

DNA二本鎖切断修復アッセイ系を用いた放射線療法・ 化学療法の増感剤の探索

[1] 組織

代表者：荻原 秀明
(国立がん研究センター研究所)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)
研究費：物件費 40 万円,

[2] 研究経過

本研究の目的は、放射線・抗がん剤の増感剤を探索することである。

がん治療において、特に放射線治療は、がん細胞に DNA 損傷を与えることでがん細胞死を誘発する目的で行われてきた。放射線治療においては、放射線照射装置の技術的な発展により腫瘍部位に集中的に照射することが可能になりつつある。しかし、人体に照射できる照射線量には限界量があるため、限界まで照射した場合でも完全に腫瘍を退縮できない場合もある。また、このように放射線は、主に DNA 二本鎖切断 (DSB) を誘発し、その修復には DSB 修復機構である非相同末端結合 (NHEJ) が関与する。即ち、放射線治療において、NHEJ を阻害する化合物を併用すれば、放射線によって生じた DSB の修復を抑制することでがん細胞死を効率的に誘発することが期待できる。このような DSB 修復関連因子の阻害剤は、効率的な治療効果が期待できると共に、照射量、投与量の低量化による副作用の低減化も期待できる。しかし、DSB 修復関連因子の阻害剤はいくつか存在しているものの臨床応用には至っていない。

そこで本研究では、正常細胞の増殖に影響が少なく、かつがん細胞への放射線感受性を増感・増強する化合物を同定し、放射線治療、化学療法の新規増感法の開発を目指す。

放射線による DSB の修復には主に、NHEJ が重要である。即ち、放射線増感剤には NHEJ 促進因子が標的となり得る。そこで、以下の2つの観点から増感剤の探索を行う。

(1) 化合物ライブラリーを用いた放射線増感剤の網羅的探索

(2) NHEJ に関連タンパク質の阻害剤による放射線増感効果の検証

申請者は、これまでにヒト細胞内で NHEJ の活性を簡便に測定できる独自のアッセイ系 (H1299dA3-1 細胞株) を開発してきた (Ogiwara et al., 2011)。そして、このアッセイ系を用いることで、CBP、p300 などの HAT 阻害剤が NHEJ の促進に寄与することを見出した。さらに、HAT 阻害剤の中で Garcinol が NHEJ を効率よく抑制し放射線増感作用を有することを見出した (Oike et al., 2012)。

(1) について申請者が開発した NHEJ アッセイ系を用いて、化合物ライブラリーから NHEJ 活性を抑制する化合物をハイスループットでスクリーニングする。それらの候補化合物の中から正常細胞に影響が少なく、放射線増感作用のある化合物を同定する。

(2) について申請者が今まで見出した新規 NHEJ 促進タンパク質の阻害剤の中で、放射線増感作用のある化合物を同定する。

候補化合物の NHEJ への影響を加齢ゲノム制御プロテオーム寄附研究部門・安井明教授らが開発した DNA 損傷応答可視化システムなどによって、修復タンパク質 KU70/KU80 などの DSB への集積を調べる。また、標的因子が推定できればノックダウンした時の修復活性への影響を調べて、候補化合物の増感作用について分子レベルでの解析を行う。

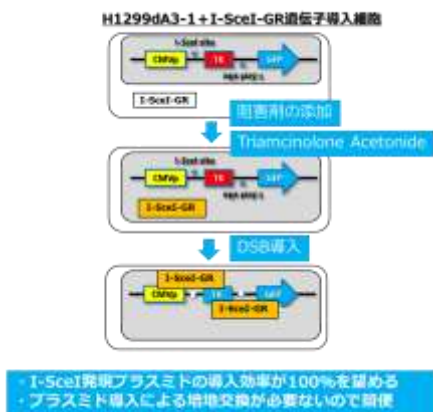
[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、NHEJ アッセイ系を用いて NHEJ 活性を抑制するような化合物の網羅的探索するために最適なアッセイ系の確立を試みた。今までに我々は、ヒト細胞内での NHEJ 活性を測定できる H1299 d A3-1 細胞株を樹立した。しかし、この細胞を用いた NHEJ アッセイは、I-SceI 制限酵素の発現プラスミドをアッセイごとに遺伝子導入する必要があり、実験作業工程が煩雑になるためハイスループットスクリーニングに適さない。

NHEJ阻害剤のスクリーニング系の構築



そこで、Triamcinolone acetonide(TA)添加によってI-SceI 制限酵素を誘導する発現プラスミド (I-SceI-GR) をH1299dA3-1 細胞株に安定的に導入することを検討した。I-SceI-GR プラスミドの導入により薬剤耐性になったクローンを単離し、これらのクローンについて、DSB 修復された細胞を表すGFP 発現陽性細胞の割合をTA 処理前およびTA 処理後の細胞で計測した結果、いずれのクローンにおいてもTA 処理前の状態ですでにGFP 陽性細胞であることが判明した。これは、I-SceI-GR を導入した安定細胞株が樹立される過程でI-SceI-GR がクロマチンと結合できる状況になり、DSB が非制御的に形成されたことが考えられた。

この問題を回避する手段として、細胞集団全体に均一かつ一過性にI-SceI を発現させるためにI-SceI 発現ウイルスベクターの構築を検討している。

第2に、C646 による放射線増刊効果について検討した。申請者らは、いままでにヒストンアセチル化酵素CBP/p300 がNHEJ 修復において促進的な働きがあることを見出した経緯から、ヒストンアセチル化酵素の阻害効果を有する化合物についてDNA 損傷剤への増感効果について調べてきた。その中でp300 の特異的阻害剤として知られているC646 が、肺癌細胞株の放射線感受性を増感する効果があることを見出した。しかし、肺正常型細胞のHFL-III 細胞に対しては増感効果が見られなかった。したがって、C646 は放射線増感剤として有望であることが示唆された。

本共同研究により、昨年度にCBP/p300 に対する阻害作用を持つCurcumin がNHEJ やHR の抑制効果を持つことだけでなく、NHEJ に関与するp300HAT の阻害剤であるC646 が放射線増感作用を有することを見出した。本研究により、副作用の少ない放射線増感剤としての研究への発展が期待される。今後、本研究成果は、*in vivo* での放射線増感

作用などを検討し、放射線増感剤の有用性と臨床応用へ発展させていきたい。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、安井教授との共同研究を通して大阪大学や長崎大学との交流が活性化し、共同研究へと発展した。今後の研究成果へのさらなる発展が期待される。

[4] 成果資料

Oike, T., Komachi, M., Ogiwara, H., Amornwichee, N., Saitoh, Y., Torikai, K., Kubo, N., Nakano, T., and Kohno, T. (2014). C646, a selective small molecule inhibitor of histone acetyltransferase p300, radiosensitizes lung cancer cells by enhancing mitotic catastrophe. *Radiother Oncol* 111, 222-227.