

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591608

研究課題名（和文）リン酸化 H2AX を用いたヒト癌放射線感受性予測法の開発

研究課題名（英文）Prediction of radiosensitivity using phosphorylation of histone H2AX in human tumor cell lines

研究代表者

笹井 啓資（SASAI KEISUKE）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20225858

研究成果の概要（和文）：

放射線感受性予測法の開発目的で、放射線照射後のリン酸化 H2AX 蛍光免疫組織染色により検出された DNA 二重鎖切断数と細胞生存率との関係を *in vitro* で 7 種類のヒト悪性腫瘍株について求めた。全細胞株を対象にした場合、リン酸化 H2AX フォーカス数と細胞生存率には弱い相関しか認められなかった。DNA プロイディでフォーカス数を補正し、さらにアポトーシス数で考慮すると、6 細胞株では強い相関が得られた。

研究成果の概要（英文）：

To develop a new predictive assay for radiosensitivity, we tested the relationship between cell survival and expression of phosphorylation of histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) foci using 7 different human cell lines. There was not a good correlation between the  $\gamma$ H2AX foci frequency and surviving fraction after irradiation. When we normalized the  $\gamma$ H2AX foci frequency by DNA content, and introduced the frequency of apoptosis to the analysis, there was a good correlation between the cell survival and the combined frequency of apoptosis and  $\gamma$ H2AX foci in 6 cell lines except for one.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：リン酸化 H2AX、DNA 二重鎖切断、放射線感受性予測、DNA プロイディ、細胞生存率、アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療開始前に腫瘍および周囲の正常組織の放射線感受性を予測することは、患者の予後を予測するばかりでなく、放射線治療の可否、放射線治療方法の選択などに重要な情報を与えてくれる。しかしながら、これまで種々の方法が提案されてきたが実用化に至っていない。

放射線照射後放射線照射後のDNA二重鎖切断や染色体障害と細胞の生存率の間に密接な関連があることは知られている。従来行われていたDNA二重鎖切断の測定は臨床に用いられる放射線線量よりはるかに高線量を照射しなければ測定困難である。H2AXはヒストンを構成するタンパクで、DNA二重鎖切断が生成されるとリン酸化され、フォーカスを形成する。このフォーカス数とDNA二重鎖切断数は密接な相関関係があることが報告されている。リン酸化H2AX( $\gamma$ H2AX)は免疫組織染色法を用いて蛍光染色可能で、フローサイトメトリや蛍光顕微鏡下で測定することができる。

### 2. 研究の目的

本研究では放射線照射細胞の $\gamma$ H2AX を蛍光免疫組織染色し、これを計測することでDNA二重鎖切断数を算定し、腫瘍細胞および正常細胞の放射線感受性を簡便に測定する方法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

7種類のヒト悪性腫瘍細胞株（食道癌4種類、乳癌2種類、線維肉腫1種類）を用いインビトロで全ての研究を行った（表）。フローサイトメトリで求めた各細胞のDNA量はヒトリンパ球のDNA量と比として求めた。

X線(140KV)照射は平衡期細胞を用い0-9Gy照射した。コロニー法および蛍光免疫染色は照射24時間後に行った。コロニー法は標準的方法で行い、50細胞以上からなるコロニーを

生存細胞とした計測した。

表 使用した細胞株とDNA量

細胞株	腫瘍	DNA量*
HT1080	線維肉腫	1.95
TE-9	食道扁平上皮癌	1.55
KYSE30	食道扁平上皮癌	1.56
KYSE150	食道扁平上皮癌	1.67
KYSE220	食道扁平上皮癌	1.49
HCC70	乳癌	2.23
ZR75-1	乳癌	1.6

\*DNA量：ヒト正常リンパ球に対する比

$\gamma$ H2AXフォーカス蛍光免疫染色は、一次抗体として抗リン酸化H2AX マウスモノクローナル抗体を、2次抗体としてAlexa Fluor 488® コンジュゲイトヒツジ抗マウスIgG 抗体を用いた。DAPIでカウンター染色後、蛍光顕微鏡下で $\gamma$ H2AX フォーカス数（図）の計測を行った。アポトーシスの頻度は免疫組織染色を行った標本を用いて形態的に細胞核の凝縮を認める細胞数から求めた。

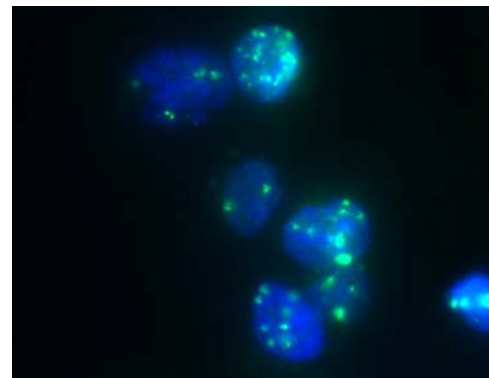


図1  $\gamma$ H2AXフォーカス

### 4. 研究成果

#### (1) コロニー法による細胞生存率

7種類の細胞の放射線感受性をコロニー法で求めたところ、幅広い感受性があることが明らかになった。特にHT1080 およびZR75-1

細胞株の感受性が高く、一方 KYSE30やHCC70は感受性が低いことが明らかになった。

#### (2) $\gamma$ H2AX フォーカス数の経時的変化

線維肉腫細胞株HT1080を用いて放射線照射後の $\gamma$ H2AX フォーカス数経時的変化を求めた。4Gy照射後の $\gamma$ H2AX フォーカス数は照射後3-4時間で1細胞あたり約20個に達し、その後徐々に減少したが照射24時間後でも残存が認められた。

#### (3) 照射線量と $\gamma$ H2AX フォーカス数

7種類の細胞株に関して、照射線量と照射24時間後の $\gamma$ H2AX フォーカス数の関係を求めた。いずれの細胞株でも線量依存性に $\gamma$ H2AX フォーカス数は増加したが、同一の線量で比較した場合、細胞株によりフォーカス数に大きな差が認められた。9Gyで見た場合、HT1080細胞株の1細胞あたり4個程度からKYSE30やHCC70の12個まで認められた。

#### (4) $\gamma$ H2AX フォーカス数と細胞生存率

以上のデータを用いて $\gamma$ H2AXフォーカス数と細胞生存率の関係を求めたが、わずかな相関しか認められなかった ( $R^2=0.34$ )。

#### (5) 補正 $\gamma$ H2AXフォーカス数と細胞生存率

表で示したようにDNA量は各細胞株により異なるため、DNA二重鎖切断数もDNA量に影響されることが考えられる。既に微小核形成試験や未成熟染色体凝集試験でも同様の検討がなされているため、 $\gamma$ H2AX フォーカス数をDNA量で補正し、細胞生存率との関係を求めた。2細胞株(HT1080、KYSE30)を除いては、よい相関関係が得られた ( $R^2=0.77$ )。

#### (6) アポトーシスの影響

放射線照射後の各細胞株に関してアポトーシスの頻度を求めた。HT1080細胞株では照射24時間後のアポトーシスの頻度が他の細胞と比較して有意に多く、9GyではHT1080細胞株では19%、他の細胞株では1-4%であった。補正 $\gamma$ H2AXフォーカス数と細胞生存率に相関関係の得られなかった2細胞株のうちHT1080細胞株では、アポトーシスによる細胞死の影響があるため、DNA二重鎖切断のみでは細胞生存率が予測困難であったと考えられた。このためアポトーシスの頻度を解析に導入することで細胞生存率が予測可能であることが考えられた。しかし、もう一つの細胞株KYSE30に関してはアポトーシスのみでは説明困難で、これ以外の何らかの要因が影響している可能性が考えられ、今後の課題として残った。

#### 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 Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K, Masutani M. Radio-sensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high linear energy transfer radiation. *Cancer Science* 査読有 *in press*
- ② Kunii R, Jiang S, Hasegawa G, Yamamoto T, Umezu H, Watanabe T, Tsuchida M, Hashimoto T, Hamakubo T, Kodama T, Sasai K, Naito M. The predominant expression of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1)-negative pulmonary adenocarcinoma. *Histopathology*. 査読有 58(3): 467-476, 2011

- ③ Izawa H, Hirowatari H, Yahata Y, Hamano Y, Ito K, Saito AI, Yamamoto H, Miura K, Karasawa K, Sasai K. Effect of dose fractionation on pulmonary complications during total body irradiation. J Radiat Resarch 査読有 52, 502-508, 2011
- ④ Hirowatari H, Karasawa K, Izawa H, Ito K, Sasai K, Furuya T, Ozawa S, Arakawa A, Orihata G, Saito M. Full-dose capecitabine with local radiotherapy: one of the treatment options for inoperable T4 breast cancer. Jpn J Radiol. 2 査読有 9(3) : 222- 225, 2011
- ⑤ Kawaguchi G, Abe E, Sasamoto R, Sasai K. Elevation of serum carcinoembryonic antigen level in a patient with hypothyroidism after radiation therapy for cervical esophageal cancer. Int J Clin Oncol. 査読有 15(1):104-108, 2010
- ⑥ Sakamoto M, Mizowaki T, Mitsumori M, Takayama K, Sasai K, Norihisa Y, Kamoto T, Nakamura E, Ogawa O, Hiraoka M. Long-term outcomes of three-dimensional conformal radiation therapy combined with neoadjuvant hormonal therapy in Japanese patients with locally advanced prostate cancer. Int J Clin Oncol. 査読有 15(6):571-577, 2010.

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Kunogi H, Sasai K. Prediction of radiosensitivity using phosphorylation of Histone H2AX. Presented at The International Conference on Translational Research

in Radio- Oncology and Physics for Health in Europe. Feb.27-March 2, 2012, Geneva, Switzerland.

- ② 久能木裕明、笹井啓資 リン酸化 H2AX を用いた放射線感受性予測法の基礎研究 第 70 回 日本医学放射線学会 学術大会（WEB開催） 2011 年 5 月 9 日～20 日

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
 笹井啓資（ SASAI KEISUKE ）  
 順天堂大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：20225858