

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24701019

研究課題名(和文)放射線感受性が高い固形腫瘍に対するG2期チェックポイント阻害剤の併用療法の有効性

研究課題名(英文)The availability of combination therapy using G2 checkpoint inhibitor against radiation-sensitive solid tumor

研究代表者

小泉 幸央(Koizumi, Yukio)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80353465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、放射線感受性マーカーであるRegenerating gene 1 (REG1)とG2期チェックポイント阻害剤という2つの概念を融合し、REG1を高発現した固形腫瘍に対する放射線療法とG2期チェックポイント阻害剤との併用療法の有効性を証明し、放射線療法に着目した新しい個別化療法の可能性を探ることを目的としている。今回、食道がん細胞株のREG1遺伝子発現とX線感受性の関連性の評価を進め、REG1遺伝子高発現/X線高感受性群、REG1遺伝子高発現/X線低感受性群、REG1遺伝子低発現/X線高感受性群、REG1遺伝子低発現/X線低感受性群の計4群に分類した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to fuse two concepts of radiation sensitive marker, regenerating gene 1 (REG1), and G2 checkpoint inhibitor, to demonstrate the availability of combination therapy using radiotherapy and G2 checkpoint inhibitor, and to evaluate the feasibility of new personalized medicine focusing on radiotherapy. In this study, we proceeded to evaluate the relationship between expression of REG1 gene and X-ray sensitivity in esophageal cancer cell lines, and classified into four groups: 1) high expression of REG1 gene/X-ray sensitive, 2) high expression of REG1 gene/X-ray insensitive, 3) low expression of REG1 gene/X-ray sensitive, and 4) low expression of REG1 gene/X-ray insensitive sensitive.

研究分野：生化学

キーワード：放射線療法 がん G2期チェックポイント 個別化療法

1. 研究開始当初の背景

固形がんに対する治療は手術と放射線が中心的役割を担っている。近年の放射線治療の進歩は著しく、手術に匹敵する治療成績が報告されている。しかしながら、放射線感受性には個人差があり、皮膚炎、倦怠感、脱毛、嘔吐といった副作用が生じることもある。そのような背景から、放射線感受性を治療に先立ち予測する試みや腫瘍の放射線感受性を増強させる試みが近年行われている。

申請者のグループは腫瘍の放射線感受性を予測する試みとして、食道がんが発現する放射線感受性マーカーを探索した結果、**Regenerating gene 1 (REG1)**を見出した。REG1は膵臓β細胞の再生・増殖に関与する遺伝子として最初に発見されたサイトカイン様の分泌タンパク質である。扁平上皮食道がん組織の生検試料を用いた免疫染色からREG1を高発現している食道がん患者では発現していない患者と比較して放射線化学療法後の予後が良好であったこと (Hayashi K et al, *Ann Surg Oncol*, 2008)、さらにREG1を発現していない食道がん細胞株にREG1遺伝子を強制発現した結果、X線に対する感受性が上昇することも見いだした (Hayashi K et al, *Cancer Sci*, 2008)。

一方、腫瘍の放射線感受性を増強させる試みとして、G2期チェックポイント阻害剤の開発があげられる。チェックポイント機構は、損傷したDNAを感知し、DNAが修復されるまで細胞周期の進行を停止させる細胞に備わった生体防御機構の1つである。チェックポイントには細胞周期のG1期とG2期、それぞれに働くG1期チェックポイントとG2期チェックポイントが存在するが、多くの腫瘍細胞においてはp53遺伝子の変異や欠失によってG1期チェックポイントが不全状態にあり、G2期チェックポイントがDNA損傷時に唯一のチェックポイント機構として働いている。したがって、G2期チェックポイントの阻害はDNA損傷を引き起こす薬剤や放射線の効果を腫瘍細胞選択的に増強できることから、新しい抗がん剤開発のための有望な標的経路と考えられている。

申請者のグループは、これまで微生物二次代謝産物からいくつかのG2期チェックポイント阻害剤を見出してきた (ボロマイシン: Arai M, Koizumi Y et al, *J Antibiot*, 2004、シマオミシンα: Arai M et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004、Koizumi Y et al, *Cancer Sci*, 2009、マルホルミンA1: Koizumi Y et al, *J Antibiot*, 2002、Hagimori K et al, *Biol Pharm Bull*, 2007)。しかし、これらはDNA損傷型抗がん剤によって誘発した白血病細胞株のG2期チェックポイントに対する阻害剤として見出したので、新たに食道がん細胞株に対する放射線誘発G2期チェックポイント阻害剤の探索を新たに行ない、微生物二次代謝産物や化合物ライブラリーを用いたスクリーニ

ングの結果、Chk1キナーゼ活性を阻害することが報告されているUCN-01を見出した (申請者ら、未発表データ)。

G2期チェックポイント阻害剤がREG1発現細胞に対してより効果的に放射線感受性を増強させることが証明できれば、がん放射線療法の個別化治療という新しい治療方針が導かれることが期待される。具体的には、食道がん患者の生検試料を用いたREG1遺伝子発現の判定によって積極的な放射線療法を取り入れるかどうかの個別判定が進み、放射線治療とG2期チェックポイント阻害剤の併用によって、低線量の放射線照射でも副作用なく、がん特異的に治療効果が発揮されることが期待できる。

2. 研究の目的

放射線感受性マーカーであるREG1とG2期チェックポイント阻害剤という2つの概念を融合し、REG1遺伝子を放射線治療介入判別の指標とし、UCN-01のようなG2期チェックポイント阻害剤との併用療法の臨床応用への可能性を探ることを目的としている。

3. 研究の方法

固形がん由来細胞株

実験には、胃がん由来のAGS細胞株、食道がん由来のEC-GI-10、TE-1、TE-6、TE-10、TE-14、TE-15細胞株を用いた。

MTTアッセイ

24ウェルプレートに 2×10^4 cellsのがん細胞を添加し、37°C、CO₂インキュベーター内で培養する。24時間後、0-50 GyのX線を照射し、さらに5日間培養する。この際、2日毎に培地交換する。反応後、終濃度が500 µg/mlとなるようMTTを添加し、4時間さらに反応する。反応終了後、細胞溶解液(40% ジメチルホルムアミド、2% 酢酸、20% SDS、0.03 M 塩酸)を添加し、室温で一晩攪拌する。マイクロプレートリーダーで570 nmの吸光度を測定し、細胞の生存率を算出する。

RT-PCR

ISOGENを用いてがん細胞から総RNAを抽出した。RT-PCRは100 ngの総RNAとSuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen)を用いてマニュアルに従って実行した。使用したプライマーは表1に示した。RT-PCRは以下のプログラムで行った: 55°C30分、94°C2分を1サイクル、94°C15秒、55°C30秒(REG1A)または49°C30秒(GAPDH)、68°C5分を40サイクル、68°C5分を1サイクル。PCR産物は3%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色で検出を行った。

表1 プライマー塩基配列

REG1A	Fwd	5'-AACATGAATTCGGGCAACC-3'
(480 bp)	Rev	5'-AGGAGAACTTGTCTTCACAA-3'
GAPDH	Fwd	5'-CCGCATCTTCTTTTTCGCTCG-3'
(93 bp)	Rev	5'-GCCCAATACGACCAAATCCGT-3'

4. 研究成果

各種食道がん細胞株の X 線感受性を MTT アッセイによって評価した (図 1)。その結果、X 線感受性は、

TE-15>TE-10>EC-GI-10>TE-6>TE-14>TE-1 という順で高いことがわかった。

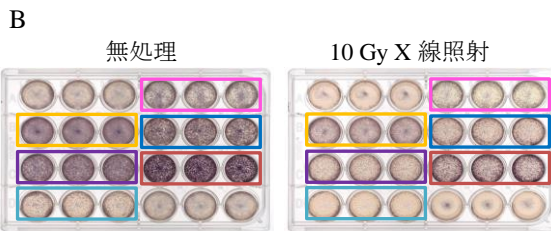
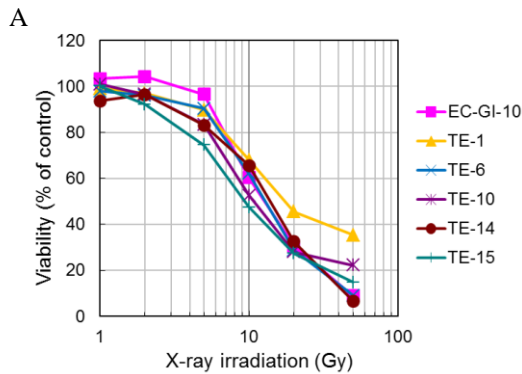


図1 各種食道がん細胞株の X 線感受性 (A)MTT アッセイの結果。(B) MTT 添加後の食道がん細胞株。左が無処理、右が 10 Gy X 線照射。□EC-GI-10、□TE-1、□TE-6、□TE-10、□TE-14、□TE-15。

次に、各種食道がん細胞の REG1A 遺伝子の発現を RT-PCR で調べた。(図 2) その結果、REG1A 発現は、TE-6> EC-GI-10, TE-1>TE-10> >TE-15>TE-14 という順で高いことがわかった。

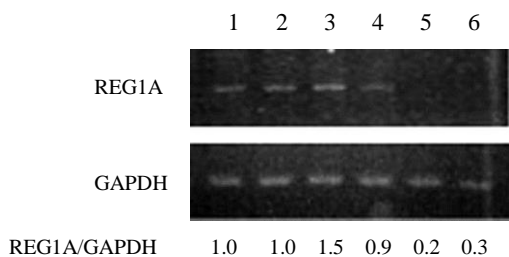


図2 各種食道がん細胞株 REG1A 発現 1: EC-GI-10, 2: TE-1, 3: TE-6, 4: TE-10, 5: TE-14, 6: TE-15。

MTT アッセイによる X 線感受性の結果と

RT-PCR による REG1A の発現結果を図 3 にまとめた。①REG1 遺伝子高発現/X 線高感受性群、②REG1 遺伝子高発現/X 線低感受性群、③REG1 遺伝子低発現/X 線高感受性群、④REG1 遺伝子低発現/X 線低感受性群の 4 群に食道がん細胞株を分類すると、①は TE-6、TE-10、EC-GI-10、②は TE-1、③は TE-15、④は TE-14 となることがわかった。

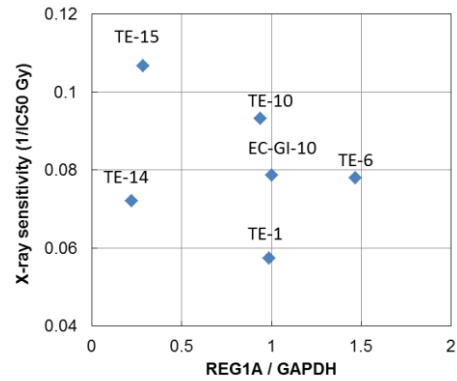


図3 各種食道がん細胞株の X 線感受性と REG1A 発現

今回の結果から、TE-6、TE-10、EC-GI-10 は ①REG1 遺伝子高発現/X 線高感受性群に分類されることがわかったので、今後これらの細胞を用いて放射線照射と G2 期チェックポイント阻害剤の併用効果を in vitro および in vivo で解析を進め、REG1 高発現患者に対する個別化療法としての G2 期チェックポイント阻害剤の有効性を調べていきたい。

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 5 件)

1. Zhou X, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Koyota S, Yamada M, Kondo Y, Hamada F, Sugiyama T. Cadmium-coordinated supramolecule suppresses tumor growth of T-cell leukemia in mice. *Cancer Sci.*, 106, 635-641 (2015). 査読有 DOI: 10.1111/cas.12651
2. Natsui M, Kawagoe M, Somei M, Koizumi Y, Koyota S, Sugiyama T. Stimulation of the hair growth by α 2-blocker SST-VED. *Akita J Med.* 41, 23-33 (2014). 査読有 <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009839555/en>
3. Frores MJ, Koyota S, Qiao Z, Koizumi Y, Sugiyama T. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin enriched in the apical plasma membrane of rat hepatocytes. *Akita J Med.* 40, 163-173 (2013). 査読有 <http://ci.nii.ac.jp/naid/120005441909>

4. Kumaga A, Koizumi Y, Kawagoe M, Koyota S, Sugiyama S. Identification of antioxidants derived from Inonotus obliquus. Akita J Med. 40, 113-119 (2013). 査読有
http://ci.nii.ac.jp/naid/110009658223
5. Natsui M, Kawagoe M, Nagai S, Qiao Z, Sato Y, Flores MJ, Koizumi Y, Koyota S, Sugiyama T. Stimulation of the Hair Growth by a Natural Origin Glechoma Hederacea Extract. Akita J Med. 40, 1-12 (2013). 査読有
http://ci.nii.ac.jp/naid/110009598136

〔学会発表〕 (計 6 件)

1. 小泉 幸央、山口 智和、門脇 歩美、夏井 美幸、佐藤 ちとせ、今井 由美子、久場 敬司「CNOT3によるES細胞増殖、初期発生制御の分子機構の解析」第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日 -20 日 (名古屋)
2. 小泉 幸央、岳 発貴、小代田 宗一、杉山 俊博 「食道扁平上皮がん細胞に対する UCN-01 の放射線感受性増強活性」日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 27 日-30 日 (東京)
3. Flore MJ, Koyota S, Koizumi Y, Sugiyama T. 「Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed on rat liver plasma membrane domains」第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日-6 日 (神戸)
4. 小泉 幸央、長井 賢一郎、高 立娜、蓮見 恵司、小代田 宗一、杉山 俊博「膜基板型抗体マクロアレイを用いたマルホルミンの作用機序解析へのアプローチ」日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会 2013 年 6 月 19 日-21 日 (東京)
5. 夏井 美幸、喬 志偉、小泉 幸央、小代田 宗一、杉山 俊博「毛包器官培養法を用いたカキドオシ・エキスの発毛促進作用」日本生化学会東北支部 第 79 回例会・シンポジウム 2013 年 5 月 11 日 (仙台)
6. 小泉 幸央、長井 賢一郎、蓮見 恵司、小代田 宗一、杉山 俊博「フィブリン分解を促進する環状ペプチドマルホルミンの構造活性相関」日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会 2012 年 6 月 7 日-9 日 (京都)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小泉 幸央 (Yukio Koizumi)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80353465

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：