

## 研究の分類・属性

基礎系

## 研究の概要

放射線治療では物理的精度の向上により肺がん等において治療成績が向上している。低侵襲性という面からも今後、放射線治療の大きな増加が見込まれる。一方、放射線治療の増感剤としては低酸素増感剤等が検討されているが、臨床に定着した増感剤は皆無である。腫瘍局所での増感が達成できれば、照射線量を減少させ、再発時にも十分再照射ができるなど、局所制御率の向上につながる。グリオブラストーマ等で癌幹細胞が放射線抵抗性を示すことも報告されており、癌幹細胞の放射線感受性を高める増感剤の開発も重要である。放射線の主作用が DNA 鎖切断であることから修復応答を阻害する Chk1 や Hsp90 の阻害剤が臨床試験で検討され始めている。申請者、荻原、岡安らは PARP 阻害剤やポリ (ADP-リボース) を分解する PARG の阻害、二本鎖 DNA 修復阻害剤が放射線に対して増感作用を示すことを見出してきた。荻原、岡安らは二本鎖 DNA 修復阻害剤による放射線増感を報告し、西尾、岡本は各線種の物理学的特性から照射条件の至適化を進めている。小泉はヒト腫瘍細胞株の詳細な性状解析データを集積している。

そこで本研究では、各種放射線の増感効果の検出系を最適化し、増感の標的分子を探索的に検討する(平成 23-24 年度)。新たに同定した増感標的因子、及びこれまでの研究から得た増感標的因子から、臨床応用に展開する増感剤を絞り込む(平成 23-24 年度)。次に in vivo 腫瘍モデルで放射線増感効果を検証し、臨床応用に適した増感剤を見出すこと(平成 24-25 年度)を目的とする。本研究では、放射線生物学、放射線物理学、臨床腫瘍学、放射線医学の各専門家が協力し、腫瘍細胞株の選定、及び物理学的・生物学的特性から in vitro, in vivo の独自の増感検出系を作成し、至適化を行うことに特色がある。本研究により臨床研究に展開できる各線種の放射線治療に有効な増感剤が見出せれば、国内外の放射線治療成績の向上に大きく貢献できると期待される。

動物実験については、各機関の指針を遵守する。遺伝子組換え実験、ヒト腫瘍細胞株の遺伝子解析では、各機関の委員会において承認を得て実施する。疫学研究は疫学研究に関する倫理指針に準拠する。

## 研究経費

8,000 千円

## 研究班の組織

益谷 美都子	国立がん研究センター研究所ゲノム安定性研究分野 分野長	放射線増感剤の探索と作用機序の研究
荻原 秀明	国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野・研究員	DNA切断修復アッセイ系を用いた放射線増感剤の研究
小泉 史明	国立がん研究センター研究所、遺伝医学研究分野 (国立がん研究センター中病院計画治療病棟支援施設)・ユニット長	放射線効果増強剤の探索系の至適化と検証

西尾 禎治 国立がん研究センター東病院 臨床開 陽子線・炭素線に対する増感効果及び機序の解析  
発センター粒子線医学開発部 粒子線  
生物学室 室長

岡本裕之 国立がん研究センター・中央病院放射 X線及びガンマ線の照射条件の物理学的検討  
線治療科・医学物理士

岡安 隆一 放医研・国際オープンラボラトリー・ 重粒子線による放射線増感効果の研究とその作用機構  
Scientific の解明  
Secretary

## 研究の目的と到達目標及び実績要点

### 全期間

(目的と到達目標) :

本研究では、各種放射線の増感検出系を放射線抵抗性を示す癌幹細胞マーカー陽性などを指標に最適化し、標的分子を探索的に検討する。新たに同定した増感標的分子、及びこれまでの研究から得た増感標的分子から、さらに増感剤として適切な標的分子の阻害剤を絞り込む。次に *in vivo* 腫瘍モデルで放射線増感効果を検証し、臨床応用に適した増感剤を見出すことを目的とする。さらに臨床応用のため、放射線増感の効果を規定するバイオマーカーの探索を行う。また放射線生物学的研究と平行して種々の放射線について物理的に生物学的効果を導出する方法を確立し、様々な照射条件下での計算による生物学的効果比を導出し、そのデータを用いて照射における照射条件の最適化を行うことを目的とする。臨床的見地から放射線増感剤候補について高線量1回ないし寡分割照射症例を対象として検討し、臨床治験対象症例の選択基準の確立を目指す。到達目標としては放射線生物学と放射線物理学に基づいた放射線増感の *in vitro* 及び *in vivo* モデルを用いた研究体制を整備し、臨床応用に適した増感剤候補を得、放射線治療の至適化に資する基礎的資料を提供することである。

### 第1年次

(到達目標)

- 1 各種放射線の増感剤候補について作用機序を明らかにし、異なる線質の放射線に対する増感効果を検討する。
- 2 各種放射線の増感効果の検出系を放射線抵抗性を示す癌幹細胞マーカー陽性などを指標に最適化し、増感の標的分子を探索的に検討する。各種細胞株の遺伝子発現量、変異情報の解析及び増感効果との関連の検討(有効性バイオマーカーの探索)を開始する。
- 3 陽子線及び炭素線の高精度でLET計算が可能なモンテカルロシミュレーションコードGEANT4の計算環境の整備を実施する。モンテカルロ法およびマイクロドシメトリ法を用いた生物学的効果の導出法を確立し、細胞に付与される局所のエネルギー密度分布を計算し、実測、あるいは文献値等で比較し妥当性を立証する。ガンマ線照射装置専用のマウスの脳腫瘍モデル頭部照射用遮蔽装置を作成し、腫瘍モデルの放射線増感の条件検討を行う。

(年次評価時点の実績要点)

PARP 阻害剤、PARG 機能阻害、hsp90 阻害剤が低 LET 放射線のガンマ線照射だけでなく、高 LET の炭素線に対しても増感効果を示すことを見出し機序を検討した。NHEJ(非同末端連結修復) 阻害剤が低 LET 放射線のガンマ線照射に対し増感効果を示すことを見出した。肺癌を対象として組織型や遺伝子変異パターンの異なる 12 細胞株を選定し、PARG 機能阻害による放射線増感効果について効果規定因子の検討を行いつつある。<sup>137</sup>Cs のガンマ線照射装置専用のマウス脳腫瘍モデル用の頭部照射用遮蔽装置を作成し、当装置における照射部位での線量分布と遮蔽部位での十分な遮蔽を確認できた。基準細胞として HSG 細胞を用い、細胞実験の生残率の結果を用いて、計算より各種放射線の生物学的効果比を導出する方法を確立した。また、陽子線照射装置での培養フラスコの細胞照射の条件設定を行った。

## 研究成果と考察

### 第1年次評価時点

#### (1) 放射線増感剤候補の作用及び機序と検索

##### PARP 阻害による増感作用

膀胱癌細胞株 MIA PaCa2 を用いて、PARP 阻害剤 AZD2281 処理下、ガンマ線単回照射後、炭素線 (LET13 及び LET70 keV/ $\mu$ m) 単回照射後の生存率をコロニー形成法で測定した。PARP 阻害剤はガンマ線と炭素線の両者に対して増感効果を示し、炭素線の増感の線量依存性はガンマ線と異なった。ガンマ線 5 Gy 単回照射後 PARP 阻害剤存在下で  $\gamma$ -H2AX、p53 ser15 リン酸化レベルの増加などの DDR の亢進と延長を認めた。PARP 阻害剤存在下では照射後局所での DSB のプロセッシング遅滞が生じ、これが細胞死の亢進に寄与することが示唆された。

##### PARG 阻害による増感作用

マウス ES 細胞において、PARG の機能阻害は低 LET であるガンマ線の致死増強作用を示すが、その機構としてアポトーシス誘導の亢進を観察した。高 LET 放射線の炭素線の致死増強作用について検討した。LET13 及び LET70 keV/ $\mu$ m の両者において 2 Gy 以下では増感効果は認められなかったが、5 Gy では認められ、腫瘍領域が照射される LET70 の方が増感効果が高かった。また、PARP-1 の機能阻害よりも増感効果は高かった。LET70 では PARG 機能阻害下で二本鎖 DNA 切断マーカである  $\gamma$ -H2AX シグナルの活性化遅延と poly(ADP-ribose) の蓄積が観察され、二本鎖 DNA 切断修復の遅延が作用機序であることが示唆された。また、放射線治療が適応となる肺癌を対象として組織型や遺伝子変異パターン異なる複数の細胞株 8 株を選定した。肺癌細胞株 PC-14 をはじめ 5 株において増感作用を認めた。PARG ノックダウンは細胞周期への影響を介して放射線増感作用を示すことが示唆された。

##### NHEJ 阻害による増感作用

以前作成したヒト生細胞での NHEJ 活性アッセイ系を最適化し、siRNA でノックダウンすると NHEJ 活性を顕著に抑制する遺伝子を調べた結果、DNA-PKcs と Artemis を見出した。放射線によって生じるような DSB では incompatible な DNA 末端が多くの場合で生じるため、NHEJ 関連タンパク質のうち、end resection に関与する Artemis が重要であることが示唆された。LIG4 及び Artemis の阻害剤は放射線増感剤になり得ると考えられた。また、クロマチン構造を緩ませる働きを持つヒストンアセチル化酵素 (HAT) に着目し CBP, p300 などのヒストンアセチル化酵素 (HAT) が NHEJ に関与することを見出した。そこで、放射線増感効果が強い HAT の阻害剤の探索を検討に着手し、いくつかの HAT 阻害剤が放射線増感作用があることが示唆された。今後はより放射線増感剤として有効な化合物について詳細な検討を進める。

##### Hsp90 阻害による増感作用

以前発表した X 線と併用で使用すると、癌細胞にある程度特異的に放射線増感作用を起こす 17AAG (Hsp90 阻害剤) が重粒子線でも増感を起こすことを、癌細胞株で見出した。X 線の時の作用機構は DNA 二重鎖切断修復の阻害 (特に相同組換え修復 homologous recombination repair: HRR) であったが (Noguchi et al 2006)、重粒子線との併用では二重鎖切断の修復に関連するかは今のところ不明であり、現在さらなる解明を図っている。17AAG と重粒子線照射との併用ではその増感機構が X 線の場合とは異なることが予想され、現在細胞周期 check-point 関連の問題、アポトーシス等、他の原因を追及している。以上の他に、他の Hsp90 の阻害剤についても検討を行う予定である。

今後、これらの作用点の異なる薬剤を併用で用いた場合の増感作用を検討する。

##### shRNA library 等による放射線増感標的のスクリーニング

ノックダウンによりガンマ線の感受性を亢進させる遺伝子の網羅的解析を行うためレンチウイルス shRNA ライブラリーを購入し、癌細胞株における感染効率測定などの予備実験を行った。低放射線感受性を示す癌細胞株を用いるため、各種癌細胞株に対する放射線照射後の生存率をコロニー形成法により測定した。乳がん細胞株 5 種の中では BT20、SKBR3 株について D10 (10% 生存を示す線量) 線量が 6 Gy 以上であった。今後、癌幹細胞マーカーの発現陽性の細胞株を中心に放射線増感の解析に適した細胞株を選択する。

#### (2) 照射条件の物理的検討

##### ガンマ線照射装置の照射条件の物理学的検討

<sup>137</sup>Cs のガンマ線照射装置専用のマウスの脳腫瘍モデル用の頭部照射用遮蔽装置を作成し、当該装置における照射部位での線量分布と遮蔽部位での十分な遮蔽を確認できた。局所照射装置を用いてマウス脳腫瘍移植モデルを対象に 2012 年 1 月より局所照射と放射線増感剤候補の併用実験を開始する予定である。また、基準細胞として HSG 細胞を用い、200 kV X 線、<sup>60</sup>Co ガンマ線、6 MV X 線を照射したときの細胞実験の生残率の結果を用いて、計算より生物学的効果比を導出する方法を確立した。次のアプローチとしては、この方法を用いて、様々な照射条件 (エネルギー、試料のサイズ、照射野サイズ、深さ) における生物学的効果比の変化について評価を行う。

##### 陽子線の照射条件の物理的検討

陽子線の培養フラスコの照射の物理的条件設定を行った。また、癌細胞株 2 種を用いて低 LET 側と高 LET 側の照射後の生存率測定の実験を行った。陽子線について、Beth-Bloch の阻止能計算式による LET 計算を実施した。現在、

実験データを解析中である。また、高精度で LET 計算が可能な GEANT4 の計算環境の整備を実施中である。GEANT4 は膨大な物理反応過程データを統計的手法で計算する手法であるため、高速計算可能な並列計算機を用いた計算環境を構築中である。並列計算機は Blade Center/IBM を採用し、14CPU/56CORE の環境を準備した。GEANT4 のソースコードは、KEK で開発され、サポートされた最新の計算コードを実装中である。

本年度中の研究目標としては、細胞照射実験結果から増感剤効果を算出し、GEANT4 を用いた LET 計算環境を整備し、その初期計算結果との比較検証の実施を目指している。

## 倫理面への配慮

動物実験については、各研究機関の「動物実験に関する指針」を遵守する。遺伝子組換え実験は、各研究機関の各研究機関の遺伝子組換え実験安全委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施する。

遺伝子組み換え動物の取り扱いは、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守する。各研究機関で樹立したヒト腫瘍細胞株の遺伝子解析では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、各機関の遺伝子解析研究倫理審査委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施する。遡及的研究において過去に治療された患者データを取り扱う場合は「疫学研究に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省告示第1号）」に準拠する。

## 本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

1. Ogiwara, H., Kohno, T. Essential factors for incompatible DNA end joining at chromosomal DNA double strand breaks in vivo. PLoS ONE, 6(12):e28756, 2011.
2. Okayasu, R. Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions—mini-review, Int J. Cancer, 130: 991-1000, 2012.
- 3.
4. Kato, T., Tsuda, A., Uesaka, M., Fujimori, A., Kamada, T., Tsujii, H., Okayasu, R. In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CHI following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs, Radiat. Oncol. 6(1): 116, 2011.
5. Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K, Masutani, M. Radiosensitization effect of PARP inhibitor in cells exposed to low and high LET radiation. Cancer Sci., 103(6):1045-50, 2012.

(学会発表)

1. Shirai H., Hirai T., Sasai K., Okayasu R., Masutani, M. *Parg* deficiency sensitizes to radiation of low-high LET with enhanced apoptosis induction in mouse ES cells, 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011 年 10 月)
2. Hirai T., Shirai H., Okayasu R., Sasai K., Masutani, M. Radiosensitization effect of PARP inhibitor in cells exposed to low and high LET radiation. ASTRO' s 53<sup>rd</sup> Annual Meeting in Miami, Florida (2011, 10 月)
3. Oike, T., Ogiwara, H., Nakano T., Yokota, J., Kohno, T. Radio-sensitization of human lung cancer cells using histone acetyltransferase (HAT) inhibitors. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋(2011 年 10 月)
4. Oike, T., Ogiwara, H., Nakano T., Yokota, J., Kohno, T. Garcinol, a Histone Acetyltransferase Inhibitor, Radiosensitizes Cancer Cells by Inhibiting Non-homologous End Joining. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜(2011 年 12 月)
5. 西尾禎治、“陽子線の線量測定”、日本放射線腫瘍学会第 2 4 回学術大会、ランチョンセミナー、(2011 年 11 月)
6. 西尾禎治、“国立がん研究センター東病院の陽子線治療施設運用について”、第 2 6 回粒子線がん治療等に関する施設研究会、第 3 5 回普及用小型医療加速器を用いた粒子線がん治療施設普及方策検討会、(2011 年 11 月)
7. 中島 菜花子、岡安 隆一、藤森 亮、その他：重粒子線による DNA 二重鎖切断とその修復の特徴、第 54 回日本放射線影響学会、神戸市 (2011 年 11 月)
8. Okayasu, R., Hirakawa, H., Noguchi, M., Yu, D., Hirayama, R., Fujimori, A. Radiosensitization by inhibition of homologous recombination repair combined with high LET heavy ion irradiation, 14th International Congress of Radiation Research, ワルシャワ(2011 年 8 月)