

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15632

研究課題名（和文）LETの違いによる重粒子線のがん転移に対する影響

研究課題名（英文）Effect of LET of heavy ion beam on cancer metastasis

研究代表者

林 和彦（Hayashi, Kazuhiko）

大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：70718981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題の実験結果より、LETが、がん浸潤能の抑制に寄与することが示された。また、そのメカニズムは、炭素イオン線照射によって、細胞内カルシウム濃度調節に関与する、Calmodulinの抑制によって、細胞運動ならびに浸潤能に関わるRhoファミリータンパクの抑制であった。結論として、今後の炭素イオン線治療において最適な照射条件(LET)の選定を行なう事は、殺細胞効果の観点だけでなく、転移抑制効果の面で重要な因子となる事が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炭素イオン線治療成績向上の為に、現在線エネルギー付与（LET）の増加が試みられている。一般的に、LETが増加すると同一線量であっても、殺細胞効果は高まる。本研究課題では、LETの増加が殺細胞効果のみならずがん細胞の転移の一因となる、細胞浸潤能も抑制することを見出した。今後発展する粒子線治療の新たな有効性を見出したと言える。

研究成果の概要（英文）：LET contributes to the suppression of cancer invasive capabilities. The mechanism is the suppression of Rho family proteins involved in cell motility and invasion by the suppression of Calmodulin, which is involved in the regulation of intracellular calcium concentration by carbon-ion irradiation. In conclusion, the selection of LET for future carbon-ion therapy will be an important factor on not only cell killing effect but also inhibition of metastatic potentials.

研究分野：放射線治療

キーワード：炭素イオン線 LET 浸潤能

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の背景として、がん患者の急速な増加と高齢化に伴い、より浸襲性の少ないがん治療が望まれていた。また、医療費の高騰を抑制するためにも、コスト的にも有利ながん治療が期待される状況であり、その両面から放射線治療の適応は急激に高まっている状況であった。炭素イオン線や陽子線といった粒子線を用いた放射線治療により、今まで治療成績が不良であった腫瘍に対しても、良好な治療成績が得られていたが、外科、化学療法を含む集学的な局所療法の進歩で、良好な局所制御がなされるようになってきている当時においても、がんの遠隔転移は最大の課題であった。がん転移の有無は生存率に大きく影響し、がん患者の予後に関わる。よって、転移を抑制する為の生物学的指標を得ることは、今後、生物学的因子を修飾した放射線治療を考える上で必須であると考えた。

放射線医学総合研究所病院で行われている炭素イオン線治療で用いられている線エネルギー付与 (LET) は、40 keV/ $\mu\text{m}$  程度である。LET とは、放射線の飛跡に沿って単位長さあたりに物質が受け取るエネルギー量のことであり、この値が大きい程、腫瘍内酸素濃度の影響を受けにくくなり高い殺細胞効果が得られるが、照射野内の LET の分布は均一でない。その為に、治療後の照射野範囲内から局所再発あるいは遠隔転移が起きる例は少なくない。近年、細いビームを用いて照射野内を塗りつぶす様に照射できるスポットスキャン照射法とビームを様々な角度から照射できる回転ガントリー照射装置の臨床導入が進み、線量集中性の改善および照射野内での LET ペインティングが可能となってきた。つまり、照射野内の線量増加と LET 均一性の保持が期待できる。また、複数の核種を同時に重ね合わせて照射する強度変調混合イオン照射法 (Intensity modulated composite particle therapy: IMPACT) による照射野内 LET の増加を期待できる試みも出てきた。この様に、炭素イオン線の効果を最大限に引き出す為に LET の修飾を目指した研究が進んでいるが、当時は LET とがん転移能の関係を示した報告がなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、炭素イオン線の LET とがん転移に関係する因子の間に関係があるか否かを解析し、がん転移抑制に効果的な 1 回線量、LET など炭素イオン線治療成績向上の為の基礎的データを取得することにあつた。

## 3. 研究の方法

- (1) コロニー形成試験 対象の細胞に炭素イオン線(290 MeV/u, mono)を、LET を 15, 50, 85 keV/ $\mu\text{m}$  と条件を変えて照射した。炭素イオン線照射直後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、トリプシン処理を行った。その後、60 mm ディッシュに細胞を播種した。培養後 14 日目に 10% ホルマリンで固定し、0.04% クリスタルバイオレット溶液で染色した。染色後、各コロニーの細胞数が 50 個以上の細胞塊を生存細胞としてカウントし、生存率 (Surviving Fraction: SF) を算出した。生存率は linear-quadratic (LQ) モデル ( $SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$ ) に当てはめ近似曲線を描いた。D は放射線量、 $\alpha$ ,  $\beta$  は係数を示す。
- (2) マトリゲルを用いた浸潤アッセイ 対象の細胞に炭素イオン線(290 MeV/u, mono)を、LET を 15, 50, 85 keV/ $\mu\text{m}$  と条件を変えて照射した。細胞照射は、0.5, 1 Gy を照射する方法と、各 LET で細胞生存率が 70% となる線量を照射する方法の 2 種類を用いた。照射後、24 時間後に培養フラスコに接着している細胞のみを、マトリゲル (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をコートしたケモタキセル (pore size = 8  $\mu\text{m}$ ) の上層

に  $3.0 \times 10^5$  cells / well となるように播種した。細胞播種 24 時間後、ケモタキセルの下層に移動した細胞を、浸潤細胞としてカウントした。

- (3) タンパク発現解析 対象の細胞に炭素イオン線(290 MeV/u, mono)を、LET を 15, 50, 85 keV/ $\mu$ m と条件を変えて照射した。各条件の細胞に対して照射 24 時間後のライセートを回収し、細胞浸潤に関わるタンパク発現をウェスタンブロットにより解析した。
- (4) 細胞免疫染色 細胞は、4 ウェルチャンバースライド(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)でコンフルエントになるまで培養した。対象の細胞に炭素イオン線(290 MeV/u, mono)を、LET を 15, 50 keV/ $\mu$ m と条件を変えて照射した。照射後、滅菌した 200  $\mu$ L のピペットチップを用いて細胞の単層をまっすぐにスクラッチし、PBS で 1 回洗浄した。照射 24 時間後、細胞を 4% パラホルムアルデヒド溶液で 30 分間、室温で固定し、PBS 中の 0.5% Triton X-100 で 10 分間、透過処理を行った。細胞を PBS 中の 10% ウシ血清アルブミン(BSA)で 1 時間、室温でブロックした。GM130 に対する一次抗体(BD Biosciences, Tokyo, Japan)と室温で 1 時間インキュベートした。その後、PBS で洗浄し、FITC を結合させた抗マウス IgG 抗体(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)と室温で 1 時間インキュベートした。蛍光像は、レーザー共焦点顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE, Osaka, Japan)で得た。

#### 4. 研究成果

- (1) ヒト乳がん細胞 MDA-MB 231 に対する炭素イオン線照射後のコロニー形成試験の結果を Fig.1 に示す。その結果、LET 15 keV/ $\mu$ m の条件に比べて、50, 85 keV/ $\mu$ m の LET を持つ炭素イオン線の方が、同じ線量であっても殺細胞効果が高いことが分かった。しかし、50 keV/ $\mu$ m と 85 keV/ $\mu$ m の間には、有意な殺細胞効果の差は、みられなかった(Fig.1 B)。

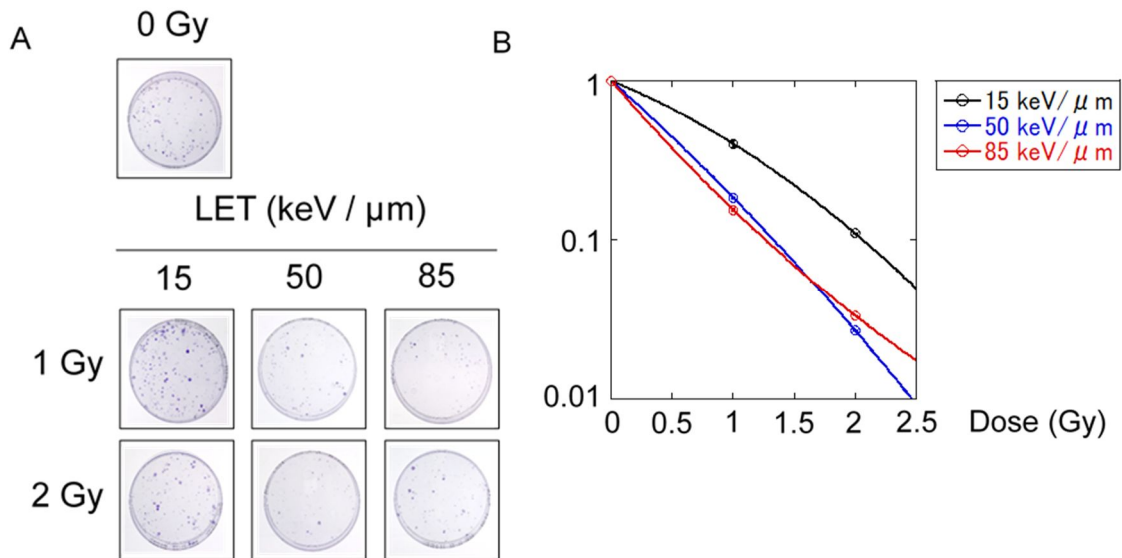


Fig.1 乳がん細胞 MDA-MB 231 における LET 別照射による細胞生残率の違い。A. 各条件のコロニー形成の様子。B. 細胞生残率曲線。横軸に線量、縦軸に細胞生残率をプロットした。

(2) 各 LET における細胞浸潤能を検討した結果、殺細胞効果が同程度であった 50, 85 keV/μm の間に有意な差はみられなかったが、線量依存的に浸潤細胞数が減少していることが分かった (Fig.2 A) . 更に、同一の細胞生残率(70%生残)となる様に、各 LET の条件下で細胞に照射し、細胞浸潤能を比較検討した . その結果、同一の細胞生残率にも関わらず LET 依存的に細胞浸潤能が抑制された (Fig.2 B) .

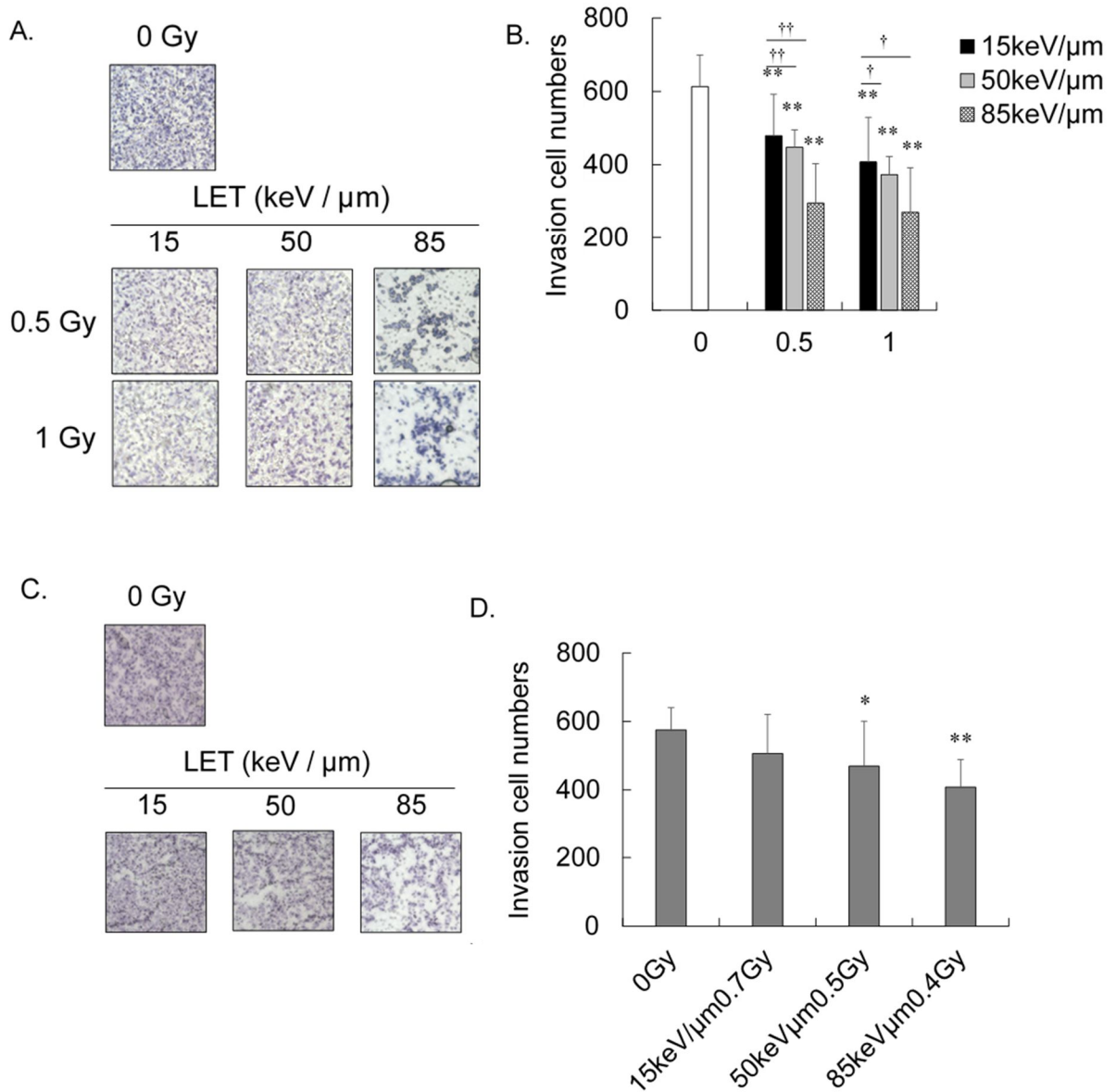


Fig.2 乳がん細胞 MDA-MB 231 における LET 別照射による浸潤細胞の違い . A. 各 LET 条件の細胞浸潤の様子 . B.各 LET 条件における細胞浸潤能 . 横軸に線量, 縦軸に浸潤細胞数をプロットした . C. 各 LET における同一細胞生残率線量照射後の細胞浸潤の様子 . D. 各 LET における同一細胞生残率線量照射における細胞浸潤能 . 横軸は, 各 LET 値ならびに対応する線量, 縦軸に浸潤細胞数をプロットした .

(3) LET 依存的に細胞浸潤能が抑制される現象に対する分子メカニズムを探索する為に、小胞体ストレスマーカーである eIF2α と calmodulin の発現を検討した . その結果、炭素イオン線照射された細胞の calmodulin の発現が、線量依存的に抑制されていた ( Fig.3 A) . そこで、

細胞内カルシウム濃度と関わり、細胞浸潤に関わる Rho ファミリータンパク、RhoA ならびに Rac1 の発現を検討した。すると、RhoA ならびに Rac1 の活性型発現が抑制された (Fig.3 B)。最後に、細胞方向性を決定する因子である細胞内小器官であるゴルジ体の位置を検討した。すると、細胞運動の方向に向くはずのゴルジ体の向きが、炭素イオン線の LET 依存的に均一性を失っていた (Fig.3 C)。

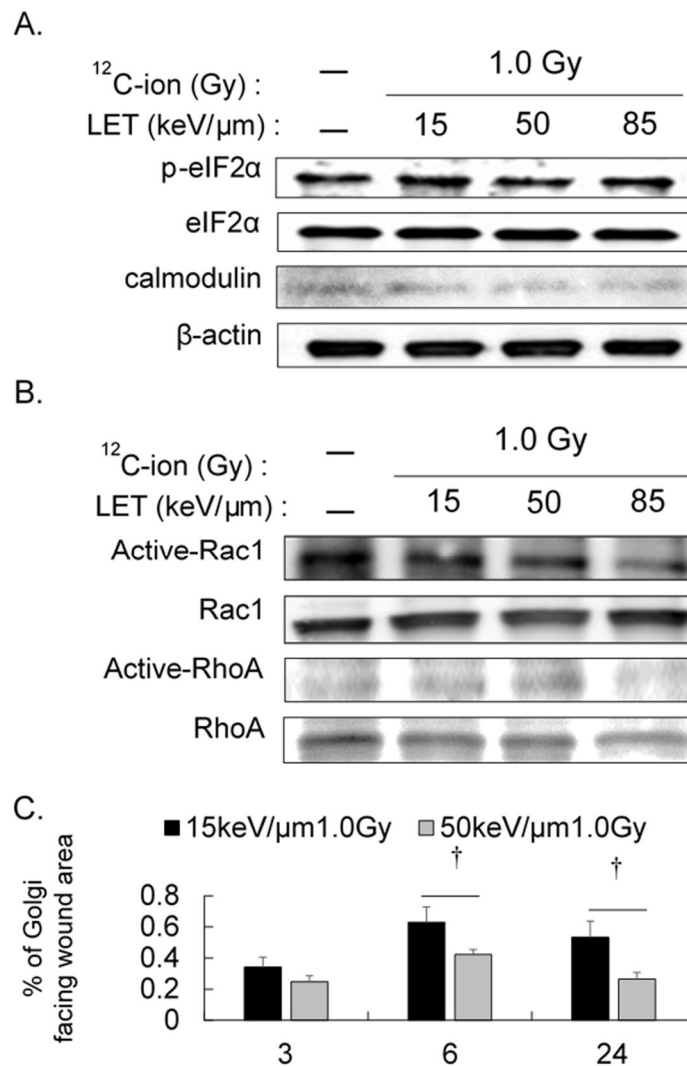


Fig.3 乳がん細胞を用いた、LET 依存性細胞浸潤抑制メカニズムの解析。A. eIF2 のリン酸化発現、ならびに calmodulin の発現検討。B. 炭素イオン線照射による、Rho ファミリータンパクに与える影響。C. 炭素イオン線の細胞運動に与える影響。

本研究課題の実験結果より、LET が、がん浸潤能の抑制に寄与することが示された。また、そのメカニズムは、炭素イオン線照射によって、細胞内カルシウム濃度調節に関与する、Calmodulin の抑制によって、細胞運動ならびに浸潤能に関わる Rho ファミリータンパクの抑制であった。結論として、今後の炭素イオン線治療において最適な照射条件(LET)の選定を行なう事は、殺細胞効果の観点だけでなく、転移抑制効果の面で重も重要な因子となる事が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Hayashi K, Koto M, Ikawa H, Hagiwara Y, Tsuji H, Ogawa K, Kamada T.	4. 巻 136
2. 論文標題 Feasibility of Re-irradiation using carbon ions for recurrent head and neck malignancies after carbon-ion radiotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiother Oncol.	6. 最初と最後の頁 148-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radonc.2019.04.007.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Anzai M, Yamamoto N, Hayashi K, Nakajima M, Nomoto A, Ogawa K, Tsuji H.	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 Safety and Efficacy of Carbon-ion Radiotherapy Alone for Stage III Non-small Cell Lung Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 379-386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13963.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Koba A, Hayashi K, Suzuki O, Kawaguchi Y, Ogawa K, Chatani M.	4. 巻 19(3)
2. 論文標題 Stereotactic body radiotherapy feasibility for patients with peripheral stage I lung cancer and poor pulmonary function.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 2515-2521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11333.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------