

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07780

研究課題名(和文) 臨床肺がんおよび正常肺移植マウスモデルを用いた粒子線治療効果と副作用評価

研究課題名(英文) Evaluation of ion radiotherapy effects and side effects using a mouse model of clinical lung cancer and normal lung transplantation

研究代表者

足立 成基 (Adachi, Shigeki)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・プロジェクト研究員

研究者番号：60379261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌は、日本人高齢者における癌死亡率1位である。治療法として重粒子線治療(炭素線)が、普及しつつある。炭素線による癌治療効果と副作用評価のため、手術摘出後の患者癌組織をSCIDマウスに移植して作成したヒト肺腺癌PDXに、炭素線及びX線を照射した。経時観察したところ線量依存的に増殖抑制が見られ、RBEは1.5であった。正常ヒト肺組織を移植したSCIDマウスに炭素線及びX線を照射し、遺伝子発現解析を行った。照射によって構造や血管新生、サイトカイン等に影響があると示唆された。炭素線による肺腺癌への線量依存性の抑制効果はみられたのに対し正常組織への照射初期の遺伝子発現の影響を捉えることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、ヒト正常肺組織置換Super-SCIDマウスを作製し、放射線を移植ヒト肺組織に直接照射することにより、人体実験を避け、生きたままのヒト正常肺組織への放射線による障害を解明できる点である。肺がんは、日本人のがん罹患率の上位であり、肺がんに対する放射線療法の副作用(正常肺への障害)を軽減することが、早急に求められている重要課題である。肺がんと正常組織を移植したマウスに放射線を照射することで、人体実験を避け、生きたままのヒト正常肺組織への放射線障害のメカニズムを実験的に解明できるところに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer has the highest cancer mortality among the elder persons in Japan. Heavy ion radiotherapy (carbon ion) is specifically used for radiotherapy in Japan because of the sharp bragg peak. To examine effect of the cancer therapy and side effects, the patient's cancer tissue PDX (Patient Derived Xenograft) were irradiated to carbon ion and X-rays. Suppressive effects of carbon ion and X-rays were shown dose-dependent on human lung cancer and the RBE was 1.5. Human normal lung tissue transplanted to SCID mice were irradiated to carbon ion and X-rays and gene expression analyzed. Carbon ion irradiation affects structure, angiogenesis, and cytokines. Although the suppressive effects by carbon ion was observed on lung adenocarcinoma, the effect of the gene expression on the normal lung tissue was not observed at the initial stage of irradiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：重粒子線 ヒト肺腺がん ヒト正常肺 SCIDマウス PDXモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人高齢者に高発するがんのうち、肺がんは、日本人に於けるがん死亡率の1位である。治療法として、放射線療法は単独または化学療法/外科手術との併用でかなりの割合で行われている。放射線治療では、副作用として肺正常部に肺線維症がおこる。近年、先端医療の一つとして重粒子線治療(主に、炭素線または陽子線)が、徐々に普及しつつある。炭素線は身体深部の標的部分にエネルギーピークを設定できるため、標的(腫瘍部)に選択的に放射線照射を行うことができる。それでも周辺部の肺組織に肺線維症がおこるため正常組織への影響研究は避けては通れない。

2. 研究の目的

近年、日本人の高齢患者に高発する肺がんまた、難治性の膵がんに対し術前照射の有意性が検討されている。患者負荷の少ない方法として、重粒子線(炭素線または陽子線)治療が重視されている。本研究においては、炭素線によるがん治療効果と副作用の評価を比較・検討するため、手術摘出後の患者がん組織を Super-SCID マウスに移植・維持したヒト肺がん及び正常肺組織 PDX モデルを用いることで人体実験を避け、炭素線及び X 線によるがん増殖抑制効果比を求め、組織障害の観察を行う。さらに照射による影響を受けた正常組織の遺伝子発現の変化を短時間で比較検討することにより、炭素線の治療効果と安全性の評価を行う。

3. 研究の方法

(1)Super-SCID マウスの維持・量産：T 細胞、B 細胞機能を欠如し、LPS に無反応の Super-SCID(C3H/HeJ/N0s-scid;LPS-)マウスの維持・量産を行うため、Super-SCID マウスの血清より、ELISA 法により IgG、IgM を測定し、検出限界以下のものを選別して使用した(文献 4-10)。

ヒト肺がん組織及び正常肺組織の移植：国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所(以下、医薬健栄研)に於いては、医薬健栄研及び医療機関の倫理委員会の承認の下、治療上やむなく手術摘出されたヒト組織を Super-SCID マウス皮下に移植、増殖させ、ヒト臨床組織 PDX を作製している(文献 1,3,5)。

(2)現在 PDX 化に成功しているヒト臨床がん組織から、高発がんである肺がん(腺がん)を選び、炭素線照射実験に用いた。ヒト正常肺組織移植 PDX についても同様に炭素線照射実験を行った。炭素線照射は、粒子を作り出す大型の加速機等特別な施設が必要であり、我が国に於いては、国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構(名称変更)しか実験研究に共同利用できないため、半年ごとに計画され、承認された照射実験に限り可能である。作成した肺腺がん PDX 組織を約 5 mm に細分し、イソフルラン吸入麻酔下にて、実験に必要な匹数のマウスの左右下腿部皮下に移植した。移植後約 8~11 日後に移植マウスは照射直前に、無菌状態を保てる専用の照射箱に固定し、量子科学技術研究開発機構にて炭素線照射と同時にレファレンス照射として医薬健栄研にて X 線を下腿部近辺に局所照射した(図 1)(文献 1,2)。

(3)照射による形態変化解析のため、病理標本作製し、炭素線、X 線の影響を比較した。

(4)照射による遺伝子発現変化については、ヒト正常肺組織を SCID マウスに移植 1 週間後に炭素線、X 線照射し、照射 2 週間後に摘出し、液体窒素にて保存を行った。保存組織片より RNA を抽出し、マイクロアレイ(GeneChip, Affymetrix)用に、試料調整を行い、GeneChip にかき、発現解析を行い非照射組織の発現解析と比較することで行った(文献 1,4)。炭素線による発現変化により、炭素線に反応する肺がん特有遺伝子の同定を行う。

(5)正常肺組織についても、病理標本作製し、炭素線、X 線の影響を比較した。

4. 研究成果

(1)T 細胞、B 細胞が検出限界以下の Super-SCID マウスの量産、維持を行い、ヒト肺がん PDX 及び正常肺をマウス下腿部皮下に移植し、照射

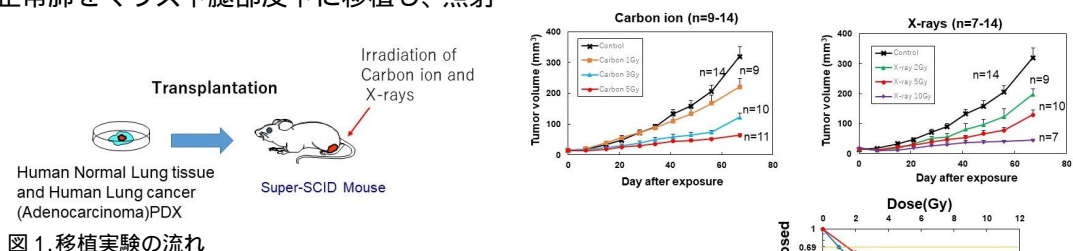


図 1. 移植実験の流れ

に用いた(図 1)。

(2)移植した SCID マウスに量子科学技術研究開発機構にて、炭素線 1Gy、3Gy、5Gy、レフ

図 2. SCID マウスに移植した肺腺がんの照射による抑制効果

ァレンス照射として、X線 2Gy、5Gy、10Gy を照射して、経時的に変化を観察した。図 2 に示すように、線量依存的に増殖抑制が見られ、RBE は 1.5 であった。

(3) SCID マウスに移植した肺腺がん照射 2~4 ヶ月後の組織像を H.E 染色で観察したところ、非照射組織と比べると、照射線量の増加により組織は縮小し、炭素線では間質組織が多く見られた(図 3)。組織像よりがん組織と間質組織との割合を求め、非照射、炭素線 1Gy、3Gy、5Gy、X線 2Gy、5Gy、10Gy では、がん組織はそれぞれ、1300.9、256.2、103.0、46.0、318.0、68.9、29.6mm³と算出できた。照射により増殖抑制は照射線量の増加と共にみられるが、炭素線、X線照射で組織像が異なっていた。

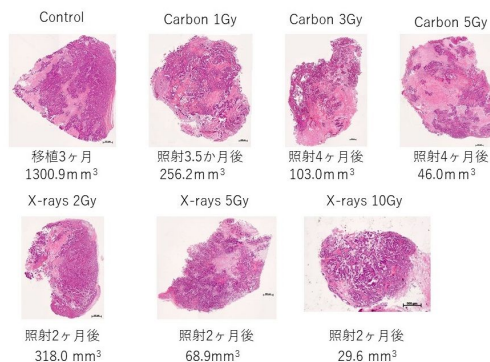


図 3. SCID マウスに移植した肺腺がんの照射組織像

(4) 正常ヒト肺組織を移植した SCID マウスに炭素線 1Gy、2Gy、レファレンス照射として X線 1Gy、3Gy 照射後、2 週間後に摘出し、Affymetrix GeneChip により遺伝子発現解析を行った。非照射肺組織と比較して 4 倍以上の遺伝子発現の増加は、それぞれ、31、19、15、10 個、1/4 倍以上の減少は 50、47、10、10 個であった。共通遺伝子として、遺伝子発現の増加群で HLA-DQB1、PPBP、減少群では、COL11A1、EPYC、ESM1、CYTL1、ANGPT2 であり、照射により構造や血管新生、サイトカイン等に影響があると示唆される(図 4)。また、肺がんに関連する特異的遺伝子変異で問題となる EGFR、K-Ras、ALK、RET、ROS、BRAF、myc、BCL2 について調査したが照射 2 週間においては、これら遺伝子の 4 倍、1/4 倍以上の変化はみられなかった。

	Carbon 1Gy	Carbon 2Gy	X-rays 1Gy	X-rays 3Gy
Increase >4	31 HLA-DQB1	19 PPBP	15 HLA-DQB1	10 PPBP
Decrease <1/4	50 COL11A1 EPYC ESM1 CYTL1 ANGPT2	47	10 COL11A1 EPYC ESM1 CYTL1 ANGPT2	10 COL11A1 EPYC

図 4. 遺伝子発現解析により非照射肺組織と比較して 4 倍、1/4 倍以上の個数と共通遺伝子

(5) 組織像を観察したところ、非照射肺組織と比較しても 2 週間での摘出のためか、構造に大きな変化はみられなかった(図 5)。

炭素線による肺腺がんへの線量依存性の抑制効果はみられたが、正常組織への照射初期の遺伝子発現の影響を明確に捉えることはできなかった。

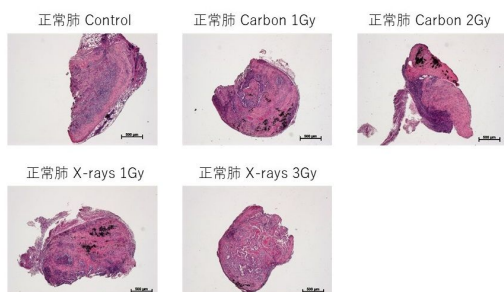


図 5. SCID マウスに移植した正常肺組織の照射組織像

参考文献

- 野村大成、足立成基、梁 治子、坂巻 靖、鳥 正幸、吉留克英、野々村祝夫、古澤佳也、鶴澤玲子。ヒトがん組織等移植 SCID マウスを用いた重粒子線治療の有効性・安全性の研究 放医研 重粒子線がん治療装置等共同利用研究報告書、26 : 56 - 58, 2015. (査読無)
- 野村大成、梁治子、足立成基、坂巻 靖、吉留克英、野々村祝夫、古澤佳也。ヒト組織等移植 SCID マウスを用いた重粒子線治療の有効性、安全性の研究 平成 25 年度放射線総合医学研究所重粒子線がん治療装置等共同利用研究報告書 I 治療・診断・生物 4 月 50-51, 2014. (査読無)
- Dillip Kumar Parida¹, Koji Wakame, Taisei Nomura. Integrating Complementary and Alternative Medicine in Form of Active Hexose Co-Related Compound (AHCC) in the Management of Head & Neck Cancer Patients. International Journal of Clinical Medicine, 2:588-592, 2011. (査読有)
- Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura. Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice.

- Mutat Res., 696,107-113, 2010. (査読有)
5. Nomura T, Hongyo T, Nakajima H, Li LY, Syaifudin M, Adachi S, Ryo H, Baskar R, Fukuda K, Oka Y, Sugiyama H, Matsuzuka F. Differential radiation sensitivity to morphological, functional and molecular changes of human thyroid tissues and bone marrow cells maintained in SCID mice. *Mutat Res.* Nov 17;657(1):68-76, 2008 (査読有)
 6. Fukuda, H. Nakajima, E. Taniguchi, K. Sutoh, H. Wang, P. M. Hande, L. Y. Li, M. Kurooka, K. Mori, T. Hongyo, T. Kubo, T. Nomura. Morphology and function of human benign tumors and normal thyroid tissues maintained in severe combined immune deficient mice. *Cancer Letters*, 132: 153-158, 1998. (査読有)
 7. Nomura, T., Nakajima, H., Hongyo, T., Taniguchi, E., Fukuda, K., Li Y. L., Kurooka, M., Sutoh, K., Hande, T. M., Kawaguchi, T., Ueda, M., and Takatera, H. Induction of cancer, actinic keratosis and specific p53 mutations by ultraviolet light B in human skin maintained in SCID mice. *Cancer Res.*, 57: 2081-2084, 1997. (査読有)
 8. Inohara, H., Matsunaga, T., and Nomura, T. Growth and metastasis of fresh human benign and malignant tumors in the head and neck regions transplanted into scid mice. *Carcinogenesis*, 13: 845-849, 1992. (査読有)
 9. Nomura, T., Takahama, Y., Hongyo, T., Takatera, H., Inohara, H., Fukushima, H., Ono, S., and Hamaoka, T. Rapid growth and spontaneous metastasis of human germinal tumors ectopically transplanted into scid (severe combined immunodeficiency) and scid-nudestreaker mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82: 701-709, 1991. (査読有)
 10. Nomura, T., Takahama, Y., Hongyo, T., Inohara, H., Takatera, H., Fukushima, H., Ishii, Y., and Hamaoka, T. SCID (Severe Combined Immunodeficiency) mice as a new system to investigate metastasis of human tumors. *J. Radiat. Res.*, 31: 288-292, 1990. (査読有)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 野村大成、足立成基、梁 治子、坂巻 靖、種村匡弘、鳥 正幸、吉留克英、辻本正彦、野々村祝夫、古澤佳也、鶴澤玲子	4. 巻 QST-T-13
2. 論文標題 ヒトがん組織等移植SCIDマウスを用いた重粒子線治療の有効性・安全性の研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 2018年度放射線医学総合研究所 重粒子線がん治療等 共同利用研究報告書	6. 最初と最後の頁 59-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野村大成、足立成基、梁 治子、吉井鈴美、坂巻 靖、種村匡弘、鳥 正幸、吉留克英、辻本正彦、野々村祝夫、古澤佳也、鶴澤玲子	4. 巻 QST-T-17
2. 論文標題 ヒトがん組織等移植SCIDマウスを用いた重粒子線治療の有効性・安全性の研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 2019年度放射線医学総合研究所 重粒子線がん治療等 共同利用研究報告書	6. 最初と最後の頁 54-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村大成、足立成基、梁 治子、坂巻 靖、種村匡弘、鳥 正幸、吉留克英、辻本正彦、野々村祝夫、古澤佳也、鶴澤玲子
2. 発表標題 ヒトがん組織等移植SCIDマウスを用いた重粒子線治療の有効性・安全性の研究
3. 学会等名 HIMAC共同利用研究成果発表会
4. 発表年 2019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	野村 大成 (Nomura Taisei) (90089871)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・研究リーダー (84420)	

6. 研究組織（つづき）

	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	梁 治子 (Ryo Haruko) (90301267)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・プロジェクト研究員 (84420)	
研究分担者	吉留 克英 (Yoshidome Katsuhide) (80598813)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・客員研究員 (84420)	
研究分担者	坂巻 靖 (Sakamaki Yasushi) (70623693)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・客員研究員 (84420)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関