

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861072

研究課題名(和文) Hsp90阻害剤併用炭素イオン線照射による放射線感受性修飾変化の検討

研究課題名(英文) Radiosensitive change by the Hsp90 inhibitor combination carbon ion radiotherapy.

## 研究代表者

武者 篤 (MUSHA, ATSUSHI)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：60637122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：重粒子線治療は制御困難であった種類の悪性腫瘍に対し、期待される治療法だが、進行癌の場合、根治は難しい。そこで我々は、癌の全身制御という見地から化学療法(Hsp90阻害剤)併用炭素線治療を考えた。これまで、Hsp90阻害剤とX線の併用により抗腫瘍効果が増大するが、重粒子線は単独でも十分な抗腫瘍効果を示す為に併用効果が見られず、併用時の上乗せ効果の違いは異なる修復機構が理由の一つであることを見出した。さらに、X線・重粒子線照射群で線量依存性の浸潤低下傾向が見られ、Hsp90阻害剤は単独でも浸潤低下傾向が見られた。高線量では併用の有無による差が減少傾向にあり、低線量域にて詳細な検討を施行中である。

研究成果の概要(英文)：Carbon ion radiotherapy (C-ion RT) is a potential therapy for radio-resistant malignant tumors. However, in cases of progressive malignant tumors, achieving a complete response is difficult. Therefore, chemotherapy (with an Hsp90 inhibitor, 17-AAG) in combination with C-ion RT was employed. This study was designed to clarify the cell killing effect of 17-AAG, in combination with X-rays or carbon-ion beams in oral squamous cell carcinoma cells. 17-AAG and X-rays in combination showed enhanced antitumor effect compared to C-ion RT, which had an adequate antitumor effect even when used alone. The difference in the effectiveness of the two combination therapies was attributable to the difference in their therapeutic mechanisms. At high doses, the difference between the invasive effect of the combination treatments and that of the individual treatments decreased. However, since 17-AAG shows sufficient combined effects even at low doses, we investigated the invasive effects at low doses.

研究分野：放射線治療

キーワード：Hsp90阻害剤 炭素線治療

1. 研究開始当初の背景

放射線療法は単に癌細胞への殺細胞効果を期待するだけでなく、手術療法にて失いかねない他の正常組織を保護して治療後のQOLの維持を支援する治療としても重要であり、その需要は増える一方である。近年、従来の放射線療法と比較して、生物学的効果が高く、線量集中性に優れ正常組織に副作用が生じにくい、重粒子線治療(炭素イオン線)が注目されている。頭頸部癌に対する炭素イオン線治療は、放射線医学総合研究所(放医研)において1994年より開始され、従来の放射線治療では難治性であり制御が困難であった腺癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、悪性黒色腫などの非扁平上皮癌に対し、局所制御率や生存率の向上が認められるなど良好な成績をおさめており、早期の手術と並んで治療成績の向上が期待される治療法と考えられる。群馬大学では、2010年から炭素イオン線治療を開始している。局所効果は良好であるが、進行癌においては、重粒子線治療後に遠隔転移や照射野外再発の症例も散見されることから、重粒子線治療のみでは進行癌の根治は難しいことが予想される。そこで我々は、癌の全身制御という見地から化学療法併用重粒子線治療を考えた。癌細胞において発現の増加が認められているHsp90(引用1)に着目し、その阻害剤であるHsp90阻害剤を局所効果良好な重粒子線に併用することとした。

Hsp90は主要な分子シャペロンであり細胞内で多種多様なタンパク質(client protein)と複合体を形成しており、そのClient proteinにはRaf-1やAkt、ErbB2、HIF1-等の放射線抵抗因子が含まれている。(図1)(引用文献2-5)このことから、Hsp90は

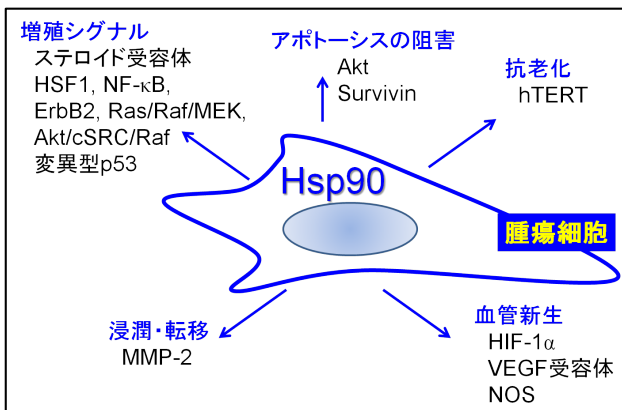


図1 Hsp90のclient protein

放射線増感のターゲットと成り得ることが期待されている。また、Hsp90阻害剤が癌細胞の遊走・浸潤能を抑制することが報告されている(引用文献6)。放射線治療による転移について、文献的には腹腔内摂取したマウス腫瘍細胞の肺転移はX線照射後に促進され、一方、炭素イオン線照射後に抑制されることが報告されている(引用文献7)。しかし

ながら、放射線が癌細胞の転移能にどのような生物学的効果をもたらすか十分に解明されていない。

当該申請者は、難治性腫瘍の放射線治療法の確立を目指し、X線および炭素イオン線による頭頸部癌細胞の放射線生物学的効果の特性および分子機構を解明する研究をしてきた。これまでに、頭頸部扁平上皮癌細胞のLMF4は、X線照射に比べ炭素イオン線は5.1倍の抗腫瘍効果であること(図2)

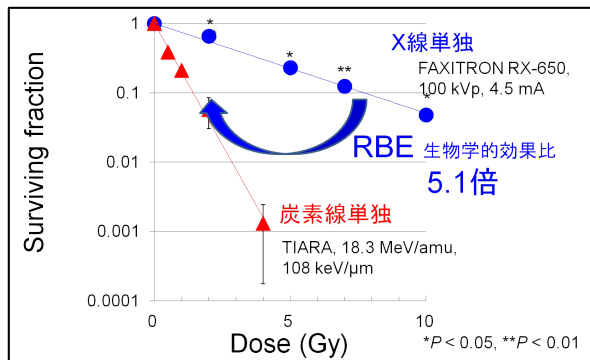


図2 LMF4細胞におけるX線と炭素線単独による生存曲線

Hsp90阻害剤(17-AAG)と放射線併用療法の抗腫瘍効果はX線で1.6倍であるが、炭素イオン線では併用効果が見られず1.1倍であることを明らかにした(図3)(引用文献8)。併用効果の差については、細胞周期とDNA

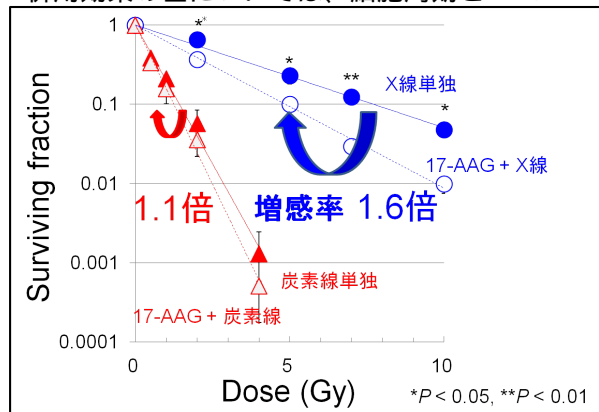


図3 LMF4細胞におけるX線と17AAG併用による生存曲線

修復機構に着目した。X線群では、NHEJ修復機構がHsp90阻害剤にて抑制されていたが、炭素線群では、Hsp90阻害剤による修復機構の抑制は見られない結果となり、炭素線の殺細胞効果は、単独でも17-AAG併用X線照射群に比べ十分な殺細胞効果を示した(引用文献8)。

そこで、これまでの研究成果を進展させて、局所効果のみならず、癌細胞の転移能の制変化について調べ、放射線(X線と炭素線)とHsp90の関与について明らかにすることで、全身制御を狙った放射線増感剤の開発に有効となる成果が期待できると考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は浸潤性増殖を示す頭頸部進行がんの治療改良を目指し、がんの放射線治療において大きな期待が寄せられている重粒子線（炭素イオン線）と、分子シャペロンであるヒートショックプロテイン（Hsp）に着目し、これらの腫瘍細胞における生物学的効果、特に転移と、そのメカニズムを解明することである。具体的な目的は、頭頸部がんにおける重粒子線の生物学的効果について知見を得ること、Hspの発現と放射線感受性の変化や腫瘍細胞の転移メカニズムを明らかにし、その分子機構から、重粒子線治療法の提案を行うものである。

## 3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌細胞 LMF4 を用いて、X線および炭素イオン線照射に 17-AAG を併用し癌細胞の転移能の研究を行った。転移能は、浸潤能として matrigel invasion chamber assay にて解析を行った。LMF4 を 50 mm dish に培養し、17-AAG の有無の環境下で X 線および炭素イオン線を照射した。その後トリプシン処理し invasion assay kit にて 24 時間培養後、kit の膜を通過した細胞を固定し DAPI 染色を施行し、細胞を計測した。未処置の細胞 (0Gy) の浸潤細胞数を 100% とし、グラフ化した。これにより放射線の線量依存変化、両者の併用による変化をみた。

## 4. 研究成果

X 線及び炭素イオン線照射群では matrigel を浸潤する細胞の割合が線量依存的に減少し、放射線による浸潤能低下の傾向が見られた。また、17-AAG 自体にも浸潤抑制効果があり、これは X 線及び炭素イオン線照射併用時で相加的に働く傾向が認められた。(図 4)

今後は低線量の範囲にて詳細な検討が必

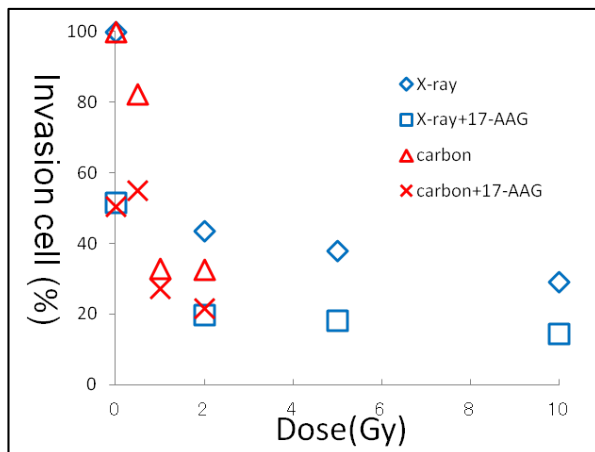


図 4 LMF4 細胞における X 線及び炭素線と

### 17AAG 併用による浸潤能試験

要であり、併用線量や薬剤濃度についても検討が必要であると考えられる。さらに、ウェ

スタンプロット法にて、Hsp90 の発現量や、細胞周期に關与するタンパク質の発現量、そして、シグナル伝達系 (MAPK シグナル伝達経路) のシグナル伝達關連タンパク質の発現量の違いによって、Hsp90 阻害剤と炭素イオン線との併用による抗腫瘍効果と抗転移効果の解析を行う予定である。癌細胞では、Hsp90 の発現が増加しているとの報告があり、Hsp90 の client protein には、浸潤や転移に關与するタンパク質も報告されていることから、17-AAG との併用により癌細胞では抗転移効果の併用効果が生じやすいと予想される。

## <引用文献>

- (1) Kamal A, et al. Nature. 2003 25;425(6956):357-359.
- (2) Schulte TW, et al. J Biol Chem.1995 270: 24585-24588.
- (3) Sato S, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 97: 10832-10837.
- (4) Peng X, et al. J Biol Chem. 2005 280: 13148-13152.
- (5) Ibrahim NO, et al. Cancer Res. 2005 65: 11094-11100.
- (6) Brenda K. Eustace, et al. Nature Cell Biology. 2004 6(6):507-514.
- (7) Tamaki T et al. IJROBP.2009 74(1):210-218.
- (8) Musha A, et al. J Radiat Res. 2012 53(4):545-550.

## 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 6 件)

Atsushi Musha, Hirofumi Shimada, Katsuyuki Shirai, Jun-ichi Saitoh, Satoshi Yokoo, Kazuaki Chikamatsu, Tatsuya Ohno, Takashi Nakano. Prediction of acute radiation mucositis using an oral mucosal dose surface model in carbon ion radiotherapy for head and neck tumors. PLOS ONE 2015 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0141734.

Yukari Yoshida, Koichi Ando, Ken Ando, Kazutoshi Murata, Yuya Yoshimoto, Atsushi Musha, Nobuteru Kubo, Hidemasa Kawamura, Sachiko Koike, Akiko Uzawa, Takeo Takahashi, Tatsuya Ohno, Takashi Nakano. Evaluation of therapeutic gain for fractionated carbon-ion radiotherapy using the tumor growth delay and crypt survival assays. Radiother Oncol 2015; 117(2):351-7. 査読有 DOI: 10.1016/j.radonc.2015.09.027.

Kubo N, Noda SE, Takahashi A, Yoshida Y, Oike T, Murata K, Musha A, Suzuki Y, Ohno T, Takahashi T, Nakano T. Radiosensitizing effect of carboplatin and paclitaxel to carbon-ion beam irradiation in the non-small-cell lung cancer cell line H460. J Radiat Res. 2015 Jan 18. 査読有  
DOI: 10.1093/jrr/rru085.

白井 克幸, 齋藤 淳一, 川嶋 基敬, 高草木 陽介, 柴 慎太郎, 武者 篤, 深田 恭平, 大野 達也, 高安 幸弘, 高橋 克昌, 近松 一郎, 中野 隆史. Stage III ~ IV 中咽頭癌に対する化学療法併用強度変調放射線治療の初期経験 臨床放射線 59 巻 10 号 Page1357-1364, 2014. 査読有

Imaeda M, Ishikawa H, Yoshida Y, Takahashi T, Ohkubo Y, Musha A, Komachi M, Nakazato Y, Nakano T. Long-term pathological and immunohistochemical features in the liver after intraoperative whole-liver irradiation in rats. J Radiat Res. 2014 Jul;55(4):665-73. 査読有  
DOI: 10.1093/jrr/rru005.

武者 篤, 大野達也, 横尾 聡. 粘膜悪性黒色腫の重粒子線治療 Heavy ion radiotherapy for mucosal malignant melanoma. 日本臨床社編, 皮膚悪性腫瘍 基礎と臨床の最新研究動向, 日本臨床 71 巻増刊号 4, 370-373, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

武者 篤, 横尾 聡 Hsp90 阻害剤 17-AAG による放射線増感効果の検討 第 33 回日本口腔腫瘍学会 January 29-30, 2015, 奈良県新公会堂(奈良県, 奈良市)

〔図書〕(計 2 件)

武者 篤, 他. 患者さんと家族のための放射線治療 Q&A 2015 年版 日本放射線腫瘍学会編 東京:金原出版, 2015;75-79.

武者 篤, 他. 照射誘導損傷と DNA 損傷応答. 安藤興一・中野隆史編, Basic Clinical Radiobiology 4th edition (Edited by M. Joiner, A. v. d. Kogel, HODDERARNOLD, UK) 日本語訳 臨床放射線生物学の基礎, 原著 4 版, 放射線医療国際協力推進機構, 足利:エムプラン株式会社, 2013; 11-26.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武者 篤 (MUSHA Atsushi)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号: 60637122