

学 位 論 文 題 名

ヌクレオシド系制がん剤による放射線増感効果の  
メカニズムに関する研究

学位論文内容の要旨

がん治療において、放射線による抗腫瘍効果の増強を目的とし、放射線と制がん剤の併用治療が幅広く行われている。現在、臨床の現場ではcisplatinやgemcitabineなどDNA損傷を誘起する薬剤が主に使用されている。放射線もDNA損傷によりその致死効果を発揮することから、この併用治療では相加的な治療効果しか得られない事もある。一方、遺伝子ターゲティングにより放射線抵抗性となるタンパク質を抑制することで放射線の効果を増強させる試みも行われている。このアプローチ法では実験レベルでは相乗的な効果が誘導できるものの、実際の臨床への応用には至っていない。そこで、当放射線学教室ではRNA合成阻害作用を持つ制がん剤を用いて、放射線抵抗性の原因となるタンパク質の発現を抑制し放射線増感効果を誘導し、臨床応用につなげる試みを行っている。これまでの研究の結果から、RNA合成阻害作用を持つ1-[3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl]cytosine (ECyd)が放射線抵抗性因子の発現抑制という点で有用であることが示唆されているものの、その作用機序については未だ不明な点も多い。そのため臨床応用のために作用点の解明や処理条件など詳細な検討が必要不可欠である。そこで本研究では、RNA合成阻害作用を持つヌクレオシド系制がん剤である8-aminoadenosine (8-NH<sub>2</sub>-Ado)および 前述のECydの2つの薬剤について、その放射線増感効果およびその誘導メカニズムについて検討した。

第一章では、8-NH<sub>2</sub>-Adoについて研究を行った。放射線照射直前に8-NH<sub>2</sub>-Adoを処理し、照射後に薬剤を効かせる手法でその放射線増感効果について検討したところ、放射線誘発細胞増殖死およびアポトーシスの増強が観察された。そこで、8-NH<sub>2</sub>-Adoによるアポトーシス増強のメカニズムを明らかにするために、抗アポトーシスタンパク質の発現への影響を検討したところ、SurvivinとXIAPの発現抑制が観察された。また、広域Caspase阻害剤ならびにCaspase-3、-8、-9の特異的阻害剤の効果を検討したところ、全ての阻害剤で放射線誘導アポトーシスの減少が見られた。この結果か

ら、8-NH<sub>2</sub>-Adoによる放射線誘発アポトーシスの増強はCaspase依存的であり、その実行経路にはミトコンドリア経路のみならずデスレセプター経路も関与していることを示された。

第二章では、ECydの放射線増感効果について、放射線照射によって生じるDNA二本鎖切断(DSB)の修復能に及ぼす影響に着目して研究を行った。ECydについては、当放射線学教室において、これまで上記の8-NH<sub>2</sub>-Ado同様に照射後に薬剤を長時間処理するという手法でのアポトーシス増強に起因する放射線増感効果を報告してきた。しかしながら、実際の臨床では制がん剤を長時間処理後に放射線の照射が行われる場合が想定される。そこで、ECydを照射前に24時間前処理により放射線増感効果を誘導できるか検討したところ、ECyd前処理においても放射線誘発細胞増殖死の増強効果が観察された。この結果から、照射段階でDSB修復に関与しているタンパク質の発現が阻害され、放射線増感が起きている事が考えられた。そこで、この事を確かめるためにDSB修復能を反映するとされている亜致死損傷修復や $\gamma$ -H2AXのフォーカス形成能を評価したところ、ECyd前処理細胞では、DSB修復の有意な遅延が観察された。また、DSB修復に関わるタンパク質の発現を検討したところ、ECyd処理によってDSB修復経路の一つである相同組換え修復に関わるBRCA2やRad51の強い発現抑制が観察された。そこで、チャイニーズハムスター線維芽細胞であるV79細胞とそれを親株とするBRCA2を欠損したV-C8細胞を用いて、それぞれにおけるECyd前処理による放射線増感効果を比較したところ、V79細胞では放射線増感が観察されたのに対し、V-C8細胞ではECydによる増感効果は観察されなかった。以上の結果からECydは、BRCA2の発現を低下させ、相同組換え修復を阻害することで放射線増感効果を誘導していることが示唆された。

結論として、8-NH<sub>2</sub>-Adoに関して、ECyd同様に照射前処理の検討が今後必要であるが、本研究により得られた知見は8-NH<sub>2</sub>-AdoおよびECydが放射線増感剤として有用である可能性を示している。また、RNA合成阻害作用を介して放射線により誘導される細胞死のシグナル経路の修飾やDNA修復能を照射前に抑制しておくという手法が、新たながん治療のアプローチとして有益であることを示唆している。

# 学位論文審査の要旨

|    |     |    |     |
|----|-----|----|-----|
| 主査 | 教授  | 稲波 | 修   |
| 副査 | 教授  | 木村 | 和弘  |
| 副査 | 教授  | 石塚 | 真由美 |
| 副査 | 准教授 | 山盛 | 徹   |

## 学位論文題名

### ヌクレオシド系制がん剤による放射線増感効果の メカニズムに関する研究

がん治療において、放射線による抗腫瘍効果の増強を目的とし、放射線と制がん剤の併用治療が幅広く行われている。現在、臨床では cisplatin や gemcitabine など DNA 損傷を誘起する薬剤が主に使用されている。放射線も DNA 損傷によりその致死効果を発揮することから、この併用治療では相加的な治療効果しか得られない場合もある。一方、遺伝子ターゲティングにより放射線抵抗性となるタンパク質を抑制することで放射線の効果を増強させる試みも行われている。しかし、このアプローチは実験レベルでは相乗的な効果が誘導できるものの、依然、臨床への応用には至っていない。そこで、近年、DNA 損傷以外の作用機序の制がん剤を用いて放射線増感効果を誘導し、臨床応用につなげる試みが行われてきている。女池氏は本博士論文研究において DNA 損傷以外の作用機序の制がん剤の中で RNA 合成阻害作用を持つ 8-aminoadenosine (8-NH<sub>2</sub>-Ado) と 1-[3-C-ethynyl]-β-D-ribo-pentofuranosyl]cytosine (ECyd) の二つの制がん剤に着目し、放射線増感効果とその機構について検討した。

第一章では 8-NH<sub>2</sub>-Ado の放射線増感について検討を行った。本実験ではヒト肺腺がん由来 A549 細胞に対して放射線照射直前に 8-NH<sub>2</sub>-Ado を処理し、照射後に薬剤の効果を発揮させる投与手順を用いて放射線増感効果を評価した。その結果、8-NH<sub>2</sub>-Ado は A549 細胞に対して放射線照射による増殖死およびアポトーシスに対して強い増強効果があることが見いだされた。更に、女池氏はこのアポトーシス増強作用に Survivin と XIAP などの抗アポトーシスタンパク質の 8-NH<sub>2</sub>-Ado による発現抑制が関与し、各種 Caspase 阻害剤の実験結果から、8-NH<sub>2</sub>-Ado と放射線照射併用で誘導されるアポトーシス増強にはミトコンドリア経路だけでなくデスレセプター経路も関与していることも示した。

第二章では ECyd の放射線増感効果について検討を行った。既に、ECyd は 8-NH<sub>2</sub>-Ado 同様に照射直前に薬剤を投与するという手順でアポトーシス増強に

起因する放射線増感効果を起こすことが他の論文で報告されている。しかしながら、実際の臨床における制がん剤と放射線との併用療法では制がん剤を事前に長時間処理し、放射線照射は分割照射により行われることが多い。女池氏はこの臨床での治療手順を想定し、ECyd を照射の 24 時間前に腫瘍細胞を処理することで放射線増感効果を誘導できるか否かについて検討した。その結果、24 時間前処理でも ECyd は放射線照射による細胞死の増強を起こす事が示された。更に、DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復について評価したところ、ECyd 前処理細胞では、DSB 修復の有意な遅延が起きること、DSB 修復経路の一つである相同組換え修復に関わる BRCA2 や Rad51 の強い発現抑制が起きること、BRCA2 欠損細胞では BRCA2 野生型細胞と比較して ECyd による放射線増感効果が小さいことを示した。以上の結果は ECyd の事前の長時間処理が腫瘍細胞の BRCA2 の発現を低下させ、相同組換え修復を阻害することで放射線増感効果を誘導することを示唆するものである。

本博士論文は 8-NH<sub>2</sub>-Ado および ECyd などの RNA 合成阻害作用を持つ薬剤が細胞死のシグナル経路の増強や DNA 修復能の阻害を誘導することで放射線増感作用を示した初めての論文であり、制がん剤と放射線併用によるがん治療のアプローチにおいて意義のある論文であると認められる。また、本論文の内容の一部は既に 2 報の学術誌に公表済みである。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者女池俊介氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。