

(様式4)

学位論文の内容の要旨

齋藤 克代 印

(学位論文のタイトル)

Histone deacetylase inhibitors sensitize murine B16F10 melanoma cells to carbon ion irradiation by inducing G1 phase arrest

(ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、G1期停止を介して悪性黒色腫細胞株の重粒子線感受性を増強する)

(学位論文の要旨)

背景と目的:

難治性腫瘍では、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC: Histone Deacetylase) が強発現し、ヒストンは低アセチル化状態にある。HDAC阻害剤は、この低アセチル化状態を是正することによって抗腫瘍効果を発現する可能性がある。HDAC阻害剤は単独で抗腫瘍効果を示すのみならず、がん免疫療法を増感することも知られており、HDAC阻害剤と低LET放射線治療の併用効果についても近年報告され始めている。

一方、重粒子線は線エネルギー付与 (LET: Linear Energy Transfer) が大きいために、X線などの低LET放射線と比べて細胞致死効果が高く、がん病巣のみを狙う線量集中性にも優れている。そこで、本研究では、難治性がんに対するより効果的な治療法を開発するために、悪性黒色腫細胞を用いてHDAC阻害剤と重粒子線の併用効果を検討した。

材料と方法:

本研究ではマウス悪性黒色腫細胞株B16F10を用いた。HDAC阻害剤には4種類 (FK228、トリコスタチンA (TSA: Trichostatin A)、バルプロ酸 (VPA: Valproic acid)、スベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA; suberoylanilide hydroxamic acid)) を用いた。重粒子線は、量研機構・高崎量子応用研究所TIARAにおいて炭素線 (220 MeV) を照射した。比較のために、⁶⁰Co ガンマ線を照射した群も用意した。

細胞のヒストンアセチル化の確認には、抗acetyl-histone H3 (Lys 9) 抗体および抗acetyl-histone H3 (Lys 18) 抗体を用いた。細胞をHDAC阻害剤存在下で16時間培養した後、Western blot法にて解析を行った。内在性タンパク質を検出するためhistone H3とGAPDHに対する抗体を用いた。アポトーシスの解析は、細胞をHDAC阻害剤存在下で16時間培養して重粒子線を照射した後、すぐにトリプシン処理して再播種し、24時間後にフローサイトメトリーにより細胞とAnnexin Vおよび7AAD (7-Amino-Actinomycin D) との親和性を解析した。

コロニー形成実験は、細胞をHDAC阻害剤存在下で16時間培養して重粒子線を照射した後、すぐにトリプシン処理して適当な細胞数を再播種し、9(±1)日後にコロニーを固定染色して計数した。非照射非投与群が100%となるよう細胞数を補正して生存曲線を作成した。放射線とHDAC阻害剤の相互作用を検定するために、独立変数を薬の有無と照射した線量、従属変数をコロニー数として二元配置分散分析を行った。

細胞周期は、細胞をHDAC阻害剤存在下で16時間培養したあと重粒子線を照射し、すぐにトリプシ

ン処理して再播種して、照射24時間後まで経時的に細胞を回収した。回収した細胞は固定後、フローサイトメトリーでDNA量を測定し、細胞周期の判定に用いた。

結果と考察：

まず、4種類のHDAC阻害剤がB16F10のヒストンをアセチル化するか確認するために、細胞をHDAC阻害剤存在下で培養した後、抗アセチル化ヒストン抗体を用いてウェスタンブロッティングした。その結果、各HDAC阻害剤はヒストンを濃度依存的にアセチル化することが確認でき、クロマチン構造を弛緩させることが示唆された。

次に、HDAC阻害剤が重粒子線による細胞殺傷力増強を調べるために、アポトーシスを解析した。細胞をHDAC阻害剤存在下で培養したあと重粒子線を照射し、24時間後にフローサイトメトリーによりAnnexin V陽性率を解析した。その結果、4種類のHDAC阻害剤は重粒子線誘発アポトーシスを促進した。一方、本実験で用いた濃度ではガンマ線との併用においては、FK228とSAHAは増感効果があったがTSAとVPAの投与では増感効果は認められなかった。

線質によらずアポトーシスを促進した2種類（FK228, SAHA）を用いて、コロニー形成実験を行った。細胞をHDAC阻害剤存在下で培養して重粒子線を照射し、できたコロニーを計数して生存曲線を作成した。放射線とHDAC阻害剤の交互作用を検定するために二元配置分散分析を行った。FK228の事前曝露は、重粒子線によるコロニー形成能の抑制を相加的に促進した。SAHAの事前曝露は、重粒子線によるコロニー形成能の抑制を相乗的に促進し、ガンマ線による抑制は相加的に促進した。どちらのHDAC阻害剤も統計的には、ガンマ線より重粒子線との併用による抑制効果のほうが高かった。またどちらの線種でも、FK228よりSAHAの事前曝露のほうがコロニー形成能の抑制を強く促進した。

当初、HDAC阻害剤による増感効果は、HDAC阻害剤により緩んだクロマチン構造に放射線の間接作用が働くことが原因だと予想したが、ここまでの実験では予想に反し、間接作用が小さいとされている高LET放射線のほうが併用効果が大きい結果となった。ゆえに、クロマチン構造の緩みと間接作用は、HDAC阻害剤による放射線増感効果に関係ないのかもしれない。

最後に、FK228とSAHAの効果の違いの理由を調べるために、細胞周期を解析した。細胞をHDAC阻害剤存在下で培養して重粒子線を照射し、照射24時間後まで経時的に細胞周期を解析した。HDAC阻害剤の事前曝露によって照射後初期にはG0/G1期停止が誘導されており、重粒子線照射後徐々にG2/M期が誘導された。本実験に用いた濃度のHDAC阻害剤では、G0/G1期停止はFK228よりSAHAで強く誘導された。コロニー形成実験においてSAHAがFK228より高い併用効果を示した理由は、放射線感受性の高いG1期停止がSAHAにより強く誘導された状態で重粒子線照射を受けたために、感受性が高かったと考えられる。

まとめ：

本研究より、HDAC阻害剤と重粒子線の併用は抗腫瘍効果を増強させることがわかった。B16F10はHDAC阻害剤により放射線感受性の高いG1期停止が誘導された状態で重粒子線を照射されたために、重粒子線増感効果を示したことが示唆された。HDAC阻害剤は重粒子線増感剤として有望である。