

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年～2008年

課題番号：19591462

研究課題名（和文） 放射線治療の個別化に向けた DNA 2 重鎖切断修復に関わる蛋白質の研究

研究課題名（英文） Research of proteins involved in repair of DNA double strand breaks for individualization of radiation therapy

研究代表者

坂田 耕一

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10235153

研究成果の概要：

これまでの我々の DNA-PK(DNA 依存性プロテインキナーゼ)の研究成果を臨床応用に近づけることを目標として、DNA-PK 活性を阻害して、放射線による殺細胞効果を増感する方法の開発を目指した。そこで、ギメラシルに注目して研究を行った。ギメラシルは、抗癌剤 TS-1 の一成分であり、肝臓での 5-FU の分解を阻害し、血中 5-FU 濃度を高値に保つ作用をもつ。しかし、ギメラシル自体が放射線増感効果を持つことが報告されており、その放射線増感の分子メカニズムを検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線医学

キーワード：放射線治療学

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞の放射線感受性及び患者の照射に対する耐容能力に応じた個別化した放射線治療が求められている。細胞の本質的放射線感受性に関しては、最近の基礎研究により、 $\gamma$ 線による細胞死に最も関係する DNA 2 重鎖切断(DSB)の修復メカニズムが急速に解明されつつある。

## 2. 研究の目的

X 線が細胞に照射されると様々な種類の DNA 損傷が引き起こされるが、その中でも 2 本鎖 DNA 切断は最も修復が困難な DNA 損傷で、X 線による細胞死に最も関係する事象は、2 本鎖 DNA 切断である。腫瘍細胞の本質的放射線感受性は、2 本鎖 DNA 切断の修復能に大きく影響されることが判明している。ここまでは、20 年前に既に判明して

いたのであるが、2本鎖 DNA 切断修復の分子メカニズムは、しばらく不明なままであった。しかし、ここ10年の分子生物学を応用した放射線生物学の急速な進歩により、2本鎖 DNA 切断の修復メカニズム及びその過程に関わるタンパク質の全容が解明されつつある。その概略は、DNA 2本鎖切断は相同組換え修復と非相同末端結合修復の少なくとも2経路により再結合され、両経路は状況に応じて使い分けられる。相同組換え修復とは、切断された DNA と相同の姉妹染色体の DNA を鋳型とした DNA 合成により修復を行うもので、NBS1、MRE11 と RAD50、RAD51、RAD54 などの蛋白が関与し、全細胞周期で働く。非相同末端結合修復の概略は、DNA-PK(DNA 依存性プロテインキナーゼ)が、2本鎖 DNA 断端に結合し、リガーゼ IV と結合している XRCC4 蛋白をリン酸化し、リガーゼ IV を活性化して、リガーゼ IV が DNA 切断を再結合するというものであるが、姉妹染色体が必要なため細胞周期の late S、G2 期でしか作用しない。

我々は、抗癌剤 TS-1 の一成分であるギメラシルの放射線増感効果を検討してきた。ギメラシルの放射線増感効果は、検討した10種類以上のすべての細胞でみられ、また、ギメラシル自体には殺細胞効果はみられなかった。また、*in vitro* の実験で最大の増感効果を得るのに必要なギメラシル投与量は、これまでの動物実験や TS-1 の臨床データより、臨床上十分投与可能と考えられる。また、ギメラシルは毒性が少ないため分割照射期間中連日投与が可能である可能性があり、大きな増感効果が得られることが期待される。

本研究では、ギメラシルで放射線増感効果の分子メカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) DNA-PK(DNA 依存性プロテインキナーゼ)活性を欠損し、非相同末端結合(NHEJ)に障害がある細胞とその親の細胞の計3組6種類の細胞を用い、Colonogenic assay を施行した。M059K・M059J、CHO-K1・Xrs5、V79・XR15B の3組6種の腫瘍細胞を用い、CDHP を 1000  $\mu$  M 添加した群と添加しない群の2群に分け、24時間後に0, 1, 2, 4Gy の照射を行った。14日間培養後 Colony 数をカウントした。上記6種の細胞群に CDHP を 0, 200, 1000, 2500, 5000  $\mu$  M 加えた。24時間後に0, 4Gy の放射線照射を照射し、14日後に染色、Colony 数をカウントした。

(2) 非相同末端結合(NHEJ)経路に障害のある細胞株とその親株の3組6種類の細胞 (M059K/M059J、CHO-K1/Xrs5、V79/XR15B) に、1mM ギメラシル添加24時間後に4Gy 照射、照射後24時間の残存  $\gamma$ H2AX フォーカス数を計測した。またフ

ォーカス数の Time course を見るために、4Gy 照射後 1,4,8,24 時間後のフォーカス数を計測した。

(3) SCneo は、部位特異的な DNA 二重鎖切断の相同組換え修復アッセイ系である。SCneo は、薬剤耐性遺伝子 neo を相同組換えの対象とし、I-Sce I という制限酵素による部位特異的な DNA 二重鎖切断の導入を行なう事で、 $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$  レベルでの組換えイベントが検出可能である。DT40 細胞 (ニワトリ B リンパ球細胞)、HeLa 細胞を用いて、1mM のギメラシル 48 時間で処理し、相同組換え頻度を、コントロールと比較した。(1) DNA-PK(DNA 依存性プロテインキナーゼ)活性を欠損し、非相同末端結合(NHEJ)に障害がある細胞とその親の細胞の計3組6種類の細胞 (M059K/M059J、CHO-K1/Xrs5、V79/XR15B) を用い、1mM ギメラシル添加24時間後に4Gy、照射後24時間の残存  $\gamma$ H2AX フォーカス数を計測した。またフォーカス数の Time course を見るために、4Gy 照射後 1,4,8,24 時間後のフォーカス数を計測した。

### 4. 研究成果

(1) 照射24時間後の残存  $\gamma$ H2AX フォーカス数は、DNA 2重鎖切断の修復能の指標となる事が報告されている。非相同末端結合修復を欠損している M059J、Xrs5、XR15B 細胞では、ギメラシル添加による照射24時間後の残存フォーカス数はギメラシル非添加群に比べて高かった。親細胞の残存  $\gamma$ H2AX フォーカス数には、ギメラシル添加による影響がみられなかった。これはギメラシルの放射線増感効果が DNA 2重鎖切断修復を阻害することによることを示唆する。また、残存  $\gamma$ H2AX フォーカス数を指標にしたギメラシルの放射線増感効果が非相同末端結合修復欠損細胞にのみみられたことにより、ギメラシルによる放射線増感効果は相同組み替え修復の阻害によることが推察された。また、Time course の検討では、照射後1,4時間まではフォーカス数に明らかな差がなく、8,24時間後で差が見られた。

(2) ギメラシルによる増感効果は、親細胞より、M059J、Xrs5、XR15B の DNA-PK 活性欠損細胞でより大きくみられた。もし、ギメラシルが非相同末端結合修復を阻害するならば、DNA-PK 活性欠損細胞は非相同末端結合修復が機能していないため、ギメラシルの増感効果はみられないはずである。しかし、結果は、親細胞より DNA-PK 活性欠損細胞でギメラシルによる放射線増感効果は大きくみられたことより、ギメラシルは、相同組み替え修復を阻害することが推察された。また、ギメラシルの濃度と放射線増感効果の関係を検討すると、ギメラシルの濃度が

0.2 から 1mM で放射線増感効果の上昇を認め、放射線増感効果は 1mM にてプラトーに達した。

(3) 処理が I-SceI のみの群に比べ、I-SceI +ギメラシル(1mM,48h) 群は、相同組み替え修復による gene conversion 頻度が 15% 程度低下した。細胞の生存率はギメラシル 48 時間処理で全く低下しなかった。HeLa 細胞でも同様の結果であった。また、ギメラシルの濃度を変化させ、HR による gene conversion 頻度を測定した所、ギメラシルの濃度が 1mM で HR 頻度の抑制も飽和した。これは、clonogenic assay において、ギメラシルの放射線増感効果が 1mM で飽和する結果と一致した。この結果より、ギメラシルの放射線増感効果は、DNA 二重鎖切断の相同組換え修復の阻害によるものと考えられる。

以上、(1) (2) (3) を総合すると、ギメラシルの放射線増感効果は、放射線照射による DNA 2 重鎖切断の修復メカニズムの中の相同組換え修復を阻害することによることを解明した。

## 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)

[雑誌論文] (計 9 件)

1 K Sakata, M Someya, H Nagakura, K Nakata, A Oouchi, M Takagi, and M Hareyama: Brachytherapy for oral tongue cancer: An analysis of treatment results with various biological markers. Jap J Clin Oncol. 38 ;402-407, 2008. 査読有。

2 K. Sakata, H Sakurai, Y Suzuki, S Katoh,, T Ohno, T Toita, M Kataoka, E Tanaka, Y Kaneyasu, T Uno, Y Harima, and T Nakano: Results of concomitant chemoradiation for cervical cancer using high dose rate intracavitary brachytherapy : Study of JROSG (Japan Radiation Oncology Study Group). Acta Oncologica. 47 ;434-441, 2008. 査読有。

3 H. Fujii, K. Sakata, Y. Katsumata, R. Sato, M. Kinouchi, M. Someya, S. Masunaga, M. Hareyama, H. M. Swartz and H. Hirata: Tissue oxygenation in a murine SCC VII tumor after X-ray irradiation as determined by EPR

spectroscopy. Radiother Oncol. 86 (3); pp. 354-360, 2008. 査読有。

4 K Sakata, M Someya, Y Matsumoto, and M Hareyama: Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity. Radiation Medicine. 25(9) ;433-438, 2007. 査読有。

5 坂田耕一、染谷正則、中田健生、高木克、小島一男、晴山雅人、: 多分割照射の基礎と臨床-多分割照射の理論の臨床への応用: 頭頸部癌 33(3) ; 280-282、2007. 査読なし。

6 M Someya, K Sakata, Y Matsumoto, M Satoh, H Narimatsu, and M Hareyama: Immunohistochemical analysis of Ku70/86 expression of breast cancer tissues. Oncology Reports. 18(6) ;1483-1487, 2007. 査読有。

7 M Someya, K Sakata, Y Matsumoto, H Tauchi, H Narimatsu, and M Hareyama: Association of DNA-PK activity and radiation-induced NBS1 foci formation in lymphocytes with clinical malignancy in breast cancer patients. Oncology Reports. 18(4) ;873-878, 2007. 査読有。

8 坂田耕一、染谷正則、晴山雅人: 発癌、放射線感受性と DNA 2 本鎖切断修復能: 癌の臨床 53(6) ; 361-364、2007. 査読なし。

9 K. Sakata, H. Yamamoto, Y. Matsumoto, M. Someya, and M. Hareyama: cDNA analysis of gene expression associated with DNA-dependent protein kinase activity. Int J Oncol. 30(2) ;413-420, 2007. 査読有。

[学会発表] (計 3 件)

1 坂田耕一、ギメラシルの放射線増感作用、第 21 回日本放射線腫瘍学会、2008 年 10 月 18 日、札幌パークホテル

2 坂田耕一、ギメラシルの放射線増感効果の分子メカニズム、第 66 回日本医学放射線学会、2008 年 4 月 6 日、パシフィコ横浜

3 坂田耕一、SCneo レポーター法によるギメラシル放射線増感効果の検討、第 20 回日本放射線腫瘍学会、2007 年 12 月 13 日、福岡国際会議場

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 耕一 (SAKATA KOH-ICHI)

札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号・10235153

(2)研究分担者

高木 克 (TAKAGI MASARU)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号・10404716

(3)連携研究者