

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 4 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791167

研究課題名（和文）正常脳神経細胞における、重粒子線の影響に関する分子生物学的解析

研究課題名（英文）Molecular biological investigation about the effect of heavy-ion beam on normal brain

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

- 1) 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、これらの変化はアクチン・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。
- 2) 肺癌細胞における、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) における 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。
- 3) 発達期のラット小脳培養組織において、小脳組織の形態を経時的に観察したところ、炭素線による影響が同線量の X 線の効果に比べ約 1.4 倍大きかった。

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. Also, Under severe hypoxic condition for 24 hour, OER of X-ray was calculated as 2.6. OER was decreased to 1.1 by the combination use of X-ray irradiation and mTOR inhibitor. However, OER was not changed by combination use of carbon-ion beam irradiation and mTOR inhibitor.
- 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.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：炭素イオン線、悪性脳腫瘍、遊走能、増感剤、ニューロン

1. 研究開始当初の背景

本研究の研究代表者（鈴木）は、平成 17～18 年度・若手 B「脳ニューロン・グリア細胞の放射線感受性とその修飾に関する分子生物学的研究」、平成 20～21 年度・同「炭素イオン線治療で悪性脳腫瘍を完治させるための基礎的研究」の研究代表者として、悪性脳腫瘍の治療法の確立を目指し、放射線（X 線・炭素イオン線）による正常脳組織の有害事象低減のメカニズムを解明するため、正常脳組織の放射線に対する反応について研究を続けており、これまでに、1) ニューロン細胞でも放射線によりアポトーシスが起り、細胞の成熟度により放射線感受性が大きく変化する、2) 未熟ニューロン細胞においては炭素線の効果は X 線に比べ約 6 倍大きい、3) 数 Gy 程度の線量でもニューロン細胞にアポトーシスを誘導し、発達に影響を及ぼす、4) アポトーシスおよび遊走能を指標とすると、未熟脳組織における炭素イオン線の生物学的効果比（RBE）が 2～3 である。5) 成長円錐崩壊を指標とすると、神経細胞の RBE は 2～3 であること、などの研究成果を、英文学術誌や米国放射線腫瘍学会などで発表している。悪性脳腫瘍、特に神経膠芽腫や悪性髄膜腫は現在一般に行われている放射線治療には極度に抵抗性であり高 LET 線である炭素イオン線の強い殺細胞効果に大きな期待が寄せられている。しかしながら、放射線医学総合研究所で行われている悪性脳腫瘍に対する臨床研究の結果は、「正常脳組織の有害事象（副作用）が強い」など期待を裏切る結果となっており、早急な治療戦略の改善が求められている。この現状を克服するには、や

はり、正常脳組織の重粒子線に対する反応をしっかりと把握することが急務と考えられる。群馬大学では、2010 年 3 月より、炭素イオン線治療が開始される予定であり、脳腫瘍についても順次治療が開始される予定であることから、正常脳組織の重粒子線に対する反応に関する研究を行うことは必要不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

肺がん・前立腺がん・などで、重粒子線（炭素イオン線）治療により良好な臨床成績が報告されているものの、前述のように、悪性脳腫瘍では、いまだ適切な線量・照射法が明らかになっておらず、従来の X 線治療による治療成績を上回るに至っていない。その原因の一つは、正常組織の反応（副作用）が予想以上に強かったことであり、治療戦略を作成する上で、「正常脳組織・細胞における、種々の条件下における、炭素イオン線照射による反応の詳細な検討」、が必要である。具体的には、①神経細胞の発達度の指標であるドレブリン・シナプシンなどの発現を照射後経時的に観察を行い、炭素イオン線の X 線に対する RBE の検討を行う。②RBE は照射条件（1 回線量・酸素圧・など）によって変化することが知られている。特に、脳組織は α/β 、及び、酸素効果比（OER）が小さいと考えられていることから、特に低線量域・低酸素状態で RBE が高いことが予想される。従って、放医研で採用されている RBE=3 が適当であるか、1 回線量・酸素圧を変化させて検討する。

3. 研究の方法

- 1) ニューロン細胞の発達を指標とした炭素イオン線の X 線に対する RBE の検討
Bunker's methods を用いて培養された正常ニューロン細胞を用いて (培養 7 日目: 未熟細胞、14 日目: 成熟中期細胞)、X 線および炭素イオン線照射を行い、照射後 7・14 日後に、アクチン・ドレブリン・シナプシンなどの神経細胞の発達に関連する蛋白発現を評価し、炭素イオン線・X 線による神経発達阻害に対する RBE について検討する。
- 2) 1 回線量・酸素分圧を変化した場合における炭素イオン線の X 線に対する RBE の検討
培養腫瘍細胞を、培養液中の酸素分圧を任意に変化させることのできる照射装置 (京都科学が開発した低酸素照射機器を、当教室で独自に改良したもの) を用い、X 線および炭素イオン線照射を行い、さまざまな酸素圧・1 回線量において、炭素イオン線の X 線に対する RBE を評価する。エンドポイントは、細胞生残率にて評価する。
- 3) 小児の脳組織における重粒子線照射の影響を調べるため、未熟なラットの小脳から切片培養標本を作製し組織学的に影響を評価する。

4. 研究成果

- 1) Bunker's methods を用いて培養された正常脳神経細胞における、炭素イオン線の X 線に対する RBE について、照射後 24 時間時点でのアポトーシスの頻度を指標とした場合、未熟な正常神経細胞 (生後 7 日目) における炭素イオン線の RBE は約 10 であった。(JRR 51, 627-31, 2010) 腫瘍細胞やその他の正常組織細胞 (繊維細胞、血管細胞、など) の多くは、RBE は 2~4 であり、神経細胞の RBE はかなり高く、炭素イオン線治療では、正常神経組織への線量を可能な限り減らす必要があ

ることが示唆された。

また、神経細胞の発達度の指標である F-actin・ドレブリンなどの発現を経時的に観察したところ、放射線 (X 線) により F-actin の発現は照射直後より低下し、電子顕微鏡での観察で、軸索が細小化し、シナプス形状が変化することが明らかとなった (論文投稿中)。免疫化学的検討により、その actin 発現の低下・シナプス形状の変化は、アクチン・フィラメントの脱分極が主たる原因であることが推測された。(2011 年米国放射線腫瘍学会で報告)。

- 2) 低線量域・低酸素状態など、照射条件 (1 回線量・酸素圧・など) を変えた場合の RBE について検討するため、まず腫瘍細胞にて急性極低酸素条件 (0.1mmHg 以下、1 時間) での照射実験を行った。この条件下での Oxygen enhancement ratio (OER) は約 2.6 であった (Experimental and Therapeutic Medicine, 2012; 3: 141-145)。次に、慢性極低酸素条件 (0.1mmHg 以下、24 時間以上) における OER は約 2.6 であった。mTOR 抑制剤の併用により 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 (論文作成中)。

- 3) 発達期のラット小脳培養組織において、X 線及び炭素線照射を行った後、小脳組織の形態を経時的に観察したところ、時間及び線量依存的に、小脳・外顆粒層の肥厚と顆粒細胞の凝縮が認められた。また、X 線と炭素線と効果を比較したところ、炭素線の X 線に対する RBE は 1.4 と考えられることが明らかとなった。(J Radiat Res 2012; 53: 87-92)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

① **Suppression of HIF-1 α and Radiation Resistance in the Acute Hypoxic Condition**

Oike T, Suzuki Y, Al-Jahdari W, Mobaraki A, Saitoh JI, Torikai K, Shirai K, Nakano T. Experimental and Therapeutic Medicine. 査読有2012;3:141-145.

②Evaluation of the Relative Biological Effectiveness using Rat Organotypic Slice Culture System on Cerebellum

Yoshida Y, Suzuki Y, Al-Jahdari WS, Hamada N, Funayama T, Shirai K, Katoh H, Sakashita T, Kobayashi Y, Nakano T. J Radiat Res (Tokyo). 査読有 2012;53(1):87-92.

③Reduction of nitric oxide level enhances the radiosensitivity of hypoxic non-small cell lung cancer.

Saleem W, Suzuki Y, Mobaraki A, Yoshida Y, Noda S, Saitoh JI, Nakano T. Cancer Sci. 査読有 2011;102(12):2150-6.

④Expression of hypoxia-inducible factor 1 α predicts clinical outcome after preoperative

hyperthermo-chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer

Shioya M, Takahashi T, Ishikawa H, Sakurai H, Ebara T, Suzuki Y, Saitoh J, Ohno T, Asao T, Hiroyuki K, Nakano T. J Radiat Res (Tokyo). 査読有 2011;52(6):821-7.

⑤High-dose-rate Interstitial Brachytherapy with Computed Tomography-based Treatment Planning for Patients with Locally Advanced Uterine Cervical Carcinoma.

Saitoh J, Ohno T, Sakurai H, Katoh H,

Wakatsuki M, Noda SE, Suzuki Y, Sibuya K, Takahashi T, Nakano T. J Radiat Res (Tokyo). 査読有 2011;52(4):490-5.

⑥Development of head module for multi-head Si/CdTe Compton camera for medical applications

Yamaguchi M, Kawachi N, Suzui N, Fujimaki S, Kamiya T, Odaka H, Ishikawa S, Kokubun M, Watanabe S, Takahashi T, Shimada H, Arakawa K, Suzuki Y, Torikai K, Yoshida Y, Nakano T. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A 査読有2011;648:S2-S7

⑦ Pseudo-progression event during temozolomide combining chemoradiotherapy for malignant glioma

Suzuki Y, Saleem W, Satoh Y, Wakatsuki M, Shirai K, Sugawara K, Noda SE, Okamoto M, Yoshimoto Y, Nakano T. Recent Advances and Research Updates. 査読無 2011;12:315-9.

⑧Radiation-induced ICAM-1 expression via TGF- β 1 pathway on human umbilical vein endothelial cells; comparison between X-ray and carbon-ion beam irradiation

Kiyohara H, Ishizaki Y, Suzuki Y, Katoh H, Hamada N, Ohno T, Takahashi T, Kobayashi Y, Nakano T. J Radiat Res (Tokyo). 査読有 2011;52(3):287-92

⑨Intracavitary combined with CT-guided interstitial brachytherapy for locally advanced uterine cervical cancer: introduction of the technique and a case

presentation.

Wakatsuki M, Ohno T, Yoshida D, Noda SE, Saitoh J, Shibuya K, Katoh H, Suzuki Y, Takahashi T, Nakano T.

J Radiat Res (Tokyo). 査読有
2011;52(1):54-8.

⑩MK615, a prospective anti-proliferative agent, enhances CD4/CD8 ratio after exposure to irradiation.

Al-Jahdari WS, Sakurai H, Yoshida Y, Mobaraki A, Suzuki Y, Nakano T.

Int J Radiat Biol. 査読有 2011
Jan;87(1):81-90.

⑪The Benefit of Small Bowel and Pelvic Bone Sparing in Excluding Common Iliac Lymph Node Region from Conventional Radiation Fields in Patients with Uterine Cervical Cancer: A Dosimetric Study

Oike T, Ohno T, Wakatsuki M, Noda SE, Saitoh JI, Mizukami T, Yoshimoto Y, Okonogi N, Katoh H, Shibuya K, Suzuki Y, Ishikawa H, Ebara T, Takahashi T, Nakano T.

J Radiat Res (Tokyo). 査読有
2010;51(6):715-21

⑫Effectiveness of carbon-ion beams for apoptosis induction in rat primary immature hippocampal neurons

Kaminuma T, Suzuki Y, Shirai K, Mizui T, Noda SE, Yoshida Y, Funayama T, Takahashi T, Kobayashi Y, Shirao T, Nakano T

J Radiat Res (Tokyo). 査読有
2010;51(6):627-31.

⑬Influence of Histological Subtype on Survival after Combined Therapy of Surgery and Radiation in WHO Grade 3 Glioma

Shirai K, Suzuki Y, Okamoto M, Wakatsuki M, Noda SE, Takahashi T, Ishiuchi S, Hasegawa M, Nakazato Y, Nakano T

J Radiat Res (Tokyo). 査読有
2010;51(5):589-94.

⑭Protective Effect of Urinary Trypsin Inhibitor on the Development of Radiation-Induced Lung Fibrosis in Mice.

Katoh H, Ishikawa H, Hasegawa M, Yoshida Y, Suzuki Y, Ohno T, Takahashi T, Nakano T.

J Radiat Res (Tokyo). 査読有
2010;51(3):325-32.

⑮Higher pAkt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas.

Suzuki Y, Shirai K, Oka K, Mobaraki A, Yoshida Y, Noda SE, Okamoto M, Suzuki Y, Itoh J, Itoh H, Ishiuchi S, Nakano T.

J Radiat Res (Tokyo). 査読有
2010;51(3):343-8.

⑯Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer

Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takahashi T

J Radiat Res (Tokyo). 査読有 51:1-8, 2010.

⑰Survivin is a Potential Mediator of Prostate Cancer Metastasis

Zhang M, Coen JJ, Suzuki Y, Siedow MR, Khor LY, Pollack A, Zietman AL, Shipley WU, Chakravarti A

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 査読有
2010;78(4):1095-103.

[学会発表] (計 11 件)

① **日本放射線腫瘍学会第 24 回大会**
2011. 11. 17-19 神戸

放射線による抗腫瘍免疫の活性化

鈴木義行

② **日本放射線腫瘍学会第 24 回大会**
2011. 11. 17-19 神戸

高精度放射線治療への応用を目指した次世代 RI 診断機器 Si/CdTe コンプトンカメラの開発

鈴木義行、山口充孝、小高裕和、武田伸一郎、
吉田由香里、神谷富裕、河地有木、荒川和夫、
高橋忠幸、中野隆史

③ **American Society for Radiation Oncology**
53th annual meeting, 2011. 10. 2-6, Miami
Beach Convention Center, Miami Beach, FL,
USA

X ray Irradiation Induces Acute
Depolymerization of Axonal and Dendritic
Microfilaments in Cultured Neuron

Suzuki Y, Hino M, Shirai K, Yoshida Y,
Mizui T, Hanamura K, Shirao T, Nakano T

④ **The first meeting of International**
Society for Radiation Neurobiology,
2011. 01. 29, Gunma

Radiation induced neural cell death
(apoptosis) Yoshiyuki Suzuki

⑤ **第 46 回群馬脳腫瘍研究会**2011. 01. 15 前橋
重粒子線治療 ～群馬大学重粒子線医学セン
ターの現状、及び、中枢神経系腫瘍に対する
今後の展望～ 鈴木義行

⑥ **第二回日本放射線外科学会** 2010. 11. 27 東
京

重粒子線治療

鈴木義行

[図書] (計 4 件)

① **Textbook of Radiosurgery : 総論** 5 章 F

白井克幸、鈴木義行

p88-92、メディカ出版、2012

② **Textbook of Radiosurgery : 各論** 2 章②

岡本雅彦、白井克幸、鈴木義行

p171-175、メディカ出版、2012

③ **免疫細胞療法 II : 放射線治療**

鈴木義行、吉本由哉

p212-217、幻冬舎、2011

④ **がん・放射線療法 : 放射線生物学** 分子生
物学的アプローチ

鈴木義行

p211-215、篠原出版新社、2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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 : 6 0 3 3 4 1 1 6

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者