

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591504

研究課題名(和文) 放射線異感受性腫瘍に対する重粒子マイクロビーム照射・抗癌剤併用に関する基礎研究

研究課題名(英文) Interaction of heavy-ion microbeam and chemotherapeutic agents in vitro

研究代表者

高橋 健夫 (TAKAHASHI TAKEO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70241883

研究成果の概要(和文): 重粒子線(炭素線)は物理学的線量分布に加え、生物学的効果比が高く、放射線抵抗性腫瘍に特に有用である。重粒子線治療が今後、一般的に普及するためには局所進行癌に対する集学的治療の中での有効性を、科学的に明らかにする必要がある。In vitroの検討で重粒子線は p53 変異株で放射線抵抗性腫瘍に対し効果が高く、照射効果は p53 に非依存的である。抗癌剤の増感効果はトポイソメラーゼ 阻害剤でみられ、アポトーシスと Ku70 蛋白の発現抑制が関与していた。バystanダー効果が重粒子線照射後見られるが、薬剤増感効果は未確認である。

研究成果の概要(英文): It is known that relative biological effectiveness (RBE) of high-LET heavy-ion irradiation is higher than that of low-LET radiation such as X-ray. Monotherapy of charged particles has been applied for several tumors. We investigate the differences between two tumor cell lines with different radiosensitivities in sensitivity to high-LET heavy ion beam and in sensitizing effect and the mechanism of cisplatin and etoposide in combination with heavy-ion beam. Etoposide showed a synergistic effect in combination with carbon beam irradiation in radioresistant NMT-1R cells. However, there was no enhancement effect in radiosensitive NMT-1 cells. On the other hand, cisplatin had no enhancement in both cell lines. There was no differences in the pattern of G2 arrest among Carbon-beam + etoposide, Carbon-beam + cisplatin, and Carbon-beam alone 24 hours after irradiation. The increase in amount of apoptosis and the inhibition of Ku70 protein expression were found in the combination of carbon beam irradiation and etoposide in NMT-1 cells. There were bystander effects after heavy-ion microbeam irradiation.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：重粒子線、バystanダー効果、p53、抗癌剤、DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

重粒子線(炭素線)は優れた線量分布を有し、直接 DNA 障害を引き起こす直接効果が主体であることから細胞致死効果が大きく、X線と比較して生物学的効果は大きく放射線抵抗性腫瘍に有用であるとされている。実際の臨床面においても重粒子線治療は臨床試験の結果から、有用性が明らかになり普及の段階に入っている。ただし今後、治療適応が拡大するかは現在の臨床試験で確認されている 期肺癌などに加え、局所進行癌で有用性が確認できるかによると考えられる。以前よりわれわれは重粒子線に対する感受性は p53 ステータスに依存せず、X線に対して放射線感受性の異なる腫瘍細胞も、重粒子線照射(炭素線)においては同一の照射効果であることを明らかにした。さらに放射線抵抗性腫瘍においてトポソメラーゼ 阻害剤のエトポシドが重粒子線照射効果を増感させることを明らかにした(一方、X線で顕著な増感効果を示すシスプラチンで増感は見られなかった)。すなわち放射線抵抗性腫瘍においては重粒子線単独に比べ抗癌剤併用の意義がある可能性を確認した。腫瘍本体の制御率のみならず、局所進行癌においては重粒子線単独で治療した場合に、腫瘍辺縁の再発や所属リンパ節等の再発転移が問題になる可能性が高い。近年、バイスタンダー効果の存在が明らかになりつつあるが、抗癌剤併用時にバイスタンダー効果の増強があれば、腫瘍周囲のリンパ管侵襲等で再発しやすい腫瘍辺縁の制御に貢献する可能性がある。今回、同一細胞由来で p53 状態ならびに放射線感受性の異なる細胞を用いて、重粒子マイクロビーム照射に抗癌剤(エトポシド)を併用した際の増感効果を、バイスタンダー効果を中心に解析する。また細胞核に選択的にマイクロ

ビームで照射を行うことで重粒子線に対する細胞応答ならびに抗癌剤併用効果の分子生物学的な詳細な検討を行う。

2. 研究の目的

われわれは以前より、同一細胞由来の放射線異感受性細胞(放射線高感受性腫瘍細胞株 NMT-1、放射線抵抗性腫瘍細胞株 NMT-1R)を用いて X線・重粒子線に対する感受性の研究を行ってきた。X線に対する照射効果の相違はアポトーシス出現率の相違ならびに p53 における遺伝子的相違が関与していることを明らかにしてきた。これまでの研究で、この放射線異感受性腫瘍に対する重粒子線の照射効果を明らかにしてきた。

本課題は(1)マイクロビームを用いて細胞核に選択的に重粒子を照射することで、重粒子線に対する細胞応答機構の解明、ならびに抗癌剤併用時の増感効果の解明を分子生物学的に行う。さらに(2)バイスタンダー効果の放射線異感受性細胞における検討、と抗癌剤の併用効果の強度ならびに作用機序を明らかにすることが目的である。近年、重粒子線マイクロビームを用いて細胞内器官を狙い撃つ照射により、より照射な照射に対する細胞応答が研究され始めている。重粒子マイクロビーム照射で細胞核に選択的に照射を行えることから、われわれが進めてきた p53 状態の異なる腫瘍に対する重粒子線の照射効果ならびに抗癌剤併用効果の作用機序の詳細な検討が可能となる。従来の mono peak beam を用いたランダムな細胞に対する照射での検討に加えて、細胞核に対する狙い撃ち照射実験を行うことで腫瘍細胞の細胞応答のメカニズム、さらにはトポソメラーゼ II 阻害剤の増感効果に関する詳細な分子生物学的詳細な検討が可能となる。特に放射線抵抗性腫瘍 NMT-1R に焦点をあて併用効果に

ついて作用機序を追求する。作用機序に関しては DNA 修復機序の発現様式・程度についてマイクロビーム照射後の細胞応答ならびに周囲の非照射細胞の細胞応答を中心に解析する。バスタンダー効果も重粒子抗癌剤併用によりいかにその作用が修飾されるかを詳細に検討する。

3. 研究の方法

高 LET 放射線と白金製剤であるシスプラチンとトポイソメラーゼ II 阻害剤(エトポシド)の併用効果は重粒子線ブロードビーム及び重イオンマイクロビーム照射後に薬剤を添加し細胞死の変化を継時的に検討する。薬剤は単独では軽度な殺細胞効果である IC₅₀ 量 (NMT-1 では 0.25 µg/ml、NMT-1R では 1.0 µg/ml) を照射直前の 1 時間 37 °C で反応させる。これにより重粒子をブロードに照射もしくは細胞核に選択的に照射した細胞の細胞死の様式ならびに重粒子単独と同様にヒット数と抗癌剤併用による細胞致死効果の相関を検討比較検討する。細胞核に対する重粒子マイクロビーム照射後の細胞を 3, 6, 12, 24 時間にアポトーシスの頻度、G2 ブロック、非相同性 DNA 修復に関連する DNA-PK、Ku70、Ku80 の免疫染色を行い重粒子線の生残率、重粒子のヒット数と DNA 修復蛋白の発現の相関を検討する。それぞれの腫瘍系に対して実験を行い比較検討することで DNA 修復能と重粒子線・抗癌剤併用の照射効果の相関を解明する。重粒子線はブロードビーム 290MeV/µ 及びマイクロビームは炭素線(12C5+)220MeV/µ を用いてビーム数を制御して照射実験を行う。ブロードビームは放射線医学総合研究所で、また日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の細胞局部照射装置(マイクロビーム)にてマイクロビーム照射を行う。

4. 研究成果

重粒子線(炭素線)は生物学的効果比が X 線の 2-3 倍と評価され、臨床的には放射線抵抗性腫瘍に特に有用である。重粒子線治療が今後、一般的に普及するためには局所進行癌に対する集学的治療の中で用いられるケースを見出す必要がある。現時点での臨床試験では局所制御は良好であるが、遠隔転移が問題となっている。そこで本研究では重粒子線に抗癌剤を併用した際の増感効果ならびにバスタンダー効果の有無を、p53 ステータスの異なるラット卵黄嚢由来で同一細胞由来の放射線異感受性腫瘍を用いて検討し、その機序について分子生物学的に解析した。

(1) 重粒子線・抗癌剤の併用効果: X 線照射で増感がみられ、固形癌に汎用される cisplatin (DNA 架橋形成), etoposide (topoisomerase II 阻害剤)を用いて IC₅₀ 量で併用実験を行ったところ、cisplatin は相加効果のみであったが、etoposide では NMT-1R において相乗効果(D₀ の減少)が認められた。

(2) 増感効果のメカニズム: 炭素線照射(1,3,5Gy)照射後、経時的にアポトーシスの出現頻度を解析したところ、アポトーシスの増強が認められ、etoposide の増感効果にアポトーシス発現の増加が関与していることが示唆された。細胞周期に関しては強い G2 ブロックが見られたが、各群で差異は見られなかった。DNA 修復の機構では DNA 修復を担う Ku70 蛋白の発現が etoposide 併用群で抑制された。よって放射線抵抗性 NMT-1R における etoposide 併用での増感効果はアポトーシス増加ならびに DNA 修復能の低下が関与していると考えられる。

(3) 重粒子マイクロビーム照射によりバスタンダー効果が認められたが、併用効果は確認されていない。

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 14 件)

Takahashi 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 Agent in Two Cell lines with Different Radiosensitivities and Different p53 Status. Anticancer Research 査読有 30,2010, 1961-1968

Takahashi T, Yoshida Y, Ando K, Kawamura H, Okamoto M, Saitoh J, Ishikawa H, Ebara T, Suzuki Y, Ohno T, Nakano T: Signal Transduction and Heavy Ion Radiation Therapy: Biological Mechanisms, Biological Quality Assurance, and New Multimodality Approach. Current Signal Transduction therapy 査読有 5, 2010, 237-243

Kaminuma T, Suzuki Y, Shirai K, Mizui T, Noda SE, Yoshida Y, Funayama T, Takahashi T, Kobayashi Y, Shirao T, Nakano T: Effectiveness of carbon-ion Beams for Apoptosis Induction in Rat Primary Immature Hippocampal Neurons. J Radiat Res. 査読有 51, 2010, 627-631

Katoh H, Ishikawa H, Hasegawa M, Yoshida Y, Suzuki Y, Ohno T, Takahashi T, Nakano T: Protective effect of urinary trypsin inhibitor on the development of radiation-induced lung fibrosis in mice. J Radiate Res. 査読有 51, 2010, 325-32

Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takahashi T: Current Advancement

in Radiaion Therapy for Uterine Cervical Cancer. J.Radiat Res 査読有 51,2010, 1-8

Ishikawa H, Nonaka T, Sakurai H, Tamaki Y, Kitamoto Y, Ebara T, Shioya M, Noda SE, Shirai K, Suzuki Y, Takahashi T, Nakano T.: Usefulness of intraluminal brachytherapy combined with external beam radiation therapy for submucosal esophageal cancer: long-term follow-up results. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 査読有 76, 2010, 452-9

Wakatsuki M, Ohno T, Yoshida D, Noda S, Saitoh J, Shibuya K, Katoh H, Suzuki Y, Takahashi T, Nakano T: Intracavitary Combined with CT-guided Interstitial Brachytherapyfor Locally Advanced Uterine Cervical Cancer:Introduction of the Technique and a Case Presentation. J.Radiat.Res 査読有 52, 2011, 54-58

Niibe Y, Kenjo M, Onishi H, Ogawa Y, Kazumoto T, Ogino I, Tsujino K, Harima Y, Takahashi T, Anbai A, Tsuchiba E, Toita T, Takemoto M, Yamashita H, Hayakawa K: High-dose-rate intracavity brachytherapy combined with external beam radiotherapy for stage B adenocarcinoma of the uterine cervix in japan: A multi-institutional study of Japanene society of therapeutic radiorogy and oncology 2006-2007. Jpn J Clini Oncol 査読有 8, 2010, 795-799
Oike T, Ohno T, Wakatsuki M, Node SE, Saitoh JI, Mizukami T, Yoshimoto Y, Okonogi N, Katoh H, Shibuya K,

Suzuki Y, Ishikawa H, Ebara T, Takahashi T, Nakano T: The Benefit of Small Bowel and Pelvic Bone Sparing in Excluding Common Ilic Lymph Node Region from Conventional Radiation Fields in Patients with Uterine Cervical Cancer:A Dosimetric Study.. Journal of Radiation Research 査読有 51, 2010, 715-721

Shirai K, Suzuki Y, Okamoto M, Wakatsuki M, Noda SE, Takahashi T, Ishiuchi S.Hasegawa M, Nakazato Y, Nakano T.: Influence of histological subtype on survival after combined therapy of surgery and radiation in WHO grade 3 glioma. J Radiat Res 査読有 51, 2010, 589-94

Ebara T, Kaira K, Saitoh J, Shioya M, Asao T, Takahashi T, Sakurai H, Kanai Y, Kuwano H, Nakano T: L-type Amino-Acid Transporter 1 Expression Predicts the Response to Preoperative Hyperthermo -Chemoradiotherapy for Advanced Rectal Cancer. Anticancer Research 査読有 30, 2010, 4223-4228

Takahashi T, Yoshida Y, Musya A, Kawamura H, Ando K, Nakano T: mechanism of enhancement effect of carbon-beam irradiation and topoisomerase II inhibitor on two cell lines with different radiosensitivities and different p53 status in vitro. 37th Annual Meeting of the European Radiation research Society (Prague August 26-29) 査読無 2009, 83-85

Saitoh J, Sakurai H, Suzuki Y, Katoh H, Takahashi T, Nakano T: Metastatic

angiosarcoma of the lung with alveolar hemorrhage. Jpn J Radiol 査読有 27, 2009, 381-384

Takahashi T, Hondo M, Nishimura K, Kitani A, Yamano T, Yanagita H, Osada H, Shinbo M, Honda N: Evaluation of quality of life and psychological response in cancer patients treated with radiotherapy. Radiation Medicine 査読有 26, 2008, 396-401

[学会発表](計9件)

Ishikawa H. High-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy for locally advanced prostate cancer. ASTRO. 2010.10.30-11.3. San Diego.

Takahashi T. Mechanism of sensitizing effect of high-LET carbon ion irradiation and anticancer drug on two cell lines with different radiosensitivities and p53 status in vitro. ESTRO 29, 2010. 9. 12-16, Barcelona.

Takahashi T. Mechanism of enhancement effect of carbon-beam irradiation combined with chemotherapeutic agents on two cell lines with different radiosensitivities and different p53 status in vitro. PTCOG 49. 2010.5.20-22. Maebashi.

Takahashi T. Biological quality assurance (QA) of carbon beam irradiation at spread-out Bragg peak beams. PTCOG 49. 2010.5.20-22. Maebashi.

Yoshida Y. Preclinical biological

assessment for treatment planning of carbon-ion therapy. PTCOG 49. 2010.5.20-22. Maebashi.

Murata K. Analysis of esophageal mobility during normal respiration in 4DCT planning. PTCOG 49. 2010.5.20-22. Maebashi.

Nishimura K. Assessment of interfractional set-up accuracy in lung cancer for highly precise radiotherapy, especially for particle therapy, using a body immobilization system of stereotactic radiotherapy. PTCOG 49. 2010.5.20-22. Maebashi.

Takahashi T. Enhancement effect of high-LET carbon-ion beam and anticancer drugs on two cell lines with different radiosensitivities and p53 status in vitro. ASTRO Annual Meeting, 1-5 November, 2009. Chicago

Takahashi T. Gross tumor volume definition in treatment planning of stereotactic radiotherapy for brain metastases: dose comparison study with gadoteridol. ESTRO 27.

2008.9.14. Gotengerg

〔図書〕(計1件)

高橋健夫(大西洋, 唐澤克之, 唐澤久美子, 監修) 篠原出版新社、がん・放射線療法 2010、転移性腫瘍における放射線療法「骨転移」 2010、1187-1195

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 健夫 (TAKAHASHI TAKEO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：7 0 2 4 1 8 8 3