

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591380

研究課題名（和文） 食道癌に対する低用量ドセタキセルと HDAC 阻害薬併用化学放射線療法の基礎的検討

研究課題名（英文） Effect of valproic acid and low dose docetaxel for radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

二宮 致 (NINOMIYA ITASU)

金沢大学・大学病院・准教授

研究者番号：60345618

研究成果の概要（和文）：食道癌細胞の放射線感受性に対する。バルプロ酸と低濃度ドセタキセルの影響とその機序につき検討した。その結果バルプロ酸は、ヒストンのアセチル化によるクロマチンの弛緩と放射線障害により引き起こされる DNA 二重鎖切断を修復する酵素のうち Rad51 の発現を低下させ相同末端結合を阻害するとともに、Ku70 のアセチル化による非相同末端結合を阻害することにより食道癌細胞の放射線感受性を増強した。またドセタキセルは低濃度では G1 期、高濃度では G2M 期で細胞周期を停止させ、放射線感受性を増強した。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the Effect of valproic acid (VPA) and low dose docetaxel (DTX) for radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). VPA induced acetylation of histones H3 and H4 in ESCC cells. VPA inhibited the DNA double strand break repair by decreasing Rad51 expression and Ku70 acetylation. VPA enhances ESCC cells radiosensitivity by chromatin decondensation and down regulation of DNA double strand break repair proteins. Low dose (<1 nM) and high dose (>5 nM) DTX induced G1 and G2-M accumulation in ESCC cell, respectively. Low dose DTX (<1 nM) could yield radiosensitivity with induction of G1 arrest, although low dose DTX has limited cytotoxic effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：食道癌集学的治療における基礎的・臨床的研究

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療学

1. 研究開始当初の背景

食道癌における化学放射線療法は放射線単独療法に比して有意に生存率を向上させる事が証明されており、食道癌の非外科的治療法の標準治療法として位置づけられている。化学放射線療法における化学療法は、抗癌剤

の直接的な抗腫瘍効果とともに放射線の増感作用を示す。使用される抗癌剤の薬剤や投与量は、さまざまな報告がなされており一定していないが、5-FU とシスプラチンによる併用化学療法が最も汎用されている。化学放射線療法における有害事象には、早期有害事

象として悪心・嘔吐、骨髄抑制、食道炎、食道穿孔があり、晩期有害事象として放射線肺臓炎、胸水、心嚢水貯留、食道狭窄などが挙げられる。これらの有害事象は重篤な場合致命的となる危険性も高い。化学放射線療法後の遺残・再発としては食道局所が最も多く、再発巣が小さい場合内視鏡的治療が試みられているが、内視鏡治療不能な場合は救済手術が行われている。根治照射が行われた後の救済手術は極めて危険性が高い事が報告されている。そのため根治的放射線療法を安全に行うためには、有害事象が少なく、局所制御性の高いプロトコルの確立が必要と考えられる。近年癌に対する化学放射線療法における併用抗癌剤としてドセタキセル(DOC)が注目されており、肺癌・頭頸部癌での有効性が証明されている。DOCは比較的低用量で放射線との併用効果を認め、その理由としてアポトーシスを誘導し、微小管阻害効果によって細胞周期を低濃度ではG1期、高濃度ではG2M期で停止させる事により放射線感受性を高めることが示唆されている。さらに低濃度のタキサン系抗癌剤では線維化抑制効果が期待できる。

我々は、1998年より化学放射線療法における副作用低減のために低用量のシスプラチン5mg/m²と5-FU 250mg/m²を連日使用した化学放射線療法(FP-CRT)を行ってきたが、Grade 3以上の強い骨髄抑制により17%で治療中断を余議なくされた上、Grade 3以上の強い食道炎症状を28%に認めた。そこで有害事象を軽減するために、2005年より低用量のDOC 10mg/m²週1回投与方法(DOC-CRT)に変更した。その結果Grade 3以上の骨髄抑制は5%に減少し、食道炎も14%まで低下した。治療効果としては、原発巣での奏功率は、FP-CRT 93% DOC-CRT 94% CR率はFP-CRT 43% DOC-CRT 65%であり、病巣全体での奏功率は、FP-CRT 86% DOC-CRT 71% CR率はFP-CRT 21% DOC-CRT 35%であった。低用量ドセタキセル併用化学放射線療法は、副作用が少なく、従来の5-FUとシスプラチン併用による化学放射線療法と遜色ない治療効果を示すことを発表した(第46回日本癌治療学会総会)。また最近の治験によりヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬が放射線増感作用を示すことが明らかとなってきた(Tom C. Karagiannis et al: The paradox of histone deacetylase inhibitor-mediated modulation of cellular responses to radiation. Cell cycle 5:288-295, 2006)。HDAC阻害薬はヒストンならびにノンヒストンの脱アセチル化阻害を介してアポトーシスを誘導する。またヒストンの脱アセチル化阻害を介してクロマチンの構造変化をもたらす、放射線感受性を増大させる。放射線によるDNAの二重鎖切断が起こるとDNA損傷感知蛋白53BP1から始まり

ATM/ATRの活性化とp53の誘導が引き起こされ二重鎖切断修復が開始されるが、これらの蛋白はいずれもHDACと結合しp53はHDACにより脱アセチル化されるためにHDAC阻害薬はこれらDNA修復を阻害する。またHDAC阻害薬はDNAの二重鎖切断修復蛋白であるKu70/Ku86やDNA-PKcsの阻害作用を示す。さらにHDAC阻害薬はTGF-β抑制を介して線維化抑制に働くため放射線照射に伴う放射線性皮膚炎や食道炎を減少させる薬剤としても注目されている。そのためHDAC阻害薬は放射線照射の増感作用および副作用減少の二点で有用と考えられる。本研究では、食道癌に対する放射線感受性を増強する薬剤としてHDAC阻害薬であるValproic acid (VPA)に着目した。VPAはすでに抗てんかん薬として臨床で広く使用され安全性が確立している薬剤であり、常用量で得られる1mM程度の血中濃度でHDAC阻害作用を呈することが判明している(Gottlicher M.: Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. Ann Hematol, 83 Suppl1:S91, 2004)。以上より低用量DOC及びVPAが食道癌に対する放射線療法の併用薬剤として有用であると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、食道癌に対する低用量ドセタキセルとVPA併用による放射線の増強効果につきin vitroに検討し、食道癌に対する新しい化学放射線療法の可能性につき基礎的に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

VPA及びDOCの食道癌細胞株に対する増殖抑制実験をMTT法により行い、IC50を算出した。

次に低濃度のVPA・DOCによる食道癌細胞の放射線感受性の増強効果をClonogenic assayにより検討した。

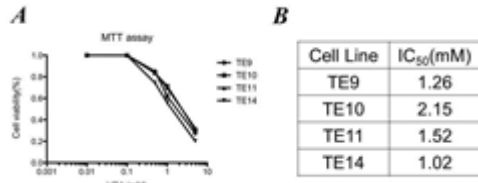
VPAによる放射線増感作用のメカニズムを検索する目的でVPAのHDAC阻害作用としてヒストンのアセチル化作用をWestern blot法により検討した。

Annexin Vの表出をFlow cytometryで観察しアポトーシスの誘導を確認した。放射線照射に伴うDNA二重鎖切断時に発現誘導されるγH2AXの発現性の変化はWestern blotならびに蛍光免疫染色により検討した。さらに細胞周期への影響をFlow cytometryを用いて検討し、DNA二重鎖切断修復酵素の発現性の変化をWestern blot法を用いて検討した。

さらにDNA二重鎖切断修復酵素のうちHDAC阻害薬によりアセチル化をうけることが予測されるKu70に関して免疫沈降法を用いたアセチル化の検討を行った。

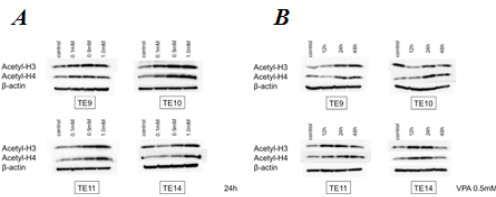
4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株 (TE9, TE10, TE11, TE14) を用いて VPA の抗腫瘍効果を MTT アッセイで検討した. VPA はすべての細胞株において用量依存性に増殖を抑制した. VPA の IC₅₀ は 1.02-2.15 mM であり, これは臨床的に抗てんかん薬として投与された時の安全血中濃度よりも高値であった.

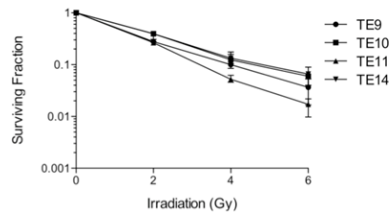


次に, VPA のヒストンアセチル化効果をウェスタンブロッティング法で評価した. VPA は抗てんかん薬として使用した際の臨床的投与量で得られる血中濃度と同等の 0.5 mM の濃度でヒストン H3, H4 のアセチル化を増強した.

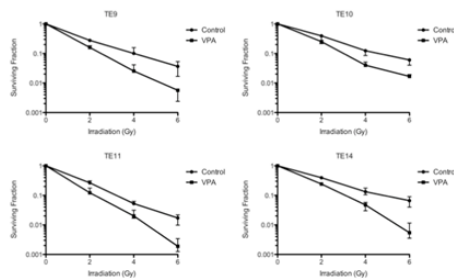
バルプロ酸によるヒストンアセチル化



クロノジェニックアッセイでは 0.5mM の VPA がすべての細胞株の放射線感受性を増強することを確認した.

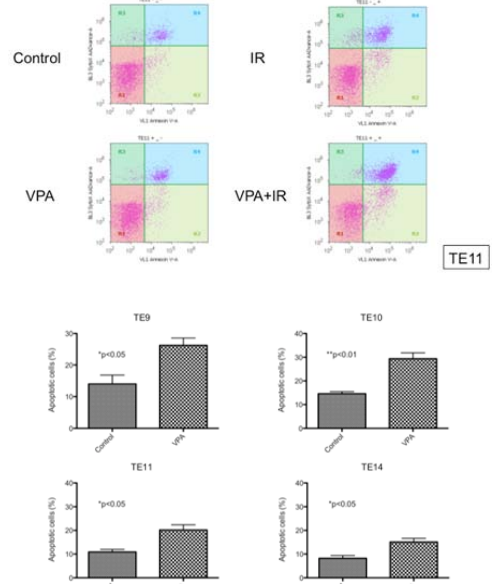


放射線感受性増強効果

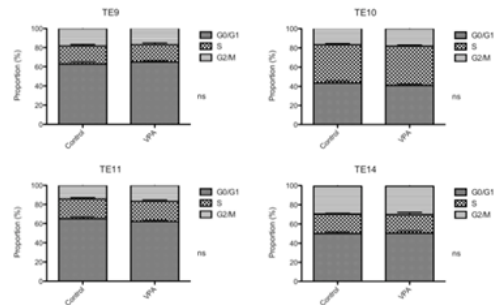


フローサイトメトリーによる検索では VPA が放射線照射後のアポトーシスを増強する事が確認されたが VPA は細胞周期には影響しなかった.

アポトーシスの変化

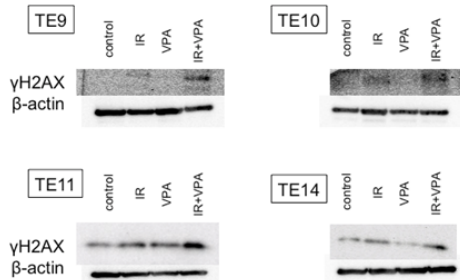


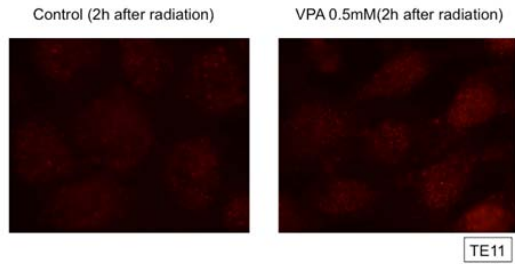
細胞周期の変化



また VPA が放射線照射後 DNA 二重鎖切断に伴い表出する γ H2AX の発現を増加させることが, ウェスタンブロッティング法ならびに蛍光免疫抗体染色法により確認された.

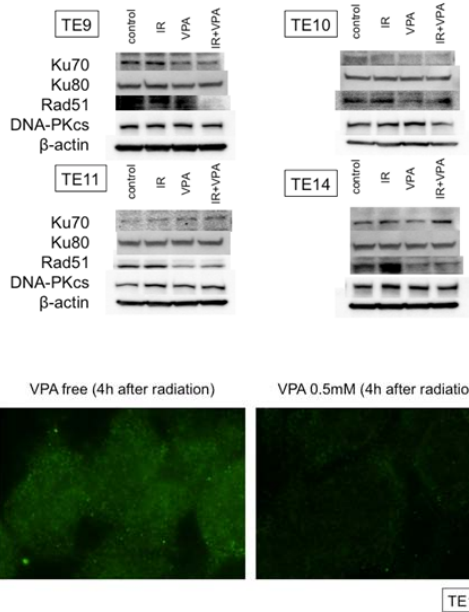
DNA二重鎖切断の変化





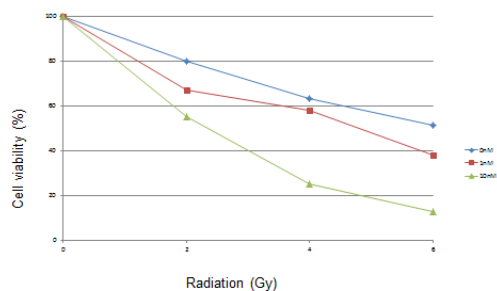
更に DNA 二本鎖切断修復酵素の発現性をウェスタンブロットティング法で検討したところ、VPA は相同組換えに不可欠なタンパク質である Rad51 の発現を低下させた。一方非相同末端結合に関与する Ku70, Ku80, DNA-PKcs の発現性に变化は認められなかった。しかし免疫沈降法を用いた検討では、VPA は非相同末端結合に関与する修復酵素である Ku70 をアセチル化することにより機能阻害することが判明した。

二重鎖切断DNA修復酵素



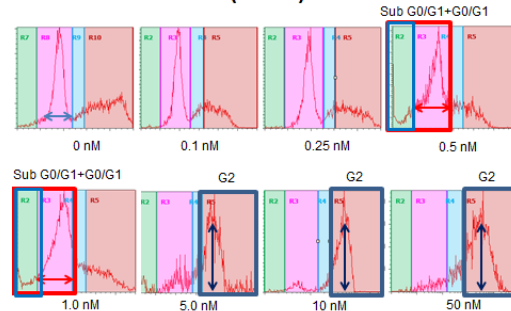
一方 DOC も濃度依存性に食道扁平上皮癌細胞株である KES 細胞の増殖を抑制したが、比較的濃度でも放射線感受性を増強することが判った。

Radiosensitizing effect of DTX on ESCC cell



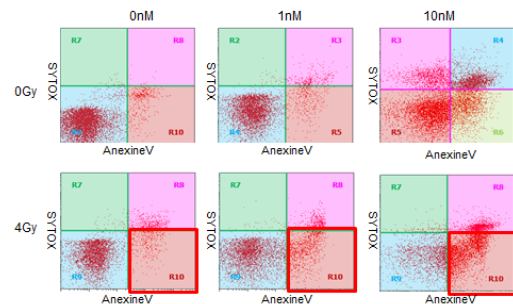
Flow cytometry を用いて DOC の濃度と細胞周期の関係を検討すると DOC は低濃度では細胞周期を G0/G1 期で停止させ、さらに高濃度では G2M 期で停止させることにより放射線感受性を増強させることがわかった。

Effect of DTX concentration on Cell Cycle (12hrs)

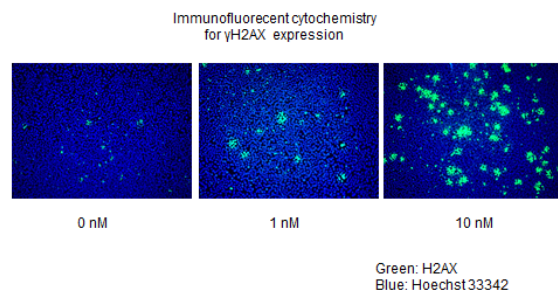


また DOC は低濃度では単独では KES 細胞のアポトーシスを誘導しないが、放射線と併用することによって強いアポトーシスを誘導するとともに、DNA の二重鎖切断を引き起こし γ -H2AX の発現が誘導されることが明らかとなった。

Apoptotic Effect of DTX as radiosensitizer



DTX increases DNA DSBs after irradiation



本研究により臨床的に安全な血中濃度の VPA は放射線感受性を増強することが明らかとなった。VPA の放射線感受性増強には 2 つの作用機序が関与していた。第一の機序はヒストンに対するアセチル化効果であり、ヒストンのアセチル化によりクロマチンの構造が

変化し電離放射線による DNA 障害が増加する。VPA はヒストンのアセチル化作用を介して細胞にとって致命的なダメージである DNA の二重鎖切断を引き起こし、アポトーシスを誘導したと考えられる。第二の機序は DNA 二重鎖切断修復阻害効果である。細胞は、DNA 二重鎖切断をうけると相同組換えや非相同末端結合を介して二重鎖切断修復を行う仕組みを有するが、VPA はそのうちの相同組換えに不可欠なタンパク質である Rad51 の発現を低下させ、非相同末端結合に必要な Ku70 をアセチル化し機能阻害することにより二重鎖切断修復を阻害すると考えられる。さらに DOC は低濃度においても細胞周期を G0G1 期で停止させ放射線感受性を増強させることが明らかとなった。本研究では、VPA と DOC が異なる機序により食道癌の放射線感受性を増強する事が明らかとなり、今後 VPA/DOC の併用療法が食道癌の放射線治療において有用である可能性が示唆された。

今回の研究では *in vitro* の基礎的に DOC VPA それぞれの放射線感受性増強効果とその機序を検討したが、技術的な問題により両薬剤の併用効果は明らかにできなかった。今後は *in vivo* の検討も加えて両薬剤の併用効果を明らかにしたい。

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 Shoji M, Ninomiya I, Fujimura T, (他 11 名, 2 番目・13 番目) Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 査読有, 40(6), 2012, 2140-2146, doi:10.3892/ijo.2012.1416.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ninomiya I, Shoji M, Fujimura T, et al. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *International Symposium on Biochemistry & Biophysics 2012*. 10. 25, Sheraton ottawa hotel (Canada)
- ② 二宮 致、宮永章平、藤村 隆, 他 食道癌細胞に対するドセタキセルの放射線感受性増強効果 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 20 日 Royton sapporo (北海道)

③ 二宮 致、正司正寿、他

バルプロ酸はヒストン脱アセチル化酵素阻害によって、食道癌細胞株の放射線感受性を増強させる, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 11 月 3 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 致 (NINOMIYA ITASU)
金沢大学・大学病院・准教授
研究者番号:60345618

(2) 研究分担者

藤村 隆 (FUJIMURA TAKASHI)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 50262580