胞、マウス血液及び尿検体からのリボシルアデノシン及びリボシルイノシンの分析条件の検討を進め、分析工程を至適化する。さらにマウスモデルでのリボシルアデノシン、リボシルイノシンの動態について放射線照射やDNA損傷後の血液検体及び尿検体についての検討を行う。

3. 研究の方法

(1)細胞及びマウスモデルでのリボシルアデノシン、リボシルイノシンの動態の検討。
以前作成した方法(Shimokawa, et. al., Organic Chemistry Insights, 2009, 2:1-5.)で大腸菌を用いてヒトPARP-1のリコンビナントタンパク質を調製し、ポリ(ADP-リボース)の大量調製を行う。ポリ(ADP-リボース)を酵素的手法を用いて分解し、HPLCによる分析でリボシルアデノシン、リボシルイノシンの標品を作成し、検出条件と感度の至適化を質量分析計を用いて検討する。回収率をモニターできる内部標準物質を合わせて選定し、分析工程を決定する。

(2)マウス体内におけるポリ(ADP-リボース)の代謝と分布を検討する。

(3)放射線照射後のリボシルアデノシン、リボシルイノシンの血中、尿中での変動の解析。
マウスに放射線照射後、経時的に血液、尿を採取し、前処理後、リボシルアデノシン、リボシルイノシンをLC-MS解析により定量する。

動物実験については、各研究機関の「動物実験に関する指針」を遵守する。

4. 研究成果

平成24年度にはポリ(ADP-リボース)の静注を行ったマウス検体における代謝物の組織分布と分解を経時的に分析した。静注5分後には血液、肝臓、腎臓において酸可溶性の低分子画分に代謝物としての移行が認められた。投与1時間後には尿中に代謝物を見いだした。従ってポリ(ADP-リボース)は血流において速やかに代謝され蓄積が防がれていると考えられる。マウス血漿検体からのリボシルアデノシン及びリボシルイノシンについてもLC-MSによる分析の条件検討を行った。回収率をモニターできる内部標準物質を選定して、ほぼ至適化された方法を確立した。平成24年度の検討を踏まえて、平成25年度にはマウス血漿及び尿サンプルの前処理法を改良し、LC-MS法によるリボシルイノシンの検出条件と感度の至適化を行った。ガンマ線照射後のリボシルアデノシン、リボシルイノシンの血中、尿中での変動の解析を行った。ガンマ線照射後、血中のリボシルアデノシン、及びリボシルイノシンが経時的に検出された。

本研究においてはLC-MS法によるリボシルアデノシン、及びリボシルイノシンの高感度な測定のためのサンプルの前処理条件の検討に時間を要したが、内部標準を用いて、良好な条件の確立が達成できた。

放射線照射後以外に、抗がん剤などのDNA損傷条件での処理後のマウス試料における測定を進め、リボシルアデノシン、リボシルイノシンの動態を検討し、抗がん剤や放射線療法の効果モニタリングのマーカーとなる可

能性を検討する予定である。また、マウスでの体内動態の測定結果を踏まえて、ヒトの臨床検体においての測定条件の検討を進める。

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 1 件)

1. Yasuhisa Okajima, Tomoko Yoshida, Hiroaki Fujimori, Junhui Wang, Hiromi Harada, Ylenia Suzuki, Hisanori Suzuki, Mitsuko Masutani. Rapid degradation of poly(ADP-ribose) after injection into the mouse bloodstream. Biol. Pharm. Bull. 2013, 36(3):462-6.(査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Mitsuko Masutani, Hiroaki Fujimori, Tomoko Yoshida, Hiromi Harada, Motoharu Kohata, Takeji Takamura-Enya. Identification of ribosyladenosine and ribosylinosine as specific metabolites of poly(ADP-ribose) in blood and urine. PARP2013, Quebec City (Sep. 6-9, 2013) (プログラム, (巻号なし) p93, 2013)

2. Hiromi Harada, Yasuhisa Okajima, Tomoko Yoshida, Hiroaki Fujimori, Mitsuko Masutani. Rapid degradation of poly(ADP-ribose) after injection into the mouse bloodstream. 第85回日本生化学会大会 2012年12月15日~2012年12月15日、福岡市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

益谷 美都子 (MASUTANI, Mitsuko)

独立行政法人 国立がん研究センター・研究
所・分野長

研究者番号：60238904

(2) 研究分担者

高村 岳樹 (TAKAMURA, Takeji)

神奈川工科大学・工学部・教授

研究者番号：50342910