

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10366

研究課題名(和文) 塩化ラジウム-223治療におけるリンパ球DNA損傷に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of radiotoxicity after Ra-223 therapy using gamma-H2AX foci formation in lymphocytes.

研究代表者

渡邊 直人 (WATANABE, Naoto)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40210926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：塩化ラジウム-223を用いた治療に、リンパ球にどの程度の放射性組織障害が出現するのか、DNA損傷部位に集積する $\gamma$ -H2AXを用いて検討した。対象は患者4名で、計12回のゾーフィゴ治療を施行した。治療前、治療24時間後に採血し、リンパ球を分離し、 $\gamma$ -H2AXを用いて免疫染色を行なった。治療前後のリンパ球に発生するDNA損傷数の測定を行った。結果：投与前後でのリンパ球数50個を対象にした $\gamma$ -H2AXの輝点の1細胞当たりの平均値は、治療前 $0.47 \pm 1.09$  治療後 $0.72 \pm 1.34$ であった。治療によりDNA損傷の有意な増加を示した。治療によりリンパ球のDNA損傷として軽度の放射線障害が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実際には塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療では、様々な副作用が生じているが、重大な副作用としてリンパ球減少等の骨髄抑制があることは確認されている。その副作用を早期で評価できれば、副作用緩和にとって有用と考えられる。治療24時間後のリンパ球を $\gamma$ -H2AXを用いて免疫染色を行なって、リンパ球のDNA損傷を評価できるので、早期にある程度の骨髄のDNA損傷の一端を評価できると推測される。リンパ球のDNA損傷の障害程度によって、臨床上早期に副作用に対応できる有用性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Our study was to evaluate the degree of radiotoxicity to lymphocytes after radium-223 therapy using  $\gamma$ -H2AX foci immunodetection. We studied 4 patients who were treated with Ra-223 totally 12 times. Lymphocytes were isolated from the blood samples and subjected to  $\gamma$ -H2AX immunofluorescence staining. A total of 50 lymphocytes were visually evaluated. The number of foci per lymphocyte nucleus was  $0.47 \pm 1.09$  before and  $0.72 \pm 1.34$  after therapy, and this difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ).  $\gamma$ -H2AX foci immunodetection in lymphocytes may detect radiation-induced DNA damage associated with Ra-223 therapy.

研究分野：核医学

キーワード：塩化ラジウム-223 DNA損傷 リンパ球 放射線障害

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の多発性骨転移に対する治療として塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療<sup>1)</sup>が欧米では以前より治療として認可されており、本邦でも近年認可された。しかしながら、実際には塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療では、軽度ながら様々な副作用が報告されている。特にリンパ球に関しては、血中数の一過性の減少を認めた報告がある。ところが、塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療に伴う、生体内のリンパ球自体への影響である放射性組織障害に関して、DNA 損傷を直接評価する検討は現在まで見られない。我々は既に、DNA 損傷を直接評価する検討として放射性ヨードを用いた放射線内部照射治療に伴うリンパ球自体の放射性組織障害に-H2AXを用いて検討し報告している<sup>2)</sup>。そこで今回、塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療について、血液の中で最も放射線感受性が高いと考えられているリンパ球に対して、どの程度の放射性組織障害が出現するのか、DNA 損傷部位に集積することが知られている-H2AXを用いて基礎的に検討しようと考えた。

## 2. 研究の目的

-H2AX に対する抗体で細胞の免疫染色を行うと、DNA 損傷部位が核内の点として染色され、光学顕微鏡で DNA 損傷の個数を数えることができる<sup>3)</sup>。この方法を用いて、治療前後の末梢血リンパ球に発生する DNA 損傷数を定量する事が可能である。前立腺癌の多発性骨転移に対する治療として塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療について、血液の中で最も放射線感受性が高いと考えられているリンパ球に対して、どの程度の放射性組織障害が出現するのか、DNA 損傷部位に集積することが知られている-H2AXを用いて検討することを試みた。

## 3. 研究の方法

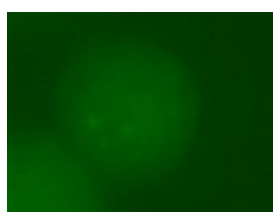
(1) 金沢医科大学倫理委員会で承認された塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療目的患者の4名(男性4名)で、塩化ラジウム-223の投与治療を受ける患者を対象とした。患者4名で合計12回の塩化ラジウム-223を用いた放射線内部照射治療を受けた。治療前、及び治療24時間後に患者より採血を行う。採血された血液中のリンパ球を、リンパ球分離溶液(LYMPHO SEPARATION MEDIUM; MP)を用いて遠心分離しリンパ球を得た。

(2) 特殊スライドガラス上(ImmunoSelect<sup>®</sup> ADHISION SLIDES squarix)に固定したリンパ球に、-H2AX に対する抗体(clone JBW301; Upstate) さらにそれに対する抗体(Polyclonal Rabbit Anti-mouse IgG-TRITC; DakoCytomation)及び4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI) with mounting medium (PermaFlour<sup>™</sup> Aqueous Mounting Medium Thermo)で細胞の免疫染色を行った(図1)。蛍光顕微鏡(Olympus BX50)にてリンパ球細胞核50個辺りのDNA 損傷部位が核内の点として染色されたDNA 損傷の個数を測定した(図2)。

図1：リンパ球の DAPI 核染色



図2：リンパ球の核内の  $\gamma$ -H2AX を用いた DNA 損傷焦点



(3) 同意の得られた正常者(6名)より採血して、リンパ球に対してリンパ球分離溶液を用いて遠心分離する。In vitro でX線外部照射する実験で、分離リンパ球にはそれぞれ 0Gy, 0.3Gy, 0.6Gy, 0.9Gy (3名)、0Gy, 1Gy, 2Gy, 3Gy (3名)をX線外部照射(VARIAN CLINAC iX, 10MeV)し、外部照射してできるDNA損傷数と照射量との関係から求めた標準線を作成した。

#### 4. 研究成果

(1) 対象患者4名にゾーフィゴ治療前後にDNA損傷を測定した。ゾーフィゴ投与前後でのリンパ球数50個を対象にした $\gamma$ -H2AXの輝点の1細胞当たりの平均値は、治療前 $0.47 \pm 1.09$  治療後 $0.72 \pm 1.34$ であった。ゾーフィゴ治療によりDNA損傷の有意な増加を示した。(Wilcoxon's signed rank test,  $P=0.001$ )

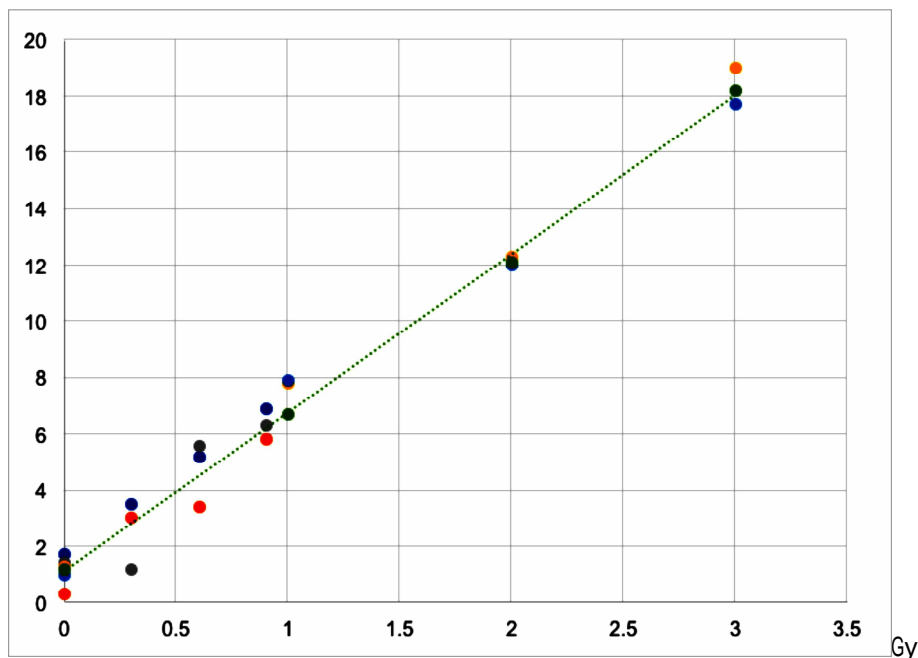
各患者の治療ごとの増加に関しては、患者3:3回目治療において、治療前 $0.02 \pm 0.14$  治療後 $0.56 \pm 1.16$ 、患者4:2回目治療において、治療前 $0.38 \pm 1.24$ 、治療後 $0.90 \pm 1.40$  3回目治療において治療前 $0.04 \pm 0.02$  治療後 $1.52 \pm 1.76$ の有意な増加を示した。

X線外部照射とリンパ球のDNA損傷の個数の関係は、照射によりDNA損傷数は直線的に増加しており、 $Y=5.7X+1.2$ ,  $R^2=0.99$ として求められた(図3)

(2) 放射線照射によるDNA損傷刺激に晒された細胞の核内では、損傷を受けたDNAが初期応答として、ヒストンH2AXをリン酸化して、リン酸化されたH2AX( $\gamma$ -H2AX)が損傷部位に集積する。DNA損傷であるDNA二重鎖切断をこの $\gamma$ -H2AXに対する抗体を用いて、損傷数を集積点数として評価することが可能である<sup>4)</sup>。 $\gamma$ -H2AXに対する抗体を用いた評価法は、低線量被曝にも有用な方法と考えられている。我々の外部照射による正常リンパ球の検討結果からも

有用性が示された。

図3：  $\gamma$ -H2AX を用いた DNA 損傷焦点数と照射量との関係  
Foci 数



(3)我々は、今回前立腺癌骨転移に対するゾーフィゴ治療 24 時間後で、患者におけるリンパ球の生物学的な放射線障害の程度について、 $\gamma$ -H2AX に対する抗体を用いて評価した。治療後のリンパ球には、有意な  $\gamma$ -H2AX の点の数の増加として検出された。軽度ではあるが有意な DNA 損傷が検出された。ゾーフィゴ治療によりリンパ球の DNA 損傷として軽度の放射線障害が認められた。ゾーフィゴ治療回数と DNA 損傷との明らかな相関関係は見出せなかった。

(4)DNA 損傷部位に集積することが知られている  $\gamma$ -H2AX 用いた評価法は、前立腺癌骨転移に対するゾーフィゴ治療 (Ra-223) において、放射線組織障害を評価可能で有用であると考えられた。ゾーフィゴ治療における副作用の早期評価法として、臨床上的有用性が示唆された。

#### <引用文献>

- 1) C Parker, S Nilsson, D Heinrich, S I Helle, et al. Alpha Emitter radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. N Engl J Med 2013;18;369:213-23.
- 2) Doai M, Watanabe N, Takahashi T, et al. Sensitive immunodetection of radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using  $\gamma$ -H2AX foci of DNA damage in lymphocytes. Ann Nucl Med.2013;27:233-238
- 3) Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem 1998;273:5858-68
- 4) Rogakou EP, Boon C, Redon C, et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. J Cell Biol 1999;146:905-15

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊直人、道合万里子、高橋知子、的場宗孝、岩淵邦芳、奥田光一
2. 発表標題 ゾーフィゴ治療におけるリンパ球の放射線障害に関する検討
3. 学会等名 第89回日本核医学会中部地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊直人、山瀬喬史、土屋紘一、沖村幸太郎、道合万里子、高橋知子、的場宗孝、中澤祐介、近沢逸平、宮澤克人、岩淵邦芳、奥田光一
2. 発表標題 ゾーフィゴ治療におけるリンパ球の放射線障害に関する検討（第二報）
3. 学会等名 第90回日本核医学会中部地方会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩淵 邦芳  (IWABUCHI Kuniyoshi)  (10232696)	金沢医科大学・医学部・教授    (33303)	
研究分担者	道合 万里子  (DOAI Mariko)  (40515673)	金沢医科大学・医学部・講師    (33303)	