

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15537

研究課題名(和文)低線量放射線の短時間間隔複数回照射による放射線抵抗性癌細胞制御効果とその機構解明

研究課題名(英文)The effects of multiple low dose irradiations on radioresistant cancer cells and their mechanisms

研究代表者

寺島 真悟 (TERASHIMA, SHINGO)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：00583733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、高線量率で低線量放射線を短時間のインターバルで複数回照射することにより、総線量が同じ単回照射と比べて癌細胞生存率が効果的に低下することを見出している。本研究では、毎日2 Gyを照射しても増殖し続ける臨床的放射線耐性細胞及び放射線抵抗性の低酸素細胞に対して申請者が考案した照射手法により細胞致死効果の増強が得られことを明らかにした。また、そのメカニズムの一因として照射後に修復されずに残存するDNA2本鎖切断の増加及び遅発性の活性酸素種の影響が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療では、放射線抵抗性の癌細胞による再発が問題となっておりその制御が課題となっている。本研究の結果より、高線量率で低線量放射線を短時間のインターバルで複数回照射する手法は、薬剤を使用せずに簡便に低酸素細胞を含む放射線抵抗性細胞に対して感受性を向上させる有効な手法であり薬剤の仕様による追加の副作用がなく、また放射線治療装置の時間的な面でも効率的である。本手法は臨床への応用を考えたときに簡便に放射線治療の局所制御率の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：I have demonstrated that low dose pulsed radiation at a high-dose-rate, even for very short intervals, decreases cell survival to a greater extent than single exposure to a similar total dose and dose rate. In this study, I demonstrated that the above irradiation method enhanced the cell lethal effect on effect on clinically radioresistant cells, exhibit radioresistance and continue to proliferate stably even after daily irradiation with 2 Gy, and radioresistant hypoxic. The effect of increased DNA double-strand breaks that remain unrepaired after irradiation and delayed reactive oxygen species were suggested as contributing factors to the mechanism.

研究分野：放射線生物学

キーワード：低線量放射線 放射線抵抗性細胞 低酸素細胞 複数回照射

1. 研究開始当初の背景

外科療法、化学療法とともにがんの三大治療の一つである放射線治療は、局所療法で組織の形態と機能を温存できる優れた癌治療である。しかしながら、放射線治療後も残存する放射線耐性細胞や放射線に抵抗性を示す低酸素細胞などの放射線抵抗性癌細胞が、癌の再発や転移の原因となるため(Harada H et al. Nat Commun. 3, 2012)、放射線抵抗性癌細胞の制御が急務の課題である。この解決のためのアプローチの一つとして、抗癌剤や放射線増感剤などの併用が挙げられるが、薬剤による全身的な副作用が問題となるため、薬剤を用いずに放射線による致死効果を高める方法が望まれる。

放射線の生物影響は線量・線量率に依存する。一方で低線量領域(0.5 Gy)において放射線に対する感受性が高くなる『超放射線感受性』と呼ばれる現象が知られており(Marples B et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 70, 2008)、放射線治療への応用も期待されている。しかしながら、この超放射線感受性は細胞の種類や実験条件に依存するという問題があるため、放射線治療への応用の実現には至っていない。申請者は超放射線感受性に関する研究を進める中で、高線量率で低線量放射線(0.25 Gy)を10秒という短時間間隔で複数回照射することにより、総線量ならびに線量率が同じ単回照射と比べて癌細胞生存率が効果的に低下することを見出した(Terashima et al. J Radiat res. 58, 2017)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が考案した低線量放射線を用いた短時間間隔での複数回照射方法が放射線抵抗性癌細胞の癌病態制御に有効かどうかを検証すること、その作用機序を明らかにし、照射間隔制御による難治性癌にも有効な放射線治療戦略を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 使用する放射線耐性癌細胞ならびに低酸素細胞の作製:

放射線耐性癌細胞はヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS から樹立した臨床的放射線耐性 SAS-R 細胞を使用する。SAS-R 細胞は毎日 2 Gy を照射しても安定して増殖し続ける放射線抵抗性を示す SAS 細胞で、東北大学加齢医学研究所で樹立された細胞である(Kuwahara Y et al. Cancer Sci. 100, 2009)。

低酸素細胞は SAS 細胞ならびにヒト肺癌細胞 A549 細胞を BIONIX-1 低酸素培養キットで培養することにより作製した。細胞 dish を入れたパック内の酸素濃度をガス濃度調節剤により 0.4% まで低下させてから、低酸素状態での培養を開始した。低酸素細胞の誘導は、western blotting にて低酸素誘導因子である hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) のタンパク発現により評価した。

(2) 申請者が考案した低線量放射線を用いた短時間間隔での複数回照射方法:

本研究では、X 線発生装置にて 150 kV、0.5 mm Al + 0.1 mm Cu フィルターの条件で細胞に X 線を照射した。本研究では、線量率 2 Gy/min で 10 秒の短時間間隔で低線量 0.25 Gy を複数回照射(以下、複数回照射)した。図 1 には、総線量 2 Gy 時の照射方法の模式図を示している。2 Gy の照射における、単回照射の照射時間は、1 m 2 s、複数回照射の総照射時間は、2 m 20 s である。

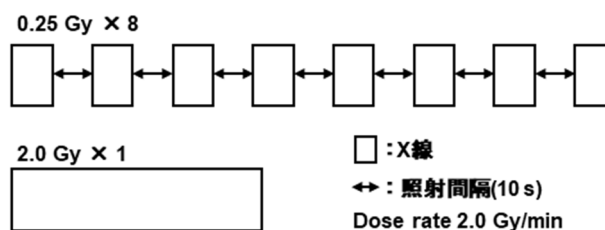


図 1 本研究の複数回照射方法(2 Gy)の模式図

(3) 臨床的放射線耐性細胞に対する複数回照射による細胞増殖能及び細胞生存率の評価:

SAS 及び SAS-R に対して 2 Gy、8 Gy の照射もしくは臨床条件を模擬し 5 日間連続で 1 日 2 Gy の照射を行い、トリパンプルー色素排除法にて細胞数を評価した。また、2、4、8 Gy の照射もしくは 5 日間連続で 1 日 2 Gy の照射を行いコロニー形成法を用いて細胞生存率を評価した。コロニー形成法の結果より、LQ モデルを用いて細胞生存率を 10% に低下させる線量  $D_{10}$  及び(単回照射の  $D_{10}$ ) ÷ (複数回照射の  $D_{10}$ ) で算出される dose-modification factor at 10% survival ( $DMF_{10}$ ) を評価した。

(4) 複数回照射による細胞致死効果の増強のメカニズム解析:

申請者が提案している本研究の複数回照射手法は、低線量域で放射線に対して細胞感受性が増加する超放射線感受性を利用した一般的な複数回照射手法のメカニズムとは一致しておらず、メカニズムは不明であった。本研究の複数回照射による細胞致死効果の増強のメカニズム解析として、SAS 及び SAS-R を用いて DNA 2 本鎖切断(DSB)の指標である H2AX 及び、

DSBの要因として細胞内活性酸素種(ROS)の評価をflow cytometrを用いて行った。

(5) 低酸素細胞に対する複数回照射による細胞増殖能及び細胞生存率の評価:

低酸素細胞にしたSAS及びA549細胞に、8 GyのX線照射を行ったのち、常常酸素下に戻した。照射細胞を再播種し、規定の日数培養後にトリパンブルー色素排除法による細胞数及びコロニー形成法による細胞生存率の評価を行った。

(6) 複数回照射による細胞遊走能及び浸潤活性の評価:

低酸素細胞にX線を照射し、照射細胞の細胞遊走能を創傷治癒アッセイで評価を行い、照射細胞の培養上清を用いて浸潤活性に関わる細胞マトリックス分解酵素(MMP; matrix metalloproteinase)のpro-MMP-9及びMMP-9の発現をゼラチンザイモグラフィにて評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 臨床的放射線耐性細胞に対する複数回照射による細胞増殖能及び細胞生存率:

2 Gy照射では、照射後4日までにSAS及びSAS-Rにおいて単回照射と比較して複数回照射でわずかに細胞数が低下したものの、有意な差は観察されなかった。8 Gy照射では、SASでは照射から4日後において単回照射と比較して複数回照射で優位な細胞数の低下が観察された。照射から6日後においては、SAS、SAS-Rともに単回照射と比較して複数回照射で優位な細胞数の低下が観察された(図2)。

次に、放射線治療の臨床を考慮して2 Gyを5日間照射した場合の本研究における複数回照射がどのような影響を及ぼすかを評価した。5回目の照射終了(Day4)までに両細胞共に有意な細胞数の差は観察されなかった。Day6(5日間の照射終了後から2日後)で両細胞ともに複数回照射において単回照射と比較して有意な細胞数の減少が確認された(図3)。

図4に複数回照射におけるコロニーアッセイの結果を示す。生存率曲線をみるとSAS-Rの方がSASより放射線に抵抗になっていることが確認できる。SAS-Rの2 Gyを除き2、4、8 Gyにおいて単回照射と比較して複数回照射の方が有意に細胞生存率が低下していた。

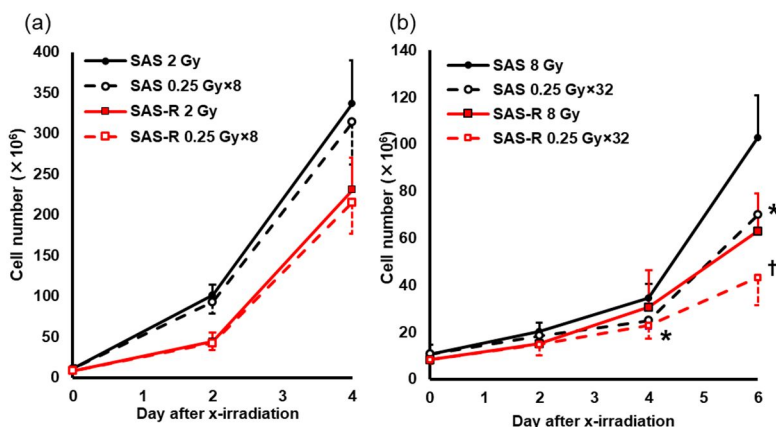


図2 臨床的放射線耐性細胞における単回照射及び複数回照射による細胞増殖能への影響。(a) 2Gy、(b) 8 Gy。\* $P < 0.05$  vs. SAS 単回照射、† $P < 0.05$  vs. SAS-R 単回照射

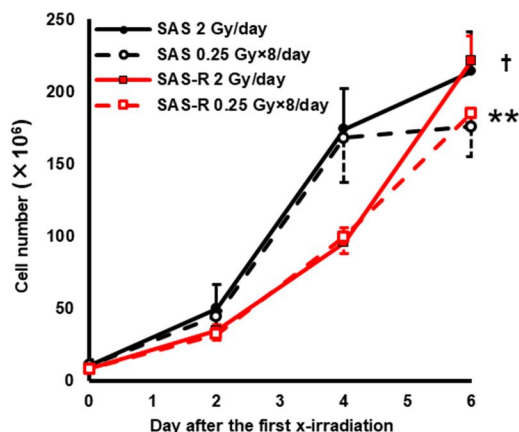


図3 2 Gy/dayの連続5日間照射における単回照射及び複数回照射による細胞増殖能への影響。\* $P < 0.01$  vs. SAS 単回照射、† $P < 0.05$  vs. SAS-R 単回照射

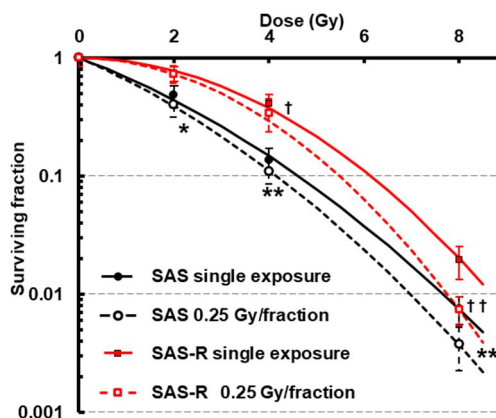


図4 単回照射及び複数回照射による細胞生存率への影響。\* $P < 0.05$  vs. SAS 単回照射、\*\* $P < 0.01$  vs. SAS 単回照射、† $P < 0.05$  vs. SAS-R 単回照射、†† $P < 0.01$  vs. SAS-R 単回照射

生存率曲線の結果より、SAS の  $D_{10}$  は単回照射、複数回照射でそれぞれ 4.6、4.2 Gy となり、SAS-R の  $D_{10}$  は単回照射、複数回照射でそれぞれ 6.1、5.5 Gy となった。 $DMF_{10}$  は、SAS 及び SAS-R でそれぞれ 1.11、1.12 となった。

また、SAS 及び SAS-R 細胞において 2 Gy/day の連続 5 日間照射により、単回照射と比較し複数回照射の方が有意に相対細胞生存率が低下していた(図 5)。

(2) 低酸素細胞に対する複数回照射による細胞増殖能及び細胞生存率の評価:

低酸素状態で 4、8、12 h の培養を行い、western blotting にて HIF-1 $\alpha$  の発現を評価したところ、SAS 及び A549 細胞で共に、4 時間で最大となった。本研究では、低酸素状態で 4 時間の培養を行ったものを低酸素細胞として実験に使用した。

常酸素及び低酸素の条件の SAS 及び A549 において 8 Gy の X 線照射後 3、5 日後において単回照射と比較して複数回照射で優位な細胞数の低下が観察された(図 6)。同様にコロニー形成法による結果でも、常酸素及び低酸素の条件の SAS 及び A549 において単回照射と比較して複数回照射で優位な細胞数の低下が観察された(図 7)。

(3) 複数回照射による H2AX 及び活性酸素種の変化:

DSB 指標である H2AX を flow cytometry を用いて解析した。2 Gy 照射では、照射より 0.5、1、4、24 h で解析を行ったが、単回照射と複数回照射ではほとんど差がなかった。しかしながら、8 Gy を照射した場合、ピーク到達後よりわずかではあるが単回照射より複数回照射の方が高い H2AX 量が観察された(図 8)。SAS では照射後 24 時間後よりわずかではあるが徐々に差が拡大していき 72 時間後においては H2AX 量の有意に高い値を示した。SAS-R では有意な差は観察されなかったが、4 時間後より単回照射より複数回照射の H2AX 量が高い状態が続いた。

8 Gy 照射において、H2AX のデータより本手法の複数回照射により 24 時間で降も修復されない DSB が残存しており、そのことが細胞致死効果を増強していると考えられ、低線量の分割照射により効率的な DSB 修復が阻害されている可能性が示唆された。このことより、超放射線感受性などの低線量の影響だけでなく、ある間隔をあけて 2 回の照射を行った場合に、DNA DSB 修復が阻害される現象である Low and Repeated Dose effect も本手法のメカニズムに関与していると考えられた。

8 Gy の照射における複数回照射による ROS の影響を照射後 1、2、3 日後で評価した。ROS 検出試薬として、hydroxyphenyl fluorescein (HPF)、Dihydrorhodamine 123 (DHR123) 及び dihydroethidium (DHE) の 3 つを用いた。HPF では、単回照射と複数回照射では ROS 量にほとんど変化はなかった。DHR123 はミトコンドリア由来の ROS の検出試薬として使用される蛍光プローブである。SAS 及び SAS-R において照射 2 日後において単回照射と比較し複数回照射で有意な DHR123 の蛍光強度の上昇が観察された(それぞれ  $p = 0.001$ 、 $0.04$ )。細胞内 superoxide の蛍光プローブとして利用される DHE においては、照射より 3 日後で SAS にのみ

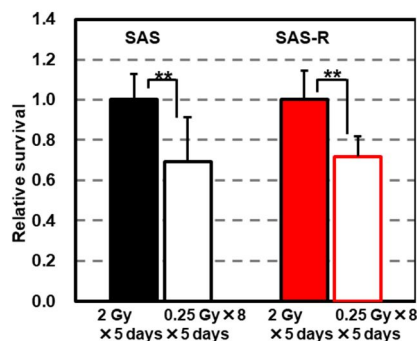


図 5 2 Gy/day の連続 5 日間照射における単回照射及び複数回照射による細胞生存率への影響。\*\* $P < 0.01$  vs. 単回照射

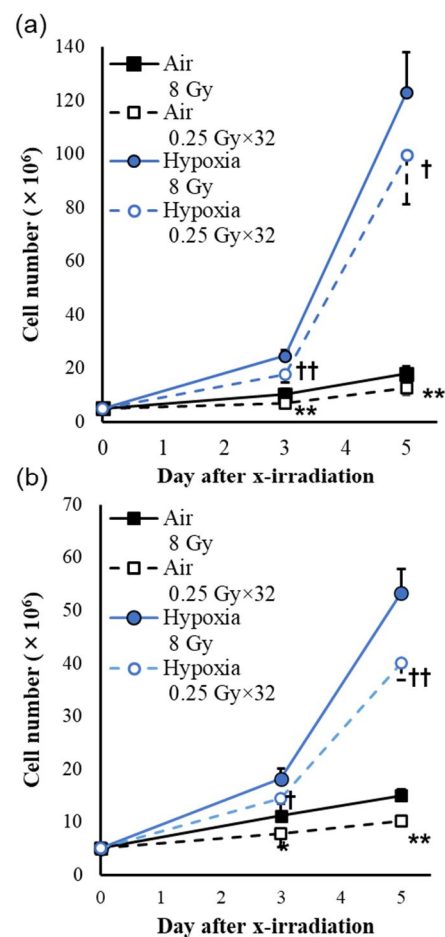


図 6 低酸素細胞における単回照射及び複数回照射による細胞増殖能への影響。(a) SAS (b) A549  
\*\* $P < 0.01$  vs. 常酸素下における単回照射、† $P < 0.05$  vs. 低酸素下における単回照射、†† $P < 0.01$  vs. 低酸素下における単回照射

有意な蛍光強度の増強が観察されたが、タイミング的にはミトコンドリアからの superoxide の露出が影響していると考えられる。

(4) 複数回照射による細胞遊走能及び浸潤活性能の評価:

しばしば、低線量の放射線は通常の線量域とは異なる結果を示す場合があり、本手法の低線量の複数回照射により癌病態制御の向上を期待して細胞遊走、浸潤活性能を評価した。8 Gy の X 線照射後に、SAS では 10 時間後、A549 では 40 時間後に創傷治癒アッセイにて創傷閉鎖率や移動量を評価したが、常酸素及び低酸素細胞ともに単回照射と複数回照射で大きな変化は観察されなかった。

8 Gy の X 線照射 48 時間後に培養上清を回収し pro-MMP-9 及び MMP-9 の発現をゼラチンゼイモグラフィにて評価を行ったが、SAS 及び A549 において常酸素及び低酸素細胞ともに単回照射と複数回照射で大きな変化は観察されなかった。

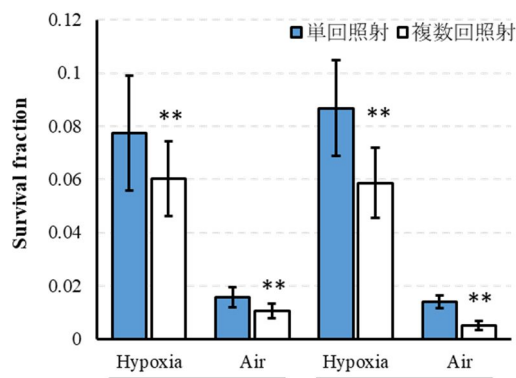


図 7 低酸素細胞における単回照射及び複数回照射による細胞生存率への影響。 \*\* $P < 0.01$  vs. 単回照射

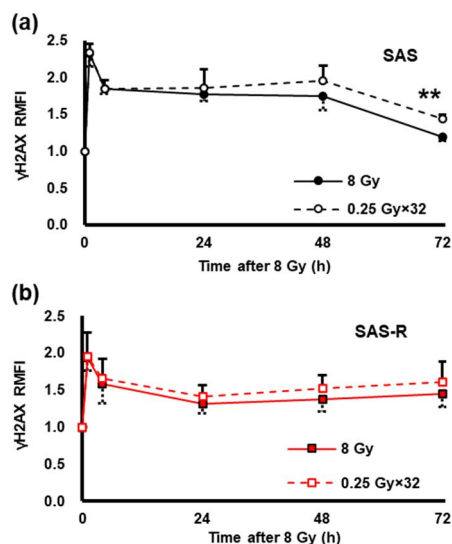


図 8 単回照射及び複数回照射による H2AX 量の変化。 \*\* $P < 0.01$  vs. 単回照射。(a) SAS (b) SAS-R

研究成果より、毎日 2 Gy を照射し続けても増殖を続ける臨床的放射線耐性細胞及び放射線抵抗性を示す低酸素細胞に対しても、本研究における複数回照射が有効であることが示された。本手法は、抗癌剤や放射線増感剤を用いずに照射間隔を制御することで簡便に放射線感受性を向上させられるというメリットがある。さらに照射間隔による遅延がわずかであるため臨床にも適用しやすいと考えられる。細胞遊走能及び浸潤活性能に対しては、本研究での照射方法は通常照射と変わりなかったが、癌の転移や再発原因となる抵抗性細胞や低酸素細胞に対しても有意な細胞致死効果の増強が得られたことは癌病態制御に有効であり、臨床への応用を考えたときに放射線治療の局所制御率の向上が期待できると考えている。

また、本研究のように、低線量を複数回照射する手法は様々あるが、複数回照射による照射の遅延のため照射間隔を含めた総照射時間が非常に長く、またそのため線量を増加させて実験することが困難なためか、低線量超放射線感受性がメカニズムとして、直接的に細胞致死効果の増強のメカニズムを証明している報告はほとんどない。本研究で提案する複数回照射の照射法は、照射の遅延による追加時間が少ないため 8 Gy の高線量までの照射が可能であり、複数回照射の細胞致死効果の増強の作用機序として DNA DSB の指標である H2AX の残存、及び DSB の要因として細胞内 ROS の関与が示唆することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>寺島 真悟、駒井 史雄、菅原 大夢、高橋 由佳、木村 直希、横山 昂生、岩崎 晃、細川 洋一郎、須崎 勝正 | 4. 巻<br>70          |
| 2. 論文標題<br>RTPSを用いた全身照射におけるMU値及び補償物質の検討                         | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>弘前医学  | 6. 最初と最後の頁<br>47～55 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.32216/hirosakiigaku.70.1_47       | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）                           | 国際共著<br>-           |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>K Masaki, S Terashima, H Endo, S Komori, T Kato   | 4. 巻<br>-           |
| 2. 論文標題<br>The method of obtaining point kernels for use in the convolution dose calculation in radiation therapy | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Proceeding of the 25th EGS Users' Meeting in Japan  | 6. 最初と最後の頁<br>11-18 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-           |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Akari Homma, Hirofumi Tazoe, Masatoshi Yamada, Shingo Terashima and Yoichiro Hosokawa                    | 4. 巻<br>7             |
| 2. 論文標題<br>Development of a Method for Analysis of Radionuclides in Biological Samples Using ICP Mass Spectrometer | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Radiation Environment and Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>102-109 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Terashima Shingo, Yoshino Hironori, Kuwahara Yoshikazu, Sakuraba Hiro, Hosokawa Yoichiro                   | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>The Effect of High-Dose-Rate Pulsed Radiation on the Survival of Clinically Relevant Radioresistant Cells | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Life   | 6. 最初と最後の頁<br>1295～1295 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/life11121295  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>真崎敬大, 寺島真悟, 遠藤浩光, 小森慎也, 加藤貴弘        |
| 2. 発表標題<br>放射線治療の線量計算に用いる point kernelの作成方法の検討 |
| 3. 学会等名<br>第25回 EGS研究会                         |
| 4. 発表年<br>2018年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>寺島 真悟、桑原 義和、福本 学、細川 洋一郎       |
| 2. 発表標題<br>低線量放射の短時間隔複数回照による臨床的耐性細胞へ影響評価 |
| 3. 学会等名<br>第56回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会         |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 弘前大学 研究者総覧<br><a href="http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000267_ja.html?k=%E5%AF%BA%E5%B3%B6">http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000267_ja.html?k=%E5%AF%BA%E5%B3%B6</a> |
|---|

| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|