

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 5 月 14 日現在

機関番号：20101
 研究種目：基盤研究（c）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591616
 研究課題名（和文） 放射線増感剤ギメラシルの臨床応用に向けた研究
 研究課題名（英文） Studies about gimeracil, a radiosensitizer
 研究代表者 坂田 耕一（SAKATA KOH-ICHI）
 札幌医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10235153

研究成果の概要（和文）：

临床上すでに使用されており、経口抗癌剤ティエスワン(TS-1)の1成分である毒性の少ないギメラシルの放射線増感効果について研究を行った。

- (1) 10種の異なる癌細胞を用いたが、ギメラシルには、いずれも同程度の放射線増感効果が存在した。
- (2) ギメラシルは細胞周期に対して影響を与えない。
- (3) ギメラシルは、相同組み替えによるDNA二重鎖切断修復を部分的に抑制する。
- (4) ギメラシルの放射線増感効果がdihydropyrimidine dehydrogenase阻害によることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We studied the radiosensitizing effects of gimeracil, a component of TS-1, an anti-cancer drug. We obtained the following results. Gimeracil had the radiosensitizing effects in all different 10 cells examined. Gimeracil did not influence the cell cycle. Gimeracil partially inhibited the homologous recombination repair (HR) of DNA double strand breaks. dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) is the target protein for radiosensitization by Gimeracil. The inhibitors of DPYD such as Gimeracil could enhance the efficacy of radiotherapy through partial suppression of HR-mediated DNA repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯学

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

1. 研究開始当初の背景
 放射線治療期間に抗癌剤を併用する同時併用化学放射線療法は、放射線治療単独に比べ、治療成績の有意な改善をもたらしている。しかし、抗癌剤の毒性のため、照射と同時併用

可能な抗癌剤の投与量は限定されている。従って、これ以上の治療成績の改善には、その薬剤自体の毒性が少ない放射線増感剤の開発が临床上望まれている。そこで、临床上すでに使用されており、毒性の少ない経口抗癌

剤ティエスワン(TS-1)の1成分であるギメラシルの放射線増感効果について研究を行った。ギメラシルは、抗癌剤 TS-1 の一成分であり、肝臓内や腫瘍内での 5-FU の分解を阻害し、血中 5-FU 濃度を高値に保つ作用を持つが、また、ギメラシル自体が放射線増感効果を持つ。

これまでの我々研究で以下(1)～(4)のことを明らかにした。

(1) ギメラシルによる放射線増感効果は、照射前にギメラシルを添加した場合にのみみられ、照射前4～8時間添加で、放射線増感効果が最大である。

(2) ギメラシルによる放射線増感効果は、ギメラシル濃度が1mMで最大である。

(3) ギメラシルにより、照射後2～4時間での γ H2AXフォーカス数が増加する。

上記(3)より、ギメラシルによる照射による殺細胞効果の増強のメカニズムとしては、主として照射により引きこされた DNA 二重鎖切断の修復を阻害することによると考えられる。また、ギメラシルがジヒドロピリミジン脱水素酵素(DPYD)阻害剤であることを着目して、ギメラシルの放射線増感のターゲット蛋白は、ジヒドロピリミジン脱水素酵素(DPYD)阻害剤であると仮定し、下記の放射線増感効果の分子メカニズムの解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、このTS-1の成分であるギメラシルの放射線増感効果の基礎的研究及び臨床応用に向けた研究を行うことを目標とする。具体的には、分子メカニズムの解明、臨床応用に向けた基礎実験データの集積を行うことを目標とする。

3. 研究の方法

ギメラシルの放射線増感効果については、コロニーアッセイ法を使用し、ギメラシルの放射線増感効果について解析を行った。放射線を照射すると、培養皿に撒かれた細胞株が増殖能を失い、コロニー形成数が減少する。個々の照射細胞が最終的に無限増殖能を回復し、コロニー形成ができるか否かは、DNA損傷が完全に修復されるか否かによって決まると考えられている。

ギメラシルの放射線増感効果の基礎的検討として、(1)細胞周期とギメラシルの放射線増感効果の検討、(2)p53の有無とギメラシルの放射線増感効果の検討、(3)SCneoアッセイによる、ギメラシルの相同組み換え修復に対する影響の検討、(4)ジヒドロピリミジン脱水素酵素(DPYD)に注目して、ギメラシルの放射線増感効果のターゲット蛋白の決定を行った。また、ギメラシルの放射線増感剤の臨床応用に向けた研究として、

(5)抗癌剤+照射に併用された場合のギメラシルの増感効果を調べた。

(1)についての方法～Nocodazoleを用いて細胞周期を同期させて、S期・G2/M期・G0/G1期の各細胞周期にてギメラシルの放射線増感効果がどのように異なるかを調べた。

(3)についての方法～SCneoアッセイ法は相同組み換え修復の頻度を、遺伝子学的手法にて定量的に検出する方法である。In Vivo 遺伝子導入装置、エレクトロポレーターを用いて、SCneoベクターを目的の細胞に導入した。ハイグロマイシンBの耐性を指標に、導入細胞のコロニー形成を行い、その後サザンハイブリタイゼーションにて、1コピーのSCneoが導入されたクローンを選別しこのクローンをを用いて実験を行った。I-Sce Iという制限酵素を発現させ、S2neo遺伝子の特定の部位にDNA二重鎖切断を生じさせる。このDNA二重鎖切断が、姉妹染色分体上の3' neoをテンプレートに相同組み換えにて修復されると、STGC(short-tract gene conversion)型、あるいはLTGC(Long-tract gene conversion)型/SCE(姉妹染色分体交換)型の産物が形成され、S2neo遺伝子が活性neo遺伝子に変換されます。これにより、細胞はネオマイシンに対して耐性を獲得することになる。反対に、I-Sce Iにて導入されたDNA二重鎖切断が、非同相末端結合により修復された場合には、S2neoは活性neo遺伝子に変換されることはない。このSCneoアッセイ法により相同組み換え修復の頻度を定量することが可能になる。相同組み換えの頻度は、ネオマイシン耐性のコロニー数を、トランスフェクトした細胞数×クローニング効率で割ることにより算出可能である。ギメラシルを添加し、ネオマイシン耐性細胞を計測し、相同組み換え修復の頻度を定量した。実験にはHeLa細胞と、DT-40細胞を使用した。

(4)についての方法～HeLa(子宮頸癌細胞)を用いた。siRNAを用いてDPYD遺伝子をノックダウンし、放射線感受性の変化及びギメラシルの放射線増感効果に対する影響をclonogenic assayにて、検討した。また、ネガティブコントロール用siRNAも導入して、放射線感受性への影響をみた。

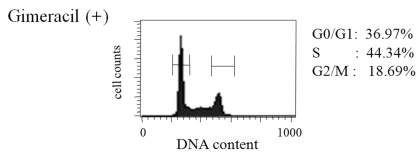
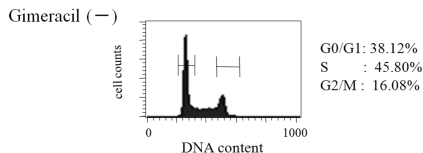
4. 研究成果

我々の研究により、

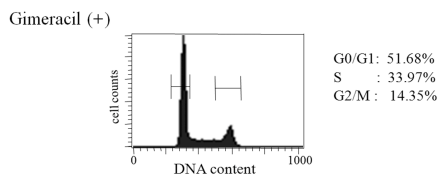
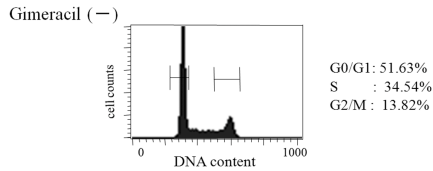
(1)10種の異なる癌細胞を用いたが、ギメラシルには、いずれも同程度の放射線増感効果が存在した。

(2)ギメラシルは細胞周期に対して影響を与えない。

(i) DLD-1



(ii) HeLa



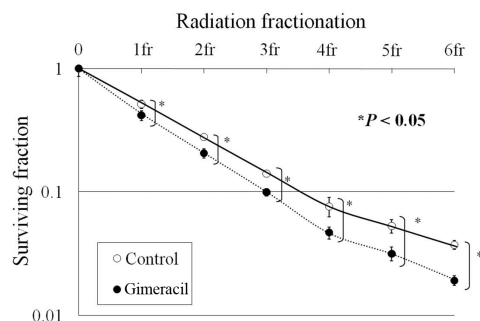
- (3) p53の野生型、欠損型、変異型をもつ肺癌細胞で、ギメラシルの放射線増感効果を検討したが、同程度の放射線増感効果がみられた。
- (4) SCneoレポーターでの解析で、ギメラシ

Table 1. Recombination frequencies in Scneo reporter construct.

Cell	CDHP	Plasmid	Total number of	Total number of	HR frequency
			plated cells	G418 resistant	
HeLa cell	0mM	pBluescript	3.38 × 10 ⁶	8	2.37 × 10 ⁻⁴
		3x nls I-Sce I	3.12 × 10 ⁶	1000	3.21 × 10 ⁻⁴
		pBluescript	3.57 × 10 ⁶	17	4.76 × 10 ⁻⁴
DT40 cell	0mM	pBluescript	9.92 × 10 ⁶	5	2.37 × 10 ⁻⁴
		3x nls I-Sce I	10.40 × 10 ⁶	1753	1.69 × 10 ⁻⁴
	0.2mM	pBluescript	9.52 × 10 ⁶	10	1.05 × 10 ⁻⁶
		3x nls I-Sce I	9.99 × 10 ⁶	1543	1.55 × 10 ⁻⁴
	1mM	pBluescript	9.75 × 10 ⁶	76	7.79 × 10 ⁻⁶
		3x nls I-Sce I	9.84 × 10 ⁶	1410	1.43 × 10 ⁻⁴
2.5mM	pBluescript	4.65 × 10 ⁶	34	7.31 × 10 ⁻⁶	
	3x nls I-Sce I	5.00 × 10 ⁶	702	1.40 × 10 ⁻⁴	

ル(CDHP)は相同組み換えの頻度を減少させる。この結果はギメラシルは、相同組み替えによるDNA二重鎖切断修復を部分的に抑制することを示唆する。

- (5) ギメラシルの放射線増感効果は、S期の細胞で最も高い。1回2Gyの分割照射とギメラシルの放射線増感効果との関係を検討した所、照射回数(総線量)が多くなるに従ってコントロール群と比較した場合のギメラシル添加群の放射線増感効果が大きくなる。



- (6) ギメラシルは、カンプトテシンの抗癌効果を増強し、ギメラシル+カンプトテシンの組み合わせで、大きな放射線増感効果がみられる。
- (7) dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) 遺伝子をノックダウンすると、ギメラシルと同程度に放射線感受性になった。また、DPYD遺伝子をノックダウンすると、ギメラシルの放射線増感効果が消失した。ネガティブコントロールsiRNAでは、放射線感受性の変化及びギメラシルの放射線増感効果に影響がみられなかった。ギメラシルの放射線増感は、DPYD遺伝子の阻害と関連している可能性が示唆

Table 1 The degree of radiosensitization of Gimeracil in control cells, cells transfected with the DPYD siRNA or scrambled siRNA

	Gimeracil	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ²)	Enhancement ratio
Control	-	0.110	0.033	1.18
	+	0.160	0.036	
Scrambled siRNA	-	0.122	0.034	1.13
	+	0.164	0.036	
DPYD siRNA	-	0.190	0.027	0.99
	+	0.177	0.029	

する。

以上を明らかにした。現在は、DPYD蛋白が、DNA 2重鎖切断の相同組換え修復に、どのように関与しているか研究中である。ギメラシルが放射線増感効果を現すには、*in vitro*で、1mM程度の濃度が必要であり、現在臨床で使用されている用量より多くの経口投与量が必要であるため、より強力なDPYD阻害剤も探索中である。

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5件)

- ① Someya M, Sakata K, Matsumoto Y, Tauchi H, Kai M, Hareyama M, Fukushima M. Effects of depletion of dihydropyrimidine dehydrogenase on focus formation and RPA phosphorylation. J Radiat Res, 査読有、in press, 2012.
- ② Takagi M, Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Tauchi H, Hareyama M, Fukushima M. The combination of hyperthermia or chemotherapy with

Gimeracil for effective radiosensitization. Strahlenther Onkol 2012; 査読有、188:255-261.

- ③ Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Tauchi H, Kai M, Toyota M, Takagi M, Hareyama M, Fukushima M. Gimeracil, an inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase, inhibits the early step in homologous recombination. Cancer Sci 2011; 査読有、102(9):1712-1716.
- ④ Someya M, Sakata K, Matsumoto Y, Kamdar P. R, Kai M, Toyota M, Hareyama M. The association of DNA-dependent protein kinase activity of peripheral blood lymphocytes with prognosis of cancer. Brit J Cancer 2011; 査読有、104(11):1724-1729.
- ⑤ Takagi M, Sakata K, Someya M, Tauchi H, Iijima K, Matsumoto Y, Torigoe T, Takahashi A, Hareyama M, Fukushima M. Gimeracil sensitizes cell to radiation via inhibition of homologous recombination. Radiother Oncol 2010; 査読有、96:259-266.

[学会発表] (計4件)

- ① 坂田耕一、ギメラシル放射線増感効果の分子メカニズムの検討、第24回日本放射線腫瘍学会、2011年11月18日、神戸。
- ② 坂田耕一、ギメラシル放射線増感効果の分子メカニズムの検討、第23回日本放射線腫瘍学会、2010年9月17日、東京。
- ③ 坂田耕一、ギメラシルの放射線増感作用、第40回日本放射線腫瘍学会制癌シンポジウム、2010年7月9日、札幌。
- ④ 坂田耕一、ギメラシル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、2009年9月17日、京都。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 耕一 (SAKATA KOH-ICHI)
札幌医科大学・医学部 ・ 准教授
研究者番号：10235153