

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791293

研究課題名(和文) 光イメージング技術を用いた分子標的薬の放射線増感作用機構の解明

研究課題名(英文) Radiosensitization

研究代表者

吉村 通央 (YOSHIMURA, MICHIO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40597936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：放射線増感作用をもつ様々な分子標的薬に関して、放射線増感作用を検討したが、その中の一つとして、TAK960というPLK-1阻害剤に注目した。がん細胞を用いてフローサイトメトリー、ならびに細胞周期によって蛍光色に変色していくFucci細胞を使用して、TAK960が細胞をM期で止めることができる至適条件を検討した。その後、ヒト癌細胞を用い、TAK960と併用し、細胞周期をM期で止めた際にin vitroにおいて、放射線増感効果を呈することが分かった。さらにマウスに移植したHeLa細胞を使用して、in vivoでもその条件を使用し、in vivoでもTAK960が放射線増感作用を呈することを示した。

研究成果の概要(英文)：Polo-like kinase 1 is a serine/threonine kinase that functions in mitotic progression. We herein investigated whether PLK1 blockade enhanced the cytotoxic effects of radiation by modulating the cell cycle phase of cancer cells using the novel small molecule inhibitor of PLK1, TAK-960. In vitro clonogenic assays as well as time-lapse imaging and flow cytometric analyses of cell cycle phases demonstrated that the TAK-960 treatment exhibited a radiosensitizing effect, especially when it increased the proportion of M-phase cells. Tumor growth delay assay combined with optical imaging of cell cycle phases in tumor xenografts also demonstrated that the radiosensitizing effect of TAK-960 depended on an increase in the proportion of M-phase cells. These results provide a rational basis of targeting PLK1 for radiosensitization when considering the therapeutic time window for M-phase arrest as the best timing for radiation treatment.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線増感 分子標的薬 放射線治療 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会において、3人に1人は癌で亡くなると言われ、癌の根絶は今や国民的課題である。放射線治療は、癌の三大療法の一つであり、癌治療において必要不可欠な治療の選択肢の一つである。放射線治療は原則的には同一部位には1クールしか治療をすることができないため、放射線治療を施行する最初で最後の機会にいかにしてその効果の高めることができるかが非常に重要となる。近年は放射線治療単独ではなく、様々な抗がん剤を併用した化学放射線療法が、より高い効果を示すことが実証されてきており、多くの種類の癌において、化学放射線療法が選択されている。しかし、抗がん剤は、強い副作用を持つ場合も多く、臨床の現場では、高齢者であったり、腎機能、肝機能が悪い患者には使用できない状況となる場合も多い。そのような場合に、抗がん剤の代用として新規分子標的薬を放射線治療と併用して使用することで、副作用を増強することなく同様以上の効果を示すのであれば、癌の治療法の新たな選択肢の一つとなる可能性がある。一例として、近年セツキシマブ（アービタックス）と放射線治療の併用療法は放射線治療単独と比べ、局所進行頭頸部癌の患者の生存期間を延長することが分かってきており、分子標的薬併用放射線療法が現在注目を集める治療法となっている。しかし、現在のところ放射線治療と増感作用のある分子標的薬として認知されているものはセツキシマブのみであり、近年次々と開発されている分子標的薬の放射線増感作用については検証されていないものも多く、これらの放射線増感作用を検証することは今後の

癌治療にとって非常に重要な鍵となると思われる。また、その分子標的薬を抗がん剤と共に放射線療法と組み合わせることで治療効果をさらに高めることができるようになれば、将来的さらにその適応も拡大していくものと考えられる。

以上より、放射線増感作用をもつ分子標的薬の開発は、癌治療において現在非常に重要な分野である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線と併用することにより放射線増感作用を呈するような分子標的薬のスクリーニング、ならびにその機能や抗腫瘍効果のメカニズム解析することである。また各種分子イメージング技術を使い、その分子標的薬が細胞内の微小環境にもたらす効果についてリアルタイムに検証し、放射線にどのようなタイミングでその分子標的薬を追加すれば最大限の抗腫瘍効果を示すかどうかについても解析することが出来る。これらの実験によって得られた結果により、今後の高精度放射線治療を組み合わせた分子標的薬併用放射線治療のターゲットを時空間的に最適化することも目的の一つである。

3. 研究の方法

培養細胞を使用した *in vitro* の研究

まず、培養細胞実験によって、放射線増感作用をもつ分子標的薬をピックアップする。続いて、培養細胞においてその分子標的薬が標的とする伝達経路を明らかにし、その後、細胞増殖試験、Clonogenic assay、イメージングサイトメーターによるDNA修復イベントの検証などにより、その薬剤が培養腫瘍細胞に対して、最大限の放射線

増感作用を呈する、濃度、タイミングを最適化する。また培養正常細胞に対する影響も検討し、実臨床で使用する際の副作用について予測する。

担癌マウスを使用した *in vivo* の研究

腫瘍を移植したマウスを使い、その分子標的薬の腫瘍縮小効果、放射線増感作用について検討する。

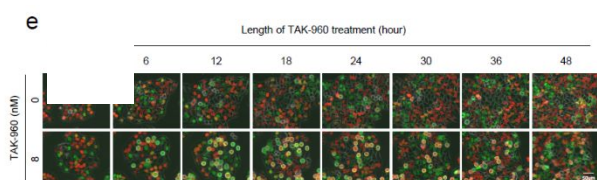
学内研究協力者と共同開発した低酸素部位や DNA 損傷部位を可視化できるレポーター遺伝子を使い、分子標的投与後や放射線照射後の、腫瘍内の低酸素、DNA 損傷部位、細胞周期の変化、局在についてリアルタイムでイメージングする。

データ解析

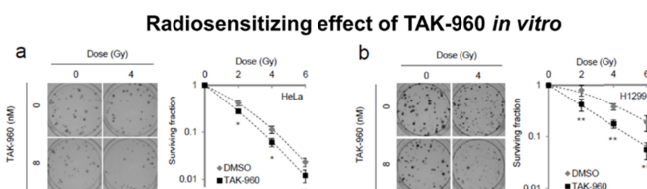
これらの実験で得られた結果をもとに、各分子標的薬の放射線増感作用、ならびに分子標的薬、放射線照射が腫瘍内の微小環境に及ぼす影響を検証する。そのデータから将来臨床の放射線治療の現場で利用し得るとされる腫瘍内放射線抵抗性分画を予測する。

4. 研究成果

放射線増感作用をもつ様々な分子標的薬に関して、放射線増感作用を検討したが、その中の一つとして、TAK960 という PLK-1 阻害剤に注目した。がん細胞を用いてフローサイトメトリー、ならびに細胞周期によって蛍光色に変色していく Fucci 細胞を使用して、TAK960 が細胞を M 期で止めることができる至適作用時間と至適作用濃度を検討した。



その後、HeLa 細胞を用い、TAK960 と併用し、細胞周期を M 期で止めた際に *in vitro* において、放射線増感効果を呈することが分かった。また、Generality を確認するために、複数のがん細胞を用いて検討を行い、同様に放射線増感作用を呈することを確認した。



さらにマウスに移植した HeLa 細胞を使用して、*in vivo* でも TAK960 が最も細胞周期を止めるのに効果的な濃度と、作用時間を検討した。

その条件を使用し、*in vivo* でも TAK960 が放射線増感作用を呈することを示した。さらにこちらも、Generality を確認するために、複数のがん細胞を用いて検討を行い、同様に放射線増感作用を呈することを確認した。

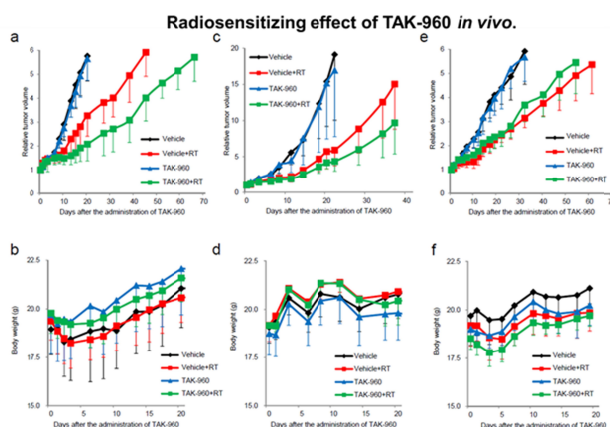


Figure 5. 24 hours after (a-d) or just after (e, f) the oral administration of 0 (black and red lines) or 10 mg/kg (blue and green lines) TAK-960, mice bearing a HeLa (a, b, e, f) or H1299 (c, d) tumor xenograft were subjected to local irradiation at a dose of 0 (black and blue lines) or 10 (red and green lines) Gy. (An animal in the TAK960 + RT group in c and d died on day 1 for undefined reasons). (b, d, f) Body weights of mice in the experiment shown in Figure 5a, 5c, and 5e, respectively.

同データを論文にまとめ、現在論文投稿し、decision 待ちである。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

A novel small molecule inhibitor of PLK1, TAK-960, sensitizes therapeutic effect of radiation by inducing mitotic arrest.

井上実、吉村通央、小林稔、板坂聡、本田弘平、原田浩、平岡真寛

第 7 4 回日本癌学会学術総会、
2014/9/25-9/27

A PLK1 inhibitor, TAK-960, acts as a radiosensitizer by inducing mitotic arrest.

井上実、吉村通央、小林稔、板坂聡、本田弘平、原田浩、平岡真寛

第 2 7 回日本放射線腫瘍学会学術大会
2014/12/11-12-13

PLK1 blockade enhances therapeutic effects of radiation by inducing cell cycle arrest at the mitotic phase.

井上実、吉村通央、小林稔、板坂聡、本田弘平、原田浩、平岡真寛

第 1 7 回癌治療増感研究シンポジウム
2015/2/6-2/7

PLK1 blockade enhances therapeutic effects of radiation by inducing cell cycle arrest at the mitotic phase

Michio YOSHIMURA, Minoru INOUE, Minoru KOBAYASHI, Akiyo MORINIBU, Satoshi ITASAKA,

Hiroshi HARADA, Masahiro HIRAOKA

15th international conference of radiation research, 2015/5/25-29

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉村 通央 (YOSHIMURA, Michio)

京都大学・医学部医学研究科・助教

研究者番号：40597936