

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591845

研究課題名(和文) 早期に臨床応用が可能な放射線増感剤の研究

研究課題名(英文) Studies about a radiosensitizer that is clinically usable

研究代表者

坂田 耕一 (SAKATA, Koh-ichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10235153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：オラパリブは、ポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ阻害剤(PARP阻害剤)である。オラパリブは、in vitroにおいて、臨床上達成可能な低濃度や短時間添加でも放射線増感効果がみられ、かつ、抗がん剤カンプトテシンの作用増感効果を認めた。また、オラパリブの放射線増感効果はp53遺伝子の状態に依存しなかった。さらにオラパリブとカンプトテシン併用でより効果的な放射線増感効果がみられ、放射線増感剤としての臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：An inhibitor of Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), Olaparib enhanced sensitivity to radiation and Camptothecin (CPT) at low concentrations and after relatively short exposure times such as 2 h. The radiosensitizing effect of olaparib was not dependent on the p53 status of tumor cells. These characteristics could be advantageous for clinical radiotherapy since tumor cells may be exposed to low concentrations of olaparib and/or may have different levels of p53 mutation. The combination of olaparib and CPT had a stronger radiosensitizing effect, indicating that combining a PARP inhibitor with a topoisomerase I inhibitor could be promising for clinical radiosensitization.

研究分野：医歯学

キーワード：放射線治療

1. 研究開始当初の背景

放射線治療効果を増強するタイプの抗癌剤と照射との同時併用、即ち化学放射線療法がおこなわれるようになり、多くの癌腫において、放射線治療単独に比べて、有意な治療成績の向上が得られている。しかし、抗がん剤はそれ自体に毒性があるため、照射と同時併用可能な投与量は制限され、それが化学放射線療法の限界となっている。抗がん剤以外にも、現在までに多くの放射線増感作用を持つ物質が発見されているが、主に強い毒性のため、臨床で使用されているものは、ない。従って、毒性の少ない放射線増感剤の開発および臨床応用が望まれている。

2. 研究の目的

オラパリブは、ポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ阻害剤(PARP 阻害剤)である。PARP 阻害剤は塩基除去修復経路の阻害により DNA 一本鎖切断が修復不能とし、複製フォークの崩壊を経て、DNA 二本鎖切断を生じることにより、放射線増感作用が起こるといわれている。抗がん剤であるカンプトテシンはトポイソメラーゼと DNA との共有結合を安定化させ、一過性に作られた一本鎖切断が修復されなくなり、さらにはそれが複製中に DNA 二本鎖切断を生成する。本研究では、これらの薬剤の放射線増感効果を検討し、放射線増感剤としての臨床応用への可能性を検討することを目的とした。

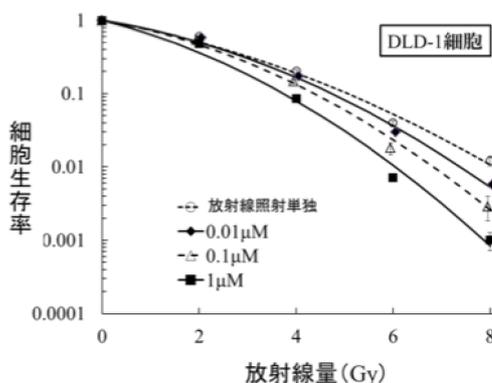
3. 研究の方法

大腸腺癌細胞株・DLD-1 細胞と非小細胞肺癌細胞株である 5 種類の H1299 細胞を用いた。H1299 細胞は野生株と p53 遺伝子欠損株および 3 種類の p53 遺伝子のコドンの変異株である。コロニーアッセイ法を用いて細胞生存率を求め、薬剤の殺細胞効果や放射線増感効果を解析した。H2AX フォーカスアッセイ法により放射線誘発の DNA 二重鎖切断の生成及び修復について調べた。

4. 研究成果

(1) 下図は、オラパリブによる放射線増感作用を示すグラフである。オラパリブ 24 時間添加にて濃度を 0.01、0.1、1 μM とすると

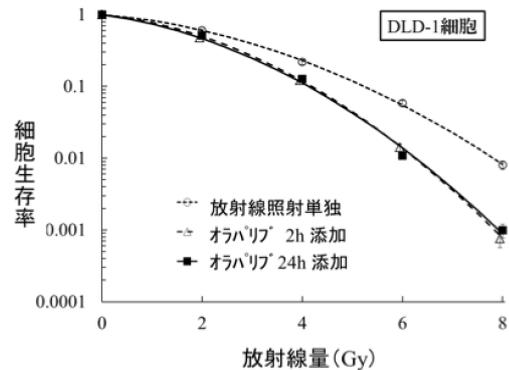
オラパリブの放射線増感作用



用量依存的な放射線増感効果を認めた。0.01 μM のような低濃度でも増感効果が認められた。

(2) 下図は、オラパリブ添加時間と放射線増感効果についての結果である。オラパリブは放射線照射 1 時間前に添加した。照射後のオラパリブ添加時間が 2 時間と 24 時間においては、放射線増感効果に差はみられなかった。

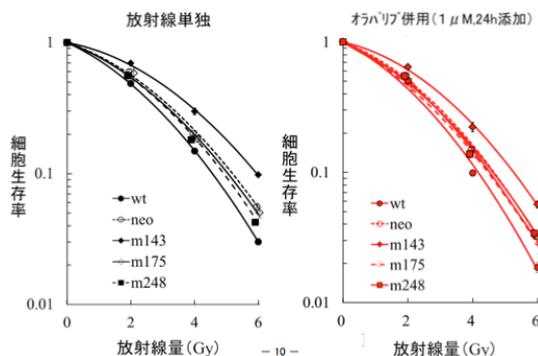
オラパリブ(1 μM)添加時間と放射線増感効果



(3) 下図は、H1299 細胞を用いた実験の結果である。左のグラフは、オラパリブを添加せずに放射線照射を行った場合で、p53 遺伝子変異細胞は、野生株と比較して、いずれも放射線抵抗性を示した。右のグラフは、オラパリブを添加した場合の結果で、いずれの細胞でも生存率が低下した。

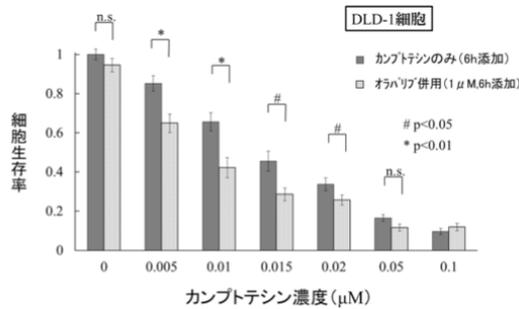
放射線増感率は 1.1~1.2 であり、オラパリブの放射線増感効果は、p53 遺伝子の状態に依存せず、いずれも同程度の増感効果を示した。

H1299細胞での放射線感受性とオラパリブによる放射線増感作用



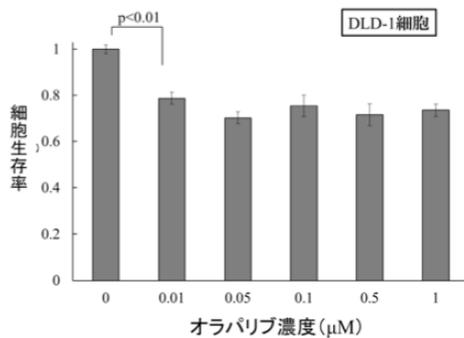
(4) 下図は、抗癌剤カンプトテシンの殺細胞効果がオラパリブ添加により増強することを示した結果である。オラパリブの濃度は 1 μM に固定して、カンプトテシンの濃度を 0 から 0.1 μM まで変化させた。カンプトテシンは低濃度の 0.005 μM から増強効果はみられ、0.01 μM で最も効果がみられている。

オラパリブ(1 μ M,6h添加)によるカンプトテシン(6h添加)の殺細胞効果



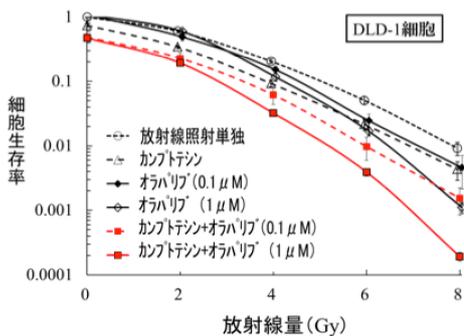
(5) 下図は、カンプトテシンの濃度を一定にして、オラパリブの濃度を变化させた際の、カンプトテシンの殺細胞効果の増強効果を調べた結果である。0.01や0.05 μ Mといった低濃度のオラパリブでもカンプトテシン単独の場合と比較して作用増強が見られた。

オラパリブ濃度とカンプトテシン(0.01 μ M,6h添加)の殺細胞効果



(6) 下図は、オラパリブとカンプトテシンの2剤を併用したときの放射線増感効果である。オラパリブの濃度は0.1 μ Mと1 μ Mの二通りです。放射線単独のコントロールと比較して、オラパリブ併用群、カンプトテシン併用群ともに放射線増感効果がみられ、オラパリブとカンプトテシン両者の併用群では、さらに強い放射線増感効果を認めた。

オラパリブ(0.1 μ M, 1 μ M,6h添加)、カンプトテシン(0.01 μ M,6h添加)併用による放射線増感効果

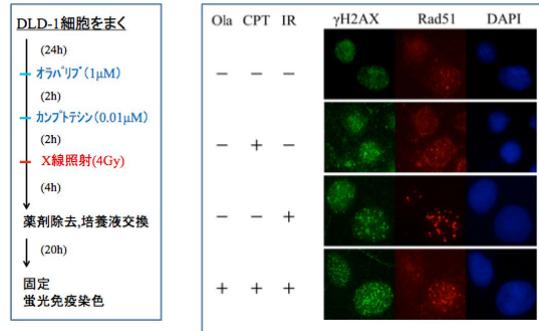


(7) H2AX フォーカスアッセイの結果である。

H2AX フォーカスは一番上の段の薬剤添加がなく照射もしていない細胞と比較して、2

段目のカンプトテシン添加や3段目の照射したものは H2AX フォーカス数が増えている。一番下のオラパリブとカンプトテシンの両者を併用し照射した細胞ではさらに多くのフォーカスが見られた。今回、同時に免疫染色を行った Rad51 は、DNA 二重鎖切断の相同組換え修復で働くタンパクであり、二重鎖切断の修復の部位を示している。

放射線照射24h後の γ H2AX



以上の結果の結果を得た。オラパリブは低濃度や短時間添加で放射線増感効果やカンプトテシンの作用増感効果を認め、また、オラパリブの放射線増感効果は p53 遺伝子の状態に依存しないという点もからも、実地臨床で有用となる可能性があると思われる。さらにオラパリブおよびカンプトテシン併用でより効果的な放射線増感効果がみられ、放射線増感剤としての臨床応用が期待される。

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 5 件)

Someya M, Yamamoto H, Nojima M, Hori M, Tateoka K, Nakata K, Takagi M, Saitoh M, Hirokawa N, Tokino T, and Sakata K, Relation between Ku80 and microRNA-99a expression and late rectal bleeding after radiotherapy. *Radiother Oncol*, in press. 査読有
DOI:10.1016/j.radonc.2015.04.008

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*, 2012;53(2):250-256. 査読有
DOI:10.1269/jrr.11190

Hayashi J, Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Satoh M, Nakata K, Hori M, Takagi M, Kondoh A, Himi T, Hareyama M, Kondoh A, Himi T. Analysis of Ku and XRCC4 expressions of hypopharyngeal cancer tissues and results treated with chemoradiotherapy. *Oncol Letters*,

2012;4(1):151-155. 査読有
DOI:10.3892/ol.2012.674
Miura K, Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Matsumoto H, Takahashi A, Hereyama M. The combination of olaparib and camptothecin for effective radiosensitization. Radiat Oncol, 2012;7:62. 査読有
DOI:10.1186/1748-717X-7-62.
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;188:255-261. 査読有
DOI:10.1007/s00066-011-0043-6

[学会発表](計 1 件)

Sakata K. Analysis of Ku and XRCC4 expressions of hypopharyngeal cancer tissues and results treated with chemoradiotherapy. 第 74 回日本医学放射線学会、2015 年 4 月 18 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

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・教授
研究者番号：10235153