

博士論文

低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感効果の基礎研究

Fundamental study of radio-sensitization by low concentration of
DNA-PK inhibitor

砂田 成章

目次

第1章 序論	1
1.1 はじめに	1
1.1.1 がんの現状.....	1
1.1.2 放射線治療.....	2
1.1.3 放射線抵抗性がん.....	3
1.2 放射線増感研究[5]	4
1.2.1 放射線増感剤の臨床応用	4
1.2.1.1 ハロゲン化ピリミジン類.....	4
1.2.1.2 低酸素細胞増感剤.....	4
1.2.2 放射線増感のターゲット分子	6
1.2.2.1 ATM/ATR.....	6
1.2.2.2 DNA-PK.....	6
1.2.3 DNA-PK 抑制による放射線増感	8
1.3 重粒子線治療	9
1.3.1 粒子線治療[5]	9
1.3.2 重粒子線の特徴と生物影響.....	11
1.3.3 重粒子線による損傷応答	13
1.4 本研究の目的	14
第2章 実験の材料と方法	15
2.1 細胞培養	15
2.2 放射線照射と薬剤処理.....	15
2.3 細胞生存率（毒性）試験	16
2.3.1 コロニー形成試験	16
2.3.1.1 原理.....	16
2.3.1.2 実験手法.....	16
2.3.1.3 細胞生存率曲線（LQモデル）	17
2.3.2 細胞増殖試験	18
2.3.2.1 原理.....	18
2.3.2.2 実験手法.....	18
2.4 フローサイトメトリー解析.....	19
2.4.1 フローサイトメトリー.....	19
2.4.2 DNA二本鎖切断修復	20

2.4.2.1	DNA 二本鎖切断検出	20
2.4.2.2	実験手法	20
2.4.3	細胞周期と Sub-G1 期	22
2.4.3.1	細胞周期解析	22
2.4.3.2	Sub-G1 期解析	22
2.4.3.3	実験手法	23
2.4.4	細胞老化	24
2.4.4.1	細胞老化解析	24
2.4.4.2	実験手法	24
2.5	ウエスタンブロッティング	26
2.5.1	原理	26
2.5.2	実験手法	27
2.6	データ解析	28
第 3 章	低濃度 DNA-PK 阻害剤と放射線の併用効果	30
3.1	背景と目的	30
3.2	実験結果	31
3.2.1	低濃度 NU7441 と X 線併用による放射線増感効果	31
3.2.2	NU7441 による DSB 修復阻害効果	32
3.3	考察	40
3.4	まとめ	42
第 4 章	低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感のメカニズム	43
4.1	背景と目的	43
4.2	実験結果	44
4.2.1	低濃度 NU7441 と X 線併用の細胞周期に対する影響	44
4.2.2	低濃度 NU7441 と X 線併用の細胞死に対する影響	44
4.3	考察	53
4.4	まとめ	55
第 5 章	低濃度 DNA-PK 阻害剤と重粒子線の併用効果	56
5.1	背景と目的	56
5.2	実験結果	57
5.2.1	低濃度 NU7441 と炭素線併用による放射線増感効果	57
5.2.2	低濃度 NU7441 と炭素線併用の細胞周期に対する影響	58
5.2.3	低濃度 NU7441 と炭素線併用の細胞死に対する影響	58

5.3 考察	69
5.4 まとめ.....	71
第6章 結論	72
6.1 低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感	72
6.2 重粒子線治療における DNA-PK 阻害剤の併用	73
6.3 今後の課題と展望.....	74
謝辞.....	76
参考文献.....	78
研究業績一覧.....	86

第1章 序論

1.1 はじめに

1.1.1 がんの現状

現在、日本においては一生のうち2人に1人はがんに罹患する時代であり、死因のトップとなっている（図 1-1）。この傾向は今後も増え続ける見込みであり、対策として診断の技術向上含め先進的な治療法の確立が喫緊の課題である。一般的に、がんの標準治療は外科療法、化学療法、放射線療法の三本の柱で支えられている。その中でも放射線療法は、身体へのダメージなど侵襲性の高い傾向にある外科療法や化学療法と比べ、クオリティ・オブ・ライフ（QOL）が高い治療法として期待されており、放射線治療患者数も年々増加している。

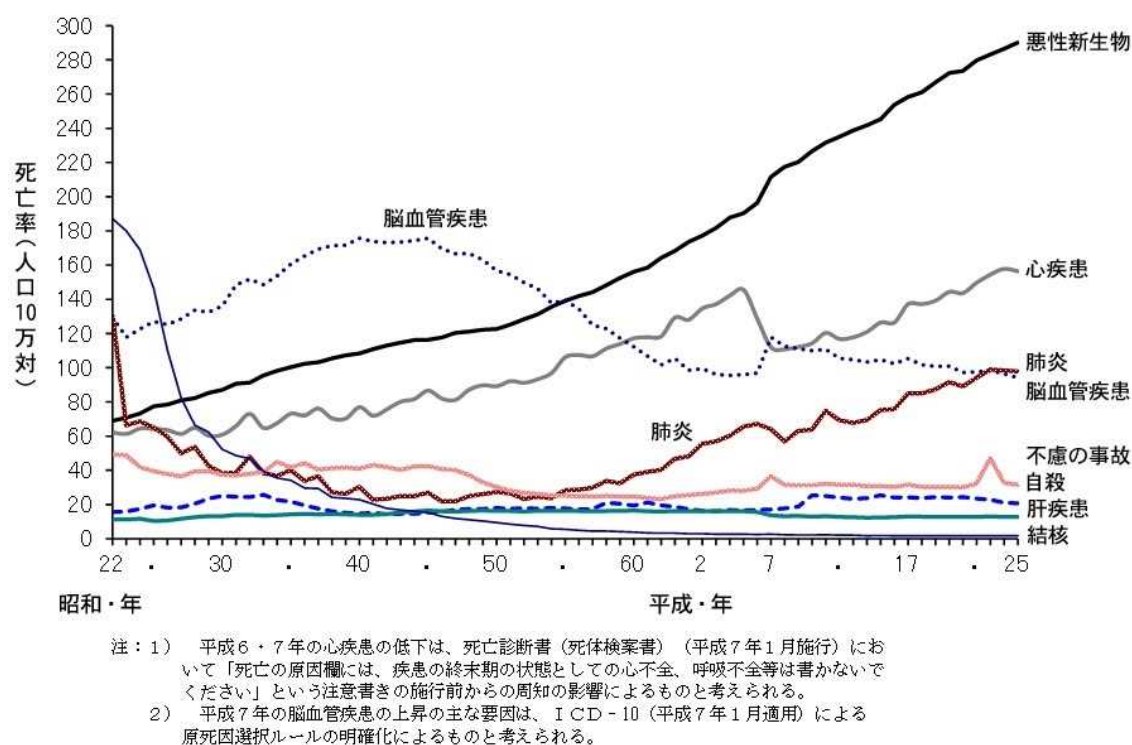


図 1-1 主な死因別にみた死亡率の年次推移

（出典：厚生労働省平成25年人口動態統計月報念年計（概数）の概略

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai13/>）

1.1.2 放射線治療

細胞に放射線が照射されたとき、細胞内では DNA の損傷が形成され、その損傷が重篤な場合は細胞死が誘導される。放射線療法はその作用を利用して、がん組織を縮小させる。一方で、放射線の外部照射により正常細胞も同時に照射される。放射線被ばく問題を解決するため、これまで様々な見地からアプローチが進められてきた。一つ目に、がん細胞と正常細胞の放射線に対する感受性の違いを利用した方法が挙げられる。一般的に、正常細胞はがん細胞に比べ細胞分裂の頻度が低いことから放射線に対する感受性が低いことが知られている。そこで放射線治療では、その耐容線量の差を利用して、正常組織において障害をほとんど起こさない範囲の線量をがん組織に与えることでがん特異的な障害を狙う。二つ目に、正常細胞の方ががん細胞よりも損傷回復能が高いことから、分割照射による亜致死損傷（sub-lethal damage： SLD）からの回復（SLD 回復）を利用した方法が挙げられる。SLD 回復とは、同一線量を照射する場合、放射線を分割して照射し、照射間で適当な時間を空けることで、その間で損傷が回復され生存率が向上する現象である。これにより正常組織に対する被ばくのダメージを幾分か抑えることができる。三つ目に、がん患部局所的に線量を集中させる物理的なアプローチが挙げられる。近年のコンピュータ計算技術の発展により、正常組織に対する被ばく影響の低減を最適化する強度変調放射線治療（Intensity Modulated Radiation Therapy： IMRT）などが開発された¹。以上、生物学的・物理学的なアプローチにより放射線治療は目覚ましい発展を遂げてきた。

1.1.3 放射線抵抗性がん

正常組織への副作用を可能な限り抑えるよう進歩してきた放射線治療技術であるが、放射線に対して抵抗性を示すがんも存在し、治療を困難にしている。放射線抵抗性を示す因子としては、細胞周期、遺伝的因子、低酸素環境など様々なものが考えられる。特にがん細胞は遺伝的な異常を有していることが多く、その中でもがん抑制遺伝子である p53 遺伝子は最も高頻度に異常が見られる^{2,3}。この p53 遺伝子は細胞周期の停止やアポトーシスの誘導制御などで重要な機能を有しており、p53 遺伝子の欠損や異常を持つがん細胞は一般的に放射線感受性が低い⁴。がん細胞の半数以上はこの遺伝子に異常があるため、放射線抵抗性がんに対する効率的な治療法の開発は重要な課題である。

1.2 放射線増感研究⁵

放射線増感剤は放射線の感受性を高める薬剤であり、がん治療効果向上に期待されている。増感剤を併用することで照射線量を抑えられることにもつながるため、これまで多くの基礎研究ならびに増感剤の開発が行われてきた。

1.2.1 放射線増感剤の臨床応用

1.2.1.1 ハロゲン化ピリミジン類

ハロゲン化ピリミジン類の一種である BrdU (bromodeoxyuridine) は、放射線増感剤として初めて注目され臨床でも用いられた。BrdU は DNA の構成物質の一つであるチミジン (thymidine) と化学構造が似ており、DNA に取り込まれる。BrdU を取り込んだ細胞が放射線照射されると、DNA の初期損傷が増大され生存率が下がることが報告されている^{6,7}。これらの効果は培養細胞による実験レベルでは実証され、大きな成果が得られてきた。そこで、BrdU を用いた治療は脳腫瘍に対して臨床応用された。特に、BrdU が DNA に取り込まれやすくするため 5-FU や MTX などの代謝拮抗剤 (antimetabolite) とともに併用する治療法は、BAR (BrdU+Antimetabolite+Radiation) 療法と呼ばれた⁸。しかし、手技の複雑さや長期的な治療成績の問題などから現在ではほとんど用いられていない。

1.2.1.2 低酸素細胞増感剤

腫瘍組織の一部は低酸素環境にあり、放射線抵抗性の原因の一つともなっている。低酸素細胞増感剤は、このような低酸素下の細胞に対し、放射線の効果を増感させることを目的に開発が進められている。作用機序は、放射線によって生じる生体高分子のラジカルを酸素と同様に固定させることで増感が起こると考えられている。低酸素細胞増感剤のスクリーニングを経て 2-ニトロイミダゾール誘導体のミソニダゾールが注目されるようになった。この薬剤は細胞実験や動物実験において有意な結果が得られたが、実際の臨床試験では咽頭がんにおいてのみ有意性が認められた他は、ほとんど有用性を示すことができなかった。これは、ミソニダゾールの副作用である神経毒性による投与量の制限が一因であると考えられている。それ以降毒性が低い、またはミソニダゾール以上の増感効果を示す薬剤の開発が促され、2-ニトロイミダゾールの側鎖を変えたエタニダゾールが開発された。エタニダゾールはミソニダゾールに比べ、脳への移行が抑

制されることで投与量が大幅に上がった。しかし、この薬剤も多くの場合で有用性が認められず、現状臨床において使用されているのは、デンマークで咽頭・喉頭がんに対して用いられるニモラゾールのみである⁹。ニモラゾールは比較的増感効果も小さいことから、低酸素細胞増感剤の有効性は限定的であると考えられている。

1.2.2 放射線増感のターゲット分子

前述の薬剤の他にも、放射線増感剤の基礎研究はこれまでに多く行われてきた。その一つが、放射線照射後の DNA 損傷応答機構の阻害をターゲットにした放射線増感である。

1.2.2.1 ATM/ATR

細胞は放射線照射され DNA 損傷が生じると、細胞内でシグナルを伝達する損傷応答が引き起こされる。最初に DNA 損傷はセンサー (sensor) によって感知され、トランスデューサー (transducer) が伝達し、エフェクター (effector) に作用して、修復や細胞周期などにおいて反応が起こる。この DNA 損傷のシグナル伝達において、上流で中心的な働きをするものに ATM (ataxia telangiectasia mutated) と ATR (ATM and Rad3-related) 遺伝子がある。ATM は、毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia) というヒトの遺伝病の原因遺伝子であり、この遺伝子に変異があると放射線感受性が高くなることが知られている。ATR は、ATM と構造や機能が似ており、DNA 損傷に対して ATM と相補的に働く。これらの蛋白質は PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase : PI3 キナーゼ (リン酸化酵素)) と構造が似ており、PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase : PI3K 関連蛋白質キナーゼ) ファミリーに分類される。これまでも ATM¹⁰ や ATR^{11,12} を阻害する薬剤が開発されており、臨床応用も期待される。

1.2.2.2 DNA-PK

DNA 修復は、DNA 損傷応答の重要な因子の一つである。特に DNA 損傷の中でも DNA 二本鎖切断 (double strand break : DSB) は、細胞に深刻な影響を与えることから、がん細胞に対する放射線増感においても重要なターゲットである。DNA DSB (以降 DSB) は主に二つの経路、相同組み換え (homologous recombination : HR) と非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) で修復される。DSB が生じた箇所において、HR は損傷を受けていない相同染色体 DNA と交差することで、NHEJ は DNA の切断末端を直接つなぎ合わせることで起こる修復機構である。これらのことから、HR による修復は姉妹染色分体を必要とするため、DNA が複製された後の S 期から G2 期にかけて起こる細胞周期依存的な修復に対し、NHEJ は細胞周期非依存的に起こる修復である。通常の放射線照射による損傷修復の多くは NHEJ によって修復される^{13,14}。

DNA 依存性タンパク質キナーゼ (DNA-dependent protein kinase : DNA-PK) は、DNA 依存性タンパク質キナーゼ触媒サブユニット (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit : DNA-PKcs) と DNA 結合性 Ku ヘテロ 2 量体 (Ku70, Ku80) から構成される NHEJ 経路の上流で働く重要な酵素群である。最近では、DNA-PKcs ががん細胞の転移など悪性度にも関わっていることが報告されており^{15,16}、分子標的としても注目されている。これまでも DNA-PK を阻害する薬剤は数多く開発されており、放射線増感剤としての基礎研究の報告も多い^{17,18}。一方で DNA-PK 阻害剤の多くは、正常組織に対する毒性などの観点から臨床試験で用いられている例は少ない。現状、DNA-PK とともに mTOR (mammalian target of rapamycin) も阻害する CC-115¹⁹ は臨床試験 Phase I の段階である (2017 年 2 月時点)。

1.2.3 DNA-PK 抑制による放射線増感

1.2.2.2 で述べたように DNA-PK は DSB 修復において重要な役割を果たしており、その阻害剤は放射線増感剤として期待されている。しかし、正常組織に対する毒性が臨床応用への障害となっている。最近 A. Gustafsson らにより、DNA-PK の抑制が DSB 修復に依存しない放射線増感を引き起こすことを示唆する興味深い知見が報告された²⁰。通常、阻害剤などで DNA-PK の働きが抑制されると DSB 修復の NHEJ 経路が阻害され、細胞内で DSB が修復されなくなり放射線増感が引き起こされると考えられていた。一方で上記の報告では、DNA-PK の抑制に RNA 干渉（特定の遺伝子の発現を抑制する技術）が用いられた。そこで人工的な RNA として siRNA を用いて DNA-PKcs の発現レベルを抑制したところ、DSB の修復阻害は起こらずに放射線増感が観測された。RNA 干渉による遺伝子の転写量を減少させる手法（ノックダウン）は、遺伝子を完全に欠損させる手法（ノックアウト）とは異なり、細胞内での遺伝子の発現が幾分か残る。そのため、DNA-PKcs がノックダウンされた細胞では、DNA 損傷後も DNA-PKcs が少ないながらも損傷箇所に集積し、通常通りの修復が行われることが示唆されている（図 1-2）。これらのことから、DNA-PK が DNA 修復阻害とは異なる経路による細胞死誘導機構に関与していることが考えられるが、その詳細については明らかになっていない。

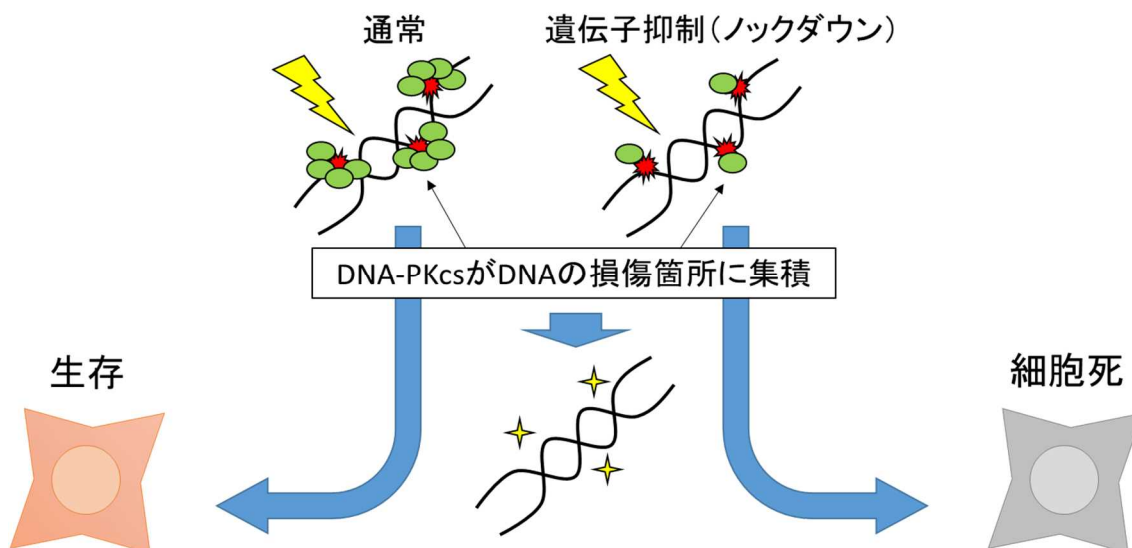


図 1-2 DNA-PKcs 遺伝子抑制された細胞の放射線応答モデル

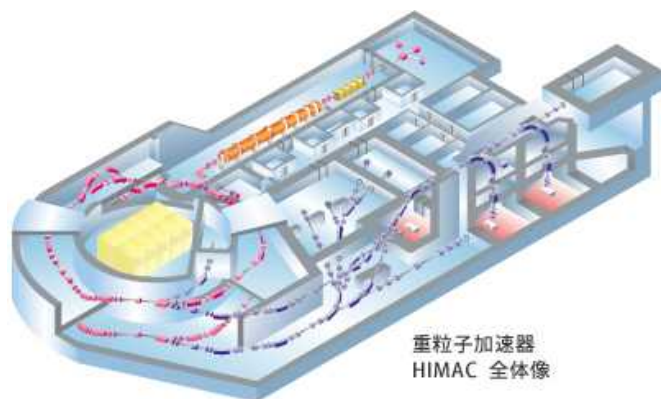
1.3 重粒子線治療

近年、放射線抵抗性のがんの認識とともに、放射線治療技術の向上も目覚ましい。特に重粒子線治療は、治療成績も顕著であり今後の標準治療として期待される。

1.3.1 粒子線治療⁵

放射線治療において最も重要な要素の一つは、正常組織に対する被ばく影響を低減させることである。従来用いられてきた X 線や γ 線などは、特徴として体内に入射された際、体表面近傍で線量が最大となり、深部まで進むに従い線量が減少する。つまり深部にあるがん組織に対する治療では、皮膚表面への影響が大きくなり、副作用として皮膚障害などが起こる。このような光子線に対し、粒子線が注目されるようになった²¹。粒子線は電子、陽子、中性子、重荷電粒子など粒子によるビームのことである。このうち、陽子線や重荷電粒子線が持つ物理的特徴にユニークな線量分布付与がある。荷電粒子は物質中を透過する際、停止する直前で大きな電離作用を受けるとともに大きなエネルギー付与が起こる。この現象はブラッグピーク (**Bragg peak**) と呼ばれ、体内の深部にあるがん組織特異的に線量を集中させることができる。

粒子線を利用したがん治療は、粒子線の持つ優れた線量分布の特徴を生かし、古くは 1946 年にロバート・ウィルソン博士によって提唱された。1950 年代に入り、ローレンス・バークレー研究所 (アメリカ) やウプサラ研究所 (スウェーデン) で陽子線の臨床研究が開始され、1961 年には、ハーバード・サイクロトロン研究所とマサチューセッツ総合病院が共同で陽子線治療を開始した。一方で、重粒子線の治療については、1970 年代にローレンス・バークレー研究所でネオン線を用いた臨床研究が開始された。国内では、陽子線については 1979 年に放射線医学総合研究所 (放医研) の HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) (図 1-3)、1983 年に筑波大学陽子線医学利用研究センターにおいて臨床研究が開始された。また、重粒子線については 1994 年に放医研で開始された。現在では、粒子線治療施設は国内に陽子線治療施設が 11 ヶ所と重粒子線治療施設が 5 ヶ所の合計 15 ヶ所ある (兵庫県立粒子線医療センターは両施設を有している)。治療成績においても重粒子線治療では、2013 年 3 月時点で 8,000 人以上が放医研で治療されており、日本が世界をリードしている²²。今後世界的にも多くの建設が予定されており、神奈川県立がんセンター (i-ROCK) で開始された重粒子線治療では、最新の照射技術が導入されるなど普及、発展ともに目覚ましい進歩を遂げている。



重粒子加速器
HIMAC 全体像



重粒子線棟

図 1-3 重粒子線加速器 HIMAC
(出典：国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構)

1.3.2 重粒子線の特徴と生物影響

1.3.1 で述べたように、陽子線や重粒子線などの粒子線はブラッグピークという線量分布を付与する特徴がある。重粒子線はさらに、飛程の単位距離あたりのエネルギー付与率を表す線エネルギー付与 (linear energy transfer : LET) が大きいという特徴がある。一般的に標準的な放射線である X 線や γ 線に加え、陽子線などは低 LET 放射線に分類され、 α 線や炭素線などの重粒子線は高 LET 放射線に分類される。LET の高さから重粒子線は図 1-4 のように密な領域に大きなエネルギーを与え、細胞の DNA に対して一本鎖切断や二本鎖切断をはじめ様々な種類の損傷を有する複雑な DNA 損傷 (またはクラスター DNA 損傷) を形成する^{23,24}。このような損傷は修復が困難であり、がん細胞に対して致死的な損傷を与える。様々な LET に対する生物効果は、指標である生物学的効果比 (relative biological effectiveness : RBE) で表される。RBE は基準放射線として X 線や γ 線の生物効果に対する相対値として以下の式 1.1 で表される。

$$RBE = \frac{\text{ある効果を得るのに必要な基準放射線の吸収線量}}{\text{同じ効果を得るのに必要な試験放射線の吸収線量}} \quad (1.1)$$

これまでも LET に対する RBE 評価に関する研究は数多くの蓄積がある^{22,25,26}。生存率における RBE については、LET の増加とともに高くなり、LET が約 100~200 keV/ μm の領域でピークを迎える²⁶。

重粒子線などの高 LET 放射線治療のアドバンテージとして、もう一つに酸素の有無に対する依存性が少ないことが挙げられる^{27,28}。細胞は酸素の存在する状態と酸素が少ない低酸素状態とで、放射線に対する感受性は大きく異なることが知られている。この現象は酸素効果と呼ばれ、指標として酸素増感比 (oxygen enhancement ratio : OER) が用いられる。OER はある生物効果を引き起こす放射線の線量の相対比により以下の式 1.2 で表される。

$$OER = \frac{\text{無酸素下である効果を得るのに必要な線量}}{\text{酸素存在下で同じ効果を得るのに必要な線量}} \quad (1.2)$$

一般的に低 LET 放射線の場合、細胞致死に対する OER は 2 以上となり、LET が高くなるに従って 1 に近づく²⁸。特にがん組織の一部は低酸素環境下に存在することから通常は放射線抵抗性を示すが、重粒子線は高い殺傷効果を示す。

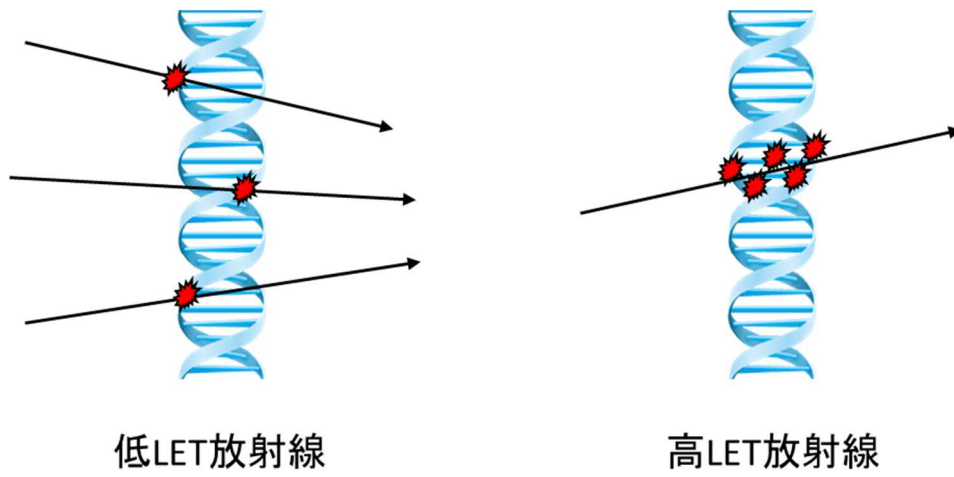


図 1-4 低 LET、高 LET 放射線による DNA 損傷

1.3.3 重粒子線による損傷応答

重粒子線をはじめとする高 LET 放射線は、低 LET 放射線と比べて生物影響が異なることが知られている。最近では、分子生物学的な見地から研究が進むにつれ、高 LET 放射線によって形成された複雑な DNA 損傷に起因する DNA 損傷応答が、低 LET 放射線によるそれとは異なる様相であることが示唆されるようになった。特に DSB 修復において相同組み換え (HR) と非同源末端結合 (NHEJ) のうちどちらを選択して修復されるかの議論が盛んになってきている^{14,24,29,30}。R. Okayasu らは、ハムスターやヒトの細胞において高 LET 放射線が、低 LET 放射線と比べ NHEJ 経路による修復を遅らせ抑制していることを報告し³¹、X. Yu らは、高 LET 放射線によって Ku タンパク質の機能が抑制されることを報告した³²。これらのことは、高 LET 放射線照射後の DSB 修復について、一部で NHEJ 経路による修復が抑制されることを示唆しており、この原因として上流にある Ku タンパク質をはじめとした DNA-PK タンパク質複合体の機能低下の関与が考えられる。一方で、A. Takahashi らは、NHEJ 関連遺伝子 (LigaseIV) や HR 関連遺伝子 (Rad54) を欠損 (ノックアウト) させたマウス細胞を用いて、様々な LET を持つ放射線に対する感受性を調べた³³。そこで低 LET 領域の放射線照射された細胞では、従来の報告同様 NHEJ をメインの経路として修復が行われていたが、高 LET 放射線照射された細胞においてもなお NHEJ 経路が優位に働いていることが示された。これらのことから高 LET 放射線は低 LET 放射線に比べ、NHEJ の経路を抑えるが、依然として NHEJ がメインの修復経路であると考えられる。

1.4 本研究の目的

放射線治療において、正常組織への放射線被ばくや放射線抵抗性がんを克服することは重要な課題である。これらを解決する戦略として、放射線増感剤の利用が挙げられるが、増感効果を得ることと引き換えに副作用が甚大であることも多く、臨床で用いられる増感剤はほとんどないのが現状である。一方で、1.2.3で述べたようにDNA-PKcsはメインのDSB修復経路であるNHEJに関わる重要な遺伝子の一つであるが、この遺伝子の一部抑制（ノックダウン）と放射線照射の併用はDSB修復に依存しない放射線増感を引き起こすことが示唆され、副作用の少ない臨床応用への発展が期待される。しかし、ノックダウンに用いる核酸（siRNA）などは化学的に不安定であり体内では容易に分解されてしまう。

そこで、我々は化学的に安定な薬剤として低分子化合物のDNA-PK阻害剤に着目した。DNA-PKcsの働きを部分的に抑制する方法として、DNA-PK阻害剤をこれまで報告されている濃度よりもさらに“低濃度”で用いることで、ノックダウンと同じような作用機序による放射線増感効果が得られるという仮説を立てた。これまで様々な増感剤をはじめDNA-PK阻害剤についても、基礎研究としては多くの報告があるが、濃度に関する検討は行われてこなかった。特に増感剤を低濃度領域で用いることによる放射線併用効果についてはほとんど知られていない。本研究では上記の知見をもとに、“低濃度DNA-PK阻害剤による放射線増感効果”を詳細に調べることを目的として、次の課題を設定した。

1. 低濃度DNA-PK阻害剤と放射線の併用効果とDSB修復に対する影響の解析（第3章）
2. DSB修復に依存しない増感機構と細胞致死の詳細解析（第4章）

さらに上記の課題に加え、重粒子線は線量をがん組織に集中させることができることから、正常組織への副作用の低減を最大化できる可能性がある。一方で、1.3.3で述べたように高LET放射線照射された細胞では、DNA修復に関わらずDNA-PKの機能が抑えられていると考えられる。またDNA-PK阻害剤と重粒子線との併用効果についての報告も少ない。そこで、次の課題も検討する。

3. 低濃度DNA-PK阻害剤と重粒子線の併用効果の評価（第5章）

以上の課題を検証することで、副作用の少ない放射線治療法開発への貢献やDNA-PKの新しい機能の解明につながると期待する。

第2章 実験の材料と方法

2.1 細胞培養

ヒト肺癌細胞 (Non-Small Cell Lung Cancer : NSCLC) A549、H1299 細胞はそれぞれ理研 BRC (Tsukuba, JAPAN)、American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。正常な p53 遺伝子を導入した H1299 細胞 (p53 野生型) は大西武雄博士より提供を受けた。A549、H1299 細胞はそれぞれ 10% (v/v) のウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) を混合した MEM α (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modifications)、RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) 培地を用いて培養した。ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞 HFL1 細胞は、理研 BRC から購入した。HFL1 細胞は 15% (v/v) の FBS を混合した MEM α 培地を用いて培養した。細胞は 37°C、5% CO₂ 濃度環境下で培養した。実験には対数増殖期の細胞を用いた。

2.2 放射線照射と薬剤処理

放射線照射は量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 (放医研) で行った。X 線照射は、X 線発生装置 TITAN-320 (島津メクテム株式会社) を用いて行った。照射条件は、管電圧 200 kV、管電流 20 mA、0.5 mm アルミニウム/0.5 mm 銅フィルターを用いて線量率は約 1 Gy/分で照射した。炭素線照射は、放医研の Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba (HIMAC) で行った。炭素イオンは 290 MeV/n で加速され、LET は 50 keV/ μ m (monoenergetic ビーム) で照射した。以降、本研究で表す細胞に照射した線量はマクロドジメトリーとしての吸収線量で表している。吸収線量は、X 線では線量計で得られた線量率の情報から計算し、炭素線では事前の粒子のエネルギーやフルエンスの情報から計算して評価した。

特異性の高い DNA-PK 阻害剤 NU7441 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。NU7441 は DMSO に 2 mM の濃度で溶かし、-20°C のフリーザーに分注ストックした。薬剤処理は、放射線照射の 1 時間前に NU7441 を培地に混合し、照射後は各実験を行うまでの間、NU7441 存在下でインキュベーター内に保存した。対照群 (Control) については、DMSO を用いて行った。

2.3 細胞生存率（毒性）試験

細胞生存率（または毒性）の評価は、コロニー形成試験または細胞増殖試験を用いて行った。

2.3.1 コロニー形成試験

2.3.1.1 原理

放射線により強い障害を持った細胞は、分裂することなく致死にいたる間期死と、分裂を繰り返す途中で分裂を止めてしまう増殖死（または分裂死）のいずれかにより細胞死が誘導される。細胞死の評価には様々な方法があるが、特に放射線の細胞死は、増殖死がよく観察されるため一般的にコロニー形成法が用いられる³⁴。コロニー形成法は細胞の増殖能力を指標として細胞生存率を定量評価する方法である。ある刺激が与えられ単離された細胞をシャーレ上に培養し、しばらくの期間を経て増殖が繰り返されると細胞群（コロニー）が形成される。そこである一定の細胞数以上からなるコロニーをその後も増殖し得るコロニーとしてカウントする。これにより単離された細胞一つ一つの生死が判断できる。コロニー形成法は、放射線生物学において細胞生存率を解析するゴールドスタンダードとなっている。

2.3.1.2 実験手法

培養フラスコやディッシュに接着している細胞に対し、放射線照射や薬剤（NU7441）処理した細胞をトリプシン処理により剥がした後、A549 と H1299 細胞は 6 cm ディッシュに、HFL1 細胞は 10 cm ディッシュに播種した。NU7441 処理する細胞については、トリプシン処理段階の短い時間以外、常に薬剤に暴露している状態にする。播種する細胞数は事前の検討実験などから、最終的なコロニー数がおおよそ 50~100 個くらいになるようにデザインした。ディッシュはインキュベーターにて約 10 日~14 日間（培養期間は HFL1>A549>H1299）培養してコロニーを形成させた（図 2-1）。コロニー形成後、PBS で細胞表面を洗浄し、100%エタノールでコロニーを固定し、0.2%クリスタルバイオレットで染色した。50 個以上の細胞で形成されるコロニーを生存能力があるコロニーとしてカウントし、以下の式 2.1、2.2 によりコロニー形成率（plating efficiency : PE）と細胞生存率（survival fraction : SF）を求めた。

$$PE = \frac{\text{カウントされたコロニー数}}{\text{播種した細胞数}} \quad (2.1)$$

$$SF = \frac{PE \text{ (照射条件における } PE\text{)}}{PE_0 \text{ (未照射条件における } PE\text{)}} \quad (2.2)$$

2.3.1.3 細胞生存率曲線 (LQ モデル)

放射線による細胞の生存率曲線を表すモデルとして、直線 2 次曲線モデル (linear quadratic model : LQ モデル) を採用した。LQ モデルによる生存率曲線は以下の式 2.3 で示される。

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (2.3)$$

ここで、SF : 細胞生存率、D : 線量 (Gy)、 α : D の係数、 β : D^2 の係数とした。放射線のターゲットの DNA が二本鎖構造を持つことから、細胞死が放射線により 1 ヒットで起こる項と 2 ヒットで起こる項として、係数 α 、 β がそれぞれに対応している。このモデルはチャイニーズハムスター細胞の生存率曲線にも適しており³⁵、現在では細胞生存率曲線を示す際に最もよく用いられるモデルである。

2.3.2 細胞増殖試験

2.3.2.1 原理

細胞は通常細胞分裂を繰り返し増殖する。そこで、経時的に細胞数を計測することで、放射線照射や薬剤処理された細胞の増殖過程をダイナミックに観測できる。2.3.1のコロニー形成試験は、最終的な増殖結果としての生存率しか確認できないが、細胞増殖試験と組み合わせることで、どの時点でどのように増殖抑制が引き起こされたかなどの詳細を理解できる。

2.3.2.2 実験手法

放射線照射前に6ウェルプレートまたは10 cm ディッシュにA549、H1299細胞をそれぞれ約10,000個ずつ播種した。十分細胞が接着された後、照射1時間前にDMSO (Control) またはNU7441処理 (0.3 μ M) を行い、放射線照射を行った。照射された細胞はインキュベーターに戻し1日 (24時間) ごとに最長4日後までの0, 1, 2, 3, 4日後に細胞数をカウントした (図2-1)。細胞数のカウントはCoulter Counter (コールター・カウンター) を用いて行った。照射された細胞は、PBSで細胞表面を洗浄後、トリプシン処理で剥がし、ピペッティングによりよく細胞を単離してからカウンターで細胞数を測定した。横軸に照射後の時間を取り、各時間における細胞数を照射直後 (0日) の細胞数で規格化した相対的細胞数 (relative cell number : RCN) を縦軸にとって、増殖曲線を作成した。照射した線量としてX線、炭素線ともに4 Gyを用いた。

2.4 フローサイトメトリー解析

2.4.1 フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、ある粒子の情報を光学的にしかも高速に分析する手法である。用いられる装置のフローサイトメーターは、様々な原理手法が組み合わせられて開発された。1940年から50年代にかけて Wallace Coulter が発表したコールター原理によって細胞の計測が自動化され、1965年には Marck Fulwyler によってセルソーティングが開発され、1969年にはロスアラモス研究所の Van Dilla らによって、レーザー光源が搭載されたフローサイトメーターが実用化の第一歩として開発された。長所短所はあるものの、これまで細胞を一つ一つ顕微鏡で観察していたものが、フローサイトメトリーの導入により短時間のうちに高精度で多くの細胞のデータを取得できる時代となった。

フローサイトメーターは細胞などの粒子 1 個ずつの性質を測定するため、流体力学に基づき単一粒子が一行に並んで流れるフローシステムが設計されている。流れている粒子に対し、レーザーが照射されて出てきた蛍光や散乱光の強さを検出器で測定できる。散乱光について、レーザービームと同方向には細胞の大きさを反映する前方散乱光 (forward scatter : FSC)、90 度方向には細胞の内部構造の複雑さを反映する側方散乱光 (side scatter : SSC) が検出される。本研究では、フローサイトメーターは FACS Calibur (BD Biosciences) を用いて解析を行った。蛍光は励起光として 488 nm の空冷アルゴンレーザーが使われ、FL1 (530±15 nm)、FL2 (585±21 nm)、FL3 (670 nm 以上) の検出器により 3 種類 (色) の蛍光を検出することができる。例えば、緑の蛍光色素としてよく用いられる FITC (fluorecein isotiocyanate) は蛍光波長が 530 nm なので FL1 により、DNA 量を検出する際に用いられる PI (propidium iodide) は蛍光波長が 617 nm なので FL2 で (または FL3 でも) 検出できる。検出器で測定されたデータはノイズも含んでいるため、解析の際は unnecessary 死細胞やデブリなどを除く必要がある。この作業はゲーティングと呼ばれ、目的とする細胞集団に絞り込んで解析できる。ゲーティング後は、例えばある蛍光の強度を測定する際、横軸を蛍光強度、縦軸を細胞数頻度としてヒストグラムを作成し、蛍光強度の平均値などをもって解析する。注意すべき点として、フローサイトメーターで得られる蛍光強度のデータは相対値で得られる。それぞれの得られた測定値は、ネガティブコントロールなどで規格化して解析する必要がある。

2.4.2 DNA 二本鎖切断修復

2.4.2.1 DNA 二本鎖切断検出

細胞に対する深刻な損傷である DNA 二本鎖切断 (DSB) の検出方法は、これまで多大な進歩を遂げてきた。一般的に DSB の検出方法としては、アガロースゲル電気泳動による DNA 断片の検出やコメットアッセイを用いる方法と、蛍光顕微鏡によって細胞核中の DSB を指標とする分子を間接的に観察する方法などが挙げられる。前者は、DSB によって切断された DNA をアガロースゲル中で通電することで、DNA がゲルの網目構造をくぐり抜け移動した距離の違いで切断頻度を定量する方法である。後者は、例として細胞内で DSB が形成された際の応答として、ヒストンタンパクの一つである H2AX のリン酸化現象を利用する方法がある。このリン酸化ヒストン H2AX は γ H2AX と呼ばれ、DSB 箇所の周辺に局在する。蛍光抗体で γ H2AX を免疫染色すると、細胞核内でフォーカスと呼ばれるドットが形成され、DSB 箇所を可視化できる。しかし、それぞれの方法で改良する余地は多くある。放射線による DSB の検出において前者は、照射する線量として数十から数百 Gy もの線量が必要である上、手法が煩雑といった欠点が挙げられる。後者は、照射する線量は 1 Gy 程度で多数のフォーカスが観察され感度も良好であるが、目視によってフォーカスの輝度を見分けることは容易でないことや、データ取得にも多くの時間を要する。

本研究では、 γ H2AX を DSB の指標としてフローサイトメーターを使用した高速で高精度な DSB 定量方法を採用した。フローサイトメーターによる DSB 検出の試みは、これまでもいくつも報告はあるが、測定感度に課題があり検出法の選択の障害となっていた³⁶⁻³⁸。A. Muslimovic らは、フローサイトメーターにより高感度で効率的に γ H2AX の蛍光強度データを取得するため、様々な試行により最適な測定手法を提案した³⁹。これにより多くの高精度データを短時間で取得できるようになった。

2.4.2.2 実験手法

放射線照射された細胞の表面を PBS で洗浄後、トリプシンを 5 分間処理して細胞を剥がした。(以下は全て 4°C 条件または氷上で行う。) 冷 PBS でよくピペティングして細胞を単離回収し、再度冷 PBS で洗浄、懸濁させた。200 μ L の FITC が結合した anti- γ H2AX マウスモノクローナル抗体 (Millipore) を混合した Block-9 染色バッファー (1 g/L BSA、8% (vol/vol) mouse serum、0.1 g/L RNase、10 mM NaF、1 mM Na₂MoO₄、1 mM NaVO₃、0.25 g/L herring sperm

DNA、0.1% Triton X-100、5 mM EDTA、0.05% (wt/vol) NaN₃) に、細胞懸濁液を 200 μL (約 1~2×10⁵ 個の細胞に調整) 混合し、ボルテックスで穏やかに攪拌した。サンプルは、冷蔵庫 (4°C) で 12 時間以上 (24 時間程度まで) 保存して免疫染色した。染色後、suspension buffer (0.1% BSA) を 400 μL 加え、セルストレーナーでフィルトレーションした溶液をフローサイトメーター FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で測定した。FITC の蛍光は FL1 で検出した。解析は Flow Logic (Mentone Victoria, AUSTRALIA) を用いて行い、FSC/SSC の展開データをもとにゲーティング後、FL1 による蛍光強度の平均値をもって γH2AX を定量した。

DSB 修復の経時挙動を調べるため、放射線照射後 1, 4, 24 時間後の細胞を測定した (図 2-1)。規格化には、各時間における未照射細胞 (ネガティブコントロール) の測定値を用いた。照射した線量は X 線、炭素線ともに 4 Gy を用いた。

2.4.3 細胞周期と Sub-G1 期

2.4.3.1 細胞周期解析

細胞は基本的に、間期である G1 期 (Gap 1)、DNA の複製が行われる S 期 (Synthesis)、G2 期 (Gap 2) を経て、細胞分裂が行われる M 期 (Mitosis) へと 1 サイクル (細胞周期) を繰り返す。細胞は放射線照射されると、損傷に伴い細胞分裂の遅延などが観察される。これは細胞分裂において、遺伝情報を分裂した細胞に正確に伝えるための監視 (チェック) 機構が各周期に備わっているために起こる現象であり、細胞周期チェックポイントと呼ばれる。各周期や周期間にある G1/S 期チェックポイント、S 期チェックポイント、G2/M 期チェックポイント、M 期チェックポイントなどがよく解析されており、放射線照射された際は、G2 期で細胞周期停止がよく観察される。

細胞周期は、放射線影響を調べる上でも重要な要素であり、解析では細胞中の DNA 含量に着目する。各細胞周期における DNA 含量は異なり、G1 期の相対 DNA 量を 1 とすると、S 期で複製され 1 から 2 へと増加し、G2 期では 2 のまま M 期に移行し、M 期から細胞分裂により G1 期に移行すると 1 に戻る。この原理から DNA を蛍光色素で染色し、フローサイトメーターで測定・解析して細胞周期の分布を調べられる。DNA 染色には DNA と結合する蛍光色素としては、PI (propidium iodide、蛍光 617 nm)、7AAD (7-Amino-Actinomycin D : 蛍光 647 nm)、Hoechst 33342 (蛍光 483 nm) などが挙げられ、多重染色 (細胞周期以外の影響と同時に観測する) など用途に応じて使い分けられる。

2.4.3.2 Sub-G1 期解析

細胞死の種類にアポトーシスやネクローシスなどが挙げられる。アポトーシスは、細胞が計画的に自殺する特徴からプログラム細胞死とも呼ばれ、能動的に起こる細胞死である。アポトーシスが開始されると、細胞膜構造の変化に始まり、細胞の縮小やクロマチンの凝縮、核の断片化 (DNA の断片化) が起こり、最終的にアポトーシス小体が形成され細胞死が誘導される。一方、ネクローシスは壊死とも呼ばれ、障害に対して受動的に起こる細胞死で、ミトコンドリアなどの細胞小器官の膨潤や細胞膜の破たんが起こり、細胞内容物の流出を引き起こす。それぞれの細胞死が誘導される機構は異なるが、細胞周期解析においてアポトーシスの後期やネクローシスを起こした細胞は、DNA 含量が G1 期の分布よりも低い位置に集団として観測される。このような分布は sub-G1 期と呼ばれ、簡便な細胞死の評価方法として用いられる⁴⁰。

2.4.3.3 実験手法

培養容器中の細胞を浮遊細胞も含め全て回収するため、放射線照射された細胞が含まれる培地や洗浄に用いた PBS を全て回収した。トリプシン処理をして細胞を剥がし、回収した溶液（培地や PBS）を混合し、冷 PBS で 2 度洗浄した。細胞を 2 mL の冷 PBS で懸濁させ、ボルテックスで攪拌しながら 5 mL の冷エタノールを少しずつ加え、ゆるやかに固定した。最終的なエタノール濃度は約 70%とした。固定した細胞はフローサイトメーターで測定するまでの間 -20°C の冷凍庫で保存した。

固定細胞を冷 PBS で 3 度洗浄して、0.5~1 mL の冷 PBS で懸濁させる。その後、RNA による非特異なシグナルを除去するため RNase を最終濃度が 1 mg/mL の濃度となるよう混合し、5 分間反応させて RNA を分解した。DNA の蛍光染色には PI を最終濃度が 50 µg/mL になるように混合し、30 分間反応させた。セルストレーナーでフィルトレーションした溶液をフローサイトメーター FACS Calibur で測定した。PI の蛍光は FL3 で検出した。解析は Flow Logic を用いて行い、FSC/SSC の展開データをもとにゲーティング後、ヒストグラムから各細胞周期と sub-G1 期の割合を算出した。

細胞固定は放射線照射 1, 2, 3 日後に行った（図 2-1）。照射した線量として X 線、炭素線ともに 4 Gy を用いた。

2.4.4 細胞老化

2.4.4.1 細胞老化解析

正常な細胞は通常分裂を繰り返して増殖していくが、1961年にレオナルド・ヘイフリックらによって細胞分裂回数に限界があることが発見された。分裂回数が限界に達した細胞はそれ以上の分裂、増殖が不可逆的にできなくなり、形態的にも細胞の巨大化などが観察される。そのような状態は細胞老化と呼ばれ、一説には正常な細胞ががん化するのを防ぐ生体の防御機構のひとつだと考えられているが、未だ不明な点が多い。一方で、がん細胞は半永久的に細胞分裂を繰り返す。この原因の一つにテロメアと呼ばれる細胞老化に関わる染色体の末端にあるDNA配列の修復が関わっていることもわかってきた。これまでがん細胞の細胞老化は注目されてこなかったが、最近になってがん細胞も放射線などの作用により細胞老化様の増殖停止を起こすことが報告され⁴¹、がん抑制の一つの手段として注目されるようになった。そこで本研究では、がんの細胞老化促進の細胞死に対する寄与を調べた。

老化細胞は、特異的に細胞老化関連βガラクトシダーゼ (senescence-associated β-galactosidase : SA-βGal) の活性が認められる。現在、SA-βGalは老化細胞の検出に広く用いられている生化学マーカーであり、この活性を測定することで、細胞老化の程度を調べることができる。測定には、SA-βGalに基質としてX-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside) を反応させて染色する方法が一般的であり、X-galは加水分解を起こし青色を呈する。青色の細胞をSA-βGalポジティブな老化細胞として、顕微鏡でカウントできる。しかし、基本的には目視の比色法による観察であるため、青色の判定基準の設定が曖昧であることや、観察に時間を要することが課題として挙げられる。そこで、本研究ではF. Debacq-Chainiauxらにより確立されたフローサイトメーターを用いて測定する手法を採用した⁴²。SA-βGalに基質としてC₁₂FDG (5-Dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-Galactopyranoside) を反応させると、波長が緑色の領域の蛍光を発する物質が生成される。この蛍光強度を測定することで、細胞老化促進の程度を高速、高分解度で調べることができる。

2.4.4.2 実験手法

放射線照射された細胞に対し、DMSOで20 μMの濃度に調整したC₁₂FDG (Setareh Biotech, Eugene, OR, USA) 混合培地と交換し、インキュベーターにて2時間反応させた。その後、2度PBSで表面を洗浄し、トリプシン処理を

行い、冷 PBS で洗淨、懸濁させた。セルストレーナーでフィルトレーションした溶液をフローサイトメーターFACS Calibur で測定した。反応による生成物の蛍光は FL1 で検出した。解析は Flow Logic を用いて行った。横軸を FSC、縦軸を FL1 とした展開データにおいて、未照射の対照群データを参考に、縦軸に対して SA-βGal ポジティブとネガティブの領域の境界をゲーティング設定した。その境界をもとに SA-βGal ポジティブ細胞の割合を定量した。

細胞染色は放射線照射 3 日後 (72 時間後) に行った (図 2-1)。照射した線量として X 線、炭素線ともに 4 Gy を用いた。

2.5 ウェスタンブロッティング

2.5.1 原理

放射線による様々な影響を分子レベルで詳細に調べる上で、タンパク質の挙動を調べることは重要である。ウェスタンブロッティングは、電気泳動により分離したタンパク質を抗体反応により特異的に検出する方法で、1979年に発表されてからタンパク質の検出において最も広く用いられている手法である。通常タンパク質検出は主に、タンパク質の抽出・精製、**SDS-PAGE**によるタンパク質の分離、ウェスタンブロッティングのステップに分けられる。

タンパク質の抽出・精製

標的タンパク質の局在にもよるが、細胞を界面活性剤などで可溶化して溶解し、タンパク質を定量後、タンパク質分解酵素の不活性化（プロテアーゼ阻害）を目的に、抽出タンパク質を薬剤や温度により変性させ安定化を図る。

SDS-PAGEによるタンパク質の分離

タンパク質はゲル中で電気泳動させることで、ゲルの網目構造による分子ふるい効果により分離でき、分子量が小さいタンパク質ほど移動度が大きい。移動速度はタンパク質の高次構造や電荷の影響も受けるため、そのような影響を排除できる SDS (sodium dodecyl sulfate) を用いて電気泳動を行う。ゲルは、低分子のタンパク質の分離に適しているポリアクリルアミドゲル (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis : PAGE) が用いられる。これらの組み合わせによる電気泳動法から SDS-PAGE と呼ばれる。

ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE によって分離されたタンパク質を抗体反応により検出するため、まずタンパク質が結合しやすい PVDF (polyvinylidene difluoride) やニトロセルロースなどのメンブレンに、タンパク質が転写 (ブロッティング) により移される。ゲルのままでは、タンパク質がゲル中で拡散したり、抗体がゲル中に浸透し難いためである。メンブレンに固定されたタンパク質は、間接法という方法で検出される。間接法では、まずタンパク質と特異的に結合する一次抗体を反応させ、その後酵素や蛍光により標識された一次抗体と特異的に結合する二次抗体を反応させる。標識された抗体の検出について、化学発光の場合は X 線フィルムへの露光検出などが用いられる。

以上のステップを経ることで標的のタンパク質を特異的に検出できる。

2.5.2 実験手法

サンプル作製

放射線照射された細胞を氷上で急冷して、冷 PBS で細胞表面を 2 度洗浄した。T25 フラスコに対し、RIPA バッファーを 200 μ L 加え、セルスクレーパーで細胞を回収した。(次のステップまで、 -80°C で保存可能) 時々ボルテックスで攪拌しながら 20 分間氷上で可溶化させ、15,000 rpm で遠心して上清をタンパク溶液として回収した。タンパク質定量は BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて、プレートリーダーにより測定した。定量後、タンパク溶液とサンプルバッファーを混合して、 95°C で 5 分間煮沸したものをサンプルとした。

SDS-PAGE

アクリルアミドの濃度が 4-15% のグラジエントゲル (ミニプロティアン® TGX™ プレキャストゲル) を用いて、5~10 μ g のタンパク質を SDS-PAGE により分離した。電気泳動の条件は定電流 20 mA で行った。

ウエスタンブロットティング

SDS-PAGE 後のゲルは、転写バッファーで 5 分間振とう \times 2 回行って平衡化した。ゲル中のタンパク質をメタノールで平衡化した PVDF メンブレンに転写した。転写は、低電圧 40 V、 4°C 、オーバーナイト (15 時間程度) の条件で行った。転写後のメンブレンはブロッキングバッファー (iBlock™) で 1 時間振とうした (室温条件)。その後、1 次抗体を 4°C 、オーバーナイトの条件で振とうした。TBS-T で 10 分間振とう \times 3 回行って、2 次抗体 (AP 標識, Sigma-Aldrich) で 1 時間振とうした (室温条件)。TBS-T で 10 分間振とう \times 3 回行った後、アルカリ性溶液で 5 分間振とう \times 2 回行って、ALP 染色液 (CDP Star™, Sigma-Aldrich) でメンブレンを染色し、ラップに挟んだ。LAS-4000 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて化学発光によりタンパク質を検出した。本研究で用いた 1 次抗体 (anti-p21, anti-GAPDH, anti-p16, anti-phospho DNA-PKcs(S2056)) は全て Cell Signaling Technology から購入した。

2.6 データ解析

全てのデータにおいて統計解析は、GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。データの平均値の比較は t 検定を用いて行い、P 値が 0.05 未満のとき ($p < 0.05$)、統計的有意差があるとみなした。各実験は少なくとも 2 回以上行い、グラフ中のデータ値は平均値 \pm SD (standard deviation) で表した。

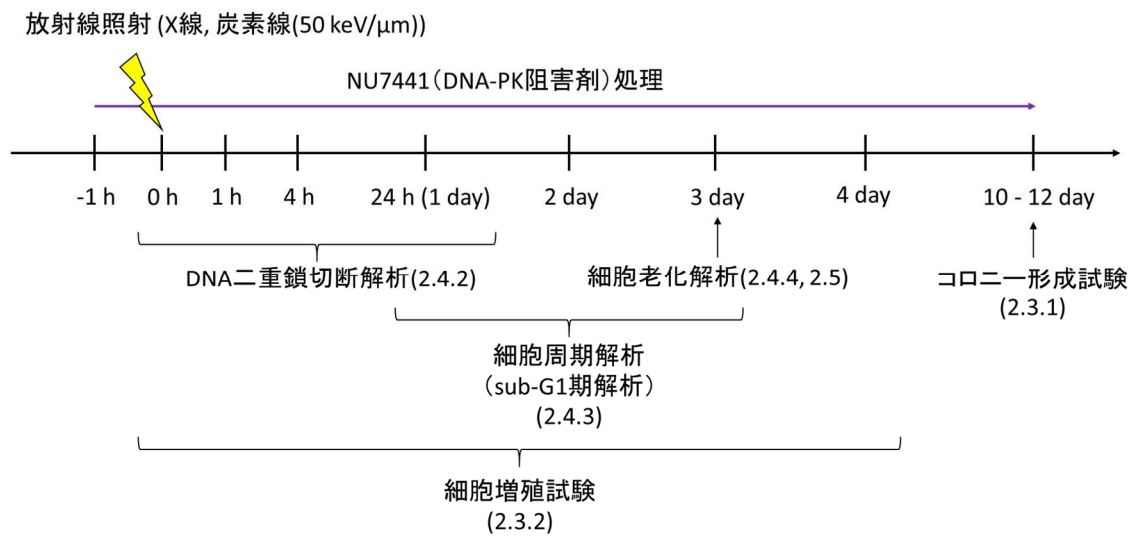


図 2-1 主な実験工程

第3章 低濃度 DNA-PK 阻害剤と放射線の併用効果

3.1 背景と目的

1.2.3 で述べたように、DNA-PKcs は DSB 修復における NHEJ 経路で主に働くと考えられていたが、遺伝子を抑制した細胞においては、DSB 修復阻害を起こさない DSB 修復非依存的な放射線増感が示唆された²⁰。DNA-PKcs のタンパク質合成を部分的に抑制しても、修復に必要なだけの DNA-PKcs が合成され、DSB 箇所に集まることで通常通りの修復が行われると考えられる。一方で、タンパク質の機能を抑制する手段としては、遺伝子ノックダウン以外にも阻害剤によるタンパク機能の抑制方法が挙げられる。これまでの研究では、阻害剤の濃度に関する詳細な検討は行われてこなかった。

そこで本章では、特異的な DNA-PK 阻害剤 NU7441 を用い¹⁸、放射線増感の濃度依存性を調べることを目的とした。特に低濃度領域で放射線と併用することで、遺伝子ノックダウンによる放射線増感と同様に DNA-PK の働きが部分的に抑えられ、DNA 修復に依存しない放射線増感が誘導されるという仮説を立て、その検証を行った。臨床の状況を想定すると、低濃度薬剤効果の知見は正常組織への副作用低減の面で有用と考えられ、正常細胞に対する薬剤毒性も合わせて議論する。

3.2 実験結果

3.2.1 低濃度 NU7441 と X 線併用による放射線増感効果

ヒト肺由来正常線維芽細胞 HFL1 細胞とヒト肺がん細胞 A549、H1299 細胞に対して、NU7441 の細胞生存率をコロニー形成試験により調べた。HFL1 細胞において、NU7441 濃度 0.3, 1, 3 μM に対する細胞生存率は、濃度依存的に低くなった (図 3-1)。対照群 (Control) と比較して、0.3 μM は統計的に有意な細胞毒性を示さなかった。A549、H1299 細胞において、NU7441 濃度 0.03, 0.3, 3 μM に対する細胞生存率は、正常細胞同様に濃度依存的に低くなり、0.3 μM 以下は細胞毒性を示さなかった (図 3-2)。このことから 0.3 μM 以下の NU7441 を正常、がんの両細胞に対して毒性を示さない無毒性濃度とした。

NU7441 と X 線の併用効果における NU7441 の濃度依存性を調べるため、A549、H1299 細胞に対してコロニー形成試験により評価した。X 線照射 4 Gy と NU7441 (0.03~3 μM) との併用効果を調べた (図 3-3、3-4)。両細胞において全濃度で Control と比べ統計的に有意に細胞生存率が低下し、濃度依存性も見られた。このことから無毒性濃度 (0.3 μM 以下) の NU7441 でも、放射線増感効果が見られた。NU7441 (0.3 μM) の併用効果を生存率曲線で表した (図 3-5、3-6)。X 線照射の全線量 (2, 4, 6 Gy) で、単独照射群よりも NU7441 併用群の方が、有意に細胞生存率が低くなり、放射線増感効果が見られた。増感剤の効果の指標である増感比 (sensitization enhancement ratio : SER) は以下の式 3.1 で表す。

$$SER(10) = \frac{D_{10}(\text{放射線単独照射群})}{D_{10}(\text{増感剤併用群})} \quad (3.1)$$

ここで、 D_{10} (Gy) は細胞生存率を 10%にする放射線照射された線量である。それぞれの生存率曲線を LQ モデルで近似した。A549、H1299 細胞における X 線単独照射群の D_{10} 値は 7.07、6.79 Gy、NU7441 併用群の D_{10} 値は 4.00、3.50 Gy と算出された。したがって A549、H1299 細胞における NU7441 (0.3 μM) による SER (10) はそれぞれ 1.77、1.94 と算出され、H1299 細胞における SER の方が高いことがわかった。p53 遺伝子の関連を調べるため、正常な p53 遺伝子を導入した p53 野生型 (p53 wt) H1299 細胞に対して、X 線 4 Gy と NU7441 (0.3 μM) の併用効果をコロニー形成試験により調べた (図 3-7)。Control 群では、p53 野生型 (p53 wt) H1299 細胞の方が p53 欠損型 (p53 null) H1299

細胞よりも放射線感受性は高くなった。一方で NU7441 併用群では、p53 欠損型 (p53 null) H1299 細胞の方が細胞生存率は低くなった。

3.2.2 NU7441 による DSB 修復阻害効果

NU7441 の DSB 修復阻害効果を調べるため、A549、H1299 細胞における X 線照射後の DSB レベルを、 γ H2AX を指標としてフローサイトメーターにより測定した。X 線 4 Gy 照射 24 時間後において、DSB レベルの NU7441 濃度依存性を調べた (図 3-8、3-9)。A549 細胞では 1, 3 μ M、H1299 細胞では 3 μ M で Control (単独照射) 群と比較して DSB レベルが有意に高くなり、長期的な DSB 修復阻害を引き起こした。一方で、両細胞とも 0.3 μ M 以下では、DSB レベルは Control 群との有意差はなく、DSB 修復阻害は見られなかった。

DSB レベルの時間挙動を調べた。X 線 4 Gy 照射 1, 4, 24 時間後の DSB レベルを Control, 0.3, 3 μ M で比較した (図 3-10、3-11)。Control 群は、照射 1 時間後 (初期損傷) から 24 時間後まで時間経過とともに DSB レベルが低下し、修復の様子が確認できた。照射 1 時間後においては、0.3, 3 μ M はともに Control 群と同等レベルであった。24 時間後までは、3 μ M では時間経過とともに修復阻害効果が見られたが、0.3 μ M ではそのような効果は見られなかった。

DNA-PKcs 遺伝子について、N 末端から 2056 番目のセリン残基がリン酸化されたリン酸化 DNA-PKcs (DNA-PKcs (S-2056)) タンパクへの影響を調べた。ウエスタンブロッティングにより X 線 4 Gy 照射 1 時間後の発現量を測定したところ、NU7441 の濃度依存的に DNA-PKcs (S-2056) の発現量が減少した (図 3-12)。

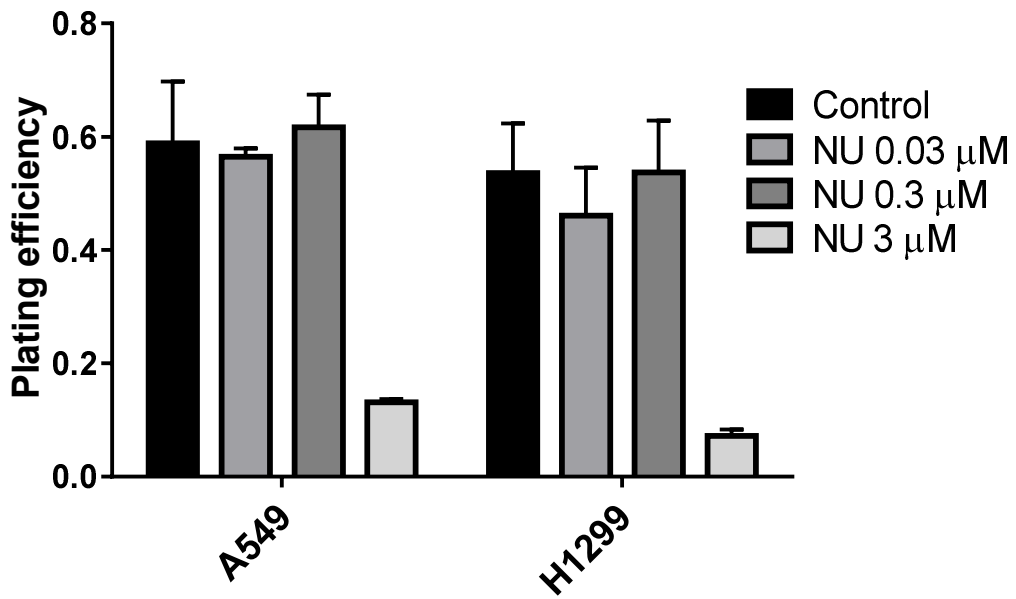


図 3-1 NU7441 による肺がん細胞（A549、H1299）の細胞生存率

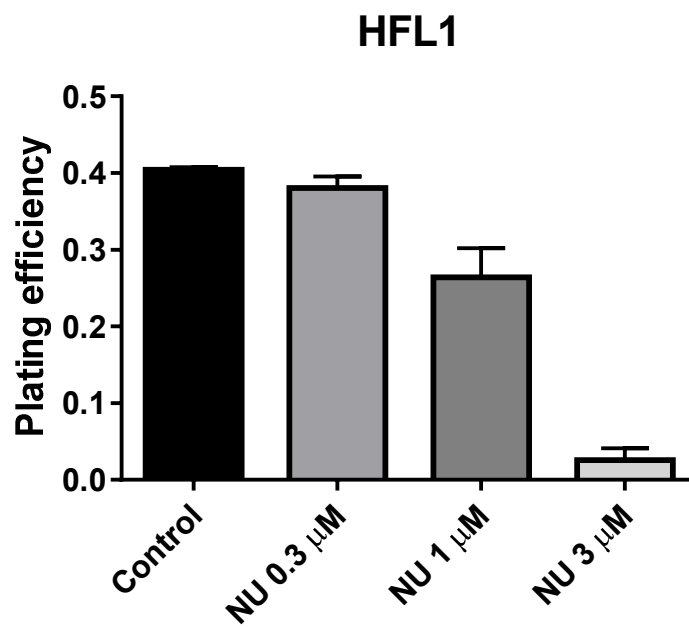


図 3-2 NU7441 によるヒト肺由来正常細胞（HFL1）の細胞生存率

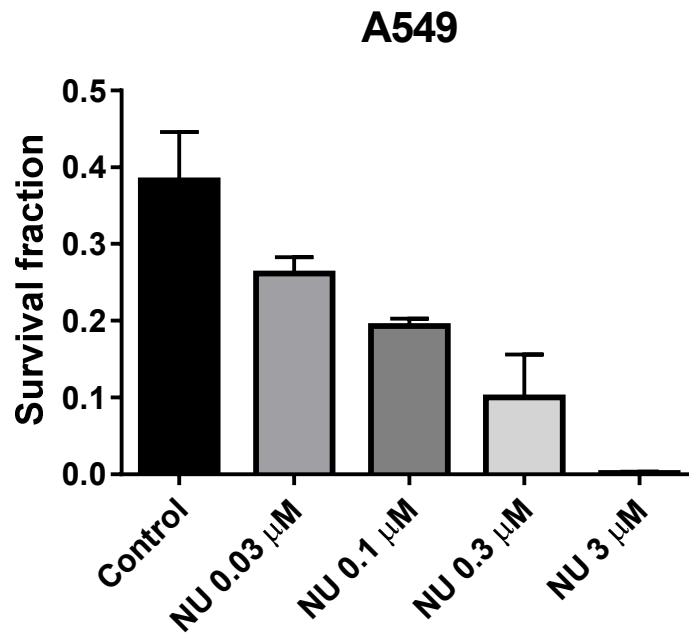


図 3-3 X線（4 Gy）と NU7441 の併用による A549 細胞の細胞生存率

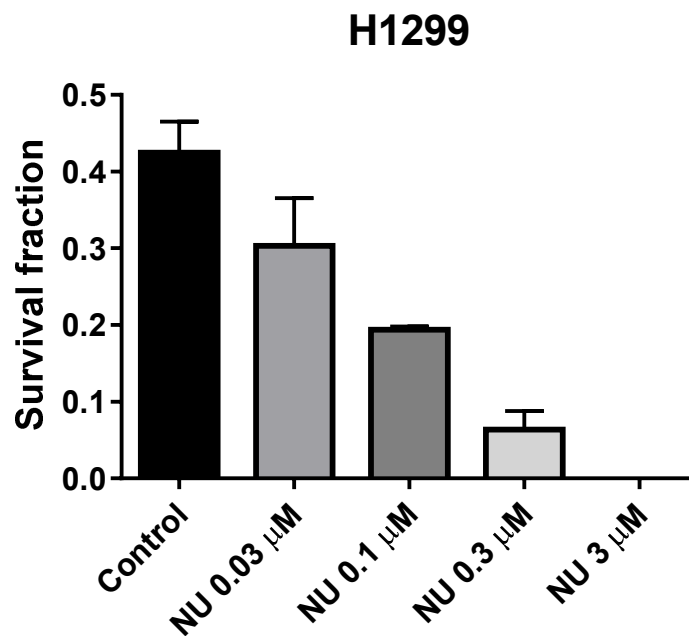


図 3-4 X線（4 Gy）と NU7441 の併用による H1299 細胞の細胞生存率

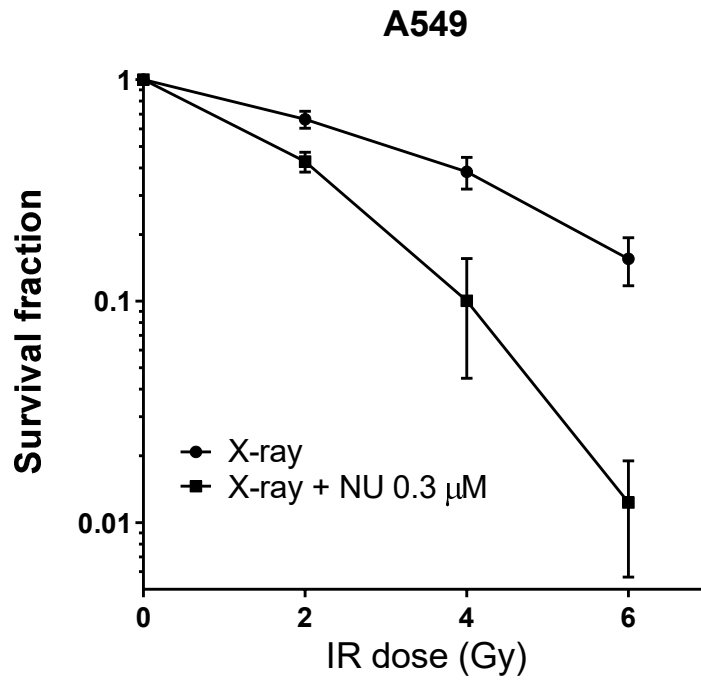


図 3-5 X線と低濃度 NU7441 (0.3 μM) の併用による A549 細胞の生存率曲線

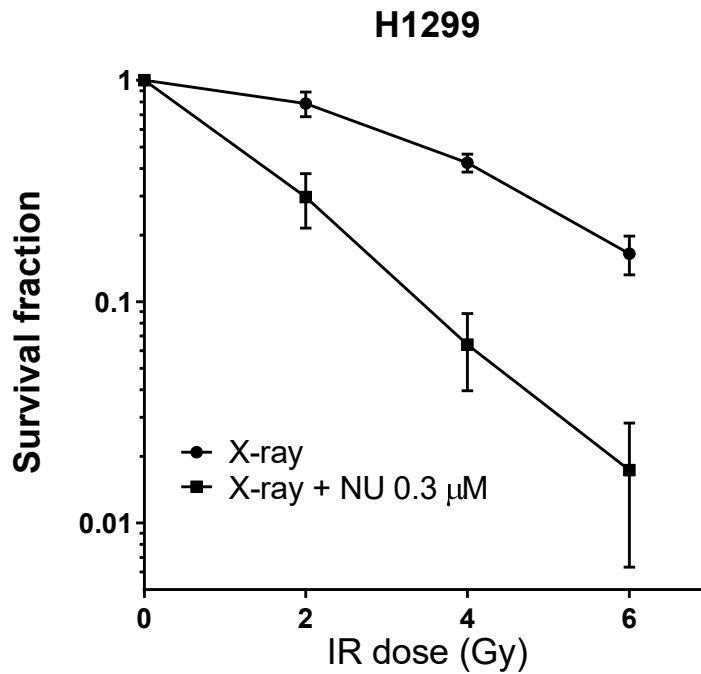


図 3-6 X線と低濃度 NU7441 (0.3 μM) の併用による H1299 細胞の生存率曲線

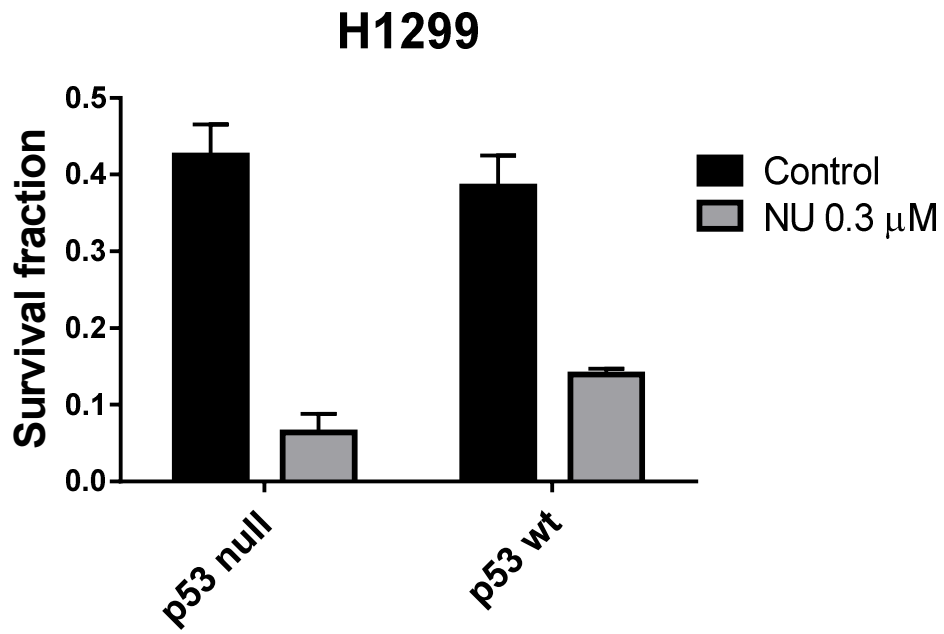


図 3-7 X線 (4 Gy) と低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用による p53 遺伝子欠損型と野生型 H1299 細胞の細胞生存率

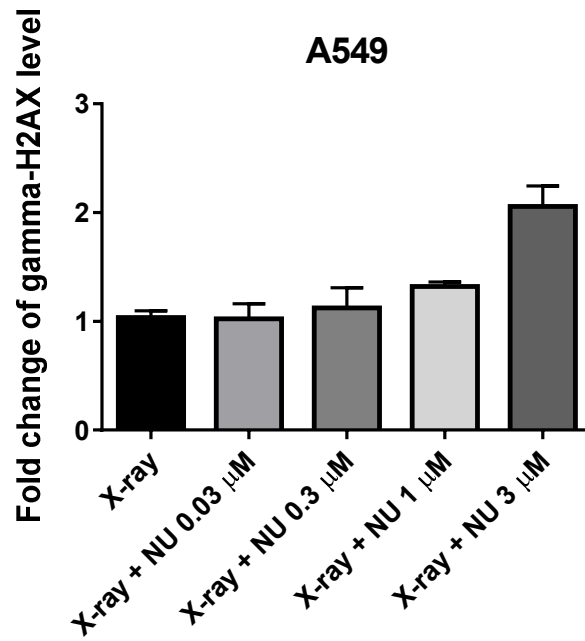


図 3-8 NU7441 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射 24 時間後の A549 細胞における γ H2AX レベル

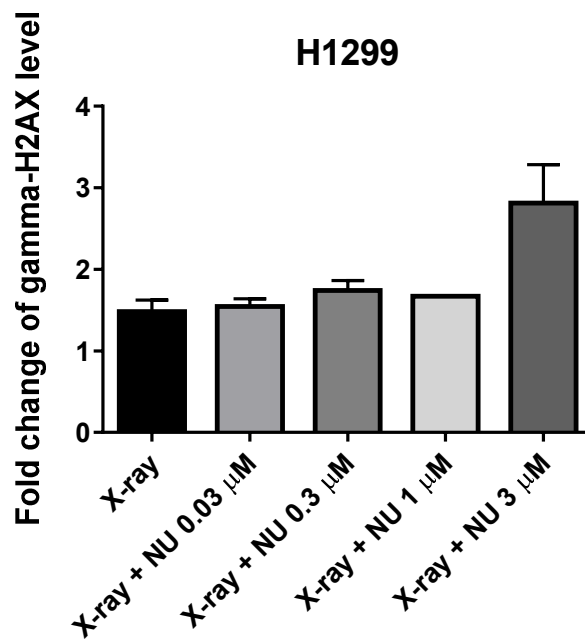


図 3-9 NU7441 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射 24 時間後の H1299 細胞における γ H2AX レベル

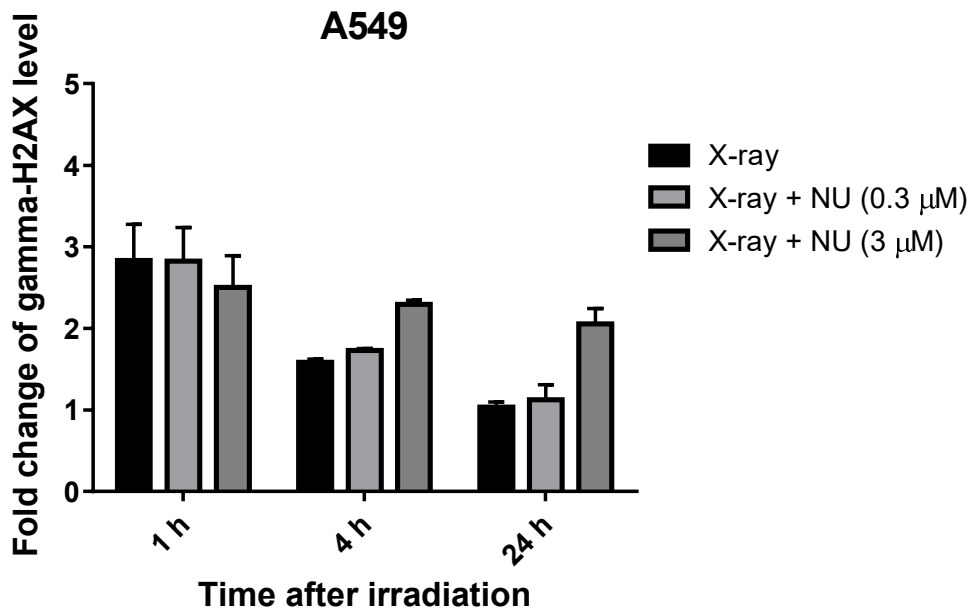


図 3-10 NU7441 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射後の A549 細胞における γ H2AX レベルの時間挙動

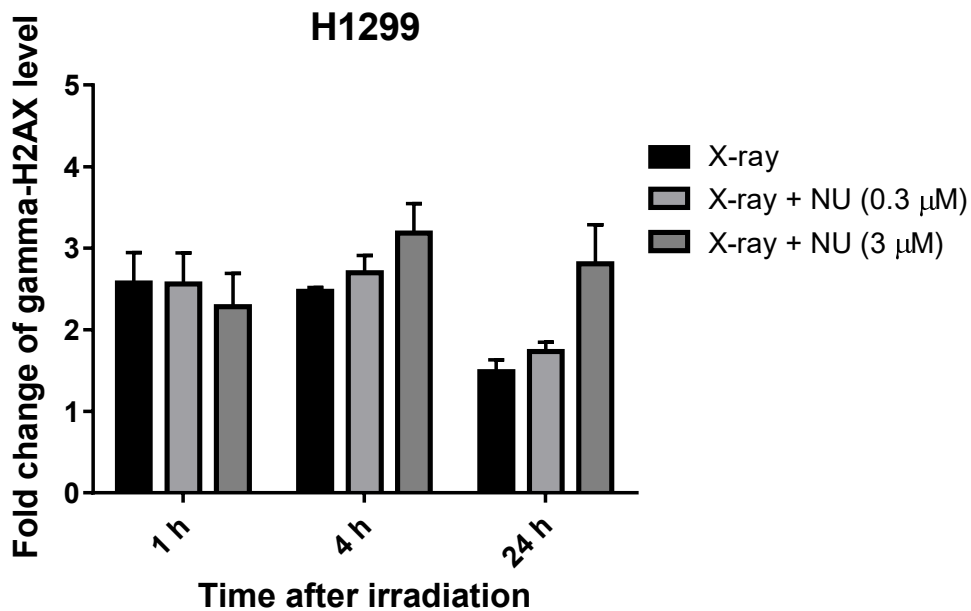


図 3-11 NU7441 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射後の H1299 細胞における γ H2AX レベルの時間挙動

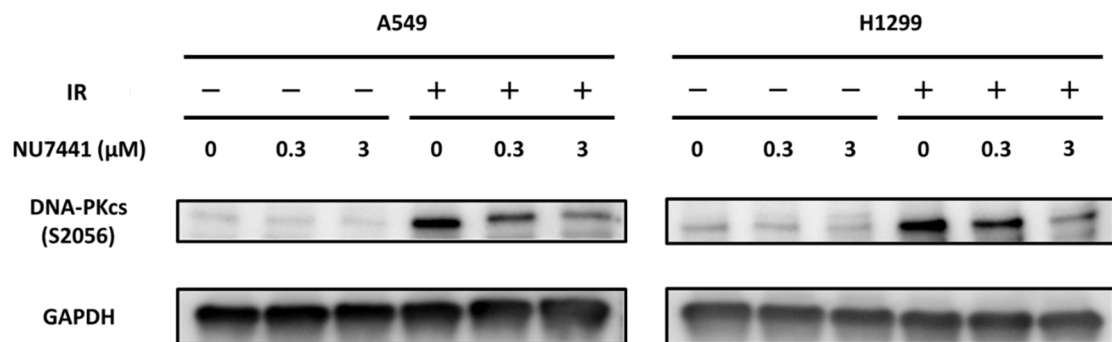


図 3-12 NU7441 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射 1 時間後のリン酸化 DNA-PKcs (S2056) タンパクの発現解析

3.3 考察

DNA-PK 阻害剤 NU7441 と放射線の併用効果における濃度依存性を評価した。細胞生存率の観点から正常細胞、がん細胞ともに毒性を示さなかった 0.3 μM の NU7441 は X 線との併用で有意な放射線増感効果を示した。これまで NU7441 の放射線増感に関する基礎研究は多数報告されているが、用いられている濃度は 1~10 μM と本研究での無毒性濃度の 3~30 倍程度であり、正常細胞に対する毒性影響は考慮されていない^{18,43-45}。Zhao. Y らの報告では、ヒト腫瘍移植モデルのマウスに 10 mg/kg の NU7441 を腹腔内注射により導入後、NU7441 の腫瘍への取り込み量の時間挙動は、30 分後に 5 μM 前後で最大となり、そこから急速に落ち込み 1 時間後にはほとんどが排出されてしまう¹⁸。DSB 誘導剤である etoposide との併用効果も細胞実験ほどの有意な増感効果は確認されなかった。また他の DNA-PK 阻害剤の動物試験報告も含め阻害剤単独による腫瘍抑制との相加効果の枠を出ない結果も多い^{46,47}。原因として、DNA-PK 阻害剤の滞留性の低さにより増感効果を得るための時間が限定的であることが挙げられる。腫瘍内の滞留性を高めるため、短時間ごとの投与回数を増加して、腫瘍内の濃度を持続的に保持する必要があると考えられる。一方で、10 mg/kg の NU7441 投与ではマウスの体重もほとんど落ちず、動物への毒性は低い。本研究で見出した低濃度による増感効果からは、投与量を 1/10 程度まで抑えて腫瘍への最大取り込み量を 0.5 μM 前後まで低くしても効果が期待できるため、投与回数の増加も可能と考えられる。

興味深いことに、増感効果の指標である SER は、p53 遺伝子に異常を持っている細胞の方が高い傾向にあった。一般的に、p53 が正常な細胞は放射線に感受性であり、異常な細胞は抵抗性を示す⁴。通常放射線治療では、p53 に異常ながん細胞に対する放射線抵抗性だけでなく、正常な p53 を有する正常細胞に対する耐用線量も深刻な問題となり得る。一方で、NU7441 を併用する場合、正常細胞に対する増感効果も考慮しなければならないが、上記の結果からは p53 に異常があるがん細胞の方でより高い増感効果が期待できる。これらの知見は臨床面でも生かせると考えられる。

また、NU7441 による DSB 修復阻害効果の濃度依存性を評価した。3 μM と濃度が高い場合は、有意に DSB 修復阻害が引き起こされたが、無毒性濃度 (0.3 μM 以下) ではそのような効果が見られず、DNA 修復に依存しない放射線増感が見られた。DNA-PK 阻害剤による放射線増感、NHEJ 経路による DSB 修復を阻害することで、修復がうまくいかず細胞死が誘導されると考えるのが通説であった^{48,49}。これまでも、本研究同様 γH2AX を指標とする DSB 修復挙動については数多く報告があるが⁵⁰⁻⁵²、低濃度併用に関する報告はなかった。こ

れにより、DNA-PKcs の siRNA ノックダウンによる放射線増感機構と同様に、低濃度 DNA-PK 阻害剤と X 線との併用は、DSB 修復阻害に依存しない放射線増感機構により細胞死が誘導されることが示唆された。NU7441 は、NHEJ 経路で働くリン酸化 DNA-PKcs タンパク (DNA-PKcs (S-2056)) の発現を抑制することが知られている⁵³。本研究では、低濃度 NU7441 (0.3 μM) でも DNA-PKcs (S-2056) の発現は抑制された。10 倍の濃度の 3 μM においても全ての発現は抑えられていなかった。仮説では、一部でも修復タンパクが残存していれば、通常通りの DSB 修復が行われると考えていた。そのため 3 μM の濃度でも放射線単独照射と同様な DSB 修復が行われると考えられるが、DSB 修復の解析結果からは 1 μM 前後と 3 μM よりも低い濃度で DSB 修復阻害が観察されはじめた。DSB 修復阻害の程度も、濃度依存的に 1 μM よりも 3 μM の方が阻害効果は高いことから、あるしきい点を境に濃度が高くなると、修復が通常通りに行えなくなることが示唆された。1 μM 前後で修復阻害が起こり始めることから、その濃度域に修復阻害を引き起こすしきい点濃度が存在すると考えられる。

3.4 まとめ

本章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤と放射線の併用効果を調べることを目的に、DNA-PK 阻害剤の併用効果の濃度依存性を調べた。そこで、正常細胞とがん細胞に対し無毒性を示す濃度 (0.3 μM) は、放射線増感効果を示すとともに、DSB 修復阻害を引き起こさないことを見出した (図 3-13)。本研究における濃度に関する知見は、投与量や投与タイミングの最適化に有用であり、臨床応用へ向けた戦略構築に貢献できると考えられる。

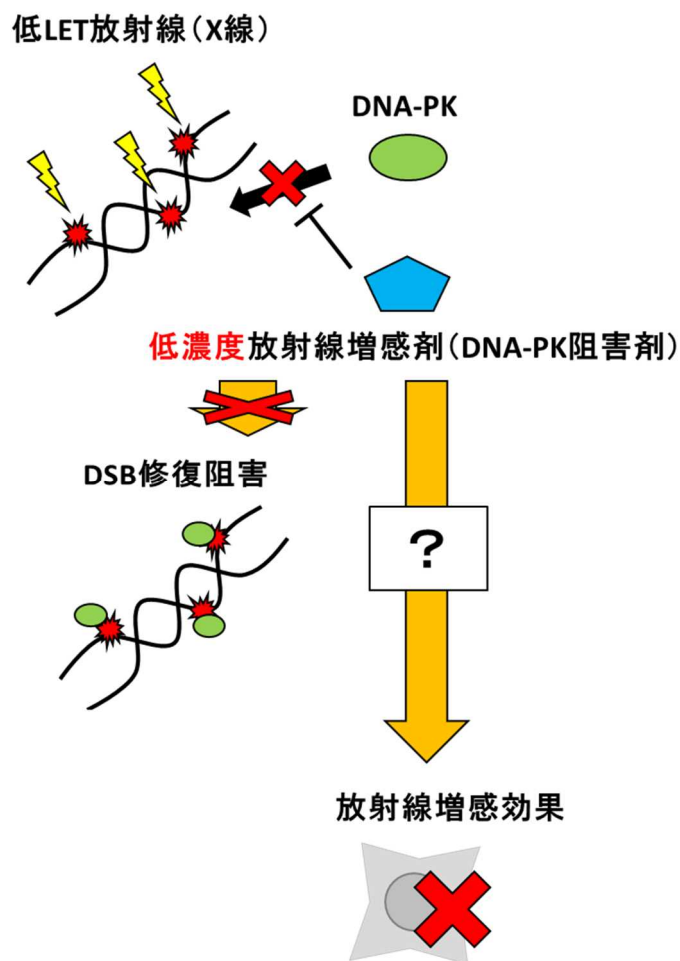


図 3-13 第 3 章のまとめ図

第 3 章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤と低 LET 放射線の併用により DSB 修復阻害に依存しない放射線増感経路の存在が見出された。

第 4 章 低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感のメカニズム

4.1 背景と目的

第 3 章では、DNA-PK 阻害剤 NU7441 を低濃度で放射線と併用することで、DSB 修復に依存しない放射線増感が引き起こされることを見出した。DNA-PK タンパクは、阻害剤によりたとえ一部のタンパクの働きが抑制されても、ある一定量だけ機能できる状態であれば、単独照射群における DNA 修復と同様に DNA-PK が損傷箇所和不足することなく局在し通常通りの修復が行われることが示唆された。これらの結果は、A. Gustafsson らによる遺伝子ノックダウンされた細胞の実験系でも同様の現象が分子レベルで確認されており²⁰、これまでの DNA-PK 阻害による放射線増感機構とは異なる新たな分子機構探索の可能性が本研究においても示された。しかし、DNA-PK の修復機能を一部抑制することによる放射線増感は、DSB 修復の挙動との関連しか報告されておらず、詳細についてはわかっていない。

そこで、本章では低濃度 DNA-PK 阻害剤が DSB 修復に依存しない放射線増感を引き起こすメカニズム解明を目的とした。第 3 章同様、低濃度 NU7441 (0.3 μM) と X 線の併用による放射線増感を様々な観点から調べ、さらには細胞死の影響にまで言及した。特に 3.2.1 で示した p53 遺伝子のステータスによる放射線増感効果の違いを詳細に調べることは、臨床応用へ向けてだけでなく学術的な面においても意義がある。

4.2 実験結果

4.2.1 低濃度 NU7441 と X 線併用の細胞周期に対する影響

低濃度 NU7441 と X 線併用による影響を、ヒト肺がん細胞 A549、H1299 細胞に対して細胞増殖試験により調べた。NU7441 (0.3 μ M) と X 線照射 (4 Gy) の併用が細胞増殖に与える影響を、照射後 1 日ごとに 4 日間にわたって細胞数をカウントしてモニタリングした (図 4-1、4-2)。3.2.1 の結果と同様、0.3 μ M の NU7441 は細胞数において Control 群との有意差は見られず、無毒性濃度であることが確認された。照射群では、X 線単独照射群よりも NU7441 併用群の方が増殖抑制の程度が強く、両細胞で時間経過とともに細胞数の差が広がっていく様子が見られた。細胞増殖抑制は、照射 1 日後から起こり始めた (図 4-3、4-4)。単独照射群と NU7441 併用群を比較すると、p53 が野生型の A549 細胞 ($p=0.068$) よりも欠損型の H1299 細胞 ($p<0.001$) の方が、NU7441 による増殖抑制の程度が強かった。

細胞周期に対する影響を調べた。A549、H1299 細胞において、NU7441 (0.3 μ M) と放射線照射 (4 Gy) の併用に対する照射 24 時間後の細胞周期の分布を表す (図 4-5、4-6)。無毒性 NU7441 は両細胞で Control 群と比べて細胞周期分布に影響を与えなかった。放射線単独照射群でも、細胞周期分布は Control 群と変わりなかった。一方で、NU7441 併用群は単独照射群と比べて G2/M 期の細胞割合が顕著に増加していることが確認された。また、両細胞で S 期の割合が減少していることも確認された。X 線単独照射と比べ NU7441 併用群の G2/M 期の細胞割合は、A549 細胞では約 20%から 40%に増加し、H1299 細胞では約 20%から 60%に増加し、H1299 細胞でより高い増加率で G2/M 期の細胞が見られた。

4.2.2 低濃度 NU7441 と X 線併用の細胞死に対する影響

低濃度 NU7441 と X 線併用による放射線増感における細胞死の形態や寄与を調べるため、sub-G1 期解析と細胞老化解析を A549、H1299 細胞に対して行った。NU7441 (0.3 μ M) と X 線照射 (4 Gy) の併用の影響を調べた。照射後 1 日ごとに 3 日間にわたって sub-G1 期解析をフローサイトメーターにより測定した (図 4-7、4-8)。両細胞において NU7441 は、sub-G1 期の細胞割合は増加させなかった。照射群について、A549 細胞では、単独照射群や NU7441 併用群のどちらにおいても sub-G1 期の細胞割合で大きな変化は見られなかった。一方で H1299 細胞では、X 線による増加は大きくないが、NU7441 との併用で sub-

G1 期の細胞割合が顕著に増加した。照射 1 日後から 2 日後にかけて上記割合は最も増加し、約 10%から 30%まで増加した。その後 3 日目にかけての有意な増加は見られなかった。

細胞老化がどの程度促進されるかについて、SA-βGal 陽性細胞の割合と重要な細胞老化関連タンパク質である p21 タンパクの発現解析により調べた。照射 3 日後の SA-βGal 陽性細胞の割合をフローサイトメーターにより測定した (図 4-9、4-10)。無毒性の NU7441 は SA-βGal 陽性細胞の割合を増加させず、細胞老化も引き起こさなかった。単独照射群は、A549、H1299 両細胞で Control 群よりも SA-βGal 陽性細胞の割合は増加した。NU7441 併用群については、単独照射群よりも増加傾向が見られ、増加率は H1299 細胞の方が高かった。また、照射 3 日後の p21 の発現をウエスタンブロッティングにより解析した (図 4-11)。A549 細胞では、Control (未照射) 群に比べ、照射群で p21 の発現上昇が見られ、さらに NU7441 の併用でより強い発現が見られた。一方で H1299 細胞では、どの処理方法においても p21 の発現は見られなかった。

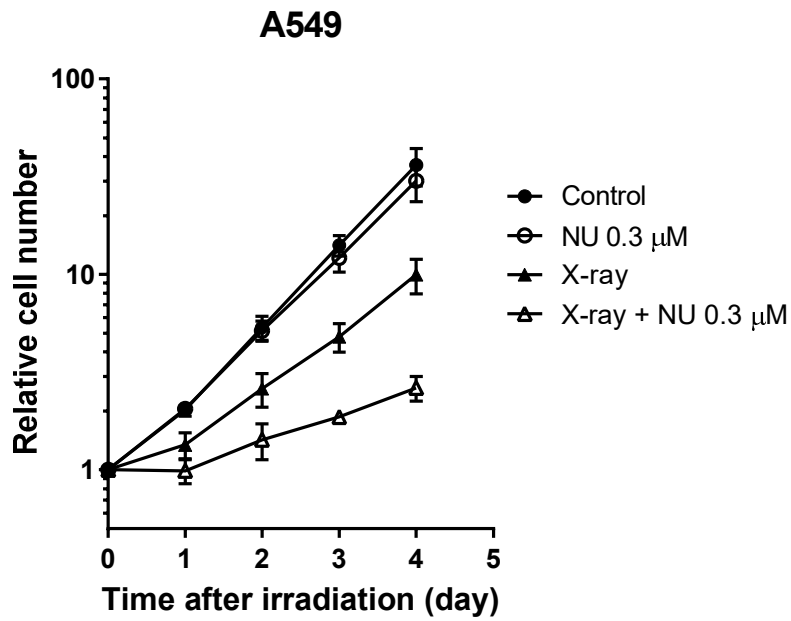


図 4-1 X線（4 Gy）と低濃度 NU7441（0.3 μM）併用による A549 細胞の増殖曲線

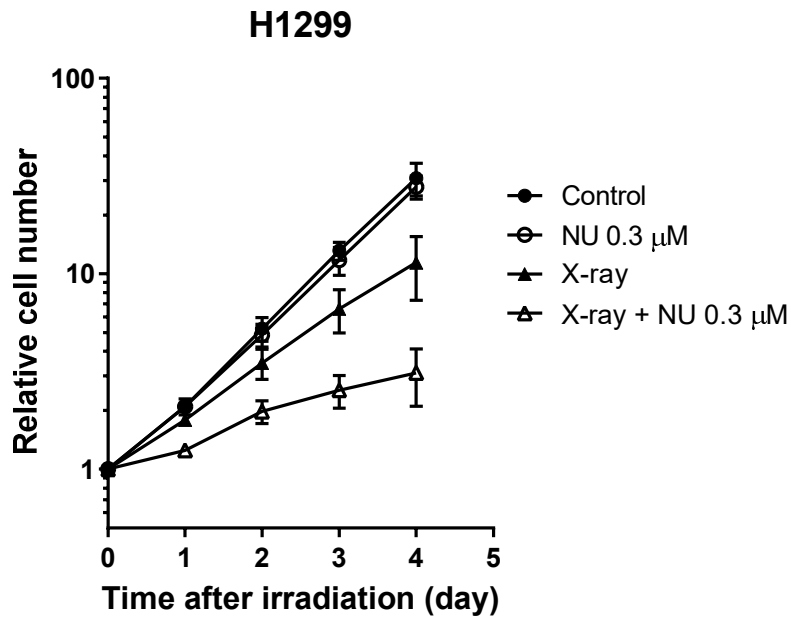


図 4-2 X線（4 Gy）と低濃度 NU7441（0.3 μM）併用による H1299 細胞の増殖曲線

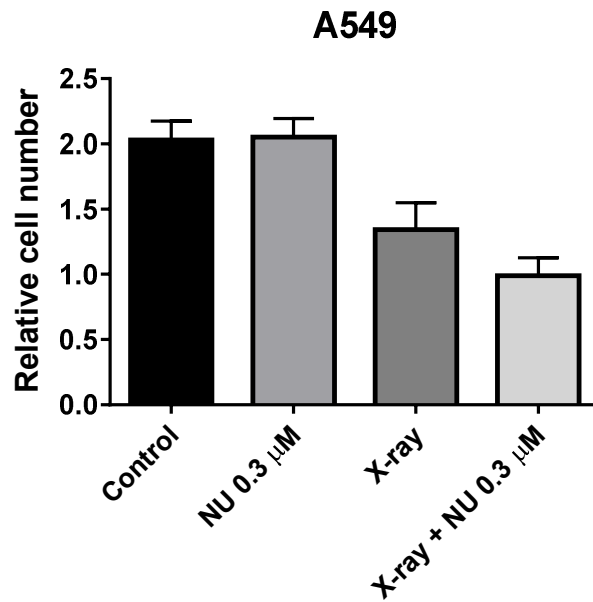


図 4-3 X線 (4 Gy) と低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する照射 1 日後の A549 細胞の相対細胞数

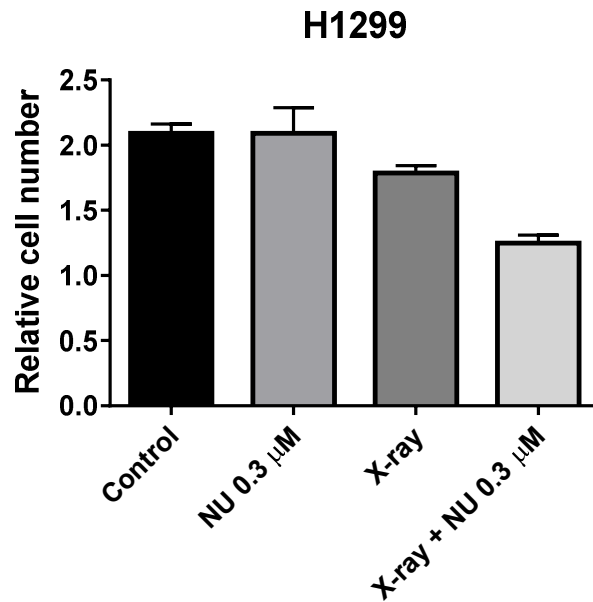


図 4-4 X線 (4 Gy) と低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する照射 1 日後の H1299 細胞の相対細胞数

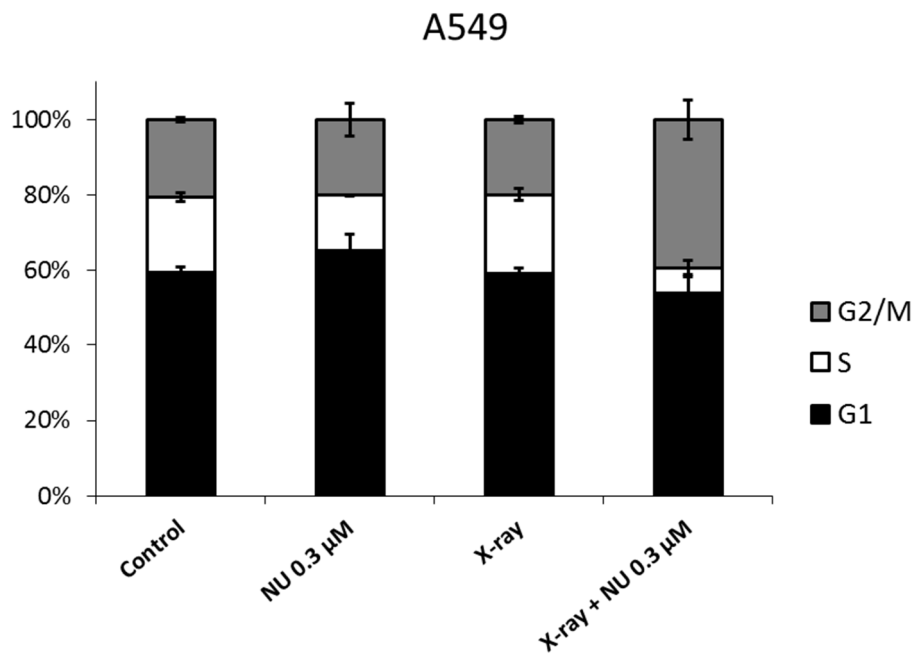
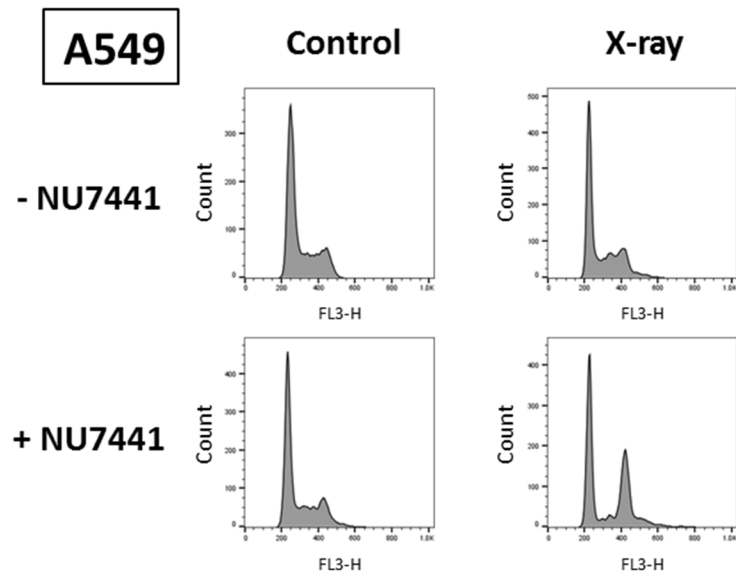


図 4-5 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射 24 時間後の A549 細胞における細胞周期分布

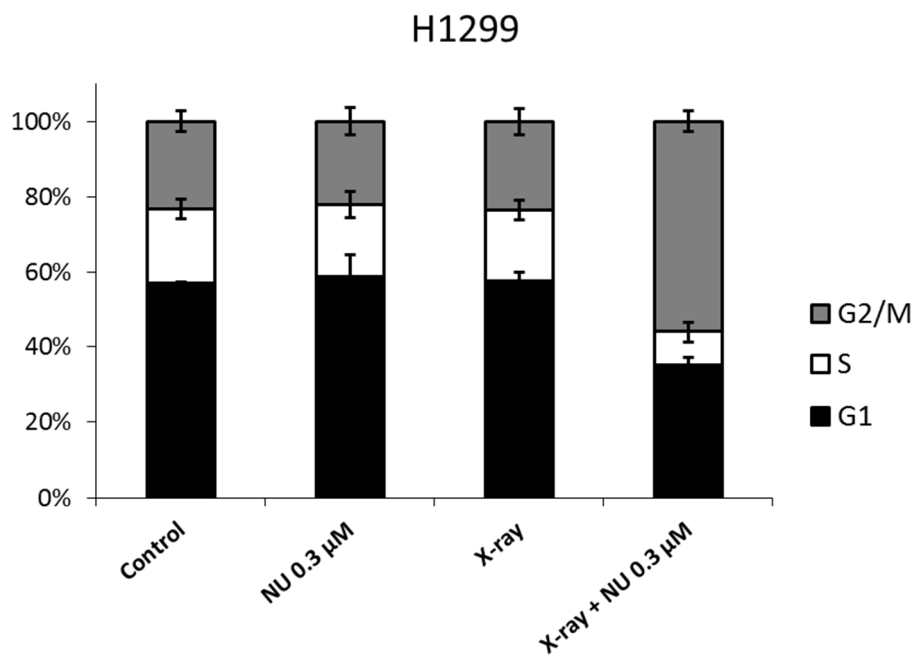
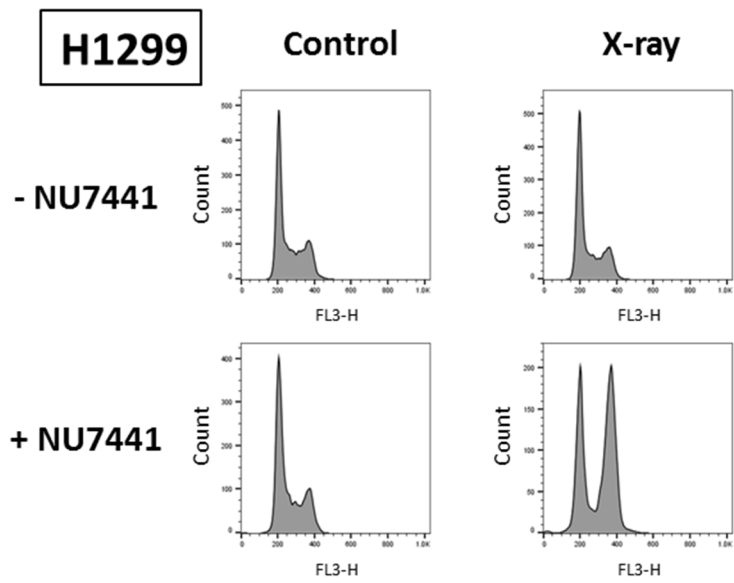


図 4-6 低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射 24 時間後の H1299 細胞における細胞周期分布

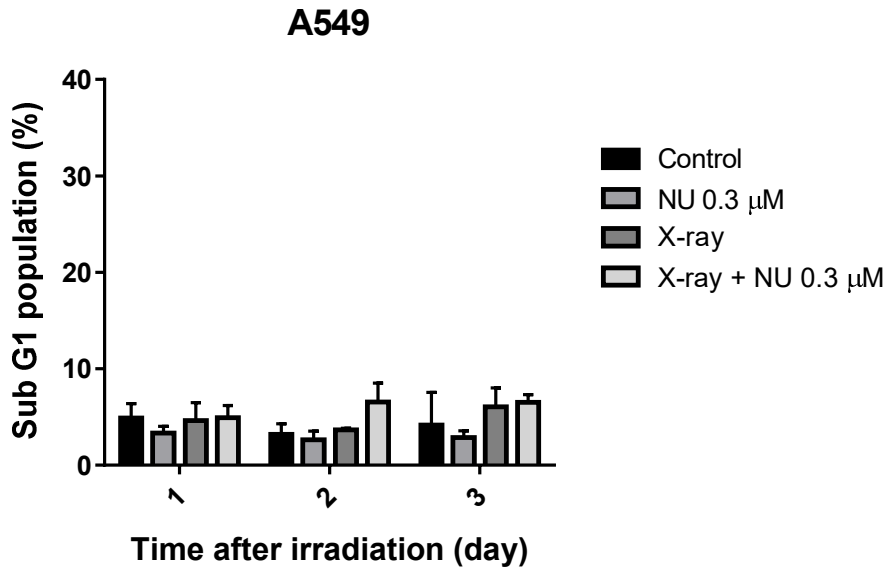


図 4-7 低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射後の A549 細胞における sub-G1 期細胞の割合の時間挙動

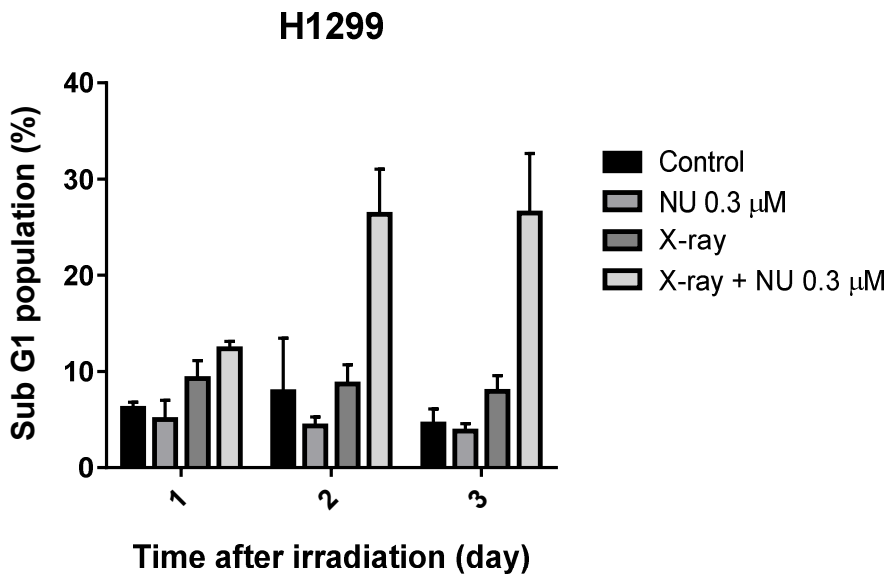


図 4-8 低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射後の H1299 細胞における sub-G1 期細胞の割合の時間挙動

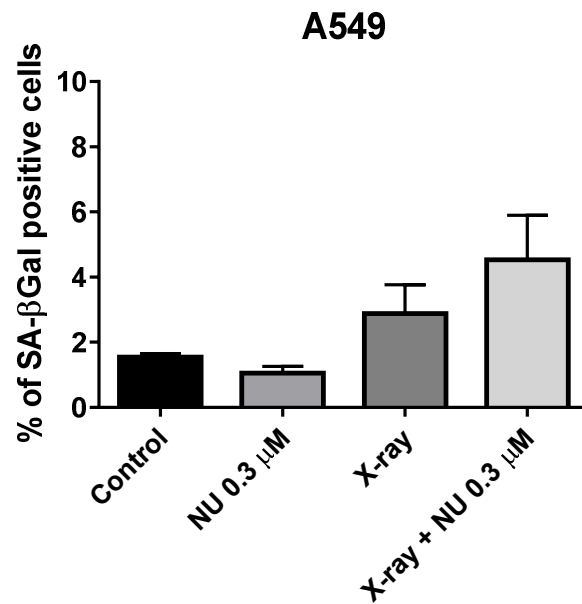


図 4-9 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射 3 日後の A549 細胞における SA-βGal 陽性細胞の割合

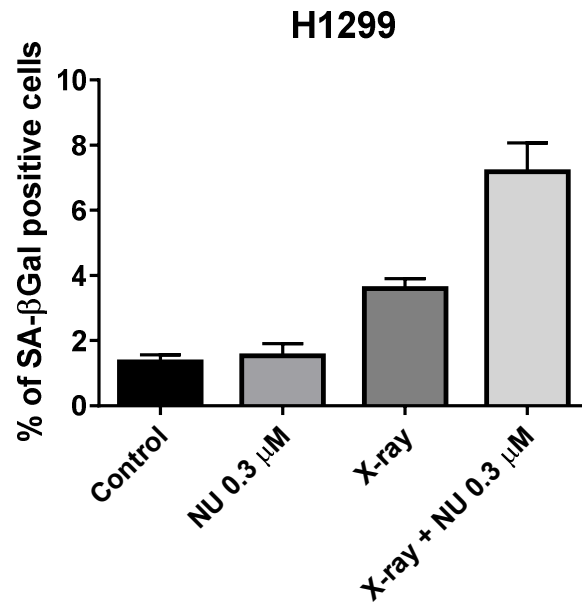


図 4-10 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射 3 日後の H1299 細胞における SA-βGal 陽性細胞の割合

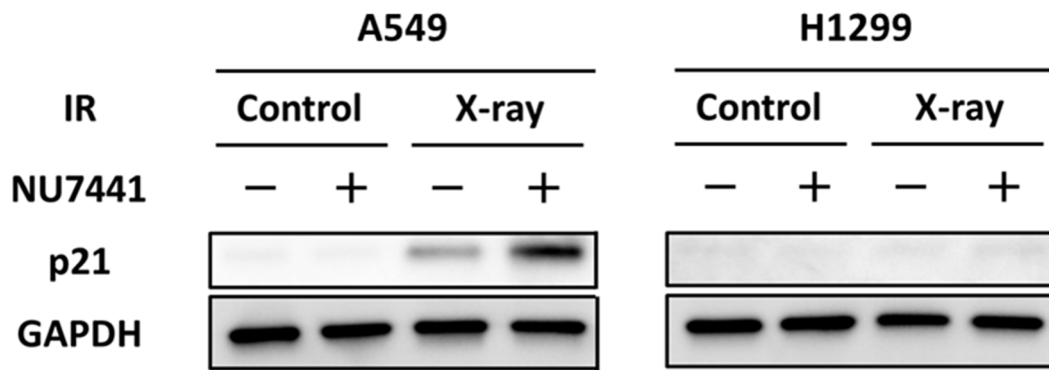


図 4-11 低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する X 線 (4 Gy) 照射
3 日後の細胞老化関連 p21 タンパクの発現解析

4.3 考察

低濃度 DNA-PK 阻害剤 NU7441 による放射線増感のメカニズムを調べた。低濃度 NU7441 と放射線を併用すると、細胞周期解析において G2/M 期の細胞割合で顕著な増加が見られた。DNA-PK 阻害と放射線併用による G2/M 期細胞の増加はこれまでも多く報告があり⁵⁴⁻⁵⁶、主に DNA 修復が不完全な細胞で、G2/M 期のチェックポイント制御 (G2/M 期アレスト) が引き起こされていると考えられていた。しかし、本研究で見出した低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感は、DNA 修復に関わらず見られ、G2/M 期アレストも確認されたことから上述の機構で全て説明することはできない。また第 3 章では、低濃度 NU7441 併用により DNA-PKcs (S-2056) の抑制が見られたが、このリン酸化は細胞周期に直接関与していることも報告されており⁵⁷、未だ知られていない DNA-PK の新たな機能も予想される。これらのことから DNA-PK 阻害は一部分で、NHEJ による DSB 修復に依存しない経路で、G2/M 期のチェックポイント制御に関わっていることが示唆された。特に興味深い点として、p53 遺伝子のステータスの違いで比較した際、p53 欠損型の H1299 細胞の方が野生型の A549 細胞よりも G2/M 期の細胞割合の増加率が高かった。p53 遺伝子は、役割の一つとして G1 期のチェックポイント制御に関わっており、p53 遺伝子が欠損した細胞では G1 期での細胞周期停止 (G1 期アレスト) が起こらないことがわかっている⁵⁸。よって p53 野生型の A549 細胞では G1 期のチェックポイント制御が正常に働く一方で、p53 欠損型の H1299 細胞では正常に働かない。そのため、DNA-PK 阻害と放射線が併用された H1299 細胞では G1 期アレストが起こらず、G2/M 期アレストによって G2/M 期の細胞割合の顕著な増加が見られたと考えられる。また正常な p53 遺伝子が導入された H1299 細胞で、NU7441 併用による G2/M 期細胞の増加割合が p53 欠損型の細胞に比べて減少した (データ未掲載) ことから上記の p53 遺伝子に対する強い関連性が示唆された。

細胞増殖において、NU7441 併用群は放射線照射 1 日後から増殖抑制を起こし、時間経過とともに単独照射群との差は広がっていった。この増殖抑制は、細胞周期解析からも G2/M 期アレストが関わっており、その影響が放射線増感の結果へとつながったと考えられる。また p53 のステータスに関しては、3.2.1 で述べたように p53 欠損型の H1299 細胞は、p53 野生型の A549 細胞や正常な p53 遺伝子が導入された H1299 細胞に比べて放射線増感効果は高かった。これらの結果は、上述した G2/M 期アレストの影響とも相関があった。以上より DNA-PK 阻害による G2/M 期アレストは細胞死誘導にも大きく関わっていることが示唆された。

細胞死の形態について、後期のアポトーシスやネクローシスが関わる sub-G1

期や細胞周期の不可逆的停止を示す細胞老化の解析を行った。Sub-G1 期解析で、p53 野生型の A549 細胞では、NU7441 と放射線の併用により sub-G1 期細胞の増加は見られなかった。p53 遺伝子はアポトーシス誘導としての役割を有しているが、固形がんでは、アポトーシスによる細胞死の割合は低いことが知られている⁵⁹。このことから、H1299 細胞における NU7441 併用による sub-G1 期細胞の増加は、アポトーシスではなくネクローシス様の DNA 断片化により引き起こされた現象と考えられる。特に H1299 細胞では、p53 欠損による G2/M 期細胞の顕著な増加が見られたことより、長期の G2/M 期アレストとその後の直接的な細胞死誘導が、ここで観測された DNA 断片化と関わっていると考えられる⁶⁰。細胞老化解析では、指標として SA-βGal 陽性細胞の割合をフローサイトメーターを用いて測定した。従来の SA-βGal の解析は、X-gal 染色により顕微鏡下で青色に呈色した細胞をカウントするのが一般的であった。その手法による解析では、H1299 細胞は放射線照射による SA-βGal 陽性細胞はほとんど検出されなかったが⁴¹、本研究で用いた手法では H1299 細胞でも有意な SA-βGal 陽性細胞の増加が確認され、フローサイトメーターによる手法が非常に高感度な解析であることがわかった。本解析により、A549、H1299 両細胞において NU7441 と放射線の併用群は、SA-βGal 陽性細胞の割合を増加させる傾向が見られた。細胞老化誘導経路の一つとして p21 の発現量をウエスタンブロッティング解析したところ⁶¹、A549 細胞では細胞老化マーカーとの相関が確認されたが、H1299 細胞では p21 の発現が見られなかった。細胞老化経路に関して、p21 遺伝子は p53 遺伝子の下流に位置することから、H1299 細胞では発現が見られなかったと考えられる。別の経路としてよく解析されている p16 の発現解析も行ったが^{62,63}、細胞老化誘導は見られなかった（データ未掲載）。このことから放射線照射された H1299 細胞は、p21 や p16 による経路に関わらない細胞老化を促進させ、NU7441 との併用でさらに顕著にその効果が加速されることが示唆された。それらの機構の一つとして、細胞分裂期のスキップが挙げられる⁶⁴。細胞分裂期のスキップは、細胞周期において G2 期から細胞の分裂が起こる M 期を飛び越して G1 期に移行して起こる細胞周期の停止であり、メカニズムなど徐々にわかりつつある。またもう一つに、テロメアの機能障害が考えられる。テロメア DNA の構造を保護している DNA-PK が機能しないことで起こる現象で、細胞老化に関わることも報告されている⁶⁵⁻⁶⁷。テロメアと細胞分裂期のスキップの関連性もあり⁶⁸、NU7441 併用による細胞老化は、これらの機構が関わっている可能性が示唆された。

4.4 まとめ

本章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤 NU7441 による放射線増感効果は、長期的な G2/M 期アレストによる増殖停止が関わっていることが示唆された。この効果は特に p53 遺伝子に異常がある細胞で顕著に見られた (図 4-12)。また、上記の G2/M 期アレストは p53 の働きに依存しない sub-G1 期細胞の増加や細胞老化を促進することも示唆された。メカニズムの詳細を理解するためにはさらなる解析が必要であり、今後の発展が期待される。

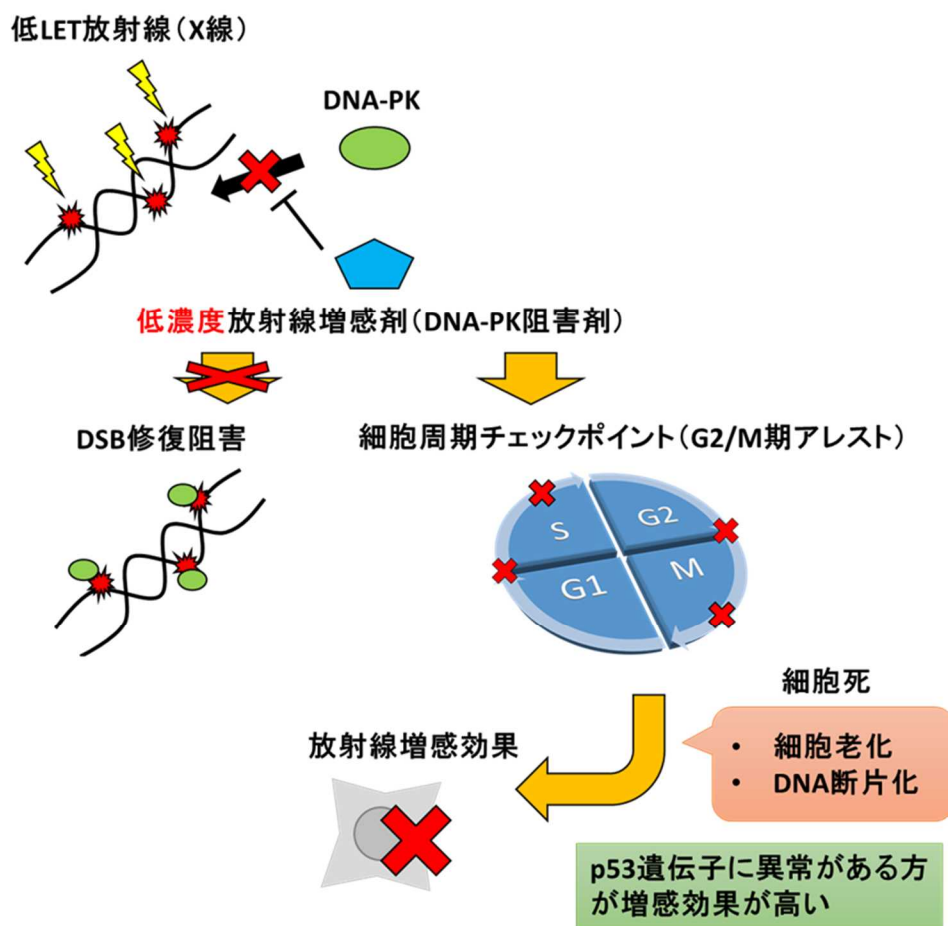


図 4-12 第 4 章のまとめ図

第 4 章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感効果は細胞周期チェックポイント制御が関わっていることが示唆された。

第5章 低濃度 DNA-PK 阻害剤と重粒子線の併用効果

5.1 背景と目的

重粒子線をはじめとした高 LET 放射線は、X 線などの低 LET 放射線と比べて、単位長さあたりのエネルギー付与が高いという物理的特徴を有する。この特徴により細胞内の DNA に複雑な損傷が形成され、がん細胞などに高い生物効果を与えることから治療分野でも活躍している。一方で、1.3.3 で述べたように高 LET 放射線は DNA 損傷応答に影響を及ぼしており、低 LET 放射線のそれとは異なることがわかってきた。特に本研究で着目している DNA-PK の機能が高 LET 放射線照射により抑制されることが報告されており²⁹、DNA 修復においても DNA-PK が働く NHEJ 経路に影響を及ぼすことがわかっている。

第3章では、DNA-PK阻害剤NU7441を低濃度で放射線と併用することで、DNA修復に依存しない放射線増感が引き起こされることを示した。一方で、重粒子線によりDNA-PKの機能が抑制されることから、上記の増感機構に影響を及ぼすことが考えられる。そこで本章では、低濃度DNA-PK阻害剤と高LET放射線との併用効果が低LET放射線との併用効果と比べ、どのように異なるか調べることを目的とした。高LET放射線としては治療で利用されている炭素線を用いた。

炭素線はそれ自体で大きな治療効果が見込まれているため、放射線増感剤との併用の必要性は低いと考えられた。しかし最近では、一部のがんでは炭素線による治療が既存の治療法（X線等）と比べて優位性がないことも報告され⁶⁹、炭素線に抵抗性を示すがんの存在も示唆されている。これらのことから炭素線においても増感剤との併用効果を調べることは意義がある。

5.2 実験結果

5.2.1 低濃度 NU7441 と炭素線併用による放射線増感効果

ヒト肺がん細胞 A549、H1299 細胞に対して、低濃度 NU7441 (0.3 μM) と炭素線 (LET=50 keV/ μm) との併用効果を DSB 修復解析とコロニー形成試験により調べた。DSB レベルの時間挙動については 3.2.2 と同様に、炭素線 4 Gy 照射 1, 4, 24 時間後の DSB レベルを Control, 0.3, 3 μM で比較した。炭素線照射による DSB レベルを X 線と比較した (図 5-1、5-2)。A549 細胞では、照射後全時間帯において X 線よりも高い DSB レベルを維持していた。H1299 細胞では、照射後時間が経過するとともに X 線との差が見られなくなった。NU7441 の濃度依存性を測定した (図 5-3、5-4)。両細胞とも 3 μM 併用群では、時間が経過するとともに DSB レベルが Control と比べ高く維持され、DSB 修復阻害が見られた。一方 0.3 μM 併用群では、一部 H1299 細胞で 24 時間後に修復阻害が観測されたが、3.2.2 で見られた結果同様に修復阻害効果は小さい傾向が見られた。

低濃度 NU7441 と炭素線併用効果をコロニー形成試験で測定し、X 線の結果と比較した (図 5-5、5-6)。炭素線の感受性は、指標である生物学的効果比 (relative biological effectiveness : RBE) で評価した。RBE は以下の式 5.1 で表す。

$$RBE(10) = \frac{D_{10}(\text{基準放射線})}{D_{10}(\text{対象となる放射線})} \quad (5.1)$$

ここで、基準放射線には X 線を選択し、対象となる放射線は炭素線とした。それぞれの生存率曲線を LQ モデルで近似して A549、H1299 細胞における基準放射線 D_{10} 値は 7.07、6.79 Gy、対象となる放射線 D_{10} 値は 3.29、3.63 Gy と算出された。したがって A549、H1299 細胞における RBE(10) は 2.15、1.87 と算出され、A549 細胞における RBE の方が高かった。炭素線と NU7441 の併用効果については、両細胞において有意な放射線増感効果が確認された。A549、H1299 細胞における放射線単独照射群 D_{10} 値は 3.29、3.63 Gy、増感剤併用群 D_{10} 値は 2.12、2.30 Gy と算出された。したがって増感比 SER(10) は 1.55、1.58 と算出され、わずかではあるが H1299 細胞における SER の方が高かった。これらの結果は、3.2.1 の X 線との併用による A549、H1299 細胞における SER 値 1.77、1.94 よりもそれぞれで低くなった。

5.2.2 低濃度 NU7441 と炭素線併用の細胞周期に対する影響

低濃度 NU7441 と炭素線併用による影響を、A549、H1299 細胞に対して細胞増殖試験により調べた。NU7441 (0.3 μM) と炭素線照射 (4 Gy) の併用が細胞増殖に与える影響を、照射後 1 日ごとに 4 日間にわたって細胞数をカウントしてモニタリングし、X 線の結果と比較した (図 5-7、5-8)。炭素線単独照射群は、両細胞において照射 1 日後では大きな増殖抑制は見られず、時間を追って徐々に見られるようになった。X 線と比較すると A549 細胞の方は炭素線照射 2 日後から増殖抑制効果が大きくなり、H1299 細胞では 4 日後から増殖抑制が見られ始めた。一方で NU7441 併用群では、X 線との併用同様に照射 1 日後から細胞の増殖抑制が見られた。その後の増殖抑制効果は、炭素線併用群の方が X 線併用群よりも大きく、細胞間では単独照射群同様に A549 細胞の方が、増殖抑制が早く観測された。時間経過による増殖度合いの傾向として、炭素線は照射後後期 (数日後) から増殖の傾きが緩やかになり、NU7441 併用群は照射後初期 (1 日後) の増殖抑制が起こってから以降は、増殖の傾きは単独照射群と同じレベルにまで戻った。

細胞周期に対する影響を調べた。A549、H1299 細胞において、NU7441 (0.3 μM) と炭素線照射 (4 Gy) の併用に対する照射 24 時間後の細胞周期の分布を表し、X 線の結果と比較した (図 5-9、5-10)。炭素線単独照射群において、A549 細胞では、G2/M 期細胞の割合が高い頻度で見られた。一方で H1299 細胞では、そのような頻度はあまり見られなかった。NU7441 と炭素線併用群では、両細胞で X 線併用群と同様に長期的な G2/M 期アレストが観測され、X 線併用群よりも強かった。NU7441 併用による G2/M 期細胞の割合の増加率は、A549 細胞では約 40%から 60%となり、H1299 細胞では約 20%から 80%となり、X 線併用時と同様に H1299 細胞の方でより強調された。

5.2.3 低濃度 NU7441 と炭素線併用の細胞死に対する影響

低濃度 NU7441 と炭素線併用による放射線増感における細胞死の形態や寄与を調べるため、sub-G1 期解析と細胞老化解析を A549、H1299 細胞に対して行った。NU7441 (0.3 μM) と炭素線照射 (4 Gy) の併用の影響を調べた。照射後 1 日ごとに 3 日間にわたって sub-G1 期解析をフローサイトメーターにより測定して、X 線の結果と比較した (図 5-11、5-12)。炭素線単独照射群において、A549 細胞では sub-G1 期細胞の割合が照射後徐々に高くなり X 線照射群と比べて増加傾向にあった。一方で、H1299 細胞では X 線単独照射群よりは増加傾向にあったが、X 線と NU7441 の併用群よりは sub-G1 期細胞の割合は低くなった。

炭素線と NU7441 の併用群は、全処理の中で sub-G1 期の細胞割合が最も高くなった。NU7441 併用による sub-G1 期細胞の割合の増加率については、X 線併用と同様に H1299 細胞でより顕著に見られた。これらの結果から、sub-G1 期細胞の増加率について、A549 細胞は NU7441 併用よりも炭素線照射に対してより感受性が高くなり、H1299 細胞は炭素線照射よりも NU7441 併用に対してより感受性が高くなった。

細胞老化がどの程度促進されるかについて、SA-βGal 陽性細胞の割合と p21 タンパク質の発現解析により調べた。照射 3 日後の SA-βGal 陽性細胞の割合をフローサイトメーターにより測定し、X 線の結果と比較した (図 5-13、5-14)。炭素線単独照射群と NU7441 併用群ともに sub-G1 期解析の結果と同様に、A549 細胞では炭素線に対して強く細胞老化促進が見られ、H1299 細胞では NU7441 併用に対して強く細胞老化促進が見られた。NU7441 併用による SA-βGal 陽性細胞の増加率も H1299 細胞の方が高かった。また、照射 3 日後の p21 の発現をウエスタンブロッティングにより調べた (図 5-15)。A549 細胞では、発現量は SA-βGal 陽性細胞の割合とある程度の相関は見られたが、H1299 細胞では、X 線の結果と同様にどの処理方法においても p21 の発現は見られなかった。

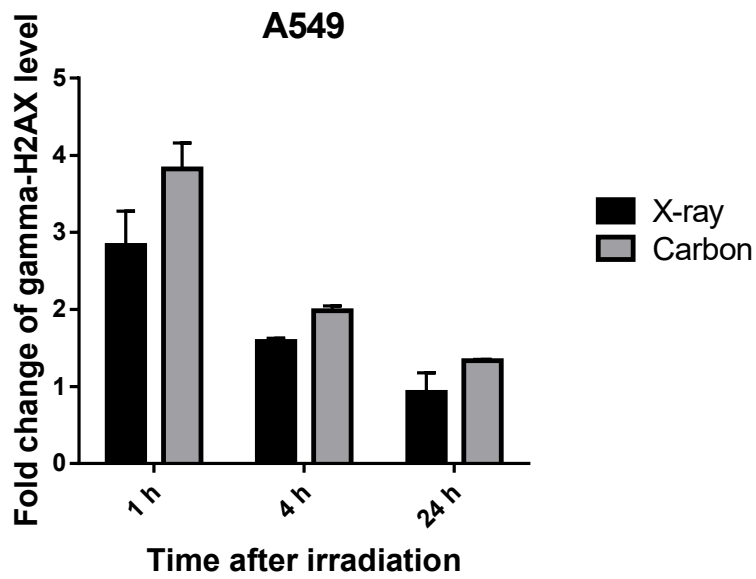


図 5-1 X線、炭素線（4 Gy）照射後の A549 細胞における γ H2AX レベルの時間挙動

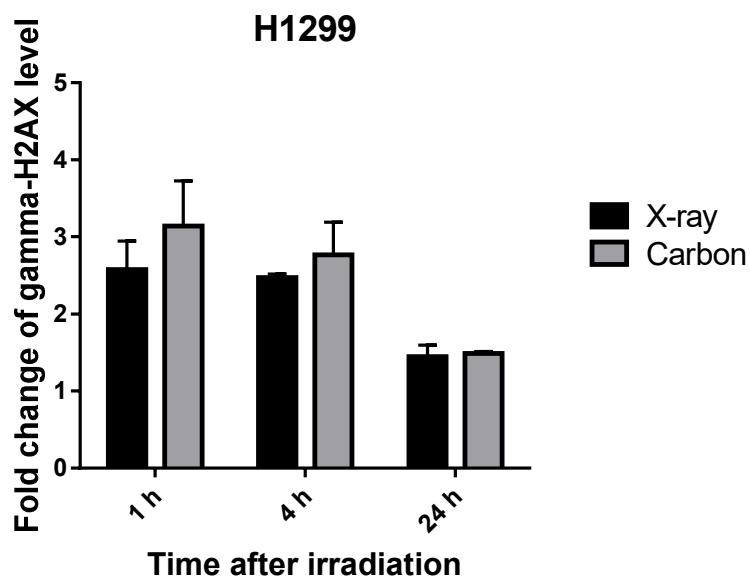


図 5-2 X線、炭素線（4 Gy）照射後の H1299 細胞における γ H2AX レベルの時間挙動

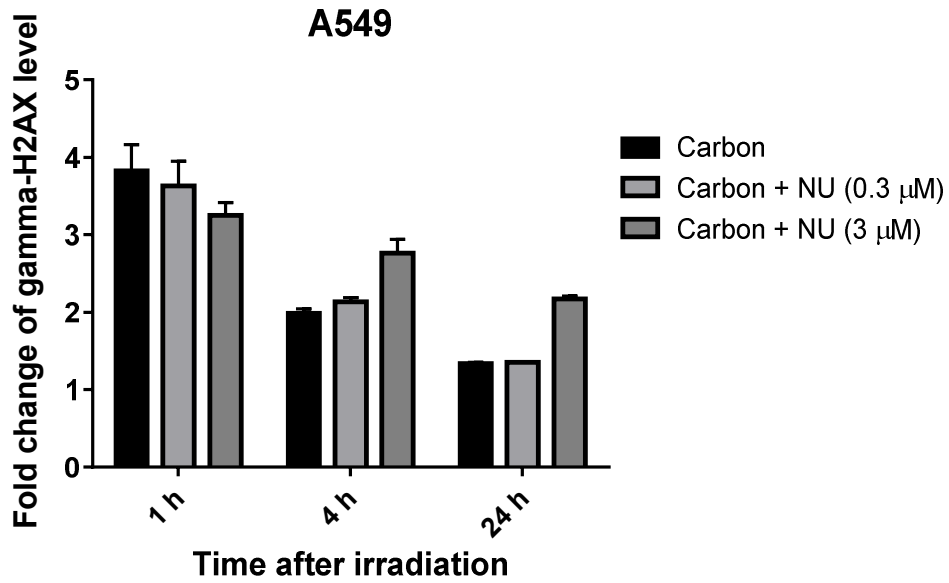


図 5-3 NU7441 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射後の A549 細胞における γ H2AX レベルの時間挙動

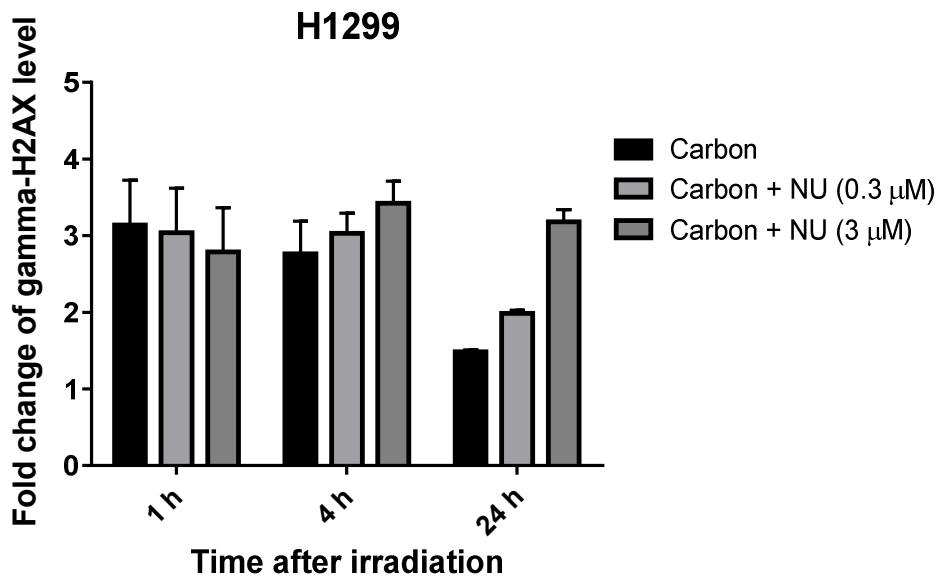


図 5-4 NU7441 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射後の H1299 細胞における γ H2AX レベルの時間挙動

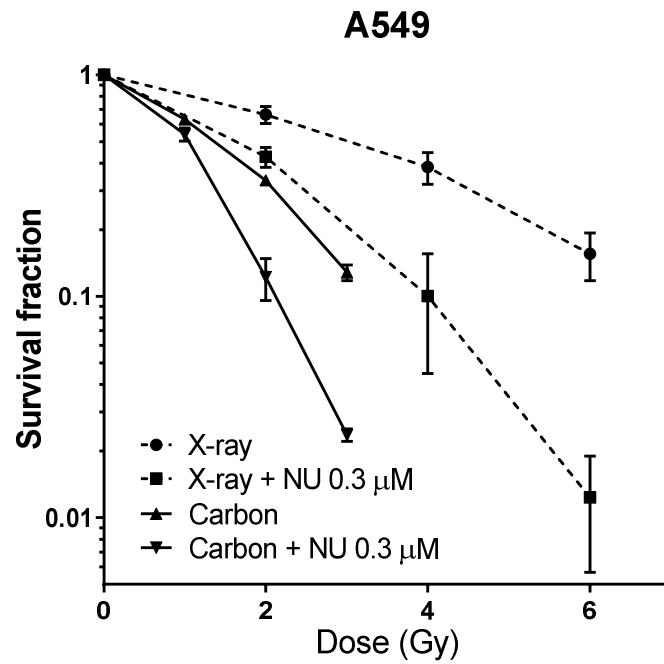


図 5-5 炭素線と低濃度 NU7441 (0.3 μM) の併用による A549 細胞の生存率曲線 (X 線と比較)

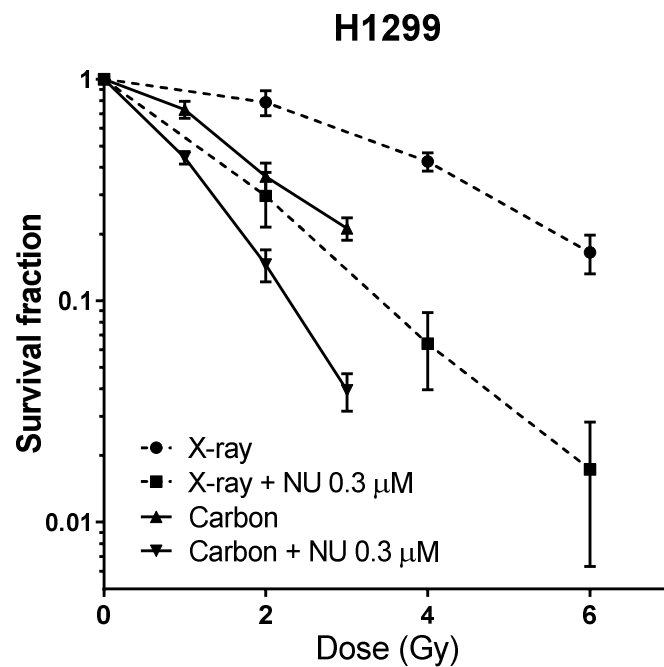


図 5-6 炭素線と低濃度 NU7441 (0.3 μM) の併用による H1299 細胞の生存率曲線 (X 線と比較)

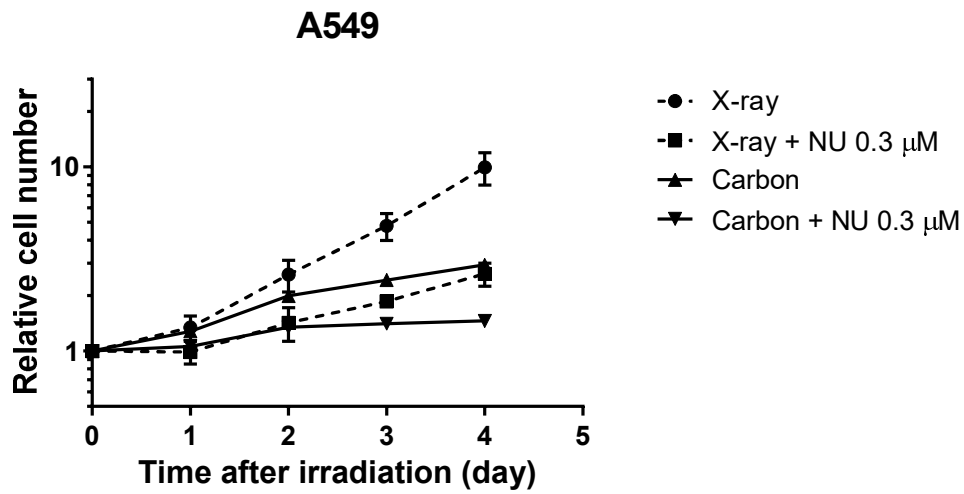


図 5-7 炭素線 (4 Gy) と低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用による A549 細胞の増殖曲線 (X 線と比較)

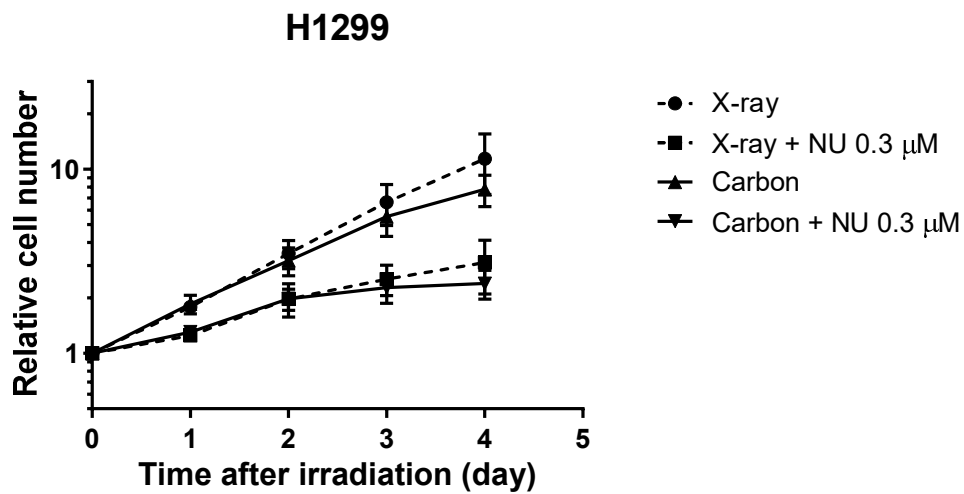


図 5-8 炭素線 (4 Gy) と低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用による H1299 細胞の増殖曲線 (X 線と比較)

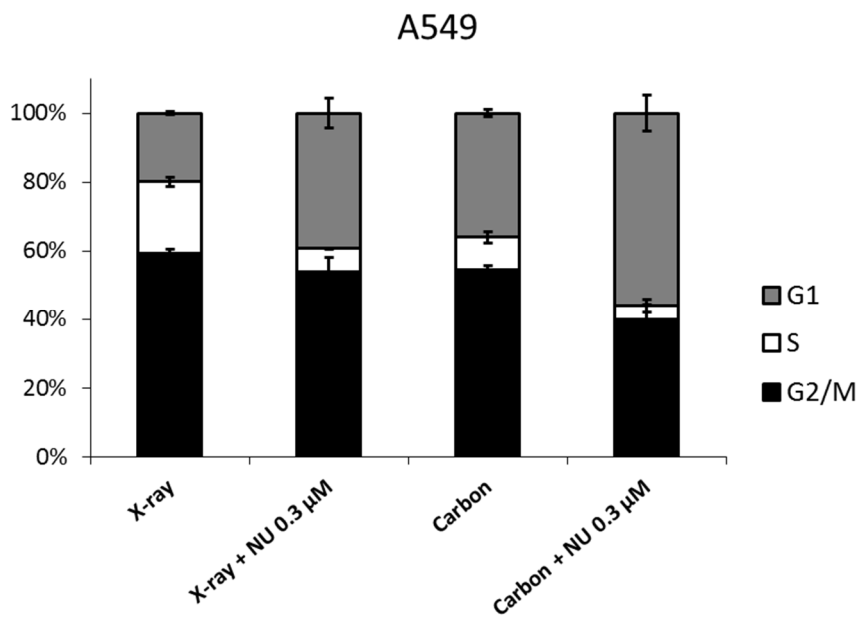
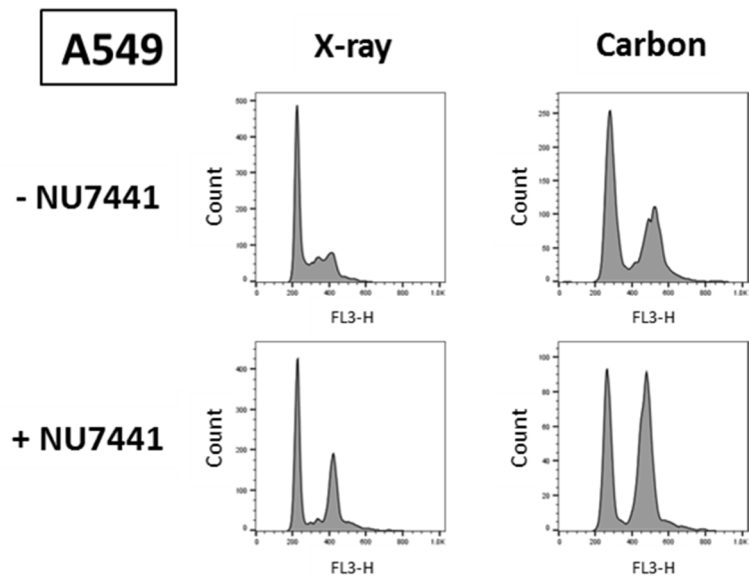


図 5-9 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射 24 時間後の A549 細胞における細胞周期分布 (X 線と比較)

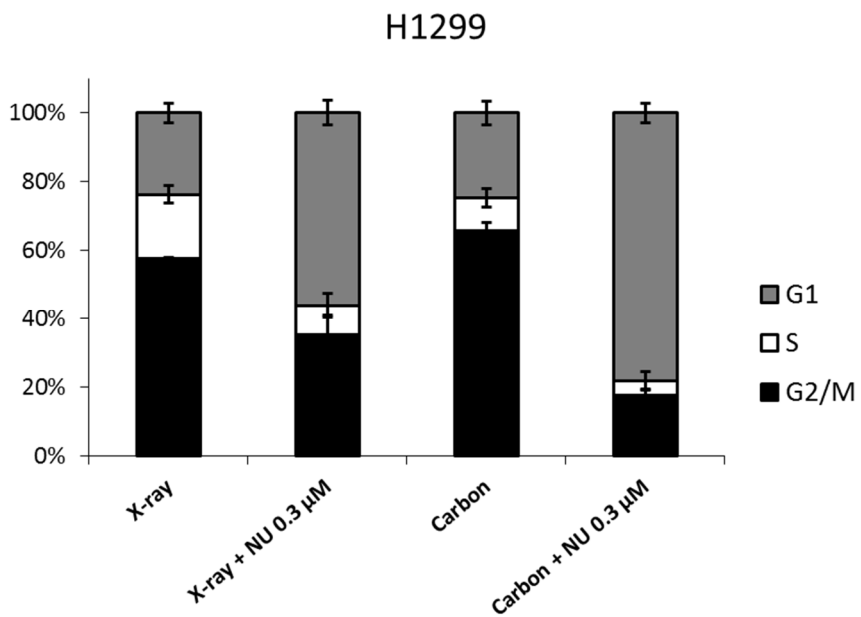
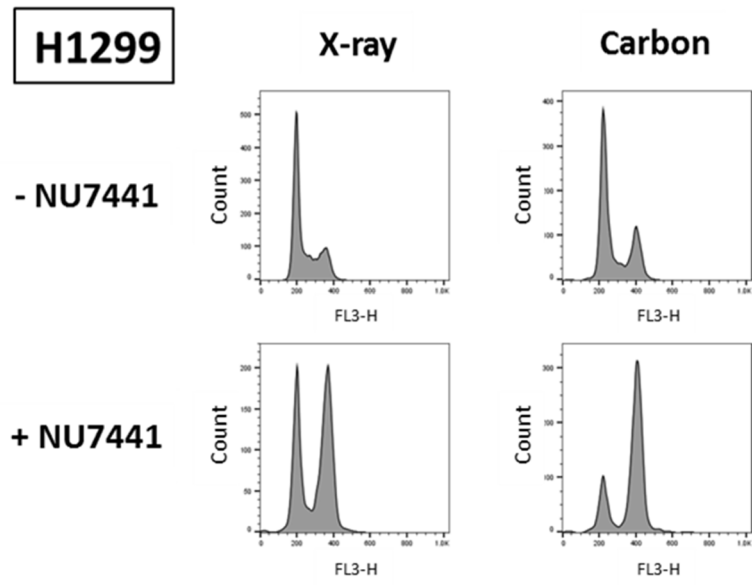


図 5-10 低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射 24 時間後の H1299 細胞における細胞周期分布 (X 線と比較)

A549

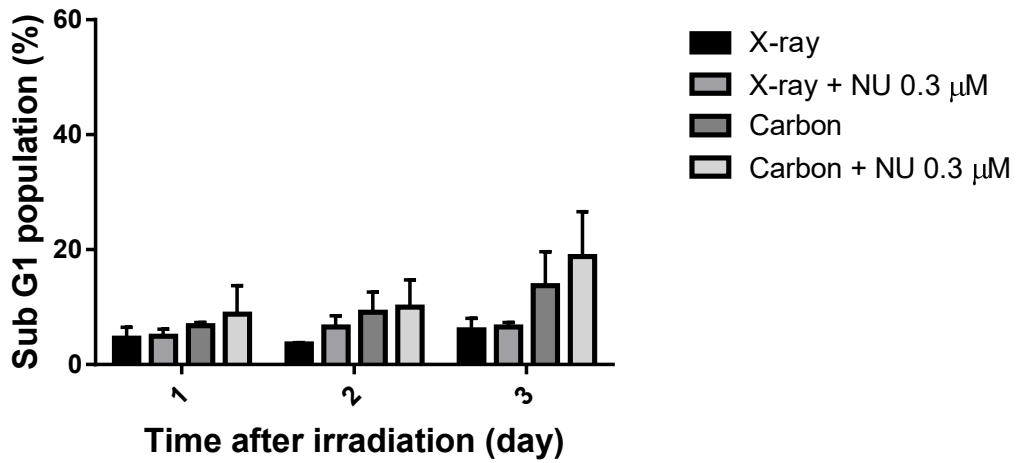


図 5-11 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射後の A549 細胞における sub-G1 期細胞の割合の時間挙動 (X 線と比較)

H1299

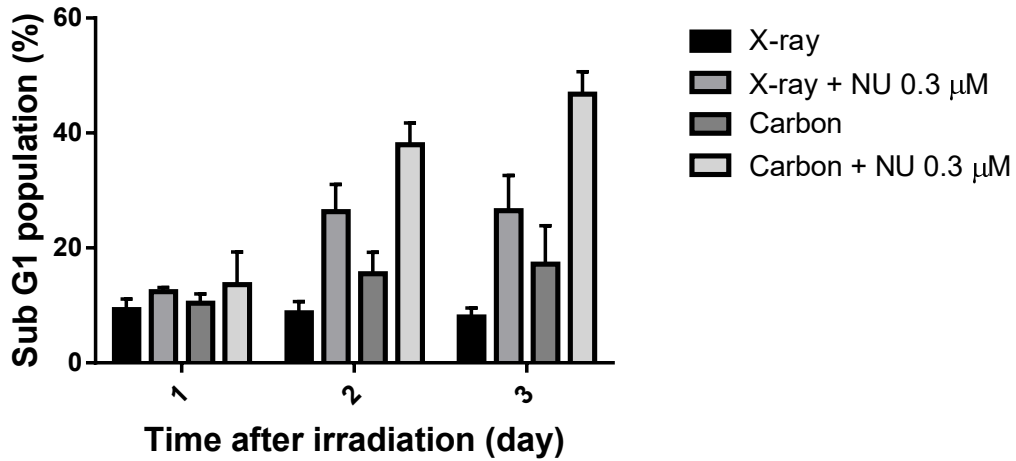


図 5-12 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射後の H1299 細胞における sub-G1 期細胞の割合の時間挙動 (X 線と比較)

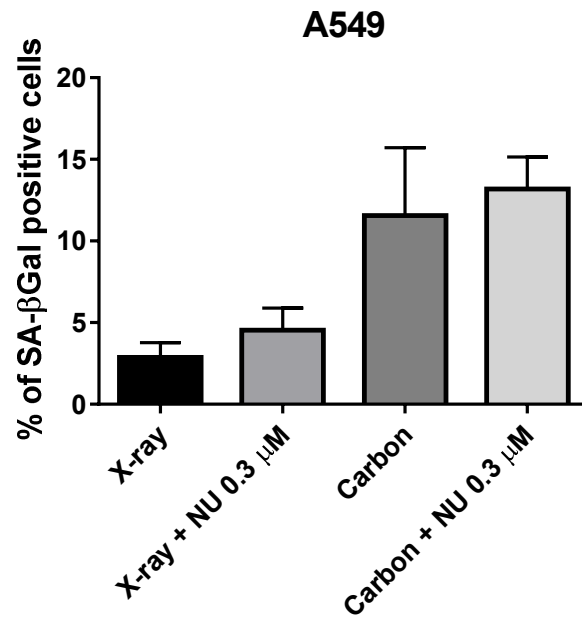


図 5-13 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射 3 日後の A549 細胞における SA-βGal 陽性細胞の割合 (X 線と比較)

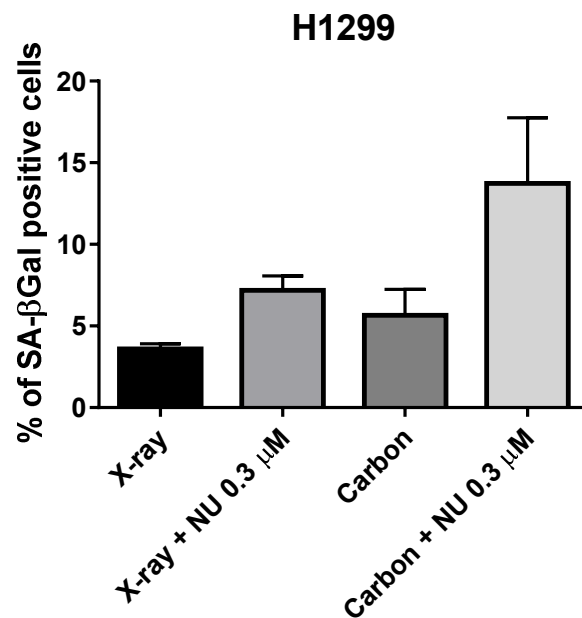


図 5-14 低濃度 NU7441 (0.3 μM) 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射 3 日後の H1299 細胞における SA-βGal 陽性細胞の割合 (X 線と比較)

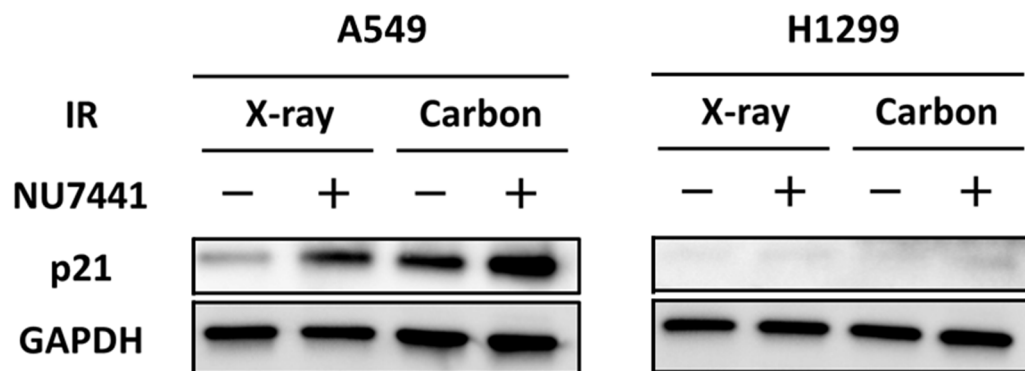


図 5-15 低濃度 NU7441 (0.3 μ M) 併用に対する炭素線 (4 Gy) 照射 3 日後の細胞老化関連 p21 タンパクの発現解析 (X 線と比較)

5.3 考察

DNA-PK 阻害剤の放射線増感について、高 LET 放射線との併用効果に関する報告はあるが⁷⁰、低 LET 放射線との比較など詳細はほとんどわかっていない。高 LET 放射線による損傷応答については、特に DNA 修復分野での議論が盛んであり低 LET 放射線とは異なることがわかってきた^{14,24,29}。一部では DNA-PK タンパク複合体の働きを抑えることで、NHEJ 経路による修復が抑制されると考えられている³⁰⁻³²。最近我々のグループでも、DNA-PKcs 遺伝子が欠損した CHO (Chinese hamster ovary) 細胞株 V3 に対する放射線応答の LET 依存性を調べたところ、LET が高くなるにつれ野生型 CHO 細胞と比較したときの感受性が低下することを報告した⁷¹。一方で本研究では、低濃度 DNA-PK 阻害剤 NU7441 は低 LET 放射線である X 線と併用することで、DSB 修復に依存しない経路による放射線増感が起こることを示した。そこで、これらの知見をもとに炭素線と低濃度 NU7441 の併用効果を調べたところ、X 線併用と同様 DSB 修復に依存しない放射線増感が見られた。増感効果の指標である SER は X 線併用時よりも低くなった。1.3.3 で述べたように、高 LET 放射線により Ku タンパクの機能が低下することが報告されている³²。つまり上記の結果は、放射線照射後の細胞を生存させるいくつかの機構のうち、DNA-PK による機構が高 LET 放射線により抑制されることで、相対的に X 線併用時よりも SER が低下したと考えられる。一方で、本研究で用いた炭素線の LET (50 keV/μm) は、実際に治療で用いられる拡大ブラッグピーク (spread out Bragg peak : SOBP) 炭素線における中心付近の平均 LET と同じ値を用いた⁷²。治療で用いる重粒子線でも NU7441 併用による SER は約 1.6 と高い増感効果を示したことから、重粒子線治療における放射線増感剤併用も期待される。

低濃度 NU7441 と炭素線併用による放射線増感は、X 線併用同様に DNA 修復に依らない長期的な G2/M 期アレストにより引き起こされることが示唆され、p53 欠損型の H1299 細胞の方が増感効果は高くなった。また炭素線単独照射に対する細胞の感受性は p53 遺伝子のステータスの違いによって左右され、p53 野生型の A549 細胞の方が高くなり、H1299 細胞は比較的抵抗性を示した。p53 欠損型の細胞に対する炭素線の感受性に関しては、p53 遺伝子のステータスに関係なく感受性を示す報告がある⁷³。一方で、p53 欠損型は抵抗性を示す報告もされており⁷⁴、議論が分かれるところである。本研究は、細胞増殖試験において細胞増殖抑制が起こり始める時期や、sub-G1 期解析や細胞老化の結果からも、p53 欠損型の H1299 細胞の方が炭素線に対して感受性が低いことを示した。これらの全ての結果は細胞生存率曲線の結果とも相関があった。DSB 修復の結果においても炭素線照射群は、A549 細胞では X 線照射群と比べ未修復の DSB が

長期的に残存しているのに対し、H1299細胞ではX線照射群と同様のレベルまで修復されており、H1299細胞が炭素線に抵抗性を示す要因となったと考えられる。p53遺伝子のステータスと高LET放射線の応答の関係性に関しては、今後の発展が期待されるが、p53遺伝子のステータスは増感剤併用の選択において重要な要素になると考えられる。

5.4 まとめ

本章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤が、高 LET 放射線照射された細胞に対して与える影響を調べることを目的に、低濃度 NU7441 と治療に用いられる LET 帯の炭素線 (LET=50 keV/μm) の併用効果を調べた。X 線併用と同様に、低濃度 NU7441 (0.3 μM) は DNA 修復に依存しない G2/M 期アレストによる放射線増感を引き起こすことが示唆された (図 5-16)。増感効果は X 線併用に比べ多少低下したが、それでも一定の有意性を示し、重粒子線治療における増感剤の導入が期待される。

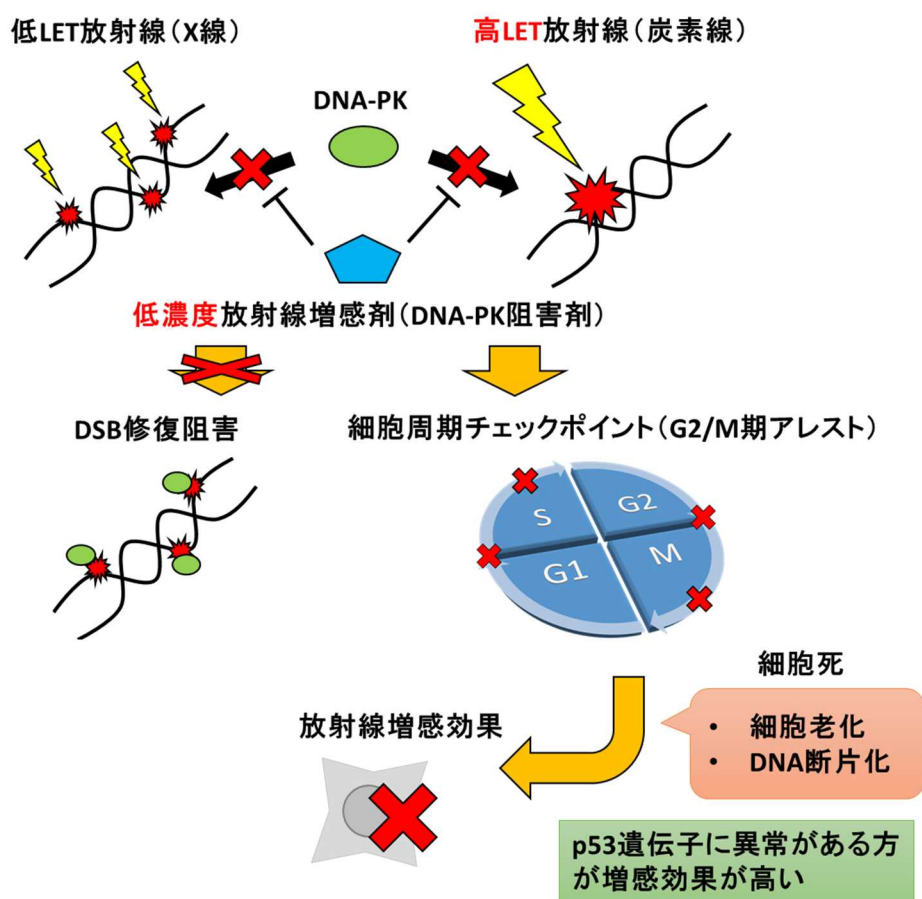


図 5-16 第 5 章のまとめ図

第 5 章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤と高 LET 放射線の併用により低 LET 放射線との併用同様に、DSB 修復阻害に依存しない細胞周期チェックポイント制御による放射線増感が見出された。

第6章 結論

6.1 低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感

放射線増感剤として数多くの報告がある DNA-PK 阻害剤だが、これまで阻害剤の濃度依存に関する知見、特に低濃度域に関しての知見はほとんどない。

第3章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤 NU7441 と X 線の併用効果を調べたところ、正常細胞やがん細胞に毒性を示さない濃度の NU7441 (0.3 μM) でも放射線増感効果が示されることを見出した。さらに、低濃度 NU7441 はリン酸化 DNA-PKcs タンパクの発現は抑制するものの、 γH2AX を指標とした DSB 修復阻害は引き起こさないことを示し、上記の増感機構は DSB 修復に依存しないことが示唆された (図 6-1)。放射線増感剤について、治療効果の増強が望めるような投与量は正常組織に対する深刻な副作用を引き起こすことが多い。よって、本研究で見出した濃度に関する知見は、臨床応用への足掛かりになると考えられる。

第4章では、低濃度 NU7441 による放射線増感機構の詳細を調べたところ、長期的な G2/M 期アレストによる増殖抑制が観測され、細胞生存率の低下にも寄与していることが示された (図 6-1)。これらの知見から、放射線照射された細胞内における DNA-PK の働きを、低濃度 DNA-PK 阻害剤により全部ではなく、一部分だけ抑制することで G2/M 期アレストを引き起こし、その結果として細胞死が誘導されることが示唆された。DSB 修復において重要な役割を持つ DNA-PK であるが、本研究の結果から新たな機能探索へと発展することを期待したい。

また興味深いことに、がん抑制遺伝子の一つである p53 遺伝子に異常がある細胞の方が、NU7441 による放射線増感効果が高いことを見出した。原因の一つとして、p53 遺伝子の異常による G1 期チェックポイント制御の機能障害が、NU7441 による G2/M 期アレストの影響を強調させたと考えられ、DNA の断片化による細胞死や細胞老化の結果とも相関があった。がん患者の半数のがん細胞は p53 遺伝子に異常があり、放射線に対して抵抗性を示す傾向にあることから、DNA-PK 阻害剤の併用が治療抵抗性の克服に貢献できるであろう。

6.2 重粒子線治療における DNA-PK 阻害剤の併用

高い治療成績を挙げている重粒子線治療であるが、DNA-PK 阻害剤との併用効果についてはよくわかっていない。

第 5 章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤 NU7441 と炭素線の併用効果を調べた。低濃度 NU7441 (0.3 μ M) は、X 線併用と同様に炭素線との併用でも、DNA 修復に依存しない長期的な G2/M 期アレストによる放射線増感を引き起こすことが示唆された (図 6-1)。X 線併用時と比べて増感比 (SER) が低下したのは、重粒子線照射により DNA-PK の活性が抑制されたためと考えられる。それでも SER は約 1.6 もあることから、DNA-PK 阻害剤と重粒子線との併用は十分有用な治療法になり得る。

また本研究では、p53 欠損型の H1299 細胞は、p53 野生型の A549 細胞よりも炭素線に対して放射線抵抗性を示した。しかし NU7441 との併用は、H1299 細胞の方でより高い感受性を示した。通常は、炭素線単独で高い治療効果をあげられると考えられていたが、炭素線に抵抗性を示す p53 に異常があるがん細胞には、NU7441 の併用を考慮するなど p53 遺伝子のステータスが、効率的な治療方法を選択する際の重要な要素になり得る。

6.3 今後の課題と展望

本研究では、DNA-PK 阻害剤を細胞に対して毒性が出ないような低濃度で X 線や重粒子線と併用しても、有意に放射線増感が起こることを示した。これまでも述べてきたように、多くの基礎研究の結果が臨床試験まで進まない原因の一つとして開発された薬剤の毒性により、患者に対して深刻な副作用を示すことが挙げられる。このことから本研究の結果は、濃度制御の点で臨床応用へ向け大きなアドバンテージになると考えられ、臨床研究への移行が期待される。そこで次のステップとしては、細胞実験系 (in vitro) から動物実験系 (in vivo) へと移行していく必要がある。

しかし一方で in vitro と in vivo では、がん細胞の置かれている環境は大きく異なることがわかっている。in vivo で形成する腫瘍組織が持つ特徴の一つに、enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) がある⁷⁵。これは、腫瘍組織は正常組織に比べ高分子などの血管透過性が高くなる現象であり、血管構造の違いなどが起因となっている。近年では、この EPR 効果を利用した腫瘍選択的な薬剤送達システム (ドラッグデリバリーシステム ; DDS) の研究が盛んになっている^{76,77}。特に第 3 章でも述べたが、DNA-PK 阻害剤が放射線増感剤として高い効果を引き出すためには、放射線照射後の DNA-PK の阻害作用を長く持続させる必要がある。放射線増感剤研究に関して、in vitro の報告ではほとんどが相乗的な効果であるにも関わらず、in vivo では相加的な効果の枠を出ていない報告が多いのも、上記が一因であると考えられる。

以上のことから今後の展望としては、放射線増感研究をさらに発展させるため、DDS の導入による放射線増感剤の効果検証を進めていくことが挙げられる。これにより、in vivo でも in vitro 同様に高い放射線増感効果が得られ、放射線増感剤の臨床研究への大きな発展に貢献することが期待される。

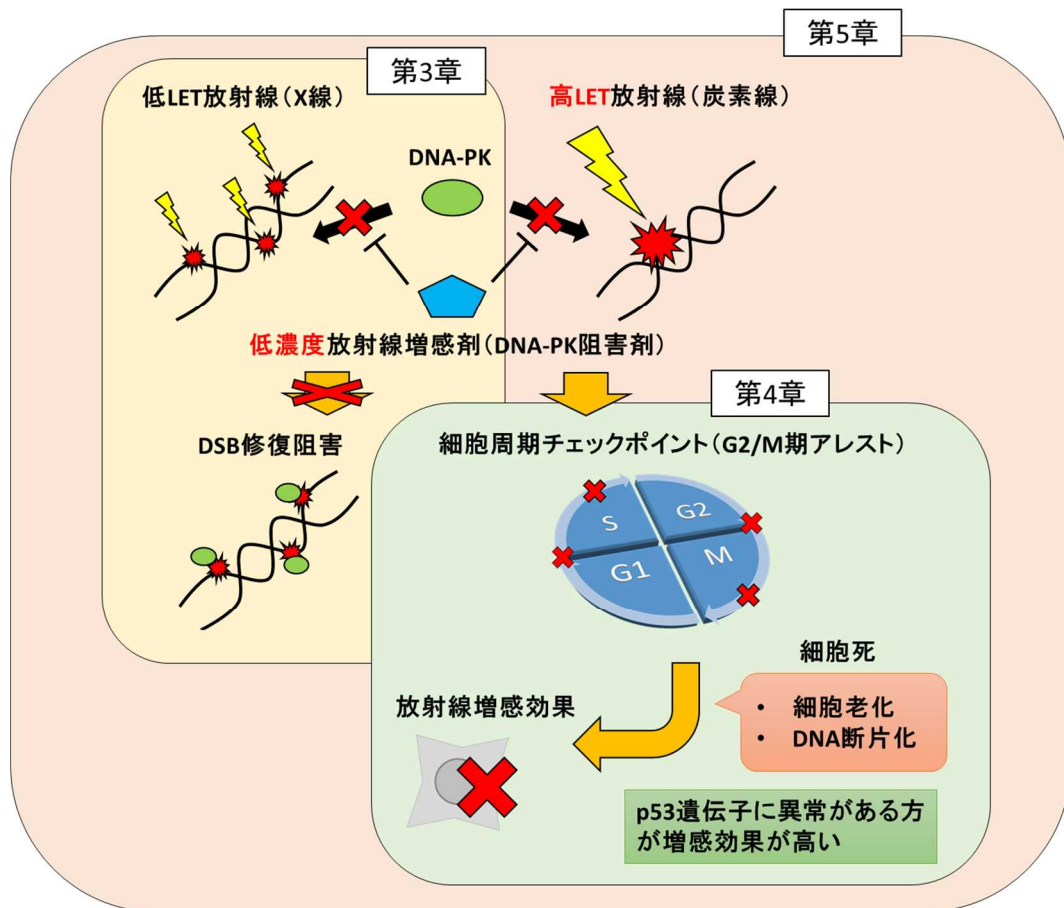


図 6-1 低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感のまとめ図

第 3、4 章では、低濃度 DNA-PK 阻害剤と低 LET 放射線併用による増感効果とそのメカニズムを検証し、第 5 章では、高 LET 放射線との併用効果について検証した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、学内外で実に多くの方々にお世話になり、このように博士論文をまとめることができました。ここに感謝の意を表し御礼申し上げます。

指導教員の上坂充教授には、学部学生の頃から長きにわたってご指導いただき、研究室に入り右も左もわからない私に研究の進め方を一から叩き込んでくださいました。日頃のディスカッションを重ねることで研究をブラッシュアップすることはもちろんのこと、研究内容を発信するにあたり、いかにしてわかりやすく相手に伝えるかを徹底的に指導していただきました。また研究以外でも研究室の行事などを積極的に企画してくださり、“よく学びよく遊べ”を実践でき充実した大学院生活を過ごせました。本当に多くのことを学ばせていただき大きく成長できたと感じており、今後も研究者として自立していけると確信しております。心から御礼申し上げます。

山下真一助教には、修士課程から実験でお世話になって以来色々ご相談にのっていただきました。実験で一緒する際はほとんどが夜通しの実験で、朝にはへとへとになっていたのも良い思い出です。今後も学会などでお会いする際はよろしく願いいたします。

秘書の関口萌氏には、事務関係で大変お世話になりました。博士課程からは学外での研究活動のため、研究室に出向く頻度も少なくなりましたが、事務処理で的確にサポートしてくださり何度もピンチを救っていただきました。本当にありがとうございました。

上坂研究室の学生にも感謝しております。M2の金井英樹氏は修士課程を通して大変成長されたと思います。本研究の実験も手伝っていただきありがとうございました。M2の于鬲氏は研究テーマを変えられたのをきっかけに、実験なども手伝っていただきました。博士課程に進まれても頑張ってください。

その他の学生メンバーには、私が本郷に行く機会が減ったため様々ご迷惑もおかけしましたが、研究室をうまく運営していただき、本郷に行った際もストレスなく過ごせました。感謝しております。東海キャンパスの先生方、スタッフの方々には、東海出張の際に大変お世話になりましたこと御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、上坂研究室以外の方々からも多大なるご支援・ご協力を賜りました。

量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所では、放射線障害治療研究部の藤森亮博士、岡安隆一博士、安田武嗣博士、崔星博士、矢島浩彦博士、劉翠華博士、平川博一氏、佐野理江氏、丸山二葉氏、方雅群氏、放射線影響研究部の中島徹夫博士、人材育成センターの根井充博士、HIMACのスタッフの方々には大変お世話になりました。研究を円滑に進めるための環境を整備していただき、学術論文を執筆するにあたっても親身になってご指導いただきました。大学と同じくトップレベルで研究されていながら、大学とは異なる雰囲気を持った研究所での活動は、今後研究を続けていく上でも非常に有意義な経験でした。深く御礼申し上げます。

アメリカはコロラド州立大学の加藤宝光准教授には、修士学生時代に留学先として受け入れていただいて以来、公私にわたって数多くお世話になりました。海外での研究活動はもちろんのこと研究室の学生とコミュニケーションをとることで英語上達という面でも貴重な経験をさせていただきました。

また本研究を進めるにあたり以下の援助をいただきました。

日本学術振興会特別研究員（DC2）、科学研究費補助金（特別研究員奨励費15J9331）の援助をいただきました。また一部の研究は量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所のHIMAC共同利用研究課題により行われ、消耗品等の援助もいただきました。感謝申し上げます。

最後に、このように博士課程で熱意を持って研究活動を続けて来られたのは、両親、兄弟、親族、友人の支えによるところが非常に大きかったです。心より感謝しております。

平成29年2月吉日
砂田 成章

参考文献

- 1 Bhide, S. A. & Nutting, C. M. Recent advances in radiotherapy. *BMC medicine* **8**, 25, doi:10.1186/1741-7015-8-25 (2010).
- 2 Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310, doi:10.1038/35042675 (2000).
- 3 Petitjean, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* **28**, 622-629, doi:10.1002/humu.20495 (2007).
- 4 Lee, J. M. & Bernstein, A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5742-5746 (1993).
- 5 青山 喬, 丹羽 太貫. 放射線基礎医学. 金芳堂 12 版.
- 6 Mitchell, J. B. *et al.* Differing sensitivity to fluorescent light in Chinese hamster cells containing equally incorporated quantities of BUdR versus IUdR. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **10**, 1447-1451 (1984).
- 7 Iliakis, G., Pantelias, G. & Kurtzman, S. Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: effect of BrdU on cell killing and interphase chromosome breakage in radiation-sensitive cells. *Radiation research* **125**, 56-64 (1991).
- 8 Nagashima, T. & Takakura, K. [Chemical modifiers in radiotherapy]. *Gan no rinsho. Japan journal of cancer clinics* **35**, 1369-1371 (1989).
- 9 Overgaard, J. *et al.* A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **46**, 135-146 (1998).
- 10 Vecchio, D. *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy on pediatric tumors of the glioma radiosensitizer KU60019. *International journal of cancer* **136**, 1445-1457, doi:10.1002/ijc.29121 (2015).
- 11 Peasland, A. *et al.* Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *British*

- journal of cancer* **105**, 372-381, doi:10.1038/bjc.2011.243 (2011).
- 12 Prevo, R. *et al.* The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer biology & therapy* **13**, 1072-1081, doi:10.4161/cbt.21093 (2012).
- 13 Li, Y., Reynolds, P., O'Neill, P. & Cucinotta, F. A. Modeling damage complexity-dependent non-homologous end-joining repair pathway. *PloS one* **9**, e85816, doi:10.1371/journal.pone.0085816 (2014).
- 14 Shibata, A. *et al.* Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO journal* **30**, 1079-1092, doi:10.1038/emboj.2011.27 (2011).
- 15 Goodwin, J. F. *et al.* DNA-PKcs-Mediated Transcriptional Regulation Drives Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Cancer cell* **28**, 97-113, doi:10.1016/j.ccell.2015.06.004 (2015).
- 16 Kotula, E. *et al.* DNA-PKcs plays role in cancer metastasis through regulation of secreted proteins involved in migration and invasion. *Cell cycle* **14**, 1961-1972, doi:10.1080/15384101.2015.1026522 (2015).
- 17 Willmore, E. *et al.* A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* **103**, 4659-4665, doi:10.1182/blood-2003-07-2527 (2004).
- 18 Zhao, Y. *et al.* Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer research* **66**, 5354-5362, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4275 (2006).
- 19 Mortensen, D. S. *et al.* Optimization of a Series of Triazole Containing Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Kinase Inhibitors and the Discovery of CC-115. *Journal of medicinal chemistry* **58**, 5599-5608, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00627 (2015).
- 20 Gustafsson, A. S., Abramenkova, A. & Stenerlow, B. Suppression of DNA-dependent protein kinase sensitize cells to radiation without affecting DSB repair. *Mutation research* **769**, 1-10, doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.06.004 (2014).
- 21 Marx, V. Cancer treatment: Sharp shooters. *Nature* **508**, 133-138, doi:10.1038/508133a (2014).
- 22 Kamada, T. *et al.* Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience. *The Lancet. Oncology* **16**, e93-e100, doi:10.1016/S1470-2045(14)70412-7 (2015).

- 23 Asaithamby, A. & Chen, D. J. Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutation research* **711**, 87-99, doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.11.002 (2011).
- 24 Yajima, H. *et al.* The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. *DNA repair* **12**, 936-946, doi:10.1016/j.dnarep.2013.08.009 (2013).
- 25 Kagawa, K. *et al.* Preclinical biological assessment of proton and carbon ion beams at Hyogo Ion Beam Medical Center. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **54**, 928-938 (2002).
- 26 Matsufuji, N. *et al.* Specification of Carbon Ion Dose at the National Institute of Radiological Sciences (NIRS). *Journal of radiation research* **48 Suppl A**, A81-86 (2007).
- 27 Prise, K. M., Gillies, N. E. & Michael, B. D. Evidence for a hypoxic fixation reaction leading to the induction of ssb and dsb in irradiated DNA. *International journal of radiation biology* **74**, 53-59 (1998).
- 28 Hirayama, R., Furusawa, Y., Fukawa, T. & Ando, K. Repair kinetics of DNA-DSB induced by X-rays or carbon ions under oxic and hypoxic conditions. *Journal of radiation research* **46**, 325-332 (2005).
- 29 Okayasu, R. Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions-a mini review. *International journal of cancer* **130**, 991-1000, doi:10.1002/ijc.26445 (2012).
- 30 Wang, H. *et al.* Characteristics of DNA-binding proteins determine the biological sensitivity to high-linear energy transfer radiation. *Nucleic acids research* **38**, 3245-3251, doi:10.1093/nar/gkq069 (2010).
- 31 Okayasu, R. *et al.* Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions in mammalian cells proficient and deficient in the non-homologous end-joining pathway. *Radiation research* **165**, 59-67 (2006).
- 32 Yu, X., Wang, H., Wang, P., Chen, B. P. & Wang, Y. The Ku-dependent non-homologous end-joining pathway contributes to low-dose radiation-stimulated cell survival. *Journal of cellular physiology* **226**, 369-374, doi:10.1002/jcp.22342 (2011).
- 33 Takahashi, A. *et al.* Nonhomologous end-joining repair plays a more important role than homologous recombination repair in defining radiosensitivity after exposure to high-LET radiation. *Radiation research* **182**, 338-344, doi:10.1667/RR13782.1 (2014).

- 34 Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* **1**, 2315-2319, doi:10.1038/nprot.2006.339 (2006).
- 35 Marples, B. & Joiner, M. C. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiation research* **133**, 41-51 (1993).
- 36 Olive, P. L. & Banath, J. P. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **58**, 331-335 (2004).
- 37 MacPhail, S. H. *et al.* Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *International journal of radiation biology* **79**, 351-358 (2003).
- 38 Banath, J. P. & Olive, P. L. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer research* **63**, 4347-4350 (2003).
- 39 Muslimovic, A., Ismail, I. H., Gao, Y. & Hammarsten, O. An optimized method for measurement of gamma-H2AX in blood mononuclear and cultured cells. *Nature protocols* **3**, 1187-1193, doi:10.1038/nprot.2008.93 (2008).
- 40 Wlodkowic, D., Skommer, J. & Darzynkiewicz, Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods in molecular biology* **559**, 19-32, doi:10.1007/978-1-60327-017-5_2 (2009).
- 41 Azad, A. *et al.* Inhibition of DNA-dependent protein kinase induces accelerated senescence in irradiated human cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* **9**, 1696-1707, doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0312 (2011).
- 42 Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols* **4**, 1798-1806, doi:10.1038/nprot.2009.191 (2009).
- 43 Ciszewski, W. M., Tavecchio, M., Dastyk, J. & Curtin, N. J. DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. *Breast cancer research and treatment* **143**, 47-55, doi:10.1007/s10549-013-2785-6 (2014).
- 44 Yu, L. *et al.* NSCLC cells demonstrate differential mode of cell death in response to the combined treatment of radiation and a DNA-PKcs

- inhibitor. *Oncotarget* **6**, 3848-3860, doi:10.18632/oncotarget.2975 (2015).
- 45 Tichy, A. *et al.* Radio-sensitization of human leukaemic MOLT-4 cells by DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7441. *Radiation and environmental biophysics* **53**, 83-92, doi:10.1007/s00411-013-0494-5 (2014).
- 46 Kashishian, A. *et al.* DNA-dependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer. *Molecular cancer therapeutics* **2**, 1257-1264 (2003).
- 47 Maggiorella, L. *et al.* Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer research* **63**, 2513-2517 (2003).
- 48 Okayasu, R., Suetomi, K. & Ullrich, R. L. Wortmannin inhibits repair of DNA double-strand breaks in irradiated normal human cells. *Radiation research* **149**, 440-445 (1998).
- 49 Chernikova, S. B., Wells, R. L. & Elkind, M. M. Wortmannin sensitizes mammalian cells to radiation by inhibiting the DNA-dependent protein kinase-mediated rejoining of double-strand breaks. *Radiation research* **151**, 159-166 (1999).
- 50 Amrein, L. *et al.* Chlorambucil cytotoxicity in malignant B lymphocytes is synergistically increased by 2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-one (NU7026)-mediated inhibition of DNA double-strand break repair via inhibition of DNA-dependent protein kinase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **321**, 848-855, doi:10.1124/jpet.106.118356 (2007).
- 51 Niazi, M. T. *et al.* Effects of dna-dependent protein kinase inhibition by NU7026 on dna repair and cell survival in irradiated gastric cancer cell line N87. *Current oncology* **21**, 91-96, doi:10.3747/co.21.1509 (2014).
- 52 Elliott, S. L. *et al.* Mitoxantrone in combination with an inhibitor of DNA-dependent protein kinase: a potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* **152**, 61-71, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08425.x (2011).
- 53 Wechsler, T. *et al.* DNA-PKcs function regulated specifically by protein phosphatase 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1247-1252, doi:10.1073/pnas.0307765100 (2004).

- 54 Sturgeon, C. M., Knight, Z. A., Shokat, K. M. & Roberge, M. Effect of combined DNA repair inhibition and G2 checkpoint inhibition on cell cycle progression after DNA damage. *Molecular cancer therapeutics* **5**, 885-892, doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0358 (2006).
- 55 Lee, S. E., Mitchell, R. A., Cheng, A. & Hendrickson, E. A. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Molecular and cellular biology* **17**, 1425-1433 (1997).
- 56 Holgersson, A. *et al.* Different G2/M accumulation in M059J and M059K cells after exposure to DNA double-strand break-inducing agents. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **61**, 915-921, doi:10.1016/j.ijrobp.2004.10.036 (2005).
- 57 Chen, B. P. *et al.* Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *The Journal of biological chemistry* **280**, 14709-14715, doi:10.1074/jbc.M408827200 (2005).
- 58 Nagasawa, H., Li, C. Y., Maki, C. G., Imrich, A. C. & Little, J. B. Relationship between radiation-induced G1 phase arrest and p53 function in human tumor cells. *Cancer research* **55**, 1842-1846 (1995).
- 59 Lowe, S. W. & Lin, A. W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485-495 (2000).
- 60 Sleiman, R. J., Catchpoole, D. R. & Stewart, B. W. Drug-induced death of leukaemic cells after G2/M arrest: higher order DNA fragmentation as an indicator of mechanism. *British journal of cancer* **77**, 40-50 (1998).
- 61 Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I. & Melino, G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* **32**, 5129-5143, doi:10.1038/onc.2012.640 (2013).
- 62 Prieur, A., Besnard, E., Babled, A. & Lemaître, J. M. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun* **2**, 473, doi:10.1038/ncomms1473 (2011).
- 63 Wang, M. *et al.* EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks. *Cancer research* **71**, 6261-6269, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0213 (2011).
- 64 Gire, V. & Dulic, V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell cycle* **14**,

- 297-304, doi:10.1080/15384101.2014.1000134 (2015).
- 65 Bailey, S. M. *et al.* The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres. *DNA repair* **3**, 225-233, doi:10.1016/j.dnarep.2003.10.013 (2004).
- 66 Gilley, D. *et al.* DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 15084-15088, doi:10.1073/pnas.261574698 (2001).
- 67 Williams, E. S. *et al.* Telomere dysfunction and DNA-PKcs deficiency: characterization and consequence. *Cancer research* **69**, 2100-2107, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2854 (2009).
- 68 Davoli, T., Denchi, E. L. & de Lange, T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* **141**, 81-93, doi:10.1016/j.cell.2010.01.031 (2010).
- 69 厚生労働省. 第 34 回 先進医療会議議事録.
- 70 Zhou, X. *et al.* DNA-PKcs inhibition sensitizes cancer cells to carbon-ion irradiation via telomere capping disruption. *PloS one* **8**, e72641, doi:10.1371/journal.pone.0072641 (2013).
- 71 Sunada, S. *et al.* Investigation of relative biological effectiveness and uniform isobiological killing effects of irradiation with a clinical Carbon SOBP beam on DNA repair deficient CHO cells. *Oncology Letters*, in press (2017).
- 72 Hirobe, T., Eguchi-Kasai, K. & Murakami, M. Effects of carbon-ion radiation on the postnatal development of mice and on the yield of white spots in the mid-ventrum and tail tips. *Radiation research* **162**, 580-584 (2004).
- 73 Amornwichee, N. *et al.* Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. *PloS one* **9**, e115121, doi:10.1371/journal.pone.0115121 (2014).
- 74 Lee, Y. *et al.* The purine scaffold Hsp90 inhibitor PU-H71 sensitizes cancer cells to heavy ion radiation by inhibiting DNA repair by homologous recombination and non-homologous end joining. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **121**, 162-168, doi:10.1016/j.radonc.2016.08.029 (2016).
- 75 Matsumura, Y., Oda, T. & Maeda, H. [General mechanism of intratumor accumulation of macromolecules: advantage of

- macromolecular therapeutics]. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy* **14**, 821-829 (1987).
- 76 Cabral, H. *et al.* Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature nanotechnology* **6**, 815-823, doi:10.1038/nnano.2011.166 (2011).
- 77 Maeda, H., Nakamura, H. & Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced drug delivery reviews* **65**, 71-79, doi:10.1016/j.addr.2012.10.002 (2013).

研究業績一覧

(本論文に関わる業績は太字)

(1) 原著論文

(1-1) 筆頭著者論文

1. Shigeaki Sunada, Ian M. Cartwright, Hirokazu Hirakawa, Akira Fujimori, Mitsuru Uesaka, Takamitsu A Kato, Investigation of relative biological effectiveness and uniform isobiological killing effects of irradiation with a clinical Carbon SOBP beam on DNA repair deficient CHO cells, *Oncology Letters*, 2017 in press.

2. Shigeaki Sunada, Hideki Kanai, Younghyun Lee, Takeshi Yasuda, Hirokazu Hirakawa, Cuihua Liu, Akira Fujimori, Mitsuru Uesaka, Ryuichi Okayasu, **Nontoxic concentration of DNA-PK inhibitor NU7441 radiosensitizes lung tumor cells with little effect on DSB repair**, *Cancer Science*, 107(9), p.1250-1255, 2016.

3. Shigeaki Sunada, Hiroshi Fujisawa, Ian M. Cartwright, Junko Maeda, Colleen A. Brents, Kazue Mizuno, Yasushi Aizawa, Takamitsu A. Kato, Mitsuru Uesaka: Monoglucosyl-rutin as a potential radioprotector in mammalian cells, *Molecular Medicine Reports*, 10(1), p.10-14, 2014.

(1-2) 共著者論文

1. Younghyun Lee, Shigeaki Sunada, Hirokazu Hirakawa, Akira Fujimori, Jac A. Nickoloff, Ryuichi Okayasu, TAS-116, a novel Hsp90 inhibitor, enhances radio-sensitivity in human cancer cells exposed to low and high LET radiation, *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(1), p.16-24, 2017.

2. Younghyun Lee, Huizi Li, Aya Masaoka, Shigeaki Sunada, Hirokazu Hirakawa, Akira Fujimori, Jac A. Nickoloff, Ryuichi Okayasu, The purine scaffold Hsp90 inhibitor PU-H71 sensitizes cancer cells to heavy ion radiation by inhibiting DNA repair by homologous recombination and non-homologous end joining, *Radiotherapy & Oncology*, 121(1), p.162-8, 2016.

3. Hao Yu, Jeremy S. Haskins, Cathy Su, Allison J. Allum, Alexis H. W. Haskins, Victoria A. Sallinas, Shigeaki Sunada, Taisuke Inoue, Yasushi Aizawa, Mitsuru Uesaka, Takamitsu A Kato; In vitro screening of radioprotective properties in the novel glucosylated flavonoids, *International Journal of Molecular Medicine*, 38(5), p.1525-1530, 2016.

4. Hiroshi Fujisawa, Nakako Izumi Nakajima, Shigeaki Sunada, Younghyun Lee, Hirokazu Hirakawa, Hirohiko Yajima, Akira Fujimori, Mitsuru Uesaka, Ryuichi Okayasu; VE-821, an ATR inhibitor, causes radiosensitization in human tumor cells irradiated with high LET radiation, *Radiation Oncology*, 10; 175, 2015.

(2) 学会発表等

(2-1) 国際会議における発表

1. Shigeaki Sunada, Hirokazu Hirakawa, Takeshi Yasuda, Akira Fujimori, Mitsuru Uesaka, Ryuichi Okayasu; DNA-PK inhibitor (NU7441) accelerates p53 independent tumor growth impairment in lung tumor cells irradiated with carbon ions, *Radiation Research Society 61st annual meeting*, Weston FL, September 2015.

2. Inoue Taisuke, Sunada Shigeaki, Aizawa Yasushi, Kato Takamitsu, Uesaka Mitsuru; Evaluation of novel glycosylated flavonoids as radioprotective agent by electrophoresis and comparison by the number of glycosylation, *Radiation Research Society 61st annual meeting*, Weston FL, September 2015.

3. Shigeaki Sunada, Hirokazu Hirakawa, Takeshi Yasuda, Akira Fujimori, Mitsuru Uesaka, Ryuichi Okayasu; Cellular Senescence May Play a Role in Radio-sensitization by DNA-PK Inhibitor (NU7441) in Lung Tumor Cells Irradiated with Carbon Ions, *15th International Conference of Radiation Research*, Kyoto JAPAN, May 2015.

4. Inoue Taisuke, Yamashita Shinichi, Sunada Shigeaki, Aizawa Yasushi, Uesaka Mitsuru; Radioprotective Property of Glucosylated Flavonoids: Observation of \cdot OH-scavenging Reactions by Pulse Radiolysis, *15th International Conference of Radiation Research*, Kyoto JAPAN, May 2015.

5. Ryuichi Okayasu, Aya Masaoka, Hirokazu Hirakawa, Hiroshi Fujisawa, Shigeaki Sunada, Ryoichi Hirayama, Miho Noguchi, Huizi Keiko Li, Akira Fujimori, Effectiveness of the combined treatment with hsp90 inhibitor and heavy ion irradiation, American Association for Cancer Research annual meeting 2014, San Antonio TX, December 2014

(2-2) 国内学会における発表

1. 砂田成章、金井英樹、Lee Younghyun、安田武嗣、平川博一、劉翠華、藤森亮、上坂充、岡安隆一、“低濃度 DNA-PK 阻害剤による放射線増感効果”、日本放射線影響学会第 59 回大会、JMS アステールプラザ (広島)、2016 年 10 月

2. 于髡、砂田成章、相澤恭、加藤宝光、藤森亮、山下真一、上坂充、“DSB 抑制とラジカル消去能からみた糖転移フラボノイドの放射線防護効果”、日本放射線影響学会第 59 回大会、JMS アステールプラザ (広島)、2016 年 10 月

3. 于髡、砂田成章、相澤恭、加藤宝光、上坂充、“分子コーミング法による糖転移フラボノイドの放射線防護効果の評価”、日本原子力学会北関東支部若手研究者発表会、東海会館 (茨城)、2016 年 4 月

4. 金井英樹、砂田成章、相澤恭、藤森亮、岡安隆一、上坂充、“配糖化アスコルビン酸の重粒子線に対するラジカル捕捉効果の評価”、日本原子力学会 2016 年春の大会、東北大学 (宮城)、2016 年 3 月

5. 于髡、砂田成章、相澤恭、藤森亮、岡安隆一、上坂充、“分子コーミング法による糖転移フラボノイドの放射線防護効果の評価”、日本原子力学会 2016 年春の大会、東北大学 (宮城)、2016 年 3 月

6. 相澤恭、井上泰助、砂田成章、加藤宝光、上坂充、“糖転移ルチンを利用した新しい放射線防護剤の開発”、日本原子力学会 2016 年春の大会、東北大学 (宮城)、2016 年 3 月

7. Lee Younghyun, Ryuichi Okayasu, Aya Masaoka, Huizi Li, Shigeaki Sunada; EFFECTS OF HSP90 INHIBITOR PUH71 IN HEAVY ION IRRADIATED HUMAN CANCER CELLS, 日本放射線学会 放射線ワークショップ, 富山大学 (富山), 2015 年 10 月

8. Ryuichi Okayasu, Younghyun Lee, Aya Masaoka, Shigeaki Sunada; Radiosensitization effect of Hsp90 inhibitor CAY10607 in human tumor cells, 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 2015 年 10 月

(3) 研究助成金等の採択状況

1. 日仏交流促進事業 (SAKURA プログラム) [日本学術振興会]

研究題目: 「ハドロン放射線治療による軟骨肉腫がん幹細胞の制御」(平成 28-29 年度)

研究分担: 分担 (課題代表者: Guillaume Vares)

助成金額: 2,000,000 円 (平成 28 年度: 1,000,000 円、平成 29 年度: 1,000,000 円)

2. 重粒子線がん治療装置等共同利用研究課題 [量子科学技術研究開発機構]

研究題目: 「効率的な細胞老化促進によるがん抑制法の基礎研究」(平成 27-28 年度)

研究分担: 代表者

助成金額: 研究に伴う必要経費 (旅費、宿泊費、実験消耗品等の支給)

3. 日本学術振興会特別研究員 (DC2) [日本学術振興会]

研究題目: 「効率的な細胞老化促進によるがん抑制法の基礎研究」(平成 27-28 年度)

研究分担: 代表者

助成金額: 1,900,000 円 (平成 27 年度: 1,000,000 円、平成 28 年度: 900,000 円)

4. 原子力人材育成等推進事業学位論文研究支援 [文部科学省]

研究題目: 「糖転移フラボノイドの生体に対する放射線防護剤としての検討」(平成 26 年度)

研究分担: 代表者

助成金額: 2,000,000 円