

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591455  
 研究課題名（和文） 放射線療法における腫瘍内血管系からみた治療効果増強のメカニズム  
 研究課題名（英文） Mechanisms of modification effects of radiotherapy in tumor and endothelial cells.  
 研究代表者  
 塩浦 宏樹（SHIOURA HIROKI）  
 福井大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：50235488

研究成果の概要（和文）：培養細胞を温熱療法、放射線療法、種々の抗がん剤で処理してその併用効果について検討した。その併用効果は相加的に認められる場合と相加的効果を上回る効果が認められる場合がある。その作用機序として温熱療法や放射線による細胞に対する亜致死障害の回復を抗がん剤が阻害する可能性があると考えられた。また、逆に抗がん剤による細胞に対する亜致死障害の回復を温熱療法あるいは放射線療法が阻害する可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The effects of combined treatments with hyperthermia and anti-cancer drugs or radiation and anti-cancer drugs were investigated in vitro. Supra-additive or additive effects of multidisciplinary therapy were observed. Mechanisms of modification effects of multidisciplinary therapy may be the inhibition of sub-lethal damage repair by anti-cancer drugs, hyperthermia or radiotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：放射線医学

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：放射線治療学・温熱

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 固形腫瘍内の血管構築は正常組織と比べると脆弱であり、腫瘍内にはしばしば低酸素領域が存在する。この腫瘍の低酸素環境は放射線やいくつかの化学療法に対して固形腫瘍が抵抗性になるという治療的問題をはらんでいる。それに対して温熱療法は血流の乏しい低酸素領域には治療効果が高いという性質を持っている。一方、最近の前臨床研究では、血管新生阻害剤と放射線との併用による放射線増感効果が報告されている。血管新生阻害剤を使用することにより、腫瘍血管が減少し低酸素細胞が増加すると、放射線に抵抗性になるという考えとの矛盾がある。しかしながら、血管新生は腫瘍の増殖において重大な意義を持ち、放射線療法や温熱療法時においては、その役割の詳細な機序はあきらかとなっていない。

(2) 我々は以前より放射線をがん細胞に照射すると一酸化窒素合成酵素が誘導され、一酸化窒素 (NO) が蓄積増加することを報告してきた。また、NO は血管内皮細胞からも産生され、血管新生に重要な役割を果たしている。血管内皮細胞に対する放射線および温熱療法の影響に関する報告も少なく、がん細胞と血管内皮細胞の放射線および温熱療法に対する細胞死型の相違等を明らかにすることにより、正常組織の副作用軽減とがん治療効果の増強を計ることが重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 血管内皮及びヒトがん培養細胞を用い

て、放射線あるいは温熱療法による細胞死型の相違、NO を介する細胞間シグナル伝達系の相違等について解析し、がん治療における血管内皮細胞の役割及びその血管新生に関わるメカニズムについて明らかにする

(2) ヒトがんのヌードマウス移植腫瘍を用いて、放射線あるいは温熱療法時、およびそれらの血管新生阻害剤併用時における腫瘍内微小血管の構築動態、腫瘍内血流動態等の解析から最適な放射線あるいは温熱療法と血管新生阻害剤との併用療法について明らかにし、またその作用メカニズムを明らかにする

## 3. 研究の方法

(1) 細胞は当大学にて凍結保存されている株細胞で、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞、中国ハムスターV-79 細胞、マウス線維芽細胞由来 L 細胞を使用した。炭酸ガス培養器は 1 台新たに購入した。

### (2) 放射線と温熱療法

放射線は大学保有のハイテックス社製 X 線照射装置 HW-150 を用いて 120-140KV の電圧で種々の線量を培養細胞に照射した。温熱は恒温槽を用いて 40°C または 43°C の温湯に種々の時間フラスコを浸透して行った。

(2)-1: 温熱 (40°C または 43°C) の時間を一定にしてその前または後に放射線をいろいろな線量で照射した。

(2)-2: 放射線の線量を一定にしてその前または後に温熱療法を種々の時間行った。

(2)-3: 放射線+温熱をいろいろな間隔時間で繰り返し行い分割治療の効果を調べた。

#### (3) 抗がん剤と温熱療法

(3)-1: 各種抗がん剤を種々の濃度で 37℃、40℃または 44℃で処理した。  
各種抗がん剤を種々の濃度で 37℃で処理し、その前後に温熱療法を一定時間行った。  
抗がん剤を一定の濃度で処理し、その前あるいは後に 40℃の温熱療法を種々の時間行った。

#### (4) 抗がん剤と放射線療法

(4)-1 細胞に放射線をいろいろな線量で照射し、その前あるいは放射線療法後に抗がん剤を併用した。

#### (5) 指標

(5)-1: 細胞を放射線療法、温熱療法、抗がん剤の単独処理あるいは併用療法についてコロニー形成法で生存率を求めた。  
(5)-2: それぞれの単独処理あるいは併用療法処理後に細胞を蛍光色素(Hoechst 33342)により染色し、蛍光顕微鏡下で観察して核の濃縮や断片化などの形態的に典型的なアポトーシス細胞の割合を調べ、またその経時的变化を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 44℃加温における V-79 細胞の温熱致死感受性 T<sub>0</sub> 値は 7.25 分であった。44℃加温に抗がん剤 MitomycinC(MMC)を同時に併用すると T<sub>0</sub> 値は 5.75 分に短縮し、相加的効果を上回る増感効果が認められた。44℃加温における A549 細胞の温熱致死感受性 T<sub>0</sub> 値は 12 分であった。44℃加温に抗がん剤 Amrubicinol(AMROH)を sequential に併用

することにより、生存率曲線における亜致死の温熱障害の回復 sublethal thermal damage repair (SLTDR) を示す肩の部分が消失し、相加的増感効果が認められた。40℃加温におけるマウス L 細胞の温熱致死感受性 T<sub>0</sub> 値は 23.7 時間であった。40℃加温に抗がん剤 Bleomycin(BLM)を sequential に併用すると、40℃加温後に BLM を併用した場合は増感効果はわずかであったが、BLM 処理後に 40℃加温すると相加的効果を上回る増感効果が認められた。

(2) A549 細胞に放射線を照射した場合の放射線致死感受性 D<sub>0</sub> 値は 2.35Gy であった。抗がん剤 Amrubicin(AMR)で 3 時間処理後に放射線を照射すると D<sub>0</sub> 値は 1.7Gy に短縮した。抗がん剤 AMROH で処理後に放射線照射すると D<sub>0</sub> 値は 1.5Gy に短縮を認めた。また、A549 細胞に AMR または AMROH で 3 時間処理後に放射線を照射すると細胞生存率曲線の最初の肩の部分の消失が認められ、亜致死障害(sublethal damage)の修復が阻害されている可能性が示唆された。

(3) マウス L 細胞株に抗がん剤 BLM で処理するとアポトーシスの誘導は 5%以内であった。また、抗がん剤 BLM と 40 度の温熱療法を併用処理した場合、アポトーシス誘導の増強は認められなかった。

A549 細胞に抗がん剤 AMR 単独処理した場合のアポトーシス細胞の割合は、処理後 48 時間後で 0.9%、72 時間後で 0.88%であった。A549 細胞に放射線を照射した場合のアポトーシス細胞の割合は、処理後 48 時間後で 1.2%、72 時間後で 0.71%であった。また、A549 細胞に MR と放射線療法の併用処理した場合のアポトーシス細胞の割合は、処理後 48 時間後で 1.4%、72 時間後で 1.5%であっ

た。併用処理によるアポトーシス細胞の割合は相加的增加であり、アポトーシス誘導の増強は認められなかった。

#### 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 Hayashi S, Sakurai H, Hayashi A, Tanaka Y, Hatashita M, Shioura H, Inhibition of NF- $\kappa$ B by combination therapy with parthenolide and hyperthermia and kinetics of apoptosis induction and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. International Journal of Molecular Medicine、査読有、Vol.25、2010、pp.81-87
- ② Hayashi S, Hatashita M, Hayashi A, Matsumoto H, Shioura H, Kitai R、Thermosensitization by parthenolide in human lung adenocarcinoma A549 cells and p53- and hsp72-independent apoptosis induction via the nuclear factor- $\kappa$ B signal pathway. International Journal of Molecular Medicine、査読有、Vol.21、2008、pp.582-592
- ③ Aoyama H, Tago M, Kato N, Toyoda T, Kenjyo M, Hirota S, Shioura H, Inomata T, Kunieda E, Hayakawa K, Nakagawa K, Kobashi G, Shirato H, Neurocognitive function of patients with brain metastasis who received

either whole brain radiotherapy plus stereotactic radiosurgery or radiosurgery alone. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics、査読有、Vol 68、2007、pp1388-1395

- ④ Matsumoto H, Tomita M, Otsuka K, Hatashita M, A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam research. Journal of Radiation Research、査読無、Vol.50:Suppl, 2009, A67-79
- ⑤ Matsumoto H, Takahashi A, Ohnishi T, Nitric Oxide radicals choreograph a radioadaptive response. Cancer Research、査読有、Vol.67、2007、pp8574-8579

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

塩浦 宏樹 (SHIOURA HIROKI)  
福井大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50235488

##### (2) 研究分担者 (平成 19 年度)

松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号：40142377

##### (3) 連携研究者 (平成 20, 21 年度)

松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号：40142377