

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890271

研究課題名（和文）炭素イオン線による細胞照射効果に与える Hsp90 阻害剤 17-AAG の影響

研究課題名（英文）Combination treatment with carbon ions and Hsp90 inhibitor 17-AAG

研究代表者

野口 実穂（NOGUCHI MIHO）

独立行政法人 日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究職

研究者番号：40455283

研究成果の概要：炭素イオン線照射（以下、炭素線）に化学療法剤である Hsp90 阻害剤 17-AAG を併用し、炭素線による細胞致死効果の増強を試みた。その結果、前立腺癌細胞で両者の併用により炭素線照射効果が増強され、細胞死が顕著に増加した。この原因として 17-AAG による DNA 二本鎖切断（以下、DSB）の修復阻害が考えられたが、炭素線により誘発された DSB はそれ自体、非常に修復しにくく、17-AAG による修復阻害の増強は認められなかった。しかし、M 期細胞で微小核が増加したことから、17-AAG は細胞分裂の異常を引き起こし、最終的に細胞死を誘導することが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,310,000	393,000	1,703,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,640,000	393,000	3,033,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：粒子線治療、炭素線治療、17-AAG、増感、Hsp90

1. 研究開始当初の背景

放射線治療の局所制御率向上を図る戦略として X 線より優れた物理的特性を持つ炭素線照射は非常に有効な方法である。炭素線は特徴的な物理的深部線量分布から X 線に比べて細胞致死効果が高い。しかし、X 線と同様に正常組織の耐容線量や腫瘍の発生部位、再発癌等で照射線量が制限されることがある。このような場合には化学療法剤との併用が必要になる。しかし、炭素線に対して放射線増感作用を示す薬剤についてはこれまで報告

がなく、この問題の解決は急務である。研究代表者はこれまでに熱ショックタンパク質の一種である Hsp90 の機能を阻害する薬剤 17-AAG が X 線と併用すると、X 線の放射線致死効果が増強され、このメカニズムに DSB 修復経路の中でも相同組み換え修復に関与するタンパク質 BRCA2 の細胞内分解が関与していることを報告している。また予備的な実験から 17-AAG と炭素線の併用で、炭素線の放射線致死効果が増強される結果を得た。これらを踏まえ、分子標的治療薬の 17-AAG と炭

素線治療併用によるガンの局所制御率向上を目的とした戦略を提案する。

2. 研究の目的

研究代表者は予備的な実験により 17-AAG による炭素線の放射線増感効果を確認しているが、そのメカニズムは全くわかっていない。炭素線は X 線に比べて DNA 損傷を DNA 上の局所に密集して作るため、複雑であり、その結果 DSB の修復効率も低いことが報告されている。このため、炭素線の DSB に対しても 17-AAG が X 線と同様な作用を示すのかどうかも明らかにしなければならない。さらに、炭素線の放射線増感には DSB 修復阻害以外のメカニズムが関与している可能性がある。そこで、本研究では Hsp90 タンパク質の作用を阻害する薬剤、17-AAG が炭素線との併用で炭素線の細胞致死効果をどの程度増強できるか、また、どのようなメカニズムが 17-AAG による炭素線放射線増感に関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 17-AAG による炭素線増感効果の確認実験
種類の異なる複数の癌細胞を用い、17-AAG による炭素線増感作用をコロニー形成法で調べた。放射線は放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置 HIMAC から供給される 290MeV/n の炭素線を用い、LET は 70keV/ μm で行った。細胞は予備実験でも確認された前立腺癌に加え、特に炭素線治療が行われている組織（肺癌、頭頸部癌、悪性黒色腫）を対象として行った。また、対照として正常人胎児肺線維芽細胞についても同様な実験を行った。すべての細胞株において 17-AAG (0、10、20、50、100nM) を細胞培地中に添加し、24 時間後に炭素線 (0、1、2、3Gy) を照射した。照射後細胞を適宜希釈し、培地に播種し、14 日後コロニー数をカウントし、細胞生存率を求めた。

(2) 炭素線増感メカニズムの解明実験

上記の実験から増感効果の高い細胞を選び、増感効果のメカニズムを細胞・分子レベルで検討した。

! DSB 修復効率の測定

17-AAG 100nM を培地に添加し、24 時間後に炭素線 20Gy を照射した。照射は 4 で行い、照射後すぐに培地を薬剤無しの温培地に交換し、37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベーターにて 0、1、2、4、6 時間修復させた。その後、細胞を単離させ、アガロースでプラグ状に固め、Protenase K 入り Lysis buffer にて 50 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間処理した。続いて、定電圧電気泳動法にて DNA を分子量の大きさで分け、DSB を検出した。

! Rad51 フォーカス数の定量及び細胞核の

形態観察

17-AAG 100nM を培地に添加し、24 時間後に炭素線 2Gy を照射した。照射は 4 で行い、照射後すぐに培地を薬剤無しの温培地に交換し、37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベーターにて 0~24 時間修復させた。その後、細胞を固定し、抗 Rad51 抗体および蛍光二次抗体で処理した。さらに、細胞核を DAPI で染色した。Rad51 フォーカス、及び細胞核の形態は蛍光顕微鏡を用いて観察した。

細胞分裂指数 (Mitotic index) 及び細胞周期の測定

17-AAG 100nM を培地に添加し、24 時間後に炭素線 4Gy を照射した。照射は 4 で行い、照射後すぐに培地を薬剤無しの温培地に交換し、37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベーターにて 0~48 時間修復させた。その後、細胞を単離させ、固定した。固定した細胞を細胞周期の M 期マーカーである抗ヒストン H3 リン酸化抗体で処理し、その後蛍光二次抗体処理を行った。さらに、PI での染色も行った。その後、Flow cytometer を用いて、M 期細胞の割合、及び細胞周期の分布を測定した。

4. 研究成果

放射線治療における癌の局所制御率の向上を図るためには、X 線、炭素線どちらにおいても癌の細胞致死の増加だけでなく、正常組織への影響を最小限に抑えることが重要である。本研究では炭素線照射と薬剤 17-AAG の併用により、前立腺癌で高い細胞致死効果を得、さらに正常細胞においては影響がほとんどないことを明らかにした。この増感のメカニズムに関しては、炭素線と X 線の DNA 損傷の複雑性の違いが影響を与えている可能性が示唆された。炭素線の複雑な DSB に対し、17-AAG による相同組み換え修復の阻害が DSB の誤修復を誘発し、それが照射後の細胞分裂異常を引き起こし、最終的に細胞死に至ることが示唆された。

炭素線は X 線等の低 LET 放射線で観察される亜致死損傷および潜在的致死損傷からの回復や細胞周期の違いによる放射線感受性の変化が少ないことなどから、薬剤での増感も少ないことが一般的に言われていたが、実際には本実験で示したように放射線増感が観察され、炭素線においても分子標的治療薬を併用する新しい治療法の可能性が広がった。炭素線と分子標的治療薬を併用した研究は培養細胞レベルにおいてもまだ始まったばかりであり、今後の発展が期待できる。以下に本研究で行った実験結果の詳細について記述する。

(1) 17-AAG が炭素線の細胞致死効果に与える影響

本実験では4種類の癌細胞株を用いて、17-AAGと炭素線併用による細胞生存率を調べた。その中で前立腺癌DU145細胞は特に高い放射線増感効果が認められた。図1にDU145細胞の線量-生存率曲線を示した。17-AAGは0、10、20、50、100nMを細胞培地に照射24時間前に添加した。生存率は17-AAGの濃度が高くなるにつれて減少し、濃度依存性を示した。また、17-AAG 100nMでの生存率0.1(10%)における増感比は2.00であり、高い増感効果が認められた。

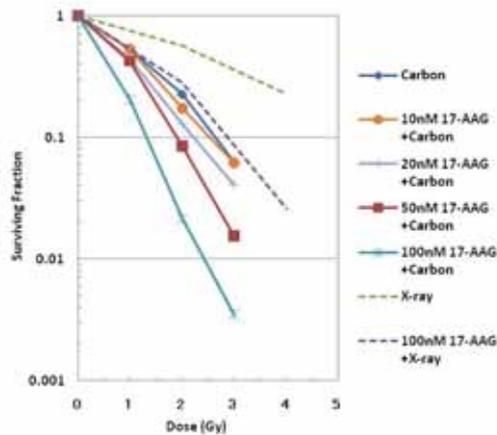


図1 DU145細胞における線量-生存率曲線

一方、正常細胞においても同様な実験を行ったところ、17-AAG 100nMでの生存率0.1における増感比は1.17であり、癌細胞で見られたような増感効果は見られなかった。これは正常細胞におけるHsp90の分布が癌細胞とは大きく異なることが原因と考えられる。癌細胞で高い細胞致死効果が得られ、正常細胞で効果が少ないことは、癌の局所制御率を高めることにつながり、正常組織の障害抑制、すなわち副作用の軽減の面からも臨床応用につながる成果を得た。

(2)炭素線誘発DSB修復に対する17-AAGの影響

炭素線とX線の生物効果において、放射線照射後のDSBの修復効率に大きな違いが見られる。両者の放射線感受性の違いにDSBの修復の度合いが関与していることも複数報告されている。一般に、DSBは放射線誘発細胞死の主原因と言われていることから、17-AAGと炭素線併用による高い細胞致死効果のメカニズムにDSBとその修復機構が関与しているかどうかを調べた。図2にDU145細胞における炭素線20Gy照射後のDSB修復動態の経時変化を示した。17-AAGは100nMを照射24時間前から細胞培地に添加した。図に示した値は照射0時間のDSB初期損傷を100%と補正した値を用いた。

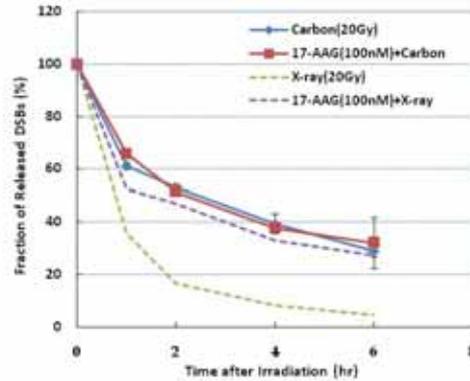


図2 DU145細胞における炭素線照射後の残存DSB量の経時変化

照射後6時間までの修復において、X線の場合は残存DSB量が17-AAGの併用で多くなることが顕著に認められたが、炭素線では炭素線単独と17-AAG・炭素線併用の場合とで、残存DSB量の差がほとんど認められなかった。これは炭素線によって生じたDSBが非常に修復されにくいことを示唆しており、17-AAGで修復経路を阻害しても、DSBの再結合への影響は現れにくいと考えられる。

そこで、以前、研究代表者がX線において17-AAGの関与を報告した相同組み換え修復の関与を炭素線においても分子レベルで確認するため、炭素線照射後のRad51フォーカス形成数を調べた。図3にDU145細胞における炭素線20Gy照射後のRad51フォーカス数の経時変化を示した。17-AAGはDSB実験と同様100nMを照射24時間前に細胞培地中に添加した。

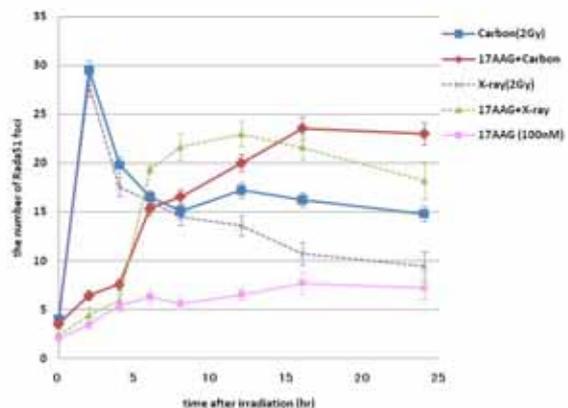


図3 DU145細胞における炭素線誘発Rad51フォーカス数の経時変化

炭素線単独のフォーカス数は照射後2時間で最大となり、その後徐々に減少した。照射24時間後の残存フォーカス数はX線の1.5倍であった。炭素線と17-AAG併用のフォーカ

ス数は炭素線単独と大きく異なり、照射後4時間以降からフォーカスが観察され、その後15時間までは徐々に増加したが、炭素線単独での最大ピーク数には達しなかった。またフォーカス数の減少も緩やかで、照射後24時間後の残存フォーカス数は炭素線単独に比べて1.5倍の増加を示した。すなわち、17-AAGは炭素線照射後の相同組み換え修復に影響を与えており、DSB再結合の効率よりむしろ、DSBの誤修復を誘導している可能性が示唆された。

(3)炭素線照射後のG2チェックポイントに対する17-AAGの影響

炭素線と17-AAG併用により異常な形態のM期(細胞分裂期)細胞や、多数の微小核を伴う核が多数確認された。さらにRad51フォーカス形成の結果からもDNA損傷の修復が不十分(誤修復も含む)のまま細胞分裂が行われている可能性が考えられる。そこで、M期の細胞分裂に大きく関係するG2チェックポイントが17-AAGの影響を受けているかどうかを調べた。図4にDU145細胞において炭素線4Gy照射後のM期細胞の割合を経時的に測定した結果を示した。17-AAGはDSB実験と同様100nMを照射24時間前に細胞培地中に添加した。

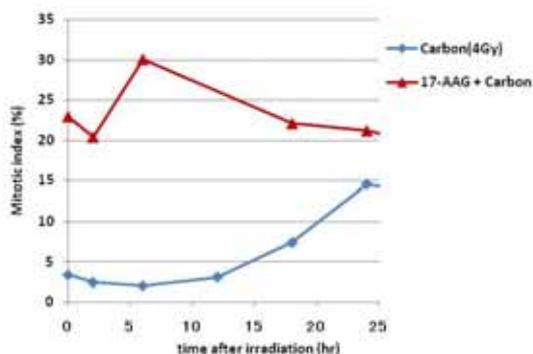


図4 DU145細胞における炭素線照射後のM期細胞数の経時的変化

炭素線単独の場合、照射後12時間まではM期細胞の増加が見られないことから、照射後にG2チェックポイントが機能していると考えられる。しかし、17-AAG併用の場合、照射時でもM期細胞の割合が高く、さらに照射後6時間までM期細胞数が増加していることから、細胞はG2期で停止せず、M期に進行しており、G2チェックポイントの働きが阻害されていることが示唆された。また、照射時のM期細胞数の増加が炭素線増感に関与しているかどうかについて、M期細胞のみを取り出し、炭素線照射後にコロニー形成を行ってみたが、放射線増感は認められなかった。よって、17-AAG添加によるM期細胞の増加は炭素

線致死作用の増強には関与していないが、照射後のM期の増加は形態異常や微小核形成などから、細胞分裂の異常を引き起こし、最終的に細胞死に至ること示唆された。

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)

[雑誌論文](計 7件)

Miho Noguchi, Ryoichi Hirayama, Sergey Druzhinin and Ryuichi Okayasu, Enhanced Radiation Induced Cell Killing by Herbimycin A Pre-treatment, Radiation Physics and Chemistry, 2009, in press, 査読有

Naoya shikazono, Miho Noguchi, Kentaro Fujii, Ayumi Urushibara and Akinari Yokoya, The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation, Journal of Radiation Research, 50, 27-36, 2009, 査読有

Ryoichi Hirayama, Atsushi Ito, Masanori Tomita, Masako Izumi, Fumio Yatagai, Miho Noguchi, Yoshitaka Matsumoto, Yuki Kase, Koichi Ando, Ryuichi Okayasu and Yoshiya Furusawa, Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High LET Radiations, Radiation Research, 171, 212-218, 2009, 査読有

Ryuichi Okayasu, Takamitsu Kato, Miho Noguchi, Maki Okada and Emiko Sekine, Radiobiology for Heavy-ion Radiotherapy, Proceedings of NIRS-MDA Symposium on Clinical Issues for Particle Therapy, 174-180, 2008, 査読無

岡安隆一、野口実穂、ゲルダナマイシン誘導体の併用による癌の放射線治療、ISOTOPE NEWS、643、2-7、査読無

[学会発表](計 13件)

野口実穂、8-oxoGを含むクラスターDNA損傷誘発突然変異における一本鎖切断の影響、日本放射線影響学会第51回大会、2008年11月19-21日、北九州市

Miho Noguchi, Enhanced Radiation Induced Cell Killing by Herbimycin A Pre-treatment, The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry, 2008年8月29日-9月1日、東京

Miho Noguchi, Mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine depends on single strand break location, 10th International Workshop Radiation

Damage to DNA, 2008年6月8-12日, 裏磐梯

野口実穂、非二本鎖切断型クラスター損傷(8-oxoG と鎖切断)の突然変異誘発、日本放射線影響学会第50回大会、2007年11月14-17日、千葉市

Miho Noguchi, The mutation frequency of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when single strand break is closely present on the same or the opposite strand, The 7th International Symposium on Advanced Science Research, 2007年11月6-9日, 茨城県東海村

野口実穂、Hsp90 阻害剤による放射線増感～DNA 二本鎖切断修復への影響～、第46回日本医学放射線学会生物部会、2007年7月21日、茨城県つくば市

〔図書〕(計 1件)

福土政弘(編集)、野口実穂、寺下貴美ほか、メジカルビュー社、診療放射線技師ポケットレビュー帳、2008年、3～32ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

氏名：野口 実穂 (NOGUCHI MIHO)

所属：独立行政法人 日本原子力研究開発機構

部局：先端基礎研究センター

職名：研究職

研究者番号：40455283