

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790902

研究課題名（和文） ギメラシルによる放射線増感効果の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of Molecular mechanisms and radiosensitizing effect of Gimeracil.

研究代表者

染谷 正則 (MASANORI SOMEYA)

札幌医科大学医学部・助教

研究者番号：60404711

研究成果の概要（和文）：

内服可能な放射線増感剤として臨床応用が期待されているギメラシルの放射線増感効果のメカニズムを検討し、培養癌細胞を用いたコロニーアッセイ法および放射線誘発フォーカスアッセイ法などの実験によって、ギメラシルがDNA切断修復経路の1つである相同組換え修復を部分的に阻害する事で放射線増感効果を示すという事を解明した。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed molecular mechanisms of radiosensitizing effect of Gimeracil as a clinically expecting therapeutic drug. By using methods of colony formation assay and radiation-induced foci formation assay, we proved that gimeracil partially inhibits homologous recombination in the DNA double strand break repair mechanism and therefore the radiosensitizing effect can be obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

ギメラシルは経口抗癌剤である TS-1 に含まれる一成分で、5-FU を分解する DPD (Dihydropyrimidine dehydrogenase) の阻害作用がある他に、放射線増感効果がある事が報告されてきている。そこで放射線増感剤としてギメラシルの臨床応用を目指すために、その放射線増感効果の分子メカニズムを解明する研究が必要とされている。

そこで今回の研究において、ギメラシルの放射線増感効果および分子メカニズムの基礎的検討を行った。

2. 研究の目的

(1) 複数の培養癌細胞を用いてギメラシルの増感効果を確認し、また増感率を計算し、どのような条件で増感効果が大きくなるか検討する。

(2)放射線増感効果を示すメカニズムがどのようなものであるかを解明する。

3. 研究の方法

(1)コロニーアッセイ法を用いた放射線増感効果の測定

複数の培養癌細胞株を用いてギメラシルを添加後に X 線を照射、形成されるコロニー数を計測して生存率曲線を作成し、ギメラシルによる増感効果を確認した。また増感効果が最大となる至適濃度および添加時間について検討し、その条件での毒性の有無を検討した。

(2)細胞周期同調法を用いた放射線増感効果の変化の測定

ノコダゾールやチミジンなど細胞周期を同調させる薬剤を使い、ギメラシルの増感効果が細胞周期の中でどの時期において特に効果が高くなるかを検討した。

(3)放射線誘発核内フォーカス測定による DNA 修復経路の機能変化の観察

放射線による DNA 損傷が生じた場合には、損傷部位に多くの DNA 修復タンパクが動員され、フォーカスを形成する事が知られている。そこでこれらの修復タンパクに対する蛍光免疫染色を行って可視化し、測定する事で DNA 損傷修復を観察した。またその修復過程にギメラシルを添加する事でどのような変化が現れるかを観察した。具体的には、リン酸化ヒストン H2AX、NBS1、Rad50、Mre11、BRCA1、RPA、Rad51 などのフォーカスを観察した。

(4)ニュートラルコメットアッセイ法を用いた DNA 損傷の定量化

DNA 二重鎖切断の損傷量を直接定量化できる方法としてニュートラルコメットアッセイ法を用い、DNA 損傷の修復過程を観察した。

4. 研究成果

(1)各種培養細胞株を用いたコロニーアッセイ法によって、多くの細胞株での放射線増感効果が見られる事が判明した。(図 1)

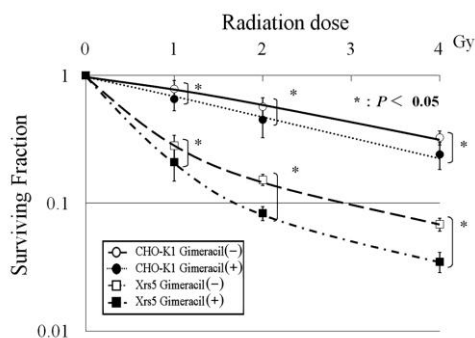


図 1. CHO-K1 細胞と Xrs5 細胞のギメラシル添加の有無での生存率曲線の比較

特にギメラシルの濃度は 1mM で照射前 48 時間前より添加する事で、放射線増感効果は最大となる事が判明した。この条件での細胞毒性はほとんど見られない事が確認された。多くの細胞株での放射線増感比は 1.1-1.3 の数値を示したが、相同組み換え修復経路に関わるタンパクである NBS1 (ナイミーヘン染色体脆弱症候群原因遺伝子) を欠損した細胞株 XRCC3 ではギメラシルによる明らかな放射線増感効果は見られなかった。

(2)ノコダゾールおよびチミジンを用いた細胞周期同調の実験によって、G1/G0 期や M 期に比べて、DNA 合成が盛んに行われている S 期~G2 期の細胞周期においてギメラシルの放射線増感効果は高まる事が判明した。

(図 2)

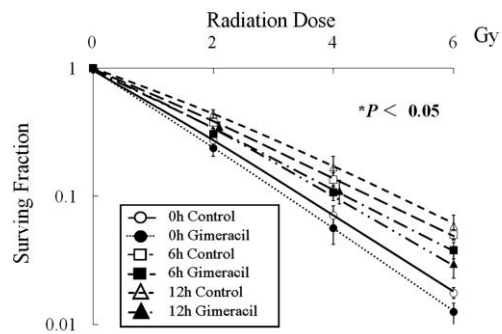


図 2. DLD-1 細胞を用いてノコダゾール処理により細胞周期を同調させた時の生存率曲線 (0hr : M 期、6hr : G1/G0 期、12hr : S/G2 期)

(3)放射線誘発フォーカスの観察を行い、DNA 損傷および修復の指標とされているリン酸化ヒストン H2AX のフォーカス数は、ギメラシル非添加群に比べて添加群では、4Gy 照射後 4 時間~24 時間の時間帯で有意に ($p < 0.001$) 多く残存する事が判明した。(図 3)

また相同組み換え修復に関わるとされているタンパクである RPA および Rad51 の核内フォーカス発生数はギメラシル非添加群に比べて添加群で 4Gy 照射後 2.5 時間~4 時間の時間帯で減少する事が判明した。また、NBS1 フォーカス、Rad50 フォーカス、Mer11 フォーカスは増加が見られたが、BRCA1 フォーカスは変化が見られなかった。すなわちギメラシル添加によって RPA および

Rad51 以下の下流の DNA 修復が阻害され、その仕組みは主に相同組み換え修復経路が部分的に阻害される事によってなされている事が判明した。

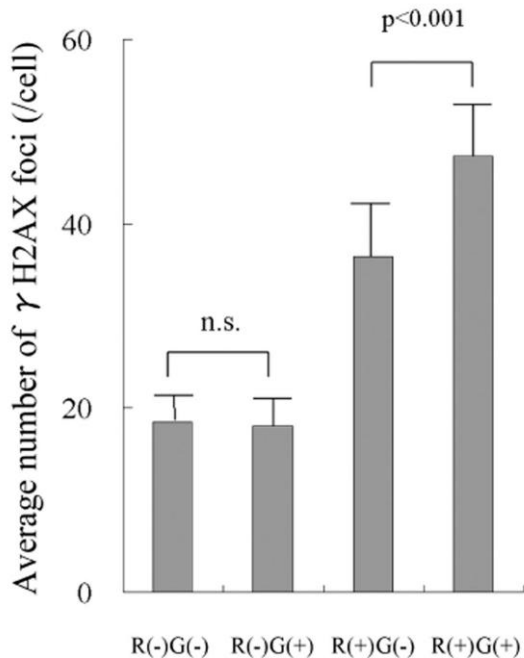


図3. DLD-1 細胞を用い、照射前および 4Gy 照射 24 時間後の細胞内リン酸化 H2AX フォーカス数 (R(-)G(-)非照射ギメラシル非添加群、R(-)G(+)
非照射ギメラシル添加群、R(+G(-)4Gy 照射ギメラシル非添加群、R(+G(+)
4Gy 照射ギメラシル添加群)

(4)ニュートラルコメットアッセイ法を用いて X 線照射後に生じる DNA 損傷の断片であるテイルモーメントを測定した所、4Gy 照射直後のテイルモーメント量はギメラシル添加群および非添加群において同等であったが、1 時間後および 2 時間後のテイルモーメント量はギメラシル非添加群に比べて添加群では有意差をもって大きくなる事 (p=0.034) が判明した。(図4)

これは修復されていない DNA 損傷がギメラシル添加によって多く残存しているという直接的な証拠となる事が確認された。

以上の結果より、ギメラシルが DNA 損傷修復経路の 1 つである相同組換え修復を部分的に阻害する事により放射線増感効果を示す事を解明した。またこの条件での細胞毒性は見られなかった事から、臨床応用に可能な放

射線増感剤として有望である薬剤と考えられる。

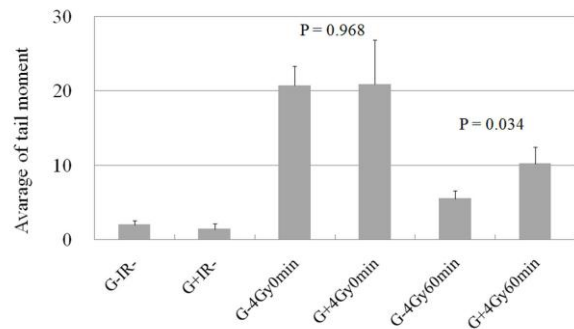


図4. SCCVII細胞を用い、ニュートラルコメットアッセイ法にて算出した、照射前、4Gy 照射直後、4Gy 照射 60 分後の平均テイルモーメントの比較

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

①Atsushi Oouchi, Koh-ichi Sakata, Hideji Masuoka, Mitsuharu Tamakawa, Hisayasu Nagakura, Masanori Someya et al. The treatment outcome of patients undergoing breast-conserving therapy: the clinical role of postoperative radiotherapy. Breast Cancer 16: 49-57, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

①坂田耕一、染谷正則、高木克、中田健生、小島一男、晴山雅人. ギメラシルの放射線増感効果の分子メカニズムの検討. 第 22 回日本放射線腫瘍学会学術大会、2009 年 9 月 18 日、京都府京都市

②高木克、坂田耕一、染谷正則、三浦勝利、小島一男、中田健生. ギメラシルの放射線増感効果の分子生物学的検討. 第 22 回日本放射線腫瘍学会学術大会、2009 年 9 月 18 日、京都府京都市

③染谷正則、坂田耕一、高木克、晴山雅人、松本義久、田内広、福島正和. ギメラシルによる放射線増感効果の分子メカニズムの解析. 第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、2009 年 7 月 10 日、富山県富山市

④染谷正則、高木克、坂田耕一、晴山雅人、松本義久、田内広、福島正和. ギメラシルに

よる放射線増感効果の検討. 第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、2008 年 6 月 21 日、高知県高知市

⑤坂田耕一、染谷正則、高木克、中田健生、小島一男、晴山雅人. ギメラシルの放射線増感効果の分子メカニズム. 第 67 回日本医学放射線学会総会、2008 年 4 月 4 日、神奈川県横浜市

⑥高木克、林潤一、小島一男、中田健生、染谷正則、坂田耕一. 分割照射・抗癌剤併用におけるギメラシルの放射線増感作用の検討. 第 67 回日本医学放射線学会総会、2008 年 4 月 4 日、神奈川県横浜市

⑦染谷正則、高木克、小島一男、中田健生、坂田耕一. ギメラシルの放射線増感作用の放射線誘発 γ H2AX フォーカスによる解析. 第 67 回日本医学放射線学会総会、2008 年 4 月 4 日、神奈川県横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

染谷 正則 (MASANORI SOMEYA)
札幌医科大学医学部・助教
研究者番号：60404711

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし