

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10101

研究課題名(和文) DNA修復阻害による合成致死性を応用した新たな食道癌化学放射線療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel chemoradiotherapy using synthetic lethality by DNA repair inhibitors for esophageal cancer

研究代表者

浜井 洋一 (Hamai, Yoichi)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：90423384

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)：食道癌細胞株において、抗癌剤、PARP阻害剤、放射線照射による抗腫瘍効果を評価した。また、これら薬剤および放射線併用での抗腫瘍効果の評価も行い相乗効果を確認した。さらに、RNAiによるRAD51の発現抑制下で、上記薬剤、放射線照射の併用による抗腫瘍効果を評価した。この過程で、H2AXとRAD51を経時的に測定し、抗腫瘍効果の発現・増強のメカニズムを解明した。PARPとRAD51を標的とした治療と、抗癌剤および放射線治療の相乗効果について定量を行い、作用機序を解明することができた。PARPとRAD51を標的とした2種類のDNA修復機構を阻害することで、より有効な新治療の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the antitumor effects of anticancer drug, PARP inhibitor (Olaparib) and irradiation to esophageal cancer cell lines. Furthermore, we verified the combinational effects of anticancer drug, PARP inhibitor and irradiation. These anticancer effects were also evaluated in condition using RNAi for RAD51. Moreover, we could revealed the mechanism in expression and enhancement of anticancer effect by over time evaluation of H2AX and RAD51 under these treatments for esophageal cancer cell lines. We aim to develop novel chemoradiotherapy using synthetic lethality by DNA repair inhibitors for PARP and RAD51 in esophageal cancer in the future.

研究分野：消化器外科

キーワード：DNA修復阻害

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道癌において化学放射線療法 (Chemoradiotherapy: CRT)は、根治的 CRT や手術と組み合わせた集学的治療として、いずれのステージにおいても広く用いられる。食道癌の治療成績向上のためには、CRT の効果を増強させる新規薬剤やより有効な治療レジメンの開発が極めて重要である。

(2)DNA 損傷は様々な機構によって修復され、修復不可能な場合はアポトーシスが誘導される。DNA 損傷によりアポトーシスを誘導させることが放射線や抗癌剤の治療原理である。DNA 損傷には 1 本鎖 DNA 切断 (single-strand break: SSB) と 2 本鎖 DNA 切断 (double-strand break; DSB) があり、SSB が蓄積すると DSB に移行し細胞に致命的ダメージを与える。これらの DNA 損傷はそれぞれ主に塩基除去修復機構 (base excision repair: BER) と相同組換え修復機構 (homologous recombination repair; HR) によって修復される。

(3)Poly (ADP - ribose) polymerase (PARP) は SSB を修復する経路の BER を担っている酵素である。PARP 阻害剤は、HR が欠如した腫瘍において合成致死 (Synthetic lethality: 単独遺伝子欠損では細胞や個体に対する致死性を示さないのに、複数の遺伝子の欠損が共存すると致死性を発揮する現象) を誘導し、高度のゲノム不安定性を生じさせる。また化学療法や放射線における抗腫瘍効果を増強する。

(4)RAD51 は、DSB 修復機構である HR において、その中心的役割を担っている。HR では、DNA 損傷部位近傍のヒストン H2AX がリン酸化され (γH2AX)、そこに RAD51 などのゲノム修復タンパク質が核内フォーカスを形成し、損傷を修復する。RAD51 の発現亢進は種々の癌で認められ、抗癌剤に対する耐性や放射線治療に対する感受性低下と関連する。

(5)癌では DNA 損傷・修復機構が密接に関与し治療標的となる。1 本鎖と 2 本鎖 DNA 切断の修復に関わる PARP と RAD51 を標的とし同時に阻害することで、高度のゲノム不安定性が生じ効率の良い抗腫瘍効果が期待される。つまり合成致死性による抗腫瘍効果増強が期待できる。

2. 研究の目的

(1)食道癌細胞株において抗癌剤および放射線照射に、PARP と RAD51 の阻害を加え、抗腫瘍効果を in vitro, in vivo で評価する。

(2)その過程で、DNA 損傷の指標である H2AX と DNA 切断の修復に関わる RAD51 を経時的に測定し抗腫瘍効果の発現・増強メカニズムを解明する。

(3)これらの結果から、食道癌に対する DNA 損傷・修復機構を標的とした新規化学放射線療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

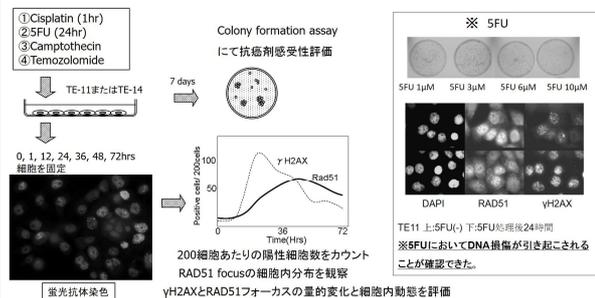
(1)食道癌細胞株に DNA 損傷を引き起こす抗癌剤 (Cisplatin, 5FU, Camptothecin, temozolomide) を単独および併用添加し、抗癌剤併用の相加・相乗効果を評価する。さらに DNA 損傷の指標である H2AX と DNA 修復蛋白 RAD51 フォーカスの量的変化 (kinetics) と細胞内動態を経時的に測定し、各抗癌剤の細胞内作用部位と効果発現メカニズムを明らかにする。抗癌剤、PARP 阻害剤、放射線照射を併用し同様の検討を行い、併用による相加・相乗効果を評価するとともに、DNA 損傷 (H2AX) と修復 (RAD51) の経時的变化を解析する。

(2)RNAi 法を用い恒常的に RAD51 の発現抑制を行い、食道癌細胞株に対する抗腫瘍効果を評価する。さらに、対照群、抗癌剤投与群、放射線照射単独群、Olaparib 単独群、抗癌剤+Olaparib 併用群、Olaparib+放射線併用群、抗癌剤+Olaparib+放射線併用群で抗腫瘍効果の評価を行う。DNA 損傷の指標として H2AX を経時的に測定。これとともに RAD51 の変化を確認する。

(3)ヌードマウスに RAD51 発現抑制食道癌細胞株を皮下移植し、上記と同様に 対照群、抗癌剤投与群、放射線照射単独群、Olaparib 単独群、抗癌剤+Olaparib 併用群、Olaparib+放射線併用群、抗癌剤+Olaparib+放射線併用群で Tumor volume を測定する。種々のコンビネーションによる in vivo での抗腫瘍効果を検証する。

4. 研究成果

(1)食道癌細胞株において 抗癌剤 PARP 阻害剤 (Olaparib) 放射線照射による抗腫瘍効果を評価した。また、これら薬剤および放射線併用での抗腫瘍効果の評価を行い、PARP 阻害剤と放射線照射の相乗効果を確認した。



※ 食道癌細胞株の放射線感受性とCisplatin,5FUの至適濃度・時間は、既に確認済みである。抗腫瘍効果およびγH2AX, RAD51経時的变化の評価

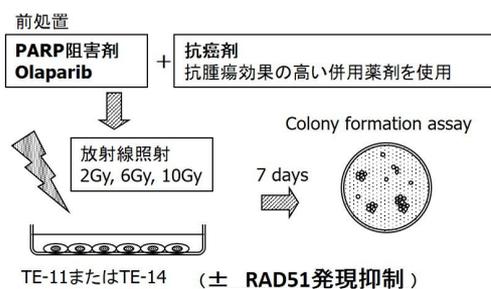
(2)RNAi による RAD51 の発現抑制下で、上記薬剤、放射線照射の併用による抗腫瘍効果を評価した。この抗腫瘍効果の発現過程で H2AX と RAD51 を経時的に測定し抗腫瘍効果の発現・増強のメカニズムを解明した。

(上図)

PARP 阻害剤による抗腫瘍効果と H2AX, RAD51 発現の経時的变化を評価する。PARP 阻害剤 (Olaparib, 1,5,10 μ M (24hr)) を添加し、同様の検討を行い、Olaparib の添加による抗腫瘍効果を評価するとともに、DNA 損傷 (H2AX) と修復 (RAD51) の経時的变化を解析した。

放射線照射による抗腫瘍効果と H2AX, RAD51 発現の経時的变化を評価放射線照射後の食道癌細胞株においても同様の検討を行い、放射線による抗腫瘍効果を評価するとともに、DNA 損傷 (H2AX) と修復 (RAD51) の経時的变化を解析した。

抗癌剤, PARP 阻害剤, 放射線照射併用による抗腫瘍効果と、H2AX, RAD51 発現の経時的变化を評価抗癌剤, PARP 阻害剤, 放射線照射を併用し同様の検討を行い、併用による相加・相乗効果を評価するとともに、DNA 損傷 (H2AX) と修復 (RAD51) の経時的变化を解析した。(下図)



0, 1, 12, 24, 36, 48, 72hrsで細胞を固定し蛍光抗体染色を行い、 γ H2AXとRAD51フォーカスの量的変化と細胞内動態を評価。抗腫瘍効果をColony formation assayで評価。

RAD51発現抑制下においてPARP阻害を加えることで、2本鎖DNA切断修復阻害下で1本鎖DNA切断の修復を同時に阻害することが出来る。

合成致死性による抗腫瘍効果発現・増強メカニズムを解析する。

RAD51発現抑制の有無で、抗癌剤, PARP阻害剤, 放射線の抗腫瘍効果および γ H2AX, RAD51経時的变化を評価

(3)今後、ヌードマウスに RAD51 発現抑制食道癌細胞株を皮下移植し、上記と同様に 对照群, 抗癌剤投与群, 放射線照射単独群, Olaparib 単独群, 抗癌剤+Olaparib 併用群, Olaparib+放射線併用群, 抗癌剤+Olaparib+放射線併用群で Tumor volume を測定する。種々のコンビネーションによる in vivo での抗腫瘍効果を検証する。

(4)PARP と RAD51 を標的とした治療と、抗癌剤および放射線治療の相乗効果について定量を行い、その作用機序を解明することがで

きた。PARP と RAD51 を標的として 2 種類の DNA 修復機構を阻害することで、より有効な新治療を開発を目指し、その抗腫瘍効果発現機構を明らかにすることで癌治療の発展につなげていきたい。

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 5件)

Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Murakami Y, Nishibuchi I, Nagata Y, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Okada M. Preoperative prediction of a pathologic complete response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. Surgery. 査読有, 2018. Epub ahead of print
doi:10.1016/j.surg.2018.01.011.

Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Okada M. Treatment Outcomes and Prognostic Factors After Recurrence of Esophageal Squamous Cell carcinoma. World J Surg. 査読有, 2017. Epub ahead of print
doi: 10.1007/s00268-017-4430-8.

Emi M, Hihara J, Hamai Y, Furukawa T, Ibuki Y, Okada M. Clinicopathologic Features of Submucosal Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Thorac Surg. 査読有, 2017;104(6):1858-1864.
doi: 10.1016/j.athoracsur.2017.06.037.

Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Murakami Y, Nishibuchi I, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Nagata Y, Okada M. Evaluation of Prognostic Factors for Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Neoadjuvant Chemoradiotherapy Followed by Surgery. World J Surg. 査読有, 2018;42(5):1496-1505.
doi: 10.1007/s00268-017-4283-1.

Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Okada M. Effects of Neoadjuvant Chemoradiotherapy on Pathological TNM Stage and Their Prognostic Significance for Surgically-treated Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res. 査読有, 2017;37(10):5639-5646.
URL:<http://ar.iiarjournals.org/content/37/10/5639.long>

〔学会発表〕(計 5件)

浜井洋一、恵美 学、伊富貴雄太、山北伊知子、黒川智彰、岡田守人、進行食道癌における術前化学放射線療法 + 手術後の早期再発死亡リスク因子、第118回日本外科学会定期学術集会、2018/4/5、東京

浜井洋一、恵美 学、古川高意、伊富貴雄太、岡田守人、高齢者食道癌に対する治療とその成績、第71回日本食道学会学術集会、2017/6/15、軽井沢

浜井洋一、恵美 学、古川高意、伊富貴雄太、岡田守人、Treatment outcomes in esophageal cancer with neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery、第72回日本消化器外科学会総会、2017/7/22、金沢

Yoichi Hamai, Tomoharu Yoshiya, Manabu Emi, Takaoki Furukawa, Yuta Ibuki, Morohito Okada, Prospective randomized crossover study of effects of traditional Japanese herbal medicine rikkunshito on food intake and plasma acylated ghrelin levels in patients with esophageal cancer administered with cisplatin-based chemotherapy, 2017 Gastrointestinal cancer symposium, 2017/1/19, San Francisco

Yoichi Hamai, Jun Hihara, Manabu Emi, Takaoki Furukawa, Ichiko Yamakita, Yuta Ibuki, Tomoaki Kurokawa, Morihito Okada, Effects of neoadjuvant chemoradiotherapy on TNM staging and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma, 15th World congress, International society for diseases of the esophagus, 2016/9/19, Singapore

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0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
浜井 洋一 (HAMAI YOICHI)
広島大学・病院・講師
研究者番号：90423384

(2)研究分担者
岡田 守人 (OKADA MORIHITO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：70446045

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
恵美 学 (EMI MANABU)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：30464308

伊富貴雄太 (IBUKI YUTA)
広島大学・病院・医科診療医
研究者番号：40581369