

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16836

研究課題名(和文) 前立腺癌に対する新規放射線増感剤の開発

研究課題名(英文) Development of new radiosensitizer for prostate cancer

研究代表者

坂口 雅州 (SAKAGUCHI, Masakuni)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：70599349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の治療成績を向上させるために、新規放射線増感剤を作製する研究を行った。放射線抵抗性に関するKu80を標的としたPIポリアミドを作製したが、合成が困難であった。複数の抗癌剤結合ポリアミドを腫瘍細胞に投与し放射線照射を行ったが、腫瘍抑制効果に有意差は示されなかった。前立腺癌に対してポリアミドの治療上乗せ効果を期待するには、標的遺伝子を再設定した放射線増感剤の研究が優先されると考えられた。日常臨床やin vivoでは放射線照射による低線量域の広がり、よりリンパ球減少に影響している結果を得ている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の抑制に関するKu80を標的とするポリアミドの作製は困難であった。抗癌剤結合ポリアミドによる腫瘍抑制は有意な結果が得られず、放射線抵抗性に関する標的遺伝子を再設定し、放射線増感作用を有するポリアミドを作製することが前立腺癌の治療成績向上に寄与すると推測される。また、放射線増感作用を有する新規ポリアミドを作製する研究過程では放射線照射が必須となるが、人体においては低線量の広がりリンパ球減少に影響していることが示されたことから、放射線照射が腫瘍免疫に与える影響を考慮した検討を行うことが、日常臨床で使用できるポリアミド開発には重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to create a new radiosensitizer that improves the outcome of prostate cancer treatment. Although we tried to create PI polyamides targeting Ku80, which has been associated with radiation resistance, they were quite difficult to synthesize. Polyamide combined with an anticancer drug was administered to the tumor cells, after which irradiation was performed; however, no significant effects were observed. To determine the additional therapeutic effects of polyamide on prostate cancer, research on a radiosensitizer with a reconfigured target gene would be necessary. Lymphocytes are deeply involved in tumor immunity. Our results of unintentional splenic radiation suggested that spreading a low dose area affected lymphopenia in the body.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：前立腺癌 ポリアミド Ku80 腫瘍免疫

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌において、原発巣への放射線治療とアンドロゲン除去療法を組み合わせた治療(ホルモン療法)が単独治療より有意な予後延長が認められるとされ、日常臨床で広く行われている。しかし、治療経過とともに放射線照射後に残存した癌細胞の形質が変化し、その後のアンドロゲン除去療法が無効になり、治療に難渋することがある。原因の一つに放射線照射により、前立腺癌特異的融合遺伝子群が形成されることが報告されている。現在、粒子線治療や強度変調放射線治療など放射線治療機器の進歩や日々の照射における精度の担保により、良好な線量分布を得ることができるようになったが、直腸など周辺臓器の耐用線量の問題から、前立腺への線量増加が困難な現状がある。また、再発または転移のある前立腺癌においてもホルモン療法の進歩が著しく、治療成績も向上しているが、ホルモン治療抵抗性となった場合の全身治療としては化学療法が残された選択肢となる。しかし前立腺癌に使用できる化学療法は限られており、その効果も満足の得られるものとは言えない現状がある。

前立腺癌に対する放射線治療を日常臨床で行い、治療成績や有害事象を報告してきたが、放射線治療のみでは成績向上や有害事象の低減に限界があり、放射線増感剤を中心とした基礎研究を並行して行っている。放射線増感作用のあるポリアミドや抗癌剤と結合させたポリアミド、両者の性質をもつポリアミドを作製できれば治療成績の向上に寄与すると考えられ、本研究の着想に至った。過去の報告を参照すると、前立腺癌においては放射線抵抗性に重要な役割を示している遺伝子の一つに Ku80 が報告されている。Ku80 は Sp1 の転写調節を受け、Sp1 特異的 siRNA を用いた研究では有意に Ku80 の発現を抑制させ、放射線感受性が増強した報告がある。しかし、siRNA や mRNA に結合するアンチセンス核酸は生体内で分解され易いため安定性が低く、生体内において細胞毒性遺伝子産物を発現させる可能性もあり、RNA をターゲットにした放射線増感剤は必ずしも安全とはいえないのが現状であった。そこで、DNA 配列に特異的に結合する放射線増感剤である PI ポリアミドを開発できれば、日常臨床に応用できるのではないかと考えた。

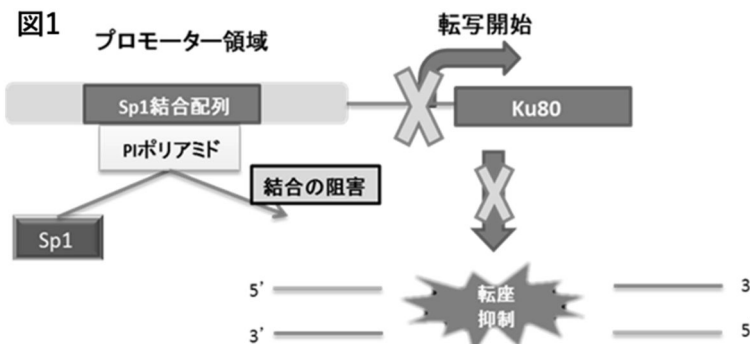
### 2. 研究の目的

転移のない前立腺癌の主な治療法はホルモン療法と前立腺への放射線照射であるため、両方からのアプローチが重要である。一方、ホルモン療法抵抗性前立腺癌に対する全身治療法は化学療法である。ホルモン療法に関しては、前立腺癌におけるアンドロゲン調整遺伝子に対するポリアミドを作製し、腫瘍の抑制を当施設で既に報告している。しかし、放射線感受性に関するポリアミドの開発や抗癌剤を結合させたポリアミドの研究は少ないため、これらのポリアミドの設計、標的遺伝子への結合、効果の確認を行う。また、従来報告されていた RNA をターゲットとした放射線増感剤では体内での安定性が確実ではないため、DNA 配列をターゲットとしたポリアミドを作成することで、日常臨床へ応用可能な安全性の高い新規増感剤の開発することが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) ポリアミドの設計、作製

放射線増感剤ポリアミド：従来報告されていた RNA ポリアミドは生体内での安全性に問題があるため、DNA 配列をターゲットとする PI ポリアミドを設計する。PI ポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole(Py)および N-methylimidazole(Im) で構成される分子であり、DNA 配列に特異的に結合する性質がある。Im/Py ペアは G・C を、Py/Py ペアは T・A および A・T を認識する。PI ポリアミドと DNA への結合は、DNA 結合蛋白と DNA の結合に相当する親和性を持ち、Im/Py と Py/Py の組み合わせ次第で、多様な配列の DNA に結合させることができる。標的遺伝子については、過去の報告を参照すると、前立腺癌においては放射線抵抗性に重要な役割を示している遺伝子の一つに Ku80 が報告されている。Ku80 は Sp1 の転写調節を受け、Sp1 特異的 siRNA を用いた研究では有意に Ku80 の発現を抑制させ、放射線感受性が増強したとされる。このため、標的遺伝子を Ku80 に設定し(図1)、PI ポリアミドを作製する。



抗癌剤結合ポリアミド：当講座、当施設で既に作製経験のあるポリアミドで新たな設計は不要である。種類や濃度の異なる抗癌剤をポリアミドに結合させる。

#### (2) PI ポリアミドの DNA 結合能の検討

作製したポリアミドの標的配列 (Sp1) への結合能を Gel mobility shift assay、Biacore にて明らかにする。

#### (3) PI ポリアミドによる標的遺伝子発現抑制の検討

作製した PI ポリアミドと生理活性を持たないポリアミド投与を行い、各群に放射線照射を行い Ku80 の発現量をウエスタンブロット、RT-qPCR を用いて測定する。

#### (4) 抗癌剤結合ポリアミドの腫瘍細胞抑制の検討

作製経験のある抗癌剤結合ポリアミドを腫瘍細胞に投与する。コントロール群と結合させる抗癌剤の濃度や種類を調整したポリアミドを投与し、放射線照射を行う。その後、WST8 という方法で腫瘍細胞生存をカウントする。

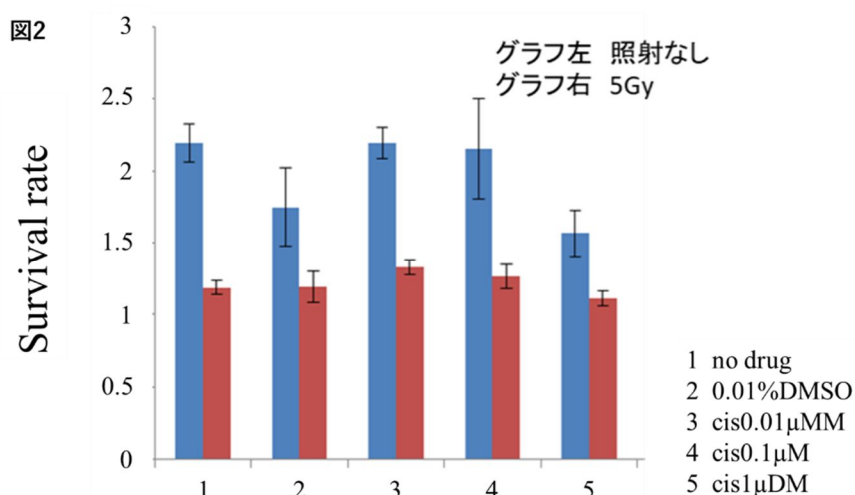
### 4. 研究成果

#### (1) PI ポリアミドの作製

放射線抵抗性に関与する Ku80 を標的とした PI ポリアミドを作製するために、中分子化合物の合成をペプチド合成装置 PSSM-8 を用いて行ったが、クロマトグラムを用いた純度判定において一定した単一ピークが得られず合成が困難であった。放射線感受性に関する標的遺伝子配列を再設定したポリアミド合成が必要と考えられた。

#### (2) 抗癌剤結合ポリアミドの腫瘍細胞抑制

放射線照射後の腫瘍細胞の抑制について、濃度を変えた抗癌剤結合ポリアミドを腫瘍細胞に結合させ 5Gy の照射を行ったが、in vitro においてポリアミドによる腫瘍抑制効果に有意差は確認できなかった(図 2)。結合させる抗癌剤の種類や濃度の再設定が必要と考えられた。

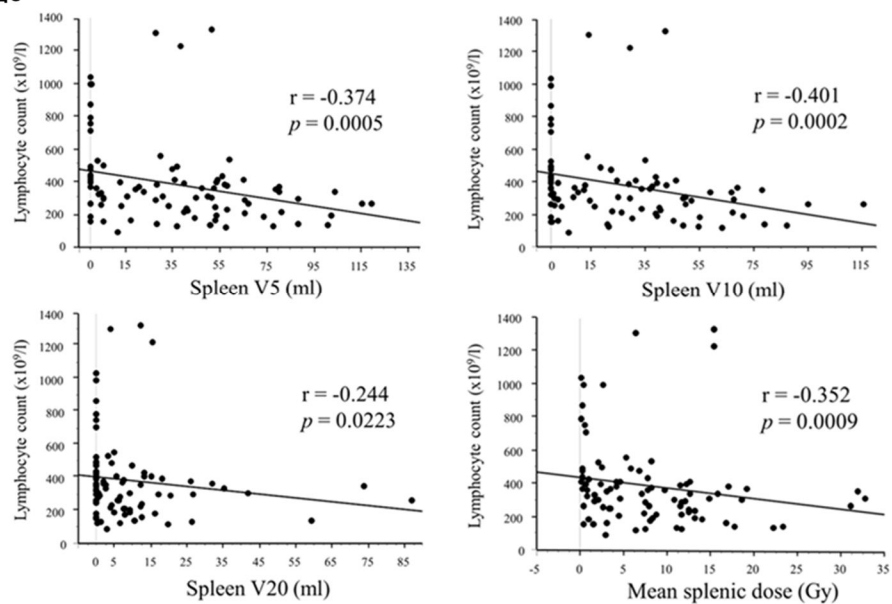


(1)(2)より、前立腺癌の治療法として放射線治療、ホルモン療法、化学療法などがあり、ホルモン療法に関してはポリアミドを用いた有効性が報告されているが、その他ポリアミドの治療上乗せ効果を期待するには、標的遺伝子を再設定した放射線増感剤の開発が優先されると考えられた。

#### (3)腫瘍免疫による腫瘍抑制

本研究の開発に至った理由として、前立腺癌が治療後に治療抵抗性になる原因として放射線照射により、前立腺癌特異的融合遺伝子群が形成されることを一因と考えた。しかし、in vivo で腫瘍増殖の原因は一つではなく、様々な因子が影響しており、一例として腫瘍免疫の関与が挙げられる。これはリンパ球が腫瘍細胞を攻撃し、腫瘍免疫を賦活化するサイトカインを産生することで、腫瘍増殖抑制に関与しているという機序である。日常臨床でも Immune checkpoint inhibitor が種々の癌に応用され従来の抗癌剤を凌駕する効果を得ているが、これは個体の腫瘍免疫応答を活性化させる作用によるものであり、近年の癌治療において注目されている。本研究では、ポリアミドを結合させた腫瘍細胞に対する放射線照射が必須な過程となるが、日常臨床における前立腺癌の放射線治療では、放射線照射による前立腺局所の腫瘍免疫の抑制や骨盤骨が照射されることによる骨髄抑制、放射線照射野内の血液が放射線照射されることによるリンパ球減少に伴い、腫瘍免疫が低下することも考慮する必要があると考えられた。実際、癌治療では治療前からリンパ球が低下している患者の予後が不良である事はしばしば経験することがある。放射線照射によるリンパ球の減少は有害事象として生じるものであり、人体で放射線照射とリンパ球減少の研究をデザインすることはできない。しかし、食道癌や肺癌、膵癌、肝癌などの照射では網内系リンパ組織である脾臓が意図せず照射野内に入ってしまうことに着目し、放射線照射とリンパ球数、すなわち腫瘍免疫の関係、治療成績について検討した。主に放射線照射時の低線量領域の広がりがリンパ球数減少に関連することを明らかにした(図 3 Sakaguchi M, et

図3



#### (4)今後の展開

PI ポリアミドの再合成を行っており、PI ポリアミドの DNA 結合能の検討、標的遺伝子発現抑制の検討、新規 PI ポリアミドによる前立腺癌の放射線感受性への影響を検討している。この過程で放射線照射による実験が必須であるが、通常 *in vitro* で腫瘍細胞に照射する線量と *in vivo* や日常臨床で用いられる線量には開きがある。線量が増加することで腫瘍の抑制が期待されるが、腫瘍免疫は抑制される可能性があり、*in vivo* の実験を通じて日常臨床へ応用するには、放射線照射による腫瘍免疫の関与も考慮していく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masakuni Sakaguchi, Toshiya Maebayashi, Takuya Aizawa, Naoya Ishibashi, Masahiro Okada	4. 巻 10
2. 論文標題 Association between unintentional splenic radiation and lymphopenia and high neutrophil/lymphocyte ratio after radiotherapy in patients with esophageal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 TRANSLATIONAL CANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 5076-5084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tcr-21-1765	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------