

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24日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010-2011

課題番号：22791207

研究課題名（和文）分子標的放射線増感剤の研究

研究課題名（英文）Analysis of molecular targeting radiosensitization using DPYD depletion.

研究代表者

染谷 正則（MASANORI SOMEYA）

札幌医科大学医学部・講師

研究者番号：60404711

研究成果の概要（和文）：

DPYD 阻害薬であるギメラシルが、DNA 損傷修復経路の1つの相同組換え修復を部分的に阻害する事がこれまでの研究で判明している。そのメカニズムを放射線誘発フォークスの解析により詳しく調べた。siRNA を用いた DPYD ノックダウンにより、DNA 修復タンパクのうち RPA リン酸化が部分的に阻害され、DNA 損傷部位への NBS1/Mre11/Rad50 複合体から RPA が動員される経路が抑えられる事で、放射線増感効果が見られる事が判明した。このような DNA 修復に関わるタンパクを新たな分子標的薬の創薬により選択的に阻害する事で、放射線増感剤を開発できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Gimeracil, an inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD), partially inhibits homologous recombination (HR) repair and has a radiosensitizing effect. We investigated the mechanisms of sensitization of radiation by DPYD inhibition using DLD-1 cells treated with siRNA for DPYD. DPYD depletion by siRNA significantly restrained the formation of radiation-induced foci of Rad51 and RPA, whereas it increased the number of foci of NBS1. The numbers of colocalization of NBS1 and RPA foci in DPYD-depleted cells after radiation were significantly smaller than in the control cells. The phosphorylation of RPA by irradiation was partially suppressed in DPYD-depleted cells, suggesting that DPYD depletion may partially inhibit DNA repair with HR by suppressing phosphorylation of RPA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、放射線増感剤、放射線

1. 研究開始当初の背景

2008-2009 年度のこれまでの研究によって、経口抗癌剤である TS-1 の一成分であるギメラシルに放射線増感効果がある事、およびその放射線増感効果のメカニズムとして DNA 修復経路のうち相同組換え修復を部分的に阻害する事が判明している。これと同様に DNA 修復に関わるタンパク機能または遺伝子発現を、分子標的薬剤を用いてピンポイントで阻害する事ができれば、放射線増感効果を持つ新たな新薬の創薬が期待されている。

2. 研究の目的

そこで、今回はまずギメラシルの薬効の標的となっている (DPYD) Dihydropyrimidine dehydrogenase の発現を RNA 干渉 (small RNA interference) によってノックダウンし、放射線増感効果が見られるかどうかを、コロニーアッセイ法を用いて調べた。その増感効果の仕組みの解明のために、DNA 修復タンパクの放射線誘発フォーカスの動態を解析する事とした。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞の培養細胞株として大腸癌細胞株 DLD-1 を用い、DPYD siRNA を導入し、DPYD の発現が低下する事を RT-PCR 法を用いて確認した。具体的には導入後 1, 3, 5, 7 日目での DPYD 発現の状態を確認した。

(2) 上記で得られた条件を元に、最適な培養日数を探し、一番 DPYD 発現が低下した状態で X 線照射実験を進めた。

(3) DPYD siRNA およびコントロール群の SC siRNA 導入した細胞を用い、X 線照射による生存率曲線をコロニーアッセイ法によって算出し、放射線増感率を計算した。37%生存率となる線量 D37 を計算し、DPYD siRNA 群とコントロール群での比を取り、増感率 SER を計算した。

(4) X 線照射後の放射線誘発フォーカスとして NBS1, RPA, Rad51 タンパクを、蛍光免疫染色法を用いて可視化し、DPYD siRNA 処理の有無や X 線照射線量を 4Gy と 8Gy に変化させ、照射後から固定までの時間を 2.5 時間から 4 時間に変えて、フォーカス形成の様子を観察した。

(5) NBS1 と RPA については二重染色を行って G2 期の細胞内でのフォーカスの共局在の様子を観察し、細胞内フォーカス数および共局在の割合を算出した。

4. 研究成果

(1) DLD-1 細胞株を用い、DPYD siRNA を作成して導入した所、導入後 5 日目まで DPYD の mRNA 発現が低下する事が RT-PCR 法によって確認された。

他の細胞株として、HeLa 細胞や膀胱癌細胞株である MiaPaCa-2 細胞などでも同様に DPYD 発現の低下が確認された。

(2) DLD-1 細胞を用いて、DPYD siRNA 導入後 5 日目に X 線 2, 4, 6Gy を照射し、その 14 日後のコロニー形成数をカウントし、生存率曲線を算出した。その結果、コントロール群に比べて DPYD siRNA 処理群で有意に細胞生存率の低下が見られた。生存率曲線を α/β モデルの式にフィットさせ、D37 の線量を推定して比を取った所、増感率 SER は約 1.2 であった。

(3) DPYD siRNA 処理および X 線照射を行い、その後スライドグラスに細胞を貼り付けてメタノール、アセトンで固定を行い、NBS1, RPA, Rad51 の各種抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。核を染める対比染色として DAPI 染色を行った。スライドグラスは蛍光顕微鏡を用いて観察し、デジタルカメラで青、緑、赤の波長の画像を撮影し、フォトショップ上で合成を行った。(図 1)

X 線照射によって DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断が起こると、その修復に関わるタンパクが損傷部位に動員されてフォーカスを形成する。照射後 2.5-4 時間の核内放射線誘発フォーカスは DNA 損傷の修復が完了していない部位を示していると考えられており、残存フォーカス数が多いほど残存する DNA 損傷の数も多い事が推測される。

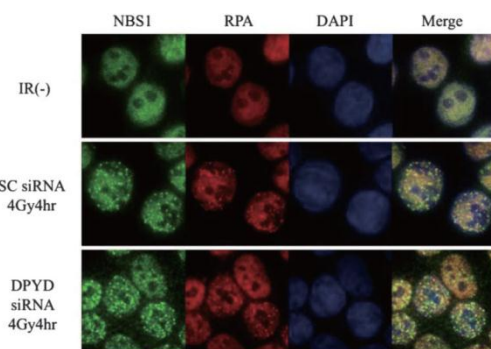


図 1. DLD-1 細胞を用い X 線 4Gy 照射前・後の NBS1, RPA フォーカスの変化を示す (IR(-) : 非照射, SC siRNA : コントロール群, DPYD siRNA : DPYD ノックダウン群)

(4) DPYD siRNA 処理により、コントロール群と比較して G2 期の細胞内の平均フォーカス数は、NBS1 は増加、RPA と Rad51 は減少した。これは 4Gy 照射後 2.5 時間、4 時間、8Gy

照射後 4 時間のいずれの条件でも同様の結果であった。照射線量を 4Gy から 8Gy に上げると、残存するフォーカス数は NBS1, RPA, Rad51 いずれも増加した。(図 2)

DPYD siRNA 処理によって NBS1 フォーカス数は増加し、RPA および Rad51 フォーカス数は減少したという結果から、DPYD ノックダウン処理は DNA 修復経路のうちの相同組換え修復において、NBS1/Mre11/Rad50 複合体形成後に RPA タンパクが動員される過程、つまり DNA 切断端のプロセッシング処理が行われる過程の部分的な阻害効果を示す事が推察された。

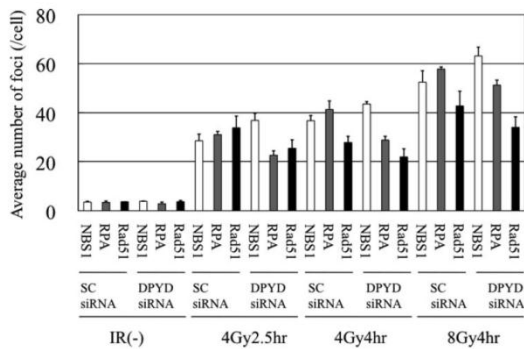


図 2. DLD-1 細胞を用い、非照射、X 線 4Gy, 8Gy 照射 2.5 時間、4 時間後の G2 期の細胞のみを選んで、細胞内の NBS1, RPA, Rad51 平均フォーカス数、平均値と標準偏差を示す

(5) また NBS1/RPA の共染色を行い、細胞内で NBS1 フォーカスおよび RPA フォーカスが重なっている部位を共局在と定義し、細胞内で 10 個以上の共局在が観察された細胞を陽性細胞と定義した。(図 3)

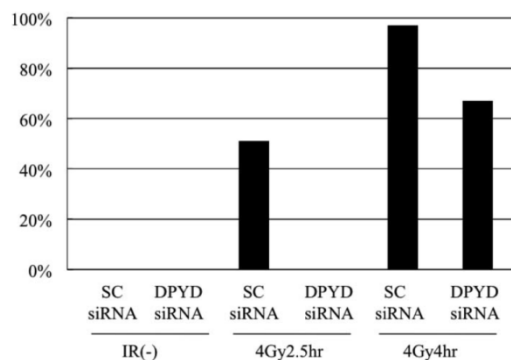


図 3. DLD-1 細胞を用い、G2 期細胞を選んで、細胞内の放射線誘発 NBS1, RPA フォーカスの共局在陽性割合を計測したものを示す

その結果、細胞内の NBS1/RPA フォーカス共局在の陽性率はコントロール群では 4Gy 照射後 2.5 時間で 50%、4 時間で 98%であったが、DPYD siRNA 処理を行うとその陽性率は

4Gy 照射後 2.5 時間で 0%、4 時間で 65%となり、明らかに NBS1/RPA タンパクの共局在が抑制されている事が示された。

これは図 2 の結果で示した推察を裏付ける結果となった。

さらに 1 つの細胞内で形成されるフォーカス数全体に対する NBS1 フォーカス単独、RPA フォーカス単独、フォーカス共局在、の割合を図 4 に示す。こちらでも同様に DPYD siRNA 処理が NBS1/RPA フォーカス共局在を抑制している事が示された。

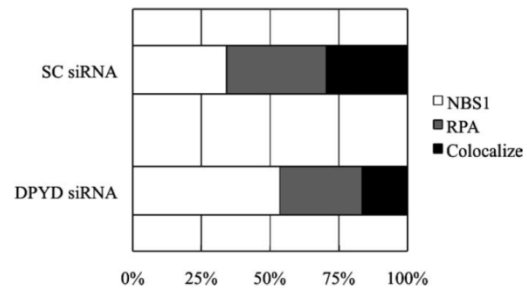


図 4. DLD-1 細胞を用い、1 つの細胞内での NBS1 フォーカス単独、RPA フォーカス単独、NBS1/RPA フォーカス共局在の割合 (%) を示す

(6) ウェスタンブロッティング法を用いて、RPA タンパクのうちの p34 サブユニットのリン酸化を観察した (図 5)。X 線 10Gy 照射後 4 時間の RPA リン酸化のバンドの濃度を計測したが、DPYD siRNA 処理により、X 線照射によって生じる RPA リン酸化はコントロール群に比べて低下する事が判明した。

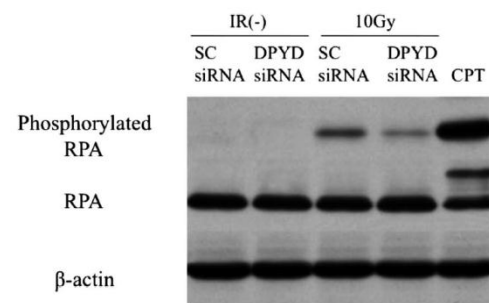


図 5. DLD-1 細胞を用い、ウェスタンブロッティング法により非照射、X 線 10Gy 照射 4 時間後のリン酸化 RPA および RPA のバンドを示す (CPT: ポジティブコントロールとしてのカンプトテシン処理群)

この結果より、DPYD ノックダウン処理が RPA タンパクの状態に変化を与え、X 線照射によ

って生じる RPA リン酸化を抑制する事が分かった。

以上の結果から、DPYD siRNA 処理によって DNA 相同組換え修復の 1 つである RPA タンパクのリン酸化が部分的に抑制され、その結果として放射線誘発の NBS1 フォーカス数は増加、その修復経路の下流に当たる RPA、Rad51 フォーカス数は低下し、相同組換え修復が阻害されているものと思われる。

今回の検討ではギメラシルそのものが DPYD タンパクの機能を選択的に阻害する薬剤として既に見出されている薬剤であり、新たな新薬の創薬にはつながらなかった事と、増感率が約 1.2 倍という数値では臨床的にインパクトのある結果を見いだす事はなかなか難しいと考えられる。

今後とも同じような DNA 修復タンパクを阻害する作用機序を持つ分子標的薬の新規創薬によって、放射線増感剤の開発の余地がありうると考えられる。

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)

① Masanori Someya, Masaru Takagi, Koh-ichi Sakata, Yoshihisa Matsumoto, Hiroshi Tauchi, Masahiro Kai, Masato HAREYAMA, Masakazu Fukushima. Effects of depletion of dihydropyrimidine dehydrogenase on focus formation and RPA phosphorylation. *Journal of Radiation Research* 53: 250-256, 2012. 査読有
DOI: 10.1269/jrr.11190

② Masaru Takagi, Koh-ichi Sakata, Masanori Someya. The combination of hyperthermia or chemotherapy with gimeracil for effective radiosensitization. *Strahlentherapie und Onkologie* 188: 255-261, 2012. 査読有
DOI: 10.1007/s00066-011-0043-6

③ Masaru Takagi, Koh-ichi Sakata, Masanori Someya. Gimeracil sensitizes cells to radiation via inhibition of homologous recombination. *Radiotherapy and Oncology* 96: 259-266, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.radonc.2010.05.020

④ Koh-ichi Sakata, Masanori Someya, Yoshihisa Matsumoto, Hiroshi Tauchi, Masahiro Kai, Minoru Toyota, Masaru Takagi,

Masato Hareyama, Masakazu Fukushima. Gimeracil, an inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase, inhibits the early step in homologous recombination. *Cancer Science* 102: 1712-6, 2011. 査読有
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02004.x

[学会発表] (計 2 件)

① 染谷正則、坂田耕一、高木克、晴山雅人、田内広、松本義久、福島正和. 放射線誘発 NBS1, RPA フォーカスの共局在に対するギメラシルの影響. 第 24 回日本放射線腫瘍学会学術大会、2011 年 11 月 17 日、兵庫県神戸市

② Masanori Someya, Masaru Takagi, Koh-ichi Sakata, Hiroshi Tauchi, Yoshihisa Matsumoto, Masato Hareyama, Masakazu Fukushima. Radiosensitizing effects of Gimeracil. 第 56 回 Radiation Research Society. 2010 年 9 月 25 日、アメリカ ハワイ州

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・講師
研究者番号: 60404711

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし