

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09993

研究課題名(和文) ホウ素中性子捕捉療法におけるアブスコパル効果についての基礎研究と臨床応用

研究課題名(英文) Study on the abscopal effect in Boron Neutron Capture Therapy

研究代表者

木梨 友子 (Kinashi, Yuko)

京都大学・複合原子力科学研究所・准教授

研究者番号：80252534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：個体の放射性感受性の差が中性子照射時のアブスコパル効果に影響するかどうかを調べた。放射性高感受性であるSCIDマウスの中性子感受性は、口腔粘膜障害死において放射線感受性の指標であるRBE値はSCIDマウスでは1.61、比較対象の近交系C3Hマウスは2.08であった。一方、照射部位ではない脾細胞のアポトーシス比較によるRBE値はSCIDマウスでは1.67、C3Hマウスは2.12で、口腔粘膜障害と非照射部位の脾細胞のRBE値はいずれもSCIDマウスがC3Hマウスより低かった。この結果から中性子照射では非照射部位のアブスコパル効果は放射線感受性の差が縮小されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの放射線治療では放射線治療後に白血球のうちリンパ球数が低下するとともに免疫能が低下する。中性子照射によるホウ素中性子捕捉療法では腫瘍選択性が高く正常組織に対する副作用は低く抑えられるが、中性子照射後の免疫反応については知見が少ない。中性子照射後の免疫組織である脾細胞の応答についての研究成果はBNCTプラス免疫療法のための適正なプロトコルの提案が可能となる。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether the radiation-sensitivity of the individual influence the abscopal effect following the neutron radiation, the value of Oral Radiation Death after head-neutron-irradiation and the index of apoptosis of non-irradiated splenic cells were studied about high-radiation sensitive mice, so-called SCID mice. The RBE (relative biological effectiveness) values that show the radiation sensitivity of SCID mice were slightly lower than inbred C3H mice. These results indicate that the abscopal effect of radio-sensitive mice will not appear high following neutron irradiation.

研究分野：放射線科学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 中性子 アブスコパル効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がんの放射線治療においてがん部位の放射線照射時に照射部位ではない部位に起きる効果がアブスコパル効果とされ、1969年に悪性リンパ種に対する放射線治療時に照射部位でない転移巣のリンパ節に腫瘍の縮小効果が認められたのが最初の報告である（文献①）。最近の研究でアブスコパル効果は放射線照射により特異的な腫瘍免疫応答が惹起されて起きる効果であることが分かってきた。本課題研究では、ホウ素中性子捕捉療法（以下 BNCT：Boron Neutron Capture Therapy）において、中性子のがん部位の局所照射により特異的な腫瘍免疫応答が惹起されて起きるアブスコパル効果がとらえられるかどうかを検証し、さらに、この効果を有効に利用することで BNCT プラス免疫療法のプロトコルを提案するための基礎研究を実施した。

2. 研究の目的

BNCT での中性子の非照射部位への影響を調べるために以下の項目について研究を実施した。

- （1）中性子部分照射時の放射性感受性と脾細胞の応答についての研究
- （2）放射線照射回数の分割による脳腫瘍細胞への DNA 損傷および免疫応答への影響
- （3）脳腫瘍の遺伝子型の違いによる BNCT の効果解析

3. 研究の方法

- （1）中性子部分照射時の放射性感受性と脾細胞の応答についての研究

放射線高感受性マウスとして DNA 二重鎖切断(DNA-DSB)の修復障害により放射線高感受性である SCID マウスを用い、近交系マウス C3H の反応と比較した。照射部の感受性の指標は、マウス頭部をガンマ線で照射したときに認められる口腔粘膜死(Oral Radiation Death: ORD)による半致死線量の LD50 (50% Lethal Dose) を用いた。非照射部のアブスコパル効果の指標としては、ガンマ線照射後に非照射部位である脾臓を取り出し脾細胞のアポトーシス誘導を Cell Death Detection ELISA (ロッシュ) を用いて酵素免疫法により定量的に測定した。また、脾細胞由来リンパ球の細胞核内 DNA 二重鎖損傷部位に集積する 53BP1 フォーカス数を調べた。

- （2）放射線照射回数の分割による脳腫瘍細胞への DNA 損傷および免疫応答への影響

ヒト神経膠芽腫細胞の p53 変異型である T98G 細胞を用いて実験を行った。対数増殖期の細胞を準備し、照射 1 時間前にホウ素化合物 BPA(10B-borono-phenylalanine) を細胞培養液に添加し、中性子(1MW)を分割照射した。照射後は細胞の生存率、53BP1 フォーカス免疫蛍光染色による DNA 損傷および細胞培養液中のサイトカイン(IL1,IL6) 測定を行い、中性子照射後の生物効果をガンマ線分割照射の結果と比較しその特徴を検討した。

- （3）脳腫瘍の遺伝子型の違いによる BNCT の効果解析

神経膠芽腫細胞を用いて DNA アルキル化剤 Temozolomide (TMZ) による化学療法と放射線治療併用効果と免疫応答の変化についての研究を実施した。がん抑制遺伝子 p53 変異型のヒト神経膠芽腫細胞 T98G および p53 野生型のヒト神経膠芽腫細胞 A172 を用いてコロニーアッセイによる殺細胞効果と 53BP1 フォーカスアッセイによる DNA 損傷について TMZ と中性子照射併用時の感受性の違いを調べた。

4. 研究成果

- （1）中性子部分照射時の放射性感受性と脾細胞の応答についての研究

DNA 損傷修復酵素の機能異常のため DNA 二重鎖切断の修復ができない SCID マウスのガンマ線の感受性は C3H マウスより約 2 倍感受性が高いとされている（全身照射時の LD50 比較）。

マウスの頭部照射による口腔粘膜障害死を指標として中性子照射とガンマ線照射を比較することで RBE 値(Relative Biological Effectiveness:生物学的効果比)を求めた。口腔粘膜障害死の RBE 値は SCID マウスでは 1.61、比較対象の近交系マウス C3H は 2.08 であった。さらに中性子照射後に経時的に脾臓を取り出し脾細胞のアポトーシスの変化を経時的に調べた結果では、脾細胞のアポトーシス誘導では SCID マウスは C3H マウスより約 3 倍感受性が高かった。さらに、脾細胞由来リンパ球の細胞核内 DNA 損傷部位に集積する 53BP1 フォーカス数は SCID マウスと C3H マウスに優位の差は認められなかったが、SCID マウスでは DNA 二重鎖損傷の回復が遅延することが確認された。脾細胞のアポトーシスが最も高く表れた時点での比較による RBE 値は SCID マウスでは 1.67、C3H マウスは 2.12 で照射部の障害である口腔粘膜障害と非照射部位の脾細胞の RBE 値はいずれも SCID マウスが C3H マウスより低かった。これらの結果から中性子照射では照射部位の正常組織およびアブスコパル効果としての非照射部位の影響は、X 線やガンマ線に比べて放射線感受性についての個体差が表れにくいのではないかと推測できた。

(2) 放射線照射回数の分割による脳腫瘍細胞への DNA 損傷および免疫応答への影響

放射線治療では正常細胞の副作用回避のために分割照射が実施されている。一方、分割照射時にはがん細胞では放射線による DNA 損傷の回復が起こるため、一回照射に比べてがんに対する放射線の効果は減弱する。ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) の分割照射効果についての研究の結果、中性子分割照射後に T98G 細胞では回復が確認されたが、中性子分割照射の回復程度はガンマ線照射にくらべ 3 分の 1 前後で、回復程度は小さいことが確認された。照射後の DNA 損傷を示す 53BP1 フォーカス数の結果では、中性子の単回照射と分割照射でフォーカス数平均値に大きな変化が見られなかった。分割照射ではフォーカス数のばらつきが大きかった。これは分割照射によって修復が促された細胞と修復が遅延した細胞の混在によると思われる。また、照射後 72 時間後のサイトカインについては有意な上昇は見られなかった。一般の放射線分割照射では免疫反応が惹起されるとの報告がされている。今回の実験では中性子照射線量が少なかつたため免疫反応上昇の有意な結果が得られなかった。今後は一回線量を多くして BNCT 中性子照射による免疫反応賦活化効果の検証を進めていきたい。

(3) 脳腫瘍の遺伝子型の違いによる BNCT の効果解析

神経膠芽腫細胞を用いて DNA アルキル化剤 Temozolomide(TMZ) による化学療法と放射線治療併用効果と免疫応答の変化についての研究を実施した。p53 変異を示す神経膠芽腫は放射線に抵抗性となる。ガンマ線照射時の D_{10} 値 (生存率 10%となる線量) は T98G 細胞では 7.0Gy で A172 細胞では 4.8Gy であった。一方、中性子照射時 (ホウ素 10 濃度が $20 \mu\text{g/ml}$) の D_{10} 値は T98G が 1.1Gy で A172 細胞 0.8Gy であり、ガンマ線照射時に比べて中性子照射時では放射線感受性の差が少なく BNCT がエックス線抵抗性の脳腫瘍に対してより効果が期待できることが確認された。中性子照射後の 53BP1 フォーカス数は両細胞ともにガンマ線照射後より多かつたが、T98G 細胞と A172 細胞間に有意差はなかった。TMZ 感受性については、DNA 損傷修復酵素 O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) をコードする MGMT 遺伝子のプロモーター領域がメチル化されていると TMZ に高感受性であるが、メチル化されていないと TMZ 耐性となる。MGMT 遺伝子非メチル化を示す T98G 細胞は MGMT 遺伝子メチル化である A172 細胞と比較して IC50 値 (50% Inhibitory Concentration:50% 阻害濃度) 比較で約 10 倍以上抵抗性であった。中性子照射と TMZ の併用では T98G および A172 細胞ともに併用後の生存率では相乗効果は認められなかった。T98G 細胞ではホウ素 10 が存在する BNCR 反応において中性子照射と TMZ の併用により生存率が上昇しさらに抵抗性となった。神経膠芽腫の標準治療では放射線治療と TMZ の併用治療効果は腫瘍細胞の遺伝子発現型により治療効果が異なるが、BNCT に

においても腫瘍細胞の遺伝子発現型により中性子照射と TMZ 併用時の治療効果が異なることが示唆された。放射線治療と DNA 損傷系の抗ガン剤併用後に起きる DNA 損傷のシグナルがガン細胞の PD-L1 発現を誘発して免疫反応が制御されていることが、近年、他研究者から発表されている。T98G および A172 細胞を用いて中性子照射と TMZ の併用後に PD-L1 を経時的に測定した有意な免疫応答の変化はとらえられなかった。

(4) 研究成果のまとめ

マウスの中性子照射実験では照射部位の正常組織およびアブスコパル効果としての非照射部位の影響は、X線やガンマ線に比べて放射線感受性についての個体差が少なくなることが分かった。この結果から、中性子照射による免疫応答への影響はエックス線照射後に比べて放射線感受性によらないことが示唆される。また、放射線照射回数分割による脳腫瘍細胞への DNA 損傷の研究では、中性子分割照射では脳腫瘍細胞の回復はガンマ線照射に比べて3分の1前後で回復程度は小さく、分割照射による抗腫瘍効果が低くならないことが確認され、免疫応答を含めた正常組織の回復のためには分割照射が有効であることが分かった。さらに、脳腫瘍の遺伝子型の違いによる BNCT の効果解析では、腫瘍細胞の遺伝子発現型により中性子照射と TMZ 併用時の治療効果が異なるため、免疫応答を含めた正常組織の回復過程においても腫瘍細胞の遺伝子発現型の影響を考慮する必要があると思われる。

<引用文献>

① Nobler, M P, The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation, Radiology, Volume:93, Issue:2, 1969, 410-412

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Yuko Kinashi, Natsuya Yokomizo, Sentaro Takahashi, DNA Double-strand Breaks Induced By Fractionated Neutron Beam Irradiation for Boron Neutron Capture Therapy, Anticancer Research 2017, vol. 37, no. 4, 1681-1685.
- ② E. Kitajima, S. Takahashi, Y. Kinashi, Y. Kubota, R. Okayasu, H. Tanaka, M. Takada, K. Ono, A comparative study of the biological effects of neutron beams with different energy profiles, RADIOISOTOPES 2015, 64, 291-297.
- ③ K. Seki, Y. Kinashi*, S. Takahashi: * Corresponding author
The influence of p53 status in glioblastoma on the effects of boron neutron capture therapy, Anticancer Research 2015, 35, 169-174.

[学会発表] (計 6件)

- ① Yuko Kinashi, Tomoyuki Ikawa, Sentaro Takahashi, The combination effect of neutron irradiation and exposure to DNA-alkylating agent on glioblastoma cell lines with different MGMT and p53 status, 18th International Congress on Neutron Capture Therapy (国際学会) 2018年 TAIPEI, TAIWAN
- ② 木梨 友子、小野 公二、エックス線感受性の異なるマウスにおける中性子感受性の差、日本放射線影響学会 第61回大会、2018年 長崎
- ③ Rui Akayama, Yuko Kinashi, et. al, Cell Survival and DNA-double strand breaks in Glioblastoma Cell Lines with Different p53 Status after Neutron Irradiation and Exposure to DNA-alkylating Agent, 9th Young Researchers' BNCT Meeting (国際学会)

2017年 Kyoto, JAPAN

- ④ 木梨 友子、赤山 類、井川 智之、高橋 千太郎、p53 遺伝子の発現が異なる神経膠芽腫細胞における中性子照射感受性および DNA アルキル化剤感受性、日本放射線影響学会 第 60 回大会、2017 年 千葉
- ⑤ Yuko Kinashi, Natsuya Yokomizo, Sentaro Takahashi, The DNA double-strand breaks damage in CHO cells induced by the fractionated neutron irradiation, 17th International Congress on Neutron Capture Therapy (国際学会) 2016 年 Colombia, Missouri, USA
- ⑥ 木梨 友子、井川 智之、高橋 千太郎、p53BP1 を指標とした中性子の DNA 二重鎖切断損傷・修復の特徴、日本放射線影響学会 第 59 回大会、2016 年 広島

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：木梨 友子

ローマ字氏名：(KINASHI, yuko)

所属研究機関名：京都大学

部局名：複合原子力科学研究所

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80252534

※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。