

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390325
 研究課題名（和文） 放射線感受性を左右する分子の探索と画像化に関する基礎的検討
 研究課題名（英文） Experimental study on identification and imaging of a molecule influencing radiosensitivity
 研究代表者
 三橋 紀夫 (MITSUHASHI NORIO)
 東京女子医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20008585

研究成果の概要：放射線生物学的に線量集中を可能にするために、放射線感受性に関与する分子を同定し、それら分子の局在ならびに照射前後の質的、量的変化を画像化するための基礎的研究を行ったところ、tyrosine kinase ならびにその下流に位置する分子や DNA 障害部位のセンサーと考えられている H2AX フォーカス形成は放射線感受性を予知しうる候補分子となることが明らかとなった。また、生検組織の免疫組織染色で E-cadherin (CAD) と CAD の負の制御因子として働いている Dysadherin (DAD) の発現と放射線感受性とに相関があることも明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	7,200,000	2,160,000	9,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線感受性, tyrosine kinase, シグナル伝達, DNA 損傷, 接着因子, 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は臓器温存が可能な体に優しい治療であること、さらに、近年のコンピュータ技術の進歩によって放射線治療機器が急速に発展したことなどから、本邦でもがん患者に対して放射線治療が選択される頻度が増加してきている。また、さらなる新しい放射線治療の開発が今後のがん治療の進歩に非常に重要な位置を占めてくるものと考え

られる。しかし、これらの新しい治療技術を用いた放射線療法を施行したとしても、十分な局所制御が困難な悪性腫瘍はいまだ多く存在する。局所制御を困難にしている原因としては、大きく放射線物理学的な原因と放射線生物学的な原因に分けることができる。

腫瘍の局所制御率を向上させるためには、周囲正常組織に照射される線量を増加させることなく腫瘍への線量を集中させる必要

性があったが、放射線物理学の進歩によって、IMRT や IGRT さらには IGIMRT などの新たな放射線治療法が開発され、物理学的な腫瘍への線量の集中に関しては解決されつつある。これまではいかに照射野内を均等に照射するかに努力が払われてきたが IMRT の開発によって絵を書くように不均一に腫瘍内を照射し分けることが可能な dose painting と呼ばれる線量計算法が開発された。そこで、腫瘍の局在診断のみならず、腫瘍組織内の腫瘍の特性や放射線感受性の不均一性 (heterogeneity) を明らかとし、生物学的にも線量の集中が行われなければ、良好な空間的線量分布が可能な IMRT や IGIMRT を十分に生かすことは出来ない。ところが、現在行われているような CT や MRI といった解剖学的画像を参考として治療計画を行っていたのでは、腫瘍の小浸潤巣を検出して照射野を決定したり、腫瘍の特性や放射線感受性を考慮して腫瘍を不均一に照射することは不可能である。そこで、腫瘍の進展範囲の機能画像による正確な把握のみならず、1) 腫瘍細胞自体が有する放射線感受性の違い、2) 腫瘍内環境を含む腫瘍組織の違い、3) 腫瘍組織外環境の違いなどの放射線生物学的因子を機能画像上に描出し、生物学的悪性部位には線量を増加する必要がある標的として IMRT などの高精度放射線治療計画を立てる必要がある。

2 . 研究の目的

本研究の目的は放射線生物学的に線量集中を可能にするために、放射線感受性に関与する分子を同定し、それら分子の照射前後における局在の変化ならびに質的、量的変化を画像化する基礎研究を行うことである。

3 . 研究の方法

1 . 放射線感受性や反応性が異なる癌細胞の放射線照射による遺伝子発現パターンおよび照射により活性化または抑制されるシグナル伝達とその分子を検討し、これらのデータからそれぞれの癌細胞で放射線感受性を規定する分子を絞り込むとともに、照射による発現変化を画像解析装置で解析する。

2 . DNAの2重鎖切断の修復部位にフォーカスを形成するH2AXの変化について放射線感受性との相関ならびに経時的变化について蛍光抗体法を用いて定量的に検索する。また、H2AXフォーカスにcolocalizeするNbs1フォーカス形成についても同様に検索し画像化を試みる。

3 . 細胞接着因子として癌の転移に深く関与していることが知られている E-cadherin (CAD) と CAD の負の制御因子として働き、種々の癌でその発現が転移や治療効果に重要な働きをしていることが示唆されている Dysadherin (DAD) の発現と放射線治療効果との相関について放射線治療が施行された頭頸部癌 48 例を対象として、生検もしくは切除材料を用いて免疫組織学的染色にて検索し、CAD および DAD の発現と放射線治療の局所効果、治療後の再発形式との相関について解析する。

4 . 研究成果

1 . tyrosine kinase の放射線照射による活性化と局在の変化

EGFR の下流に位置する p42/p44 ERK が放射線照射によって活性化された際の局在の変化について検討したところ、照射前には細胞質内に局在している p42/p44 ERK は 2 Gy の照射によって 30 分後にはリン酸化され核内に移行したが、阻害剤である PD98059 によって

核内への移行が抑制された。Hsp90 シャペロンコンプレックス阻害剤である Radicicol は、照射によってリン酸化され核内に移行する p42/p44 ERK と Akt の核内移行を阻害した。また、PDK1 は Hsp90 と直接結合することで、Radicicol との結合が阻止され不活性化を免れていることが、免疫沈降法と共焦点顕微鏡を用いた検索で明らかとなった。このように tyrosine kinase ならびにその下流に位置する分子は放射線感受性を予知しうる候補分子となることが明らかとなった。

2 .H2AX のフォーカス形成と放射線感受性との相関

H2AX は DNA 障害によってリン酸化され DNA の二重鎖切断部にフォーカスを形成することから DNA 障害部位のセンサーとして研究が進んでいる。そこで、H2AX フォーカス形成を画像化することで、温熱や放射線感受性が予知できるかどうか前立腺癌細胞株ならびに A549 細胞を用いて *in vitro* の系で検索した。3 種の放射線感受性の異なる前立腺癌細胞株の放射線照射後の H2AX フォーカス形成能ならびにフォーカスの消失時間について検索すると、放射線感受性株では抵抗性株に比してフォーカスの数が有意に多く、またフォーカスの消失が遅延した。また、温熱でも H2AX のフォーカスは出現するが、放射線に比してフォーカスの数は少なく、出現までの時間は遅かった。さらに、温熱は放射線照射によって誘導される H2AX のフォーカス形成を抑制し、DNA 損傷からの回復過程を修飾しているものと考えられた。以上から H2AX は放射線感受性を表わす画像化の候補分子となりうる可能性が明らかとなった。

3 . E-cadherin (CAD) ならびに Dysadherin (DAD) の発現と放射線治療効果

放射線治療の局所効果は CR : 26 例、PR : 18 例、SD : 4 例であり、5 年原病生存率は 52%

であった。後発リンパ節転移は 16 例、遠隔再発は 6 例に認められた。CAD 発現の認められなかった 24 例のうち、14 例で DAD の発現が認められた。一方、CAD 発現の認められた 24 例のうち、10 例で DAD の発現が認められた。CAD と DAD の発現には、有意差に至らないものの逆相関の傾向が認められた。局所効果 (腫瘍完全消失率 : CR) と DAD の発現強度との相関を検討すると、DAD 発現が弱い grade 0-1 症例では CR が 70%であったのに対して、発現が強度な grade 2 症例では CR は 38%と、DAD が強発現している症例で照射効果が有意に不良であった ($p < 0.05$)。CAD 発現と DAD 発現はそれぞれ単独では、生存率や再発形式との間に相関は認められなかったが、DAD の発現の Grade から CAD の発現の Grade を引いた値が 1 以上の症例、すなわち DAD 発現が CAD 発現より相対的に高い症例、ではリンパ節または遠隔再発の頻度が有意に高かった (55% vs. 22% : $p < 0.05$)。この結果は DAD が CAD の機能に対して抑制的に作用することが原因と推測される。また、本研究では DAD が強発現を示す症例の放射線治療効果は DAD の発現が低い症例に比較して有意に不良であり、DAD の発現が放射線抵抗性に関与している可能性が高いと考えられた。DAD は腫瘍塊のなかでも浸潤傾向の強い部位に強発現することも知られており、DAD の発現が放射線治療に対する抵抗性や腫瘍の好転移能に関与していることが予測された。

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 10 件)

- 1) Nishimura, Y., Mitsuhashi, N., et al. (他 8 名, 10 番目): A Randomized Phase II Study of Cisplatin/5-FU Concurrent Chemo radiotherapy for Esophageal Cancer: Short-term Infusion versus

- Protracted Infusion Chemotherapy (KR0SG0101/JROSG021). Radiother.Oncol., 2009. (in press) 査読有.
- 2) Isomura, M., Akimoto, T., Mitsuhashi, N., et al. (他 17 名, 9 番目): IL12RB2 and ABCA1 genes are associated with susceptibility to radiation dermatitis. Clin.Cancer.Res., 14(20):6683-6689, 2008. 査読有.
 - 3) Muramatsu, H., Akimoto, T., Maebayashi, K., Mitsuhashi, N., et al. (他 1 名, 5 番目): Prognostic significance of Dysadherin and E-cadherin expression in patients with head and neck cancer treated by radiation therapy. Anticancer.Res., 28(6D):3859-3864, 2008. 査読有.
 - 4) 前林勝也, 那須佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫 (他 5 名, 9 番目): 安静呼吸下体幹部定位放射線治療時の呼吸性移動の対処法. 臨床放射線, 53(3):387-395, 2008. 査読無.
 - 5) 三橋紀夫: 放射線に対する細胞応答の分子機構. 医学の歩み, 227(9):644-649, 2008. 査読無.
 - 6) 中村 努, 太田正穂, 三橋紀夫 (他 4 名, 7 番目): 進行食道癌に対する根治的 化学放射線療法と手術の遠隔成績の比較. 消化器科, 46(5):511-515, 2008. 査読無.
 - 7) 前林勝也, 那須佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫 (他 4 名, 8 番目): 放射線腫瘍学. 血液・腫瘍科, 56(4):425-431, 2008. 査読無.
 - 8) 清塚 誠, 秋元哲夫, 那須佐知子, 前林勝也, 三橋紀夫 (他 7 名, 12 番目): 前立腺癌に対する寡分割照射法による強度変調放射線治療後の急性・晩期有害事象の検討. 臨床放射線, 53(12):1731-1737, 2008. 査読無.
 - 9) 羽生裕二, 秋元哲夫, 那須佐知子, 三橋紀夫 (他 2 名, 6 番目): 臨床技術講座 前立腺 IMRT の治療計画の手順. 日本放射線技術学会雑誌, 63(11):1303-1309, 2007. 査読無.
 - 10) 羽生裕二, 黒岡将彦, 那須佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫: IMRT の治療計画から治療開始までの手順ならびに問題点. 頭頸部癌, 33(3):322-326, 2007. 査読無.
- [学会発表](計 33 件)
- 1) 秋元哲夫・三橋紀夫: 前立腺癌の生物学的特性を考慮した放射線治療方法の可能性. 第 11 回癌治療増感研究シンポジウム, 2009.2.15, 奈良
 - 2) 那須佐知子, 秋元哲夫, 清塚 誠, 茂木厚, 橋本弥一郎, 中村香織, 前林勝也, 橋本恭伸, 田邊一成, 三橋紀夫: 前立腺癌に対する放射線治療後による急性反応と QOL の変化 - 強度変調放射線治療, シード永久挿入, 外照射併用高線量率組織内照射の比較 -, 第 4 回泌尿器腫瘍放射線研究会, 2008.11.1, 名古屋
 - 3) 秋元哲夫, 清塚 誠, 那須佐知子, 橋本弥一郎, 茂木 厚, 中村香織, 前林勝也, 橋本恭伸, 石川 仁, 三橋紀夫: 前立腺癌に対する術中計画による高線量率組織内照射-CT 治療計画との比較-, 第 46 回日本癌治療学会総会, 2008.11.1, 名古屋
 - 4) 橋本弥一郎, 前林勝也, 茂木 厚, 清塚 誠, 中村香織, 泉 佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫, 丸山隆志, 村垣善浩, 久保長生, 堀智 勝: 膠芽腫の治療成績, 第 46 回日本癌治療学会総会. 2008.11.1, 名古屋
 - 5) 前林勝也, 橋本弥一郎, 茂木 厚, 清塚 誠, 中村香織, 泉 佐知子, 村松博之, 高橋満弘, 三橋紀夫, 丸山隆志, 村垣善浩, 久保長生, 堀智 勝: 悪性神経膠腫(WHO Grade3)の治療成績, 第 46 回日本癌治療学会総会, 2008.11.1, 名古屋
 - 6) 中村香織, 秋元哲夫, 唐澤久美子, 前林勝也, 泉 佐知子, 清塚 誠, 橋本弥一郎, 茂木 厚, 三橋紀夫: IVA-B 期中咽頭癌に対する機能温存を目指した化学放射線治療成績, 第 46 回日本癌治療学会総会, 2008.10.31, 名古屋
 - 7) 清塚 誠, 秋元哲夫, 福留美夏, 茂木厚, 三橋紀夫: 放射線照射による EGF 受容体の活性化と二量体形成, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008.10.28, 名古屋
 - 8) 茂木 厚, 秋元哲夫, 清塚 誠, 那須佐知子, 橋本弥一郎, 中村香織, 前林勝也, 橋本恭伸, 田邊一成, 三橋紀夫: 前立腺癌に対するシード永久挿入療法の尿路系急性反応と QOL スコアの変化, 日本放射線腫瘍学会第 21 回学術大会, 2008.10.17, 札幌
 - 9) 秋元哲夫, 清塚 誠, 那須佐知子, 橋本弥一郎, 中村香織, 茂木 厚, 前林勝也, 石川 仁, 中野隆史, 三橋紀夫: 前立腺癌に対する術中計画による高線量率組織内照射 - CT 治療計画との比較 -, 日本放射線腫瘍学会第 21 回学術大会, 2008.10.17, 札幌
 - 10) 橋本弥一郎, 前林勝也, 茂木 厚, 清塚

- 誠, 中村香織, 泉佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫, 村垣善浩, 堀 智勝: 神経膠腫 WHO Grade3・4 の治療成績, 日本放射線腫瘍学会第 21 回学術大会, 2008.10.16, 札幌
- 11) 中村香織, 三橋紀夫, 橋本弥一郎, 清塚 誠, 那須佐知子, 前林勝也, 秋元哲夫: 孤立性同側鎖骨窩リンパ節転移に対する放射線治療後の経過, 第 16 回日本乳癌学会学術総会, 2008.9.27, 東京
- 12) Nishimura, Y., Mitsumori, M., Hiraoka, M., Koike, R., Nakamatsu, K., Kawamura, M., Negoro, Y., Fujiwara, K., Sakurai, H. and Mitsuhashi, N.: A Randomized Phase Study of Cisplatin/5-FU Concurrent Chemo radiotherapy for Esophageal Cancer: Short-term Infusion versus Protracted Infusion Chemotherapy (KROSG-0101, JROSG-021), The 50th Annual ASTRO Meeting, 2008.9.23, Boston, USA
- 13) Akimoto, T., Kiyoduka, M., Nasu, S., Motegi, A., Hashimoto, Y., Maebayashi, K., Ishikawa, H., and Mitsuhashi, N.: Acute Genitourinary Toxicity after Real-time Planning High Dose Rate (HDR) Brachytherapy for Prostate Cancer: Comparison of the Incidence of Grade 2 or Worse Acute GU Toxicity between Intra-operative Real-time and Post-operative CT-based Planning (Poster Presentations), The 50th Annual ASTRO Meeting, 2008.9.21-25, Boston, USA
- 14) 那須佐知子, 秋元哲夫, 前林勝也, 村松博之, 篠田宏文, 中村香織, 清塚 誠, 橋本弥一郎, 茂木 厚, 三橋紀夫: 頸部食道癌の根治的放射線治療成績と再発形成, 第 32 回日本頭頸部癌学会, 2008.6.13, 東京
- 15) 中村香織, 秋元哲夫, 茂木 厚, 橋本弥一郎, 清塚 誠, 那須佐知子, 前林勝也, 三橋紀夫, 吉原俊雄, 唐澤久美子: 期中咽頭癌に対する放射線治療成績 (ポスター), 第 32 回日本頭頸部癌学会, 2008.6.13, 東京
- 16) 秋元哲夫, 三橋紀夫: 化学放射線療法 の適応: 放射線治療単独の限界 (シンポジウム B), 第 29 回頭頸部手術手技研究会, 2008.6.11, 東京
- 17) 秋元哲夫, 清塚 誠, 福留美夏, 茂木 厚, 泉 佐知子, 橋本弥一郎, 中村香織, 前林勝也, 高桑雄一, 三橋紀夫: 上皮増殖因子受容体の放射線照射による自己リン酸化と 2 量体形成の基礎的検討, 第 14 回癌治療増感研究会, 2008.6.8, 三重
- 18) 三橋紀夫, 野中哲夫, 前林勝也, 泉 佐知子, 中村香織, 清塚 誠, 橋本弥一郎, 茂木 厚, 秋元哲夫: H2AX のリン酸化とフォーカス形成からみた温熱による放射線増感, 第 14 回癌治療増感研究会, 2008.6.7, 三重
- 19) 清塚 誠, 秋元哲夫, 那須佐知子, 茂木 厚, 橋本弥一郎, 中村香織, 前林勝也, 橋本恭伸, 田邊一成, 三橋紀夫: 前立腺癌に対する寡分割照射法による強度変調放射線治療後の急性・晩期有害事象の検討 (電子ポスターCypos), 第 67 回日本医学放射線学会総会, 2008.4.4-6, 横浜
- 20) 中村香織, 秋元哲夫, 前林勝也, 那須佐知子, 篠田宏文, 清塚 誠, 橋本弥一郎, 茂木 厚, 唐澤久美子, 三橋紀夫: stage 中咽頭癌に対する放射線治療成績, 日本放射線腫瘍学会第 20 回学術大会, 2007.12.14, 福岡
- 21) 橋本弥一郎, 前林勝也, 那須佐知子, 茂木 厚, 清塚 誠, 中村香織, 秋元哲夫, 三橋紀夫: 子宮頸癌術後症例の放射線治療成績, 日本放射線腫瘍学会第 20 回学術大会, 2007.12.13, 福岡
- 22) 前林勝也, 中村香織, 橋本弥一郎, 茂木 厚, 清塚 誠, 那須佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫: 子宮頸癌に対する放射線単独ならびに化学放射線治療成績, 日本放射線腫瘍学会第 20 回学術大会, 2007.12.13, 福岡
- 23) Mitsuhashi, N. Changes in the Phosphorylation and the Number of H2AX Foci in Thermal Radiosensitization in Human Lung Cancer Cell Line, Radiological Society of North America (RSNA), 2007.11.25, Chicago, USA
- 24) 秋元哲夫, 清塚 誠, 那須佐知子, 中村香織, 橋本弥一郎, 前林勝也, 橋本恭伸, 田邊一成, 三橋紀夫: 前立腺癌に対する術中計画による高線量率組織内照射の初期経験, 第 45 回日本癌治療学会総会, 2007.10.24, 京都
- 25) 那須佐知子, 秋元哲夫, 羽生裕二, 黒岡将彦, 清塚 誠, 中村香織, 橋本弥一郎, 前林勝也, 橋本恭伸, 三橋紀夫: 前立腺癌放射線治療の適切な PTV マージ

- ンの評価, 第 45 回日本癌治療学会総会, 2007.10.24, 京都
- 26) 清塚 誠, 秋元哲夫, 那須佐知子, 茂木厚, 橋本弥一郎, 中村香織, 前林勝也, 橋本恭伸, 田邊一成, 三橋紀夫: 前立腺癌に対する寡分割放射線治療後の晩期有害事象の検討, 第 45 回日本癌治療学会総会, 2007.10.24, 京都
- 27) 橋本恭伸, 近藤恒徳, 秋元哲夫, 三橋紀夫, 田邊一成: 前立腺全摘除術後再発に対する局所放射線療法の検討, 第 45 回日本癌治療学会総会, 第 45 回日本癌治療学会総会, 2007.10.24, 京都
- 28) 村松博之, 秋元哲夫, 清塚 誠, 中村香織, 前林勝也, 高橋満弘, 唐澤久美子, 喜多みどり, 那須佐知子, 三橋紀夫: 頭頸部癌における細胞接着因子 Cadherin と Dysadherin の発現と放射線治療成績との相関, 第 45 回日本癌治療学会総会, 2007.10.24, 京都
- 29) 中村香織, 那須佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫: 乳房温存療法の腫瘍切除後組織欠損部に生ずる有害事象の検討 (示説討論), 第 15 回日本乳癌学会学術総会, 2007.6.30, 横浜
- 30) 中村 努, 太田正穂, 成宮孝祐, 工藤健司, 佐藤拓也, 内田数海, 林 和彦, 山本雅一, 那須佐知子, 三橋紀夫: 食道癌術後リンパ節転移単独再発に対する根治的治療の成績, 第 61 回日本食道学会学術集会, 2007.6.22, 横浜
- 31) 清塚 誠, 秋元哲夫, 橋本弥一郎, 那須佐知子, 中村香織, 前林勝也, 橋本恭伸, 田邊一成, 三橋紀夫: 前立腺癌に対する術中計画による高線量率組織内照射の初期経験, 日本放射線腫瘍学会小線源治療部会第 9 回研究会, 2007.6.16, 高崎
- 32) 秋元哲夫, 三橋紀夫: 多分割照射の放射線生物学的な基礎 (シンポジウム 4), 第 31 回日本頭頸部癌学会, 2007.6.15, 横浜
- 33) 羽生裕二, 黒岡将彦, 那須佐知子, 秋元哲夫, 三橋紀夫: IMRT の治療計画から治療開始までの手順ならびに問題点 (シンポジウム 2), 第 28 回頭頸部手術手技研究会, 2007.6.13, 横浜

〔図書〕(計 4 件)

- 1) 三橋紀夫: 新潮社 (新潮新書), がんをどう考えるのか 放射線治療医からの提言, 総ページ数 220, 2009.
- 2) 三橋紀夫: 毎日健康サロン, ハイパー

サーミア - がん温熱療法ガイドブック
- 日本ハイパーサーミア学会編, pp6-7, 2008.

- 3) 三橋紀夫: 総合医学社, ナーシングケア Q&A 19 号 徹底ガイド 肺がんケア Q&A, pp94-95, 2008.
- 4) 三橋紀夫: 学会出版センター, 放射線医科学 - 生体と放射線・電磁波・超音波 -, pp83-85, 2007.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 紀夫 (MITSUHASHI NORIO)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20008585

(2) 研究分担者

秋元 哲夫 (AKIMOTO TETSUO)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10261851
前林 勝也 (MAEBAYASHI KATSUYA)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60332350
泉 佐知子 (IZUMI SACHIKO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50292602

(3) 連携研究者

なし