

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791431

研究課題名(和文)膵癌微小環境に基づく放射線抵抗機序解明と新規人工ウイルスによる責任間質細胞の制御

研究課題名(英文)Elucidation of the radioresistance mechanism on the microenvironment of pancreatic cancer and control of the stroma cells causing radioresistance by newly artificial virus.

研究代表者

鬼丸 学 (ONIMARU, Manabu)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：80529876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の特徴は増殖能力が高く早期に転移を認め予後が不良である。通常の膵癌治療として外科療法や化学療法や放射線療法が挙げられるが、これまでの報告でヒト線維芽細胞において放射線照射後にDouble Strand BreakというDNAの2本鎖がともに切断される現象に対してその修復過程においてヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)が関与していることが解明された。そこで、膵癌の放射線耐性についてHDAC1がどのように関与するか検討した。結果として放射線照射を行った膵癌細胞は、HDAC1の発現が増強し放射線耐性を示した。これらの結果からHDAC1は膵癌細胞の放射線耐性のメカニズムに含まれる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) is characterised by aggressive tumor spread, early metastasis and a poor prognosis. Standard therapy for PDA patients includes not only surgery and chemotherapy but also radiotherapy. However, there have been few detailed molecular biological studies to investigate about the effect of radiotherapy on PDA. It was reported that histone deacetylase 1 (HDAC1) is responsible for DNA repair of double strand breaks after irradiation in human fibroblasts. Here, we examined HDAC1 is involved in the mechanism of radioresistance of PDA. The irradiated pancreatic cancer cell lines reduced the radiosensitivity and increased the HDAC1 mRNA expression. The radioresistance was decreased after the addition of low-concentration TSA or knockdown of HDAC1 in pancreatic cancer cell lines. The present data suggested that HDAC1 is involved in the mechanism of the radioresistance of pancreatic cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌 HDAC1 DNA Double Strand Break Trichostatin A iRNA

1. 研究開始当初の背景

膵癌の特徴は増殖能力が高く、早期に転移を認め予後が不良である。通常の膵癌治療として外科療法や化学療法や放射線療法が挙げられる。しかし、膵癌の放射線療法の効果について分子生物学的に調査した研究はほとんど認められない。これまでの報告でヒト線維芽細胞において放射線照射後に Single Strand Break という DNA 1 本鎖切断や Double Strand Break という DNA 2 本鎖切断が起きると報告されている。その中でも Double Strand Break は細胞に致命的な障害を与え Apoptosis へと至る。その DNA の修復過程においてヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC 1) の発現が関与していることが解明された。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌の放射線耐性について HDAC 1 がどのように関与するか検討した。さらに、HDAC 1 が放射線耐性に関与した場合、HDAC 1 を阻害または抑制した場合にどのような結果に至るか検討を行い、放射線療法での治療成績の改善を目的とした。

3. 研究の方法

まず、膵癌細胞株における HDAC 1 の発現を mRNA で確認を行う。その際、HDAC 1 の発現が低いものを選出し膵癌細胞株に対して放射線照射を週に 1 回行い放射線耐性の膵癌細胞を作製する。そこで、HDAC 1 の発現に変化がある細胞株さらにもともと HDAC 1 の発現が高い細胞株を選定し、それら細胞株を用いて HDAC 阻害剤である Trichostatin A を低濃度で投与し、放射線照射を行った場合の細胞生存率を測定する。同様の細胞株で interfering RNA を用いて HDAC 1 の発現を抑制し放射線照射を行った場合の細胞生存率も測定する。

4. 研究成果

①膵癌細胞株の HDAC 1 の発現と放射線照射の 50% 阻害容量の確認とそれらの相関関係についての検討

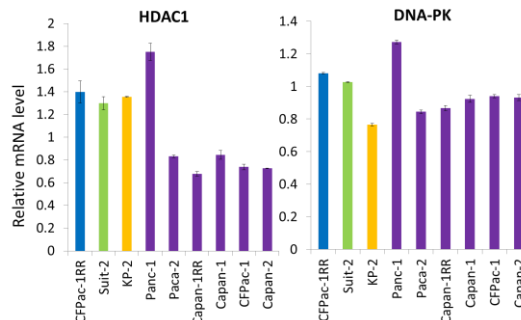
各種の膵癌細胞株について放射線照射による DNA 障害の Double Starand Break の修復に必要な HDAC 1 並びに通常 DNA 修復の際に必要なタンパクである DNAPK についても mRNA レベルで発現量の確認を行ったところ KP2 や SUIT 2 などの細胞株で HDAC 1 の発現が高く、CFPAC 1 や Capan 1 などでは低いことが確認できた。また、DNAPK に関してはそれぞれの細胞株で発現量に大きな差は認められなかった。

そこで、CFPAC 1 や Capan 1 の細胞株に対して 1 週間に 1 回程度で定期的に放射線を照射することで放射線耐性の細胞を作製し、CFPAC 1 RR と Capan 1 RR とした。

放射線耐性の CFPAC 1 RR では HDAC 1 の発現の増加が認められたが、Capan 1

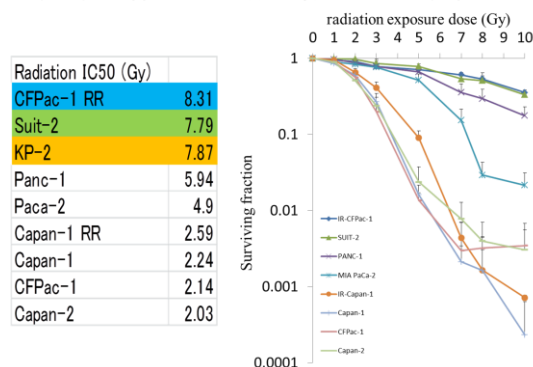
RR では変化は認められなかった。また、DNAPK に関しては、放射線耐性の細胞でも軽度の変化しか認められなかった。

膵癌細胞株におけるHDAC1とDNA-PKのmRNA発現



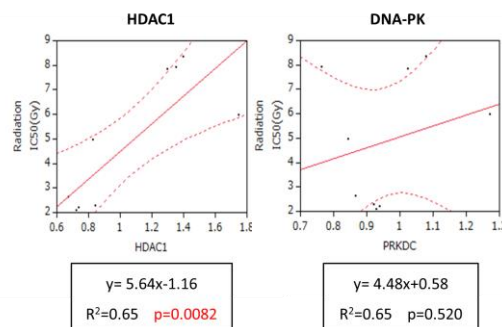
さらに、各種細胞株の放射線照射後の 50% 阻害容量 (放射線照射後の細胞の生存率) を確認したところ KP2 や SUIT 2、さらに放射線耐性の CFPAC 1 RR でも高い値が確認できた。Capan 1 RR では HDAC 1 の発現同様に低い値のみであった。

膵癌細胞株における放射線の50%阻害容量



これら二つの結果から HDAC 1 または DNAPK と放射線による 50% 阻害容量の相関関係を確認したところ、HDAC 1 においてのみ相関関係が認められた。

HDAC1並びにDNA-PKのmRNAと放射線50%阻害容量の関係



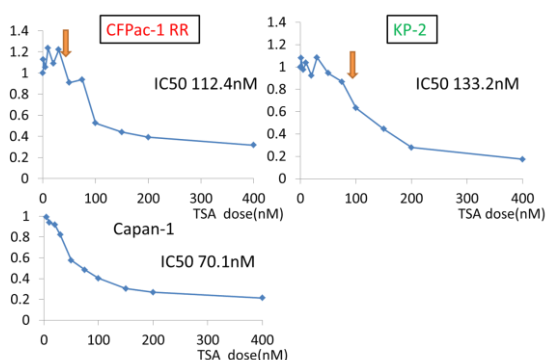
以上の結果から HDAC 1 が放射線照射に

伴う DNA 障害の修復に大きく関与するつまり HDAC 1 の発現が高い場合その修復が効率的に行われる可能性が示唆された。

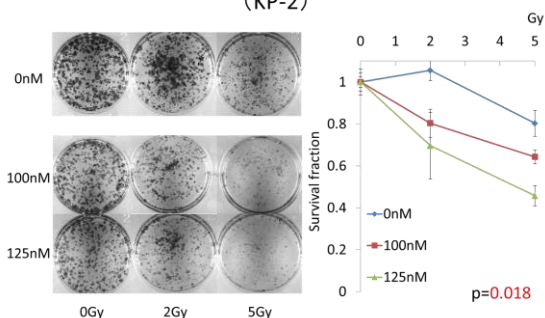
②HDAC 1 の阻害または抑制を行い、放射線照射による膵癌細胞の放射線耐性の改善の検討

まず、HDAC の阻害剤として Trichostatin A (TSA) を選択した。TSA はそれ自体に細胞毒性があるため TSA の 50%阻害容量を検討した上で実験を開始した。放射線照射前に TSA を添加しその後放射線照射を行い 7 日後に膵癌細胞の生存率を確認した。この実験では、もとより HDAC 1 の発現が高い KP 2 と放射線耐性の CFPAC 1 RR を用いて行った。

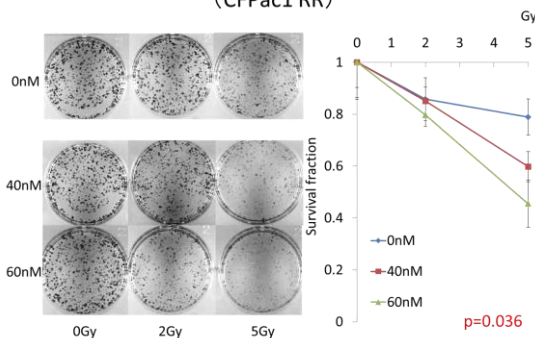
膵癌細胞株におけるTSA 50%阻害濃度を測定



HDAC阻害剤投与下に放射線照射 (KP-2)



HDAC阻害剤投与下に放射線照射 (CFPac1 RR)

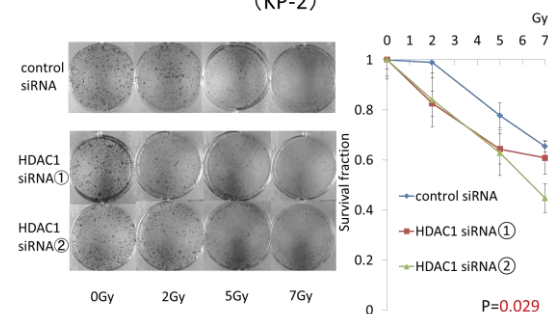


TSA を添加することで放射線照射の容量

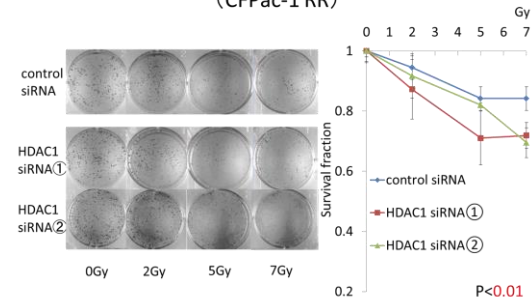
が増すとその抵抗性の改善が強く認められた。

同様に HDAC 1 の抑制のために short interfering RNA を放射線照射前に膵癌細胞株に導入しその後照射後 7 日目の生存率を確認した。細胞株は TSA の実験と同様に KP 2 と CFPAC 1 RR を用いた。

HDAC1 siRNA導入後に放射線照射 (KP-2)



HDAC1 siRNA導入後に放射線照射 (CFPac-1 RR)



以上から HDAC 1 阻害剤である TSA を添加することで細胞の生存率が低下し、放射線抵抗性が改善されたことが確認できた。また、siRNA を用いた実験でも同様に放射線抵抗性の改善を認めた。今後 HDAC 1 を治療ターゲットとすることで放射線治療の成績改善が期待できる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 2013年4月 日本外科学会総会
膵癌細胞株における Histon deacetylase 1 の放射線耐性に関する評価
田中友晴、小藪真吾、大内田研宙、水元一博、田中雅夫
九州大学 臨床・腫瘍外科
- ② 2013年 American Pancreatic Association
Histon deacetylase 1 is responsible

for radioresistance of pancreatic cancer cells.

Tomoharu Tanaka, Shingo Kozono, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto and Masao Tanaka

Department of Surgery and Oncology,
Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼丸 学 (ONIMARU Manabu)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80529876

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし