

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890233

研究課題名(和文) マウス脳転移モデルを用いた放射線増感剤の研究

研究課題名(英文) Study of radiosensitizer using a mouse model of brain metastasis

研究代表者

平井 崇久 (Hirai, Takahisa)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30626669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてPoly(ADP-ribose) polymerase阻害剤(AZD2281)の陽子線に対する増感効果を細胞レベルで見だし、その機構がDNA損傷応答を作用点とすることを示した。この結果はAZD2281が光子線治療と同様に陽子線治療においても、少ない有害事象でより高い抗腫瘍効果実現に寄与できる可能性を示唆する。

また、放射線増感候補薬剤のin vivoでの有効性検証のため、マウス脳内へのがん細胞株注入により脳転移マウスを作成した。しかし、腫瘍生着率の低さからマウスモデルを大腿部皮下の移植片モデルへ変更した。同モデルにおいてX線とAZD2281併用群での抗腫瘍効果の増強が観察された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor AZD2281 in cells exposed to proton beam irradiation through affecting the DNA damage response. The results suggest that AZD2281 might offer beneficial clinical effects without increasing the toxic effects of proton therapy like in photon therapy.

Furthermore, we prepared a mouse model of brain metastasis by direct injection of tumor cells into the animal brain to test the effectiveness of radiosensitizing drugs in vivo. However, because of the low tumor implantation rate in this model, we altered our approach to a mouse model, in which tumor cells were subcutaneously administered into the thigh. In this model, AZD2281 treatment enhanced the anti-tumor effect of X-ray irradiation compared to controls.

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：放射線増感 線 X線 陽子線 炭素線 PARP PARP阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

がん臨床において有効な放射線増感剤の開発は重要な課題である。X線やγ線などの光子線に加え、近年優れた生物学的効果を有する陽子線や炭素線などの粒子線が臨床応用され、良い臨床成績が報告されている。また、各種がんや病期に対する使用線質の住み分けが進められている。この様ながん臨床の背景から、各種線質の生物学的効果に応じた放射線増感剤の開発が重要と考えられる。

本研究で放射線増感研究の対象として注目する転移性脳腫瘍 (BM) は他臓器癌が血行性に脳内に移動し成長する腫瘍であり、担癌患者の生存期間中の発生率は約 10% と非常に高い。特に原発巣が良く制御されている症例では、BM が予後決定の最重要因子となるため、その局所制御成績を向上させ得る放射線増感剤を開発し、新規治療法を確立する意義は大きい。

また近年、放射線増感剤の種々の標的候補分子が報告されている (Tofilon PJ et al, Chem Rev 2009;109:2974-88.)。本研究代表者は DNA 損傷応答に関わる poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 に注目し、阻害剤による増感の研究を行ってきた。PARP 阻害剤 (PARPi) は臨床試験において、単剤又は既存の抗がん剤との併用において少ない有害事象での臨床効果が報告されている。(Fong PC et al, N Engl J Med 2009;361:123-34., O'Shaughnessy J et al, N Engl J Med 2011;364:205-14.) また、PARPi が光子線の細胞殺傷効果を増強することが報告されており (Dungey FA et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008;72:1188-97.) 以下のメカニズムが考えられている。光子線による DNA 損傷の大半は DNA1 本鎖切断 (SSB) であり主な修復経路は塩基除去修復 (BER) である。PARP 阻害は BER を停滞させ、SSB から細胞死に寄与する DNA2 本鎖切断 (DSB) を誘発する。また、PARP-1 は非相同末端結合修復にも関わる。動物モデルにおいても、PARPi が光子線の細胞殺傷効果を増強することが報告されている (Senra JM et al, Mol Cancer Ther 2011;10:1949-58., Efimova EV et al, Cancer Res 2012;70:6277-82.)

本研究代表者は PARPi の放射線治療の増感剤としての有用性と作用機構を検証するために低線エネルギー付与 (LET) 及び高 LET 放射線照射後のがん細胞株に対する致死効果の増強とその機構を細胞レベルで検討した。PARPi が低 LET の線のみならず、炭素線の増感効果を示し、幅広い線質の有効な放射線増感剤となりうることを示した。また、線、炭素線への PARPi の増感効果の作用機序は共に、細胞周期 S 期停止と引き続き起こる G2/M 期停止を導く DNA 損傷修復応答の遅

延と DNA2 本鎖切断のプロセッシングの遅滞であることを示した (Hirai T et al, Cancer Science 2012;103:1045-50.)

## 2. 研究の目的

(1) 放射線増感候補薬剤の in vivo での有効性検証のための動物モデルの条件検討

まず、マウス脳転移モデルの作成条件の確立

PARPi の X 線照射に対する増感をマウスモデルで検証し、同時に各種実験条件の最適化を行い、マウスモデルでの検証の系の確立

マウスモデルでの検討条件の確立後、新規の放射線増感候補薬剤の増感効果とそのメカニズムの検証

(2) マウスモデルの陽子線・炭素線照射実験への応用

## 3. 研究の方法

(1) 本研究における方法の主な変更点と理由

マウスモデルを脳転移モデルから大腿部皮下の移植片モデルへ変更  
変更理由：脳転移モデルでの細胞生着率の低さが改善されず、同モデルでの本研究の目的である放射線増感候補薬剤の in vivo での有効性検証が困難と考えられたため

ヘルシフェラーゼ発現ベクターを導入したヒトがん細胞株の使用を中止し、通常のヒトがん細胞株の使用への切り替えを行った  
変更理由：上記のマウスモデルの変更に伴い、マウスを生かしたままの直接的に腫瘍径の測定が可能となったため、光子線・炭素線照射においての PARPi の増感効果が既知であるヒト膵癌細胞株 MIA Paca-2 を用いた

(2) 各種放射線照射装置

線照射：<sup>60</sup>Co 照射装置 (Gammacell 220)

X 線照射：CP-160 X 線照射装置

陽子線照射：放射線医学総合研究所 HIMAC

(3) マウス脳転移モデルの作成の条件検討

脳転移モデルは ICR ノードマウス (CrIj: CD1-Foxn1nu, 7-8 週齢、日本チャールズ・リバー社) の右側線条体ヘルシフェラーゼ発現ベクター導入ヒトがん細胞株を脳定位装置を用いて定位的に注入し作成した。その条件検討の詳細を以下に記す。

マウス脳マップ (George Paxinos & Keith B.J. Franklin) を参照し、細胞注入に使用するカニューレ (エイコム (株) 社製) を脳定位装置を用い、マウス頭蓋骨プレグマより右側へ 2.5 mm の位置の頭蓋骨表面より深さ 3 mm へ刺入し、カニューレを固定。その後、実験動物用 X 線 CT Latheta LCT-200 (日立アロ

カメディカル(株)社製)でマウス頭部を撮影し、カニューレ先端が右側線条体へ刺入されていることを確認した。さらに、カニューレより墨汁注入後、マウス脳をスライスし墨汁の位置を確認し、同部位を脳実質内細胞注入時の位置と決定した。次にヒト肺腺癌細胞株 A549-luc ( $1 \times 10^5/5 \mu\text{L}$ ) をイソフルラン麻酔下でマウスの右側の線条体へ注入した。2週間後、ルシフェラーゼ発光基質である D-ルシフェリン (PBS で 15 mg/mL へ濃度調整) 200  $\mu\text{L}$ /匹を腹腔内投与し、in vivo imaging system IVIS-Spectrum (SPI 社製)にて細胞生着を確認し、発光強度を測定した。

(4) 脳転移マウスへの X 線照射条件の検討  
マウス頭部への放射線照射による死因として知られる口腔死を起こさないための照射方法の検討を行った。マウス頭部を側臥位で固定し、頭蓋内以外の頭部腹側(口腔側)と体部を鉛板遮蔽することで、生存率を下げずにマウスの頭蓋内のみの局所照射が可能となった。

(5) 細胞レベルにおける陽子線に対する PARPi による増感効果とメカニズムの検証

粒子線にはブラッグ・ピーク(BP)という物理的な特性があり、体表面から BP に達するまでの入り口部分(ER)と BP に区別できる。この2部分では生物学的効果が異なる。粒子線治療における治療計画では BP が腫瘍へ来るように調整されるため、ER は正常組織に照射されることになる。この物理的な特性のために、粒子線治療では、腫瘍により高い線量を集中させ、正常組織への線量を低く抑える優れた線量分布での治療が可能となっている。以下全ての実験において AZD2281 の濃度は 5  $\mu\text{M}$  を用いた。

コロニー形成法での PARPi の放射線増感効果の観察：陽子線照射の線量分布の ER と BP に対する PARPi の増感効果の観察をコロニー形成法にて行い、いずれにおいても線量依存的な細胞致死効果の増強が認められた。

免疫染色法による DSB マーカーである -H2AX の foci の観察

ウェスタンブロッティング法にて DNA 損傷修復応答をタンパク質の動態で検討  
使用抗体：-H2AX、リン酸化 p53、ヒストン H3、リン酸化ヒストン H3 (G2/M マーカー) など。

細胞周期への影響、アポトーシスの観察：  
フローサイトメトリー FACS (FACS Calibur, B&D 社)

(6) 大腿部皮下移植片モデルの条件検討と X 線照射に対する PARPi の増感効果の検討

大腿部皮下移植片モデルにおいても ICR ノードマウスを用い、細胞株は光子線・炭素線照射への PARPi の増感効果が既知であるヒト膵癌細胞株 MIA Paca-2 を用いた。同モデルの条件検討より、MIA Paca-2 を  $5 \times 10^6$  個/匹

マウス大腿皮下へ注入すると約2週間で最大径約5mm、約3週間で約10mmとなることを確認した。

細胞注入後、マウス大腿の腫瘍体積が 500 mm<sup>3</sup> を目安に Dimethyl sulfoxide (DMSO)、PARPi 濃度 A、PARPi 濃度 B、DMSO + X 線、PARPi 濃度 A + X 以下の5つのグループに分けて X 線照射に対する PARPi の増感効果の検討を行った (n=3)。PARPi の投与は X 線照射 2 時間前とし、濃度 A: 50 mg/kg/日、PARPi 濃度 B: 75 mg/kg/日にて3日間の胃内投与とした。X 線照射は 4 Gy/日を3日間(総線量 12 Gy)とした。X 照射時は鉛板(3 mm)を加工した遮蔽装置を用い腫瘍のある下肢以外の部位の遮蔽を行った。腫瘍は3日ごと大きさ(長さ・幅・高さ)と体重を測定し、グラフ化を行った。

#### 4. 研究成果

本研究代表者は、これまでに PARPi の放射線照射後のがん細胞株に対する致死効果の増強とその機構を検討し、PARPi が低 LET の線のみならず、高 LET の炭素線にも増感効果を示し、幅広い線質の有効な放射線増感剤となりうることを示した。

本研究において PARPi は陽子線に対しても増感効果を示すことが細胞レベルで確認された。その作用機序は、線や炭素線と同様に DNA 損傷修復応答の遅延と DNA 二本鎖切断のプロセッシング遅滞が考えられた。この結果は PARPi が幅広い線質の有効な放射線増感剤となりうるという本研究代表者らの推論を支持するものであった。

本研究で用いた PARPi である AZD2281 は既に臨床試験において単剤又は既存の抗がん剤との併用での少ない有害事象での臨床効果が報告されている。今回の実験結果は、PARPi が、優れた線量分布を示す陽子線や炭素線などの粒子線治療において、より高い抗腫瘍効果とより少ない有害事象の実現に寄与できる可能性を示唆するものであった。

また本研究では、ノードマウスの脳内へのがん細胞株注入により作成したマウス脳内腫瘍に対する各処理の影響を観察する動物モデルを想定し条件検討を重ね、脳転移モデルを作成したが、腫瘍の脳への生着率が約 20% と低いものであった。細胞株の種類を変更し条件検討を重ねるも生着率の改善が見られなかったため、実験効率を考え使用する動物モデルをマウス大腿皮下移植モデルへ変更し条件検討を進めた。同検討より、直接的に腫瘍径の測定が可能であったためヘルシフェラーゼ発現ベクターを導入した細胞株の使用を中止し、光子線・炭素線照射においての PARPi の増感効果が既知であるヒト膵癌細胞株 MIA Paca-2 を用いた。同モデルにおいて、X 線単独群と比較して X 線に PARPi を併用した群での抗腫瘍効果の増強が観察された。今後は、現在進行中である PARPi 以

外の新規放射線増感候補薬剤の放射線増感効果の検証を進めるとともに、同モデルのX線によって得られた知見を基に粒子線での放射線効果についても検討を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Mitsuko Masutani, Diaz Baiseitov, Tasuku Itoh, Takahisa Hirai, Kulzhan Berikhanova, Yasufumi Murakami, Zhaxybay Zhumadilov, Yoshio Imahori, Masaharu Hoshi, Jun Itami. Histological and biochemical analysis of DNA damage after BNCT in rat model. Applied Radiation and Isotopes, 2014 Mar 5, In printing, 査読有り, DOI:10.1016/j.apradiso.

2. Shirai H, Fujimori H, Gunji A, Maeda D, Hirai T, Poetsch R A, 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. Biochemical and Biophysical Research Communications, 24: 100-106, 2013, 査読有り, DOI:10.1016/j.bbrc.

〔学会発表〕(計5件)

1. 平井崇久、斎藤総一郎、藤森浩彰、西尾禎治、岡安隆一、藤森亮、笹井啓資、益谷美都子、がんの陽子線治療と重粒子線治療の生物効果の比較と増感剤の検討、平成25年度放射線医学総合研究所 HIMAC 共同利用研究成果発表会、2014年4月22日、千葉市

2. Takahisa Hirai, Souichiro Saito, Hiroaki Fujimori, Teiji Nishio, Ryuichi Okayasu, Akira Fujimori, Keisuke Sasai, Mitsuko Masutani: Radiosensitization by PARP inhibitor to proton beam irradiation in cancer cells, 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、横浜市

3. 平井崇久、斎藤総一郎、藤森浩彰、西尾禎治、岡安隆一、藤森亮、笹井啓資、益谷美都子、がんの陽子線治療と重粒子線治療の生物効果の比較と増感剤の検討、平成24年度放射線医学総合研究所 HIMAC 共同利用研究成果発表会、2013年4月23日、千葉市

4. 平井崇久、藤森浩彰、吉田周平、齋藤総一郎、茂木章、原田博美、笹井啓資、岡安隆一、藤森亮、益谷美都子、DNA損傷応答阻害剤の重粒子線及び低LET放射線に対する効果増強作用、平成24年度放射線医学総合研究所 HIMAC 共同利用研究成果発表会、2013年4月23日、千葉市

平井崇久, DNA 損傷応答関連の放射線増感剤の研究, 第54回放射線医学研究所重粒子医学センター研究交流会, 2013年4月4日, 千葉市

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 崇久 (HIRAI, Takahisa)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 30626669