

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792244

研究課題名(和文) DNA修復経路を標的とした口腔腫瘍温熱細胞死の基礎的研究

研究課題名(英文) Study of hyperthermic sensitization as a target of DNA repair pathways in the oral cancer cells

研究代表者

梶原 淳久(Kajihara, Atsuhisa)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00382317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：相同組み換え(HR)修復あるいは非相同組み換え修復の抑制による温熱殺細胞効果の影響を検討した。Ku80欠損細胞は親株細胞と同程度であったが、BRCA2変異型細胞は親株細胞より温熱に高い殺細胞効果を認めた。ヒト舌癌細胞でもBRCA2のsiRNAで処理したものがcontrolより温熱で殺細胞効果を認め、アポトーシス頻度も増強した。親株細胞では、温熱でG2/M arrestが認められたが、BRCA2変異型細胞では認められなかった。また、BRCA2変異型細胞は親株細胞より温熱処理後のH2AX消失遅延が生じた。

HRを抑制することで、頭頸部領域の癌細胞でも温熱殺細胞効果が向上することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility that the inhibition of homologous recombination (HR) repair or non-homologous end joining (NHEJ) repair enhances the heat sensitivity in cancer cells. There was no difference in the heat sensitivities of Ku80 defective cells and the parental cells. But, BRCA2-mutated cells were sensitive to heat as compared with the parental cells. In human tongue cancer cells, BRCA2-siRNA transfected cells were more sensitive to heat than the negative control-siRNA transfected cells. Apoptotic bodies were increased more efficiently in the BRCA2-siRNA transfected cells than the negative control-siRNA transfected cells after heat. A G2/M phase arrest was observed in the parental cells, but not in BRCA2-mutated cells after heat. DSBs were decreased at 18 h in the parental cells as compared with them at 0.5 h after heat. In contrast, they were not decreased at all in the BRCA2-mutated cells. These results suggest enhancement of heat sensitivity by depression of HR repair.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 現在の温熱療法について

近年、がんの三大治療法(外科手術・放射線療法・化学療法)が画期的に発展を遂げてきたにもかかわらず、今なお、がんは日本人の死因の一位である。そこで四番目の選択肢の一つとして温熱療法が注目されている。温熱療法とは腫瘍の局所を42~43以上に30~60分加温する治療法で、放射線療法と併用することによって、その効果を著しく高める。また、化学療法との併用では抗がん剤の使用量を減量でき、その副作用を少なくする。また、その周辺部の免疫力を高めるといった観点からも注目されている。この治療法は1990年から放射線併用電磁波温熱療法が健康保険の適用になり、現在では温熱単独治療でも適用されるようになってきている。

### (2) 温熱療法においてDNA二本鎖切断HR修復経路を分子標的候補とした経緯

温熱の生物応答については不明な点や再考の余地が多く残されている。例えば、温熱による細胞死の直接的な原因は何かということである。従来定説によると温熱による細胞死の主因はタンパク質の変性のみと考えられてきた。温熱にさらされると直接的な原子・分子間結合の切断によるタンパク質や脂質を多く含む生体膜の熱変性のみならず、ラジカル反応や生体応答を介して、核酸にも分子損傷を引き起こす。

研究協力者のTakahashiらは温熱でDNA二本鎖切断(DSB)が生成することを中性コメットアッセイ法および免疫蛍光染色法によるリン酸化ヒストンH2AX( $\gamma$ H2AX)フォーカス形成の測定で明らかにし、温熱誘導DSB形成率と温熱感受性との間に高い相関性があることを示した(Takahashi A, et al. *Cancer Res* 64: 8839-45, 2004.)。また、この現象が哺乳類細胞に共通してみられることや(Takahashi A, et al. *Mutat Res* 656: 88-92, 2008.)、ATMというリン酸化酵素が主要な働きを担うことについても明らかにした(Takahashi A, et al. *J Radiat Res* 51: 417-22, 2010.)。さらには、各種DSB認識タンパクが温熱処理後に $\gamma$ H2AXと共局在することも明らかにした(Takahashi A, et al. *Ann Cancer Res Ther* 15: 50-3, 2007.; Takahashi A, et al. *J Radiat Res* 51: 91-5, 2010.)。また、DSBの修復に関わることが知られているNBS1を標的すると、温熱感受性が増強することを明らかにした(Ohnishi K, Takahashi A, et al. *J Cell Biochem* 99: 1642-50, 2006.; Okamoto N, Takahashi A, et al. *Int J Hyperthermia* 27: 297-304, 2011.)。

## 2. 研究の目的

DSB修復にはhomologous recombination(HR)修復とnon-homologous end joining(NHEJ)修復の二つの経路が関わっている。これまでに様々なDNA修復因子が欠損した

細胞を使って、HR修復が温熱殺細胞効果を高めることを見出してきている。しかしながら、がん細胞において、HR修復を阻害することによって温熱の感受性が高まるのかどうかについて、十分に明らかにされていないのが現状である。本研究ではsiRNAを用いた分子標的による口腔腫瘍細胞における温熱殺細胞効果の確認および温熱処理によるHR修復誘導についての解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) siRNAを用いた分子標的による口腔腫瘍細胞における温熱殺細胞効果の確認

温熱殺細胞効果を高める標的候補が明らかにするためにチャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来のHR修復関連遺伝子BRCA2変異型細胞とその親株細胞、およびNHEJ欠損型細胞とその親株細胞を用いて温熱処理を行い、コロニー形成法にて生存率の比較検討を行った。その結果、温熱殺細胞効果の標的遺伝子となった遺伝子のsiRNAを処理48時間前にリポフェクション(Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen)によって口腔癌由来細胞株に導入し、温熱処理しコロニー形成法にて生存率を測定し、温熱殺細胞効果が増すかどうかを確認した。また、そのsiRNAを導入した口腔癌由来細胞株とcontrolのsiRNAを導入した細胞に対してHoechst33342染色法によって温熱処理後のアポトーシス頻度の計測を行い、比較検討した。

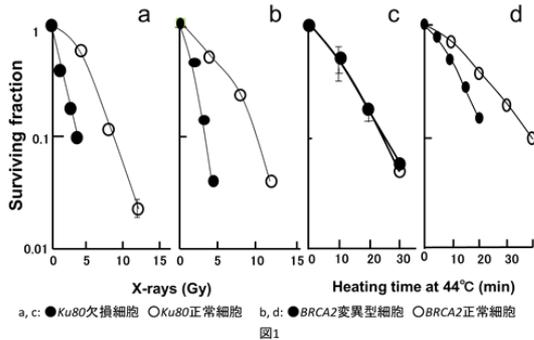
### (2) 温熱処理によるHR修復誘導についての解明

温熱処理によって出来たDSBがHR修復経路によって修復されるかどうかをRecombination Assayによって調べた。チャイニーズハムスター由来細胞SPD8はhypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(hprt)遺伝子のexon7が重複しておりHR修復によって、正常型のhprt遺伝子に戻る。HaST培地は50mM hypoxanthine, 10mM L-azaserine, 5mM thymidineを通常の増殖培地に添加した培地で、HRで修復されたhprt遺伝子を持つSPD8細胞のみが選択的にコロニーを形成できる培地である。SPD8細胞を温熱処理後、HaST培地と通常の増殖培地に播種し、HaST培地に形成されたコロニー数と増殖培地に形成されたコロニー数を比較することで、HRで修復された頻度を薬剤ごとに調べることができる。また、H2AX抗体を用いたフローサイトメトリー法にて温熱処理後のDSB量を計測した。温熱処理によって出来たDSBがHRによって修復されるのであれば、HRが抑制されている細胞ではDSBの消失遅延が生じ、wild typeの細胞ではDSB量が少なくなるはずである。次に、免疫蛍光染色法にてBRCA2とcomplexを形成するRad51のfocus形成が温熱処理後、発現するかを検討した。

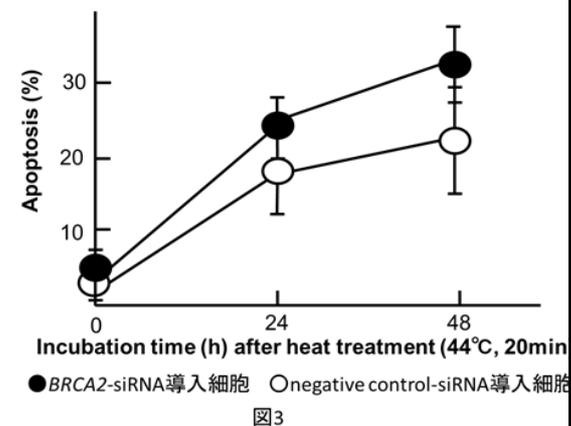
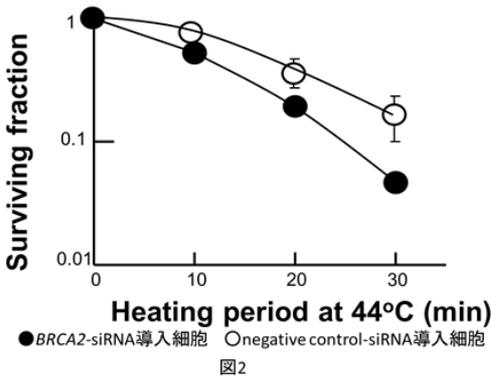
## 4. 研究成果

(1) HR修復関連遺伝子BRCA2変異型細胞と

NHEJ 修復関連遺伝子 *Ku80* 欠損細胞に X 線処理および温熱処理を行った生存率の結果、X 線照射ではどちらにおいてもその親株細胞と比較して高い殺細胞効果が認められた。一方、温熱処理では、*Ku80* において親株細胞と感受性に変化が認められなかったが、*BRCA2* 変異型細胞では、親株細胞よりも高い殺細胞効果が示された(図 1)。このことにより、DNA 修復を標的とする場合、温熱処理では HR 修復が標的となることが示唆された。



(2) 口腔癌細胞でも siRNA を用いて *BRCA2* を標的に HR 修復を抑制することで、negative control siRNA 導入細胞と比較して温熱処理後、温熱感受性が増強することが認められた(図 3)。また、アポトーシス頻度においても *BRCA2* siRNA 導入細胞の方が negative control siRNA 導入細胞より上昇することが示唆された(図 3)。



(3) Recombination assay により温熱と X 線照射によって Control よりも HR 修復を起

こした変異体が多く検出された(図 4)。

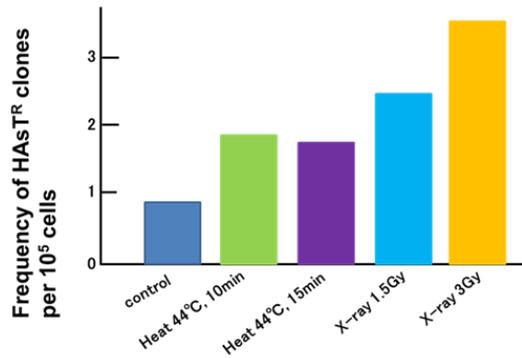


図4

(4) H2AX 抗体を用いたフローサイトメトリ法にて DSB 量を計測したところ、*BRCA2* 変異型細胞では温熱処理 18 時間後の H2AX の消失遅延が生じた。これは *BRCA2* 変異型細胞では DSB 修復が抑制されたものと考えられる(図 5)。

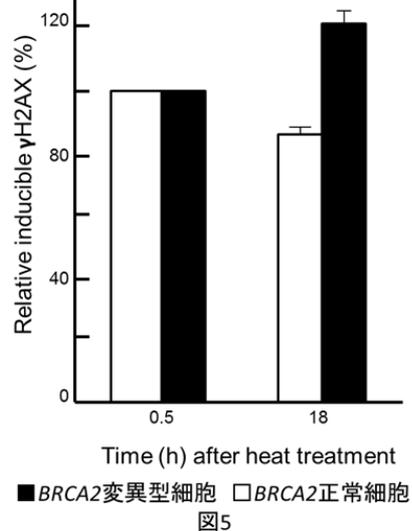


図5

(4) 免疫蛍光染色法にて *BRCA2* と complex を形成する Rad51 の focus 形成を検討したところ、温熱処理後 4 時間をピークに核内に認められた(図 6)。これは、温熱によって DSB が誘導され、HR 修復が働くと考えられる。すなわち、温熱では HR 修復が標的となりうる可能性がより強く示唆された。

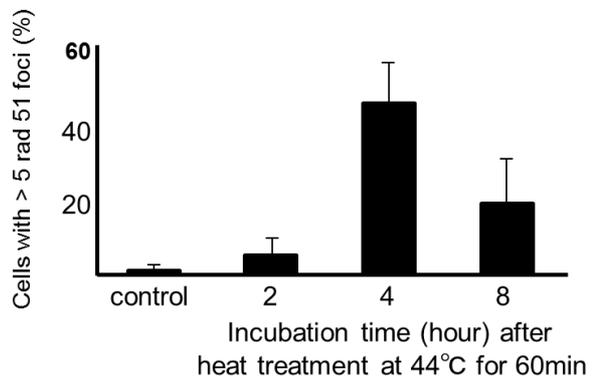


図6

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 2 件)

Nakagawa Y., Takahashi A.,  
Kajihara A., Yamakawa N., Imai Y.,  
Ota I., Okamoto N., Mori E., Noda T.,  
Furusawa Y., Kirita T., Ohnishi T.  
Depression of p53-independent Akt  
survival signals in human oral  
cancer cells bearing mutated p53  
gene after exposure to high-LET  
radiation.

Biochem Biophys Res Commun.  
423(4):654-60. Epub 2012. 査読有り。  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.004.

Nakagawa Y, Kajihara A, Takahashi A,  
Kondo N, Mori E, Kirita T, Ohnishi T.  
The BRCA2 gene is a potential  
molecular target during 5-fluorouracil  
therapy in human oral cancer cells.  
Oncol Rep. 2014 May;31(5):2001-6.  
査読有り。  
doi: 10.3892/or.2014.3080.

〔学会発表〕(計 4 件)

梶原淳久、

口腔癌細胞に対する相同組換え修復を標的とした  
温熱増感効果についての検討

第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会(24  
年 5 月 17・18 日、広島国際会議場)

Atsuhisa Kajihara

Enhancement of heat sensitivity by depression  
of DSB repair

ICHO&JCTM2012 (August28~August31.2012  
Hyatt Regency Kyoto)

梶原淳久

口腔癌細胞に対する DNA 修復を標的とした温熱  
増感効果についての検討

第 57 回 日本口腔外科学会総会・学術大会(平成  
24 年 10 月 19~21 日、パシフィコ横浜)

梶原淳久

DNA 修復を標的とした温熱増感効果  
日本ハイパーサーミア学会第 30 回大会  
(25 年 8 月 30・31 日、横浜シンポジア)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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

梶原 淳久 (KAJIHARA Atsuhisa)  
奈良県立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：00382317

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：