

令和元年5月17日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05675

研究課題名(和文)最先端スキャニング照射法の陽子線治療の生物学的基礎解明による、臨床応用の構築

研究課題名(英文) Construction of clinical application by clarifying the biological basis of proton therapy of cutting edge scanning irradiation method

研究代表者

岩田 宏満 (Iwata, Hiromitsu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40611588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：スキャニング陽子線照射と高容量のシスプラチン併用で、非常に強い効果があると考えられた。これは併用時に細胞死と細胞周期のパターンが異なることによるものであることが示唆された。これらの結果から、G2停止の増加のタイミングを考慮すると、たとえば、抗がん剤併用陽子線治療を行う際に、化学療法によって放射線感受性のある細胞周期中に陽子線照射を併用することで、強力な生物効果が得られる可能性が示唆された。シスプラチンと陽子線の併用時にはX線と併用時よりも異なった表現型が様々認められた。照射後のmRNA発現レベルは、特にDNA修復に関連する遺伝子において、陽子線とX線の間で異なり、生物学的応答の差が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陽子線治療は、国内外でも広がり、臨床治療がさらに進む方向であるが、いまだに基礎生物学は未解明の問題が多く取り残されている。本研究で、X線と陽子線という線質の違いにより、細胞・個体に対して、様々な表現型の違いが認められ、照射単独では、細胞死という終着点である事象に違いがみられないものもあるが、併用療法によっては、差がみられるものもみられ、より至適な使用方法の開発が急務であることがわかった。このスキャニング照射法での基礎検討は世界でも類をみない検討であり、最先端のがん治療といわれる陽子線治療の礎となるものであり、今後将来の臨床応用の基礎的概念の確立に寄与する、非常に重要なものとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Proton therapy using scanning method combined with high-concentration cisplatin is considered to be very effective. It is suggested that the pattern of cell death and cell cycle may be different, which partly accounts for the difference in the combined effect. Considering the timing of the increase in G2 arrest, potent biological effects may be obtained by delivering proton irradiation during radiosensitive cell cycle phases in chemo-proton therapy. Proton beam irradiation combined with cisplatin resulted in different phenotype as compared with X rays and cisplatin.

The level of mRNA expressions after irradiation were different between proton and X-ray, especially in genes related to DNA repair. Differences of in vivo biological responses between proton and X-ray beams were found.

研究分野：放射線治療、陽子線治療

キーワード：陽子線治療 放射線治療 放射線生物学 スキャニング照射

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、陽子線治療は最先端治療として発展し、国内外で加速的に導入計画が進んできている。特に、骨軟部肉腫、悪性黒色腫、原発性肝癌、原発性肺癌など、粒子線治療の安全かつ根治性の報告がなされている。申請者も特に肺癌において外科手術に劣らない成績を明らかにした (Iwata et al. J Thorac Oncol 2013)。陽子線治療は、従来の X 線治療と比較して、物理的な線量分布の優位性と生物学的な効果の優位性の 2 つの側面を有した治療法である。しかし、特にこの生物学的な側面としての陽子線の基礎研究は、まだ報告が少なく、放射線治療の Top journal である Int J Radiat Oncol Biol Phys の Chief editor である Dr.Zietman も陽子線治療の不確かさの 3 things の一つとして、生物学的側面を述べている。しかしこういった基礎的な生物研究が未発展なまま、臨床研究が進んでいるのが現状である。

将来的には、更なる新規治療法であるスキヤニング照射を用いた陽子線治療が主流になると予想されるが、現状では導入施設が世界中で 3 施設のみであり、そのうちの 1 施設が、本研究にて照射実験を施行する名古屋陽子線治療センターである。またこの照射法の基礎生物学的研究を実際に行っているのはわずかである。申請者らは、このスポットスキヤニング照射法に関して、Particle Therapy Cooperative Group や American Society for Radiation Oncology などの annual meeting において多数の報告を行ってきたが、至適な照射法や生物研究などの基礎研究にまだ多くの未解明のことが未だに残されており、また臨床応用への展開に関して検討する事項が多い。

2. 研究の目的

陽子線治療は、X 線治療と比較した生物学的効果比が約 1.1 倍といわれているが、これはあくまで一種類の培養細胞系でのデータである、現状ではこの培養細胞系のデータのみで、実臨床でも使用されている。陽子線治療は、X 線治療と比較して、DNA の double strand break (2 重鎖切断) が多いというような報告がわずかにあるくらいで、詳細な生物学的効果比や、その他分割換算モデルでの検討がまだ十分になされないまま実臨床が先走ってすすめられていることは、大変不都合なことである。特に、スキヤニング照射法は、陽子線治療の照射法の中で、最先端の照射方法である。従来照射と比較して、照射方法が異なり、生物学的な側面で異なる可能性が示唆されている。本研究では、陽子線治療、特にスポットスキヤニング照射法の解明されていない、生物学的な基礎研究を施行し、至適な使用方法など、臨床応用を展開し、国内外へ世界初として発信するための研究を行う。特に下記の内容を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Passive 照射法とスポットスキヤニング照射法による陽子線照射を、single cell と spheroid cell に対して行い、陽子線の distal end の生物効果比をコロニー法により測定・比較した。

(2) 陽子線の酸素効果比と DNA 切断における直接効果・間接効果の違いに関して DMSO を使用して X 線とコロニー試験を用いて、測定・比較した。

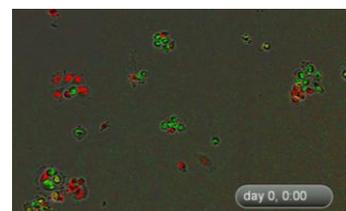
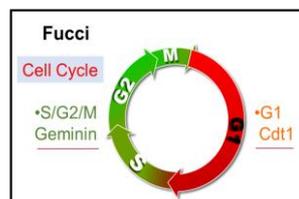
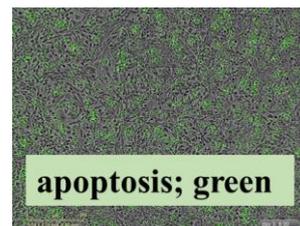
(3) 3 種類の培養細胞 (EMT6、HSG、V79) を適量播種し、6 時間静置後に、シスプラチン (CDDP) を 0-2.5 μ M を濃度毎に投与、投与 1 時間後に、0-5GyE の X 線と陽子線を照射して、照射 1 時間後に CDDP を除去し、コロニー試験を施行。生存率曲線から CDDP と陽子線照射の増感効果を測定・比較した。

(4) IncucyteZoom を用いて、タイムラプスイメージングを行い、化学陽子線治療の細胞死、アポトーシス変化など細胞毒性評価を行った。

(5) HSG 細胞に、mCherry と AmCyan1 を PiggyBac system を用いて導入し Fucci 細胞を独自で樹立した。Fucci 導入の細胞に対して、同様の陽子線照射を行い、タイムラプスイメージングにて細胞周期を観察、G1 期と S/G2/M 期の割合など細胞周期を評価・解析した。

(6) ショウジョウバエ (野生型 Oregon-R) の三齢幼虫を用い、サイズ、動きなどから可及的に発達段階の等しい幼虫サンプルを抽出し、陽子線、X 線の両線種の全身照射を行った後、線量依存性の羽化後生存率などを算出、計測した。

(7) 陽子線の臨床データと比較し、上記生物実験結果を考察し、臨床応用を展開した。



4. 研究成果

(1) 陽子線の distal end における生物効果は、passive 照射法よりスポットスキヤニング照射法においてより強くなることがわかった。また spheroid cell においても、同様の傾向を認めた。(国内外発表予定)

(2) 陽子線の SOBP 中心の酸素効果比は X 線治療と異なり、低くなる。また X 線と比較して直

接効果の割合が高くなり、DNA 切断のされ方に違いを認めた。(国内外発表済論文 publish 済)
(3) CDDP と照射の併用にて有意な増感効果を認めた($p < 0.05$, ANOVA)。特に、EMT6 と V79 細胞では、高容量の CDDP と高線量陽子線照射併用群にて、X 線併用群より強い増感効果を認めた($p < 0.05$)。(国内外発表済論文投稿予定)

(4) 52 時間後の細胞死に対するアポトーシスの割合が、X 線併用時より、陽子線併用の方が顕著に増加した($p < 0.05$)。(国内外発表済論文投稿予定)

(5) 陽子線と X 線の照射後に、S/G2/M 期細胞割合が増加し、細胞周期遅延が認められ、G2 arrest が起こっていると考えられた。線量増加により、緑色の S/G2/M 期細胞の割合が増加し、それにより細胞周期遅延が延長した。8Gy の高線量照射では約 10 時間程度の細胞周期遅延が認められ、陽子線の高線量照射でよりこの増加が認められた。また初回の G2 arrest 以降の細胞周期は線量・線質依存的な変化はあまり認められなかった。陽子線と抗がん剤を併用した場合の方がより、同時刻での S/G2/M 期細胞の割合が、X 線併用の場合より、相対的に多くなった。(国内外発表済論文投稿予定)

(6) 全身照射によって生存率の違いが認められた。mRNA 発現量において、線種間で最も顕著な違いを認めたのは、照射後 2 時間のサンプルにおける DNA 2 本鎖切断修復関連遺伝子であり、また、炎症性サイトカイン TNF も照射後 2 時間サンプルにおいて有意に陽子線照射群で発現量の上昇を認めた。(国内外発表済論文投稿予定)

(7) 抗がん剤併用の陽子線治療症例では、腫瘍縮小のパターンがことなることがわかり、本研究のデータと一致するような所見が認められた。X 線と陽子線という線質の違いにより、細胞・個体に対して、様々な表現型の違いが認められた。照射単独では、細胞死という終着点である事象に違いがみられないものもあるが、併用療法によっては、差がみられるものもみられ、より至適な使用方法の開発が急務であることがわかった。(国内外発表済論文投稿予定)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

(1) [Iwata H](#), Toshito T, Hayashi K, Yamada M, Omachi C, Nakajima K, Hattori Y, Hashimoto S, Kuroda Y, Okumura Y, Mizoe J, Ogino Y, Shibamoto Y. Proton therapy for non-squamous cell carcinoma of the head and neck: planning comparison and toxicity. *J Radiat Res*. 2019, article in press. 査読あり

(2) Nakajima K, [Iwata H](#), Ogino H, Hattori Y, Hashimoto S, Toshito T, Hayashi K, Akita K, Baba F, Nakamae K, Mizoe JE, Shibamoto Y. Clinical outcomes of image-guided proton therapy for histologically confirmed stage I non-small cell lung cancer. *Radiat Oncol*. 2018;13:199. doi: 10.1186/s13014-018-1144-5. 査読あり

(3) Hashimoto S, Sugie C, [Iwata H](#), Ogino H, Omachi C, Yasui K, Mizoe JE, Shibamoto Y. Recovery from sublethal damage and potentially lethal damage : Proton beam irradiation vs. X-ray irradiation. *Strahlenther Onkol*. 2018;194:343-351. doi: 10.1007/s00066-017-1223-9. 査読あり

(4) Nakajima K, [Iwata H](#), Ogino H, Hattori Y, Hashimoto S, Nakanishi M, Toshito T, Umemoto Y, Iwatsuki S, Shibamoto Y, Mizoe JE. Acute toxicity of image-guided hypofractionated proton therapy for localized prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. 2018;23:353-360. doi: 10.1007/s10147-017-1209-8. 査読あり

(5) [Iwata H](#), Ishikawa H, Takagi M, Okimoto T, Murayama S, Akimoto T, Wada H, Arimura T, Sato Y, Araya M, Mizoe JE, Goshō M, Nakamura K, Shirato H, Sakurai H. Long-term outcomes of proton therapy for prostate cancer in Japan: a multi-institutional survey of the Japanese Radiation Oncology Study Group. *Cancer Med*. 2018;7:677-689. doi: 10.1002/cam4.1350. 査読あり

(6) [Iwata H](#), Ishikura S, Murai T, Iwabuchi M, Inoue M, Tatewaki K, Ohta S, Yokota N, Shibamoto Y. A phase I/II study on stereotactic body radiotherapy with real-time tumor tracking using CyberKnife based on the Monte Carlo algorithm for lung tumors. *Int J Clin Oncol*. 2017;22:706-714. 査読あり

(7) [Iwata H](#), Ogino H, Hashimoto S, Yamada M, Shibata H, Yasui K, Toshito T, Omachi C, Tatekawa K, Manabe Y, Mizoe J, Shibamoto Y. Spot scanning and passive scattering proton therapy: relative biological effectiveness and oxygen enhancement ratio in cultured cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;95:95-102. 査読あり

(8) Hashimoto S, Shibamoto Y, [Iwata H](#), Ogino H, Shibata H, Toshito T, Sugie C, Jyun-etsu Mizoe. Whole-pelvic radiotherapy with spot-scanning proton beams for uterine cervical cancer: a planning study. *J Radiat Res*. 2016;57:524-532. 査読あり

(9) Ohta K, Shimohira M, Sasaki S, [Iwata H](#), Nishikawa H, Ogino H, Hara M, Hashizume T, Shibamoto Y. Transarterial Fiducial Marker Placement for Image-guided Proton Therapy for Malignant Liver Tumors. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2015;38:1288-1293. 査読あり

[学会発表] (計 26 件)

(1) 岩田宏満, X 線と陽子線の細胞・個体に対する表現型の違い, 第 21 回菅原・大西記念癌治療増感研究シンポジウム, 2019

(2) [Iwata Hiromitsu](#), Effects of proton beams and X rays on the cell cycle of fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)-expressing cells, the 60st American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, 2018

- (3) Iwata Hiromitsu, Phase II study of image-guided proton therapy for solitary primary hepatocellular carcinoma with indication for standard treatment, the 60st American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, 2018
- (4) 岩田宏満, Fucci 発現細胞を用いた陽子線と X 線の細胞周期に与える影響の検討, 日本放射線腫瘍学会第 31 回学術大会, 2018
- (5) Iwata Hiromitsu, Clinical and basic biological research of proton therapy at Nagoya Proton Therapy Center - 5 year ' s experience and future prospects-, The 2nd International Symposium for High Precision Radiotherapy, 2018
- (6) Iwata Hiromitsu, Clinical and biological research at Nagoya Proton Therapy Center, the 8th Annual Meeting of ISRN, 2018
- (7) 岩田宏満, 化学療法併用陽子線治療の生物学的検証, 日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会, 2017
- (8) 岩田宏満, 局所進行非小細胞肺癌に対する S-1 と cisplatin の同時併用化学陽子線治療の第 II 相試験, 日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会, 2017
- (9) 岩田宏満, Moving target に対する Spot scanning 照射法による陽子線治療での取り組み, 第 14 回日本粒子線治療臨床研究会, 2017
- (10) Iwata Hiromitsu, Long-term Outcomes of Proton Therapy for Prostate Cancer in Japan: Retrospective Analysis of a Multi-institutional Survey, the 59st American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, 2017
- (11) Iwata Hiromitsu, Biological Effects of Proton and Photon Therapy in Combination with Cisplatin and Their Possible Mechanisms: an In Vitro Study, the 59st American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, 2017
- (12) 岩田宏満, 名古屋陽子線治療センターにおける臨床・基礎研究, 第 46 回放射線による制癌シンポジウム, 2017
- (13) 岩田宏満, 化学療法併用陽子線治療の生物学的検証, 日本医学放射線学会第 161 回中部地方会, 2017
- (14) 岩田宏満, ライブセルイメージング技術を用いた陽子線治療による細胞内現象と化学陽子線治療の生物学的検討, 第 19 回癌増感研究シンポジウム, 2017
- (15) 岩田宏満, 陽子線治療の最前線-臨床と基礎の融合, 第 19 回癌増感研究シンポジウム, 2017
- (16) Iwata Hiromitsu, Proton Therapy for Non-squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck: Planning Comparison among Spot Scanning Method with or without a Patient-specific Aperture System, Passive Scattering Method, and X-ray IMRT, the 58st American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, 2016
- (17) Iwata Hiromitsu, Tumor Regression Curve during and after Concurrent Chemotherapy and Proton Therapy for Unresectable Stage III Non-small Cell Lung Cancer: Comparison with Chemo-X-radiation Therapy, the 58st American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, 2016
- (18) 岩田宏満, 陽子線 Spot scanning 照射の DNA 損傷に対する直接効果と Distal end の生物効果の検討, 第 18 回癌増感研究シンポジウム, 2016
- (19) Iwata Hiromitsu, Relative biological effectiveness of spot scanning proton therapy: comparison with passive scattering proton beam and X-ray irradiation, 15th International Congress of Radiation Research, 2015
- (20) Iwata Hiromitsu, Oxygen enhancement ratios of proton and photon beams: comparison under identical biological conditions using clinically used machines, 15th International Congress of Radiation Research, 2015
- (21) Iwata Hiromitsu, Relative biological effectiveness of spot scanning proton therapy at the Nagoya Proton Therapy Center: comparison with passive scattering proton therapy and X-ray irradiation: in vitro study, 54th Annual Conference of the Particle Therapy Co-Operative Group, 2015
- (22) 岩田宏満, 切除不能臨床病期 III 期非小細胞肺癌に対する同時併用化学陽子線治療後の腫瘍退縮曲線, 第 17 回癌増感研究シンポジウム, 2015
- (23) 岩田宏満, Spot scanning 照射法による陽子線治療 -生物学的基礎検討・初期臨床経験-, 日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会, 2014
- (24) 岩田宏満, 陽子線の酸素効果比: 同一の生物条件下での実臨床照射装置による検討, 日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会, 2014
- (25) 岩田宏満, 陽子線治療における基礎生物-RBE・OER に関して-, 日本放射線影響学会 第 57 回大会, 2014
- (26) Iwata Hiromitsu, Oxygen enhancement ratios of proton and photon beams: the precise report of the same institution ' s experiments using the clinical equipments, the 56st American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Annual Meeting, 2014

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：芝本 雄太

ローマ字氏名：SHIBAMOTO yuta

研究協力者氏名：中畷 晃一朗

ローマ字氏名：NAKAJIMA koichiro

研究協力者氏名：橋本 眞吾

ローマ字氏名：HASHIMOTO shingo

研究協力者氏名：杉江 愛生

ローマ字氏名：SUGIE chikao

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。