

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390324

研究課題名（和文）がんに対する重粒子線治療の治療方法確立のためのトランスレーショナル研究

研究課題名（英文）Translational research for establishment of heavy ion radiotherapy for cancer

研究代表者

中野 隆史（NAKANO TAKASHI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20211427

研究成果の概要（和文）：

重粒子線治療における基礎的臨床的研究成果として 1) 炭素イオン線による培養正常脳神経細胞の形態学変化とアクチン・フィラメントの脱分極の関与と強いRBE、2) 肺がん細胞におけるmTOR抑制剤併用によるOERの低下と、炭素イオン線効果、3) 発達期のラット小脳培養組織で、炭素線による小脳組織形態的経時変化、4) 炭素イオン線によるヒト血管内皮細胞（HUVEC）の強いICAM-1発現効果、5) 直腸癌患者のHIF-1 α の発現の予後因子の役割、6) 直腸がん、肺がん患者の良好な炭素線治療の費用対効果を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

1) Carbon-ion beams were about 10-fold more effective than X-rays in immature hippocampal neurons. X-irradiation immediately induced morphological changes in axons and dendrite. These changes seemed to be caused by x-irradiation evoking depolymerization of microfilament. 2) Under severe hypoxic condition for 1 hour, oxygen enhancement ratio (OER) of X-ray was calculated as 2.7. Under severe hypoxic condition for 24 hour, OER of X-ray was decreased from 2.6 to 1.1 by addition of mTOR inhibitor but, OER was not changed in carbon-ion beam irradiation. 3) The RBE of C-beams to X-rays in the normal cerebellum of infant rats with rat organotypic slice culture system was assumed to be 1.4. 4) Radiation-induced ICAM-1 expression on HUVE cells was regulated by TGF- β 1 and carbon-beam induced higher ICAM-1 expression than X-ray. 5) HIF-1 α expression was a prognostic factor in patients with locally advanced rectal cancer. 6) The cost-effectiveness of carbon beam therapy was good for advanced rectal cancers and lung cancers by analyzing clinical data..

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：放射線腫瘍学

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：重粒子線、放射線治療、放射線生物学、粒子線治療、放射線腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

現在、がん対策では生存率の向上のみでなく、QOL(Quality Of Life)を重視した治療が強く望まれ、低侵襲がん治療法の確立が重要な課題となっている。政府は、「第3次対がん10か年総合戦略」のなかで、重粒子線治療の推進を重要な施策として取り上げた。我々は、放医研で行われている重粒子線治療に参加し、目覚ましい治療効果を世界に先駆けて証明した。その中で基礎研究では特に、子宮頸がん症例を用いて、重粒子線は放射線に効きにくい低酸素に富む癌細胞にも効果が高いこと、極めて悪性な脳神経膠芽腫は、放射線に対する腫瘍の遊走能がこの悪性度に関与していることなどを見いだした。

群馬大学は平成18年度から小型重粒子線治療装置の建設を開始した。この高価な重粒子線治療法に対しては、最も効果的な治療方法の開発が求められると同時に、真に重粒子線治療の対象となる疾患に限定して選択されなければならない。そこで、重粒子線治療に応用可能な、トランスレーショナル研究を積極的に推進し、重粒子線の生物効果を基礎研究から解明するとともに、並行して、重粒子線治療の適応となる対象を臨床研究で科学的に検証し、治療対象を明らかにすることが求められている。

2. 研究の目的

本研究は重粒子線治療の革新的展開のためのトランスレーショナル研究を以下のサブ課題に分けて展開し、重粒子線に特徴的な生物効果を基礎研究から解明し、重粒子線治療の適応となる対象を臨床研究で科学的に検証し、治療対象を明らかにする。

i) 重粒子線治療による照射効果ならびに細胞死の研究

○p53野生型腫瘍およびp53変異型腫瘍に重イオンビームによる照射をおこない、アポトーシス誘発とアポトーシス以外の細胞死誘発、さらにこれらに関与するシグナル伝達を明らかにする。p53依存性および非依存性細胞死誘発過程の中で、DNA修復機構ならびにAKTカスケード蛋白、p27系蛋白の発現とアポトーシスや壊死との相関を検討する。

ii) 脳機能ならびに脳腫瘍に対する重粒子線による照射効果に関する研究

ランダム照射により各種細胞の照射感受性を増殖能、アポトーシス数を算定し非照射群と比較する事によりヒト神経膠芽腫とヒ

ト脊索肉腫由来細胞の重イオン照射感受性を解析する。

Bunker's methodを用いて培養された正常神経細胞を用いてX線および炭素イオン線照射を行い、分割照射時の炭素イオン線のX線に対する生物学的効果比(RBE)を評価し、至適な分割回数を評価する。また、成熟細胞と未成熟細胞との相違も確認する。

iii) 重粒子線治療の最適な分割効果や抗癌剤併用効果の解析

ラット卵黄嚢腫瘍で同一細胞由来の放射線感受性細胞(NMT-1)と放射線抵抗性細胞(NMT-1R)を用い、特にp53のステータスの相違に加えてBCL2の過剰発現がいかに関与するか、また抗癌剤の併用効果を検討する。

3. 研究の方法

i) 重粒子線治療による照射効果ならびに細胞死の研究：

炭素線が、低LET放射線との基本的な相違である放射線反応の初期課程、DNAの2重鎖切断などのDNA損傷と γ H2AXやATMなど、その認識ならびに修復過程の特徴を解明し、その特徴と反応下流の上記諸現象との関連性を解明する。

また、重粒子線による分裂死や細胞老化現象がX線など一般の放射線と異なるメカニズムで起きるのか、Ku70-80蛋白、DNA-PK等DNA修復機構ならびにAKTカスケード蛋白、老化細胞関連蛋白p16、p19、p27系蛋白、NOによるBystander Effect、NF- κ BがJNKの抑制、活性酸素ROSに焦点を当て、重粒子線による分裂死や細胞老化現象の分子機構を解明する。

ii) 脳機能ならびに脳腫瘍に対する重粒子線による照射効果に関する研究：

脳腫瘍細胞の遊走能に関する重粒子線による増進のメカニズムをAkt蛋白関連シグナル伝達経路を中心として研究する。そして、本腫瘍の遊走能を阻止する薬剤を開発を目指し、その併用による遊走能阻止効果を解析する。脳ニューロン、グリア細胞のみの培養系を用いて、脳正常組織・神経細胞、血管内皮細胞における炭素イオン線のX線に対するRBE(生物学的効果比)の検討をおこなう。

iii) 重粒子線治療の最適な分割効果や抗癌剤併用効果の解析：

本研究では、少分割照射

法の放射線生物学的根拠ならびに分子機構を解明し、放射線生物学的なアプローチにより、種々の腫瘍や正常組織の生物学的な特性に応じた至適分割照射法の開発研究を行う。低酸素細胞関連遺伝子 HIF 1 α や血管新生関連遺伝子 HIF2 α の重粒子線効果への修飾、重粒子線と抗ガン剤との併用、アポトーシスの誘導能について明らかにする。

臨床データの解析により、重粒子線治療の有効性を解析する。

4. 研究成果

i) 重粒子線治療による照射効果ならびに細胞死の研究

脳、精巣、腸管などの正常組織と p53 野生型および変異型の各種腫瘍に、炭素線、X線を種々の条で照射し、生物学的効果を経時的に検討し RBE を算出し、重粒子線の生物学的効果を検討した。肺がん細胞の急性極低酸素条件 (0.1mmHg 以下、1 時間) での酸素効果比 (OER) は約 2.7 で、慢性極低酸素条件 (同、24 時間以上) での OER は約 2.6 であった。mTOR 抑制剤の併用により X 線の OER は 1.1 に低下したが、炭素イオン線では、mTOR の併用による変化は認められなかった。

PDK1 は、細胞運動性を高める因子であるが、低酸素環境で、癌細胞 O2 レベルを維持するために HIF-1 α によって制御されている。癌細胞における PDK1 発現の減少により癌細胞の代謝を抑制し、癌細胞運動性と浸潤性を抑えた。そして、ROS 生産増加ががん細胞死に関連しており、これは Cytochrome C への Nitric Oxide の結合の減少が関与している可能性があることを明らかにした。また、HIF-1 α 表現は細胞の低酸素あるいは正常酸素圧の状態の間でかなり異なることを明らかにした。

尿トリプシン阻害剤によるマウスにおける放射線誘発肺線維症の防護効果 C57BL/6 マウスを用い、尿トリプシン阻害剤 (urinary trypsin inhibitor; 以下 UTI) 投与による肺照射後の放射線肺線維症の抑制効果およびその至適な投与時期について検討を行った。その結果から UTI 投与によって TGF- β の発現が抑制され、その結果として放射線肺線維症の発現が抑制されている可能性が示唆された。

ii) 脳機能ならびに脳腫瘍に対する重粒子線による照射効果に関する研究 :

培養正常脳神経細胞における炭素イオン線の X 線に対する生物学的効果比 (RBE) は約 10 であった。照射直後より軸索の細小化とシ

ナプス形状が変化が認められ、アクチン・フィラメントの脱分極が主たる原因であると推測された。

重オンマイクロビームを用いた細胞の放射線応答の解析を、主にヒト神経膠芽腫細胞を用いて行った。確立した培養系を用いて複数の重粒子線 (Ar, Ne, C) の腫瘍細胞に対する移動性、増殖性および細胞死に関して X-線と対比して解析した。細胞障害性は物理線量を同じにすると重粒子線のほうが 3-4 倍強い細胞障害性を認めた。

ニューロン・グリア・血管内皮細胞などの正常組織の放射線感受性に関する知見を得ることは脳腫瘍に対する重粒子線治療を確立するために不可欠である。しかし、重粒子線による正常脳・脊髄組織や脳血管への障害 (副作用) については細胞レベルまで詳しく分析されていない。そこで、培養正常脳細胞 (ニューロン・グリア) および血管内皮細胞の重粒子線に対する放射線感受性、その細胞死のメカニズムを重イオンビーム照射により、分子生物学的に解明した。

さらに、ラット脳から神経細胞とグリア細胞が共存する脳薄切切片培養標本を作製し、この標本を対象として、神経細胞とグリア細胞の重粒子線照射に対する感受性の差異を明らかにした。

幼児期の小脳において放射線生物学的効果を検討した。ラット小脳から正常組織培養切片を作成し、X 線および炭素線の照射を行い、特に小脳皮質に異常をきたすことが明らかとなった。この小脳皮質の異常は照射により ①顆粒細胞のアポトーシスが誘発され、ベルクマングリア細胞の突起の形態異常が誘発されることにより ②顆粒細胞の遊走能が低下したことに起因していると考えられた。またこの小脳皮質の異常および顆粒細胞のアポトーシスを指標とした RBE は 1.4~1.6 であった。

ヒト神経膠芽腫細胞の細胞走行性に関しては、非照射細胞と比較すると X 線で 2 倍、重粒子線 (Ar, Ne, C) で 3 倍の遊走亢進作用が認められた。この X 線および重粒子線の細胞走行性の亢進現象に関しては、確立されたモデル動物による評価を行い、培養系で得られた知見を支持する結果となった。すなわち、炭素線を照射した腫瘍細胞はヌードマウス脳移植モデルにおいて著しい浸潤性を示した。脳移植マウスに X 線照射しても著しい浸潤能の亢進を認めた。X 線、炭素線照射群とも、グルタミン酸受容体拮抗薬併用で治療した群では腫瘍細胞はすべて老化様細胞死に陥った。遊走の先端部分の脳腫瘍細胞は強く

Akt 蛋白質を発現しており、脳腫瘍細胞の遊走能に関する重粒子線による増進のメカニズムとして Akt 蛋白質関連シグナル伝達経路の関与を示唆する所見を得た。

iii) 重粒子線治療の最適な分割効果や抗癌剤併用効果の解析：

重粒子線によるがん治療の臨床研究を推進し、その基盤となる物理工学的研究ならびに生物学的研究を行った。重粒子線治療については、複数の臓器の治療プロトコルを完成させ、治療技術を確立し、平成22年3月からがん患者に対して重粒子線治療を開始し、本年度は10月31日までに総計144名に対して治療を行った。この疾患別内訳は、前立腺癌107名、頭頸部腫瘍13例、1期肺癌7例、肝臓癌7例、骨軟部5例、その他5例であった。順次、対象疾患を増やすため、新規治療プロトコルの作成も行った。また、重粒子線治療に伴う医療費の妥当性について、直腸癌術後再発治療、肺癌治療などの化学療法の治療費と比較し、重粒子線治療について、妥当性有効性を明らかにした。

脳組織などの正常組織や各種腫瘍に対する重粒子線の生物効果に関する基礎的研究を進めるとともに、高精度炭素イオンマイクロサージェリー治療技術開発に関して、第4室に設置した専用実験ポートを使用して、生物実験を推進した。

放医研で重粒子線治療された前立腺がん患者の直腸膀胱の有害事象について、研究し、他の治療法に比べて、障害発生率が低いことが示された。

局所に再発をみた直腸癌のための炭素イオン放射線治療の費用対効果

放医研と群馬大学の局所再発直腸癌患者25人の例を対象に、各人の診断・再発に対する治療・経過観察・交通費・支持療法・合併症・および入院のための直接費をそれぞれ計算し、局所再発の直腸癌患者における、炭素イオン放射線療法と従来の集学的治療の費用対効果を分析した。患者は初回治療で根治手術のみを受け、2003年から2005年の間に手術の不可能な骨盤内再発を起こした者を分析の対象とした。NIRSでの治療は炭素イオン放射線療法(CIRT)単独で行われた。GUHでは3D原体照射療法、化学療法、および温熱療法を含む集学的治療が行われました。結果:再発治療として、CIRTが14人、集学治療が11人認められた。2年の全生存は、それぞれCIRTで85%、集学的治療で55%であった。平均の治療費用はCIRTグループは

¥4,803,946、集学的治療グループで¥4,591,605であり、CIRTが、1%の生存率増加につき上昇した費用対効果比は7,078円であった。総入院時間は、CIRTで37日間、集学的グループで66日間であり、患者の物理的精神的社会的負担はCIRT群の法が軽かった。結論:これらすべての結果を考察すると、再発直腸癌治療においては、CIRTが集学的治療と比べ費用対効果がよいと考えられた。

術前化学放射線療法と hyperthermo-(HCRT)で治療した50名の局所進行直腸癌患者における HIF-1 α 発現の予後的意義に対する腫瘍の応答の予測値を評価した。結果:正の HIF-1 α の発現は症例の 42.0% (21/50) に認められ、HIF-1 α -陰性群の3年生存率は、HIF-1 α 陽性群では60.6%に比べ85.2%で有意に良好であった。3年無再発生存率も同様であった。さらに、HIF-1 α の発現が有意に多変量解析で無再発生存と無転移率との相関が認められた。結論:HIF-1 α 発現は、HCRTで治療された直腸癌患者の無再発生存と無転移率を予測可能性がある。

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 20件)

重粒子線治療の臨床的研究

①Mobaraki A, Ohno T, Yamada S, Sakurai H, Nakano T. Cost-effectiveness of carbon ion radiation therapy for locally recurrent rectal cancer. *Cancer Sci.* 101:1834-9, 2010. 査読有

②Ishikawa H, Tsuji H, Kamada T, Hirasawa N, Yanagi T, Mizoe JE, Akakura K, Suzuki H, Shimazaki J, Nakano T, Tsujii H: Adverse effects of androgen deprivation therapy on persistent genitourinary complications after carbon ion radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 72(1):78-84, 2008. 査読有

重粒子線の基礎研究

③Takahashi T, Fukawa T, Hirayama R, Yoshida Y, Musha A, Furusawa Y, Ando K, Nakano T. In vitro interaction of high-LET heavy-ion irradiation and chemotherapeutic agents in two cell lines with different radiosensitivities and different p53 status. *Anticancer Res.* 2010 Jun;30(6):1961-7. 査読有

④ Suzuki Y, Oka K, Ohno T, Kato S, Tsujii H, Nakano T. Prognostic impact of mitotic index of proliferating cell populations in cervical cancer patients treated with carbon ion beam. *Cancer*. 2009 May 1;115(9):1875-82. 査読有

⑤ Hamada N, Hara T, Omura-Minamisawa M, Funayama T, Sakashita T, Sora S, Yokota Y, Nakano T, Kobayashi Y. Energetic heavy ions overcome tumor radioresistance caused by overexpression of Bcl-2. *Radiother Oncol*. 2008 ;89(2):231-6. 査読有

⑥ Suzuki Y, Nakano T, Ohno T, Oka K: Comparison of the radiobiological effect of carbon ion beam therapy and conventional radiation therapy on cervical cancer. *J Radiat Res (Tokyo)*, 49(5):473-479, 2008. 査読有

バイスタンダー効果

⑦ Harada K, Nonaka T, Hamada N, Sakurai H, Hasegawa M, Funayama T, Kakizaki T, Kobayashi Y, Nakano T. Heavy-ion-induced bystander killing of human lung cancer cells: role of gap junctional intercellular communication. *Cancer Sci*. 2009 Apr;100(4):684-8. 査読有

低酸素 HIF1

⑧ Oike T, Ogiwara H, Torikai K, Nakano T, Yokota J, Kohno T. Garcinol, a Histone Acetyltransferase Inhibitor, Radiosensitizes Cancer Cells by Inhibiting Non-Homologous End Joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Mar 13. 査読有

⑨ Oike T, Nakano T, et al Suppression of HIF-1 α and Radiation Resistance in the Acute Hypoxic Condition. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 3. 2011. 141-145 査読有

脳研究

⑩ Yoshida Y, Suzuki Y, Al-Jahdari WS, Hamada N, Funayama T, Shirai K, Katoh H, Sakashita T, Kobayashi Y, Nakano T. Evaluation of the relative biological effectiveness of carbon ion beams in the cerebellum using the rat organotypic slice

culture system. *J Radiat Res*. 2012;53(1):87-92. 査読有

⑪ Okamoto M, Suzuki Y, Shirai K, Mizui T, Yoshida Y, Noda SE, Al-Jahdari W, Shirao T, Nakano T. Effect of Irradiation on the Development of Immature Hippocampal Neurons In Vitro. *Radiat Res*. 2009;172(6):718-24. (IF:3.043) 査読有

⑫ Al-Jahdari WS, Suzuki Y, Yoshida Y, Hamada N, Shirai K, Noda SE, Funayama T, Sakashita T, Kobayashi Y, Saito S, Goto F, Nakano T. The radiobiological effectiveness of carbon-ion beams on growing neurons. *Int J Radiat Biol*. 2009;85:700-9. (IF:2.178) 査読有

転移:

⑬ Ohkubo Y, Iwakawa M, Seino K, Nakawatari M, Wada H, Kamijuku H, Nakamura E, Nakano T, Imai T. Combining Carbon Ion Radiotherapy and Local Injection of α -Galactosylceramide-Pulsed Dendritic Cells Inhibits Lung Metastases in an In Vivo Murine Model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 78:1524-31, 2010. 査読有

⑭ Tamaki T, Iwakawa M, Ohno T, Imadome K, Nakawatari M, Sakai M, Tsujii H, Nakano T, Imai T. Application of carbon-ion beams or gamma-rays on primary tumors does not change the expression profiles of metastatic tumors in an in vivo murine model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;74(1):210-8. (IF:4.639) 査読有

〔学会発表〕(計 25 件)

- ① 中野隆史、「世界で一番放射線科が好き！」～放射線治療の立場から～、第 47 回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2011. 10. 21、下関
- ② 中野隆史、がんの重粒子線治療の現状と将来、第 75 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、2011. 09. 17、群馬県民会館(群馬県)
- ③ 中野隆史、高度先進医療 癌の重粒子線治療について、第 315 回日本消化器病学会関東支部例会、2011. 07. 2、東京
- ④ Takashi Nakano, "Heavy Ion Therapy", Symposium on Image-Based Radiation

Therapy (Joint ASTRO-IAEA-PROS Educational Course), 2011. 2. 26, (フィリピン、クエゾン市)

- ⑤ 中野隆史、がん研究入門コース「がんに対する新しい放射線治療戦略」、第 69 回日本癌学会学術総会、2010. 09. 24、大阪()
- ⑥ 中野隆史、子宮頸がん 最新の予防と診断と治療、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010. 04. 25、東京
- ⑦ 中野隆史、がんプロフェッショナルの検証と提言～2年間を振り返る、第 47 回日本癌治療学会学術集会、2009. 10. 22、横浜
- ⑧ 中野隆史、癌の重粒子線治療の現状と展望、群馬臨床泌尿器科医会 20 年度第 2 回学術講演会、2008. 11. 20、前橋
- ⑨ 中野隆史、子宮頸部癌の治療成績報告、日本放射線腫瘍学会 第 21 回学術大会、2008. 10. 16、札幌
- ⑩ 中野隆史、がんの重粒子線治療と地域がん医療、第 299 回日本消化器病学会 関東支部例会、2008. 05. 17、前橋

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

①名称：粒子線モニタリング装置、粒子線モニタリングプログラム及び粒子線モニタリング方法

発明者：中野隆史、外 10 名

権利者：群馬大学、外 2 施設

種類：特許

番号：特願 2011-0364461

出願年月日：2011 年 2 月 22

国内外の別：国内

○取得状況 (計 2 件)

①名称：コンプトンカメラ

発明者：山口充孝、中野隆史、外 10 名

権利者：群馬大学、外 3 名

種類：特許

番号：特願 2010-48699

取得年月日：2010 年 3 月 4 日

国内外の別：国内

②名称：がん治療用の遊走阻害剤

発明者：石内勝吾、中野隆史

権利者：群馬大学

種類：特許

番号：特願 2008-308491

取得年月日：2008 年 12 月 25 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 隆史 (NAKANO TAKASHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20211427

(2) 研究分担者

櫻井 英幸 (SAKURAI HIDEYUKI)

筑波大学・人間総合科学研究科・教授

研究者番号：50235222

高橋 健夫 (TAKAHASHI TAKEO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70241883

鈴木 義行 (SUZUKI YOSHIYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60334116

石川 仁 (ISHIKAWA HITOSHI)

筑波大学・人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：70344918

石内 勝吾 (ISHIUCHI SHOGO)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：10312878

大野 達也 (OHNO TATSUYA)

群馬大学・重粒子線医学研究センター
・教授

研究者番号：10344061

山口 充孝 (YAMAGUCHI MITSUTAKA)

日本原子力研究開発機構・研究員

研究者番号：10375404

(3) 連携研究者

()

研究者番号：