

令和 6 年 4 月 20 日現在

機関番号：23903
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K16830
研究課題名（和文）タイムラプス観察から迫る陽子線照射後の生体反応動態：最適な分割法開発に向けた検討

研究課題名（英文）Exploring the biological response dynamics after proton beam irradiation through time-lapse observation: a study towards the development of optimal fractionation methods

研究代表者
中島 晃一郎（Nakajima, Koichiro）
名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：50866176
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の当初の計画では、培養細胞実験とショウジョウバエ実験を並行して行う予定であったが、ショウジョウバエに対する超高線量率陽子線照射（FLASH照射）実験を優先的に行うこととした。野生型ショウジョウバエの三齢幼虫と処女雌成虫を用いて、通常線量率照射群とFLASH照射群の比較実験を行った。照射後遺伝子発現解析では、線量率の違いにより特定の遺伝子において遺伝子発現レベルが異なることが観察できた。一方で、処女雌成虫に対する照射実験において、その第一世代子孫（F1）の蛹化率・羽化率、羽化後の単位時間当たり活動量を評価したが、いずれの項目においても線量率の違いによる有意な差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
陽子線治療は低侵襲ながん治療の選択肢として重要な役割を果たしている。「超高線量率照射=FLASH照射」は、未だ生物学的機序において不明な点が多いが、臨床応用されれば、さらなる低侵襲化を可能とする画期的な照射法として期待されている。本研究の成果は、FLASH照射の生物学的基礎研究の普及に向けた実験モデルの構築に寄与するものであり、ショウジョウバエにおいても線量率の違いにより反応に差が出る可能性が示唆されたことは、今後に期待の持てる結果であった。

研究成果の概要（英文）：In the initial plan of this study, experiments on cultured cells and *Drosophila* were intended to be conducted concurrently. However, priority was given to ultra-high dose rate proton irradiation (FLASH irradiation) experiments on *Drosophila*. Experiments comparing normal dose rate irradiation and FLASH irradiation were conducted using wild-type *Drosophila* third instar larvae and virgin female adults. Post-irradiation gene expression analysis revealed differential gene expression levels due to varying dose rates in specific genes. In contrast, in the irradiation experiments on virgin female adults, no significant differences were observed in the pupation and eclosion rates of the first generation offspring (F1), nor in their activity levels per unit time post-eclosion.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：陽子線治療 FLASH照射 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

低侵襲ながん治療法として、陽子線治療の普及が世界規模で加速している。X線照射後と陽子線照射後では生体内で起こる反応が様々な点で異なることがこれまでに分かっている。しかし依然として不明な点も多く、陽子線治療の急速な臨床応用に、基礎生物学的な知識の裏付けが追いついていないという現状があり、知識の蓄積をベースとした陽子線治療独自の最適な照射方法の構築が望まれている。放射線治療を行う上で線量分割は重要な検討課題の一つである。一方で、近年、極めて高い線量率で放射線を照射することで、腫瘍組織に対するダメージは保持したまま、正常組織の障害のみが軽減するという、「超高線量率効果(=FLASH効果)」が注目を集めるようになった。

臨床利用に近い環境において、陽子線照射実験(特に陽子線FLASH照射実験)を行える施設は世界的にも限られており、この分野の研究発展のためには、照射可能施設の効率的な利用に向けた研究体制の構築、研究ツールの開発が望まれる。我々はこれまでに陽子線照射実験にショウジョウバエを用いた報告がほとんどないことに着目し、ショウジョウバエ in vivo 系実験モデルを構築するとともにその有用性を検証することを目的として研究を行ってきた。

2. 研究の目的

当初の本研究の目的は、陽子線治療における最適な線量分割法を開発するために、陽子線照射後の生体反応をタイムラプスイメージングにより観察することでX線照射後との違いを時間の概念を踏まえて整理していくことであった。一方で、研究開始早期より自施設においてFLASH照射実験を行うための環境が整ったことから、FLASH効果がショウジョウバエにおいても確認されるかを検証することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

[1] 交配実験 (処女雌に対する照射後F1世代の観察)

野生型キロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*: Oregon-R)の処女雌成虫に対して、陽子線FLASH照射(FLASH)、陽子線通常線量率照射(CONV-P)をそれぞれ行ったあと、非照射の雄と交配させ、その第一世代子孫(F1)の蛹化率、羽化率、羽化後の単位時間当たりの活動量を計測した。

[2] 遺伝子発現解析

野生型キロショウジョウバエの三齢幼虫に対して、40 GyのFLASH、CONV-P、X線通常線量率照射(CONV-X)を行い、照射後2時間時点における遺伝子発現についてマイクロアレイを用いて解析した。

[3] 形態観察

野生型キロショウジョウバエの三齢幼虫に対して、40 GyのFLASHとCONV-Pを照射した後、その個体が成虫になるまで飼育し、形態観察を行うことで表現型の違いを評価した。

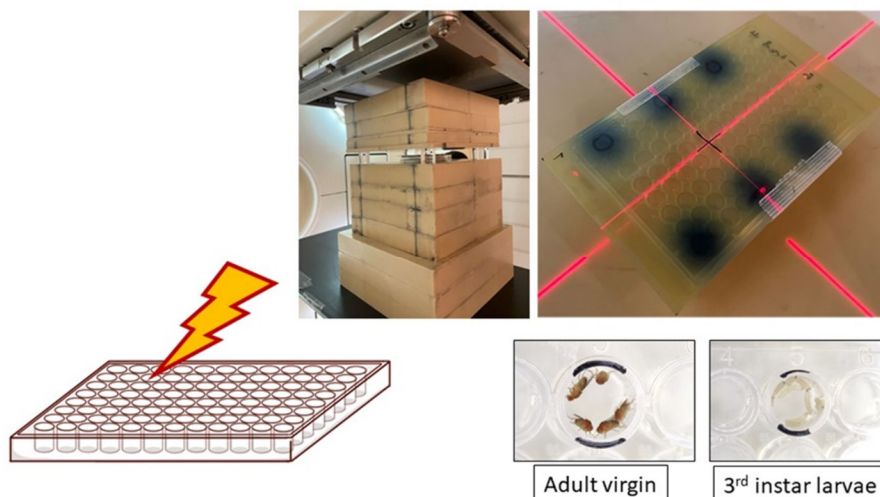


図 1

FLASHはProbeat-III® (Hitachi)-シンクロトロン加速器を用いて照射を行い、線量率は>1000 Gy/sec以上に設定した(図1)。CONV-Pは同一陽子線照射装置を用いて、約0.5 Gy/secで照射を行い、CONV-XはNovalis-TX®を用いて、約0.05 Gy/secで照射を行った。

4. 研究成果

[1] 交配実験 (処女雌に対する照射後 F1 世代の観察)

蛹化率

FLASH と CONV-P それぞれにおいて 20 Gy、50 Gy を照射した。照射後 1~5 日までに産まれた卵の数を毎日カウントし、蛹化した割合(蛹化率)を算出した。1~5 日までの一日毎の蛹化率と 5 日間の合計の蛹化率を図 2 に示す。5 日間の合計の蛹化率は、Control (非照射): 94%、CONV-P 20Gy: 75%、FLASH 20Gy: 77%、CONV-P 50Gy: 34%、FLASH 50Gy: 28%であり、線量依存的な蛹化率の低下は見られたものの、線量率間では有意な差は認められなかった。

羽化率 (図 3)

蛹化率と同様に成虫まで羽化した割合(羽化率)を算出した。1~5 日までの一日毎の羽化率と 5 日間の合計の羽化率を図 3 に示す。5 日間の合計の羽化率は、Control: 90%、CONV-P 20Gy: 72%、FLASH 20Gy: 73%、CONV-P 50Gy: 30%、FLASH 50Gy: 26%であり、蛹化率と同様に線量依存的な羽化率の低下は見られたものの、線量率間では有意な差は認められなかった。

羽化後の単位時間当たりの活動量

照射後 1、2 日に産まれた卵の成虫を 12 時間周期の明暗条件で飼育し、一日当たりの活動量と一日当たりの活動時間を Drosophila activity monitoring (DAM) system により定量化した。結果としては、一日当たりの活動量、一日当たりの活動時間の両項目ともに線量率間では有意な差は認められなかった。

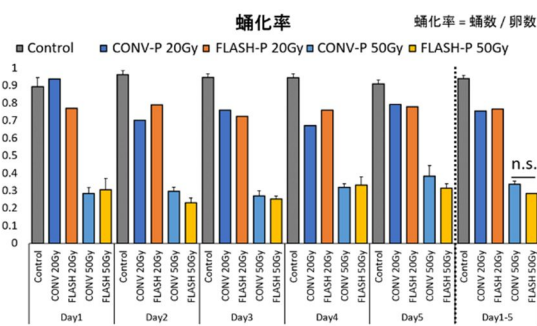


図 2

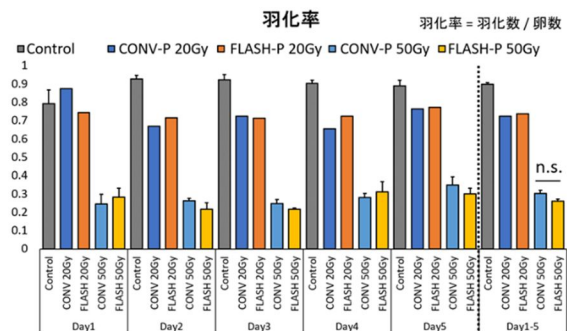


図 3

[2] 遺伝子発現解析

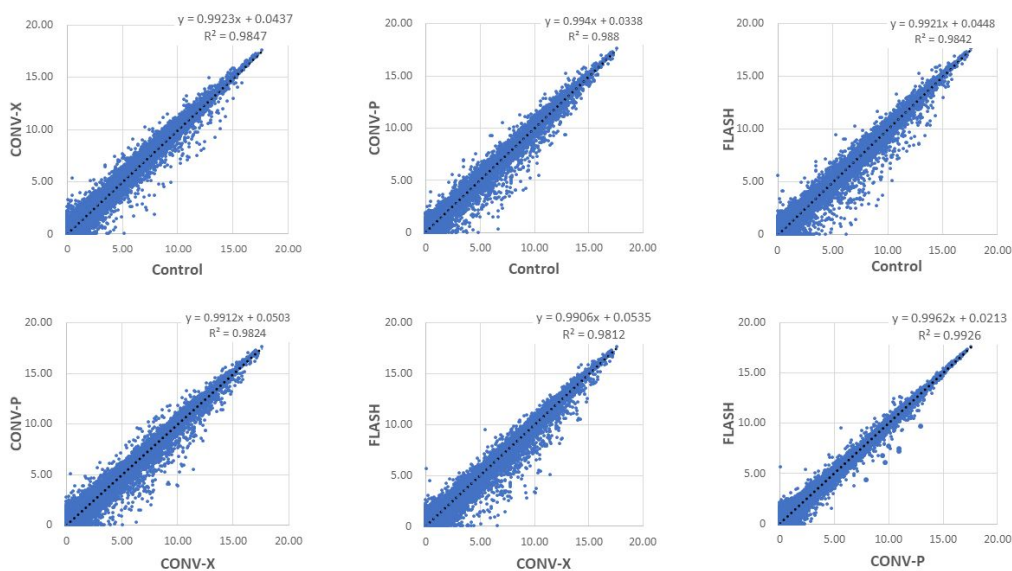


図 4

マイクロアレイを用いた、遺伝子発現の網羅的解析の結果、FLASH 群と CONV-P 群は相対的に発現変動のパターンが似ていることが分かった(図 4)。FLASH 群においても CONV-P 群同様、「mre11」, 「rad50」, 「nbs」, 「ku80」, 「ku70」などの DNA repair 関連の遺伝子発現が増加しており、GO 解析の結果、「Response to ionizing radiation」、「DSB repair」、「Telomere maintenance」といった biological process に関連する遺伝子の発現が増加していることが分

かった。FLASH 群と CONV-P 群を比較した際、代表的なストレス誘導タンパクである HSP70 family の遺伝子が CONV-P 群では発現増加している一方で、FLASH 群では発現低下しているという結果であった。

[3] 形態観察

FLASH 群と CONV-P 群の照射後の形態観察を行うことで表現型の違いを確認することを目的に照射実験を行ったが、照射後の飼育（輸送）環境のためか、比較に足る十分な個体サンプルが確保できなかったため、予備実験として行った CONV-P 群と Control 群の比較を図 5-8 に示す。

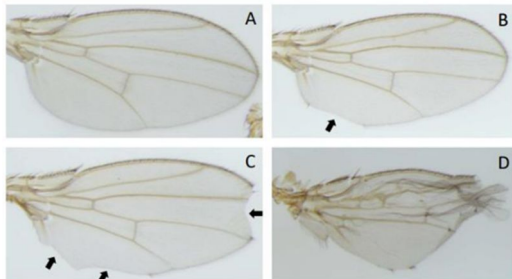


図 5

羽の表現型

Control (A) および CONV-P 群 (B-D) の表現型。CONV-P 群は端が欠ける表現型 (Notch 表現型) を示した (矢印)、(B) 羽化後 2 日で死んだ雄の羽。(C) 羽化直後で死んだ個体。(D) 羽が開かずに死んでいた個体。

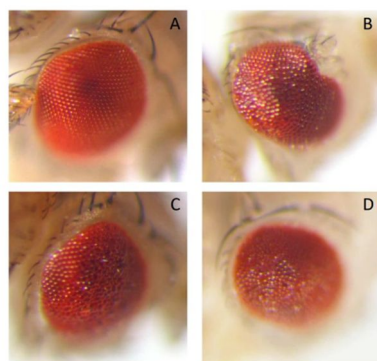


図 6

複眼の表現型

Control (A) および CONV-P 群 (B-D) の表現型。Control は個眼が整然と並んだ複眼を有している。CONV-P 群の多くは個眼の並びが乱れる (rough eye) 表現型を示した。



図 7

剛毛の表現型

Control (A) および CONV-P 群 (B, C) の背中。Control では剛毛が左右同数並んでいる。CONV-P 群の一部では剛毛が欠ける表現型を示した (矢印)。

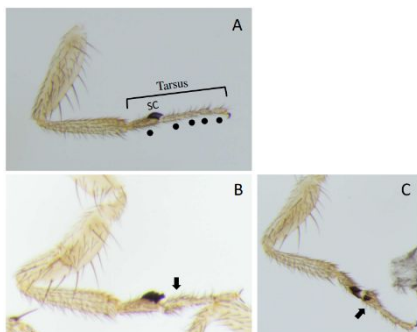


図 8

脚の表現型

Control (A) および CONV-P 群 (B, C) の雄前脚。Control の雄は前脚の先端部 (Tarsus) に 5 つの分節を有している (黒丸)。基部側の分節には交尾器である性櫛 (Sex comb; SC) が見られる。CONV-P 群では分節の数が減少しているもの (B) や一部が肥大化している (C) 表現型を示した (矢印)。

まとめ

本研究において、明らかな FLASH 効果 (正常組織防護効果) は確認できなかったが、照射条件の確認が出来たこと、また遺伝子発現の変動パターンが線量率により異なる可能性が示唆されたことは重要であり、本研究の成果を今後の研究に活かしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koichiro Nakajima, Hiromitsu Iwata, Yukiko Hattori, Kento Nomura, Shingo Hashimoto, Toshiyuki Toshito, Kensuke Hayashi, Yo Kuroda, Hideo Fukano, Hiroyuki Ogino, Yuta Shibamoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Spot Scanning Proton Therapy for Sinonasal Malignant Tumors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of particle therapy	6. 最初と最後の頁 189-199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14338/IJPT-D-20-00043.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kento Nomura, Hiromitsu Iwata, Toshiyuki Toshito, Chihiro Omachi, Junpei Nagayoshi, Koichiro Nakajima, Hiroyuki Ogino, Yuta Shibamoto	4. 巻 97
2. 論文標題 Biological effects of passive scattering and spot scanning proton beams at the distal end of the spread-out Bragg peak in single cells and multicell spheroids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of radiation biology	6. 最初と最後の頁 695-703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09553002.2021.1889704	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiromitsu Iwata, Kenji Akita, Yusuke Yamaba, Eiji Kunii, Osamu Takakuwa, Misuzu Yoshihara, Yukiko Hattori, Koichiro Nakajima, Kensuke Hayashi, Toshiyuki Toshito, Hiroyuki Ogino, Yuta Shibamoto	4. 巻 109
2. 論文標題 Concurrent Chemo-Proton Therapy Using Adaptive Planning for Unresectable Stage 3 Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase 2 Study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of radiation oncology, biology, physics	6. 最初と最後の頁 1359-1367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijrobp.2020.11.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yukiko Hattori, Hiromitsu Iwata, Koichiro Nakajima, Kento Nomura, Kensuke Hayashi, Toshiyuki Toshito, Shingo Hashimoto, Yukihiro Umemoto, Jun-Etsu Mizoe, Hiroyuki Ogino, Yuta Shibamoto	4. 巻 62
2. 論文標題 Changes in sexual function and serum testosterone levels in patients with prostate cancer after image-guided proton therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of radiation research	6. 最初と最後の頁 517-524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrab002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiromitsu Iwata, Hiroyuki Ogino, Yukiko Hattori, Koichiro Nakajima, Kento Nomura, Shingo Hashimoto, Kensuke Hayashi, Toshiyuki Toshito, Shigeru Sasaki, Jun-Etsu Mizoe, Yuta Shibamoto	4. 巻 111
2. 論文標題 A Phase 2 Study of Image-Guided Proton Therapy for Operable or Ablation-Treatable Primary Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of radiation oncology, biology, physics	6. 最初と最後の頁 117-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijrobp.2021.03.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koichiro Nakajima, Hiromitsu Iwata, Yukiko Hattori, Kento Nomura, Kensuke Hayashi, Toshiyuki Toshito, Yukihiko Umemoto, Shingo Hashimoto, Hiroyuki Ogino, Yuta Shibamoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Patient-Reported Quality of Life Outcomes after Moderately Hypofractionated and Normofractionated Proton Therapy for Localized Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 517-517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14030517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Hashimoto, Hiromitsu Iwata, Yukiko Hattori, Koichiro Nakajima, Kento Nomura, Kensuke Hayashi, Toshiyuki Toshito, Eiko Yamamori, Kenji Akita, Jun-etsu Mizoe, Hiroyuki Ogino, Yuta Shibamoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Outcomes of proton therapy for non-small cell lung cancer in patients with interstitial pneumonia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13014-022-02027-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島晃一朗、江上涼、富田淳、桑和彦、岩田宏満、歳藤利行、大町千尋、梅澤真澄、山田雅史、荻野浩幸
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた陽子線FLASH照射に関する実験モデルの検討
3. 学会等名 第23回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島 晃一郎、岩田 宏満、野村 研人、秋田 憲志、荻野 浩幸、芝本 雄太
2. 発表標題 期肺癌に対する陽子線治療 -臨床から基礎へ-
3. 学会等名 第49回放射線による制癌シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩田 宏満 (Iwata Hiromitsu)		
研究協力者	条 和彦 (Kume Kazuhiko)		
研究協力者	富田 淳 (Tomita Jun)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------