

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670566

研究課題名(和文) エピジェネティック制御によって難治性がんの重粒子線感受性を増強させる

研究課題名(英文) Epigenetic Modifier as a Potential Radiosensitizer for Heavy-ion Therapy on Malignancy

研究代表者

斎藤 克代 (SAITO, KATSUYO)

高崎健康福祉大学・薬学部・助手

研究者番号：90455288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：難治性腫瘍ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC: Histone Deacetylase)が高発現し、ヒストンは低アセチル化状態にある。HDAC阻害剤は、この低アセチル化状態を是正することにより抗腫瘍効果を示す。そこで本研究では、難治性がんに対するより効果的な治療法を開発するため、悪性黒色腫細胞を用いてHDAC阻害剤と重粒子線の併用効果を検討した。その結果、HDAC阻害剤は重粒子線照射による細胞致死効果を増強することを明らかにした。また、HDAC阻害剤による重粒子線増感のメカニズムは、DNA損傷応答以外の機序であることが示唆された。HDAC阻害剤は臨床応用可能な重粒子線増感剤として有望である。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma is one of the representative types of refractory tumors and the most lethal form of cancer, resisting not only chemotherapy but also radiotherapy. In this study, we examined whether histone deacetylase inhibitors (HDACis) can be used to sensitize malignant melanoma B16F10 cells to carbon ion irradiation. The cells were first treated with HDACis (FK228, trichostatin A, valproic acid and vorinostat) and were then exposed to two types of radiation (carbon ions and gamma-rays). We found that HDACis enhanced the radiation-induced apoptosis and suppression of clonogenicity that was induced by irradiation, having a greater effect with carbon ion irradiation than with gamma-rays. Carbon ion irradiation and the HDACi treatment induced G2/M and G0/G1 arrest, respectively. Based on these findings, we propose that pretreatment with HDACis as radiosensitizers to induce G1 arrest combined with carbon ion irradiation may have clinical efficacy in refractory cancer patients.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：重粒子線 重粒子線治療 エピジェネティック ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 HDAC阻害剤 HDACi 増感 併用効果

1. 研究開始当初の背景

重粒子線は高 LET (Linear Energy Transfer: 線エネルギー付与) で生物学的効果比が大きく、細胞致死効果が高い (*Int J Radiat Biol.* 2009; 85(9): 715-28)。さらに、線量集中性に優れていることから、がん病巣だけをピンポイントで狙って死滅させることができる。そのため「切らずに治す」革新的ながん治療法の一つと言える。しかし、早期がんでは重粒子線単独で高い効果が得られているが、進行がんでは化学療法や免疫療法などとの併用が望ましいとされており、実質的に臨床応用可能な重粒子線増感薬が求められている。

これまでに申請者らは、難治性がんの特徴的なエピジェネティック修飾に焦点を絞り、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) を用いた研究に取り組んできた (Kobayashi et al. *Oncogene* 2006; 25(4): 512-24; Murakami et al. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(6): 1506-16)。また、欧米でも HDACi をがん免疫治療への増感薬として用いる試みがなされている (Murakami et al. Review in "Experimental and Applied Immunotherapy" 2011)。

そこで、それらを発展させ、我々は難治性がんに対する重粒子線感受性を HDACi によって増強させる研究に取り組んでいる。がん重粒子線治療は日本・ドイツ・イタリヤ・中国 (4ヶ国) のみで実施されており、本邦がこの分野を牽引している。申請者らは本邦の優位性を活かし、独立行政法人日本原子力研究開発機構の研究協力を受け、すでに難治性がんに対する重粒子線感受性を増強する薬物候補を見出している。

2. 研究の目的

本研究では、難治性がんの代表である悪性黒色腫 (メラノーマ) の細胞株を用い、①各種 HDACi の重粒子線治療に対する増感効果を明確にするとともに、②重粒子線治療の効果をリアルタイムに可視化する実験的イメージング解析系を開発する。

3. 研究の方法

「2. 研究の目的」において記した「①各種 HDACi の重粒子線治療に対する増感効果を明確にする」について、下記に記す。「②重粒子線治療の効果をリアルタイムに可視化する実験的イメージング解析系の開発」については、研究が遅れている。

3-1. ヒストンのアセチル化の確認

まず、4種類の HDACi (romidepsin [FK228, depsipeptide], trichostatin A [TSA], valproic acid [VPA],

suberanilohydroxamic acid [SAHA, vorinostat]) が、マウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 のヒストンをアセチル化するか確認した。B16F10 を様々な濃度の HDACi 存在下で 16 時間培養した後、細胞を溶解し、9 番目のリジンをアセチル化したヒストン H3 の抗体、18 番目のリジンをアセチル化したヒストン H3 の抗体、コントロールとしてヒストン H3 と GAPDH の抗体を用いて、ウェスタンブロッティングした。

3-2. コロニー形成実験

B16F10 を HDACi 存在下で 16 時間培養し、重粒子線を照射した。照射後すぐにトリプシン処理して適当な細胞数を再播種し、コロニーを形成させた。できたコロニーをカウントし、非照射非投与群が 100% となるように細胞数を補正して生存曲線を作成した。比較のために、ガンマ線でも同様の実験を行った。放射線と HDACi の交互作用 (interaction) を検定するために、重粒子線とガンマ線の実験それぞれにおいて、独立変数を薬の有無と照射した線量、従属変数をコロニー数として二元配置分散分析を行った。薬の有無により有意差があり、放射線と交互作用がない ($p \geq 0.05$) のものを相加的とし、放射線と交互作用があるもの ($p < 0.05$) を相乗的とした。一番高い線量において、その点のみでの生存率も比較した。

重粒子線は、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所イオン照射研究施設の AVF サイクロトロンで加速された炭素イオンを照射した。ガンマ線は、同研究所食品棟で ^{60}Co ガンマ線を照射した。

3-3. アポトーシスの解析

HDACi が重粒子線による細胞殺傷力を増強するか調べるために、アポトーシスを解析した。B16F10 を HDACi 存在下で 16 時間培養し、重粒子線を照射した。照射後すぐにトリプシン処理して再播種し、24 時間後にフローサイトメトリーにより細胞と Annexin V および 7AAD (7-Amino-Actinomycin D) との親和性を解析した。比較のために、ガンマ線でも同様の実験を行った。照射した線量は、重粒子線 1.8Gy、ガンマ線 8.1Gy であり、これは実験的に求めた D_{10} である。

3-4. 細胞周期の解析

HDACi の効果の違いの理由を調べるために、細胞周期を解析した。B16F10 を HDACi 存在下で 16 時間培養し、重粒子線を照射した。照射後すぐにトリプシン処理して再播種し、照射 24 時間後まで経時的に細胞を回収した。回収した細胞は固定後、フローサイトメトリーで DNA 量を測定し、細胞周期の判定に用いた。比較のために、ガンマ線でも同様の実験を行った。照射した線量は、重粒子線 1.8Gy、ガンマ線 8.1Gy であり、これは実験的に求めた D_{10} である。

3-5. H2AX のリン酸化の解析

HDACi による重粒子線増感メカニズムを解明するために、DNA 損傷応答のマーカーである H2AX のリン酸化について、ウエスタンブロッティングにより経時的に調べた。

3-6. H2AX のリン酸化のイメージング

H2AX のリン酸化の増減について、 γ H2AX の foci の数が増えているのか、数は変わらずに 1 つ 1 つの foci が大きくなっているのか、蛍光免疫染色によって調べた。

4. 研究成果

4-1. ヒストンのアセチル化の確認

HDACi の投与によって、ヒストンのアセチル化は濃度依存的に増加した (図 1)。

以降の実験では、図 1 において真ん中に位置している濃度を用いた。具体的には、FK228 は 20nM、TSA は 10nM、VPA は 400 μ M、SAHA は 4 μ M である。これらは、事前に実験的に求めた HDACi 単独でコロニー形成率を 10% 減少させる濃度である。

4-2. コロニー形成実験

FK228 の事前処理は、重粒子線との併用において、コロニー形成能の抑制を相加的に促進した (図 2 b)。SAHA の事前処理は、炭素線との併用において相乗的にコロニー形成能の抑制を促進し、ガンマ線との併用において相加的に促進した (図 2 c)。どちらの HDACi も統計的には、ガンマ線より炭素線との併用による抑制効果のほうが高かった。

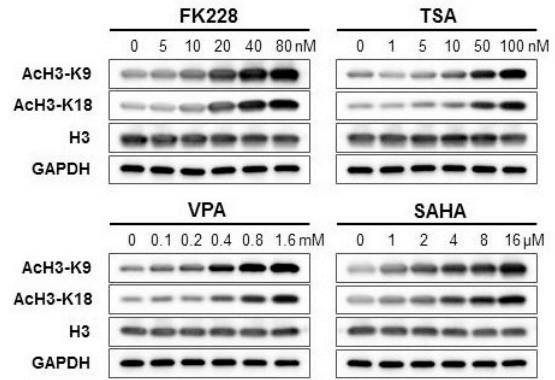


図 1. ヒストンのアセチル化の確認

また、どちらの線種でも、FK228 より SAHA の事前処理のほうがコロニー形成能の抑制を強く促進した。1 点のみに注目した比較でも同様の傾向は確認できたが、統計的に有意とまではいかなかった (図 2 d, e)。

4-3. アポトーシスの解析

4 種類の HDACi は、重粒子線誘発アポトーシスを促進した (図 3 b)。本実験で用いた濃度では、ガンマ線との併用においては、FK228 と SAHA は増感効果があったが、TSA と VPA の投与では増感効果は認められなかった (図 3 c)。

後期アポトーシスでは、HDACi の併用効果を観察できなかった (data not shown)。

4-4. 細胞周期の解析

照射 3 時間後は、特に SAHA 投与群で G0/G1 期停止が優勢だった (図 4 a)。照射

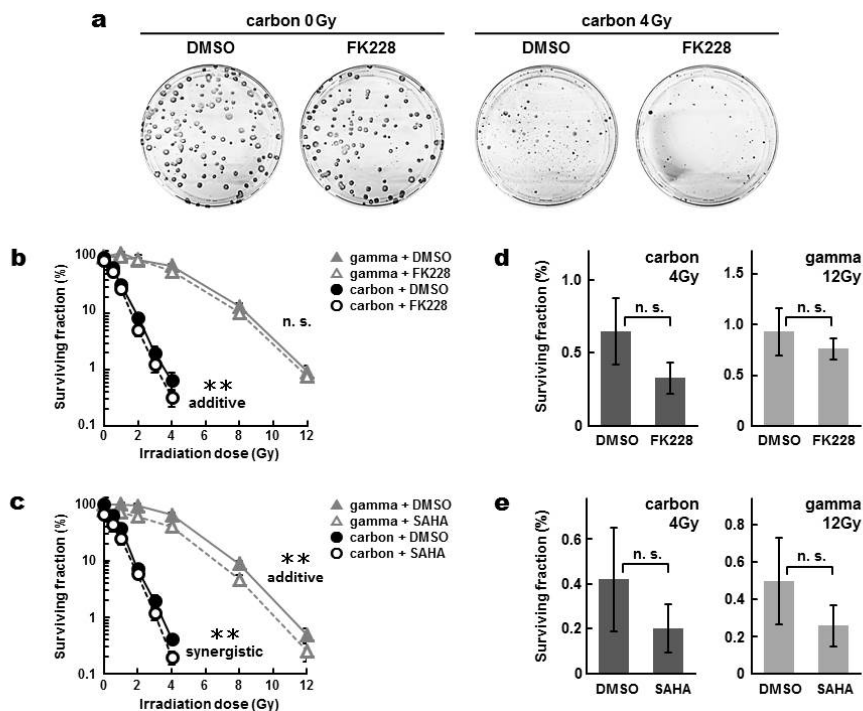


図 2. コロニー形成実験の結果

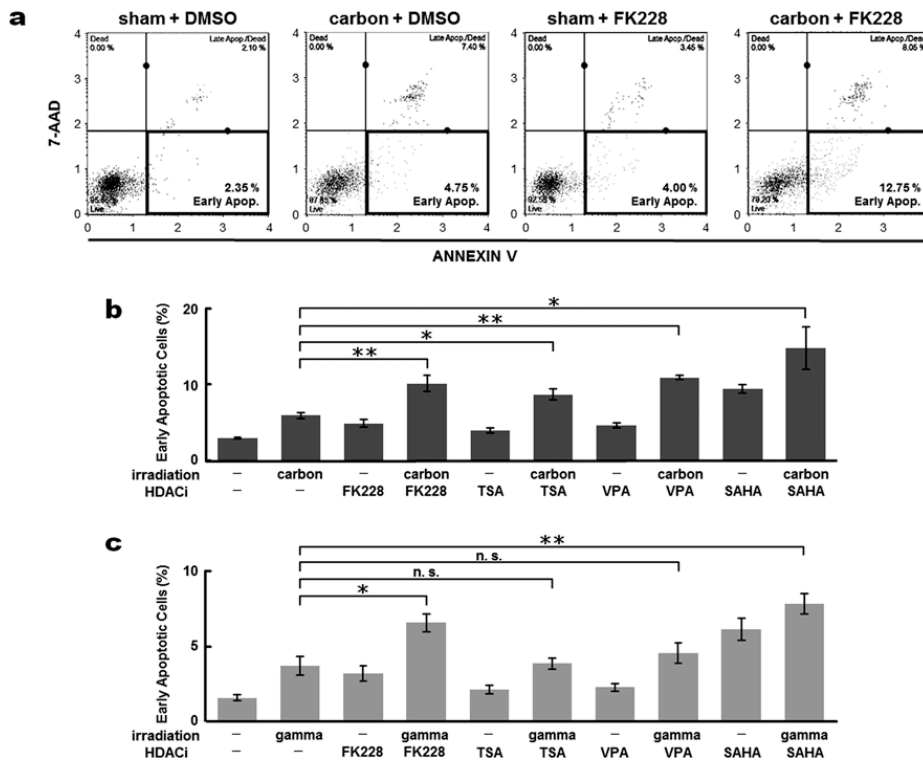


図3. アポトーシスの解析

12 時間後では、重粒子線照射のコントロール群で G2/M 期停止が優勢だった (図 4 b)。照射 3 時間後から 24 時間後までの結果を継続的にまとめたのが図 4 c である。照射後初期には事前の HDACi 処理によって G0/G1 期停止が誘導されており、照射後徐々に重粒子線照射によって G2/M 期が誘導されたことがわかる (図 4 c)。本実験に用いた濃度の HDACi では、照射 3 時間後の時点での G0/G1 期停止は FK228 より SAHA で強く誘導された (図 4 d)。G0/G1 期停止誘導に伴い、相対的に G2/M 期停止は減っていた (図 4 e)。また、どちらの HDACi でも、照射により誘導された G2/M 期停止のピークである照射 12 時間後には、併用により G2/M 停止は減少しており、波形のピークが右にシフトしているように見える (図 4 e)。ガンマ線照射によっても、ほぼ同じパターンを示した (data not shown)。

4-5. H2AX のリン酸化の解析

HDACi は、ガンマ線との併用によって、照射直後の H2AX のリン酸化を増加させた (unpublished data)。

4-6. H2AX のリン酸化のイメージング

HDACi は、ガンマ線との併用によって、照射直後のリン酸化 H2AX の foci を大きくさせた (unpublished data)。

以上より、難治性がんに対する HDACi の重粒子線増感効果を、マウス悪性黒色腫を用いて明らかにした。HDACi は、重粒子線照射によるアポトーシスを促進し、重粒子線誘

発コロニー形成能の抑制を促進した。その効果はガンマ線照射との併用より大きかった。重粒子線は G2/M 期停止を誘導し、HDAC 阻害剤は G0/G1 期停止を誘導した。HDAC 阻害剤により、放射線感受性の高い G1 期停止が誘導された状態で重粒子線が照射されたため、細胞致死効果が増大したと考えられる。

H2AX のリン酸化は、重粒子線との併用よりガンマ線との併用で増加した。その結果、HDACi による重粒子線感受性の増強は、H2AX のリン酸化の増加に起因しないことがわかった。重粒子線のほうがガンマ線より増感効果が高い理由は、DNA 損傷応答以外のメカニズムにあると示唆された。

これらより、HDACi は臨床応用可能な重粒子線増感剤として、有望である。本研究の成果は、重粒子線治療の効果をさらに促進する具体的な薬物を提案できるに留まらず、全身的な免疫賦活化が期待できるため、遠隔転移病巣を含む進行がんの画期的な治療戦略となる。

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 1 件)

- ① Histone Deacetylase Inhibitors Sensitize Murine B16F10 Melanoma Cells to Carbon Ion Irradiation by Inducing G1 Phase Arrest. Saito K, Funayama T, Yokota Y, Murakami T, Kobayashi Y. *Biol. Pharm. Bull.*, 40(6):844-851, 2017. doi: 10.1248/bpb.b16-01025. 査読有

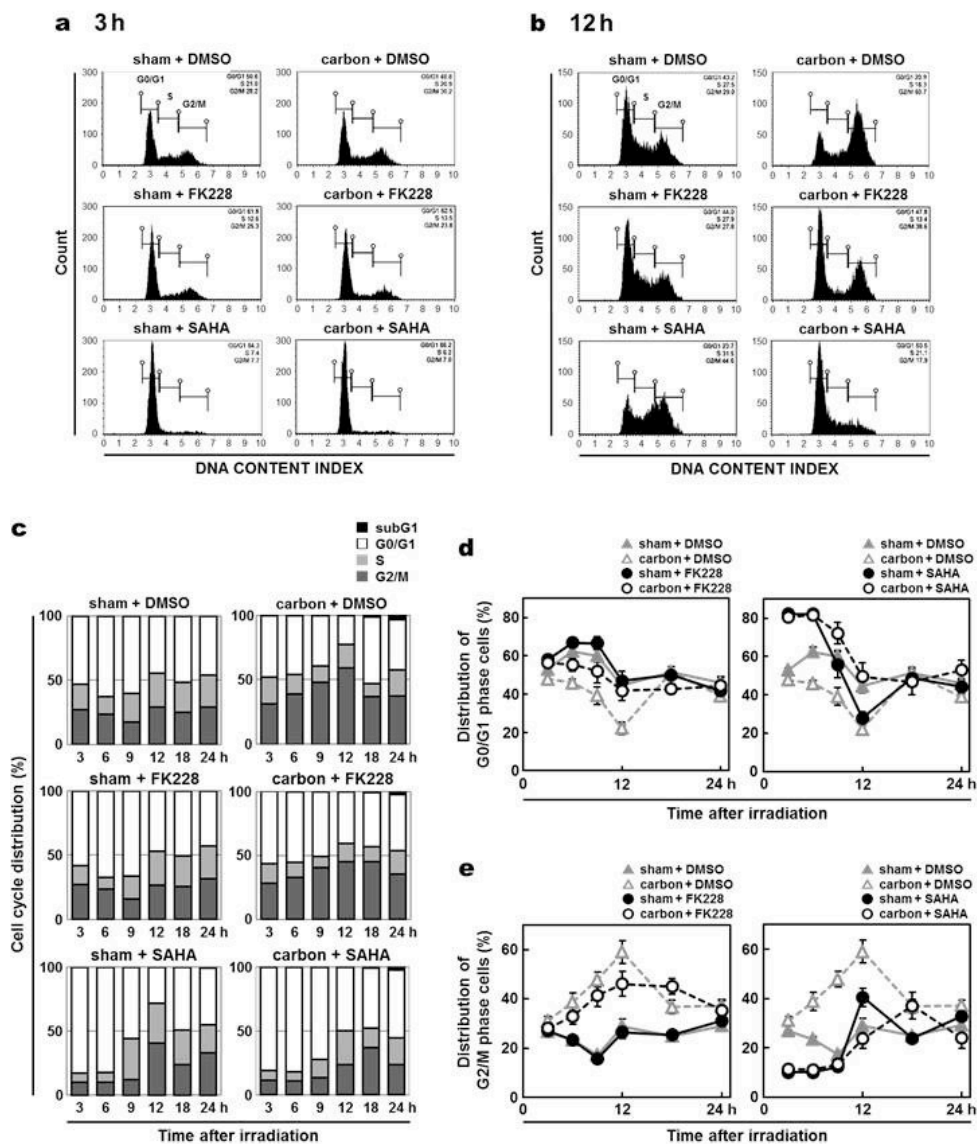


図4. 細胞周期の解析

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による重粒子線感受性の増強は、H2AXのリン酸化の増加に起因しない 齋藤克代、舟山知夫、横田裕一郎、小林泰彦、村上孝 日本薬学会第137年会 宮城 2017年3月
- ② 難治性がんに対するエピジェネティック制御と重粒子線感受性の増強 (IV) 齋藤克代、舟山知夫、横田裕一郎、小林泰彦、村上孝 第1回QST高崎研シンポジウム 群馬 2017年1月
- ③ ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による重粒子線感受性の増強は、H2AXリン酸化の増加に関連しない 齋藤克代、村上孝 第75回日本癌学会学術総会 神奈川 2016年10月
- ④ ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、重粒子線誘発 G2/M 期停止に影響を及ぼす

齋藤克代、舟山知夫、小林泰彦、村上孝 日本薬学会第136年会 神奈川 2016年3月

- ⑤ Histone deacetylase inhibitors potentially sensitize murine B16 melanoma cells to heavy-ion irradiation Katsuyo Saito, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Takashi Murakami 日本放射線腫瘍学会第28回学術大会 群馬 2015年11月
- ⑥ 難治性がんに対するエピジェネティック制御と重粒子線感受性の増強 (III) 齋藤克代、舟山知夫、小林泰彦、村上孝 第10回高崎量子応用シンポジウム 群馬 2015年10月
- ⑦ Epigenetic modifiers as a potential radiosensitizer for heavy-ion therapy on refractory malignancy Katsuyo

Saito, Takashi Murakami 第74回日本癌学会学術総会 愛知 2015年10月

- ⑧ ヒストン脱アセチル化酵素の阻害は、難治性がんの重粒子線感受性を増強させる
齋藤克代 第55回生命科学夏の学校
千葉 2015年8月
- ⑨ Epigenetic modification potentially sensitizes heavy-ion therapy for malignancy
Katsuyo Saito, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Takashi Murakami, 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto 2015/5
- ⑩ エピジェネティック修飾を介した難治性がんに対する重粒子線感受性の増強
齋藤克代、舟山知夫、小林泰彦、村上孝 日本薬学会第135年会 兵庫 2015年3月
- ⑪ 難治性がんに対するエピジェネティック制御と重粒子線感受性の増強(Ⅱ)
齋藤克代、舟山知夫、小林泰彦、村上孝 第9回高崎量子応用研究シンポジウム 群馬 2014年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 克代 (SAITO, Katsuyo)
高崎健康福祉大学・薬学部・助手
研究者番号：90455288

(2) 研究分担者

村上 孝 (MURAKAMI, Takashi)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：00326852

(3) 連携研究者

小林 泰彦 (KOBAYASHI, Yasuhiko)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線生物応用研究部・部長
研究者番号：50354957

(4) 研究協力者

舟山 知夫 (FUNAYAMA, Tomoo)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線生物応用研究部・上席研究員
研究者番号：40354956

横田 裕一郎 (YOKOTA, Yuichiro)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線生物応用研究部・主幹研究員
研究者番号：30391288