

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16425
研究課題名(和文) 子宮頸癌・膵臓癌患者への放射線治療と抗癌剤低用量併用の基礎的検討とその応用

研究課題名(英文) Basic studies of low-dose cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy on human cervix carcinoma cells (HeLa cell line)

研究代表者
原田 倫太郎 (Harada, Rintaro)
千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20568662
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)：HeLa-S3(子宮頸癌細胞)を用いて照射と抗癌剤シスプラチン(CDDP)の併用効果に関する基礎的検討を実施した。X線照射と抗癌剤が単独・併用にて腫瘍細胞に傷害を与える線量と薬剤濃度を細胞のDNA合成阻害とコロニー形成能を指標として検討した。照射とCDDPの併用(1.25-2.5 μ l/ml)にて顕著な腫瘍細胞の増殖抑制効果が認められた。また、HeLa-S3細胞を移植したヌードマウスでは、照射10日後に再増殖が見られる6Gyで3回の局所照射後にCDDPの500-1000 μ g/kg投与で明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。これは照射線量と低用量抗癌剤の併用効果を示す結果と思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療における放射線療法では、腫瘍縮小効果を期待して抗癌剤との併用療法が行なわれている。当施設に置いて子宮頸癌に対して局所制御や根治的治療を目的として化学放射線治療が実施されている。放射線照射と抗癌剤の同時併用で明らかな治療効果が得られるが治療を継続するために障害となるのが嘔吐や悪心などの副作用の発現である。本研究では、腫瘍細胞レベルにおけるCDDP濃度と照射線量の効果関係についてのin vitro実験および照射と抗癌剤によるマウスの抗腫瘍効果の検討(in vivo)を実施して低濃度CDDPにて明らかな併用効果が認められ、臨床に寄与でき得る基礎的な知見と思われた。

研究成果の概要(英文)：In vitro study using HeLa-S3 (human negroid cervix carcinoma) cells was performed to evaluate effects of combined irradiation (X-rays) and low-dose cisplatin powder by measuring 3H-thymidine (Perkin Elmer, Inc.) uptake. In vitro study identified that the HeLa-S3 cells that were exposed to cisplatin for 72 hours showed decreased 3H-thymidine uptake even when dose levels were $1 \mu\text{g/mL}$.

In vivo study using male mice (BALB/c/nu/nu) were purchased from Japan SLC, at 4 weeks of age. Mice were transplanted with HeLa-S3 cells subcutaneously in the right femur. Cisplatin was dissolved in sterilized saline solution and administered mice intraperitoneally (i.p.) in a volume of 0.25mg-1.00mg/kg body weight. The volume of the transplanted HeLa-S3 tumor was clearly reduced by the combination of irradiation and cisplatin. Furthermore, in the histological examination of the tumor, the tumor tissue was significantly damaged by the combined use of irradiation and cisplatin administration.

研究分野：放射線科学、放射線治療学

キーワード：放射線治療 低用量抗癌剤 子宮頸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がん治療における放射線療法では、腫瘍縮小効果を期待して抗癌剤との併用療法が行なわれている。当施設に置いて子宮頸癌および手術不能な膵臓癌に対して局所制御や根治的治療を目的として化学放射線治療が実施されている。ヒトの子宮頸癌ではシスプラチン(CDDP)が頻用され、放射線治療と併用されている。

(2) 放射線照射と抗癌剤の同時併用で明らかな治療効果が得られるが、治療を継続するために障害となるのが嘔吐や悪心などの副作用の発現である。制吐剤が投与されても症状の改善が認められない患者にとっては、治療の継続が困難である。そこで当施設では投与総量と抗腫瘍効果が相関し、血中濃度に依存して副作用が発現する CDDP に注目した。すなわち放射線照射との併用による治療効果を維持し、副作用を軽減する CDDP の低用量 (8mg/m²) の連日投与を実施した。この方法では、積算 CDDP 量が十分量投与可能であること、副作用が軽減され治療成績が週 1 回の CDDP 投与 (40mg/m²) と比較して同等であり、これらの症例は臨床治療成績として当施設より報告されている。

2. 研究の目的

子宮頸癌患者に対する放射線治療と化学療法併用治療において抗癌剤の副作用を軽減して治療を継続する目的でシスプラチン (CDDP) 低用量持続投与を実施し、良好な治療成績が得られている。しかし、抗癌剤低濃度持続投与と放射線照射併用の腫瘍細胞に対する影響についての基礎的な報告は見られない。

本研究では、腫瘍細胞レベルにおける低濃度 CDDP と照射線量の効果関係について、(1) 短期間の効果として腫瘍細胞の DNA 合成阻害に対する検討、これら *in vitro* の実験結果より (2) マウスに移植した腫瘍細胞の放射線照射と抗癌剤併用による抗腫瘍効果の検討 (*in vivo*) を実施し、臨床に寄与でき得る基礎的な知見を取得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞：ヒト子宮頸癌細胞として HeLa-S3 細胞 (human negroid cervix carcinoma) を用い、抗癌剤としてシスプラチン(CDDP: Wako Chemical Industries) を培養溶液で調整した。

(2) 照射：当研究室に設置されているエックス線発生装置(MBR-1520R-3/日立メヂコ社)を用いて管電圧 150kV、管電流 20mA、線量率 3.5-4.0Gy/分の条件にて細胞およびマウスに移植した腫瘍に照射した。

(3) 腫瘍細胞の NDA 合成阻害効果：トリチウムチミジン(³H-thymidine: 以下 3H-TdR, Perkin Elmer, Inc., USA) の取り込みにより測定した。

(4) ノードマウスおよび腫瘍細胞の移植：BALB/c/nu/nu 雄(SLC Japan)、4 週令を使用して右大腿部皮下に HeLa-S3 細胞(250-300 万個/0.2ml)を移植した。

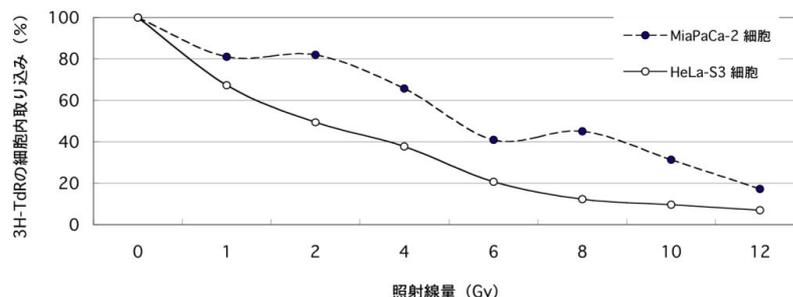
(5) CDDP の投与方法：CDDP を生理食塩液にて調整し、マウスの腹腔内に投与した。

4. 研究成果

(1) 子宮頸癌細胞(HeLa-S3)および膵臓癌細胞(MiaPaCa-2)の放射線感受性について

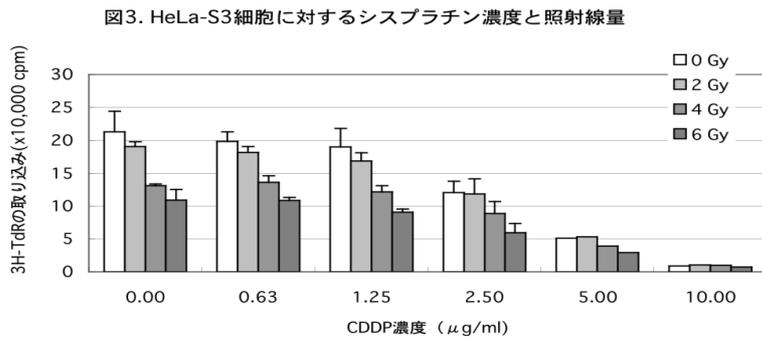
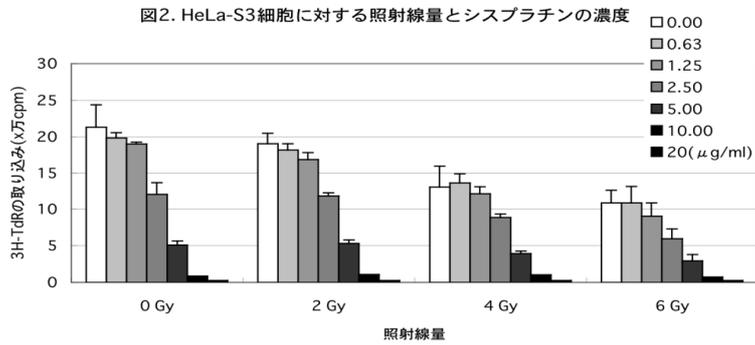
研究開始当初に予定していた膵臓癌細胞と子宮頸癌細胞について放射線感受性を検討した結果、図 1 に示した様に MiaPaCa-2 細胞の放射線感受性にバラツキがみられ、細胞も順調に培養(発育)されないことから、本実験は HeLa-S3 細胞のみにて実施した。

図1. MiaPaCa-2およびHeLa-S3細胞の放射線感受性



(2) HeLa-S3 細胞に対する照射線量と CDDP 濃度について

X 線照射と CDDP の併用効果について図 2 および図 3 に示した。図 2) HeLa-S3 細胞-X 線照射-CDDP 添加+2 時間接触-CDDP 除去-培養液で洗浄-培養液交換-培養-3 日目に 3H-TdR 添加--培養 24 時間--取り込み測定 (cpm)。図 3) HeLa-S3 細胞-CDDP 添加+2 時間接触-X 線照射-CDDP 除去-培養液で洗浄-培養液交換-培養-3 日目に 3H-TdR 添加-培養 24 時間-取り込み測定 (cpm) の 2 通りで調査した。その結果、CDDP 濃度は 2.5 μg/ml の濃度から、照射線量では 4Gy 以降に明らかな腫瘍細胞の DNA の合成抑制効果が認められた。また、2Gy から 6Gy までの単一照射と分割照射では、単一照射群で分割照射群より明らかな DNA 合成阻害がみられ、CDDP 併用では 4 から 6Gy の分割照射群で 3H-TdR の取り込み抑制が認められた。



(3) ノードマウスに移植した HeLa-S3 腫瘍に対する X 線照射と CDDP の併用効果について

HeLa-S3 細胞を移植した腫瘍に対する照射単独の線量および CDDP 単独投与量における腫瘍縮小効果を確認し、照射と CDDP 併用による腫瘍増殖抑制効果に関する実験を実施した。腫瘍体積の推移について実験開始時を 100 とした指数で図 4. に表示した。CDDP 投与群は CDDP-A (ヒト 20mg/m²/500 μg/kg に相当) および CDDP-B (ヒト 40mg/m²/1,000 μg/kg に相当) の 2 投与量を設定して照射後隔日に 9 回、マウス腹腔内に投与した。無処置群には生理食塩水を同様に投与した。照射は腫瘍局所に 6Gy/回を隔日に 3 回 (18Gy) 照射した。無処置群と CDDP-B 群は実験開始後 8 日目に腫瘍体積が増大し安楽死をもって終了した。CDDP 併用群では照射単独群に対して腫瘍体積の抑制効果 (14 日以降有意の減少) が認められた。また、実験終了時の腫瘍重量を図 5 に示した。CDDP 併用各群で明らかな腫瘍の増殖抑制効果が認められた。

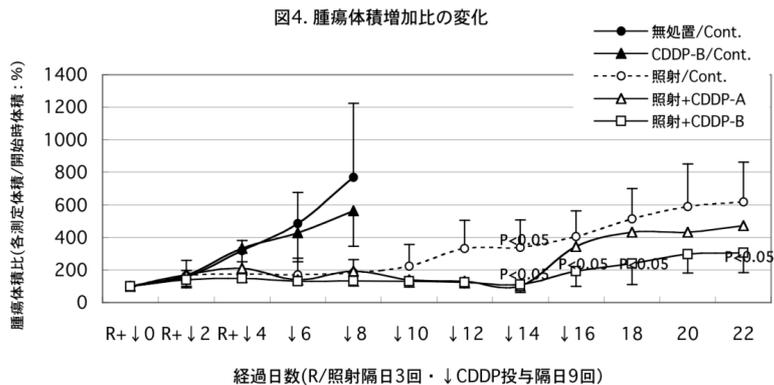
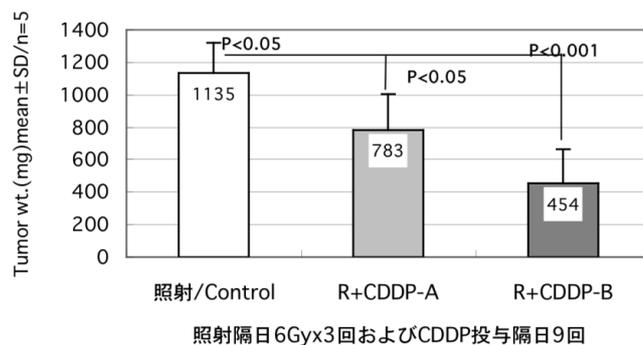


図5. 腫瘍重量



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|