

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390327

研究課題名（和文） 陽子線・炭素線の生物学的効果に関する基礎的比較・検討

研究課題名（英文） Basic Comparison of Biological Effects between Protons and Carbon-Ions

研究代表者

菱川 良夫 (HISHIKAWA YOSHIO)

神戸大学・医学系研究科・客員教授

研究者番号：20122335

研究成果の概要（和文）：陽子線や炭素線を用いた粒子線治療は従来のX線治療よりも効果が高いことが基礎的にも示された。また、放射線の生物学的効果に重要な役割を果たす活性酸素種（ROS）の照射による発生は一時的ではなく、持続的であるという新しい知見が得られた。そして、ROS発生をN-アセチルシステイン（NAC）を用いて持続的に抑制することで、照射後の細胞生存率が上昇することが分かり、NACが放射線（粒子線）防護剤として臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Particle therapy using protons or carbon-ions showed higher effectiveness than conventional X-ray therapy on basic research basis. A new finding was obtained that generation of reactive oxygen species (ROS), which plays an important role in biological effects of radiation, was not temporary but continuous after irradiation. It was also found that continuous suppression of ROS by N-acetylcysteine (NAC) lead to increased cell survival after irradiation. NAC could be used as a radioprotective agent in clinical settings.

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	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：癌、粒子線治療、陽子線、炭素線、生物学的効果、細胞老化、活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

本邦のがん死亡者数は1981年に脳卒中を追い抜いて第1位となって以来、年々増加の一途をたどっている。今後もこの傾向は続くと見られ、国民の健康管理において「がんの制御」は最重要事項となっている。

外科治療、化学療法、放射線治療は「がん治療の三本柱」と呼ばれているが、中でも放射線治療の近年の技術的進歩および国民認

知度の上昇は目覚しく、治療患者数は急激に増加している。その中でも放射線治療の一種である粒子線治療は、最近最も注目を浴びている治療法のひとつである。

荷電粒子線はブラッグピークというX線にはない物理特性を持ち、がん病巣への高度な線量集中を可能にしているため、(1)がん周囲の重要臓器への不必要な照射を避けられる→(2)がんそのものへの投与線量を増加でき

る→(3)高いがん制御率と少ない副作用を両立できる。現在臨床応用されている粒子線は陽子線と炭素線であるが、生物学的効果に関しては、陽子線はX線とほぼ同等、炭素線はより優れた生物効果を持つとされている。陽子線治療は、眼ぶどう膜悪性黒色腫に対して、全世界で16,000例を超える症例数があり、米国のMassachusetts General Hospital、University of San Francisco/Lawrence Berkeley laboratory、スイスのPaul Sherrer Instituteの主要三施設の治療成績は5年局所制御率96-97%、5年生存率80-88%と優れた成果を上げている。本邦では、筑波大学にて日本人に多い肝細胞癌への臨床研究が続けられており、既に200例を超える症例に対して5年局所制御率84.5%と報告されている。炭素線治療については、本邦の放射線医学総合研究所が世界で最大の症例数を誇っており、これまでに2,800人以上の患者が治療されている。特筆すべきは放射線抵抗性腫瘍としてこれまで放射線治療の対象にならなかった手術不能肉腫に対して、3年局所制御率82%、5年生存率54%という非常に良好な治療成績が報告されていることである。また、副作用に関しても、陽子線治療・炭素線治療ともにX線治療に比して低率・低重症度であると報告されている。

さて、以上のような理由から国内外で急速に普及が進んでいる粒子線治療であるが、陽子線・炭素線どちらがより良いのかはまだ結論が出ていない。研究代表者の菱川が所属する兵庫県立粒子線医療センターは世界で唯一、陽子線・炭素線両方のビームを発生させることができる装置を有しており、陽子線・炭素線の基礎的・臨床的比較は世界的使命と言っても過言ではない。

## 2. 研究の目的

研究代表者である菱川は、兵庫県立粒子線医療センターの開院以来、臨床医として粒子線治療に携わってきたが、一般に言われるほどに陽子線と炭素線に差があるのか疑問を抱いてきた。同センターの治療プロトコルは、現状では陽子線と炭素線では異なっており、厳密な比較はできない。しかし、臨床比較試験は、世界で唯一それが可能な同センターの世界的使命であり、その前段階として、基礎実験にてさまざまな角度から両者を比較する必要があると考えた。

今回の申請では、基礎的比較に的を絞り、近い将来に施行予定の臨床比較試験に資するデータの取得を目的とする。

## 3. 研究の方法

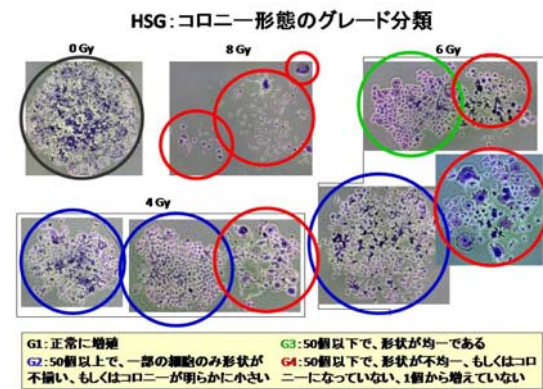
### (1) 培養細胞を用いた照射後細胞生存率の比較

粒子線治療の主要対象腫瘍の培養細胞

(HSG：唾液腺癌、HMV-2：粘膜悪性黒色腫)を用いて、X線・陽子線・炭素線照射後の細胞生存率を比較した。良好なコロニー形成能を有するHSGには放射線感受性試験のゴールドスタンダードであるコロニー形成法を用いた。HMV-2はカウント可能なコロニーを形成しないため、薬剤感受性試験で頻用されるWST-8法を転用することとした。その前段階として、コロニー形成の良好なHSG細胞(唾液腺がん)を用いて、コロニー形成法とWST-8法の比較を行った。

### (2) 照射による細胞およびコロニーの形態変化の評価

上記HSGに対するコロニー形成法を行う過程で、照射後の細胞および形成されるコロニーの形態が、線種によって異なることに気付いたため、ダメージの度合いによって4グレード(G1：正常～G4：高ダメージ)に分類し、評価した(図1)。



(図1)

### (3) 照射による細胞老化の評価

「線種による照射後の細胞および形成されるコロニーの形態の差異」が細胞老化(senescence)によるものではないかと考えられたため、細胞老化マーカーとして知られる細胞老化関連ベータガラクトシターゼ(SA-β-gal)にて照射後HSGを評価した。

### (4) 照射による活性酸素種(ROS)発生の比較およびその照射後細胞生存率への影響

「線種による照射後の細胞および形成されるコロニーの形態の差異」に線種によるROS発生の違いが関連しているのではないかと考えられたため(ROSは放射線の生物効果において“間接効果”と呼ばれる重要な役割を演じているが、生物効果全体におけるその割合は線種によって異なる)、まず、HSGにおける照射単独でのROS発生を測定し(装置：フローサイトメーター、プローブ：DCFDA)、次に抗酸化物質であるN-アセチルシステイン(NAC)併用下でのROS発生を評価した。さらに、NAC併用下での照射後HSGの細胞生

存率をコロニー形成法にて評価した。

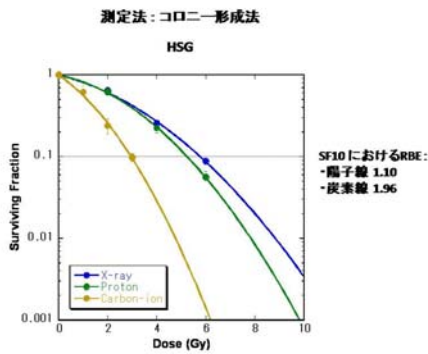
(5) 持続的 ROS 抑制の照射後細胞生存率への影響

照射による ROS 発生は持続的であり、一時的な NAC による ROS 抑制では細胞生存率に影響を及ぼさないのではないかと考えられたため、まず、HSG における照射単独での照射 6~7 日後の ROS 発生を測定した。次に、照射時~培養期間中に NAC を持続的に作用させた状態で ROS 発生を測定した。その後、同様の条件下でコロニー形成法にて細胞生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた照射後細胞生存率の比較

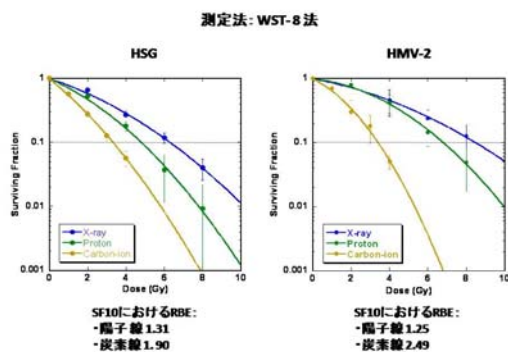
コロニー形成法による HSG の細胞生存率 10% (SF10) での生物学的効果比 (RBE) は陽子線 1.10、炭素線 1.96 で従来とほぼ同様の結果であった (図 2)。



(図 2)

WST-8 法による HSG の SF10 での RBE は陽子線 1.31、炭素線 1.90 とコロニー形成法の場合とほぼ同様の結果となり、WST-8 法が放射線感受性試験に転用可能であることが分かった (図 3)。

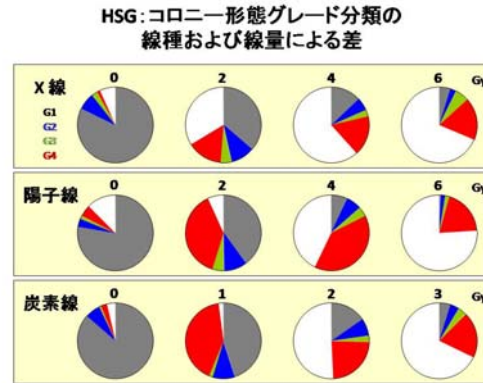
WST-8 法による HMV-2 の RBE (SF10) は陽子線 1.25、炭素線 2.49 であり、HMV-2 は X 線・陽子線には抵抗性であるが、炭素線には感受性があることが明らかとなった (図 3)。



(図 3)

(2) 照射による細胞およびコロニーの形態変化の評価

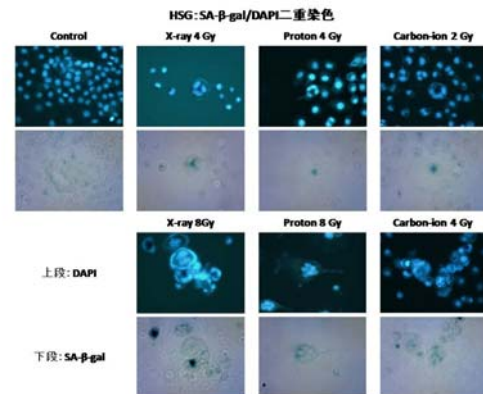
HSG において臨床での治療線量に近い X 線/陽子線 2Gy・炭素線 1Gy では、X 線に比べて陽子線・炭素線では G4 の割合が非常に高くなるが、高線量である X 線/陽子線 6Gy・炭素線 3Gy では、線種間でのグレードの割合の差が小さくなることが分かった (図 4)。



(図 4)

(3) 照射による細胞老化の評価

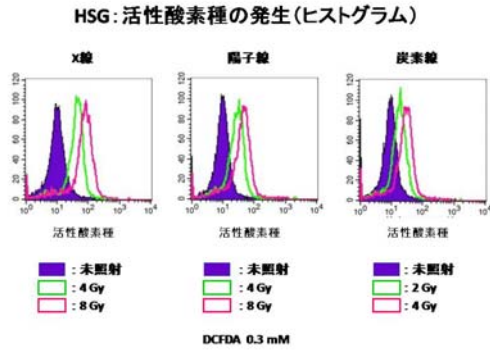
X 線・陽子線・炭素線いずれの線種においても、線量依存性に HSG における SA-β-gal 発現の上昇を認めたが、線種による差異は明らかではなかった (図 5)。



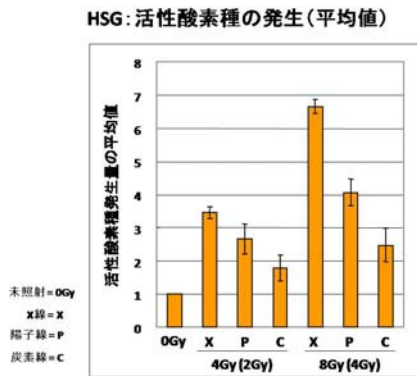
(図 5)

(4) 照射による ROS 発生と比較およびその照射後細胞生存率への影響

HSG における照射単独での ROS 発生は、X 線>陽子線>炭素線であり、発生量は線量依存性に増加した (図 6、7)。これは従来から言われている低 LET (線エネルギー付与) 放射線の方が間接効果の割合が高いという考えと一致するものであった。

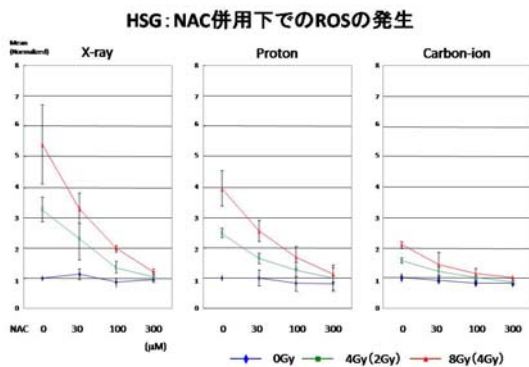


(図 6)

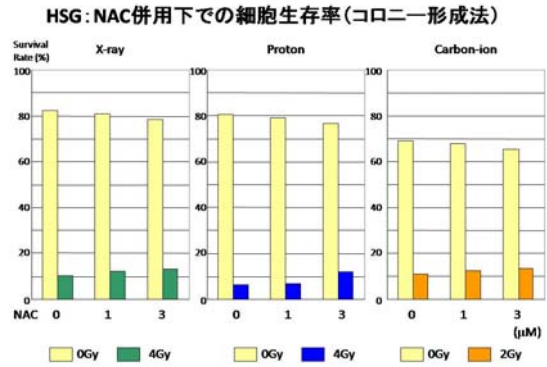


(図 7)

NAC300  $\mu$ M 併用下では、いずれの線種においても照射による ROS 発生はほぼ抑制された (図 8)。よって、NAC 300  $\mu$ M 併用下での照射効果は、ROS の関与しないいわゆる“直接効果”と考えることができると思われたが、コロニー形成法での照射後 HSG の細胞生存率は、NAC 併用の有無で明らかな差は見られなかった (図 9)。



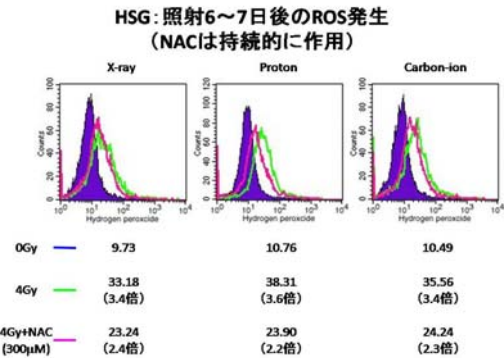
(図 8)



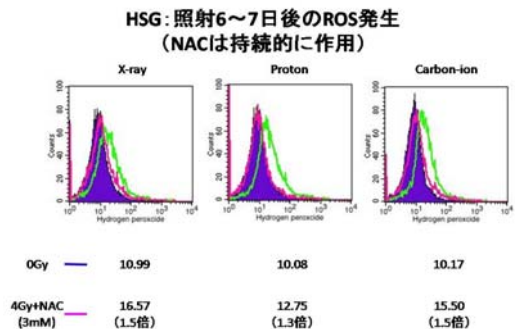
(図 9)

(5) 持続的 ROS 抑制の照射後細胞生存率への影響

HSG における照射単独での照射 6~7 日後の ROS 発生は、非照射細胞と比べて 3.4~3.6 倍であった (図 10: 線種間で有意差なし)。一般的に照射による ROS 発生は一時的と考えられているので、これは照射後の細胞が持続的に ROS を発生させているということを示した新しい知見である。次に、照射時~培養期間中に NAC 300  $\mu$ M を持続的に作用させることにより ROS の発生を 2.2~2.4 倍まで抑制することができた (図 10: 線種間で有意差なし)。NAC の濃度を 3mM に上げたところ、ROS の発生を 1.3~1.5 倍に抑制することができた (図 11: 線種間で有意差なし)。

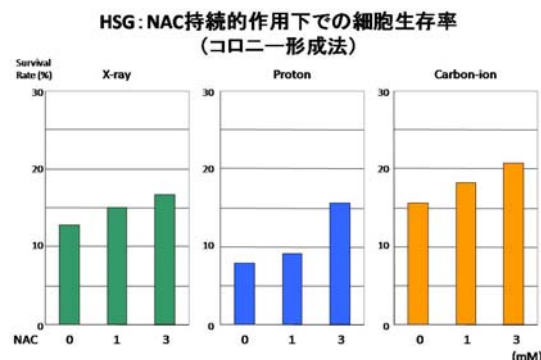


(図 10)



(図 11)

照射時～培養期間中に NAC 1mM および 3mM を持続的に作用させた状態での照射後 HSG の細胞生存率（コロニー形成法）は、NAC 用量依存性に上昇が見られ、X 線・陽子線・炭素線の殺細胞効果における ROS の重要性が示唆された（図 1 2）。尚、細胞生存率上昇の程度は、1mM では線種間で差は見られなかったが、3mM では陽子線の上昇の程度が大きかった。



(図 1 2)

#### (6) 研究成果の意義

陽子線や炭素線を用いた粒子線治療は従来の X 線治療よりも効果が高いこと、特に難治性がんの代表である粘膜悪性黒色腫に対する炭素線治療の有用性が基礎的にも示された。

また、従来から言われている低 LET 放射線の方が間接効果の割合が高いという考えを最新の分子生物学的手法を用いて裏付けることができ、さらに、照射による ROS 発生は一時的ではなく、持続的であるという新しい知見が得られた。そして、ROS 発生を持続的に抑制することで、照射後の細胞生存率が上昇することが分かり、NAC が放射線（粒子線）防護剤として臨床応用できる可能性が示唆された。

国内外で類似の報告は皆無であり、粒子線治療施設の開設が相次いでいることと併せると、今後のがん治療に大きなインパクトを与えるものと思われる。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. Y. Demizu, K. Terashima, M. Mima, O. Fujii, Y. Niwa, K. Morimoto, D. Miyawaki, R. Sasaki, Y. Hishikawa, M. Abe, and M. Murakami; Particle radiotherapy Using Protons or Carbon Ions for Adenoid

Cystic Carcinoma of the Head and Neck; 52nd Annual Meeting of American Society for Radiation Oncology; 2010/11/2; San Diego, USA

2. M. Murakami, Y. Demizu, Y. Niwa, O. Fujii, K. Terashima, M. Mima, and Y. Hishikawa; Proton radiotherapy for stage C prostate cancer; 29th Annual Meeting of European Society for Therapeutic Radiology and Oncology; 2010/9/12; Barcelona, Spain
3. T. Maeda, M. Murakami, Y. Demizu, Y. Hishikawa, and M. Abe; Difference of cell biological effects in cancer cell lines irradiated by X-ray or particle beams; 440th Wilhelm und Else Heraeus Seminar; 2009/9/15; Frauenwörth, Germany
4. S. Nagayama, M. Murakami, Y. Demizu, Y. Hishikawa, and M. Abe; Reevaluation for problem of chemical particle therapy in cell biological effect of proton, carbon-ion and X-ray at Hyogo Ion Beam Medical Center; World Congress 2009; 2009/9/12; Munich, Germany

[図書] (計 0 件)

[その他]

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菱川 良夫 (HISHIKAWA YOSHIO)  
神戸大学・医学系研究科・客員教授  
研究者番号：20122335

##### (2) 研究分担者

村上 昌雄 (MURAKAMI MASAO)  
神戸大学・医学系研究科・客員准教授  
研究者番号：50210018

佐々木 良平 (SASAKI RYOHEI)  
神戸大学・医学部附属病院・特命准教授  
研究者番号：30346267

出水 祐介 (DEMIZU YUSUKE)  
神戸大学・医学系研究科・医学研究員  
研究者番号：50452496

##### (3) 連携研究者

該当なし