

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861114

研究課題名(和文) 早期に臨床応用が可能な放射線増感剤～PARP阻害剤の研究

研究課題名(英文) Studies about a clinically usable radiosensitizer - PARP inhibitor

研究代表者

堀 正和 (HORI, Masakazu)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90404714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸部腺癌細胞を用いて、PARP阻害剤オラパリブの放射線増感作用とオラパリブ濃度の関係を検討したが、放射線増感作用は、0.05  $\mu$ M程度の臨床上達成可能な低濃度でもみられた。放射線治療効果とDNA修復蛋白の発現の関係を検討したが、食道癌では、XRCC4低発現の癌細胞は、DNA二重鎖切断修復能が低いため、放射線治療が奏功する可能性が高いことが示唆され、食道癌は、PARP阻害剤による放射線増感効果が期待できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Olaparip, a PARP inhibitor had the radiosensitizing effects in as low concentrations as 0.05  $\mu$ M, that is clinically attainable. In esophageal cancer, the higher expression of XRCC4 indicated the significantly deteriorated local control and overall survival, suggesting that the inhibition of DNA repair may be effective to improve treatments results of esophageal cancer. Olaparib could be promising in the treatment of esophageal cancer as a radionsensitizer. Further researches are required.

研究分野：医歯学

キーワード：放射線治療

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療効果を増強するタイプの抗癌剤と照射との同時併用、即ち化学放射線療法が普及し、多くの癌腫において、放射線治療単独に比べて、有意な放射線治療成績の向上が得られている。しかし、抗がん剤はそれ自体に毒性があるため、照射と同時併用可能な投与量は制限され、それが化学放射線療法の限界となっている。抗がん剤以外にも、現在までに多くの放射線増感作用を持つ物質（放射線増感剤）が発見されていますが、主に強い毒性のため、臨床上、通常使用されているものは、存在しない。従って、毒性の少ない放射線増感剤の開発および臨床応用が望まれている。

### 2. 研究の目的

オラパリブは PARP 阻害剤で、DNA 一本鎖切断の修復を阻害し、DNA 複製分岐点を崩壊させ DNA 二重鎖切断を生成する。オラパリブ (PARP 阻害剤) の放射線増感効果を検討し、放射線増感剤としての臨床応用への可能性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) in vitro assay ~ 子宮頸部腺癌細胞株 (CAC-1) を使用した。コロニーアッセイ法を用いて細胞生存率を求め、薬剤の殺細胞効果や放射線増感効果を解析した。

(2) 免疫組織染色 ~ 食道癌で放射線治療前における、内視鏡的生検組織を用いて、DNA 二重鎖切断の非相同末端結合修復に関与する蛋白である XRCC4、DNA-PKcs、Ku70、Ku86 について免疫染色を施行した。標本の腫瘍組織の中で最も強く染色される領域について、蛋白の発現率を算出した。各生存曲線の算出は Kaplan-Meier 法を用い、生存曲線の比較には Log-Rank 法を用いた。コックス比例ハザードモデルを用いた全生存率における単変量、多変量解析を行い、予後因子を検討した。

### 4. 研究成果

(1) オラパリブの細胞毒性 (殺細胞効果) について

子宮頸部腺癌細胞株 (CAC-1) を使用し、細胞生存率を求め、オラパリブによる細胞毒性 (殺細胞効果) について調べた。オラパリブによる細胞毒性は、軽度であるがみられ、オラパリブ濃度及びオラパリブの細胞培養液への添加時間に依存した。0.05 ~ 1  $\mu$ M の濃度において用量依存的な細胞毒性を認めた。オラパリブによる細胞毒性の時間依存性に関しては、添加時間を 3、6、24 時間で検討したが、3 時間と 6 時間では差はみられなかったが、24 時間では、有意に毒性が大きかった。ちなみに、3 時間の添加時間、1  $\mu$ M のオラパリブ濃度で、5 % 程度の細胞生存率の低下であった。また、24 時間の添加時間、

1  $\mu$ M のオラパリブ濃度で、8 % 程度の細胞生存率の低下であった。

(2) オラパリブの放射線増感作用についてオラパリブの放射線増感作用とオラパリブ濃度の関係では、0.01 ~ 1  $\mu$ M の濃度で検討したが、放射線増感作用は、0.05  $\mu$ M でプラトーに達した。オラパリブの放射線増感作用とオラパリブの添加時間の関係では、添加時間 3、6、24 時間で検討したが、2 Gy では有意差はみられなかったが、6、8 Gy と線量が高くなるに従い、添加時間が長いほど、放射線増感作用が増大する傾向がみられた。

これらの結果は、以前我々の研究室で施行された、ヒト大腸癌細胞 (DLD-1) を使用した同様の研究と、その結果がほぼ一致した。癌の種類が異なるにも関わらず、オラパリブの放射線増感効果を確認できたことは、PARP 阻害剤であるオラパリブを臨床応用するために必要な特性の解析が進んだと考えられる。

(3) オラパリブの放射線増感効果は、DNA 二重鎖切断の生成数の増加によると考えられる。臨床上、PARP 阻害剤による放射線増感効果が期待できる癌の予測のためには、基礎データとして、放射線治療効果と DNA 二重鎖切断修復の関係を検討することが必要である。そこで、免疫組織染色で、DNA 二重鎖切断修復の非相同末端結合修復に関わる蛋白 (XRCC4、DNA-PKcs、Ku70、Ku86) の発現と放射線治療成績の関係を食道癌を対象に解析した。

対象は 1999 年から 2008 年において、扁平上皮癌と診断された食道癌 92 例で年齢の中央値は 68 歳である。病期分類は一期が 22 例、T4 を除いた二期三期が 44 例、T4 および四期が 26 例、生存症例の観察期間中央値は 72 ヶ月であった。

放射線治療は、原発部位および転移リンパ節に対して 60 グレイの線量を目標とし、投与線量中央値は 61 Gy であった。化学療法同時併用は 80 例で、シスプラチン 5 FU が 20 例、ネダプラチン 5 FU が 56 例、5 FU のみが 4 例であった。

単変量、多変量解析において有意差を認めた因子をお示し致します。XRCC4 の発現率はいずれの解析においても有意な、独立した予後因子であった。

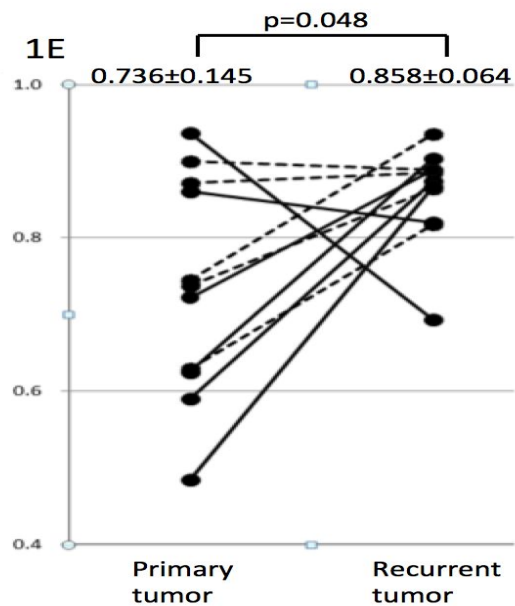
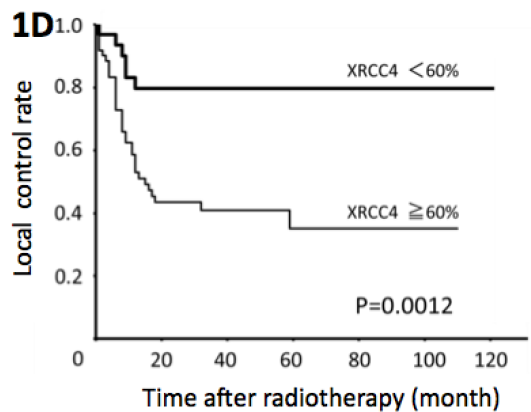
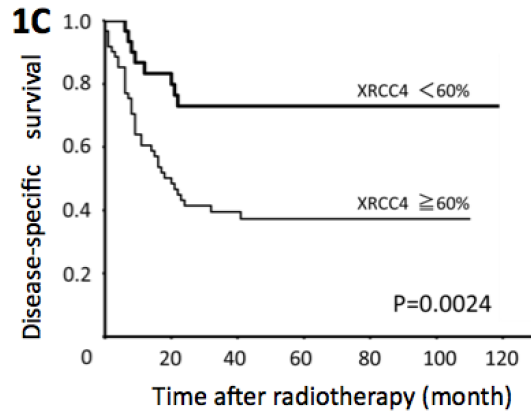
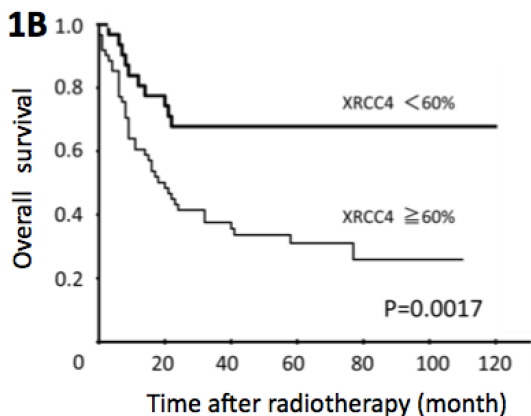
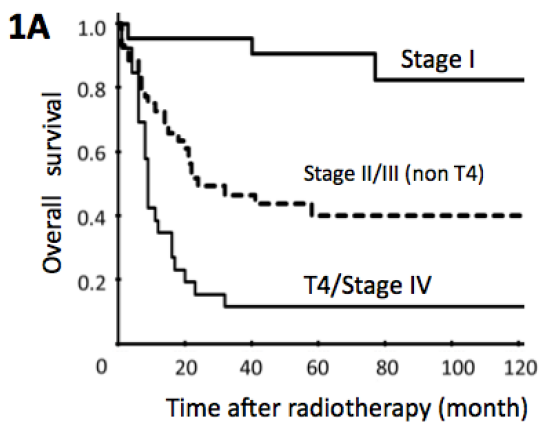
病期別生存曲線において 5 年全生存率は I 期で 80%、T4 を除く II 期 III 期で 40%、T4 および四期で 10% であった (図 1A)。

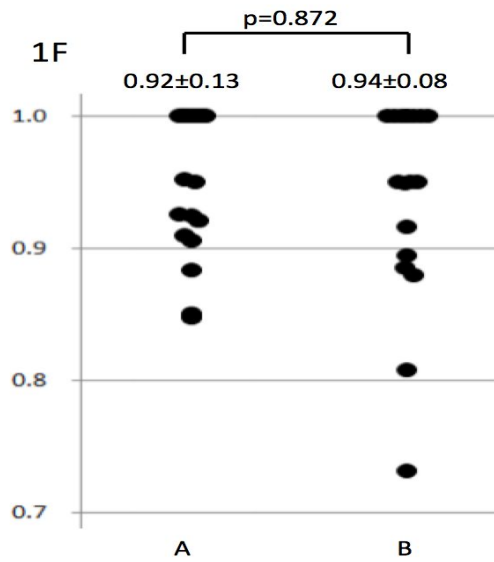
XRCC4 の発現率では、60% 以上の陽性率を示す症例は、全生存率、疾患特異的生存率、局所制御率、いずれにおいても有意に予後不良であった (図 1B, 1C, 1D)。

また、放射線治療後の再発腫瘍における XRCC4 の発現は、放射線治療前の腫瘍の発現に比較して、上昇している症例が大部分であ

り、XRCC4 の高発現が癌細胞の放射線抵抗性を通して、癌の再発と関連している可能性を示唆する(図 1E)。また、図 1F の左側は正常食道粘膜細胞、右側は食道癌細胞の XRCC4 の発現を比較している。食道癌細胞は、正常食道粘膜細胞に比べ、XRCC4 の発現にばらつきがおおきいことが判明した。

当院における食道癌の放射線治療成績は他施設の報告と同等であった。多変量解析において、T1、T2 症例や化学療法併用症例が予後良好であった事は、過去の報告と合致していた。また XRCC4 発現の多寡が、強力でかつ独立した予後因子であった事は過去に新たな知見であった。XRCC4 低発現の腫瘍細胞は、非相同末端結合による DNA 二重鎖切断修復能が低いため、放射線治療が奏功する可能性が高いことが示唆された。この結果より、食道癌は、PARP 阻害剤オラパリブによる DNA2 重鎖切断の生成数の増加による放射線増感効果が期待できる可能性が示唆された。





## 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)

[学会発表](計 1 件)

Hori M, Nakata K, Someya M, Miura K, Sakata K. Overexpression Of XRCC4 Predicts Poor Clinical Outcome Of Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated With Definitive Radiation Therapy. ASTRO's 55th Annual Meeting, 2013 年 9 月 23 日、アトランタ (アメリカ)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 正和 (HORI, Masakazu)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：9 0 4 0 4 7 1 4