

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590580

研究課題名 (和文) p53 シグナル系を指標にした新しい放射線感受性検査の開発

研究課題名 (英文) Establishment of a new laboratory test for radiation sensitivity targeting p53 signal transduction system

研究代表者

山田 恭暉 (YAMADA YASUAKI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60145232

研究成果の概要 (和文)：癌に対する治療法として放射線照射は有効であるが、時には照射によって皮膚潰瘍や腸管破裂などを引き起こす患者がいる。現在このような放射線に対して超過敏な患者を事前に診断することはできない。本研究では照射前または照射後早期にこのような患者を診断するための検査法を開発することを目的とした。対象は抗癌剤未投与で放射線照射が予定されている術後の乳癌患者とした。このような患者から放射線前後で採血し、末梢血単核細胞の放射線による影響を検討した。

照射後に皮膚障害の程度を評価したが、個々の患者で大きな相違を認めなかった。残念ながら今回対象とした患者群には放射線に高感受性の患者は含まれていなかった。末梢血のリンパ球絶対数は照射によって減少したが好中球の減少はいずれの患者でも認められなかった。興味深いことにリンパ球の放射線感受性はサブセットによって異なり、Tリンパ球はBリンパ球やNKリンパ球と比較してより高い感受性を示した。Tリンパ球の中でもCD8陽性リンパ球が最も感受性が高く、照射後は急激に減少した。照射終了12週の時点で多くの細胞は前値に回復したが、CD8陽性Tリンパ球の減少は遷延した。照射によるアポトーシス細胞の増加が予測されたが、少なくとも末梢血リンパ球の解析ではアポトーシス細胞の増加を確認できなかった。照射前後においてリンパ球のp53やp14^{ARF}、p16^{INK4A}、Hzf等のアポトーシスや細胞周期に関わる分子群のmRNA発現量を比較したが有意な変動は認められなかった。残念ながらこれらの分子群とリンパ球減少の間には有意な相関性を認めなかった。

研究成果の概要 (英文)：Although radiation therapy is one of the effective therapies for cancers, there are some patients who are extraordinarily sensitive to radiation in whom radiation-induced skin ulcer and perforation of gastro-intestinal tracts sometimes occur. Since there is no way to identify such radiation hypersensitive patients before therapy, we tried to establish a laboratory test for this purpose in the present study. Objects are mamma cancer patients who are planned to receive radiation therapy. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from these patients before and after radiation. Radiation-induced skin damage was evaluated in all patients, but there was no significant difference among patients, indicating that radiation hypersensitive patients were not included in the study. Absolute peripheral blood lymphocyte count decreased in all patients after radiation, but absolute neutrophil count showed no changes. Interestingly, radiation sensitivity was different among lymphocyte subsets, and T lymphocytes were more sensitive than B lymphocyte or NK lymphocytes. CD8+ T-cell subset was the most sensitive lymphocytes and decrease of the absolute count prolonged even after 12 weeks after radiation. Nevertheless, increase of apoptotic lymphocytes was not observed in the peripheral blood. We then quantified mRNAs of various molecules that are supposed to be influenced by radiation, such as p53, p14^{ARF}, p16^{INK4A} and Hzf. There was however no significant correlation between the changes of the mRNA levels of these molecules and the level of the decrease of absolute lymphocyte counts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍に対する治療として放射線は欠かせない。腫瘍の種類によって放射線感受性が異なることはよく知られているが、正常組織の感受性にも個人差があり、放射線に対して異常に高い感受性を示す患者がいる。このような患者では皮膚壊死や腸管穿孔、排尿障害などの予想外に激しい副作用の治療に難渋する。個々の患者の放射線感受性を治療前に診断することができれば重篤な副作用を回避する観点から、また効果的な線量決定の意味からも大変に有用である。

(2) 放射線が照射されると初期センサーである ATM が活性化され、引き続いてチェックポイントキナーゼである Chk1/2 や p53 が活性化される。活性化された p53 がどのようにして細胞を“細胞周期の停止に引き続く DNA の修復”または“アポトーシス誘導”に振り分けているのか不明であったが、最近この方向性を決定する分子として Hzf が同定された。放射線が照射されると p53 は Hzf の発現を亢進させ、Hzf と結合して細胞周期の停止に必要な分子を特異的に発現させる。一方、Hzf が存在しない条件下ではアポトーシスに必要な分子が優先的に誘導されるため細胞は死に至る。言い換えると、Hzf が欠損している個体または組織では放射線照射によって細胞死が過剰に誘導される。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究ではオーダーメイド放射線治療の指標として、新しい放射線感受性検査の開発を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) 放射線治療が予定されている乳癌患者から照射前後で末梢血を採取し、白血球分類、リンパ球表面マーカー、AnnexinV/PI 染色によるアポトーシスの定量を行う。

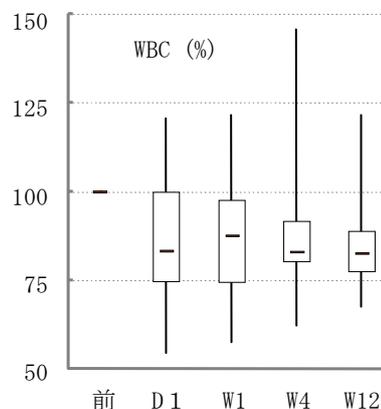
(2) 放射線照射による有害反応を国際基準に基づいて重症度判定する。

(3) 末梢血単核細胞について、照射前後における p53 シグナル伝達関連分子群 (ATM、Chk2、p53、p14^{ARF}、p16^{INK4A}、Hzf など) の mRNA を real-time PCR で定量し、放射線照射による影響を検討する。

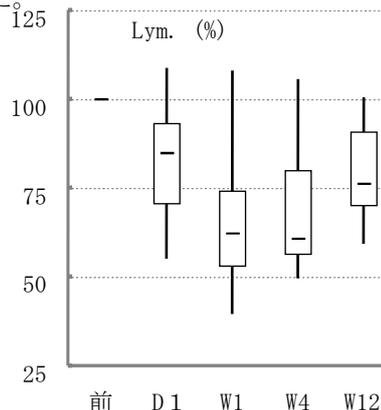
(4) これらの結果から、新しい放射線感受性検査として何が最も適切であるかを明らかにする。

4. 研究成果

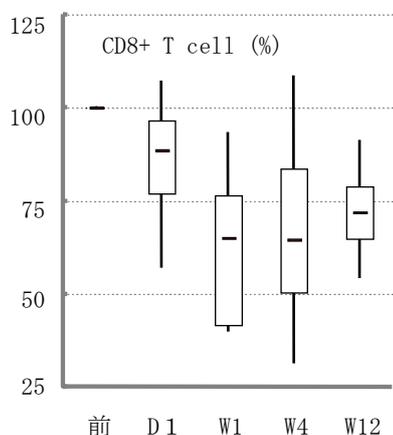
(1) 白血球数は照射前値 (100%) と比較して、照射後減少した。(D1: 照射 1 日後、W1, W4, W12: 照射 1, 4, 12 週後)



(2) 白血球の中でもリンパ球の減少が特に顕著であったが、好中球の減少は全く認められなかった。

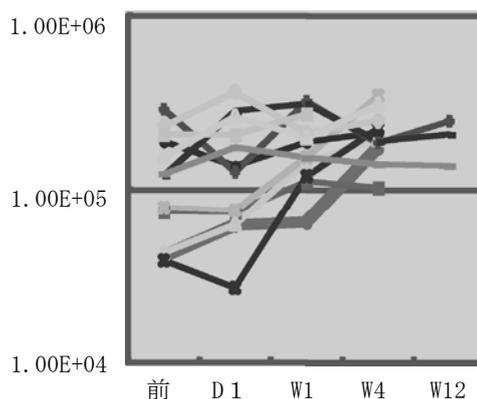
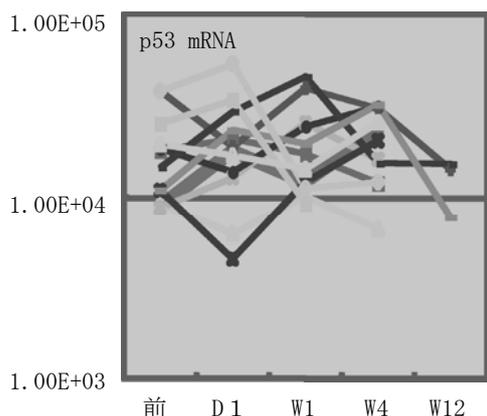
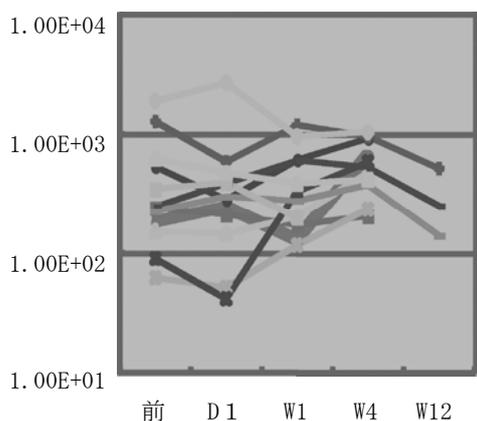


(3) そこでさまざまなリンパ球サブセットについて放射線感受性を検討したところ、CD8 陽性 T リンパ球の減少が最も顕著であり ($p < 0.01$)、照射 12 週間後も前値に回復することはなかった。



(4) リンパ球の減少は放射線によるアポトーシス誘導の結果であると考え、Annexin V/PI 染色によってアポトーシス細胞の定量を行ったが、放射線による Annexin V 陽性細胞の増加は観察されなかった。

(5) p53 シグナル伝達関連分子群 (ATM、Chk2、p53、p14^{ARF}、p16^{INK4A}、Hzf など) の mRNA を real-time PCR で定量し、放射線による影響を検討したが、一定の傾向は認めなかった。代表的な p16^{INK4A}、p53 および Hzf の結果を示す。



(6) 放射線によるリンパ球の減少、とりわけ CD8 陽性 T リンパ球の減少と p53 シグナル伝達関連分子群変動の相関線について検討したが、残念ながら有意な相関性は認められなかった。

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 6 件)

- ① Yamada Y, Kamihira S, Immunological aspects of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), a possible neoplasm of regulatory T-cells. *Current Immunology Reviews*, 査読有、4 巻、2008、242-250.
- ② Nakayama T, Hieshima K, Arao T, Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Yamada Y, Fujii M, Oiso N, Kawada A, Nishio K, Yoshie O, Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogenes*, 査読有、27 巻、2008、3221-3232.
- ③ Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Nakayama T, Shigeta A, Hieshima K, Yamada Y, Yoshie O, CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *International Journal of Cancer*, 査読有、125 巻、2009、2229-2235.
- ④ Kamihira S, Terada C, Sasaki D, Yanagihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, Yamada Y, Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. *European Journal of Haematology*, 査読有、82 巻、2009、301-307.
- ⑤ Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target

for epigenetic therapy. Hematologica, 査読有、2011, in press.

- ⑥ Sasaki D, Doi Y, Hasegawa H, Yanagihara K, Tsukasaki K, Iwanaga M, Yamada Y, Watanabe T, Kamihira S. High human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) provirus load in patients with HTLV-1 carriers complicated with HTLV-1-unrelated disorders. Virology Journal, 査読有、2010, Apr 28;7:81 (電子ジャーナル).

[学会発表] (計 3 件)

- ① 寺田千春、山田恭暉、上平 憲 他、造血器細胞株におけるp53遺伝子変異とp53mRNA及び蛋白定量による発現の検討。第55回日本臨床検査医学会学術集会、2008年1月28日。
- ② 佐々木大介、山田恭暉、上平 憲 他、成人T細胞白血病(ATLL)におけるEZH2高発現の病的意義。第71回日本血液学会学術集会、2009年10月23日。
- ③ Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S et al, Membrane-associated mucin MUC1 is overexpressed in adult T-cell leukemia/lymphoma cells and contributes to anti-apoptotic properties. 15th Congress of European Hematology Association, 2010年6月12日。

[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◇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

山田 恭暉 (YAMADA YASUAKI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：60145232

(2) 研究分担者

上平 憲 (KAMIHIRA SHIMERU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80108290

長谷川 寛雄 (HASEGAWA HIROO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00398166

(3) 連携研究者

()

研究者番号：