

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 砂田 成章

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。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。がんの標準治療において放射線療法は、侵襲性の高い傾向にある外科療法や化学療法と比べ、QOLが高い治療法として期待されている。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る正常細胞に対する被ばくや、放射線に対して抵抗性を示すがんが存在が放射線治療を困難にしており、効率的な治療法の開発が必要である。一つの戦略に放射線増感剤の利用が挙げられる。放射線増感剤は放射線の感受性を高める薬剤であり、がんの治療効果向上に期待されている。照射線量を抑えることにもつながり、現在までに多くの増感剤が開発されてきている。ターゲット因子の一つにDNA二本鎖切断修復（DSB）で働く重要なタンパクであるDNA-PKがある。DNA-PK阻害剤は放射線照射によって生じたDSBの修復を阻害して、細胞死を誘導する増感剤として報告も多く、臨床応用への期待も高い。効率的な治療法開発のもう一つの戦略に粒子線の利用が挙げられる。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り、このうち陽子線や重荷電粒子（重粒子）線などはブラッグピークと呼ばれる線量を特定箇所に集中させる物理的特徴を持ち、がん組織特異的に線量を与えられる。特に重粒子線は、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（LET）が高く、細胞のDNAに修復困難な損傷を形成でき、重粒子線治療は先進医療として治療成績も良い。

これらに関して、放射線増感研究の最近の報告で、DNA-PKcs遺伝子をノックダウンで部分的に抑制することで、DNA修復に依存しない放射線増感が起こることが示唆された。そこで低分子化合物のDNA-PK阻害剤を低濃度で用いることで、上記同様部分的にDNA-PKを阻害し、DNA修復に依存しない放射線増感が誘導できるという仮説を立てた。これまでの多くの基礎研究の報告に対し、増感剤の濃度に関する検討は行われておらず、特に低濃度による増感効果についてはほとんどわかっていないことから、臨床における副作用低減の面でも有用な知見となり得る。また重粒子線をはじめとする高LET放射線は、X線などの低LET放射線と比べて生物影響が異なることがわかってきている。最近の報告で高LET放射線が、DNA-PKが働くDSB修復経路（NHEJ）を抑制することが示された。これはDNA-PKの働きを抑えることで起こることが示唆されている。重粒子線とDNA-PK阻害剤の併用に関する報告も少なく、詳細についてはわかっていない。そこで本研究では、上記の仮説、問題に対し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の検証（第3章）
2. 低濃度DNA-PK阻害剤による放射線増感のメカニズム解析（第4章）
3. 低濃度DNA-PK阻害剤と重粒子線の併用効果の検証（第5章）

以上の課題を検証し議論することで、副作用の少ない放射線治療法の開発に貢献するとともに、DNA-PKの新しい機能の解明にもつなげることを目的とする。

まず課題1に対して、特異的なDNA-PK阻害剤NU7441を用い、X線との併用効果を評価するにあたりNU7441の濃度依存性を調べた。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細胞に対するNU7441の細胞毒性評価から0.3 μ M以下は毒性を示さないことから無毒性濃度とした。がん細胞に対して、無毒性濃度のNU7441とX線を併用したところ有意な放射線増感効果が示された。またDSB解析において0.3 μ M以下では、DSB修復阻害を示さなかった。このことから低分子化合物でも、低濃度で用いることでDNA修復に依存しない放射線増感効果が誘導され、仮説が実証された。DNA-PK阻害剤による放射線増感効果は、DSB阻害による細胞死誘導が通説であったことからDNA-PKが関与する新たな放射線増感機構の可能性が示唆された。興味深いことに、がん抑制遺伝子であるp53遺伝子が欠損したH1299細胞の方が、正常なA549細胞よりも増感効果が高いことがわかった。一般的にがん細胞の半数以上はp53遺伝子に異常があり、そのような細胞は放射線に対して抵抗性を示す。通常の放射線治療では、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、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にも生かせると考えられる。

次に課題2に対して、課題1で見出した低濃度DNA-PK阻害剤による放射線増感のメカニズムとその影響についてさらに詳細に調べた。細胞増殖試験において、NU7441の併用により照射1日後から細胞増殖抑制が起こった。そこで細胞周期への影響を調べたところ、

NU7441の併用は長期的なG2/M期アレストを引き起こしていることがわかった。これまでもDNA-PK阻害剤と放射線の併用によるG2/M期アレストの報告は多数あったが、主にはDSB修復阻害によるものだと考えられてきた。このことから低濃度DNA-PK阻害剤は、DNA修復に依存しないG2/M期の細胞周期チェックポイントを制御していることが示唆された。またp53欠損型のH1299細胞の方でG2/M期アレストが顕著に見られた。これはp53が異常な細胞はG1期アレストがうまく機能しないことから、特にG2/M期のチェックポイント制御が強調されたと考えられる。さらに細胞死の寄与についてsub-G1期解析と細胞老化解析を行ったところ、両解析においてNU7441の併用はH1299細胞の方でより細胞死を誘導することが観測された。以上の細胞生存率（増殖）試験、細胞周期解析、細胞死解析の結果は、G2/M期アレストの程度と細胞生存率の大きさに相関があることをよく表していると考えられる。細胞老化解析では、H1299細胞においてp53に依存しない老化経路の存在が示唆された。G2/M期アレストからの細胞死については、DNAの断片化による細胞死や細胞分裂期のスキップによる細胞老化など多く報告されており、それらとの関連性が示唆される。

最後に課題3に対して、これまで検討してきた低濃度DNA-PK阻害剤の低LET放射線（X線）との増感効果に加え、高LET放射線として炭素線との併用効果を調べた。低濃度DNA-PK阻害剤は炭素線との併用においても有意な増感効果を示した。増感効果の程度はX線併用時の方が高かった。このことから高LET放射線は、DNA-PKなどの機能を低下させることで、DNA修復だけでなく本研究で見出したDNA-PKが関わるDNA修復に依存しない増感経路も抑制することが示唆され、その結果増感効果が低下したと考えられる。それでも炭素線併用による増感効果の程度は十分なレベルであったことから、今後の重粒子線治療におけるDNA-PK阻害剤併用も期待される。また細胞死の影響を調べたところ、H1299細胞は炭素線に対しても比較的抵抗性を示した。p53正常型のA549細胞は炭素線に対して感受性であるのに対し、p53欠損型のH1299細胞はNU7441併用に感受性を示す結果が得られた。このことは、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り得る。

このように、低濃度DNA-PK阻害剤NU7441は低LET放射線だけでなく高LET放射線との併用でも効率的な放射線増感効果を示した。さらにこの増感経路は、DNA修復におけるDSB修復阻害ではなく、長期的なG2/Mアレストが関わっていることが示唆された。これらの結果は、臨床だけでなくDNA-PKの新たな機能探索という面でも意義がある。今後の課題としては、より臨床研究へと近づけるためにも動物実験への移行が必要である。特に実際のがん細胞の置かれている環境は細胞実験系とは大きく異なり、本研究で見出した薬剤をがん細胞まで効率よく送達させる必要がある。そこで今後は薬剤送達システム（ドラッグデリバリーシステム）の知見を取り入れることで、臨床応用に向けた効率的な放射線治療法の開発に貢献できると考えられる。