

## 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25日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700913

研究課題名（和文） G2期チェックポイント阻害剤を利用した放射線感受性増強型抗がん剤の開発

研究課題名（英文） Development of radiation-sensitizing anti-cancer agents using G2 checkpoint abrogator

研究代表者

小泉 幸央 (KOIZUMI YUKIO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80353465

研究成果の概要（和文）：本研究では、固形がんに対する G2 期チェックポイント阻害剤の放射線感受性増強効果を調べ、がん放射線療法の治療効率の上昇と副作用の減少をもたらす新規な抗がん剤の創製を目指す。食道がん TE5 細胞株への X 線照射による G2 期停止誘導および増殖抑制効果に対する種々の G2 期チェックポイント阻害剤の影響を調べた結果、UCN-01 は G2 期停止の阻害および増殖抑制の増強効果を示した。また、UCN-01 は X 線照射によって活性化される Chk1 キナーゼをタンパク質レベルで減少させることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The present study aims at examining the radiation-sensitizing effect of G2 checkpoint abrogators against solid cancers and discovering the new anti-cancer agent which brings both benefits, enhancing the therapeutic efficacy and decreasing adverse effects of cancer radiotherapy. We examined the effects of various G2 checkpoint abrogators on G2 arrest induction and antiproliferative effect by X-ray irradiation against esophageal cancer cell line, TE5. Cell cycle analysis and trypan blue exclusion assay showed that UCN-01 abrogated G2 arrest and potentiated growth inhibition, respectively. Furthermore, Western blotting demonstrated that UCN-01 decreased the protein level of Chk1 kinase activated by X-ray irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：抗がん物質探索・ケミカルバイオロジー、放射線、細胞周期、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

固形がんに対する治療は手術と放射線が中心的役割を担っている。近年の放射線治療の進歩は著しく、手術に匹敵する治療成績が報告されている。しかしながら、皮膚炎、脱毛、嘔吐、倦怠感といった副作用も生じることが

ら、腫瘍の放射線感受性を増強させる試みや放射線感受性を治療に先立ち予測する試みが近年行われている。

腫瘍の放射線感受性を増強させる試みとして、G2期チェックポイント阻害剤の開発があげられる。チェックポイントは薬剤や放射線

によって損傷したDNAを感知し、損傷DNAが修復されるまで細胞周期の進行を停止させる、細胞に備わった生体防御機構の1つである。チェックポイントには細胞周期のG1期とG2期、それぞれに働くG1期チェックポイントとG2期チェックポイントが存在する。G1期チェックポイントはp53依存性のチェックポイント機構で、DNA損傷時に素早く活性化したp53がcyclin依存性キナーゼ阻害因子の発現を誘導し、細胞周期をG1期で停止させる。しかし、多くの腫瘍細胞においてはp53遺伝子の変異によってG1期チェックポイントが不全状態にあり、G2期チェックポイントがDNA損傷時に唯一のチェックポイント機構として働く。したがって、G2期チェックポイントの阻害はDNA損傷を引き起こす薬剤や放射線の効果を腫瘍細胞選択的に増強できることから、新しい抗がん剤開発のための有望な標的経路と考えられる。

申請者のグループは、これまで微生物二次代謝産物からG2期チェックポイント阻害剤を含む細胞周期調節物質を見いだしてきた。ボロマイシンはG2期チェックポイント阻害剤として見いだした放線菌二次代謝産物で、DNA損傷型抗がん剤の効果を増強することを *in vitro* 及び *in vivo* で証明した (Arai M, Koizumi Y et al. *J Antibiot* 2004)。p53非依存的に細胞周期を停止させ、細胞死を導く放線菌由来のシマオミシン $\alpha$ も (Koizumi Y et al. *Cancer Sci* 2009)、以前AraiらによってG2期チェックポイント阻害活性を有することが報告されている。さらに、申請者が以前血栓溶解促進物質として発見した糸状菌由来のマルホルミンは (Koizumi Y et al. *J Antibiot* 2002)、最近G2期チェックポイント阻害作用も有することが Hagimoriらによって見いだされた。しかし、これらの化合物はDNA損傷型抗がん剤によって誘発されたG2期チェックポイントの阻害を指標に発見されたものなので、多くの固形がんの治療に用いられる放射線照射によって誘発されるG2期チェックポイントを阻害するかは不明である。また現在までのところ、これら化合物の詳細な作用メカニズムについてもわかっていない。

一方、申請者のグループは腫瘍の放射線感受性を予測する試みとして、食道がんが発現する放射線感受性マーカーを探索した結果、Regenerating gene 1 (REG1) を見出した。REG1は膵臓 $\beta$ 細胞の再生・増殖に関与する遺伝子として最初に発見されたサイトカイン様の分泌タンパク質である。食道がん組織の生検資料を用いた免疫染色からREG1を高発現している食道がん患者では発現していない患者と比較して放射線化学療法後の予後が良好であったこと、さらにREG1を発現していない食道がん細胞株にREG1遺伝子を強制発現した結果、X線に対する感受性が上昇することも

見いだした (Hayashi K, Koizumi Y et al. *Cancer Sci* 2009)。

以上のような背景から申請者は、G2期チェックポイント阻害剤が固形がん選択的に放射線感受性の増強および死滅させること、さらに放射線感受性マーカーREG1を高発現したがん細胞に対する放射線治療効率の飛躍的な増強の可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 微生物由来のG2期チェックポイント阻害剤が固形がんに対するX線感受性を増強するかを *in vitro* で評価し、(2) 実験(1)でX線感受性を増強したG2期チェックポイント阻害剤がREG1発現細胞のX線感受性を効率的に増強するかを *in vitro* で調べ、さらに(3) スクリーニングによって新規なX線誘発G2期チェックポイント阻害剤を探索する。(4) REG1発現細胞に対する放射線療法とG2期チェックポイント阻害剤の併用効果を *in vivo* で調べ、(5) 実験(4)で効果を示したG2期チェックポイント阻害剤の作用メカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) G2期チェックポイント阻害活性測定

3.5 cm ディッシュに  $2 \times 10^5$  cells の食道がん細胞株 TE5 を播種する。一日後、20 Gy の X 線を照射し、薬剤を添加する。20 時間の反応後、細胞を回収し、DNA を蛍光色素で染色する。DNA の染色後、フローサイトメーターを用いた細胞周期解析を行なう。

### (2) *in vitro* 増殖抑制活性測定

24 穴プレートに  $2.5 \times 10^4$  cells の TE5 細胞株を播種する。一日後、0-20 Gy の X 線を照射し、0-500 nM の UCN-01 を添加する。5 日間の反応後、細胞を回収し、トリパンブルー染色を行ない、生細胞数をカウントする。

### (3) ウェスタンブロッティング

6 cm ディッシュに  $4 \times 10^5$  cells の TE5 細胞を播種する。一日後、20 Gy の X 線を照射し、100 nM の UCN-01 を添加する。20 時間後、細胞を回収し、PBS を用いた洗浄後に細胞溶解液を作成する。タンパク質定量後、各サンプルを SDS-PAGE で分離後、ウェスタンブロッティングを行なう。

### (4) X線感受性増強物質のスクリーニング

96 穴プレートに  $5 \times 10^4$  cells の大腸がん細胞株 HCT15 を播種する。一日後、20 Gy の X 線を照射し、被検試料を添加する。72 時間後、MTT 溶液を添加し、さらに 4 時間反応する。反応後、細胞溶解液を添加し、攪拌溶解後、570 nm の吸光度を測定する。吸光度から細胞生存率を算出し、X線照射時と X線非照射時の生存率の比較から X線増強活性を計算した。スクリーニングには土壌由来の微生物の培養抽出液を用いた。

#### 4. 研究成果

REGIを発現していないTE5細胞株に対する種々のG2期チェックポイント阻害剤の影響をフローサイトメーターを用いた細胞周期解析により調べた。その結果、カフェイン、ペントキシフィリン、UCN-01、SB-218078、Gö6976、ヒメニアルジシンがX線照射によって誘発されたG2期停止を阻害することがわかった(図1)。

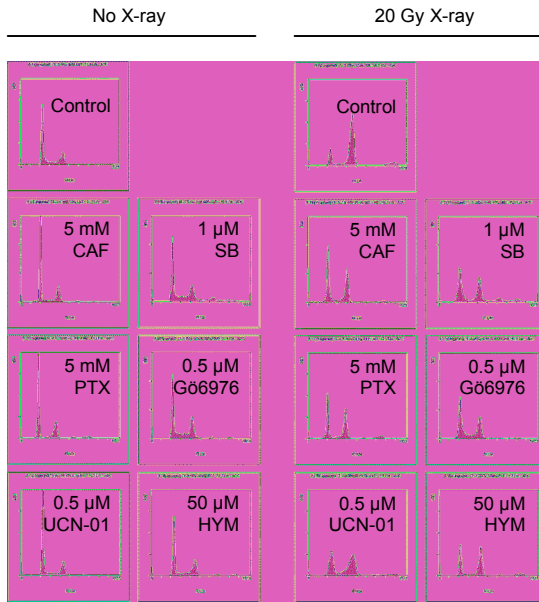


図1 X線照射による食道がんTE5細胞株の細胞周期G2期停止に対する各種G2期チェックポイント阻害剤の影響

次に、X線照射によるTE5細胞株の増殖抑制に対するG2期チェックポイント阻害剤の影響を調べた。その結果、UCN-01がTE5細胞株のX線感受性を増強することがわかった(図2)。このUCN-01によるX線増強効果は、X線吸収線量依存性(1-20 Gy)(図2a)かつUCN-01濃度依存性(10-500 nM)(図2b)を示した。

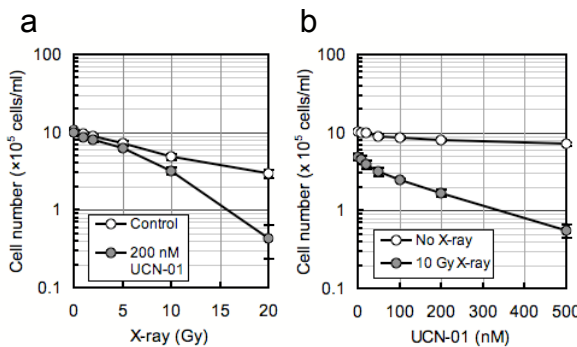


図2 食道がんTE5細胞株の増殖に対するX線照射とUCN-01の併用効果

(a)X線吸収線量依存性、(b)UCN-01濃度依存性

続いて、UCN-01によるTE5細胞株に対するX線感受性増強活性の作用機序の解析を行った(図3)。X線照射によってG2期に停止したTE5細胞株内で増加したcyclin B1はUCN-01との併用により減少し、また細胞内で減少したcyclin D1及びcyclin EはUCN-01との併用によって増加することがわかった。UCN-01はChk1キナーゼの阻害剤として知られるが、TE5細胞株に対するX線との併用処理によってChk1のタンパク質レベルの減少を導くことが新たにわかった。

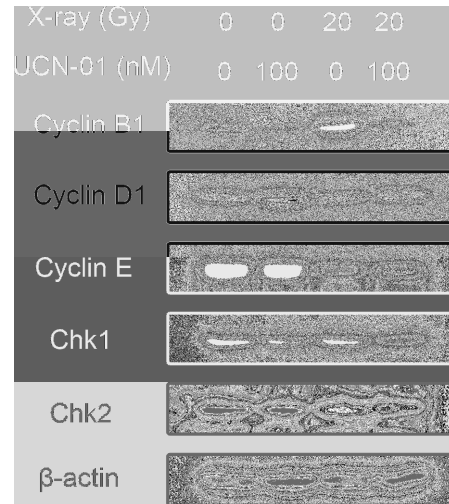


図3 UCN-01/X線処理によるTE5細胞株の細胞周期関連因子のウェスタンブロット解析

また、X線誘発G2期チェックポイント阻害剤の探索を目的とした微生物抽出液ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、これまでに秋田県の土壌から分離した放線菌AUMR0041株の培養抽出液中に大腸がん細胞株HCT15のX線感受性を増強させる成分を見出した。今後、本活性成分の同定を進める。

#### 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4件)

①Ma L, Koyota K, Myoen Y, Yamashita T, Yatabe N, Koizumi Y, Aosasa M, Nishimichi N, Matsuda H, Sugiyama T. Generation of intracellular single-chain antibodies directed against polypeptide GalNAc-transferase using a yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **418**, 628-633 (2012). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.062

②Yusa K, Yamamoto O, Fukuda M, Koyota S,

Koizumi Y, Sugiyama T. In vitro prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 273-278 (2011). 査読有  
DOI: 10.1016/j.snb.2011.08.037

③ Koizumi Y, Fukudome H, Hasumi K, Fibrinolytic activation promoted by the cyclopentapeptide malformin: Involvement of cytoskeletal reorganization. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1426-1431 (2011). 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.34.1426

④ Kuhara M, Wang J, Flores MJ, Zhiwei Q, Koizumi Y, Koyota S, Taniguchi N, Sugiyama T, Sexual dimorphism in LEC rat liver: Suppression of carbonic anhydrase III by copper accumulation during hepatocarcinogenesis. *Biomed. Res.* **32**, 111-117 (2011). 査読有  
DOI: 10.2220/biomedres.32.111

〔学会発表〕(計6件)

① Koizumi Y, Nagai K, Hasumi K, Koyota S, Sugiyama T. Synthesis and biological evaluation of malformin derivatives as a fibrinolysis enhancer. The 6th Korea-Japan Chemical Biology Symposium. Jan. 27, 2012, Sapporo.

② 小泉幸央、姜 琛、新藤道人、供田 洋、杉山俊博、カバノアナタケ抽出液によるマクロファージ脂肪滴形成阻害作用、日本農芸化学会東北支部 第146回大会、2011年10月8日、山形

③ 小泉幸央、長井賢一郎、蓮見恵司、小代田宗一、杉山俊博、血栓溶解を促進するマルホルミンの構造活性相関、日本農芸化学会2010年度大会、2011年3月27日、京都

④ 明円 悠、小代田宗一、馬 莉、小泉幸央、杉山俊博、Cosmc阻害による乳ガン細胞の増殖・転移抑制、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010年12月10日、神戸

⑤ Ma L、Koyota S、Myoen Y、Koizumi Y、Sugiyama T、Generation and characterization of intracellular single chain fragment variable (scFv) antibodies against ppGalNacTs、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010年12月10日、神戸

⑥ 小代田宗一、小代田理恵、堀川彩夏、牧野晃大、遊佐和之、小泉幸央、杉山俊博、マウスエナメル芽細胞前駆細胞と象牙芽細胞前駆細胞の共培養による石灰化促進、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010年12月10日、神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小泉 幸央 (KOIZUMI YUKIO)