

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16418

研究課題名(和文) 間欠的低酸素領域を標的とした温熱による効率的な陽子線治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of efficient proton beam therapy utilizing hyperthermia targeting intermittent hypoxia

研究代表者

関野 雄太 (Sekino, Yuta)

筑波大学・附属病院・医員

研究者番号：50795713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：種々のがん細胞を用いて新規低出力温熱治療装置オンコサーミアによる加温治療が、ウォーターバスなどの温水循環による加温と比べて優位に強い生物効果を示すことを明らかにしてきた。また、間欠的低酸素環境に置かれ、放射線に抵抗性を獲得したがん細胞に対するOTの有効性も確認してきた。X線に加え筑波大学が有する先端放射線治療である陽子線を用いて、オンコサーミアとの併用による殺細胞効果を検討した。その結果、X線を用いた場合とほぼ同様に陽子線との併用においてもWB加温に比べより効率的に細胞致死を誘導し、大きな温熱増感比を示すことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陽子線治療は物理的特徴から、がんへ高線量を照射し、副作用を低減することから、各種癌治療に応用されてきた。しかし、低酸素細胞などの治療抵抗性の病態に対してより有効な治療法の開発が必要とされている。本研究により、患者の負担が少ない、低温による温熱療法の併用により治療効果が増強される基礎生物学的な結果を得ることができた。さらなる知見の蓄積により、より効率的で患者の負担の少ない治療法につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have clarified that among various cancer cells the heating treatment by using a new low-power thermotherapy device, oncothermia has a dominant and strong biological effect compared with the heating by warm water circulation such as a water bath. We also confirmed the effectiveness of oncothermia against cancer cells that have become radioresistant by being placed in an intermittent oxygen environment. In addition to X-rays, we also examined the cytotoxic effect of the combination with oncothermia for advanced radiotherapy called protons beam therapy. As a result, it was clarified that cell death was induced more efficiently and a large thermal sensitization ratio was exhibited even when combined with proton beam, as in the case of using X-ray, as compared with water bath heating.

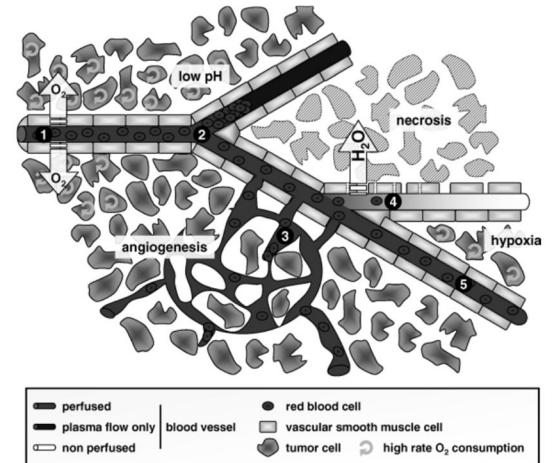
研究分野：陽子線治療

キーワード：オンコサーミア 放射線増感効果 陽子線 アポトーシス 低出力温熱治療

1. 研究開始当初の背景

がん治療には外科的治療、放射線治療、化学療法 の 3 本柱があり、超高齢社会に突入した日本では、特に侵襲性の低い放射線治療への関心が高まっている。放射線治療は治療・診断機器の開発と照射法の工夫により、がんへの線量集中性および位置精度が飛躍的に向上し、正常組織を守りながらがんへ高線量を投与することが可能となった。特に、**ブラッグピークを有する陽子線はがんへより高線量を投与することが可能であり、治療後の QOL が特に重要視される小児がんなどへの放射線治療の適応拡大につながった。**

一方で、陽子線は従来放射線治療に用いてきた X 線と同様に低 LET 放射線に分類され、酸素増感比 (Oxygen Enhancement Ratio: OER) は約 2~3 を示すため、**低酸素細胞を効率的に死滅させることはできない。** 固形腫瘍には増殖と血管新生の不均衡に起因する低酸素領域が存在するため、種々のがん治療法に対して抵抗性を示すことが古くから知られている。近年、低酸素領域の中でも血管から遠く離れた領域に存在する慢性的低酸素領域よりも、血管新生と脆弱な腫瘍内血管の破綻により生じる**間欠的低酸素 (Intermittent hypoxia あるいは Cyclic hypoxia) が治療抵抗性のみならず、がんの浸潤、再発、転移など治療予後に大きく関与することが報告されている。** 臨床の現場においても陽子線治療により根治まで到達しない症例が存在することからも、**より効率的な陽子線治療の確立には間欠的低酸素を標的とした治療法との併用が重要だと考える。**



P Soveaux et al., Radiother Oncol 86:300-

313, 2008 より引用

2. 研究の目的

低酸素細胞に対する有効的な治療法として温熱療法が上げられる。42 以上の高温処理では温度依存的に DNA 損傷を誘発して細胞致死効果を示し、40~42 の低温処理では腫瘍内の血流増加させることで、腫瘍内低酸素領域の再酸素化により放射線抵抗性を改善することが知られる。42 を超える温熱療法は患者に対する侵襲性が高いため、**臨床において他療法との併用を考えた場合、患者の負担が少ない低温による温熱療法 (Mild temperature hyperthermia: MTH) が現実的**である。しかしながら、治療予後に最も関与する間欠的低酸素細胞に対する MTH の影響を調べた報告はない。加えて、42 以上の高温処理による温熱療法による X 線増感効果を調べた研究は古くから存在するが、陽子線に対する増感効果を調べた報告は極めて少ない。本研究では、間欠的低酸素処理により治療抵抗性を獲得したがんに対して、温熱療法と陽子線の併用による影響を細胞致死効果の観点から調べ、そのメカニズムを代謝系の変化および分子生物学的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

<平成 29 年度>

1. 培養細胞に間欠的低酸素環境を連続的に経験させ、放射線及び薬剤抵抗性細胞を樹立する。
2. 間欠的低酸素経験細胞 (Intermittent hypoxia cells: IHC) における低酸素誘導因子 HIF-1

及びその下流の細胞死関連シグナル伝達経路の発現変化を有酸素下の細胞と比較する。

<平成 30 年度>

IHC に対し、陽子線あるいはX線と温熱を併用することで、

1. がん細胞に対する殺細胞効果にどの程度影響を与えるのか。
2. 温熱処理による増感効果は、陽子線とX線で異なるのかどうか。
3. 加温温度、時間、方式により増感作用はどの程度変化するのか。
4. IHC において有酸素下細胞と比べ変化したシグナル伝達系のどこに変化が生じるのか。

上記項目を細胞実験にて明らかにする。

<平成 31 年度 / 令和元年度>

前年度得られた結果から IHC に対する至適な温熱処理条件にて陽子線あるいはX線を照射し、

1. 腫瘍増殖抑制効果にどの程度影響を与えるのか。
2. 温熱処理による増感効果は、陽子線とX線で異なるのかどうか。
3. 加温温度、時間、方式により増感作用はどの程度変化するのか。
4. IHC において有酸素下細胞と比べ変化したシグナル伝達系のどこに変化が生じるのか。

上記項目を担がんマウスによる動物実験にて明らかにする。

放射線抵抗性のがん種として、臨床の現場で陽子線治療に対して抵抗性である、骨肉腫、繊維肉腫を対象とした。

4. 研究成果

平成 29 年度:

ヒト扁平上皮癌由来 SAS 細胞をマルチガスインキュベーターによる酸素分圧 21%と 1%環境下で繰り返し培養することで、間欠的低酸素環境を最大で 20 回経験させた。Cyclic hypoxia 経験細胞 (Cyclic hypoxia experiences cells: CHEC) は X 線および温熱 (恒温槽による加温) に対し、大気中酸素分圧環境下で培養した細胞に比べ顕著な抵抗性を示した。CHEC のエネルギー代謝経路を調べた結果、TCA サイクルに關与するミトコンドリアの量および膜電位が顕著に減少し、一方で嫌氣的解糖系に關わるグルコース摂取量と乳酸排出量が上昇していた。この結果から、CHEC はより嫌氣的解糖系への依存度が高まり、ROS 等への抵抗性が高まっていることが示唆された。ついで、これらの細胞に対して恒温槽 (water bath: WB) による加温と新規低出力加温療法オンコサーミア (Oncothermia: OT) による加温を行なった結果、WB に比べ OT は 30-120min の加温処理において 1.2 倍-20 倍の殺細胞効果を示した。さらに、X線との併用においても WB による 42 加温では顕著な増感効果を示さなかった (温熱増感比 TER=1.06) のに対し、OT による 42 加温では顕著な増感効果を示した (TER=1.61)。

平成 30 年度:

担癌マウスモデルを用いて温熱処理および放射線 (X 線) との併用効果を検証し、抗腫瘍効果に關わる分子メカニズ的な解析を行った。その結果、担癌マウスにおいて OT は WB に比べ優位に腫瘍増殖を抑制し、腫瘍内細胞を死滅させることが明らかとなった。さらに、X 線との併用においても OT は WB に比べ高い温熱増感比 (Thermal enhancement ratio: TER) を示し、41 では WB の 1.1 に対し OT は 2.1 を示し、43 では WB の 1.3 に対し OT は 2.3 を示した。腫瘍内細胞の分子メカニズ的な解析を行った結果、OT 処理群では WB 処理群に比べ優位にアポトーシス、ネク

ローシス、オートファジーなどの細胞死が高頻度に誘導され、放射線と併用することでさらに増強された。また、OT 処理は WB 処理に比べ、Bax などのアポトーシス誘導因子を活性化し、Bcl-2 や p-Akt などの抗アポトーシス遺伝子を抑制することで、Caspase-8 や Caspase-9 を誘導しアポトーシスを増強すること、および mTOR などのオートファジー誘導因子を更新させることで、オートファジーを増強することが明らかとなった。

平成 31 年度 / 令和元年度：

X 線に加え筑波大学が有する先端放射線治療である陽子線を用いて、オンコサーミアとの併用による殺細胞効果を検討した。その結果、X 線を用いた場合とほぼ同様に陽子線との併用においても WB 加温に比べより効率的に細胞致死を誘導し、大きな温熱増感比 (Thermal Enhancement Ratio: TER) を示すことが明らかとなった。また、WB41 度による TER は X 線と陽子線に対しそれぞれ 1.15 ± 0.07 、 1.19 ± 0.06 と両者間で有意差はなかったが、OT41 度による TER は X 線と陽子線に対しそれぞれ 2.28 ± 0.06 、 2.50 ± 0.1 と陽子線に対し顕著に高いことが明らかとなった。さらに、OT による殺細胞効果の分子メカニズムを探るため、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った結果、細胞周期 (G2 期) 停止の誘導、アポトーシス誘導、オートファジー誘導に関わる遺伝子群が、WB 処理群に比べ OT 処理群で有意に亢進し、またその発現時間が WB に比べ OT 群でより早期に起こることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本孔貴
2. 発表標題 低出力温熱治療オンコサーミアと放射線の併用による抗腫瘍効果
3. 学会等名 第22回関東ハイパーサーミア研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 松本孔貴、林淳子、関野雄太、福光延吉、斎藤高、石川仁、櫻井英幸
2. 発表標題 温水還流加温と比較して、低出力温熱治療（オンコサーミア）は効率的な殺細胞効果と放射線増感効果を示す
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第36回大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松本孔貴、菅原裕、関野雄太、福光延吉、斎藤高、石川仁、櫻井英幸
2. 発表標題 温水還流加温と比較して、低出力温熱治療（オンコサーミア）は効率的な殺細胞効果と放射線増感効果を示す
3. 学会等名 第22回癌治療増感研究シンポジウム
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----