

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23046

研究課題名（和文）線源が口腔がんの細胞周期動態に与える影響とそれを標的とした放射線増感法の開発

研究課題名（英文）Effect of alpha-emitting seed on cell cycle kinetics of oral cancer cells and development of radiosensitizing methods

研究代表者

野島 瞳 (Nojima, Hitomi)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・特任助教

研究者番号：40878203

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞周期可視化システムであるFucciを導入した複数の細胞株を用い、線源近傍での著明なG2アレストを経時的に捉えることができた。また、G2アレスト阻害剤であるWEE1阻害剤を併用したところ、G2アレストは解除され、細胞死が増加した。また、マウスモデルでも線源近傍で著明なG2アレストが生じていることが分かった。DNA損傷マーカーであるH2AXの発現は、線源からの距離依存的に減少し、線源近傍では修復不能で致死的なpan-nuclear typeが検出され、線源が周囲に及ぼす生物学的影響を初めて明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんに対する低線量率小線源治療は有用であるが、従来治療に用いてきた線源は、抵抗性を示すがんの存在や術者の被曝等が問題であった。これらの問題点を解決することが期待できる線を利用した治療法が近年開発され、従来の局所腫瘍内照射の利点と線の破壊力を有する画期的な治療法といえる。しかし、新しい治療法であるが故に放射線生物学的知見はほとんど得られていない。また、これまで放射線治療と併用することで増感作用を示す様々な薬剤が開発されてきたが、未だ臨床応用に至っていない。線による細胞動態を把握することでより良い治療法を開発するとともに、薬剤により増感させることが可能になれば臨床応用につながる。

研究成果の概要（英文）：Using several cell lines expressing Fucci, I detected strong G2 arrest near the alpha seed in a time dependent manner. Cells were released from G2 arrest and cell death increased following the WEE1 inhibitor treatment, which is able to inhibit radiation-induced G2 arrest. In the mouse model, it was also found that a remarkable G2 arrest was induced near the seed. DNA damage was detected by the expression of H2AX. It decreased in a distance dependent manner from the seed, and an unreparable and fatal pan-nuclear type was detected near the seed. In this study, for the first time, I could reveal the kinetics of DNA damage response near the alpha-emitting Ra-224 seed using human tongue cancer cell lines and suggest a possible radiosensitization by G2/M checkpoint inhibitor.

研究分野：放射線生物学、放射線腫瘍学

キーワード：線源 小線源治療 口腔がん 細胞周期 放射線増感法

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔がんに対する低線量率小線源治療の現状

がんの治療は、手術、放射線治療、化学療法や免疫療法のうち単独もしくはいくつかを組み合わせた集学的治療が行われている。放射線治療のひとつである低線量率小線源治療とは、放射性物質を固形腫瘍内に埋め込むことで、ターゲットへの線量を最大化しつつ正常組織への線量を最小化することで副作用を低減し、さらに腫瘍と同時に動くため腫瘍追尾も可能、手術ができない全身状態の患者にも適応可能な治療法である。治療の適応となる Stage I の早期舌がんにおいて、手術と同等の成績であり (Shibuya et al, *IJROBP*, 1993)、有用であることが示されている。しかし、治療線源は主に線源を用いているため、線に抵抗性を示すがんが存在や術者の被曝、術後の患者隔離が問題となっている。

(2) 線源を用いた新規治療法

上記の問題点を解決することが期待できる線源を利用した治療法が、近年イスラエルで開発された。半減期 3.66 日の Ra-224 を線源として用いると、崩壊核種が組織内で数 mm 拡散しながら線源を照射することができる。申請者の所属する施設で、2019 年度より、頭頸部がん及び乳がんの放射線治療後の再発症例を対象とするこの治療法の治験が開始された。従来の小線源治療の局所腫瘍内照射の利点と線の破壊力を有する画期的な治療法といえる。一方で、細胞動態をはじめ放射線生物学治験はほとんど得られていないのが実情である。

(3) 線源と細胞周期チェックポイント阻害剤 (G2 アレスト阻害剤) 併用による増感効果

これまで放射線治療と併用することで増感作用を示す様々な薬剤が開発されてきたものの、未だ臨床応用に至っていない。がん抑制遺伝子である p53 が機能しないがん細胞に放射線照射をすると、細胞がその修復のために G2 期で停止する G2 アレストが起こる。そこで、この G2 アレストを解除する G2 アレスト阻害剤を併用すると、損傷をもったまま次の細胞周期へと進行することで細胞により損傷が加わる。このような増感剤と線源の併用が有効であれば、さらに奏功する治療が可能となるがそのような研究はなされていない。

2. 研究の目的

線源を用いた小線源治療は、従来の局所腫瘍内照射の利点と線の破壊力を有する画期的な治療法といえる。一方で、新しい治療法であるが故に細胞動態をはじめ放射線生物学的知見はほとんど得られていない。本研究の目的は、線源による口腔がんの細胞周期動態、特に G2 アレスト動態を明らかにするとともに、G2 アレスト阻害剤の併用により増感効果が得られるかを検討することである。この研究成果により、臨床的な至適刺入条件を検討することができるようになるだけでなく、従来研究されてきた増感剤と、新規放射線治療である線源を組み合わせるといって全く新しい観点からの研究を行うことで、放射線増感戦略の実現へとつながる可能性が高いと期待できる。

3. 研究の方法

【線源と G2 アレスト阻害剤による細胞動態解析 (in vitro)】

(1) 線源による細胞動態解析

細胞周期可視化システム Fucci 導入 HeLa 細胞、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS, HSC3, HSC4 細胞) およびマウス扁平上皮癌 SCCVII 細胞を用い、蛍光顕微鏡で、線源による細胞周期動態を経時的に細胞が生きたまま観察した。線源は直径 0.7mm の円柱状で、両端に Suture が装着された形状であるため、プラスチックリングをディッシュ底面に設置することで、線源を固定し、かつ開放された環境であるため細胞動態に影響を及ぼさず、任意の範囲での撮影が可能となった (図 1)。細胞死の動態やタイミング・線源からの距離による違い、細胞周期変化、G2 アレスト動態の解析を行った。

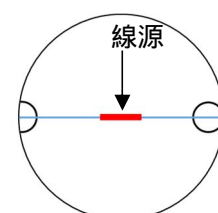


図 1 α 線源の設置方法

(2) 線源と G2 アレスト阻害剤併用による細胞動態解析

G2 アレスト阻害剤として WEE1 阻害剤 (MK-1775) を用いて、(1) で得られた G2 アレスト動態を基に、増感効果が得られるかを検討した。

【ヌードマウス皮下移植腫瘍モデルを用いた線源による腫瘍動態解析 (in vivo)】

(3) 線源刺入による腫瘍動態の解析

マウスの背中に皮下移植腫瘍を作製し、suture 付き線源を刺入後、経時的 (24, 48, 120 時間) に腫瘍を摘出した。摘出時には線源を suture で置き換えることで、標本作製時に刺入点を同定できる工夫を行った。腫瘍内の壊死、DNA 損傷 (H2AX にて検出) 細胞周期の観察を、線源からの距離と対応させながら行った (図 2)。

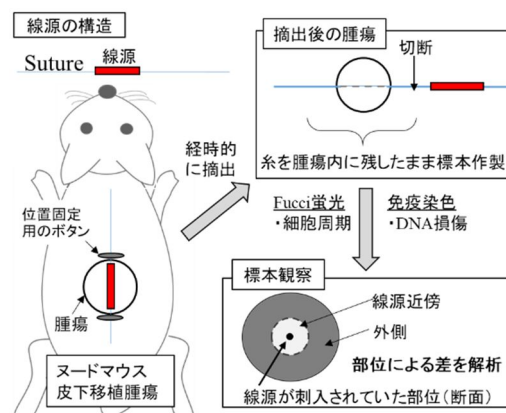


図 2 ヌードマウス皮下移植腫瘍モデルへのα線源刺入

#### 4. 研究成果

##### (1) 線源による細胞動態解析

Fucci を用いると、細胞周期依存的に核の蛍光動態が変化し、G1 期には赤色、S 期早期には橙色、S/G2/M 期には緑色を呈し、分裂直後の G1 期早期では無色となる (図 3)。Fucci を導入した 5 種類の細胞株をそれぞれ播種したディッシュに線源を設置し、経時的な変化を観察した結果、著明な細胞周期変化が観察された (図 4)。SCCVII 細胞は p53 wild type であり、他の細胞株は p53 deficient である。いずれの細胞株でも、線源設置後 16 時間程度で細胞周期変化が検出され、緑色蛍光が増加し、細胞が G2 期で停止するいわゆる G2 アレストが観察された。SCCVII-Fucci 細胞では、48 時間以後に線源近傍に赤色蛍光の強い細胞が出現し、G1 アレストの関与が考えられた。他の細胞株でも赤色細胞が認められたが、一部のみであった。線源近傍での細胞密度は、72 時間まで経時的に低下し、細胞死が起きていることが確認できた。細胞株によってその範囲は異なるが、いずれも 1~2 mm 程度であった。

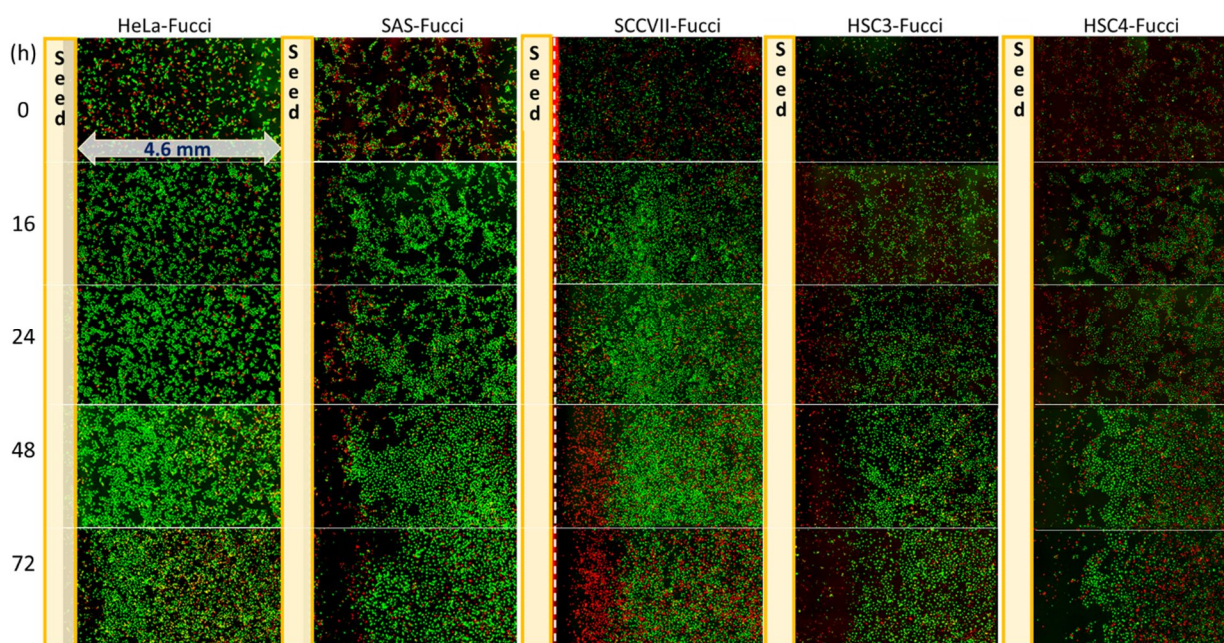
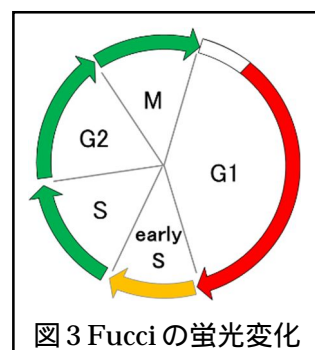


図 4 線源による細胞周期動態変化

##### (2) 線源と G2 アレスト阻害剤併用による細胞動態解析

(1)と同様の条件で観察を行った。線源設置と同時に、WEE1 阻害剤を培地に添加し、HeLa-Fucci 細胞と SAS-Fucci 細胞の細胞動態を観察した。その結果、(1)で観察されたような G2 アレストはいずれの細胞でも検出されなかった。HeLa-Fucci 細胞では、細胞の増殖が抑制され、線源近傍の細胞死は 48 時間以降で観察された。SAS-Fucci 細胞では、16 時間後に線源近傍の細胞が赤色に変化し、36 時間以降で線源近傍の細胞死が観察された。120 時間後には観察範囲内のほぼ全ての細胞が赤色に変化し、線源単独の場合とは異なった細胞動態を示した。いずれの細胞においても線源近傍の細胞死は、WEE1 阻害剤を併用すると線源単独の場合よりも早期に起こり、その範囲も広がった。これまで、X 線と WEE1 阻害剤の併用効果については様々な報告があるが、今回、線に対して WEE1 阻害剤は増感効果を示すことが明らかとなった。

##### (3) 線源刺入による腫瘍動態の解析

ヌードマウスの背に形成させた皮下移植腫瘍に対し線源を刺入し、経時的に摘出し腫瘍切片を観察した。HeLa-Fucci 細胞の皮下移植腫瘍では、刺入後 24 時間の時点で既に線源近傍 1 mm 程度で強い G2 アレストおよび H2AX により同定される DNA 損傷が出現していた。刺入 48 時間後の切片では緑色蛍光がさらに強くなり、5 日後でも G2 アレストが持続しており、線源による変化が検出された。一方、線を出さないダミー線源の刺入では、細胞周期変化や DNA 損傷は検出されなかった。刺入 48 時間後の切片を詳細に解析すると、強い DNA 損傷の領域よりも G2 アレストの範囲の方が広がった (図 5)。

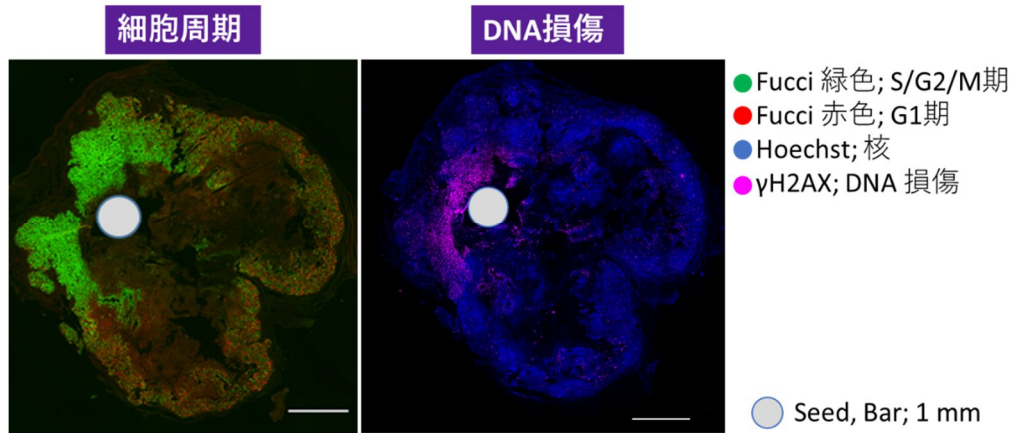


図5 線源刺入 48 時間後のマウス腫瘍切片

また、H2AX の発現量を定量し、3つのタイプに分類した。その結果、線源近傍約 0.5 mm 程度までは致命的とされる核全体が染色される Pan-nuclear type、その外側の線源から 0.5-1 mm 程度では計測不能な多量の斑点状の染色が検出され、さらに外側の 1-1.5 mm 程度の領域では斑点状の Focus type が検出された (図 6)。

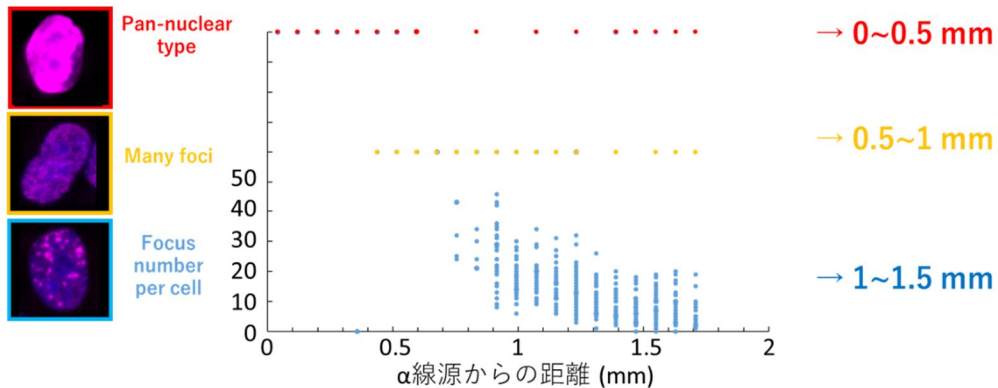


図 6hous 線源刺入 48 時間後のマウス腫瘍における DNA 損傷

これらの結果より、線源近傍では *in vitro*, *in vivo* いずれにおいても強い G2 アレストが生じること、またマウスの腫瘍において致命的な DNA 損傷が生じていることが明らかとなった。これまで不明であった  $\alpha$  線源が周囲に及ぼす生物学的影響を初めて明らかにすることができた。今後は、吸収線量の推定や細胞生存率の解析等、さらに詳細な検討を行い、臨床的により良い刺入法の探索をすすめる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shimono Hiroaki, Kaida Atsushi, Homma Hisao, Nojima Hitomi, Onozato Yusuke, Harada Hiroyuki, Miura Masahiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Fluctuation in radioresponse of HeLa cells during the cell cycle evaluated based on micronucleus frequency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-020-77969-0	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野島瞳、戒田篤志、三浦雅彦
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞を用いた定位放射線治療の効果とG2アレストの関連性の検討
3. 学会等名 第39回日本口腔腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野島瞳、戒田篤志、原田浩之、三浦雅彦
2. 発表標題 口腔がんの定位放射線治療における再分布の意義
3. 学会等名 日本歯科放射線学会第61回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野島瞳、戒田篤志、三浦雅彦
2. 発表標題 放射線照射後に生じる腫瘍細胞の再分布から考える定位放射線治療の生物学的有効性
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第58回生物部会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野島 瞳、本間久雄、小野里祐佑、戒田篤志、原田浩之、三浦雅彦
2. 発表標題 ヒト舌癌細胞におけるCHK1とWEE1の阻害剤が及ぼす細胞周期動態への影響
3. 学会等名 第22回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野島 瞳、小野里祐佑、戒田篤志、原田浩之、三浦雅彦
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞に対するCHK1、WEE1阻害剤処理後の細胞周期動態
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------