

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15466

研究課題名(和文) 粒子線を用いた低侵襲臓器機能再生法確立に向けた萌芽研究

研究課題名(英文) Exploratory Research for a non-invasive functional organ regeneration

研究代表者

下川 卓志(Shimokawa, Takashi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・主任研究員(定常)

研究者番号：20608137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん治療装置として利用されている粒子線照射装置を機能不全起こした臓器などの積極的な破壊に利用し、低侵襲臓器機能再生技術の確立を目指して、その基盤となる生物応答を検討することを目的としている。本実験では、コラーゲンスポンジを用いたin vitro 3D培養系、プラナリアとマウスモデルを用いたin vivo実験系を利用して解析を行った。その結果、粒子線の一種である炭素イオン線が組織再生の場として標的部位を特に正常組織において破壊できることを示した。さらにはがん細胞と正常細胞とで照射による損傷部位への移動効果に差があるなど、将来の再生医療への粒子線利用に向けて重要な基礎データを得た。

研究成果の概要(英文)：This study aims evaluation of biological reactions to establishing a non-invasive organ regeneration technology by using a particle beam irradiation, which has already been used as a cancer treatment device. I conducted the analysis using the following three experimental systems i) in vitro 3D culture system using collagen sponge, ii) in vivo experiment system using planaria and iii) in vivo experiment system using mouse models. The results of the project showed that carbon ion beam, a type of particle beam, can destroy the target site particularly in normal tissues. Furthermore, it is possible to obtain important basic data for the future use of particle beams for regenerative medicine, such as the difference in the attracting effect to the injured site by irradiation between cancer cells and normal cells.

研究分野：粒子線治療生物学

キーワード：粒子線 再生

1. 研究開始当初の背景

再生医療の技術・臨床応用は近年急激に進み、すでに iPS 細胞が実臨床に用いられている。培養技術の発展と相まって、in vitro の臓器再生などの研究も進められている。この技術進歩は、近い将来に体内の希望する場所で移植した細胞を望む方向へ分化させる技術への発展が期待できる。一方で、その体内での再生のための足場構築や機能してない臓器の一部や細胞を外科的ではなく低侵襲な技術で除去する方法については未だ不十分である。

申請者は放射線、特に炭素イオン線(C-ion)療法における正常組織障害に関する研究を行い、放射線障害部位における損傷周辺に存在する幹細胞の挙動と線維化/発がんリスクについて解析を進めている。皮膚などにおいては外科的損傷が幹細胞の損傷部位への誘導や移植細胞の定着に影響することがすでに知られている。さらに、申請者はこれまで発がんや発生・分化に関与する Wnt/Hedgehog シグナル系の解析を行ってきたが、外科的“傷”による幹細胞の誘導・分化にも Wnt/Hedgehog シグナル系が重要であることが明らかになってきた。

申請者は治療時の放射線障害に対し、幹細胞移植を用いた障害予防・軽減が有効であると考え解析を進めている。さらに、その考えを一步進め、ピンポイント照射が可能な粒子線の特徴を利用して、意図的に不要な組織を破壊することにより再生を促す、または移植細胞の定着を促せるのではないかと考えている。この技術は低侵襲性臓器機能再生を目指す上で必要な技術となりうる。そこで本研究課題では、そのための基盤技術開発を目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、がん治療装置として利用されている粒子線照射装置を機能不全起こした臓器などの積極的な破壊に利用し、低侵襲臓器機能再生技術の確立を目指して、その基盤となる生物応答を検討することを目的としている。本研究の最終目標である低侵襲臓器機能再生技術の確立は、iPS 細胞などを用いた再生医療の利用の幅を広げる技術の一つとして発展が可能であり、高齢化社会において再生医療という科学の発展への貢献が期待される。

さらに本研究により、Fig.1 で示すような

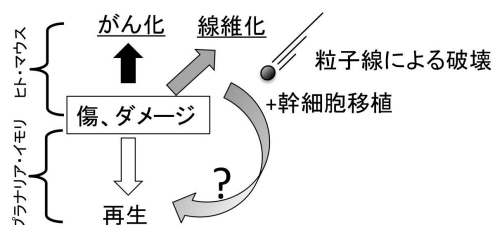


Fig.1: 本申請課題の研究背景とゴール

“何故ヒトやマウスは傷を負うと再生せずに線維化などを起こすのか？”といった生物の種の違いの理解に関する知見や“放射線による細胞傷害(傷)は外科的な傷とは何が違うのか？”という環境に対する生命現象への理解への新しい知見をえることができると考えられる

3. 研究の方法

本研究課題では、コラーゲンスポンジなどを用いた in vitro で培養細胞を用いた実験と、プラナリアやマウス(C3H/He, C57Bl/6J, BALB/c)を用いた in vivo での実験を行った。

細胞は、正常細胞として NIH3T3 および MEF 細胞を、がん細胞としてマウス由来の癌細胞株(NR-S1, Colon26, LM8, LLC)を用いた。放射線として X 線(パンタック HF-320S 型、200keV, 20mA, 0.5mm Cu + 0.5mm Al フィルター),炭素イオン線(放医研 HIMAC、290MeV, mono-energetic beam, LET 13-90keV/um)を用いた。3次元培養細胞またはマウス、プラナリアの局所に照射を行い、その後の応答反応について検討を行った。

なおマウス実験は、放医研動物実験委員会の承認を得て、研究所の定めるガイドラインに従い行った。さらに遺伝子組換え実験は遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て、行った。

4. 研究成果

invitro 実験として、コラーゲンスポンジおよびコラーゲンシートを用いた実験では、炭素イオン線照射により部分的に細胞死を誘導することができた。照射後の観察をより効果的に行い、またゲル内の酸素濃度などの環境をより生体に近づけたりできるように、新しい3次元培養測定系の構築をイタリアの研究グループと協力してすすめた。報告時においてがん細胞を用いた3次元での培養と同一細胞の経時的な観察と細胞死の評価に

成功した。今後、改良を行うとともにこの実験系を用いて、in vitro での評価を引き続き行う予定である。

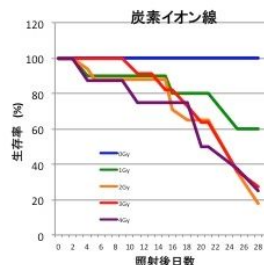
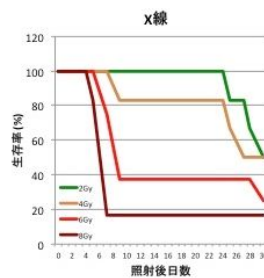


図 プラナリアの線質による感受性比較

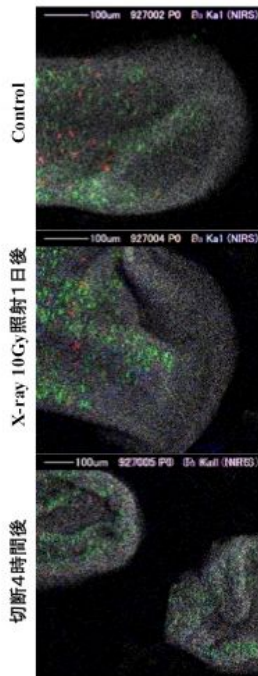


図 プラナリア元素分布変化

赤: Zn
 緑: Ca
 青: Fe
 灰: P

再生モデル生物であるプラナリアを用いた研究では、線質による放射線感受性の違いについて検討をまず行った。炭素イオン線とX線では細胞死誘導を指標とした生物効果が2~3倍高いことがこれまでの多

くの研究により明らかになっている。そのためX線と炭素イオン線とで致死線量が異なることは予想されていたが、個体の致死に至る時間経過も大きく異なることが示された。これは線質による生物効果が大きく異なることを示す結果である。さらに組織修復時のプラナリア個体内での変化を明らかにするために各種解析を行った。図に示すように粒子線励起X線(PIXE)分析による生体内元素分布解析では、コントロール個体に対し放射線照射個体や切断個体ではいくつかの元素分布の違いが示唆された。現在、さらなる解析と定量化を勧めている。

マウスを用いた *in vivo* での研究として、観察期間の長い正常組織と増殖の早い腫瘍を用いた。腫瘍を標的とした実験では、マウス下肢にがん細胞を移植し、1週間後に増殖した腫瘍の半分に炭素イオン線を照射

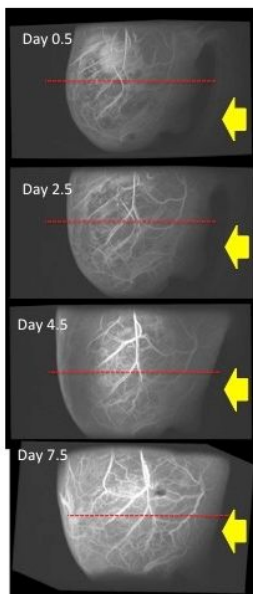


図 腫瘍部分照射後のMRIによる経時観察

した。この時の照射には、厚みのあるサンプルに物理的に比較的均質な照射が可能な単一エネルギービームのプラトー領域を用いた。照射後、経時的に腫瘍径とMRIによる腫瘍内の経時的な質的变化の測定を行

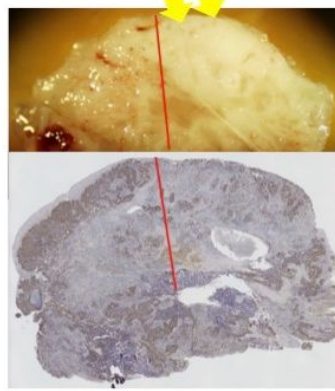


図 腫瘍部分照射後の病理像

った。その結果、照射野内における腫瘍血管の伸長が観察された。さらにこの時の病理像を解析したところ、後で述べる正常組織とは大きく異なり、照射領域の明確な境は認められず、更に照射野内の血管周辺での盛んな細胞増殖が認められた。このことは正常組織と腫瘍での損傷に対する応答が大きく異なることを示唆する結果である。

正常組織(皮膚、肺、骨髄など)を標的とした実験では、下肢または、胸部片側だけを腫瘍照射と同じ炭素イオン線照射し、その後の観察、測定を行った。図に示すように正常組織に対する照射では、生物影響の境界のはっきりとした結果となった。境界近傍と遠隔とで非照射領域の形状に大き

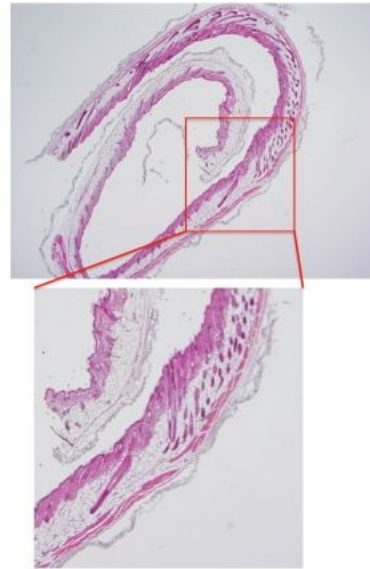


図 皮膚部分照射後の病理像

な差が認められなかったことから、炭素イオン線が非常に限局したダメージ付与を行うことが可能であることが示された。一方で、長期観

察においても、この照射領域の症状の改善は認められなかったことから、周囲の幹細胞の移動誘導は起こらなかったと想定される。一方で、同じく胸部片側だけ照射したマウスでは、照射野内の肺へのがん細胞の転移が多く認められた。このモデルへの骨髄細胞の移植では DsRed 発現遺伝子組換えマウス由来の細胞を用いた。ただし遺伝的背景の切り替え途中(5世代目)のため C3H/He と BALB/c は現時点では行えなかったため、C57BL/6J でのみ行った。この実験は長期に渡るため、報告時には観察途中であり今後引き続き観察並びに移植細胞

の局在評価を行う予定である。加えて、照射だけでは正常幹細胞などの誘引に不十分である可能性が実験結果より予想されたため、照射部位への追加ダメージによる影響についても同じマウスモデルを用いて観察をすすめている。

本課題は、粒子線の一種である炭素イオン線が組織再生の場として標的部位を特に正常組織において破壊できることを示した。さらにはがん細胞と正常細胞とで照射による損傷部位への移動効果に差があるなど、将来の再生医療への粒子線利用に向けて重要な基礎データを得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 7 件)

1. 下川 卓志, 坂本 慶充, 東 梨佳子, 中西郁夫, 松本謙一郎. Elucidating the Mechanisms Behind Late Lung Injury after Heavy Ion Beam Irradiation. H28 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会, 2017.4.17-18, ホテルポートプラザちば(千葉県千葉市)
2. 下川 卓志, Kasper Maria, Impact of Heavy Ion Irradiation on Stem Cells and Tissue Regeneration. International Open Laboratory Symposium, 2017.2.28, 放医研(千葉県千葉市)
3. 下川 卓志, 笠井 清美, 小久保年章, 福村 明史, 濱野 毅, 村上健, 重粒子線がん治療装置(HIMAC)による高エネルギー重イオンビームを用いた基礎科学全般の共同研究の推進. 千葉エリア産学官連携オープンフォーラム 2016, 2016.11.25. 千葉大学(千葉県千葉市)
4. Shimokawa T. Are Heavy Ions more Immunogenic than Photons? International Symposium on Ion Therapy 2016, 2016.11.3-4. Milano (Italy)
5. 東 梨佳子, 坂本 慶充, 松本 謙一郎, 藤崎 真吾, 下川 卓志.放射線誘発肺晩発障害の分子機構の解明.日本酸化ストレス学会 フリーラジカルサマースクール 2016, 2016.08.09. 筑波大学館山研修所(千葉県館山市)
6. Shimokawa T. Biological Research at HIMAC, NIRS: Biological Advantages of Carbon-ion Irradiation for Cancer Therapy, the Technical Meeting on the Radiobiology of Charged Particle Therapy, Vienna, (Austria)
7. 大塚 裕美, 馬 立秋, 坂本 慶充,

森竹 浩之, 佐藤 克俊, 東 梨佳子, 下川 卓志. IN Cell Analyzer 2000 を用いた Tissue Micro Array 解析, GE Life Sciences Day 2015, 2015-07-24, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

下川 卓志 (SHIMOKAWA Takashi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・放射線障害治療研究部・主任研究員

研究者番号: 20608137