

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2006～2008

課題番号：18390546

研究課題名（和文） 口腔がんにおける重粒子線療法の基礎的研究

研究課題名（英文） A study of the Heavy-ion beams medical treatment on the oral cancer

研究代表者 桐田 忠昭

桐田 忠昭 (KIRITA TADAAKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70201465

## 研究成果の概要：

重粒子線は、変異型 *p53* 遺伝子を有するがん細胞においても X 線と比較して少ない線量で効率的にアポトーシスを誘導し、感受性が高くなることが明らかとなった。さらに、重粒子線によるアポトーシスは、Caspase 依存の経路を介しており、Caspase8 経路ではなく Caspase9 経路を選択的に介し Caspase3 を活性化することによって、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。つまり、重粒子線によるアポトーシス誘導の経路の一部を明らかにすることができた。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 6,400,000  | 1,920,000 | 8,320,000  |
| 2007 年度 | 3,800,000  | 1,140,000 | 4,940,000  |
| 2008 年度 | 3,800,000  | 1,140,000 | 4,940,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,000,000 | 4,200,000 | 18,200,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

放射線によるがん細胞死は *p53* 遺伝子型に依存していることが明らかにされていた。そのことは、*p53* 突然変異型や欠損型の細胞を有するがんには、低 LET 放射線による治療は効果が望めない可能性があることを意味する。

一方、高 LET 重粒子線は生物学的効果比 (RBE) が高く、治療効果が高いことが知られている。

*p53* 遺伝子導入によりがん抑制効果を狙った研究および臨床治験が国内外でも進めら

れていた。しかし、口腔がんにおいて、高 LET の重粒子線による *p53* 非依存的アポトーシス関連遺伝子を応用した新しいがん治療法の研究は、世界的に未だ見当たらなかった。

## 2. 研究の目的

悪性度が高く難治性であることが知られている *p53* の変異型や欠失型のがんの治療効果を高めることを狙い、ヒト口腔がん治療における重粒子線療法の基礎的研究を行い、重粒子線照射による *p53* 非依存的アポトーシス

誘導メカニズムを解明し、*p53*非依存的アポトーシス関連遺伝子の発現をコントロールすることで、重粒子線を用いなくても、*p53*の異常ながん細胞をもつ多くの患者の治療効果の向上を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 変異型 *p53* 遺伝子を有するヒト歯肉扁平上皮がん細胞における高 LET 重粒子線照射後と低 LET 放射線照射後の生存率を指標に、生物学的効果比 (RBE) を算出し、高 LET 重粒子線照射後と低 LET 放射線照射後のアポトーシスの出現頻度をヘキスト染色法で調べた。

(2) 高 LET 重粒子線によるアポトーシスの経路を解明するため、ウエスタンブロット法にて PARP や Caspase3 などのタンパク質の発現を確認した。さらに Caspase3、Caspase8、Caspase9 阻害剤を用いてアポトーシス頻度と生細胞における Caspase3 の活性をフローサイトメトリー法で調べた。

(3) DNA マイクロアレイを用い高 LET 重粒子線照射後の遺伝子の発現を確認した。

### 4. 研究成果

(1) 放射線による殺細胞効果は *p53* 遺伝子背景に影響されず X 線に比べて重粒子線の LET に依存して高くなること、さらにアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

10%生存率における生物学的効果比(RBE) 曲線は 100KeV 付近をピークとした RBE 曲線が得られた。100KeV における RBE は 4.7 であった。また、10%アポトーシス出現頻度における RBE 曲線も 100KeV 付近がピークとなり、100KeV における RBE は 7.5 であった。

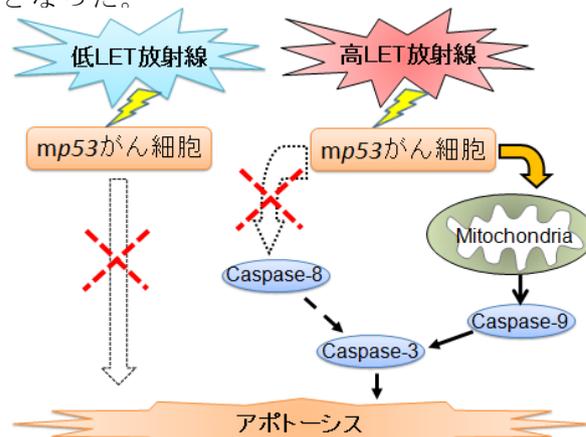
つまり、重粒子線はたとえ変異型 *p53* 遺伝子を有するがん細胞においても X 線と比較して少ない線量で効率的にアポトーシスを誘導し感受性が高くなることが明らかとなった。

(2) ウエスタンブロット法により重粒子線の LET に依存して Caspase3 と PARP 断片化が多く認められた。さらに、Caspase 阻害剤を用いた実験により Caspase8 ではなく Caspase9 の活性化が起こることにより Caspase3 が活性化されることが明らかとなった。

つまり、重粒子線によるアポトーシスは Caspase 経路を介していること、その経路においても Caspase9 経路を選択的に介し Caspase3 を活性化することが明

らかとなった。これらのことからミトコンドリア経路を介している可能性も示唆された。

(3) DNA マイクロアレイにより重粒子線照射後の細胞ではミトコンドリア経路に関する遺伝子の発現を認めた。このことから重粒子線によるアポトーシスは Caspase9 の上流のミトコンドリアの活性化も誘導していることが明らかとなった。



図：高 LET 重粒子線によるアポトーシス経路 Caspase-9 を経由して Caspase-3 が活性化されることによりアポトーシスが誘導される。低 LET 放射線では *p53* が機能しないためアポトーシスを誘導しにくい。

### 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 3 件)

(1) High LET radiation enhances apoptosis in mutated *p53* cancer cells through Caspase-9 activation.

Yamakawa N, Takahashi A, Mori E, Imai Y, Furusawa Y, Ohnishi K, Kirita T, Ohnishi T

Cancer Science, Vol. 99, No.7, 1455-1460 2008

査読：有

(2) DNA Damage Recognition Proteins Localize along Heavy Ion Induced Tracks in the Cell Nucleus.

Takahashi A, Yamakawa N, Kirita T, Ishioka N, Furusawa Y, Ohnishi K, Ohnishi T

J Radiat Res, Vol.49, No.6, 645-652 2008  
査読：有

(3) High LET heavy ion radiation induces p53-independent apoptosis.

Mori E, Takahashi A, Yamakawa N, Kirita T, Ohnishi T.

J Radiat Res, Vol.50, No.1 37-42. 2009  
査読：有

〔学会発表〕(計 1 1 件)

(1) 表現型の異なるヒト舌癌細胞における X 線・温熱併用による殺細胞効果と細胞死型の解析

山川延宏、安本順一、梶原淳久、舘林茂、山中康嗣、今井裕一郎、大儀和彦、桐田忠昭  
第 29 回日本頭頸部癌学会  
平成 17 年 6 月 15~17 日、京王プラザ・東京都

(2) Cellular sensitivity and p53-independent apoptosis on human gingival cancer cells by heavy-ion beams

Yamakawa N, Takahashi A, Imai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Kirita T.

48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society

1<sup>st</sup> Asian Congress of Radiation Research.  
Nov.15-17,2005, International Conference Center Hiroshima, Japan

(3) ヒト歯肉扁平上皮癌細胞における重粒子線の殺細胞効果および p53 非依存的アポトーシス誘導

山川延宏、今井裕一郎、梶原淳久、桐田忠昭  
第 30 回頭頸部癌学会  
平成 18 年 6 月 14~16 日、大阪国際会議場

(4) ヒト歯肉扁平上皮癌細胞における重粒子線の殺細胞効果およびアポトーシス誘導

山川延宏、高橋昭久、今井裕一郎、梶原淳久、大西健、桐田忠昭、大西武雄  
第 65 回日本癌学会学術大会  
平成 18 年 9 月 28~30 日、パシフィコ横浜・

神奈川県

(5) ヒト歯肉扁平上皮癌細胞における重粒子線の殺細胞効果およびアポトーシス誘導  
山川延宏、今井裕一郎、梶原淳久、村上国久、桐田忠昭

第 51 回日本口腔外科学会総会  
平成 18 年 10 月 12・13 日、ウエルシティ小倉・福岡県

(6) Cellular Sensitivity and p53-Independent Apoptosis on Human Gingival Cells by Heavy-ion Beams

Yamakawa N, Imai Y, Kajihara A, Murakami Ku, Ohgi K, Kirita T

7<sup>th</sup> Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery

November 5-9, 2006, Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong

(7) ヒト歯肉扁平上皮癌細胞における重粒子線の殺細胞効果およびアポトーシス誘導

山川延宏、今井裕一郎、梶原淳久、村上国久、桐田忠昭

第 25 回日本口腔腫瘍学会  
平成 19 年 2 月 2・3 日、愛知・名古屋国際会議場

(8) ヒト歯肉扁平上皮癌細胞における重粒子線の殺細胞効果およびアポトーシス誘導

山川延宏、今井裕一郎、梶原淳久、桐田忠昭  
第 31 回日本頭頸部癌学会

平成 19 年 6 月 14・15 日、神奈川県・パシフィコ横浜

(9) Cellular sensitivity and p53-independent apoptosis on human gingival cancer cells by heavy-ion beams

Yamakawa N, Takahashi A, Furusawa Y, Ohnishi K, Ohnishi T.

13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research

July 8-12, 2007, San Francisco

(10) 変異型 p53 保有歯肉扁平上皮がん細胞における重粒子線誘導アポトーシス

山川延宏、今井裕一郎、桐田忠昭

第 26 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
平成 20 年 1 月 23-25 日、大分・別府国際コンベンションセンター

(11) High LET radiation enhances apoptosis in mutated p53 cancer cell through Caspase-9 activation

山川延宏、今井裕一郎、桐田忠昭

第 27 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
平成 21 年 1 月 29-30 日、栃木県総合文化センター

〔図書〕(計 1 件)

1. 口腔腫瘍学会(口腔癌治療ガイドライン作成ワーキンググループ)、  
口腔外科学会(口腔癌診療ガイドライン策定委員会)

金原出版(東京)

科学的根拠に基づく口腔癌診療ガイドライン 2009 年版

2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桐田 忠昭 (KIRITA TADAAKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70201465

### (2) 研究分担者

高橋 昭久 (TAKAHASHI AKIHISA)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60275336