

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15784

研究課題名(和文) 口腔がんの定位照射：細胞周期動態からみた有効性の解明と至適照射条件の確立

研究課題名(英文) Stereotactic body radiotherapy for oral cancer: Mechanism of efficient tumor cell killing from cell cycle kinetics

研究代表者

三浦 雅彦 (MIURA, Masahiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10272600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：体幹部定位照射(SBRT)は、非小細胞肺癌のみならず口腔癌にも適用されつつある優れた放射線治療法である。1回線量が大きく(~12 Gy)、わずか数回の照射で終了するというこれまでの治療法とは全く異なる特徴を持つ。そこで本研究では、Fucciとよばれる細胞周期を可視化する技術を導入し、細胞周期動態からそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。研究の結果、通常用いられる1回2 Gy照射で5回5日間に渡って照射した場合に比べ、1回10 Gy照射した時の方が、放射線科感受性の高いG2/M期に細胞はより多く同調することがわかり、2回目以降の照射で放射線増感を引き起こしている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Stereotactic body radiotherapy (SBRT) is recently established as an excellent modality for Stage I non-small lung cancer and is also applied for oral cancer. Its fractionation is very unique in that dose per fraction is large (~12 Gy) and fraction number is only several times. However, radiobiological analysis has rarely been performed thus far. The aim of this study was to study the mechanism underlying the excellent clinical results of SBRT from the viewpoint of cell cycle kinetics utilizing Fucci, a cell cycle visualizing system. It was revealed that irradiation of 10 Gy per fraction remarkably enhanced the ratio of cells synchronized at the G2/M checkpoint compared to that of 5 x 2 Gy per fraction. Considering that cells at G2/M boundary are radiosensitive, the observed cell cycle kinetics could be a reason of the outstanding clinical results by SBRT.

研究分野：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：定位照射 細胞周期動態 口腔がん

## 1. 研究開始当初の背景

I 期非小細胞肺癌に対する 1 回大線量、寡分割照射法(1 回 12 Gy、総線量 48 Gy/4 回; 通常は 1 回 2 Gy、総線量 60 Gy/30 回)は、日本で開発され、現在では、外科療法に匹敵する治療法として、世界的に普及しつつある (Onishi et al., *Cancer*, 2004; Onishi et al., *Jpn J Clin Oncol*, 2013)。この照射法は、定位照射とよばれるが、一般にピンポイント照射ともよばれ、口腔がんの頸部転移リンパ節にも、近年、適応が拡大されている。しかしながら、革新的な成果が臨床で得られている一方で、なぜ有効か、という生物学的根拠が全く得られていない。これまで分割照射では、照射後、DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断 (DSB) が起こると、G2 チェックポイントが活性化し、G2 と M 期の境界(G2/M 期)に細胞が集積する現象が起こり、この時期の細胞は、放射線感受性であることから、次の照射に有利に働くと考えられてきた。こうした現象に、1 回 10Gy 以上の大線量を照射した場合、どのような影響を与えるのかを、通常の 1 回 2 Gy 照射の場合と比較することで、細胞周期動態の観点から、その答えの手がかりが得られるものと考えられる。ところが、固形腫瘍内でのこうした情報を、直接得る方法論がこれまで存在しなかった。

Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) とよばれる細胞周期を可視化する手法 (Sakaue-Sawano et al., *Cell*, 2008) を、いち早く放射線生物学の分野に導入して、以下の知見を報告してきた。

(1) p53 が機能しない腫瘍細胞では、放射線によって G2 アレストが生じるが、Fucci の蛍光動態は、それを完全に反映し、細胞が生きたままの状態でも G2 アレスト動態を調べられるようになった (Kaida et al., *Cell Biol Int*, 2011; Kaida and Miura, *Exp Cell Res*, 2013; Tsuchida et al., *PLoS One*, 2015)。

(2) スフェロイドや固形腫瘍内では、放射線による G2 アレストが著明に遷延することを初めて示した (Kaida and Miura, *Biochem Biophys Res Commun*, 2013; *Cancer Sci*, 2015)。

(3) 固形腫瘍内で、照射後の G2 アレスト動態をリアルタイムに検出する方法論を樹立した (Kaida and Miura, *Cancer Sci*, 2015)。この方法論を用いれば、定位照射の有効性の根拠が初めて得られるのではないかと考えた。こうした研究手法は、我々のオリジナルであり、国内外で同様な研究はこれまでなされていなかった。

## 2. 研究の目的

1 回大線量、寡分割照射を特徴とする定位照射は、肺癌治療に革新的な影響を与えた。近年、口腔がんにも適応が拡大されて

いるが、その有効性についてはまだ明らかではない。治療期間も著しく短縮され、患者の負担は従来の放射線治療に比べ、大きく軽減している。しかしながら、臨床が先行し、有効性に関する生物学的な根拠については、ほとんど得られていないのが現状である。本研究では、我々が研究を進めてきた細胞周期を可視化するシステムを導入し、1 回大線量照射による細胞周期動態の変化が、次の照射に与える影響を解析することにより、その有効性を生物学的に解明し、口腔がんへの適用における至適条件を検討する基盤を与えようとするものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株

ヒト口腔がん細胞株である SAS、HSC3、HSC4 細胞に、レンチウイルスの系を用いて Fucci プロンプをトランスフェクションし、ソーティングによって緑色と赤色を発現する細胞を選択した。それぞれが、細胞周期を進行することで蛍光が変わり、照射によって G2 アレストが起きて緑色になることから、Fucci システムが正常に機能していることが確認できた。こうして樹立された細胞株に対し SAS-Fucci、HSC3-Fucci、HSC4-Fucci と名付けた。既に用いていた HeLa-Fucci 細胞も実験に用いた。

### (2) スフェロイドの作製

Hydrocell 96 ウェルプレート (CellSeed) に SAS-Fucci 細胞を播種し、直径約 700  $\mu$  になった時点で実験を行った。

### (3) 固形腫瘍モデル

6 週齢 KSN ノードマウスの後ろ脚、皮下に腫瘍細胞を移植し、直径約 1cm になった時点で実験に用いた。

### (4) X 線照射

X 線照射は、HS-225 (島津製作所) (0.9Gy/min, 225 kVp, 15 mA, 1.0 mmCu フィルター付加) または RX-650 (Faxitron) (0.75 Gy/min, 130 kVp, 5 mA, 0.5 mm Al フィルター付加) を用いて行った。

## 4. 研究成果

(1) HSC3-Fucci、HSC4-Fucci 細胞における 10 Gy 照射後の DNA 損傷応答 (DDR) の特徴

新たに作製した HSC3-Fucci、HSC4-Fucci 細胞の定位照射で用いられる 1 回 10Gy 照射後の DDR を解析した。その結果、HSC3-Fucci 細胞は、HSC4-Fucci 細胞より放射線感受性を示し、G1 期では非相同末端結合がやや抑制されているが、S/G2 期においては強く抑制されているという興味深い特性が判明し、その結果、著しく長い G2 アレストを示すことがわかった。こうした細胞は、G2/M 期の放射線感受性が

高いことを考えると、定位照射における2回目以降の照射に対し、より感受性が高くなることが示唆された。また、G2 アレスト阻害剤を加えると、HSC4-Fucci 細胞のみ増感することがわかり、このことは、非同相末端結合が正常な細胞でこの阻害剤が有効であることを示唆した。

(2) SAS-Fucci 細胞から構成されるスフェロイドにおける 10 Gy 照射後の細胞動態と放射線感受性

SAS-Fucci 細胞からなる直径 700  $\mu\text{m}$  ほどのスフェロイドを作製し、その内部構造を共焦点画像で見ると、外層が緑色細胞に富み、内部はほとんどが赤色細胞であることがわかった。そこで照射直後に、細胞をソーティングによって緑色と赤色系高強度の高い(G0期)の細胞に分離し、コロニー法によって放射線感受性を調べると、驚くべきことに、前者のみ単層培養系の細胞よりも放射線抵抗性を示した。この現象は、以前より知られるコンタクト効果とよばれるもので、増殖細胞のみに認められることがわかった。さらに、照射 24 時間後に同様に細胞を分離して見ると、後者のみ抵抗性になって、ほとんど緑色細胞と同等の感受性を示した。この現象は、増殖停止細胞に見られるいわゆる潜在性致死損傷からの回復であった。スフェロイド内部の低酸素状態を調べるために、HIF1 の発現と酸素分圧 < 10 mmHg の領域に蓄積するピモニダゾールを取り込ませそれに対する抗体で免疫染色すると、前者のみが陽性であり、放射線感受性に影響を与えるほどの低酸素状態ではないと考えられた。

10 Gy 照射した同じスフェロイドを長期間にわたって共焦点画像で観察すると、外層の細胞が G2 アレストを起こし脱落しながら、おそらく再酸素化を起こしつつ内部の G0 期細胞が S 期に進行 細胞死を繰り返して次第にスフェロイドが縮小していった。ところが照射 40 日後ごろから赤色のままこの変化が停止し、休眠することがわかった。この状態から足場依存的な増殖ができる状況に移すと、再度増殖を始めることがわかった。すなわち、スフェロイドの構造を維持した場合、最終的に残存するのは、内部の静止期にある細胞であり、コロニー法から得られた結果とは異なるものであった。すなわち、スフェロイド内の腫瘍微小環境が、放射線量感受性に大きな影響を与えることがわかった。

(3) SAS-Fucci 細胞から成る固形腫瘍における 10 Gy 照射後の細胞動態と放射線感受性

KSN ノードマウスに移植して、切片を作製し Fucci の蛍光を観察すると、赤色優位の蛍光が観察され、壊死領域周辺と他の領域に大きな差は認められなかった。ところが、10 Gy 照射 24 時間後には、壊死領域が赤

色、他は強い緑色を呈し、明確に分離することがわかった。これは、増殖分画にある細胞は G1 期が延長しているために赤色細胞が多く観察されたが、照射によってこの G1 期細胞が G2/M 期で停止して緑色になったためと解釈された。さらに、照射後 3-4 日ほどそれが持続することがわかった。そこで、照射 24 時間後に腫瘍を取り出して、単一細胞懸濁液を調整して赤色と緑色細胞をソーティングし、コロニー法によってその放射線感受性を調べた。すると、スフェロイドとは異なり、赤色細胞の方が緑色細胞より放射線抵抗性になることが判明した。腫瘍内では、赤色部分はピモニダゾール陽性であり、低酸素状態が感受性に影響を与えた可能性が考えられた。

(4) 異なる分割照射法が、G2 アレストに及ぼす影響

我々は、HeLa-Fucci 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、形成された固形腫瘍中の G2 アレスト動態を、マウスが生きたままの状態での赤色に対する蛍光強度の比率(G/R 比)を時間に対してプロットすることで、リアルタイムに得る方法を既に確立していた。そこで、この手法を用いて、(I) 2Gy1 回照射、(II) 2 Gy5 回照射(毎日)、そして、(III) 10 Gy1 回照射を行い、上記の様にプロットしたところ、(I)ではわずかに上昇して、2日後にはほぼ元のレベルに戻った。(II)では、わずかに上昇したまま、照射が続いている間そのレベルを保ち、照射を繰り返すことで、それ以上に上昇することはなかった。(III)では、2日後まで著しい上昇を示し、その後緩やかに低下して、5日まで高値を維持した。この結果は、組織切片による観察と矛盾はなかった。

考察

本研究結果から、1回 10 Gy という体幹部定位照射において用いられる大線量を照射することにより、細胞周期依存的な DSB 修復機構と G2 アレストとの関係、G2 アレスト阻害剤併用による放射線増感と DSB 修復機構との関係、G2 アレスト動態の *in vivo* でのユニークな特徴が明らかになった。特に、通常用いられる 1回 2 Gy で 5回分割照射した時に起こる G2 アレスト動態との相違も明らかになり、すなわち、体幹部定位照射では、G2 アレストへの同調度が大きく、さらにそれが長期間持続することであった。G2 アレストを起こしている細胞周期相は、放射線感受性であると考えられているので、2回目以降の分割照射が、大きな増感効果を引き起こしている可能性が考えられた。一方で、最近、G2 期において PLDR が認められることも報告されている。実際、10 Gy 照射後、種々の時間をおいてから腫瘍細胞を調整してコロニー法でその感受性を調べると、次第に上昇す

ることがわかった。こうした G2 アレスト動態が 2 回目以降の分割照射に与える影響については、さらなる検証が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Jiaranuchart S, Kaida A, Onozato Y, Harada H, Miura M: DNA damage response following X-irradiation in oral cancer cell lines HSC3 and HSC4, *Arch Oral Biol*, 査読有, 90: 1-8, 2018  
DOI: 10.1016/j.archoralbio

Onozato Y, Kaida A, Harada H, Miura M: Radiosensitivity of quiescent and proliferating cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Sci*, 査読有, 108(4): 704-712, 2017  
DOI: [10.1111/cas.13178](https://doi.org/10.1111/cas.13178)

〔学会発表〕(計 10 件)

三浦雅彦: 故大西武雄先生追悼セッション. 放射線・温熱によるがん治療増感の基礎から臨床. 第 20 回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム in 奈良, 2018 年 2 月 4 日, 奈良市 (招待講演)

戒田篤志、三浦雅彦: 口腔癌細胞株における放射線誘導性 G2 アレスト動態を指標とした機能既知化合物ライブラリーからの新規放射線増感剤の探索, 第 36 回日本口腔腫瘍学会学術大会, 2018 年 1 月 25 日, 新潟市

Sirimanas Jiaranuchart, 戒田篤志、原田浩之、三浦雅彦: 体幹部定位放射線治療を想定した高線量照射による HSC3 と HSC4 細胞の DNA 損傷応答. 第 36 回日本口腔腫瘍学会学術大会, 2018 年 1 月 25 日, 新潟市

Atsushi Kaida, Yusuke Onozato, Masahiko Miura: Determining radiosensitivity of quiescent and proliferating tumor cells irradiated under different tumor microenvironments. 33th International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University, 2017.12.5, Kyoto (国際学会)

Masahiko Miura: Redistribution revisited by visualizing cell cycle. 1st International Symposium on Radiation Therapeutics & Biology, Oct 30-Nov 1 2017, Shenzhen, China

(Shenzhen University・招待講演) 国際学会)

戒田篤志、三浦雅彦: 放射線誘導性 G2 アレスト動態を指標とした機能既知化合物ライブラリーのスクリーニング. 若手放射線生物学研究会 平成 29 年専門研究会, 2017 年 9 月 2 日, 東京

三浦雅彦: 細胞周期の可視化によって”4 つの R”はどこまで見えるか? 第 26 回名古屋放射線夏季セミナー. 2017 年 7 月 22 日, 名古屋市 (招待講演)

戒田篤志、小野里祐佑、三浦雅彦: 舌扁平上皮癌における腫瘍内微小環境に応じた放射線照射後の細胞動態と放射線感受性. 日本放射線腫瘍学会第 55 回生物部会学術大会・第 46 回放射線による制癌シンポジウム. 2017 年 6 月 16 日, 名古屋市

三浦雅彦、戒田篤志、小野里祐佑: Fucci による腫瘍微小環境下での静止期、増殖期細胞の可能性、分離とその放射線感受性. 第 19 回癌治療増感研究シンポジウム, 2017 年 2 月 3-4 日, 奈良市 (招待講演)

Masahiko Miura: Cell cycle kinetics and radiosensitivity. The 29<sup>th</sup> Annual Meeting of JASTRO, 25-27 Nov 2016, Kyoto

〔図書〕(計 1 件)

三浦雅彦: 新版 放射線医科学-生体と放射線・電磁波・超音波-1 章 放射線作用の基礎-分子から細胞へ 1.9 放射線感受性の修飾 (酸素・分割・線量率). p32-34 (総ページ 192), 大西武雄監修. 医療科学社, 2016 年 10 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.tmd.ac.jp/mdth/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 雅彦 (MIURA, Masahiko)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 10272600