



第6回癌治療増感研究シンポジウム

6th Symposium on Sensitization of Cancer Treatment in Nara

放射線癌治療効果を左右する因子

平成16年2月7日(土)・8日(日)

猿沢荘

〒630-8361 奈良県奈良市池之町3番地

TEL, 0742-22-5175

シンポジウム大会長

大西武雄（奈良医大・生物）

シンポジウム代表世話人

渡邊正己（長崎大・院医歯薬・放射線生物）

国際癌治療増感研究協会

International Association for the Sensitization of Cancer Treatment : IASCT

<事務局> 小泉美樹子

〒606-8225 京都市左京区田中門前町103-5

パストゥールビル5F イメリタスクラブ

TEL, 075-707-2220 FAX, 075-707-2221 E-mail, info@iasct.jp

ホームページ, <http://www.iasct.jp/>

プログラム

2月7日(土) 第一日目

13:00-13:05 開会の挨拶

国際癌治療増感研究協会会長 大西武雄 (奈良医大・医・生物)
シンポジウム代表世話人 渡邊正己 (長崎大・院医歯薬・放射線生物)

13:05-14:30 セッション1 DNA損傷/修復

座長 鈴木文男 (広大・原医研・ゲノム応答)
内海博司 (京大・原子炉) (25分+質疑応答5分)
田内広 (茨城大・理・地球生命環境科学) (25分+質疑応答5分)

追加発言 (各3分+質疑応答各2分)

松本義久 (東大・院医・疾患生命・放)
細井義夫 (東大・院医・疾患生命・放)
鈴木文男 (広大・原医研・ゲノム応答)
石井宏武 (京大・院工・物質エネルギー化学)
牧村雄史 (京大・院工・物質エネルギー化学)

14:30-15:50 セッション2 細胞周期/細胞死1

座長 内海博司 (京大・原子炉)
真木寿治 (奈良先端大・バイオ・原核生物分子遺伝) (25分+質疑応答5分)
中西真 (名市大・院医・分子細胞生化) (25分+質疑応答5分)

追加発言 (各3分+質疑応答各2分)

鈴木啓司 (長崎大・院医歯薬・放射線生物)
稲波修 (北大・院獣医・放)
高橋恵理子 (北大・院獣医・放)
幸和恵 (奈良医大・医・耳鼻咽喉)

15:50-16:00 コーヒーブレイク

16:00-16:40 特別講演1「p53研究の新展開」 田矢洋一 (国立がんセ・研・放射線)

座長 近藤隆 (富山医薬大・医・放基)

16:40-18:00 セッション3 細胞死2

座長 奥村寛 (長崎大・医・原研放射)
垣塚彰 (京大・院生命科学・高次生体統御) (25分+質疑応答5分)
森田隆 (大阪市大・院医・遺伝子制御) (25分+質疑応答5分)

追加発言 (各3分+質疑応答各2分)

Zheng-Guo Cui (富山医薬大・医・放基)
Loreto B. Feril, Jr (富山医薬大・医・放基)
近藤隆 (富山医薬大・医・放基)
長谷川正俊 (群大・院医・腫放医)

18:30-20:30 懇親会

2月8日(日) 第二日目

9:00-9:40 **特別講演2「分子標的治療の展望」** 直江知樹(名大・院医・分子細胞)
座長 大西健(奈良医大・医・生物)

9:40-10:50 **セッション4 細胞生存**

座長 三橋紀夫(東京女医大・医・放医)
秋元哲夫(群大・院医・腫放医)(20分+質疑応答5分)
窪田宣夫(茨城医療大・保健医療・放射線技術科学)(20分+質疑応答5分)

追加発言(各3分+質疑応答各2分)
三浦雅彦(東医歯大・院・分子診断治療)
播磨洋子(関西医大・医・放)
渡邊経弘(茨城医療大・保健医療・放射線技術科学)
辻 孝(国立南和歌山病院・放)

10:50-12:00 **セッション5 腫瘍環境**

座長 平岡真寛(京大・院医・腫放)
柴田徹(京大・院医・腫放)(20分+質疑応答5分)
松浦成昭(阪大・院医・保健)(20分+質疑応答5分)

追加発言(各3分+質疑応答各2分)
永澤秀子(徳島大・工・生物工学)
宇都義浩(徳島大・工・生物工学)
桜井英幸(群大・院医・腫放医)
小倉昌和(京大・院医・腫放)

12:10-12:30 **ランチョンセミナー**

座長 小野公二(京大・原子炉)
廣田勝也(ナカライテスク)(17分+質疑応答3分)

12:30-14:25 **セッション6 放射線の標的は？**

座長 渡邊正己(長崎大・院医歯薬・放射線生物)
鈴木雅雄(放医研・宇宙放射線防護)(20分+質疑応答5分)
松本英樹(福井大・医・放基)(20分+質疑応答5分)
児玉靖司(長崎大・院医歯薬・放射線生物)(20分+質疑応答5分)
渡邊正己(長崎大・院医歯薬・放射線生物)(20分+質疑応答5分)

追加発言(各3分+質疑応答各2分)
野宮琢磨(東北大・医・放射線治療)
長谷川武夫(鈴鹿医療科学大・院・保健衛生)
安本順一(奈良医大・医・口腔外科)

14:25-14:30 閉会の辞 大西武雄(奈良医大・医・生物)

特別講演

「p53 研究の新展開」

田矢洋一（国立がんセ・研・放射線）

2 月 7 日（土） 16:00-16:40

座長 近藤隆（富山医薬大・医・放基）

p53 研究の新展開

田矢 洋一

国立がんセンター研究所放射線研究部

普通の細胞では p53 はごく微量しか存在しないけれども、DNA ダメージなどを含むさまざまなストレスを細胞が受けたとき、p53 は安定化されて量が増加し、活性な転写因子となって、ある場合には G1 期停止を誘導するが、別の場合にはアポトーシスを誘導して細胞を自殺させる。7～8年前には、この時 p53 に何が起きているのか全く不明の状態であったが、我々は p53 上の多数の推定リン酸化部位を認識する抗体を作製して解析した結果、Ser15 や Ser20 のリン酸化が p53 の安定化・活性化に重要であり、かつ、ATM あるいは ATR 蛋白質が Ser15 のリン酸化を行うことを明らかにしてきた¹⁾⁴⁾。

一方、G1 期停止とアポトーシスという2つの異なった経路の選択が p53 によってどのようなメカニズムでなされるのかということは重要な問題であるのに全く不明であった。それに関しても Ser46 のリン酸化がアポトーシス誘導能を制御しているらしいことを示してきた⁵⁾。

その後、我々は p53 の Ser46 を Phe に置換した時、転写活性化能とアポトーシス誘導能が大きく高められることに気づき、解析を進めた結果、分子量約 190kDa の蛋白質が p53 と結合していることを見いだした。この蛋白質をマスマススペクトロメトリーで同定したら、全く予想外のクラスリン重鎖であった。クラスリンは重鎖と軽鎖とが重合して細胞外からの物質の取り込みであるエンドサイトーシスに際して、膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られている。しかし、我々は重鎖のみが核内にも一部分存在して全く異なった機能をもつことを発見したわけである。このクラスリン重鎖の cDNA を p53 と共に細胞にトランスフェクトすると、野生型 p53 でも p53 依存性転写活性化能を促進するが、S46F 置換体 p53 ではずっと強く転写活性化能が増強された。内在性のクラスリン重鎖が実際に p53 と複合体を形成してこういう働きをしていることは、siRNA でクラスリン重鎖の発現を抑制すると p53 依存性転写活性化能が抑制されること、及び、クラスリン重鎖の抗体でクロマチン免疫沈降を行うと、p53 のターゲット遺伝子である p53AIP1 や NOXA、p21Waf1 などのプロモーターが取れてくることで確認した。

これらの結果は DNA に傷をつけることなく、アポトーシスを癌細胞に優先的に誘導して死滅させるような、新しい癌治療法の開発に応用できるはずである。

1) Cell, 91: 325-334 (1997)

2) Genes & Dev., 14: 289-300 (2000)

3) Science, 281: 1674-1677 (1998)

4) Science, 281: 1677-1679 (1998)

5) Cell, 102: 849-862 (2000)

特別講演 2

「分子標的治療の展望」

直江知樹（名大・院医・分子細胞）

2月8日（日）9:00-9:40

座長 大西健（奈良医大・医・生物）

分子標的療法の展望：造血器腫瘍を中心として

直江知樹

名古屋大学医学系研究科分子細胞内科学（血液内科）

従来の抗がん剤治療をベースとする化学療法が未だに満足すべき状況に達していない現実と、ポストゲノム時代において、ガン遺伝子研究を臨床に還元する大きな流れの中にあつて、「分子標的治療」はガンにおける最も今日的なテーマであろう。急性前骨髄性白血病に対するオールトランスレチノイン酸と慢性骨髄性白血病における Abl 阻害剤は、いずれもガン遺伝子産物を直接標的とした治療法であるが、いずれも臨床的に大成功を収めた。さらに抗 CD20 抗体リツキシマブがB細胞性リンパ腫に対し有効で、従来の抗がん剤療法との併用療法が標準的な治療法となりつつある。また固形癌でも、キナーゼ阻害剤と抗体療法が数多く開発されている。

従来の化学療法は細胞増殖抑制を指標に開発され、多くの場合 DNA や細胞周期関連分子を標的として、結果的にアポトーシスを誘導している。しかし「分子標的」治療の条件としては、腫瘍における分子病態に基づいて分子を特定し、その分子を小化合物などで標的し、その結果、生体内で治療効果を得ることが必要である。一方、薬剤からの「標的分子」の探索、さらにリード化合物の構造展開という薬物からのアプローチもありうる。分子標的物質あるいは抗体が薬となるまでには、①標的分子ならびに標的手段が適切であるか、②細胞内で標的が対象となっているか、狙ったような生物学的反応が起きているか、③生体内での薬物動態や代謝はどうか、④生体内での抗腫瘍効果と有害事象はどうか、⑤臨床試験のデザインは適切かなど、前臨床と臨床を橋渡しする研究、いわゆる「トランスレーショナルリサーチ」が重要になってくる。本講演では、「答え」よりも「問題」に力点をおいて、造血器腫瘍を対象とした分子標的治療の開発状況についてレビューする。

セッション1 DNA 損傷/修復

座長 鈴木文男（広大・原医研・ゲノム応答）

2月7日（土）13:05-14:30

内海博司（京大・原子炉）

田内広（茨城大・理・地球生命環境科学）

追加発言

松本義久（東大・院医・疾患生命・放）

細井義夫（東大・院医・疾患生命・放）

鈴木文男（広大・原医研・ゲノム応答）

石井宏武（京大・院工・物質エネルギー化学）

牧村雄史（京大・院工・物質エネルギー化学）

DNA二重鎖切断修復と放射線回復現象

内海博司¹⁾、Uma Devi¹⁾、古澤佳也²⁾、武田俊一³⁾

¹⁾京大・原子炉・生命医科学、²⁾放医研、³⁾京大・医学部

【目的】放射線で誘導されたDNA二重鎖切断 (DSB) 修復系には、S期からG2期にかけてのみ働く相同組換え修復 (HR) と全細胞周期で働いている非相同末端結合修復 (NHEJ) 系の2種類の存在が明らかとなり、修復に関与する遺伝子をノックアウトした細胞株も作られるようになった。特に、ニワトリBリンパ細胞株を用いて、種々のDSB修復遺伝子をノックアウトした細胞系が作られている。これらの細胞系を用いて、これまでその分子機構が不明のままになっている多くの現象 (細胞周期での感受性の変動、SLD回復、PLD回復、LET/RBE、低線量率、生存率曲線の理論など) が、DSB修復現象として、矛盾無く説明できるようになったので報告する。

【実験】4種のニワトリBリンパ細胞株 {親株(DT40)、DSB修復系の相同組換え (HR) 修復に関与するRad54遺伝子をノックアウトした細胞株(RAD54-/-)、非相同的末端連結(NHEJ)修復系に関与するKu70遺伝子をノックアウトした細胞株 (KU70-/-)、この両遺伝子をダブルノックアウトした細胞株 (RAD54-/-/KU70-/-)} を用いた。主にX線を用いたが、低線量率には γ 線を、高LET放射線は放医研の重粒子線を用いた。生存率は、メチルセルロース培地を用いてのコロニー形成法で測定した。細胞周期を合わせるのには、エリユートレータを用いた。DSB修復阻害作用を検討する実験では、放射線照射直後に薬物を入れ、照射後1時間だけ作用させて、異なったノックアウト細胞での薬剤の増感効果を比較検討した。

【結果と考察】一般に高等動物細胞を放射線照射すると細胞周期のS後期からG2期にかけての細胞が特異的に生き残る。この分子機構は不明であったが、この細胞系を用いてHR系とNHEJ系が同時に働いているため損傷を効率よく修復する結果であることを明らかにした (EMBO J., 17 5497-5508 1998)。約40数年前にエルカインド博士が放射線を一度に照射せず分割して、その照射間隔をあけると細胞障害が軽減する分割照射回復を発見し、その分子機構はブラックボックスのまま癌治療に広く応用されてきた。この回復現象にHR修復系が強く関与することを明らかにした (Radiat. Res., 155 680-686 2001)。また、LET/RBEの相関図はLETの増加と共にRBEが増加しまた減少することが知られている。しかし、その機構は不明であった。この細胞と放医研の重粒子施設を用いて、本現象の新しい解釈を見いだした。一般に低線量率照射とは、線量を多重回分割照射した場合の極限状態に相当し、その損傷修復には分割照射の回復機構が関与していると考えられてきた。分割照射回復がHR修復系であることが明らかになった現在、HR修復系が働いていると期待されたが、予想とは異なりNHEJ修復系の重要性が示された。特にこの実験を通して、ダブルノックアウト細胞の生存率曲線が1Gy/minと1Gy/dayとで、全く同じとなり、電離放射線による細胞死の主因がDSBであることを強く示唆した。

更に、この細胞系を用いて新しい増感剤の探索を行った。ウオルトマニン は予想通りNHEJ系だけを増感した。インドの薬草から取られ増感作用も報告されているウイズフェリンAは、ウオルトマニンとは逆にHR系修復系を増感した。NHEJ系を阻害する薬剤は、G0あるいはG1期に止まっている細胞周期の長いヒト正常細胞と癌細胞とを区別せず増感する恐れがある。しかし、新増感剤ウイズフェリンAは、HR修復系が働いていないG0、G1期である正常細胞と放射線抵抗性周期であるS期にある癌細胞とを区別して増感することが期待される。このHR修復系増感剤は、癌治療において、X線・ γ 線などの低LET放射線の欠点 (殺細胞効果が低い) を補い、高価な重粒子線と同等以上の治療効果を上げる可能性を示している。

放射線による DNA 二重鎖切断修復における Nbs1 タンパクの機能

田内 広¹, 飯島健太¹, 望月大輔¹, 尾形裕美¹, 小林純也², 坂本修一³, 松浦伸也²,
一政祐輔¹, 小松賢志³

¹ 茨城大学・理学部・地球生命環境科学科, ² 広島大学・原医研,

³ 京都大学・放生研センター

放射線に被曝した細胞内に DNA 二重鎖切断 (dsb) が生じることはよく知られている。細胞内ゲノムに生じた dsb は、たとえ 1 つであっても致命的な損傷となりうるため、細胞には損傷修復機構をはじめ、細胞周期チェックポイント、アポトーシスによる異常細胞の除去といった様々な dsb 応答反応が備わっている。高等真核生物の dsb 修復経路は、免疫組換えや減数分裂、DNA 複製のような、普遍的な生物反応のためにも必須であり、それには非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) の少なくとも 2 つの経路が存在することが知られている。NHEJ は高等真核生物細胞の主要な dsb 修復経路と考えられているが、その再結合部位にはしばしば挿入や欠失を伴う。一方、HR は無傷の姉妹染色分体をテンプレートにして dsb を修復する fidelity の高い経路である。

ここでテーマにあげた Nbs1 は、放射線高感受性、高頻度の発がん、染色体不安定性など、dsb 生成に伴う様々な細胞応答に異常を示す遺伝病、ナイミーヘン症候群 (Nijmegen Breakage Syndrome, NBS) の原因タンパクである。Nbs1 は、Rad50/Mre11 と複合体を形成し、その局在や活性を制御することによって dsb 修復において重要な役割を果たしている。我々は、高頻度で相同組換えを起こすニワトリ DT40 細胞を用いて Nbs1 をノックアウトし、その細胞における NHEJ および HR 機能を解析した。その結果、Nbs1 機能が欠損しても NHEJ 経路には大きな影響が見られない一方で HR の効率は野生型細胞の 1/200 以下に低下することが明らかとなり、さらに Nbs1 欠損細胞でわずかに生じた HR 修復産物の解析から、Nbs1 複合体が HR 修復に必須であることに加えて、乗り換え反応を防ぐための組換え中間体の正常な解消にも関与していることが示唆された。(Nature 2002)。そこで、Nbs1 タンパクにおける相同組換え修復に重要なドメインを明らかにするため、NBS 患者由来細胞株に相同組換えレポーターである SCneo コンストラクトを組み込み、その細胞に完全長または変異 Nbs1 タンパクを発現させて相同組換え活性を解析している。SCneo を組み込んだ NBS 患者細胞では、I-SceI による dsb 導入後の相同組換え頻度が顕著に低下し、その頻度は Nbs1 ノックアウト細胞と同様であった。NBS 細胞における相同組換え頻度の低下は、完全長の Nbs1 タンパクを発現させることによって顕著に上昇し、Nbs1 が相同組換え活性に重要であることが確認された。現在、様々な変異 NBS1 タンパクの発現下で相同組換え頻度がどのように変化するかについて解析中であり、その結果を踏まえて Nbs1 および Rad50/Mre11/Nbs1 複合体の相同組み換え修復における機能について考察する。

DNA 依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)は何をやっているのか？

松本 義久¹、富田 雅典²、細井 義夫¹、鈴木 紀夫^{1,3}

¹ 東大・院医・疾患生命・放射線、² 理研・RI、³ 国際医療福祉大

放射線が引き起こすさまざまな DNA 損傷の中でも二重鎖切断は最も重篤なもので、細胞の生死に最も密接に関わると考えられている。

DNA-PK は、二本鎖 DNA 末端に結合して活性化するタンパク質リン酸化酵素である。また、DNA-PK は触媒サブユニット(DNA-PKcs)、Ku86、Ku70 の3つのサブユニットから構成されるが、そのいずれかを欠損する細胞および個体は放射線高感受性に加えて V(D)J 組換え異常や免疫不全を呈する。これらのことから、DNA-PK は「DNA 二重鎖切断のセンサー」として、その修復や情報伝達に極めて重要な役割を担うと考えられる。

DNA-PK は *in vitro* において、p53、RPA などをはじめ、数十のタンパク質をリン酸化しうることが報告されている。しかし、*in vivo* における「真の基質」は明らかになっていない。更に、DNA-PK によるリン酸化が DNA 修復においてどのような意味を持つのかは現時点ではほとんど分らない。これは、現在ホットなこの領域における最大のミッシングリンクの一つと言えよう。

我々は、DNA-PK の真の基質とリン酸化の意義を明らかにすることを目的とし、数年前から DNA ligase IV とともに DNA 二重鎖切断修復や V(D)J 組換えに関わると考えられている XRCC4 タンパク質に着目して解析を行ってきた。まず、最初に、i)XRCC4 のリン酸化が放射線照射によって誘導されること、ii)リン酸化の誘導が DNA-PKcs を欠損する細胞では見られないこと、また、iii)AT 患者由来細胞ではリン酸化が見られることを示した。これらの結果から、XRCC4 が *in vitro* ばかりでなく、*in vivo* においても DNA-PK の基質となっていることが強く示唆された。

リン酸化の意義の解明へ向け、現在我々は、リン酸化部位の同定、更にはリン酸化部位変異体の機能解析を進めている。これまでに、3ヶ所のリン酸化部位を確定した。プレリミナリーながら、これらのリン酸化部位を欠損する細胞の形質から、我々は、DNA-PK による XRCC4 タンパク質のリン酸化は DNA 修復の精度を保証するために重要な意味を持つであろうと予想している。

また、DNA-PK および類縁分子（例えば、ATM や ATR）は SQ、TQ 配列指向性であることが知られており、これまでの DNA-PK の機能研究はほとんどの場合、SQ、TQ 配列のみに着目して行われてきた。ところが、XRCC4 の主要なリン酸化部位はこれに一致しなかった。このことから、少なくとも DNA-PK は SQ、TQ 以外の配列を標的としうることが分かった。DNA-PK はこれまで知られているよりはるかに多くのことを行っているのかも知れない。

1 本鎖 DNA と suramin による DNA-PK 活性の阻害

細井 義夫

東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター放射線研究領域

放射線は DNA に様々な傷を生じさせるが、付着細胞の生死を決定するのは DNA 2 重鎖切断とその修復系であることが報告されている。DNA 2 重鎖切断は、主に homologous recombination (HR) と nonhomologous end joining (NHEJ) の 2 つの方法により修復される。我々はヒト細胞において、NHEJ が主要な DNA 2 重鎖切断修復経路であること、ヒト培養食道癌細胞を用いた実験から癌細胞の放射線感受性 (D0) と NHEJ の最初のステップで作用する DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) の活性との間に相関があることを報告した。

wortmannin が DNA-PK 活性を抑制し癌細胞の放射線感受性を高めるが、DNA-PK 活性だけでなく PI 3-キナーゼを含め多くの酵素の活性を抑制し、副作用が大きく臨床的に用いることは困難である。我々は 1 本鎖 DNA (phosphorothioate oligonucleotides) が DNA-PK に直接作用して活性を阻害することを明らかにした。phosphorothioate oligonucleotides は増殖因子受容体を含む多くの蛋白質に結合してその活性を阻害することが報告されているが、それらの多くは suramin によっても阻害されることが報告されている。suramin はアメリカで抗癌剤として臨床試験が行われた薬剤で、臨床適応が可能である。suramin は *in vitro* で DNA-PK 活性を阻害するだけでなく、細胞上清中に添加しても DNA-PK 活性は抑制された。また、放射線による DNA 2 重鎖切断の修復も抑制された。suramin の問題点としては、(1) DNA-PK 活性の抑制率や放射線増感作用が小さいことと、(2) 細胞による取り込み量の違いによるものと考えられるが、必ずしも全ての細胞において放射線増感が得られない点である。また、suramin は EGF 受容体の活性を阻害することが報告されていて、suramin の放射線増感機序は DNA-PK 活性抑制のためだけではない可能性が考えられる。しかし、1 本鎖 DNA や suramin による DNA-PK 活性抑制機序 (DNA-PK との結合部位) が明らかになれば、より効率的な DNA-PK 活性抑制剤の開発につながるものと考えられる。

ゲノム損傷に起因する p53 非依存性アポトーシスの多様性

鈴木文男、秋元志美、矢島浩彦
広島大・原医研・ゲノム応答

これまでの研究により、放射線などのゲノム損傷に起因するアポトーシスではミトコンドリアを介したシグナル伝達が活性化すること、さらには細胞種に依存した放射線誘発アポトーシス感受性差は、p53 の状態に左右されることなく本質的なものであり、その原因はミトコンドリアからのチトクローム c 漏出以降のシグナル伝達に依存していることが明らかとなった。一方、古くから紫外線に比べて電離放射線では死細胞の出現が遅れることが証明されてきた。そこで本研究では、γ線と紫外線照射によるアポトーシス誘発効果の違いを調べるために、p53 が機能しない Jurkat 細胞を用いて同程度の致死線量を照射した後の細胞死の出現とアポトーシスシグナル伝達の活性化動態について調べた。なお、Jurkat 細胞は Fas 活性化処理においても、主として mitochondrial pathway を経由してアポトーシスが引き起こされる、いわゆる II 型 (type II) 細胞として位置づけられている。

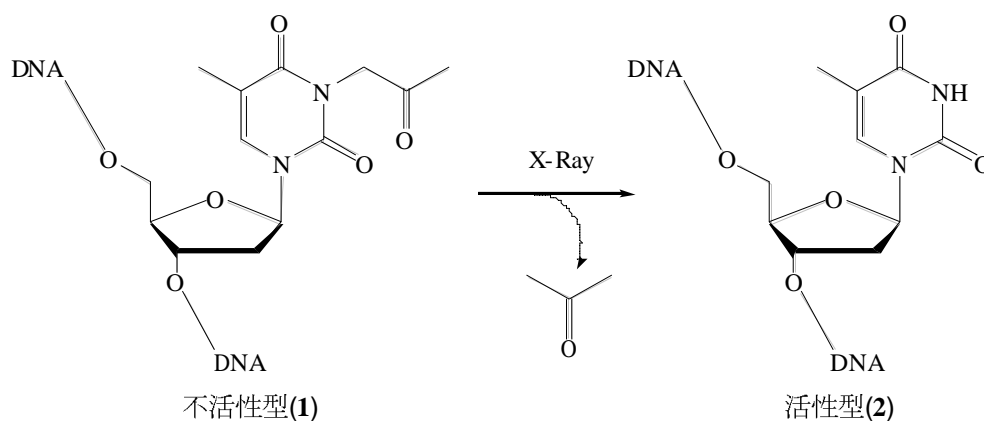
コロニー形成法により、Jurkat 細胞では 15 J/m² の紫外線照射は 10 Gy の γ線と同程度の致死効果を与えることがわかった。しかし、15 J/m² の紫外線を照射すると、照射後 3 時間でアポトーシスに特徴的な核変化が観察されるのに対して、10 Gy の γ線では照射後 24 時間以上培養しないとアポトーシス細胞は出現しなかった。同様の違いは、DNA の電気泳動解析においても見られた。また、これらの細胞について cytochrome c の細胞内分布を調べたところ、紫外線では照射後 3 時間以内に、γ線では照射後 24 時間培養することによりミトコンドリアから cytochrome c が漏出することがわかった。さらに、紫外線では照射後速やかに caspase-9、caspase-7 及び caspase-3 が活性化されるのに対して、γ線ではいずれの caspase も照射後 24 時間以上培養しないと活性化フラグメントは出現しなかった。以上の結果は、紫外線と γ線との間に見られる p53 非依存性アポトーシス誘発の大きな時間的な差は、ミトコンドリアからの cytochrome c の漏出に関わる上流のシグナル伝達制御の違いに起因することを強く示唆する。

放射線照射によりアンチセンス分子を遊離する 2-オキソ基含有 DNA の開発

石井宏武、田邊一仁、八田博司、西本清一
京大・院工・物質エネルギー化学

正常細胞では機能発現せず、がん組織においてのみ機能発現できる分子は、がん治療薬や診断薬として非常に有効である。今回我々は、放射線照射下、低酸素細胞においてのみ活性発現するアンチセンス分子の開発を行った。

我々はこれまでに、放射線照射により除去可能な置換基として 2-オキソアルキル基を見出している。本研究では、チミン残基の N(3)位に 2-オキソアルキル基を導入した放射線活性化型 DNA オリゴマー(1)をアンチセンス分子として合成し、放射線照射下における反応挙動を評価した。その結果、低酸素条件下、(1)に 330Gy の放射線を照射すると、置換基を遊離した無置換 DNA オリゴマー(2)が 10%の収率で生成した。このことは、低酸素細胞におけるアンチセンス活性を放射線照射を用いて制御できることを示唆している。



還元活性化インドールキノン置換 5-フルオロデオキシウリジンプロドラッグ

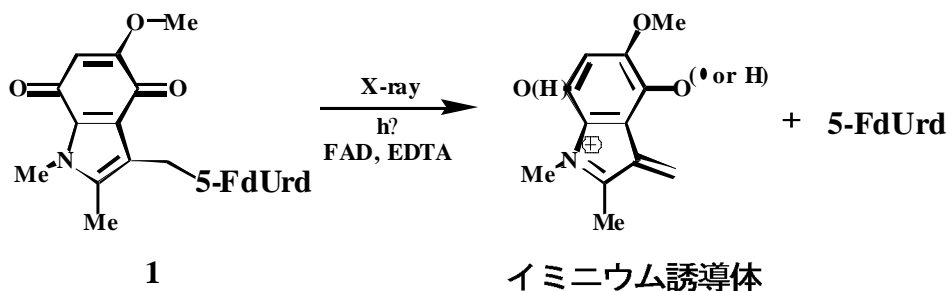
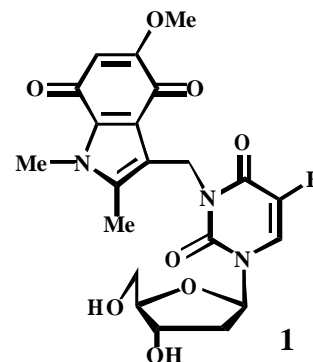
牧村雄史、田邊一仁、八田博司、西本清一
京大・院工・物質エネルギー化学

5-フルオロデオキシウリジン(5-FdUrd)は代謝拮抗作用により強い抗腫瘍活性を示すが、正常細胞に対しても強い毒性を及ぼすので、臨床応用では投与量が制限され、十分な治療効果を得られないことが問題となっている。近年これらの副作用を軽減し、かつ癌の治療効果を高める目的で、正常細胞と腫瘍細胞を差別化するためのプロドラッグ化が注目されている。

他方、インドールキノンを始めとするキノン化合物は、腫瘍細胞に過剰に存在する酵素などにより還元活性化されると、特定部位で開裂を起こす。開裂反応時に生成するイミニウム誘導体は、DNA等の生体分子をアルキル化し、強い毒性を示すことが知られている。

本研究では、還元条件下においてのみ強い抗腫瘍活性を発現し得るプロドラッグとして、インドールキノン基を N3 位に導入した 5-FdUrd(1)を合成し、放射線還元あるいは光増感還元条件下での反応挙動を解析した。

その結果 1 は、900Gy の放射線照射下、29%の 5-FdUrd を遊離した。またフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の共存下における光増感還元により、70%の高収率で 5-FdUrd を遊離することが明らかとなった。これらの結果と併せて、低酸素細胞に対する *in vitro* 放射線または光増感活性、低酸素細胞毒性について報告する。



セッション2 細胞周期/細胞死 1

座長 内海博司（京大・原子炉）

2月7日（土）14:30-15:50

真木寿治（奈良先端大・バイオ・原核生物分子遺伝）

中西真（名市大・院医・分子細胞生化）

追加発言

鈴木啓司（長崎大・院医菌薬・放射線生物）

稲波修（北大・院獣医・放）

高橋恵理子（北大・院獣医・放）

幸和恵（奈良医大・医・耳鼻咽喉）

複製開始制御異常に起因する染色体異常と細胞死の誘発
－発がんプロセスの新しい仮説－

真木寿治

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

発がんの直接的な原因である突然変異や染色体異常の発生には様々な要因が関与する。紫外線・放射線・化学変異原などの細胞外からの要因に加えて、酸素ラジカルを代表とする細胞内の代謝過程で生じる物質による DNA 損傷や DNA 複製の誤りで生じる複製エラーが遺伝情報の変化を引き起こすことが広く知られている。最近になり、我々は複製開始制御の異常が染色体異常を強く引き起こすことを見いだした。

マルチレプリコンを持つ真核生物では、複製起点からの複製開始の制御に異常が生じた場合、レプリコンサイズの増大やレプリコン間での複製開始順序の乱れなどにより、複製フォークの進行に様々な問題が生じることが予想される。これまでに我々は、出芽酵母 *Orc1p* をコードする遺伝子の温度感受性変異株 (*orc1-4*) において染色体喪失や染色体再編が高頻度に発生することを見出した。この現象を詳細に検討する過程で、複製開始制御異常は細胞周期の G2/M チェックポイントを強く活性化すること、染色体異常はチェックポイントの脱離に伴い誘発されること、さらにこのチェックポイントの脱離に伴い細胞死が誘発されることを発見した。興味深いことに、非許容温度で処理した *orc1-4* 細胞の生き残りの大部分は、非許容温度下での G2/M 期での停止や生存率低下を示さなくなることが判明した。これらの細胞に共通して rDNA 領域の顕著な退縮が生じていることから、複製開始制御異常による rDNA 領域の変化、および誘発された DNA 損傷チェックポイントにおける rDNA 領域の役割について検討し、以下の結果を得た。1)rDNA 領域の変動は Rad9p によって抑制されている。2)他の染色体異常の発生プログラムとは異なり、rDNA 領域の変動は温度シフトアップ後の早い時間に始まる。3)人為的に rDNA 領域を退縮させた *orc1-4* 変異株では細胞周期の停止が部分的に抑制され、かつ DNA 損傷チェックポイントによる細胞死の誘発が見られなくなる。これらのことから *orc1-4* 変異株では、rDNA 領域で高頻度に DNA 傷害が生じており、チェックポイントの発動の一因となっていると考えられる。

これらの結果から、複製開始制御と発がんを議論する。

染色体 DNA 異常を感知するチェックポイント機構

中西 真

名古屋市立大学大学院医学研究科・分子細胞生化学

哺乳動物細胞は様々な変異原刺激や増殖刺激に対して、安定に染色体 DNA を維持するチェックポイント機構を持っている。このチェックポイントは染色体 DNA に損傷等の異常が感知された場合、直ちに細胞周期を停止して効率的に異常 DNA を修復するものである。細胞周期チェックポイントの最終標的はサイクリン/Cdk 複合体であると考えられているが、いかなる分子機構により DNA 傷害が認識されるのか、いかなる分子群がこれらの情報をサイクリン/Cdk 活性制御に伝達するのかについては不明な点が多い。癌細胞においては、一般的に DNA 変異の蓄積や染色体の数、質の変化が見られるため、ある種のチェックポイント機構が破壊されていると考えられている。しかしながら、生存に必須なチェックポイント機構は存在しており、これらにおける変異の蓄積は放射線照射等の様々な変異原刺激に対する感受性を高める原因となる。従って、癌細胞に残存するチェックポイント機構を阻害することは、新たな対がん治療としての可能性が示唆される。我々はノックアウトマウスを用いた遺伝学的解析から、哺乳動物細胞においては Chk1 キナーゼが DNA 傷害チェックポイントならびに DNA 複製チェックポイントに必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた。本シンポジウムでは Chk1 キナーゼのマウスコンディショナルノックアウト細胞の解析を中心に、Chk1 がいかんして細胞周期停止を制御するかについての最新の知見や、Chk1 活性を制御する上流因子群についても新たな結果を紹介したい。興味有ることに、体細胞細胞周期においては Chk1 欠失細胞でも DNA 複製チェックポイント機構は保たれており、発生過程において新たな Chk1 非依存的チェックポイント機構が確立してくると思われた。これらの知見を基に Chk1 経路が新たな癌治療の標的となるかどうかについても議論したい。

放射線による非アポトーシス性老化様増殖停止誘導の分子メカニズム

鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生物学研究室

癌の放射線治療においては、腫瘍部位にいかに効率よく細胞死を引き起こすかが最も重要な課題である。これまでに、放射線によるアポトーシスの誘導にかかわる因子が次々と同定され、より効率的なアポトーシスの誘導により放射線治療効果が飛躍的に高まることが期待されている。しかしながら、癌の中にはとりわけ固形腫瘍のように放射線治療によりアポトーシスを顕著に起こさないものもある。我々研究グループは、このような癌細胞においても放射線照射により老化様細胞増殖停止 (SLGA) が誘導され、癌細胞の増殖が不可逆的に停止していることを見いだした。これまでに、放射線照射による SLGA の誘導には p53 機能に依存的な経路と非依存的な経路があることを明らかにしてきたが、さらに SLGA の誘導には SLGA の誘導開始とその維持の 2 つの段階が存在する可能性が示されるようになってきた。すなわち、p53 機能が存在する癌細胞では、放射線照射による ATM-p53 経路の活性化に依存した細胞周期停止が SLGA の誘導開始シグナルとなり、細胞周期の永続的停止が細胞にとってある種のストレスとして作用して MAP キナーゼ経路が活性化され p16^{INK4a} が誘導されて SLGA が維持される。一方、p53 機能が消失した多くの癌細胞では、放射線照射後誘導される mitotic catastrophe により細胞周期が 4N G₁ の状態で停止することによって SLGA の誘導が開始され、この状態が細胞にとってストレスとなって MAP キナーゼ経路が活性化されて SLGA が維持される。以上の結果より、放射線治療効果を左右する因子として放射線による SLGA の誘導にかかわる因子の役割について考察したい。

参考文献

1. K. Suzuki, I. Mori, Y. Nakayama, M. Miyakoda, S. Kodama, and M. Watanabe. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat. Res.*, 155, 248-253 (2001).
2. 鈴木啓司, 児玉靖司, 渡邊正己: 放射線による p53 活性化と老化様細胞増殖停止の誘導, 放射線生物研究, 第 36 巻, 第 4 号, p392-400 (2002) .
3. 鈴木啓司, 児玉靖司, 渡邊正己: 放射線による老化様細胞増殖停止(SLGA)の誘導と細胞死, 癌の臨床, 第 48 巻, 第 6 号, p377-380 (2002) .
4. 渡邊正己, 鈴木啓司, 児玉靖司: 放射線による細胞死の分子機構, 日本医学放射線学会誌, 第 62 巻, 第 10 号, p540-544 (2002) .

放射線による機能的 FAS ならび DR5 のレドックス制御による発現

稲波 修、浜洲 拓、桑原幹典

北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室

【目的】私たちは、ヒト白血病由来 MOLT-4 細胞で放射線により FAS の過剰発現が起こり、リガンドには非依存性であるが、機能的な DISC の形成が見られ、カスパーゼ 8、3 依存性のアポトーシス経路があることを示した (Takahashi et al. Int J Radiat Biol. 78:115、2002)。本研究ではこうした機構がリンパ球系以外の固形腫瘍由来のがん細胞でも起きているのかどうか、さらには FAS-L や TRAIL による放射線増感が起きるかどうか検討した。

【方法】用いた細胞はヒト前立腺がん由来 LNCaP、DU145、ヒト乳がん由来 MCF-7、ヒト肺癌由来細胞 A549、ヒト胃癌細胞 MKN45 を用いフローサイトメトリーによる細胞膜表面への FAS ならび DR5 の発現と X 線照射の関係を評価し、さらに、FAS アゴニスト抗体である CH11 と DR5 に対するリガンドである TRAIL を培地に加えアポトーシスの放射線増感が起きるかどうか評価した。また、幾つかの細胞で FAS や DR5 の発現が見られたことから、この発現に細胞内の酸化還元状態が関与するかという目的で、照射直後に N-アセチルシステイン(NAC)を培地に添加し検討した。

【結果】今回用いた全ての細胞で FAS ならび DR5 の細胞膜への発現の X 線照射 (8Gy) による増強が観察された。また、これらの細胞のうち、MKN45 細胞と A549 細胞では CH11 と TRAIL 処理によって強い放射線アポトーシス増感が観察された。DU145 細胞では僅かであるが CH11 と TRAIL 処理による放射線アポトーシス増感が、LNCaP 細胞では TRAIL のみで強いアポトーシス増感が見られた。また、MCF-7 細胞ではこれらのいずれのリガンド処理でも放射線アポトーシス増感は観察されなかった。さらに、MKN45 細胞では放射線誘発 FAS と DR5 発現は NAC の放射線照射後の培地への添加で抑制され、リガンドによる放射線誘発アポトーシス増感も消失した。以上のことはリンパ系細胞のみならず多くの固形腫瘍細胞でも放射線照射によりレドックス機構が関与する機能的デスリセプター発現を起こす事を示している。したがって、今後、放射線照射後の細胞内の活性酸素種生成やグルタチオンとその関連酵素を検討することが重要であると考えられる。今回の結果は、放射線によって発現するデスレセプターを標的とした増感方法の可能性を示すものである。

白血病細胞 MOLT-4 の 2-クロロデオキシアデノシンによるアポトーシス誘導におけるデスレセプター発現と細胞膜マイクロドメインの重要性

高橋 恵理子¹、 稲波 修¹、 松田 彰²、 桑原 幹典¹
北大・獣医放射線¹、 北大・薬学・創薬化学²

[目的] 我々は、ヒトリンパ系白血病細胞 MOLT-4 の放射線誘導アポトーシスが、デスレセプターである Fas の過剰発現と機能的な DISC の形成につづいて、カスパーゼ-8 とカスパーゼ-3 が活性化して誘導されるというメカニズムを報告してきた。さらに、ヌクレオシド系抗がん剤である 2-クロロデオキシアデノシンによっても、Fas さらに DR5 を介したアポトーシス経路が存在することを明らかにしてきた。本研究では、2-クロロデオキシアデノシン(2CdA)が MOLT-4 に誘導する、デスレセプターを介したアポトーシス経路の詳細を明らかにするために、細胞膜レベルでのシグナル伝達機構について細胞膜マイクロドメイン(ラフト)に注目して実験を行なった。

[方法] 5 μ M の 2CdA 処理した MOLT-4 細胞および未処理の細胞を回収し、1%TritonX-100 で可溶化した後、ショ糖不連続密度勾配法によりラフト画分を分離した。イムノブロットにより Fas と DR5、そしてアダプタータンパク質である FADD を検出した。また、ラフトの構造を破壊する薬剤として知られるメチル β -シクロデキストリン(M β CD)を添加し、2CdA が誘導するアポトーシス細胞の割合を測定し、さらにイムノブロットによる Fas と DR5 の発現を比較検討した。

[結果・考察] 2CdA 処理した MOLT-4 細胞では、ラフト画分への Fas と DR5 の移動が認められ、さらに FADD も検出された。M β CD により 2CdA 誘導アポトーシスは抑制されたが、Fas と DR5 の発現増加に変化はなかった。2CdA のアポトーシス誘導は、デスレセプターの増加だけでは不十分であり、レセプター会合の場としてのラフトの存在が不可欠であると証明された。本研究の結果は、その他の抗がん剤あるいは放射線で誘導されるアポトーシスについてもラフトの観点から考える必要があると示唆するものである。

プロテインチップを用いたグリセロールによる CDDP 増感効果の解析

幸和恵¹、高橋昭久²、大西健²、家根旦有¹、大西武雄²

奈良医大・耳鼻咽喉科¹、生物²

【目的】これまで我々は、変異型 *p53* をもつ甲状腺未分化癌細胞株 8305c においてグリセロールを併用することにより CDDP の感受性を増感させることができることを培養細胞および移植腫瘍レベルで明らかにしてきた。今回、グリセロール併用の影響についてプロテインチップを用いて検討した。

【方法】変異型 *p53* 遺伝子を有する甲状腺未分化癌培養細胞をグリセロールおよび CDDP 処理し、タンパクを抽出した。Cye3、Cye5 で標識し、Ab microarrayTM とインキュベートしハイブリダイズした後、Genepix にて画像を取り込み、Arraygauge で画像解析を行った。

【結果】グリセロールと CDDP 併用処理群では CDDP 処理単独群と比較して、アポトーシス抑制遺伝子産物の TRAF2、NIK、IKK、NF κ B、IAP などの蓄積誘導の減少が見られた。これらの遺伝子発現は併用処理群で減少することを DNA アレイ解析で確認している。さらに、382 種類のタンパク質のうち 308 種類ものタンパク発現の減少が見られた。

【考察】グリセロールと CDDP 併用時の増感効果は少なくとも NF- κ B を介した経路が抑制され、アポトーシスが促進されるためであることが示唆された。しかしながら、他のアポトーシス促進メカニズムの寄与の可能性も考えられる。

セッション3 細胞死2

座長 奥村寛（長崎大・医・原研放射）

2月7日（土）16:40-18:00

垣塚彰（京大・院生命科学・高次生体統御）

森田隆（大阪市大・院医・遺伝子制御）

追加発言

Zheng-Guo Cui（富山医薬大・放基）

Loreto B. Feril, Jr（富山医薬大・放基）

近藤隆（富山医薬大・医・放基）

長谷川正俊（群大・院医・腫放医）

垣 塚 彰

京都大学大学院生命科学研究科

我々は、caspase 非依存性細胞死を引き起こすポリグルタミンの分子メカニズムを解明するために、ドロソフィラの遺伝学を用いて、ポリグルタミンが引き起こす細胞死に関与する遺伝子を検索してきた。その結果、VCP と呼ばれる AAA ATPase がポリグルタミンが引き起こす細胞死に深く関わることを見いだした。VCP は、細胞分裂、蛋白質分解、ER-ゴルジ体の形成等、いろいろな生物学的なプロセスに関与することが報告されている。VCP の生理作用を解析する目的で、HeLa 細胞を用いて VCP のノックダウンを行ったところ、G1 期から S 期への移行の障害がおこった。一方、転移癌で VCP の発現量が亢進しているという報告がある。しかしながら、正常細胞と癌細胞で VCP 蛋白質量の変動はほとんど観察されておらず、VCP は発現量の変化ではなく、主として活性の変化によって細胞周期、癌の悪性化に関与していると考えられる。実際、VCP 蛋白質は、リン酸化やアセチル化を受ける蛋白質であり、蛋白質修飾によって ATPase 活性の制御を受けることが判明した。すなわち、増殖・癌化シグナルは、VCP 蛋白質の異常修飾という形に集約されている可能性を示唆している。一方、caspase 非依存性の細胞死を引き起こす場合には、癌化の時とはべつの修飾が VCP におこり細胞死の誘導につながっていると考えられる。今後、詳細な VCP 修飾とその場合の機能解明を行うことによって、癌の発生・進行・退縮における新たな分子機構の解明に貢献できると考えている。

DNA 損傷の修復遺伝子(Rad51, ヒストン H2AX)の発現抑制による癌細胞の放射線感受性の増感

森田隆、吉田佳世

大阪市立大学大学院医学研究科遺伝子制御学

近年、DNA 修復に関与する遺伝子がクローニングされ、そのメカニズムや、欠損による疾病の研究が進んでいる。これらの研究から、放射線感受性を支配する因子として、DNA 修復遺伝子が重要であることがわかってきた。我々の目的は、このような DNA 修復遺伝子の発現を哺乳動物細胞において、制御することにより、修復遺伝子の *in vivo* での機能を調べるとともに、遺伝子制御にともなう、修復遺伝子発現の変化やカスケードの解明、また修復関連タンパクの細胞内での DNA 損傷に対する動態を明らかにすることである。さらに、細胞の DNA 修復能を制御することは、がんの放射線法や化学療法において問題となるがんの自然耐性、あるいは獲得耐性を克服や、正常組織が障害を起こさないように、できるだけ照射する放射線強度、抗がん剤の濃度を抑え、癌治療における QOL を高めることにも結びつく。そこで、我々は、第一のターゲットとして、放射線や DNA 二重鎖切断に対する組換え修復において、中心的な役割を果たす哺乳動物の Rad51 遺伝子の発現を RNAi により抑制し、癌細胞の放射線や抗癌剤に対する感受性を増加させる実験を行った。第二には、放射線などの二重鎖切断に対して、特異的にリン酸化され、修復へのシグナルをクロマチン構造のレベルで伝達するヒストン H2AX 遺伝子をターゲットにした。この遺伝子については、tet-off のシステムを用いて、その発現が tetracycline で制御されるような細胞を作製し、放射線感受性を人為的に変化させることを可能にしたので、これらの結果について報告する。

Radiation-induced apoptosis enhanced by 6-formylpterin via increase of the production of intracellular hydrogen peroxide

Zheng-Guo Cui,¹ Takashi Kondo,¹ Ryohei Ogawa,¹ Loreto B. Feril, JR.,¹ Qing-Li Zhao,¹ Shigehito Wada,² Toshiyuki Arai,³ and Keisuke Makino⁴

¹*Department of Radiological Sciences,* ²*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University,* ³*Department of Anesthesia, Kyoto University Hospital,* ⁴*Institute of Advanced Energy, Kyoto University*

Reactive oxygen species (ROS) are associated with many forms of apoptosis, and as a common mediator, oxidative stress plays a pivotal role in ROS-related apoptosis. Hydrogen peroxide (H₂O₂), as a species of ROS, is able to induce apoptosis in several types of cells leading to further investigation of extracellular H₂O₂ as an apoptosis inducer. A metabolite of folic acid, 6-formylpterin (6-FP), which is able to induces production of intracellular hydrogen peroxide (H₂O₂). A high concentration of 6-FP generates intracellular H₂O₂, which induces apoptosis of HL-60 cells and suppresses proliferation of PanC-1 cells. Here, we verify if it can enhance radiation-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells, and its underlying molecular mechanism was investigated. When the cells were treated with 6-FP at a nontoxic concentration of 300 μM, and then exposed to X-rays at a dose of 10 Gy, significant enhancement of radiation-induced apoptosis was observed as determined by nuclear morphological change, phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation. Flow cytometry for hydrogen peroxide (H₂O₂) generation revealed that either X-ray or 6-FP increased the formation of intracellular H₂O₂, which further increased when the cells were combine treated with both X-ray and 6-FP. Decrease of mitochondria trans-membrane potential, release of cytochrome c from mitochondria, and activation of caspase-3 were enhanced after the combined treatment. Remarkable activation of protein kinase C delta (PKC delta) and its translocation from cytosol to mitochondria were detected in combined treatment. Bid was noted in the cells treated with radiation but significant decrease was observed in the combined treatment, while no changes in the expression of Bcl-2 and Bax were observed. In addition, more increase in intracellular Ca²⁺ concentrations was also observed in the combined treatment. However, c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) activation was not enhanced in the combined treatment; and the sign of caspase-independent pathway protein, apoptosis inducing factor (AIF) remained unchanged even after 3 hr. These results indicate that intracellular H₂O₂ generated by 6-FP enhances radiation-induced apoptosis via the mitochondria-mediated caspase-dependent pathway, with the active involvement of PKC delta.

Reference

Zheng-Guo Cui et al. "Enhancement of radiation-induced apoptosis by 6-formylpterin", Free Radic. Res. (in press)

Apoptosis induced by low intensity non-thermal ultrasound: Its enhancement by hyperthermia, hypotonia or echo-contrast agents (ECAs)

Loreto B. Feril, Jr., Takashi Kondo, Qing-Li Zhao, Ryohei Ogawa and Zheng-Guo Cui
*Department of Radiological Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama
930-0194, JAPAN*

Therapeutic ultrasound has been in use for therapy mainly for its ability to generate heat in a target tissue. High intensity ultrasound is needed for such purpose. On the other hand, low intensity ultrasound has been found to induce some biological effects, especially apoptosis, both in vitro and in vivo. However its limited apoptosis-inducing ability made it less useful in therapy. In here, we aimed to enhance the ultrasound-induced apoptosis by combining ultrasound with other methods. We used either hyperthermia at 44_ for 10 min, hypotonia by adding equal volume of distilled water to the culture medium or ECAs (Levovist, 2mg/ml; YM454, 1 _l/ml or Optison, 1 _l/ml). Some degree of enhancement was observed in any of the combined treatments. With hyperthermia, 2 times increase of apoptosis at 0.5 W/cm² ultrasound was noted compared to the apoptosis of the two methods combined (*Feril et al. Cancer Lett, 178, 63, 2002*). Hypotonia, which did not induce apoptosis by itself, increased the apoptosis induced by 1.0 W/cm² ultrasound by about 3 times (*Feril et al. Int Radiat Biol, in press*). On the use of ECAs, Optison and YM454 moderately enhanced the ultrasound-induced apoptosis at the intensity 2.0 W/cm² while minimal increase was noted at 1.0 W/cm² with Levovist (*Feril et al. Ultrasound Med Biol, 29, 331, 2003*). Generally, apoptosis predominates at lower intensities while cell lysis is more common at higher intensities and was also enhanced in any of the combined treatments. The different methods used to combine with ultrasound were described to have distinct mechanism of action in enhancing the ultrasound-induced apoptosis. Hyperthermia exerts its effect as a thermal stress both on the physical and chemical micro-environment of the cells, while hypotonia puts a physical burden on the cell membrane making it susceptible to mechanic damage and at the same time inhibiting the repair mechanism of the cells. ECAs, however, enhances the effects of ultrasound by augmenting the cavitation activities associated with sonication. Each specific method could therefore be used to tailor a particular need to enhance the apoptosis. These findings suggest that ultrasound can induce greater apoptosis when combined with other methods thus raising its value in therapy that requires apoptosis induction as in cancer therapy.

親水性温度依存性フリーラジカル発生剤と温熱および超音波併用による アポトーシスの増強

近藤 隆¹、小川良平¹、趙 慶利¹、フェリルロレト¹、崔 正国¹、藤原美定¹、
津田祐子²、塚田一博²

富山医薬大・医・¹放基、第二外科

アポトーシスは遺伝子制御された細胞死であり、癌の放射線や温熱治療においてその分子機構を探る価値は大きい。一般に癌は、その発生過程でアポトーシス誘導に抵抗性となる。アポトーシスに抵抗性を示す癌に、いかにアポトーシスを誘導するかを研究することは、直接に癌治療に貢献するばかりか、細胞死全体の機構を探る上でも意義深い。

我々の研究室では放射線やハイパーサーミアによるアポトーシス誘導と細胞内酸化ストレスの制御の関係について研究を進めてきた(1, 2)。また、親水性温度依存性フリーラジカル発生剤である 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) がアポトーシスの温熱増感剤として働く可能性をアポトーシスを誘導しやすい細胞である U937 細胞および誘導しにくい細胞である子宮頸癌細胞株を用いて示した(3, 4)。親水性である本薬剤は 37 °C では、細胞内に取り込まれにくいためにアポトーシス誘導を殆ど示さないが、ハイパーサーミア併用により、膜透過性が高まると細胞内に取り込まれアポトーシスを起こす。

機械的エネルギーである超音波を細胞に照射すると細胞内 Ca²⁺濃度が上がる等、イオン流入が変化し、さらに強度を上げると遺伝子等の高分子物質も細胞内に取り込まれる(5, 6)。そこで、U937 細胞を用いて超音波と AAPH の併用効果を検討したところ、照射時温度 25 °C でもアポトーシスが増強されることが判明した(7)。この結果はアポトーシス増強のためには AAPH が細胞外から細胞内に取り込まれる必要があることを示した。

以上、細胞内に過剰の酸化ストレスを付加するとアポトーシスが増強されることを示した。今後はアポトーシスを誘導しにくい癌細胞でも、いかに、効率よく酸化ストレスの制御により細胞増殖遅延や細胞死の増強を誘導できるかを検討することが望まれる。

文献

- 1) Kojima Y, Kondo T, Zhao Q-L, et al: Free Radic Res 36: 255-263: 2002.
- 2) Arai Y, Kondo T, Zhao Q-L, et al: J Biol Chem 277: 18986-18993: 2002.
- 3) Li F-J, Kondo T, Zhao Q-L, et al: Free Radic Res 35: 281-299: 2001.
- 4) Yuki H, Kondo T, Zhao Q-L, et al: Free Radic Res. 37: 631-643, 2003.
- 5) Feril Jr LB, Kondo T, Takaya K, et al: Int J Radiat Biol (in press).
- 6) Nozaki T, Ogawa R, Feril Jr LB, et al: J Gene Med (in press).
- 7) Feril Jr LB, Tsuda Y, Kondo T, et al: Cancer Sci (in press).

in vivo 治療実験における細胞死に関与する因子：
特に組織型、感受性と p53 について

長谷川正俊，鈴木義行，桜井英幸，中村勇司，野島久美恵*，今井礼子*，
大野達也*，中野隆史

群馬大学大学院 医学系研究科 腫瘍放射線学分野 *放射線医学総合研究所

トランスレーショナルリサーチという言葉が一部の研究者に頻用されているが，現実的には急速に進歩した基礎研究とその臨床応用との隔たりは非常に大きく，遺伝子レベル，細胞レベルで得られた明確な結果がそのまま臨床現場まで反映できることは極めてまれである．分子標的治療の進歩も，無数の基礎研究からみればまだ例外的な存在であり，今後の発展に大きな期待が寄せられていることは言うまでもない．この隔たりを少しでも小さくするために，臨床応用を前提とした in vivo での研究の重要性について再認識する必要があるが，この分野でも問題点は多い．ここでは，これまでに我々が行なってきた in vivo での実験における治療効果，細胞死に関与する諸因子の中で，特に組織型，感受性と p53 status に関する知見について簡潔に発言させていただく．

p53status，感受性の異なる腫瘍・臓器（ヌードマウス可移植性ヒト腫瘍，マウス腫瘍，マウス全身臓器）を用いて，放射線（X線，重粒子線）照射後，種々の化学療法後の細胞死（アポトーシス，分裂死・壊死）を検討した．

X線や DNA 傷害性薬剤に対して特に感受性の腫瘍（ependymoblastoma, PNET）・臓器（胸腺・脾のリンパ球，小腸のクリプト細胞，精巣の精粗細胞，海馬の顆粒層細胞，他）では，一般によく知られているように in vivo でも p53 依存性のアポトーシスが誘発され，p53(+/+), p53(+/-)では高率だったが，p53(-/-)や p53 変異型では著しく低率だった．p53 依存性アポトーシスが高率な場合には壊死の関与が乏しかったが，放射線抵抗性腫瘍では p53 status にかかわらずアポトーシスは低率であり，分裂死・壊死が主体になる傾向が認められた．また，p53(+/+)の正常組織でも，特に高感受性の臓器以外では，再生系・非再生系にかかわらず多くの臓器でアポトーシスは非常に低率であった．その一方で，これらの腫瘍・臓器において，低率ではあるが p53 非依存性アポトーシスの関与が示唆された．なお，高感受性の p53 野生型腫瘍や正常組織では，高 LET の炭素イオン線照射後でも X線同様 p53 依存性アポトーシスが主体で RBE はあまり大きくなかったが，放射線抵抗性の p53 変異型腫瘍においては，X線に比して相対的に高率なアポトーシスが誘発され，その RBE が大きいことが示唆された．また，高感受性腫瘍においては，多くの DNA 傷害性薬剤(cisplatin, nedaplatin, etoposide, doxorubicin 等) 投与後でもやはり p53 依存性アポトーシスが主体であったが，微小管の脱重合を抑制する taxoid (paclitaxel, docetaxel) では p53 非依存性アポトーシスの関与が示唆された．

in vivo モデルの検討では，高感受性の腫瘍・臓器（組織）の場合には，p53 とアポトーシス，感受性が比較的良好に相関したが，それ以外の場合は複雑であった．

セッション4 細胞生存

座長 三橋紀夫（東京女医大・医・放医）

2月8日（日）9:40-10:50

秋元哲夫（群大・院医・腫放医）

窪田宣夫（茨城医療大・保健医療・放射線技術科学）

追加発言

三浦雅彦（東医歯大・院・分子診断治療）

播磨洋子（関西医大・医・放）

渡邊経弘（茨城医療大・保健医療・放射線技術科学）

辻 孝（国立南和歌山病院・放）

生存シグナル伝達経路の活性化またはその阻害と DNA 損傷修復との関係

秋元哲夫

群馬大学医学部大学院 腫瘍放射線医学

放射線による DNA 損傷とその修復は、細胞の放射線応答の第一ステップとして重要である。DNA 2 重鎖切断などの DNA 損傷が引き金となり p53 遺伝子とそのシグナル伝達が活性化され細胞周期進行やアポトーシス誘導を制御する。そのため、p53 遺伝子のステータスは放射線感受性決定因子として重要であり、p53 遺伝子が野生型の腫瘍は一般に変異型の腫瘍に比較して放射線感受性が高いとされている。p53 遺伝子以外の様々な遺伝子や分子群の放射線応答における役割が研究され、その中で放射線抵抗性の因子として生存シグナル伝達経路の活性化が注目されている。これは、上皮増殖因子受容体 (EGFR) などの増殖因子受容体とそのシグナル伝達の活性化が抗アポトーシス作用や増殖に促進的に作用することで放射線に対して抵抗性に働くというのがその主たる機序である。生存シグナル伝達経路の活性化は照射によっても受容体高発現の癌細胞などでは起こることが報告されているが、癌細胞と細胞外マトリックスとの相互作用や急性の低酸素によっても HIF-1 などを介して生存シグナル伝達経路とリンクすることが分かっている。低酸素や癌細胞と細胞外マトリックスとの相互作用などは放射線感受性の抵抗性因子として注目されている。放射線はこのように DNA 損傷を起点にする細胞死のシグナルと細胞膜上の増殖因子受容体などを起点とする生存シグナル伝達経路に作用し、この両者のバランスが癌細胞の放射線感受性を規定しているとも考えられる。

このような背景から生存シグナル伝達経路の阻害が放射線の増感につながるかどうか様々なアプローチで研究され、C225 や ZD1893 などによる EGFR 活性の阻害による放射線増感作用が *in vitro* また *in vivo* で確認されている。しかし、実際には放射線による DNA 2 重鎖切断はランダムに起こるものであり、放射線高感受性および抵抗性の癌細胞どちらも線量が同じであれば同程度の DNA2 重鎖切断が引き起こされている。それゆえその修復機構の差が DNA 損傷を起点とした細胞死のシグナルの強弱の中心である。そのため DNA 損傷修復が不十分であれば、生存シグナルが活性化して増殖促進を促すことは DNA に傷を持ったまま増殖する細胞が増えることを意味し、細胞にとっては決して生存に有利に働くとは考えられない。これまで生存シグナルの活性化やその阻害による放射線感受性の変化に関する研究は多いが、生存シグナルと放射線による DNA 損傷修復との関連に関する研究はほとんどみられない。我々も Hsp90 chaperone complex inhibitor や生存シグナル伝達経路の特異的な阻害剤などによる放射線増感作用について報告してきた。そこで、これらと結果と DNA2 重鎖切断修復との関係を最近 DNA2 重鎖切断修復機構で注目されている H2AX のリン酸化やフォーカス形成の観点から検討した結果の一部を報告し、癌細胞の放射線抵抗性に関与している生存シグナルの活性化や阻害が DNA 損傷修復に与える影響について検討したいと考えている。

Hsp90 シャペロン機能の阻害による放射線増感

窪田宜夫、松本孔貴、町田 光
茨城県立医療大学・放射線技術科学

近年、新たな癌治療の分子標的として、癌細胞の癌化、増殖、生存の細胞内シグナルの伝達に關与する癌遺伝子産物のシグナル伝達阻害が注目され、さまざまな薬剤の開発が行われている。これらの癌遺伝子産物には Hsp90 と複合体を形成し、その分子シャペロン機能により細胞内での機能・局在・安定化をはかっているものが多いことが、明らかにされてきた。Hsp90 に介添えされる蛋白質(client protein)には細胞増殖や細胞周期の制御に關与するチロシンキナーゼやセリン/スレオニンキナーゼなど多くの因子があり、癌細胞で特異的に発現しているものも多い。Hsp90 の阻害剤である Geldanamycin(GA)は Hsp90 の N 末端領域にある ATP/ADP 結合領域に直接結合する。その結果 Hsp90 シャペロン複合体の構成が変化し、client protein の不安定化、細胞内での分解、下流へのシグナル遮断により、細胞の増殖阻害が引き起こされることが知られている。

我々は GA の投与により Hsp90 のシャペロン機能を阻害することにより、多くのヒト由来の腫瘍細胞の放射線感受性が増強されることを見いだした。腫瘍細胞のうちでアポトーシスの抑制に働いている PI3K/Akt 経路にその生存を依存していると思われる細胞では、GA 単独処理で Akt の活性化が抑制され、アポトーシスが高頻度に観察され、放射線との併用で大きな放射線増感効果が見られた。正常細胞は腫瘍細胞に比べ、Akt の活性は低く保たれているので、Akt は放射線増感の良い標的と考えられる。実際、ヒト腫瘍細胞と正常細胞での GA による放射線増感効果を調べると、腫瘍細胞に比べ正常細胞では GA による放射線増感の程度は非常に小さい結果であった。さらに現在、抗がん剤として clinical trial が進行中の GA の誘導体で肝毒性の軽減されている 17-allylamino-17-demetoxygeldanamycin (17-AAG)の細胞レベルでの放射線増感効果、in vitro 腫瘍モデルの多細胞スフェロイドでの併用効果についても述べ、放射線と Hsp90 の機能阻害の併用治療の可能性について考察する。

口腔癌における IGF-I 受容体と EGF 受容体のクロストーク機構

三浦 雅彦

東京医科歯科大学大学院分子診断・治療学分野

I 型インスリン様増殖因子受容体(IGF-IR)は、細胞増殖、アポトーシスの抑制、分化、寿命等、様々な生物現象に関与する膜貫通型チロシンキナーゼである。我々は初めて、IGF-IR が放射線抵抗性に寄与することを見出し(Exp. Cell Res., 1997, Clin. Cancer Res., 2001)、さらに IGF-IR 遺伝子ノックアウトマウス胎児由来線維芽細胞において、IGF-IR 下流の PI3 キナーゼ、MEK/ERK、14-3-3/c-Raf 経路が、異なる重みをもって冗長的に放射線抵抗性に寄与することを報告した。少なくともこの細胞では、MEK/ERK の活性化は、それ単独で放射線抵抗性を誘導することが可能であった(JBC, 2003)。興味深いことに、C 末端に存在する Y1250/Y1251 に変異を導入すると、上記下流経路の活性化が全く影響を受けないにもかかわらず、放射線抵抗性が完全に喪失することが判明した(BBRC, 2003)。従って、IGF-IR による放射線抵抗性機構は生存シグナルに依存しているものの、その有無のみでは単純に説明できない、受容体レベルでの制御機構の存在が示唆される。

最近、分子標的治療に関する研究がすさまじい勢いでなされているが、その中で、最もリードしているのは EGFR チロシンキナーゼ(EGFR-TK)阻害剤である。EGFR は、IGF-IR と同様に細胞増殖やアポトーシスの抑制機能を有し、多くの腫瘍細胞においてその過剰発現が認められている。我々は、EGFR を過剰発現する口底癌細胞株 Ca-9-22 細胞において、IGF-I により PI3-キナーゼ/Akt および MEK/ERK 経路が活性化されるが、EGFR-TK 阻害剤で前処理すると、前者はその活性化において全く影響を受けないにもかかわらず、後者は有意に抑制されることを見出した。このことは、IGF-I による EGFR の transactivation 機構の存在を示唆したが、驚くべきことに、EGFR は IGF-I により活性化されず、EGFR-TK 阻害剤は、基底レベルの EGFR-TK 活性を抑制しているにすぎなかった。従ってこの結果は、IGF-I による ERK の活性化において、基底レベルの EGFR-TK 活性に依存した機構の存在を示している。今回、このような IGF-IR と EGFR のクロストーク機構について我々の知見を報告する。

子宮頸癌の温熱放射線治療抵抗性における遺伝子発現プロファイル

播磨洋子、今村正浩、寒川光治、澤田 敏
関西医大・放

[目的]今回、我々は温熱放射線治療抵抗性に関与する遺伝子について包括的に検討するために、臨床検体を用いてcDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを観察した。

[対象・方法]1995年5月～2001年8月までに 同一の温熱放射線治療を施行した子宮頸癌19例(IIIA期1例、IIIB期11例、IVA期5例、IVB期2例)で、全例扁平上皮癌であった。初診時に腫瘍部を生検し、mRNAを抽出した後に増幅し、標識化を行い、プローブDNAを合成した。それを23040個のcDNAをスポットしたマイクロアレイスライドにハイブリダイズさせた。また、p53のexon5～8の点突然変異をSSCP法で、ヒトパピローマウイルス(HPV) E6とL1領域の感染をPCR法で調べた。有意差検定にはMann-Whitney testを用いて、Permutation test、クラスター解析を行った。

[結果] 全ての症例においてp53遺伝子は野生型であり、HPVの感染は陽性であった。無再発生存群は8例、癌死群は11例で、生存期間の中央値はそれぞれ42ヶ月と14ヶ月であった。無再発生存群、癌死群の2群に分けて遺伝子発現プロファイルを比較した。Permutation testでは無再発生存群で76個、癌死群で80個の計156個の遺伝子が抽出された。

さらに、クラスター解析では35個の遺伝子が選別され、予後予測スコアでは無再発生存群・癌死群の2群が識別された。温熱放射線抵抗性癌にはアポトーシスを阻害する遺伝子や、低酸素誘導遺伝子、腫瘍の浸潤、血管新生に関与する遺伝子が含まれていた。

[結論]本研究により抽出された遺伝子群は野生型p53遺伝およびHPV陽性である子宮頸癌の温熱放射線治療抵抗性を診断する有力な手掛りとなる可能性がある。さらに、予後を改善するための薬剤の開発に有力な知見を与えられられる。

ヒト腫瘍細胞でのRNAiによる放射線増感の研究

渡邊経弘、松本孔貴、町田光、窪田宜夫

茨城県立医療大学大学院・放射線技術科学専攻

増殖因子受容体である ErbB2 の過剰発現は化学療法や局所放射線治療に対する抵抗性と関連していることが報告されている。その理由の一つとして、ErbB2 を含む EGFR family の下流シグナルである PI3K/Akt 経路が抗アポトーシス作用を持つためであると考えられる。このことから PI3K/Akt 経路は癌治療のよい標的と考えられる。一方、RNAi は double-stranded RNA によってその配列特異的に mRNA が分解され、その結果、遺伝子の発現が抑制される現象であり、その遺伝子発現抑制効果の高さから癌や遺伝子疾患などの遺伝子治療への応用が期待されている。

今回、我々はヒト扁平上皮癌由来の細胞を用いて RNAi による ErbB2 並びに Akt の抑制に伴う放射線増感効果について検討したので報告する。

p53野生型及び欠損型細胞株の放射線感受性に及ぼす selenium 化合物の影響

辻 孝¹、萩平貴美¹、大西 健²、松本英樹³、大西武雄²
¹国立南和歌山病院放射線科、²奈良県立医科大学生物学教室、
³福井医科大学放射線基礎医学教室

【目的】 Selenium 化合物は発癌抑制物質として知られているが、Selenomethionine (SeMet)は Ref1 を介して p53 の 275, 277 cysteine を還元し、p53 の DNA 修復作用を活性化することにより紫外線の殺細胞効果を抑制することが報告されている。一方、p53 欠損細胞では紫外線の殺細胞効果の抑制は認められていない。もし SeMet 及びその他の Selenium 化合物が野生型 p53 細胞に対してのみ放射線による細胞死を防御すれば、正常組織の放射線防禦剤として使用することにより、抗腫瘍効果を高め、治療効果比を改善し得る可能性がある。そこで、野生型 p53 細胞、及び p53 欠損型細胞に対する SeMet 及び Sodium selenate の放射線感受性に及ぼす影響を検討した。

【対象および方法】 p53 欠損型ヒト肺癌細胞株 (H1299) に neomycin 耐性ベクターのみを導入した細胞株(H1299/neo) 、野生型 p53 を導入した細胞株(H1299/wp53)を使用した。実験には指数増殖期の細胞を用い、生存率はコロニー法で評価した。まず各細胞株を SeMet (20-180 μ M) 或いは Sodium selenate (20-2000 μ M)に 24 時間作用させ、その毒性を評価した。さらに 20 μ M の SeMet 或いは Sodium selenate 存在下に増殖培地で 15 時間培養後 10MV-linac X 線を照射し、生存率を評価した。20 μ M の SeMet 或いは Sodium selenate には何れも 24 時間作用させた。

【結果】20 μ M の SeMet 24 時間処理単独ではいずれの細胞株とも毒性はみられなかった。H1299/neo 及び H1299/wp53 双方とも X 線の殺細胞効果に SeMet は影響を与えなかった。また、Sodium selenate 24 時間処理単独では 20 μ M では両細胞株ともに毒性はみられなかった。一方 Sodium selenate 20 μ M と放射線の併用で、H1299/neo の放射線感受性に影響は見られなかったが、H1299/wp53 では放射線防禦効果が見られた。

【結語】 Sodium selenate は野生型 p53 細胞株に対してのみ放射線防禦作用を示し、正常組織の放射線防禦剤として使用することにより、放射線による治療効果比を改善させ、抗腫瘍効果の向上につながる可能性が示唆された。

セッション5 腫瘍環境

座長 平岡真寛（京大・院医・腫放）

2月8日（日）10:50-12:00

柴田徹（京大・院医・腫放）

松浦成昭（阪大・院医・保健）

追加発言

永澤秀子（徳島大・工・生物工学）

宇都義浩（徳島大・工・生物工学）

桜井英幸（群大・院医・腫放医）

小倉昌和（京大・院医・腫放）

腫瘍特異的環境としての低酸素と新規がん治療開発

柴田 徹、劉 軍叶、原田 浩、小倉昌和、平岡眞寛
京都大学・大学院・腫瘍放射線科学

固形腫瘍内には低酸素分圧の環境が存在する。低酸素細胞は放射線治療や抗癌剤に抵抗性を示すことから、がん治療効果不良の一因とされてきた。最近の研究により、低酸素は、転写因子HIF-1の活性化を介して腫瘍増殖、血管新生、エネルギー代謝に関連する特異的な遺伝子発現を引き起こしたり、また一種のストレスとして作用してアポトーシス不応性・高転移性など腫瘍細胞の悪性形質の獲得に繋がることが明らかにされ、臨床研究においても、低酸素分画の大きい症例の予後の不良が報告され、治療効果の予測因子として注目されている。癌治療増感研究においては、従来より低酸素細胞に作用する化合物や特異的な治療法の開発、腫瘍内低酸素細胞の同定・定量法の開発に向けた試みが報告され、診断・治療両面から低酸素研究の発展が期待されている。

我々は、低酸素が正常組織には無い腫瘍特異的な環境として有望な治療標的となり得ると思え、種々の研究課題に取り組んでいる。まず、がん治療への応用を目指して、ヒトVEGF遺伝子由来の転写因子HIF-1の制御領域を利用して低酸素刺激により高い発現効率・誘導活性を示す低酸素誘導性ベクターの開発し、酸素濃度に応じた治療用遺伝子の発現調節と殺細胞効果誘導が可能であることを示した。また低酸素誘導性のアデノウイルスベクターを作製し、ヌードマウスモデルでの遺伝子治療と放射線の併用効果を確認している。一方、低酸素分画の新しい評価法として、低酸素環境でGFPおよびルシフェラーゼ遺伝子を選択的に発現する細胞系を樹立し、担癌マウスにおける生体内低酸素分画の可視化や動態解析に取り組んでいる。さらに、ヒト腎癌に見られるVHL遺伝子変異に対して低酸素誘導性ベクターを用いることで腎癌特異的な遺伝子治療が可能であることを明らかにした。また別に、HIF-1 α の酸素依存性分解に関わるドメインと治療用遺伝子の融合蛋白製剤を開発し、新たな治療法開発に取り組んでいる。

今回は、低酸素に関連する最近の話題を概括し、また、我々の研究室における最新の取り組みを紹介することにより、低酸素の意義について議論を深めたい。

がんの増殖・進展における微小環境の意義
—特に放射線治療への影響について—

松浦成昭

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻
機能診断科学講座分子病理学教室

生体の中で細胞は種々の環境の中で生存し、機能を営んでいる。がん組織での環境を考えると、がん細胞は仲間であるがん細胞と結合するとともに間質組織に囲まれて存在している。病理学的にはがん組織の何割かは間質組織であり、場合によってはがん細胞の占める割合は 10%にも満たないこともある。間質組織の構成成分には間葉系細胞・白血球などの細胞成分もあるが、量的には細胞外基質と血管が大部分を占めている。かつて、細胞外基質は細胞と細胞の間の充填物で積極的な意味を持つとは考えられていなかったが、現在では細胞の機能を担う微小環境として重要な役割を果たすことが明らかになってきた。すなわち細胞は周囲に存在する微小環境である細胞外基質との相互作用を行いながら、種々の細胞の機能を営んでいると考えられる。

細胞外基質の成分はコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの高分子量のタンパク質およびプロテオグリカンと総称される糖タンパク質である。一方、細胞は表面に存在する接着分子によりこれらの細胞外基質を認識しており、インテグリン・スーパーファミリーの各分子の他、免疫グロブリンスーパーファミリーやシンデカンなどの細胞膜結合型プロテオグリカンなどが明らかにされている。その中でも最も中心的な役割を果たしているインテグリン・スーパーファミリーは α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーで、その組み合わせにより約 30 種類近い分子が見出されている。インテグリンは細胞外基質上のアミノ酸モチーフを認識し、結合すると同時に、その接着シグナルを細胞内に伝達し、多様な細胞内情報伝達を行うことが明らかにされてきた。すなわち、インテグリンは単に細胞との接着だけを担う分子ではなく、接着を通じて、細胞増殖、細胞運動、細胞分化、物質の産生、細胞の生存・アポトーシスなど細胞の種々の機能に重要な役割を果たしている。がんに対する放射線治療においても、腫瘍細胞はそれぞれ固有の細胞外基質に囲まれて存在しているので、放射線照射の腫瘍細胞に対する効果は微小環境の影響を考える必要があると考えられる。

私たちはこれまで、細胞外基質を認識するインテグリンによりがん細胞の機能が変化し、がんの浸潤・転移に大きな役割を果たすことを報告してきた。がん細胞と細胞外基質とのインテグリンを通じた相互作用の重要性を示すとともに、放射線治療効果に与える影響についてのデータを示し、議論したい。

hypoxic cytotoxin の HIF-1 抑制作用を介した 血管新生阻害作用

永沢 秀子、宇都 義浩、堀 均
徳島大・工・生物学

【目的】 hypoxic cytotoxin (TPZ, TX-402)による血管新生阻害作用の機構を調べるため、低酸素誘導因子(HIF-1 α)とその下流遺伝子の発現に対する影響を検討した。

【方法】 TPZ, TX-402 について,ヒト扁平上皮癌由来 SAS/neo (野生型 *p53*)、SAS/Trp248 (変異型 *p53*)、ヒト非小細胞肺癌由来 H1299/wtp53 (野生型 *p53*)、H1299/mp53^{Trp248} (変異型 *p53*) 細胞を用いて aerobic 又は hypoxic 条件下で MTT assay 及び clonogenic assay を行った。RT-PCR 及び免疫ブロット解析により HIF-1 α とその下流遺伝子の発現について解析した。血管新生は鶏卵漿尿膜法 (CAM assay)で調べ、VEGF 分泌は ELISA assay で調べた。

【結果・考察】 TX-402 は 1 μ g/CAM で強い血管新生阻害作用を示した。また、いずれの細胞においても強い低酸素細胞毒性を示し、*p53* status による活性の差は認められなかった。TX-402 は低酸素下で HIF-1 α の発現を mRNA 及びタンパク質レベルで抑制した。さらに低酸素下で活性化する HIF-1 α の下流遺伝子 (GLUT3, aldolase A, VEGF)の転写を抑制した。また低酸素による VEGF の分泌も抑制した。以上により hypoxic cytotoxin は、ハイポキシア応答系のシグナル分子群を阻害することが明らかになった。TX-402 の低酸素細胞毒性及び血管新生阻害作用には、このような HIF-1 pathway の抑制が関与しているものと考えられる。

p53 阻害活性を有する低酸素細胞放射線増感剤の創薬研究

宇都義浩，東 淳哉，井関小百合，貝谷梨紗，永沢秀子，堀 均

徳島大・工・生物工学

固形腫瘍に存在する低酸素細胞は、放射線感受性が低く放射線がん治療における予後が悪くし再発の原因の一つとして問題とされている。そこで、腫瘍細胞に対する放射線の効果を高める酸素ミミックな低酸素細胞放射線増感剤の開発研究が我々のグループも含め数多く報告されているが、これまでの成功例はデンマークにおける頭頸部がんの標準的治療に用いられている Nimorazole のみである。

我々は、この事実をふまえて従来のニトロイミダゾール基単独の増感効果に加えて別の抗がん機能を備えたバイファンクショナルな増感剤の開発を検討してきた。その一つとして、正常細胞（もしくは正常型 p53 をもつ腫瘍細胞）の p53 機能を阻害することで正常細胞へのダメージを軽減（もしくは腫瘍細胞の p53 による保護機能を阻害）し、より効果的な放射線治療が可能となるという仮説を立て、これに基づき TX-2004 を分子設計・合成した。TX-2004 は、p53 阻害剤 pifithrin- と 2-ニトロイミダゾール基を分子軌道計算法を利用して融合させたバイファンクショナル分子であり、これまでに低酸素腫瘍細胞に対する高い増感効果を示すことを見出している。今回は、温熱における p53 阻害作用について検討した結果について報告したい。

腫瘍の低酸素状態の予測と臨床的意義

桜井英幸、斉藤淳一、石川 仁、北本佳住、原島浩一、秋元哲夫、中山優子、長谷川正俊、中野隆史

群馬大学大学院医学系研究科 腫瘍放射線学

臨床的に個々の腫瘍の治療抵抗性を非侵襲的に測定可能であれば、治療法の選択だけでなくその最適な投与法を予測することが可能となる。放射線治療において、腫瘍の低酸素状態が治療抵抗性を誘導することは生物学的に明らかであるが、臨床的に腫瘍の低酸素状態を正確に測定することは、きわめて困難である。最も信頼性の高いとされるエッペンドルフ法に代表される酸素分圧測定は、低酸素状態を直接的に測定する方法であるが、侵襲的であるため深在性腫瘍では適応が困難であり、かつ腫瘍部分と壊死成分を区別できないと言った欠点がある。

臨床的に低酸素状態を直接測定できない場合は、腫瘍内の低酸素状態を非侵襲的に定量し画像化する方法や、低酸素により誘導される種々の分子を測定するなどの方法が考えられている。我々は、前者の方法として、 ^{31}P -MRS と低酸素細胞マーカーについて、後者として腫瘍内の HIF-1 α について、その有用性を検討したので報告する。

^{31}P -MRS により得られる高エネルギー磷酸代謝の観察は、非侵襲的な方法であり、その変化は腫瘍の酸素環境を間接的に反映している。マウス実験腫瘍での検討では、腫瘍容積の増加に伴って、腫瘍内酸素分圧の低下とともに ATP/Pi の低下が認められた。放射線による細胞死（アポトーシス）と高エネルギー磷酸代謝の変化について検討した結果、アポトーシスの出現自体を ^{31}P -MRS により同定する事は困難であったが、照射後のアポトーシス細胞が組織内から消失するタイミングと ATP/Pi の回復が相関する事がわかった。ATP/Pi の回復は放射線の線量が少ないほど早期に現れる傾向が認められた。このため ^{31}P -MRS により検出される放射線照射後の ATP/Pi の増加は、照射後の組織の再構築や再酸素化の過程を反映しているものと考え、分割照射実験を行ったところ、ATP/Pi が再増加するタイミングで照射を行った場合が、もっとも照射効果が高くなり、照射後の ^{31}P -MR スペクトルの変化は、最適な分割照射法の指標となりうる事が示唆された。

次に、低酸素細胞マーカーである β -IAZGP を用いて、マウス実験腫瘍の低酸素細胞の非侵襲的定量化について検討した。 ^{123}I - β -IAZGP を尾静脈から投与し、24 時間後にシンチグラムを測定した結果、腫瘍に強い取り込みが認められ、腫瘍内の集積の度合いは血液の約 8 倍であった。他の方法と比較した結果、低酸素マーカーの腫瘍への集積の程度は、腫瘍重量の増加と相関し、ATP/Pi の低下や、実測した組織内酸素分圧の低下とも相関が認められた、また、担癌マウスを 10Gy 照射後、in vitro で clonogenic assay を行った結果、マーカーの集積が多い腫瘍（低酸素細胞が多い腫瘍）は、コロニー形成能が高く、放射線抵抗性であることがわかった。

最後に、IIIb 期子宮頸癌 38 例の治療前の腫瘍組織を用いて、p53、bcl-2、Bax などとともに、HIF-1 α の発現について検討した。p53、bcl-2、Bax の免疫染色の陽性率と予後との相関は認められなかったが、HIF-1 α 陽性群は照射後の再発が多く、特に遠隔転移率が有意に高く、HIF-1 α の過剰発現が、腫瘍の悪性度とくに遠隔転移に関与していると推察された。

低酸素誘導性アデノウイルスベクターを利用した腎癌遺伝子治療

小倉昌和、柴田 徹、劉 軍葉、平岡真寛

京都大学医学研究科腫瘍放射線科学

低酸素状態で活性化する転写因子 $\text{HIF}\alpha$ は、血管新生や腫瘍増殖に関与する種々の遺伝子を発現させる。 $\text{HIF}\alpha$ は、酸素存在下において VHL タンパクと結合し速やかにユビキチン分解されることにより、その活性が厳密に制御されている。一方、腎細胞癌の多くでは VHL の欠失・変異がみられ、 $\text{HIF}\alpha$ の蓄積および VEGF の恒常的な発現が生じている。我々は低酸素誘導性ベクター系を応用した、 VHL 欠損・変異腎癌に特異的な遺伝子治療の可能性を検討している。ヒト VEGF 遺伝子由来 HRE に汎用の自殺遺伝子 HSVtk を連結した低酸素誘導性コンストラクトを VHL 欠損ヒト腎癌細胞株 786-O に導入した stable transfectant を構築し、ガンシクロビル (GCV) 投与による著明な抗腫瘍効果を *in vitro* 及び *in vivo* で確認した。今回、臨床応用に近いモデルとしてアデノウイルスベクターを用いた実験を行った。低酸素誘導性コンストラクトを発現する組換えアデノウイルス Ad5HREtk を COS-TPC 法にて作製した。786-O 細胞に Ad5HREtk を感染させ、GCV 添加培地で低酸素あるいは好気条件下で培養後 MTS assay を行ったところ、いずれの酸素条件でも GCV 濃度依存性の増殖抑制を示した。現在、担癌マウスモデルでの検討を行っている。

ランチョンセミナー

座長 小野公二（京大・原子炉）

2月8日（日）12:10-12:30

廣田勝也（ナカライテスク）

遺伝子機能解析用試薬

廣田勝也

ナカライテスク MKg 部

今後益々飛躍的に進展する事が期待できるゲノム創薬、プロテオーム研究領域において、抽出精製、トランスフェクション、RNAi 技術は必要不可欠な技術であります。当社では、本技術に対応した製品群を数多く取り揃えており、画期的な製品についてご紹介させていただきます。

<抽出・精製>

プロテオームを軸とした網羅的解析が主流となる今日、タンパク質の根源である mRNA の迅速な抽出・精製および発現タンパク質の網羅的精製(条件検討を含む)は必要不可欠な技術であります。ご紹介させていただきます BIO-NOBILE 社は、核酸及びタンパク質の抽出・精製をビーズ及びペンタイプ型回収機を用いて迅速、簡便に操作できるキットを保有。メカニズムは、サンプルを磁性ビーズに吸着させ、ペンタイプ型回収機により、洗浄・溶出を行う、斬新技術の導入・高性能かつ利便性に優れた特長を有します。

<トランスフェクション>

特定の遺伝子を細胞の外から中に入れることは、遺伝子機能の研究や、ガン、エイズの遺伝子治療の際に必須の操作であります。現在、遺伝子治療では、ウィルスを利用した遺伝子の導入法が主に使用されていますが、病原性等の問題があり、より安全で効率的な遺伝子導入法の開発が熱望されています。今回ご紹介させていただきます TargetingSystems 社のリポソーム（脂質および非脂質系）を利用する遺伝子の導入法は、ウィルス法に比べ簡便で安全性が高く、また、今まで導入困難であった初代培養細胞に対して非常に高い効率で導入する事が可能です。

<RNAi 関連製品>

RNAi とはターゲットとする遺伝子に相補的な配列を有す短い二本鎖 RNA であり、ターゲットとなる遺伝子の発現を抑制する。RNAi(RNAi interference)に関する技術はポストゲノム研究(機能ゲノミクス研究領域)において最大のテーマであり、先端の研究手段・革新的技術である(現在、極微量でターゲット遺伝子の mRNA を強力に阻害する RNAi 分子が非常に注目を浴び出している)。

siRNA は、近年、真核生物細胞においてターゲットとなる遺伝子の発現を抑制することが明らかにされて以来、本研究は遺伝子治療、遺伝子機能解析(ノックアウト技術に変わる真核生物の遺伝子機能解析)等、ポストゲノム時代の研究に応用展開できる事から、医学、薬学を中心とした様々な研究分野で注目を浴びている。今回は有用性が高い INVIVOGEN 社 RNAi 関連製品について、ご紹介させていただきます。

セッション6 放射線の標的は？

座長 渡邊正己（長崎大院・医歯薬学総合・放射線生物）

2月8日（日）12:30-14:25

鈴木雅雄（放医研・宇宙放射線防護）

松本英樹（福井大・医・放基）

児玉靖司（長崎大・院医歯薬・放射線生物）

渡邊正己（長崎大・院医歯薬・放射線生物）

追加発言

野宮琢磨（東北大・医・放射線治療）

長谷川武夫（鈴鹿医療科学大・院・保健衛生）

安本順一（奈良医大・医・口腔外科）

細胞間情報伝達を介した粒子放射線誘発バイスタンダー効果の癌治療応用の可能性

鈴木雅雄

放射線医学総合研究所 放射線安全研究センター

重粒子線のがん治療で考慮すべき重要な因子の一つは、標的とする容積に対する不均一・低密度照射の可能性にあると考える。これは、特に高い LET の粒子線の放射線生物実験でも問題となることで、実際に放射線が“当たった細胞”と“当たらなかった細胞”が混在する、という問題である。治療においては標的とする組織の容積が区々で画一的な議論は難しいかもしれないが、がん治療での標的容積に含まれる総細胞数に対しては、数 Gy の照射は低密度な照射、すなわち重粒子線の直接のヒットを受けない細胞が相当数存在している可能性を否定出来ない。そのような重粒子線の低密度照射の場合に問題となるのが近年注目を集めているバイスタンダー効果である。

コロンビア大学マイクロビーム照射施設で行った研究から、ヘリウムイオンマイクロビームによる培養細胞の突然変異誘発に対するバイスタンダー効果において以下のような結果を得ている。

- ① gap junction を介した細胞間情報伝達の阻害剤である γ -isomer of hexachloro-cyclohexane の投与により、突然変異誘発頻度がコントロール群に近く減少した
- ② 別の gap junction 阻害剤である octanol によっても、コントロールレベルまで誘発頻度が抑制された
- ③ gap junction チャンネルタンパク質粒子 connexon を構成するタンパク質 connexin を過剰発現させた細胞において、バイスタンダー突然変異が顕著に高く誘導された

また、培養細胞のクロマチン切断誘発においても、gap junction を介した細胞間情報伝達を発生メカニズムとするバイスタンダー効果が生じている結果を得ており、細胞及び染色体レベルに共通して、gap junction を介した細胞間情報伝達が重要な役割を演じるタイプのバイスタンダー効果が誘導されることが判ってきている。しかしながら現段階では、原子番号の大きな核種を利用したマイクロビーム照射技術が完全に確立されていないことから、たとえば現在放医研で癌治療に用いられている炭素イオンビームのような比較的原子番号の大きな核種のイオンビームを用いたこの類の実験データはほとんど無い。そこで我々の研究グループでは、炭素イオンビーム低密度照射によってバイスタンダー効果が生じるのか否かを検証するために、放医研重粒子線がん治療装置 (HIMAC) で低エネルギー (核子当たり 6 MeV) の炭素イオンビームを用いた照射実験を行っている。このビームはマイクロビームではないが、エネルギーが低いためサンプルの細胞面の一部分を容易に覆い隠すことが出来、同一のサンプル内に直接炭素イオンのヒットを受けた細胞と直接ヒットを受けないバイスタンダー細胞を同時に混在させることが可能となる。このような照射法を用いて、通常の細胞照射実験の感覚で約 0.05 Gy 程度の低密度照射を行いヒト皮膚由来正常線維芽細胞における細胞致死と *HPRT* 遺伝子座を標的とした突然変異誘発を調べた。得られた結果から、細胞致死及び突然変異誘発効果において炭素イオン低密度照射によって前述のヘリウムイオンマイクロビーム照射実験で観察されたものと同タイプの細胞間情報伝達を介した何等かのメカニズムにより誘発されるバイスタンダー効果が確認された。

本演題では、コロンビア大学マイクロビーム施設で行ったヘリウムイオンマイクロビームを用いた生物効果のバイスタンダー効果の検証実験を紹介し、放医研 HIMAC で行った低エネルギー炭素イオンビーム低密度照射によるバイスタンダー効果の実験結果を基に、重粒子線による癌治療に対してバイスタンダー効果を利用したより効率の良い治療方法の可能か否かについて話題提供をしたい。

集学的がん治療における NO ラジカルの役割

松本 英樹

福井大学医学部国際社会医学講座放射線基礎医学領域

近年、放射線に曝露された標的細胞のみならず、放射線を曝露されていない非標的細胞にも放射線影響が現れる、「バースタンダー効果」と呼ばれる現象が注目されている。集学的がん治療においても、その抗腫瘍効果は、各種制がん要因による直接的な抗腫瘍効果とがん細胞の二次的な応答による間接的な抗腫瘍効果の総和として現れてくると考えられる。以前より放射線がん治療に際して、原発巣のみに放射線治療を施行したにもかかわらず、原発巣から離れた放射線照射や他の治療を施行していない転移巣が縮小または消失する、いわゆる「遠達効果」と称する特異な現象が報告されてきた。しかしながらこの放射線誘発バースタンダー効果の分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていないのが現状である。我々は、正常型あるいは変異型 *p53* を遺伝子導入することにより遺伝的背景をそろえた各種がん細胞およびそのヌードマウス移植腫瘍を用いて、加温、X 線あるいは炭素線照射したがん細胞において一酸化窒素 (NO) ラジカルの産生が誘導されること、この NO ラジカルが共存する未処置のがん細胞に作用してアポトーシスを誘導することを明らかにした。我々の知見を紹介し、がん治療における NO ラジカルによるバースタンダー効果の抗腫瘍効果への寄与について考察する。

1. *p53* 遺伝子型と NO ラジカル生成

我々は、加温後、X 線あるいは炭素線照射後に変異型 *p53* 細胞のみに誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が蓄積誘導されることを明らかにし、変異型 *p53* 細胞のみで細胞外への NO ラジカルの放出が認められることを明らかにした (1, 2, 3, 4)。

2. 内因性 NO ラジカルの抗腫瘍効果への影響

我々は、加温、X 線あるいは炭素線照射された変異型 *p53* 腫瘍の反対側にある未処理の正常型 *p53* 腫瘍において統計学的に有意な増殖遅延が認められ、この増殖遅延の一因がアポトーシス誘導であることを明らかにした。

3. 外因性 NO ラジカルによるがん治療増感

我々は、NO ラジカル発生剤である狭心症治療薬が *p53* 非依存性アポトーシスの誘導作用を有し、加温、X 線および炭素線治療の増感薬となり得る可能性を培養細胞およびヌードマウス移植腫瘍において明らかにした。

1. H. Matsumoto *et al.*, *Cancer Res.*, 59: 3239-3244, 1999.
2. H. Matsumoto *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, 76: 1649-1657, 2000.
3. H. Matsumoto *et al.*, *Radiat. Res.*, 155: 387-396, 2001.
4. H. Matsumoto *et al.*, *Methods Enzymol.*, 359: 280-286, 2002.

放射線誘発ゲノム不安定性

児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生物学的研究室

放射線被曝した細胞の子孫細胞に、新たな染色体異常が生じる現象が知られている。いわゆる、放射線によって誘発される遅延性染色体異常であり、この様なゲノムの不安定性がどのように細胞の世代を越えて伝搬され、どのような状況下で発現するのかは、明らかではない。この現象が実際の癌の放射線治療において、どのような影響を与えるのかに関しては現在のところ不明であるが、その発生メカニズムの探索は、将来的により予後の良い放射線治療法の開発の一助に成り得ると考えられる。我々は、遅延性染色体異常の形成につながるゲノム不安定性が、細胞世代を越えて伝搬されるメカニズムに関して、被曝染色体それ自身に原因があるのかどうかをまず最初に検討した。微小核融合を用いた染色体移入法により、被曝ヒト染色体を、被曝していないマウス細胞中に移入してその安定性を、ヒト染色体特異的プローブを用いたFISH法で解析した。その結果、放射線被曝した染色体の中には、それ自身が不安定な性質を示し、被曝していないマウス染色体と相互作用して、遅延性の染色体異常を形成するものがあることが明らかになった。一方、被曝していないヒト染色体を、被曝したマウス細胞中に移入した場合について検討した結果、被曝マウス染色体と被曝していないヒト染色体との間で相互作用し、やはり遅延性の染色体異常が形成されることが分かった。

以上の結果は、被曝染色体自身に被曝の影響が刻印されており、それが細胞の世代を越えて伝搬され、遅延性染色体異常形成の原因になっていることを示唆している。では、放射線による染色体不安定化の原因は何であろうか？興味深いことに、放射線により誘発される遅延性染色体異常の多くは二動原体染色体であり、しかもその融合部にテロメア配列を残したものの形成割合は、放射線被曝量に依存して増加することが分かった。このことは、放射線がテロメアが持つ染色体末端保護機能を抑制していることを示唆している。また、ATM機能欠損細胞では、放射線被曝によりテロメアの構造異常が顕著に増加する。一方で、放射線被曝により細胞内に持続的な活性酸素種の発生が見られること、さらに、テロメアは活性酸素による損傷が蓄積しやすいことを示す事実等が報告されている。

これらの情報から、我々は放射線による遅延性染色体異常の形成に関して、以下のようなモデルを考えている。放射線は、被曝細胞の染色体を不安定化する。そのメカニズムには、被曝細胞に持続的に発生する活性酸素種によるテロメア不安定化が含まれる。不安定化したテロメアを持つ染色体は、周りの染色体と相互作用して新たな染色体異常を形成し、その異常がまた原動力となってさらなるゲノム不安定化が進行する。もちろん、ゲノム不安定化にはこれ以外の過程も存在すると考えられるが、そのうちの1つでも実証出来れば、癌の発生、あるいは進展を阻む新たな手立てのための貴重なヒントを提供できると考えられる。

突然変異誘導機構の新しい提案

—放射線による突然変異誘発は DNA 損傷を生じない長寿命ラジカルによって引き起こされる—

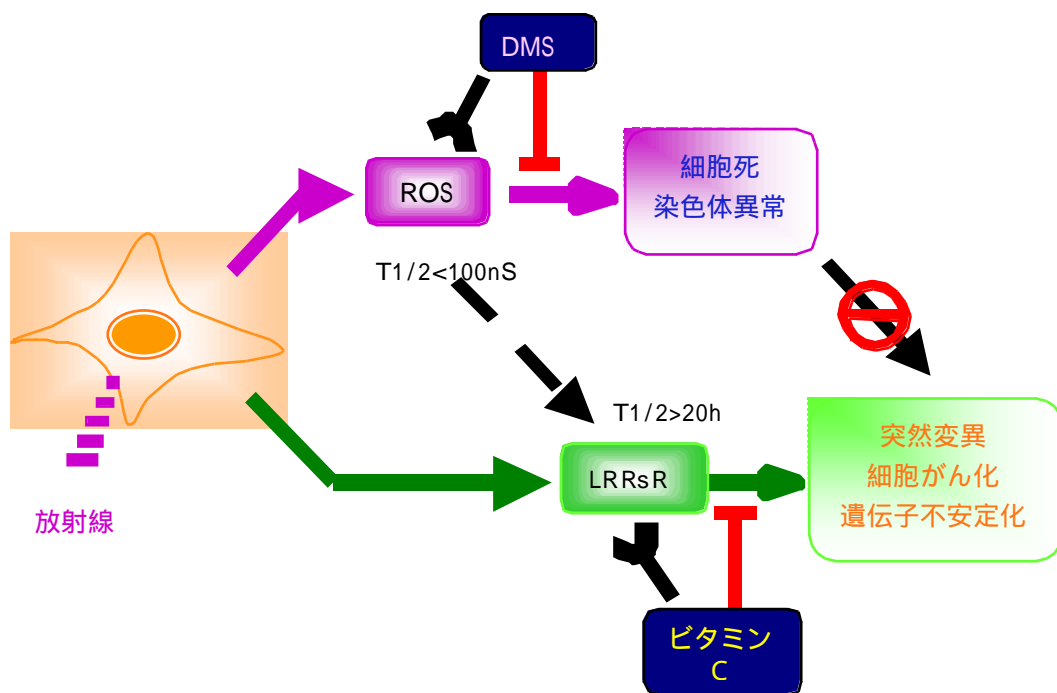
渡邊正己¹、児玉靖司¹、鈴木啓司¹、熊谷純²、宮崎哲郎²
(¹長崎大・院・医歯薬学総合、²名古屋大・院・工学)

電離放射線による生物効果は、DNA に対する直接作用と生体水の放射分解によって生ずる OH ラジカルなど活性の高いラジカルによる間接効果によって起きると推測されている。その効果は、直接効果 1 に対し間接効果 3 の割合であり、活性の高い活性酸素ラジカル(ROS)による間接効果が放射線の生物効果発現の主役を占めると信じられてきた。しかし、OH ラジカルなど活性の高い ROS ラジカルの細胞内寿命は、200 ナノ秒を越えることがないこと、かつ、水分に富む細胞内における消滅までの移動距離は $0.5 \mu\text{m}$ 以下と極めて短いと計算されることなどの理由から、生じた活性ラジカルが実際に DNA まで移動し DNA 損傷を生じさせる主因とは考えにくいと考えられるようになってきている。そこで、今回、我々は、ESR 装置の測定感度を向上させ、細胞内に生じたラジカルを直接観察し突然変異誘導に関わるラジカルの特定を試みた。

その結果、常温における半減期が 20 時間を越える極めて安定な高分子ラジカル(LLRs)が細胞内の S 含有アミノ酸に生ずることを発見し、このラジカルの消長と細胞の突然変異頻度の間に密接な相関があることを発見した。この長寿命ラジカルは、5mM ビタミン C の 2 時間処理で効果的にスクャベンジされ、その消滅に伴って 6TG 抵抗性を指標とした突然変異の誘発が著しく抑制される。しかし、ビタミン C 処理によって細胞の生存率は全く変化しない。さらに、驚くべきことに、ビタミン C 処理による坑変異原作用は、放射線照射後、数時間を経た後であっても有効であることがわかった。

これらの結果を総合すると、図に示したように放射線による突然変異は、我々が発見したアミノ酸に生ずる長寿命ラジカルが原因となって誘導されることが明確であり、“DNA 損傷—染色体異常—細胞死あるいは突然変異”という突然変異の誘導機構に対するこれまでの定説に疑問を投げかけるものである。

この結果は、放射線治療時に予想される遺伝的影響を軽減するために、従来の発癌の突然変異説を念頭においた考え方は不適当と言うことを示唆する。本シンポジウムでは、突然変異誘導機構として我々の新提案を紹介するとともに、突然変異や発がんを回避する新しい手段についての話題を提供する。



放射線により誘導された長寿命ラジカルの生物効果

VEGF 遺伝子発現ヒト扁平上皮癌細胞株と放射線感受性(in vitro assay)

野宮琢磨、仲田栄子、根本建二、高井良尋、山田章吾
東北大学医学部・放射線治療科

食道癌において肉眼的に浸潤型に分類されるものは肉眼的限局型に分類されるものに対して予後不良であることは、以前より経験的に知られており予後の違いを **retrospective** に報告している論文も幾つか見られる。更に局所の **response** (放射線感受性) にも違いがあることが示されている。我々の以前の研究では、切除されたヒト食道癌を検体として血管密度、増殖分画、血管新生因子の発現等を分析した結果、臨床的に放射線感受性が低いとされる浸潤型では全体的に血管密度が低く、増殖活性も低く、血管新生因子の発現亢進が高いことが示された。我々はこれまで得られている基礎的研究報告を基にこの結果に対し、放射線抵抗性の要因として低酸素細胞分画が大きく関与していると推測した。しかし、強力な血管新生因子である VEGF (vascular endothelial growth factor) が扁平上皮癌の増殖、放射線感受性に直接影響を与えないかどうかは未だ解明されてないところが多い。今回我々はヒト食道癌由来／扁平上皮癌細胞株に対し VEGF 遺伝子、Flt-1(VEGF receptor) 遺伝子を **transfection** した **cell line** を構築し、これら遺伝子発現株と **control** に対して **in vitro** における増殖活性、放射線感受性の比較検討を行った。**control**、VEGF(+)株、VEGF(+)/VEGF-R(+)株の **in vitro** における増殖曲線の分析では、Doubling Time は各々、45.6、43.0、43.3 hr で殆ど有意差は無かった。**in vitro** での放射線感受性の評価は発表時点で提示できると思われる。何れも **negative data** であった場合、増殖活性の差、放射線感受性の差は血管新生因子の影響によるものではなく、仮説通り低酸素領域の違いに起因する可能性が高いことを支持するものと考えられる。現時点では途中経過報告の段階であるが、今後はヌードマウスに移植した腫瘍を用いて **in vivo** での血管新生遺伝子発現と放射線感受性等の関係を比較検討する予定である。

マイルド・ハイパーサーミアによる免疫能活性

長谷川武夫^{1) 2)}、門前 一¹⁾、前田佳予子¹⁾、福山 篤司¹⁾、天野 守計¹⁾、
安藤 聡志¹⁾、具 然和^{1) 2)}、小野 博史²⁾、伊田 和司²⁾、大野由紀子²⁾、
鈴木 友昭²⁾、村林 甲介²⁾、高橋 徹³⁾、山本 五郎⁴⁾

¹⁾ 鈴鹿医療大・院 (修士)、²⁾ 同・院 (博士)、³⁾ 関西医大・RI、

⁴⁾ 山本ビニター・高周波研

(目的) 温熱治療は一般的に 42.5℃以上の温度で 30～60 分間を隔日又は週 2 回行っている。本研究は 42.5℃以下の温度 (41℃) でも免疫能活性による抗腫瘍効果が現れる事を確認したので報告する。(材料及び方法) C3H マウス大腿部皮下に SCC-VII 腫瘍を移植し、無処理群、連日加温処理群、2 日おき加温群の 3 群について、腫瘍成長速度、白血球数、リンパ球、NK 細胞活性を測定した。(結果及び考察) 単回加温の抗腫瘍効果は有意な効果が見られなかった。連日加温群の抗腫瘍効果は連日加温群が最も強い抗腫瘍効果を示し、加温処理間隔が大きくなると、無処理群の腫瘍成長速度に近づいた。41℃、30 分間の大腿部連日処理によって、NK 細胞の活性は 2.5 倍に上昇した。また、連日加温群に白血球、リンパ球の有意な増加が観測された。これらの結果は連日の 41℃、30 分間のマイルド・ハイパーサーミア処理によって免疫能が活性化するため、治療後の患者の QOL 改善や悪性腫瘍の転移予防に役立つと考える。

PI3K 阻害剤 LY294002 による放射線および温熱感受性の増感効果

安本順一¹、大西健²、高橋昭久²、大西武雄²

奈良医大・¹口腔外科、²生物

【目的】 PI3K の阻害剤である LY294002 の放射線および温熱感受性の増感効果とその作用機序について調べた。

【方法】 変異型 *p53* 遺伝子導入ヒト舌扁平上皮癌細胞 (SAS/mp53) および正常型 *p53* あるいは変異型 *p53* 遺伝子導入ヒト非小細胞肺癌細胞 (H1299/wtp53, H1299/mp53) を用い、X線および温熱感受性をコロニー形成法、アポトーシスの出現頻度をヘキスト染色法、アポトーシス調節蛋白質の蓄積量をウエスタンブロット法で解析した。LY294002 (最終濃度 40 μ M) はX線あるいは温熱処理の1時間前に培地に添加した。

【結果・考察】 LY294002 処理するとX線感受性のみならず温熱感受性も癌細胞の *p53* 遺伝子型に依存せず増感された。X線あるいは温熱処理後、Akt および survivin の蓄積誘導が見られたが、LY294002 処理によりその蓄積誘導が阻害された。この結果から、X線と温熱は Akt や survivin を介した細胞生存シグナル伝達を活性化すること、LY294002 によりこのシグナル伝達は阻害されることが示唆された。さらに、温熱処理後の hsp70 の蓄積誘導は LY294002 処理により阻害されたため、hsp70 によるアポトーシス抑制も温熱感受性増感の一因と考えられる。wortmannin に温熱感受性増感作用は見られなかったので、温熱誘導細胞生存シグナル伝達における PI3K 阻害剤の作用機序は阻害剤の種類によって異なると考えられる。

参加者一覧（五十音順）

秋元哲夫	群大・院医・腫放医
浅川勇雄	奈良医大・医・腫放
石井宏武	京大・院工・物質エネルギー化学
稲波修	北大・院獣医・放
今井雄一郎	奈良医大・医・口腔外科
内海博司	京大・原子炉
宇都義浩	徳島大・工・生物工学
大西健	奈良医大・医・生物
大西武雄	奈良医大・医・生物
尾方俊至	阪大・院医・保健
奥村寛	長崎大・医・原研放射
小倉昌和	京大・院医・腫放
古倉聡	京府医大・院医・消化器病態制御
小野公二	京大・原子炉
柿崎竹彦	北里大・獣医放射線
垣塚彰	京大・院生命科学・高次生体統御
梶原淳久	奈良医大・医・口腔外科
加藤雅史	ナカライテスク
儀我直美	労働保険事務組合・大阪育栄会併設創造科学技術研究所
北原治	武田薬品工業(株)・創薬第二研究所
屈田力	阪大・医・環境医学
窪田宣夫	茨城医療大・保健医療・放射線技術科学
桑原幹典	北大・院獣医・放
小泉雅彦	大阪府立成人病センター
児玉靖司	長崎大・院医歯薬・放射線生物
近藤隆	富山医薬大・医・放基
崔正国	富山医薬大・医・放基
桜井英幸	群大・院医・腫放医
笹井啓資	新潟大・院医歯・腫放医
柴田徹	京大・院医・腫放
鈴木啓司	長崎大・院医歯薬・放射線生物
鈴木文男	広大・原医研・ゲノム応答
鈴木雅雄	放医研・宇宙放射線防護
田内広	茨城大学・理・地球生命環境科学
高橋昭久	奈良医大・医・生物
高橋恵理子	北大・院獣医・放
田中敬正	関西医大・名誉教授
田野かおり	鈴鹿医療科学大・東洋医学
田矢洋一	国立がんセ・研・放射線
辻孝	国立南和歌山病院・放
直江知樹	名大・院医・分子細胞
永澤秀子	徳島大・工・生物工学
中島俊文	天理よろづ相談所病院放射線部
中西真	名市大・院医・分子細胞生化
夏堀雅宏	北里大・獣医放

西村恭昌	近大・医・放
西本清一	京大・院工・物質エネルギー化学
野宮琢磨	東北大・医・放射線治療
長谷川武夫	鈴鹿医療科学大・院・保健衛生
長谷川正俊	群大・院医・腫放医
畑下昌範	福井大・医・放基
秦野修	奈良医大・第一解剖
林幸子	福井大・医・放基
播磨洋子	関西医科大学放射線科
V. OSTAPENKO	尚生会西出病院
東庸太郎	体質研
平岡真寛	京大・院医・腫放
廣田勝也	ナカライテスク
フェリル・ロリト	富山医薬大・医・放基
福本学	東北大・加齢医研・病態臓器構築
細井義夫	東大・院医・疾患生命
堀均	徳島大・工・生物工学科
真木寿治	奈良先端大・バイオ・原核生物分子遺伝
牧村雄史	京大・院工・物質エネルギー化学
増永慎一郎	京大・原子炉
町田光	茨城医療大・保健医療・放射線技術科学
松浦成昭	阪大・院医・保健
松本英樹	福井大・医・放基
松本義久	東大・院医・疾患生命
三浦雅彦	東京医歯大・院・分子診断治療
三橋紀夫	東京女医大・医・放医
村尾佳則	奈良医大・医・救急
村山千恵子	東海大・医・放
森田隆	大阪市大・院医・遺伝子制御
安本順一	奈良医大・医・口腔外科
谷田貝文夫	理研・RI
家根旦有	奈良医大・医・耳鼻咽喉科
山本五郎	山本ビニター（株）
幸和恵	奈良医大・医・耳鼻咽喉科
吉村均	奈良医大・医・腫放
渡邊経弘	茨城医療大・保健医療・放射線技術科学
渡邊正己	長崎大・院医歯薬・放射線生物
<スタッフ>	
北野睦子	奈良医大・2年生
北村淳	奈良医大・2年生
久保卓也	奈良医大・2年生
田中秀憲	奈良医大・2年生
辻中大生	奈良医大・2年生
廣瀬紗也子	奈良医大・2年生
福智隆介	奈良医大・2年生
小泉美樹子	国際癌治療増感研究協会
高木昭美	体質研

第 6 回癌治療増感研究シンポジウム 賛助会員・協賛企業

「第 6 回癌治療増感研究シンポジウム」を開催するにあたり、以下の多くの企業に多大なご協力をいただきました。ここにお礼を申し上げます。

賛助会員（五十音順）

協和発酵工業（株）
山本ビニター（株）

協賛企業（五十音順）

アイプリコム（株）
飯岡形成外科クリニック
エーザイ（株）
三共（株）
塩野義製薬（株）
第一製薬（株）
中外製薬（株）
ナカライテスク（株）
日本化薬（株）
ブリストル・マイヤーズ（株）
水谷器械
盟和商事（株）
ヤナギビジネス（株）