

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461887

研究課題名(和文) 寡分割定位放射線治療における放射線生物学的最適化に関する研究

研究課題名(英文) Radiobiological study on hypofractionated high-precision radiotherapy

研究代表者

瀬尾 雄二 (Seo, Yuji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00302000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低線量と対比して高線量における放射線感受性に影響を与える因子を検討した。数理モデルによる分析から放射線増感作用を、DNA2本鎖切断生成量の増加、DNA2本鎖切断修復の抑制、非相同末端結合による誤修復で生じる染色体転座の増加に分類した。染色体転座が生じる確率は線量の2乗に比例して増加するため、は主に低線量で、は主に高線量において影響が相対的に大きくなった。DNA2本鎖切断の生成量や総修復量が同じでも、修復機構の選択が異なれば、によって放射線感受性に変化が生じた。修復機構の選択に影響を与える因子は、寡分割照射法を用いた高精度放射線治療において分子標的となりうる。

研究成果の概要(英文)：We investigated cellular responses to a high-dose-per-fraction radiotherapy compared with a conventionally fractionated radiotherapy. Based on an analysis using biomathematical models, underlying mechanisms of radiosensitizing effects were classified into three factors: 1) Increase of initial DNA damages, 2) Inhibition of DNA double-strand break (DNA-DSB) repairs, and 3) Increased chromosomal translocations mediated by non-homologous end joining. Since a probability of chromosomal translocations is proportional to a square dose, the third mechanism enhanced radiosensitivity in the high dose range to a greater extent than the second mechanism. Through the third mechanism, the altered selection of DNA-DSB repair pathways impacted on radiosensitivity without any changes in the total amount of the initial DNA damage and its repair. The pathway choice of the DNA-DSB repair can be a potential molecular target for hypofractionated high-precision radiotherapy.

研究分野：放射線治療生物学

キーワード：高精度放射線治療 DNA2本鎖切断修復 相同組換え修復 非相同末端接合

### 1. 研究開始当初の背景

近年、放射線治療機器の進歩と照射技術の発展に伴い放射線治療の高精度化が急速に進んできた。画像誘導放射線治療 (IGRT) や強度変調放射線治療 (IMRT) により、物理的に周囲正常組織を避けつつ、腫瘍に線量をより集中させることが可能となりつつある。したがって、今後 1 回に高線量を腫瘍に投与する寡分割照射法が種々の腫瘍に適應される機会が増加すると予想される。しかし、物理的に線量を腫瘍に集中させることが可能であっても、どのように 1 回あたりの線量を設定するのが放射線生物学的に最適であるのかは明確ではない。

放射線による殺細胞効果と線量の関係はしばしば、Linear-quadratic (LQ) モデル (式 1) で表される。

$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (1)$$

LQ モデルでは線量に比例する効果と線量の 2 乗に比例する効果の二つの合算で表し、前者の係数は  $\alpha$  で後者の係数は  $\beta$  で示される。細胞や組織によって  $\alpha$  や  $\beta$  は様々な値を示すが、それらが大きいほど放射線感受性が高いと言える。とくに高線量域での放射線感受性は、線量の 2 乗に比例する効果の係数である  $\beta$  への影響が大きくなる。

われわれは高線量域での放射線感受性に影響を与える因子を分析する目的で、放射線照射後の生存率を修飾する種々の薬剤や分子標的に関する研究を包括的に検索し検討した。1976 年から 2013 年までに発表された 285 の文献をピックアップし、各文献上から総計 653 ペアの線量生存率曲線をデジタル化した上で LQ モデルを用いて分析した。放射線感受性を修飾する因子は 20 のグループに分類した。20 のうち全てのグループで  $\alpha$  値の増加を認めたと、その一方で  $\beta$  値は多くのグループで変化がないか減少した。 $\beta$  値を増加させたのは Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤と低酸素増感剤のみであった。つまり多くの場合、 $\alpha$  と  $\beta$  の比は増加し、線量生存率曲線は放射線照射のみの場合と比べて直線的になり、低線量域と比べて高線量域での増感効果は小さくなる。その一方で PARP および低酸素関連分子は高線量域での放射線感受性に対する数少ない分子標的であることが示唆された。

放射線感受性を決定する最も重要な因子の一つとして DNA 二本鎖切断 (DSB) の修復が挙げられる。DSB 修復は相同組替え修復 (Homologous recombination repair: HRR) と非同相末端接合修復 (non-homologous end joining: NHEJ) の二つの機構からなることが知られているが、照射による DSB に対してどのように 2 つの修復機構が選択されるのか、未だ不明な点が多い。しかし、低線量照

射に比べて、複雑な DNA 損傷が生じる確率が高いと考えられる高線量域では HRR の重要性が相対的に高いと推測される。以上より、HRR と NHEJ のバランスが放射線生存曲線の形状を規定する因子の一つであると仮説を立てこれを検証することにした。

### 2. 研究の目的

低線量と比較して高線量照射で特異的な分子生物学的機構を解明することにより、寡分割照射法の生物学的基盤を確立することを目的とする。これにより線量分割法の設定の個別化や寡分割照射法と放射線増感剤の併用といった新たな治療法を開発し、治療可能比の更なる向上を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) 数理モデルを用いて線量生存率曲線の解析する。曲線の形状変化から放射線感受性に影響を及ぼす因子に関して分析する。
- (2) PARP 阻害剤と放射線の相互作用 (抗腫瘍効果および副作用) を種々の線量分割法を用いて細胞レベルおよびマウスモデルで検討する。
- (3) PARP 阻害剤と高線量放射線との相互作用の分子機構を DNA-DSB に対する HRR と NHEJ のバランスに着目して解明する。

### 4. 研究成果

- (1) 数理モデルを用いた放射線増感作用の分析

先の背景で述べた文献上データの包括的収集から作成した放射線量生存率曲線のデータセットに対して Repair-misrepair (RMR) モデル (式 2) を用いて解析を行った。

$$SF = e^{-\{\delta D - \psi(\delta D - U(t))\}} \left\{ 1 + \frac{\delta TD}{\varepsilon} \right\}^{(\varphi - \psi)\varepsilon} \quad (2)$$

$$U(t) = \frac{\delta(1 - T)D}{1 + \frac{\delta TD}{\varepsilon}}$$

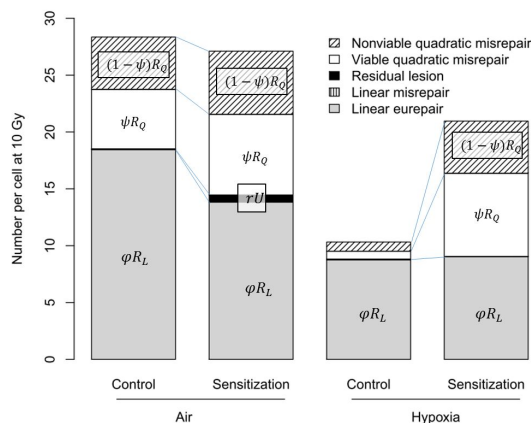
RMR モデルは LQ モデルとは異なり、全ての損傷は潜在的に回復可能であることを前提にしている。DNA2 本鎖切断は線量に比例して生じ、ある時間内に損傷の修復が起こると考える。修復は元々の切断部位同士で結合する Linear repair と、別の切断部位同士が結合する Quadratic misrepair に分類されるが、Linear repair で修復されても損傷部位で遺伝情報が失われる可能性があり、その場合は致死性となり、Quadratic misrepair で修復されて染色体転座が生じても遺伝情報が保持され生存する可能性もある。したがってそれぞれ修復により生存する場合 (Linear eurepair、Viable quadratic misrepair) と、誤修復の結果として細胞死に至る場合 (Linear misrepair、Nonviable quadratic

misrepair) を考える。もし、時間内に修復不可能であれば損傷が残存し、細胞死に至る。それらが生じる確率を5つのパラメータで表すことで生存率が推定するモデルである。

RMR モデルは数式が複雑になるが、LQ モデルと異なり、照射後の生物反応を定量することができる点に着目し、10Gy 照射後の1細胞あたりの DNA 損傷とその修復量を推定した(図1)。放射線照射のみの場合では、生じた損傷の約 2/3 は Linear eurepair で修復され、Linear misrepair は見られない。残り 1/3 は Quadratic misrepair で修復されるが、そのうち半数が Nonviable となった。残存損傷は見られないことから、RMR モデルは照射による細胞死が致死性染色体転座によって起こることを支持した。増感剤を併用した場合には、生じた DNA 損傷の量に増加はないが、Linear eurepair は減少し、残存損傷と Quadratic misrepair が増加した。増感作用による細胞生存率の減少は残存損傷と Quadratic misrepair の増加が原因であることを示唆している。

低酸素条件下で照射された場合にはより大きな変化が見られた。生成した DNA 損傷量は大きく減少し、ほぼ Linear eurepair で修復されることを示した。さらに低酸素増感剤を併用した場合には DNA 損傷の増加が明らかであり、増加した損傷は主に Quadratic misrepair で修復されている。つまり DNA 損傷生成の増加とそれに伴う致死性染色体転座の増加が増感作用のメカニズムであることを示している。

図 1



RMR モデルに基づく放射線増感作用のメカニズムは、DNA 損傷生成の増加、DNA 修復抑制による残存損傷の増加、Quadratic misrepair による致死性染色体転座の増加の3つに分類できる。DNA 修復活性自体が低下すれば、誤修復も必然的に減少することから、 $\alpha$  と  $\beta$  は互いに排他的なメカニズムと考えられる。

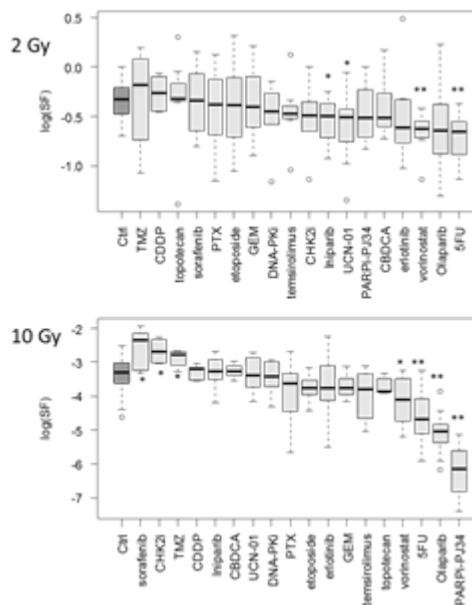
RMR モデルと LQ モデルでの解析結果を対比すると、 $\alpha$  は Linear repair と負の相関を示し、残存損傷量と最も強い正の相関を示

した。これは修復の抑制が  $\alpha$  値の増加 ( $\alpha$ -sensitization) のメカニズムであることを示唆している。一方、 $\beta$  では DNA 損傷量、Linear repair、Quadratic repair と正の相関を認めることから、 $\alpha$  とは逆に修復量の増加に伴う誤修復増加が  $\beta$ -sensitization のメカニズムであることを示唆している。

つまり何らかのメカニズムによって修復全体が抑制されることによって DNA 損傷の遺残が増加し、 $\alpha$ -sensitization が生じるが、この場合、修復自体が減少するので誤修復も減少し、結果として  $\beta$ -sensitization は生じにくくなると考えられる。一方、2つの修復機構の選択に変化が生じ、HRR での修復が減少し NHEJ が増加すれば Quadratic misrepair が生じる確率が増加し、 $\beta$ -sensitization が生じると考えられた。

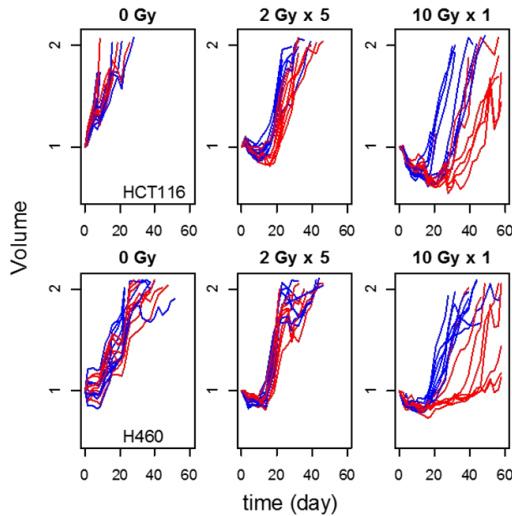
(2) PARP 阻害剤を含む 18 種類の抗癌剤および分子標的薬に対して、その増感作用の大きさを低線量 (2 Gy) と高線量 (10 Gy) で比較した。肺癌細胞 A549 (図2) および大腸癌細胞 HT29 を用いた実験において、低線量に比し高線量で最も大きな放射線増感作用を示したのはいずれの細胞でも PARP 阻害剤であった。

図 2



(3) ヒト大腸癌細胞 HCT116 およびヒト肺癌細胞 H460 を用いて 3D-multicellular spheroid (MCS 3次元球状培養) を作成した。MCS に対して 2Gy x 5 または 10Gy x 1 回の照射を行い、PARP 阻害剤 (PJ34 5 $\mu$ M) の有無で MCS の再増大速度を測定した(図3)。PARP 阻害剤を加えることにより、MCS 再増大抑制が 10Gy x 1 回照射で認められた。一方で 2Gy x 5 回照射では PARP 阻害剤の有無で差は認められなかった(赤 PARP 阻害剤あり; 青 PARP 阻害なし)。

図 3

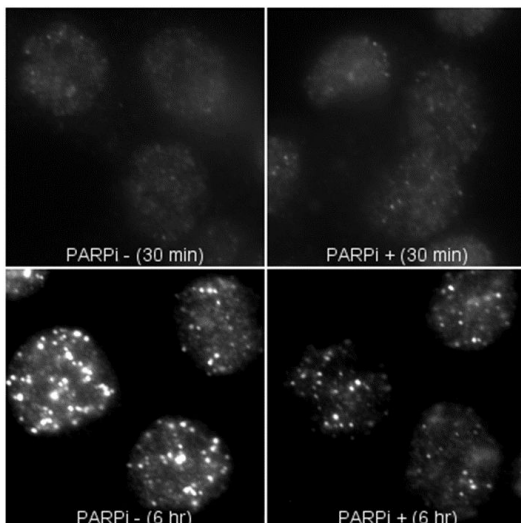


HCT116 細胞を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作成し、MCS と同様の照射実験を施行した。10Gy x 1 回照射では PARP 阻害剤 (PJ34 10 mg/kg 腹腔内投与) の追加で腫瘍再増大は照射単独と比較して有意に抑制されたが、2Gy x 5 回ではその効果は見られなかった。

(4) 照射による DNA2 本鎖切断修復の経時的推移を調べる目的で、リン酸化ヒストン H2AX をウエスタンブロッティングで定量した。HCT116 細胞に対して 10Gy 照射した後 30 分でリン酸化ヒストン H2AX の著明な増加が見られたが、PARP 阻害剤の有無で差はなかった。しかし、2 時間後、6 時間後では PARP 阻害剤を追加した方がリン酸化ヒストン H2AX の減少が促進された。したがって PARP 阻害剤によって DNA2 本鎖切断修復は抑制されていないことが示唆された。

(5) 相同組換え修復を定量する目的で、10Gy 照射 30 分後および 6 時間後に Rad51 focus を計数した。PARP 阻害剤を使用することで、照射後に発現する Rad51 focus の数は有意に減少した(図 4)。

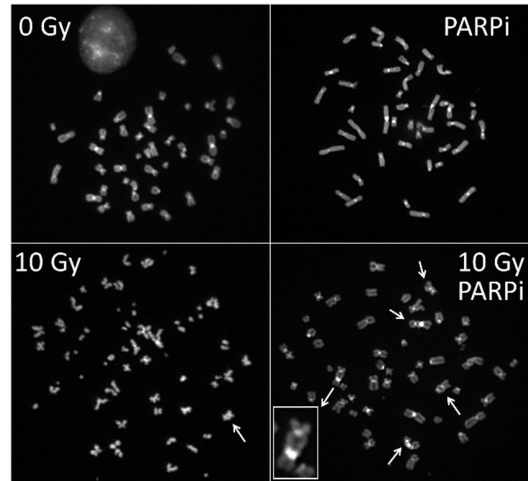
図 4



(6) 相同組換え修復が減少するのに対して、非相同末端結合の増減を調べる目的で、分裂中期の細胞において 2 動原体染色体数を C-banding 法で計測した。

10Gy 照射後では中央値で 1 細胞あたり 1 つの 2 動原体染色体が観察された一方で、10Gy + PARP 阻害剤では 1 細胞あたり 3 個に増加した(図 5)。PARP 阻害剤を使用した場合、照射単独と比較して非相同末端結合による誤修復が増加することを示すと考えられた。

図 5



(7) フローサイトメトリーを用いて細胞あたりの DNA 量の経時変化を測定した。10Gy 照射後 6-24 時間には細胞周期の G2/M チェックポイント停止に伴い tetraploid G2/M 細胞の一過性の増加を認め、その後経時的に tetraploid 細胞は減少し、diploid 細胞の割合が増加した。それに対して PARP 阻害剤を追加した場合は、照射後 48 時間、72 時間においても tetraploid 細胞の割合の高い状態が持続した。しかし、G2 期や M 期のマーカーである cyclin B1 およびリン酸化ヒストン H3 のレベルは、逆に PARP 阻害剤を加えた方が早期に低下することから、PARP 阻害剤は照射による染色体異常の増加とともに tetraploid G1 期へ誘導すると考えた。

(8) 照射後のフローサイトメトリー解析において sub-G1 population は PARP 阻害剤によってむしろやや減少する傾向が見られた。PARP 阻害剤による放射線増感作用ではアポトーシス誘導による細胞死の増加が生じる可能性は小さいと考えられた。そこで、老化関連  $\beta$ -galactosidase 活性の定量を行ったところ、PARP 阻害剤を加えることにより照射による  $\beta$ -galactosidase 活性の増加をさらに増強することが示された。すなわち PARP 阻害剤による放射線増感作用は照射によって誘導される細胞老化を増強することによって引き起こされると考えられた。

これから結果を総合すると、放射線照射による DNA 損傷の修復能が放射線感受性に大きく影響することは言うまでもないが、総修復量が同じでも DNA2 本鎖切断の修復経路が異なれば放射線感受性に変化が生じると考えられる。特に、非相同末端結合による修復は染色体転座による致死的染色体異常を生じる可能性があるため、非相同末端結合による修復割合の増加が細胞死の増加をきたすと考えられる。非相同末端結合の誤修復による染色体転座が生じる確率は線量の 2 乗に比例することから、低線量と比較して高線量域での細胞生存率への影響が大きくなる。すなわち 2 つの修復機構の選択は特に高線量域での放射線感受性に関わるため、修復機構の選択を制御する因子は、寡分割照射法を用いた放射線治療における分子標的となりうる。今回の結果は PARP が照射後の DNA 修復機構選択に関与することを示しており、PARP 阻害剤は寡分割照射法と併用するのに適した分子標的薬であると考えられる。

#### 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 1 件)

Seo Y., Tamari K., Yoshioka Y., Isohashi F., Suzuki O., Hayashi K., Takahashi Y., Baek S., Otani K., Ogawa K.

Characterization of in vitro radiosensitization in mammalian cells using biomathematical modelling: implications for hypofractionated radiotherapy with a combined modality approach.

British Journal of Radiology 2016; 89: 20150724. 査読あり。

DOI: 10.1259/bjr.20150724

[学会発表](計 2 件)

Seo Y., Yoshizaki K., Hayashi K., Tamari K., Isohashi F., Suzuki O., Yoshioka Y., Ogawa K.

Systematic Linear-Quadratic Analysis for Radiosensitization In Vitro: Implications for Hypofractionated Radiation Therapy in the Combined Modality Approaches.

American Society for Radiation Oncology Annual Meeting. 2014 年 9 月 San Francisco (USA)

Int J Radiat Oncol.Biol Phys; 2014 Sep; 90: S801.

DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.05.2312

Seo Y., Yoshizaki K., Tamari K., Takahashi Y., Otani K., Koizumi M., Ogawa K.

Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors induce  $\beta$ -radiosensitization through an altered selection of DNA double strand break repair pathways.

American Association for Cancer Research Annual Meeting.

2017 年 4 月 Washington, DC (USA)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

瀬尾 雄二 (SEO, Yuji)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00302000

##### (2) 研究分担者

小川 和彦 (OGAWA, Kazuhiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40253984