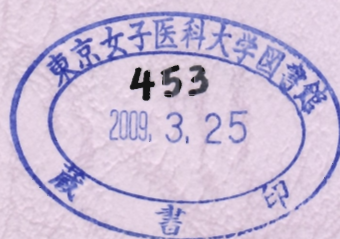


放射線によるDNA損傷修復に関わる分子を標的にした放射線感受性増感の研究

(課題番号：18591376)

平成18年度～平成19年度文部科学研究費補助金（基盤C）研究成果報告書



平成20年5月

研究代表者 秋元哲夫

(東京女子医科大学 准教授)



【目次】

1. 研究発表	1
(1) 口述発表	3
(2) 論文	5
2. 研究成果	9
(1) 研究目的	11
(2) 結果	13
3. 論文	15

研究組織

研究代表者 秋元哲夫（東京女子医科大学 准教授）

研究経費

平成 18 年度： 220 万円

平成 19 年度： 100 万円

計 320 万円

1. 研究発表

口述発表

1. 秋元哲夫 (シンポジウム) 多分割照射の基礎と臨床 —多分割照射の理論と臨床への応用— 第31回頭頸部癌学会(平成19年6月、横浜) 2007.
2. 秋元哲夫、清塚 誠、那須佐知子、茂木 厚、中村香織、橋本弥一郎、前林勝也、橋本恭伸、田邊一成、三橋紀夫 前立腺癌に対する術中計画による高線量率組織内照射の初期経験 泌尿器腫瘍放射線研究会(平成19年11月、京都) 2007.
3. Akimoto T, Katoh H, Shirai K, Harada K, Ebara T, Ito K, Yamamoto T, Suzuki K, Nakano T. HDR brachytherapy combined with hypofractionated EBRT for intermediate-high risk prostate cancer. 42nd Annual Meeting of ASCO. Atlanta USA, 2006.
4. 秋元哲夫 前立腺癌の線量分割 教育講演 日本医学放射線学会総会(平成18年4月、横浜) 2006
5. 秋元哲夫 ホルモン不応前立腺癌に対する放射線治療 総合企画：再燃前立腺癌の治療 日本泌尿器科学会総会(平成18年4月、博多), 2006.
6. 秋元哲夫、加藤弘之、白井克幸、田巻倫明、江原 威、中野隆史 前立腺癌に対する高線量率組織内照射の治療成績と晩期有害事象 第65回日本医学放射線学会学術集会(平成18年4月7~9日、横浜) 2006.
7. 秋元哲夫、野中哲生、中野隆史、古屋信彦、三橋紀夫、玉木義雄、吉積 隆(シンポジウム) 喉頭癌T2および局所進行下咽頭癌に対する放射線治療成績の改善を目指して 第30回日本頭頸部癌学会(平成18年6月14-16日、大阪), 2006.
8. 秋元哲夫 (ワークショップ) 前立腺癌に対する高線量率組織内照射：放射線生物学的な裏付けと臨床データ 日本放射線腫瘍学会小線源治療部会第8回研究会(平成18年6月17、18日、日光), 2006.
9. 秋元哲夫 前立腺癌に対する放射線治療 日本放射線腫瘍学会第8回放射線腫瘍学夏季セミナー(平成18年8月5-6日、熱海), 2006.
10. 秋元哲夫 (ワークショップ) 前立腺癌放射線治療後の晩期障害の検討 第44回日本癌治療学会総会(平成18年10月18-20日、東京), 2006.
11. 秋元哲夫 (教育講演) 前立腺癌に対する小線源治療 日本放射線腫瘍学会第19回学術大会(平成18年11月23~25日、仙台)、2006.
12. 秋元哲夫、加藤弘之、白井克幸、江原威、櫻井英幸、中野隆史 (要望演題) 前立腺癌に対する高線量率組織内照射の治療成績と晩期有害事象 日本放射線腫瘍学会第19回学術大会(平成18年11月23~25日、仙台), 2006.
13. Akimoto T. Hsp90 chaperone complex as a molecular target for potentiation of radiation-induced cell death. 1st Asian Association of Cancer Research. Hiroshima

JAPAN, 2005.

14. Akimoto T. Brachytherapy for prostate cancer. IAEA Workshop on brachytherapy. Maebashi Gunma JAPAN, 2005.
15. Akimoto T. Enhancement of radiosensitivity of hormone-sensitive and hormone-independent prostate cancer cells by Hsp90 inhibitor 7th Hirosaki International Forum .Hirosaki JAPAN, 2005.
16. 秋元哲夫 Hsp90 シャペロンコンプレックスを標的にした温熱・放射線感受性増感 日本ハイパーサーミア学会第 22 回大会 (平成 17 年 9 月 23、24 日、岡山) , 2005.
17. 秋元哲夫、唐澤克之、溝脇尚志、萬 篤憲、青木 学、築山 巖、川島実穂、平塚純一、山下 孝(要望演題): 局所限局前立腺癌に対する放射線治療の最近の動向. 日本放射線腫瘍学会第 18 回学術大会(平成 17 年 11 月 24~26 日、川越), 2005.
18. 秋元哲夫、北本佳住、塩谷真里子、白井克幸、加藤弘之、桜井英幸、中野隆史、山本巧、伊藤一人、鈴木和浩: 前立腺癌に対する外照射併用高線量率組織内照射後の急性尿路反応—geometrical optimization と anatomy based inverse optimization の比較—. 第 7 回日本放射線腫瘍学会小線源治療部会(平成 17 年 6 月 18 日、静岡), 2005.
19. 秋元哲夫、北本佳住、加藤弘之、野中哲生、江原 威、桜井英幸、塩谷真里子、白井克幸、中野隆史(要望演題): 喉頭癌 T2N0 症例に対する放射線治療単独療法と同時化学放射線療法の比較. 日本放射線腫瘍学会第 18 回学術大会(平成 17 年 11 月 24~26 日、川越), 2005.
20. 秋元哲夫 (研究助成): 放射線による DNA 障害の修復過程に与える温熱の影響に関する基礎的研究. 日本ハイパーサーミア学会第 22 回大会 (平成 17 年 9 月 23、24 日、岡山) , 2005.

発表論文

1. Nakamura K, Mizowaki T, Imada H, Karasawa K, Uno T, Onishi H, Nihei K, Sasaki S, Ogura M, Akimoto T. External-beam radiotherapy for localized or locally advanced prostate cancer in Japan: a multi-institutional outcome analysis. *Jpn J Clin Oncol.* 38(3): 200-4. 2008
2. Isomura M, Oya N, Nishimura Y, Akimoto T et al. IL12RB2 gene and ABCA1 gene are associated with susceptibility to radiation dermatitis *Clin Cancer Res* in press
3. Yamamoto T, Ito K, Miyakubo M, Takechi H, Suzuki K, Akimoto T, Ishikawa H, Nakano T. Nomogram Ranking as New Objective Evaluation Method in Various Treatment Strategies for Patients with Prostate Cancer with Various Clinicopathologic Backgrounds. *Urology.* 2008 in press
4. Ebara T, Akimoto T, Kato H, Noda S, Tamaki T, Harada K, Shirai K, Kawamura H, Sakurai H, Nakano T. Late rectal bleeding and genitourinary morbidity after high dose rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy for localized prostate cancer. *Jpn J Ther Radiol Oncol* 19: 93-97, 2007.
5. 秋元哲夫. 多分割照射法の放射線生物学的な基礎. *頭頸部癌* 33(3): 276-279, 2007.
6. 羽生裕二、黒岡将彦、那須佐知子、秋元哲夫、三橋紀夫. IMRT の治療計画から治療開始までの手順ならびに問題点. *頭頸部癌* 33(3): 322-326, 2007.
7. 羽生裕二、秋元哲夫、黒岡将彦、那須佐知子、福岡美代子、三橋紀夫：前立腺 IMRT の治療計画の手順 *日本放射線技術学会雑誌* 63(11): 1303-1309, 2007.
8. 秋元哲夫 放射線治療における内分泌療法の併用の意義 *前立腺癌 —基礎・臨床研究のアップデート— 日本臨床* 65(10): 391-396, 2007.
9. 秋元哲夫 放射線治療に伴う晩期有害事象：前立腺がん *癌の臨床* 53(5): 323-330, 2007.
10. Akimoto T, Nonaka T, Kitamoto Y, Ishikawa H, Ninomiya H, Chikamatsu K, Furuya N, Hayakawa K, Mitsuhashi N, Nakano T. Radiation therapy for T2N0 laryngeal cancer: A retrospective analysis for the impact of concurrent chemotherapy on local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15; 64(4): 995-1001, 2006.

11. Akimoto T, Katoh H, Kitamoto Y, Tamaki T, Harada K, Shirai K, Nakano T. Rectal bleeding after high-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external-beam radiotherapy for localized prostate cancer: impact of rectal dose in high-dose-rate brachytherapy on occurrence of grade 2 or worse rectal bleeding. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* ;65(2): 364-70, 2006.
12. Akimoto T, Katoh H, Kitamoto Y, Shirai K, Shioya M, Nakano T. Anatomy-based inverse optimization in high-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy for localized prostate cancer: Comparison of incidence of acute genitourinary toxicity between anatomy-based inverse optimization and geometric optimization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1; 64(5): 1360-6, 2006.
13. 桜井英幸、鈴木義行、野中哲生、塩谷真里子、清原浩樹、加藤弘之、秋元哲夫、中野隆史
子宮頸癌の臨床における FDG-PET の有効性とその限界 日本婦人科腫瘍学会雑誌
24(1): 35-40, 2006.
14. 秋元哲夫 河村英将 前立腺癌を中心とした前立腺がん治療の変遷とその展望 インナ
ービジョン 10月号 3-7, 2006.
15. 秋元哲夫 高線量率組織内照射の適応と役割 臨床放射線別冊 155-162, 2006.
16. 秋元哲夫 放射線治療における内分泌療法の併用の意義と考え方 臨床放射線別冊
218-225, 2006.
17. 秋元哲夫 外部照射併用高線量率組織内照射による急性・晩期有害事象とQOL 臨床放
射線別冊 288-296, 2006.
18. 秋元哲夫、三橋紀夫 22. 膀胱 p382-392 放射線治療マニュアル 改訂第2版 平岡
真寛、笹井啓資、井上俊彦 編 中外医学社 2006
19. Kitamoto Y, Akimoto T, Ishikawa H, Nonaka T, Katoh H, Nakano T, Ninomiya H,
Chikamatsu K, Furuya N. Acute toxicity and preliminary clinical outcomes of
concurrent radiation therapy and weekly docetaxel and daily cisplatin for head
and neck cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 35(11): 639-44, 2005.
20. Sakurai H, Kitamoto Y, Saitoh J, Nonaka T, Ishikawa H, Kiyohara H, Shioya M,
Fukushima M, Akimoto T, Hasegawa M, Nakano T. Attenuation of chronic
thermotolerance by KNK437, a benzylidene lactam compound, enhances thermal
radiosensitization in mild temperature hyperthermia combined with low
dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol.* 81(9):711-8, 2005.

21. Akimoto T, Katoh H, Noda SE, Ito K, Yamamoto T, Kashiwagi B, Nakano T. Acute genitourinary toxicity after high dose rate (HDR) brachytherapy combined with hypofractionated external-beam radiation therapy for localized prostate cancer: Second analysis to determine the correlation between the urethral dose in HDR brachytherapy and the severity of acute genitourinary toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1; 63(2): 472-8, 2005.
22. Akimoto T, Ito K, Saitoh J, Noda SE, Harashima K, Sakurai H, Nakayama Y, Yamamoto T, Suzuki K, Nakano T, Niibe H. Acute genitourinary toxicity after high-dose-rate (HDR) brachytherapy combined with hypofractionated external-beam radiation therapy for localized prostate cancer: correlation between the urethral dose in HDR brachytherapy and the severity of acute genitourinary toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1; 63(2): 463-71, 2005.
23. Harashima K, Akimoto T, Nonaka T, Tsuzuki K, Mitsuhashi N, Nakano T. Heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone complex inhibitor, radicicol, potentiated radiation-induced cell killing in a hormone-sensitive prostate cancer cell line through degradation of the androgen receptor. *Int J Radiat Biol.* 81(1): 63-76, 2005.

2. 研究成果

【研究目的】

近年のゲノム解析の急速な進展により遺伝子配列の全容およびその機能が解明されつつある。加えてマイクロアレイなどを用いた基礎的・臨床的な癌の遺伝子発現解析により、様々な癌や腫瘍において遺伝子発現の特徴が解明されつつある。これにより、転移、浸潤などの癌の悪性度や抗癌剤・放射線応答に関連する分子や遺伝子候補に関する重要な情報が得られている。しかし、遺伝子配列やゲノム構造だけでは、個々の遺伝子や分子の実際の機能は理解されたとは必ずしも言えない。抗癌剤や放射線治療などの臨床における癌治療にこれらの生命科学でもたらされる成果が応用されるには、抗癌剤や放射線に対する癌細胞の応答これらの遺伝子や分子がどのように関与しているかについて明らかにする機能解析が必要である。

放射線治療は手術や抗癌剤と共に癌治療の重要な柱であるが、手術や抗癌剤に比較し低侵襲であるため合併症のある症例にも幅広く行われている。さらに近年の治療機器や技術の進歩で従来よりも高い線量を正確に腫瘍に照射することが可能となっけていきている。そのため、今後の高齢化社会における癌治療として益々その重要性は高まることが予想される。しかし、放射線治療に抵抗性を示す腫瘍は少なく、線量増加だけでは対処が難しい場合もある。これを克服する方法として、放射線治療の効果を効率的に増強する薬剤（抗癌剤や分子標的薬剤などの新規化学療法剤）の併用が考えられ、実際に抗癌剤を放射線治療に併用する化学放射線療法が肺癌や頭頸部癌で行われ治療成績の改善が報告されている。しかし、効果に比較して全身的な強い副作用が出現する場合も少なくない。そのため、腫瘍に応じた薬剤選択や至適な併用方法を開発することは重要であるが、そのためには放射線感受性に関与する遺伝子・分子またその修飾に関わるエピジェネティックな因子の解析が必要である。しかし、抗癌剤の感受性や薬理作用の研究に比較して放射線感受性に関与するこれらの解析は遅れをとっているのが現状である。

我々はこれまで放射線感受性やその応答に関わる分子・遺伝子の特異的に阻害し、放射線感受性を効率的に増感する分子の基礎的な研究を行ってきた。その中で、上皮増殖因子受容体 (EGFR) とそのシグナル伝達の活性化が放射線抵抗性の一因であり、その阻害で放射線増感作用が得られることなどを報告してきた。また、そのシグナル伝達の中心分子である Raf-1 や Akt の機能維持や活性化に熱ショック蛋白 90 (Hsp90) とこれらの分子との結合が重要な役割を果たしていることに注目し、Hsp90 とこれらの分子 (client protein) との結合を阻害する薬剤と放射線

の併用効果について研究を行った。その結果、Akt や Raf-1 の活性化阻害を介して放射線および温熱感受性が増感することを確認し報告してきた。また、前立腺癌細胞でもアンドロゲン受容体の活性化制御機構に Hsp90 が重要な役割を果たしているが、Hsp90 阻害剤によるアンドロゲン受容体の発現抑制とその下流のシグナル伝達阻害により放射線感受性が相乗的に増感する結果を得ている。前立腺癌の中にも内分泌療法不応性または放射線抵抗性の腫瘍があることから重要な知見と考えている。臨床応用の観点では、EGFR の特異的な阻害剤である ZD1839 やその特異抗体の C225 および Hsp90 阻害剤の 17AAG がすでに臨床試験で使用され、その至適投与法や副作用、また効果なども明らかとなってきた。しかし、放射線との併用効果については限られたデータのみで、基礎的にも放射線に対する細胞応答や細胞死に関与する遺伝子や分子とそのネットワークの解明は未だ十分でなく、今後の更なる進展が必要な段階である。

放射線に対する細胞応答の最初の一步は放射線による DNA 損傷である。これは放射線生物研究の初期から明らかとなっている事実であり、癌抑制遺伝子 p53 の活性化も DNA 損傷が引き金となっており、その修復過程やアポトーシス誘導に細胞周期進行調節などを介して関与している。最近の研究の進展で放射線による DNA 二重鎖切断とその修復過程にヒストンのメンバーである H2AX が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。照射により ATM を介して H2AX がリン酸化され DNA 損傷部位にフォーカスを形成するが、これが DNA 損傷修復酵素の recruit に必要であることも報告されている。しかし、癌細胞の放射線感受性と H2AX フォーカス形成との関連や他の修復酵素の関与、また上記のような分子標的に基づく放射線感受性増感が H2AX のリン酸化やフォーカス形成にどのように影響しているかについては十分に検討されていない。DNA 損傷とその修復過程の研究はこれまでは生化学的な手法が主で、決して容易なものではなかった。しかし、H2AX や Nbs1 のフォーカス形成に代表される分子の可視化は DNA 損傷修復過程とそのネットワークの解明を分かりやすく、さらに飛躍的に進歩させる原動力となりうる。

本研究の主題は“放射線による DNA 損傷修復機構に関わる分子・シグナル伝達を標的とした放射線感受性増感の研究”である。上記のように放射線に対する細胞応答には p53 癌抑制遺伝子などの遺伝子発現、増殖因子受容体とそのシグナル伝達経路の活性化、ヒストンのアセチル化やリン酸化などのエピジェネティックな因子や細胞の低酸素などの癌細胞の微少環境などが複雑に関与している。放射線による

DNA 2重鎖切断を含む DNA 損傷は照射後瞬時に起こるが、時間差はあるものの細胞内で誘導される遺伝子発現や分子・シグナル伝達の活性化、さらに蛋白の翻訳後修飾なども放射線により誘導される。しかし、最終的な細胞死誘導には上記のような因子が直接または間接的に放射線による DNA 損傷やその修復過程に影響していることが予想される。また、前述の増殖因子受容体とそのシグナル伝達経路の活性化阻害や Hsp90 阻害剤による放射線感受性増感には Akt や Raf-1 などの機能や活性化抑制が関与しているが、放射線による細胞死を相乗的に増加させている背景に増殖因子受容体とそのシグナル伝達経路の活性化阻害や Hsp90 阻害が DNA 損傷修復過程に関わる分子のネットワークに直接または間接的に影響していることは容易に推測される。実際に増殖因子受容体とそのシグナル伝達経路の活性化阻害が放射線による DNA 損傷修復を阻害しているとする報告もあるが、このような観点の研究は限られており、十分には解明されていない。

放射線による DNA 損傷修復過程には H2AX 以外に Nbs1 や DNA-PK などの多くの DNA 損傷修復酵素がネットワーク形成して関与している。またこれらの分子のリン酸化を制御して機能変化に関わるキナーゼも関与している。本研究ではこれまでの研究成果を基に、まず癌細胞の放射線感受性と放射線による DNA 損傷修復機構との関連を検討し、さらに増殖因子受容体とそのシグナル伝達経路の活性化阻害や Hsp90 阻害といった分子標的に基づく放射線感受性増感において DNA 損傷修復酵素とそのネットワーク形成にどのように関与しているかを明らかにする予定である。本研究の成果により、近年の新規分子標的薬剤による放射線感受性増感の機序がより明瞭となり、効率的な放射線感受性増感の基礎データとなると考えている。さらに放射線による DNA 損傷修復機構に関わる分子・シグナル伝達で、既述のような他のシグナル伝達や分子とのクロストークに重要な役割を果たしている分子やその機構が明らかになると、DNA 損傷修復過程を標的とした放射線感受性増感の新たな戦略となりうると考えられる。

【研究結果】

DNA の 2 重鎖切断の修復部位にフォーカスを形成する H2AX の変化について放射線感受性との相関および放射線と温熱併用時について下記の結果を得た。癌細胞の放射線照射後に H2AX のフォーカス形成の変化を蛍光抗体法で定量すると照射後 5～30 分後にピークとなり、その徐々に消失する。その消失速度と放射線感

受性との相関を検討すると、放射線抵抗性の癌細胞ほど H2AX のフォーカス形成が遷延し放射線感受性との相関が認められた。Hsp90 阻害剤の併用で放射線感受性の相乗的な増感が得られる条件では、Hsp90 阻害剤を併用した細胞で H2AX のフォーカス形成の増加と消失の遅延が認められた。これは放射線感受性増感の機序に DNA 損傷とその修復機構の修飾が関与することを示唆している。次に温熱による放射線感受性増感 (Thermal radiosensitization) の機序として温熱による放射線誘発 DNA 損傷の修復阻害や抑制が考えられているが、H2AX を指標としてこのメカニズムを検討した。その結果、温熱単独でも H2AX のフォーカス形成は認められたが、そのピークは 43 度の温熱処理後 6 時間と放射線より late phase であった。放射線に温熱を併用すると H2AX リン酸化は抑制されないが、核内フォーカス形成が放射線単独に比較して有意に減少していた。H2AX フォーカスに colocalize する Nbs1 フォーカス形成も抑制されていた。これらの結果より、温熱による H2AX の DNA2 重鎖切断センサー機能または障害部位への修復酵素のアクセス阻害が関与している可能性が示唆された。H2AX に対する siRNA 導入でフォーカス形成が抑制されることより、この成果を基に今後 H2AX を標的にした放射線増感についてさらに研究を継続・発展する予定である