

令和元年9月10日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293270

研究課題名(和文) アミノレブリン酸のX線増感放射線療法の検証と遺伝子発現解析による作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the action mechanism of combined treatment with X-ray irradiation and 5-aminolevulinic acid by transcriptome analysis

研究代表者

高橋 淳子 (Takahashi, Junko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：80415702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポルフィリン(PpIX)前駆体の5-アミノレブリン酸(ALA)は生体に取り込まれ、腫瘍細胞に特異的にPpIXが蓄積する。PpIXは光励起により活性酸素を生じるため、ALAは光線力学的治療の増感剤として用いられている。我々は新たにX線照射によりPpIXが活性酸素を生じることを見だし、X線増感剤としての有用性を検証することとした。本課題では、ヒトの放射線治療装置リニアックは実験用放射線装置と同様に、ALAの併用はX線単独処理よりも腫瘍増殖抑制効果を示すことが確認された。また、遺伝子発現解析等から、ALA併用のメカニズムは、遺伝子損傷を原因とする細胞周期の停止が増強されることであると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の目標は、光線力学療法の励起メカニズムと類似しているが、光に替わりX線を用い、放射線の腫瘍選択性を高め、深部癌の治療に有効な「放射線力学療法」を開発し、今までの放射線治療では治療できなかったがんの治療に役立てることである。放射線力学療法に用いる放射線増感剤は低分子有機化合物であり、このような化合物の放射線応答性に関する研究は独創的であり、世界的にも類似の研究はほとんど進められていない。

研究成果の概要(英文)：Combined treatment with 5-aminolevulinic acid (ALA) and X-rays improves tumor suppression in vivo. This is because the accumulated protoporphyrin IX from ALA enhances the generation of ROS by the X-ray irradiation. In the present study, a high-energy medical linear accelerator was used instead of a non-medical low energy X-ray irradiator, which had been previously used. Tumor-bearing mice implanted with B16-BL6 melanoma cells were treated with fractionated doses of irradiation (in total, 20 or 30 Gy), using two types of X-ray irradiator after ALA administration. Suppression of tumor growth was enhanced with X-ray irradiation in combination with ALA treatment compared with X-ray treatment alone, using both medical and non-medical X-ray irradiators. "Radiodynamic therapy" using radiation from medical linacs as a physical driving force, rather than the light used in photodynamic therapy, may have potential clinical applications.

研究分野：医用生体工学

キーワード：放射線治療 X線 放射線増感剤 5-アミノレブリン酸 ポルフィリン がん治療 放射線力学療法 光線力学療法

1. 研究開始当初の背景

放射線治療をより効果的に行うため、正常組織の損傷を抑え特異的に腫瘍の放射線感受性を高める増感剤の開発が進められている。放射線増感剤は、①DNA 損傷増加、②核酸合成阻害、③細胞分裂阻害、④低酸素細胞等の腫瘍環境変化、⑤DNA 修復阻害、⑥免疫性向上、⑦情報伝達経路阻害、⑧ヨウ素化合物、等様々な作用機序が検討されているが、臨床で広く用いられる有効な X 線増感剤は無い。特に、放射線のエネルギーを直接伝達する増感剤は、放射線量の顕著な低減効果が期待されることから研究が進められている。そこで、X 線の吸収が大きい物質を含むナノ材料(金、強磁性体、半導体)を増感剤とする研究が進められているが、実用化には至っていない。

2. 研究の目的

プロトポルフィリン(PpIX)前駆体の 5-アミノレブリン酸(ALA)は生体に取り込まれ、腫瘍細胞には高濃度に PpIX が蓄積される。PpIX は光励起により活性酸素を生じるため、ALA は光線力学的治療(Photodynamic Therapy: PDT)の増感剤として用いられている。我々は X 線照射により PpIX が活性酸素を生じることを見だし、X 線増感剤としての有用性を検証してきた。ALA-PDT の研究報告は多いが適用範囲は光が到達可能な表層のがんに限られている。一方、我々が提案する X 線を用いる放射線力学療法(Radiodynamic Therapy: RDT)は深部のがんに対しても有効である。本研究では、ALA を用いる RDT の効果を検証し、遺伝子発現解析により作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

深部の腫瘍の選択的な治療を可能とする X 線励起による物理化学療法である ALA-RDT について、用量と抗癌効果の関係および作用機序を明らかにし、手法を確立するための基礎的データの蓄積を行う。B16 黒色腫固形癌マウスに対し、線量を変えた分割照射を行い、腫瘍抑制効果に関するデータを取得する。同時に腫瘍部位の遺伝子発現解析を行い、腫瘍組織の応答性に関するデータを蓄積する。

4. 研究成果

1) X 線照射による PpIX の分解

光増感剤に対して光を照射すると、増感剤が分解するフォトブリーチング現象が知られている。PpIX と放射線の物理化学的応答と、光化学的応答の類似性を比較するため、放射線増感剤である PpIX が、光照射と同様に X 線照射により分解するラジオブリーチングが生じるかを調べた。PBS 10%を含む pH7.4 の DMSO に溶解した 10 μ M の PpIX に X 線を照射して吸収スペクトルの測定を行うとラジ

オブリーチング現象が観察された(図1)。

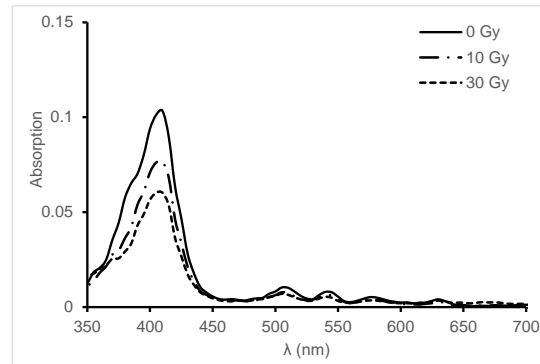


図1. X 線照射による PpIX の吸収スペクトルの変化

2) 細胞周期解析

ALA の併用による放射線増感の作用機序は、がん細胞に PpIX が蓄積し、そこに放射線を照射すると、より多くの活性酸素が生成され遺伝子損傷を引き起こすと考えられる。そこで、この作用機序の検証の一つとして、*in vitro*での細胞周期解析を行った。培養した B16-BL6 細胞に 50 μ g/mL の ALA を加え 24 時間培養した後に X 線 3Gy を照射した。活性酸素除去剤として X 線照射 2 時間前にアスコルビン酸を加えた。X 線照射 48 時間後に細胞を回収し、PI 染色 (propidium iodide 50 μ g/ml) を加え核を染色し、フローサイトメトリー法により細胞周期の解析を行った。

図2の A は細胞周期ヒストグラムであり、B-G は B. 代表的なフローサイトメトリー法による細胞周期の解析を行った。

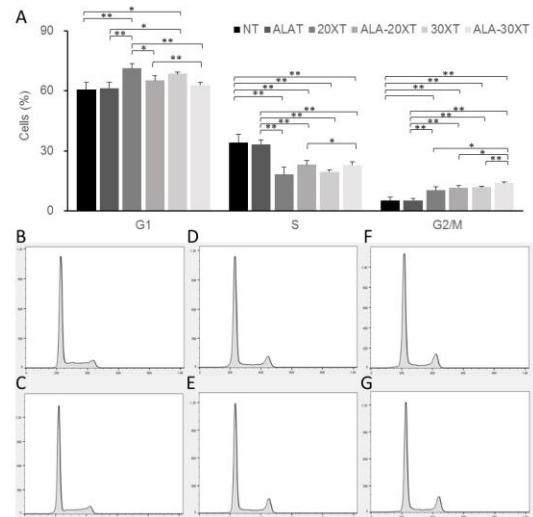


図2 5-ALA 併用 X 線処理による培養細胞の細胞周期解析

この結果、ALA 単独処理は細胞周期に影響を与えないこと、X 線照射により G2/M 期の細胞が増加し、ALA 併用および X 線量によりさらに増加した。これらのことから、ALA 併用は X 線量の増加と同様の活性酸素生成と遺伝子損傷効果を示すことが示唆された。

3) ヒト放射線治療装置リニアックによる効果検証

これまで ALA-RDT の効果検証、メカニズム解析は、*in vitro*, *in vivo* ともに、チャンバー式の放射線照射装置を用いて行ってきた。しかし実際の治療ではリニアック (linac) と呼ばれる装置が使用され、これまで実験に用いたチャンバー式の放射線装置より高い MeV オーダーのビームエネルギーを用いている。放射線照射による PpIX の活性酸素生成は物理化学的な反応であることが検証されているが、ビームエネルギーの影響については不明である。そこで、両装置を用いた *in vivo* 効果検証を行った。

3-1) B16-BL6 黒色腫担癌モデルマウスを用いた効果検証。

B16-BL6 黒色腫細胞を移植したマウスに、5-ALA 50mg/kg を局所的に投与し、投与後 PpIX が蓄積する 4-5 時間後に、総線量が 20Gy または 30Gy となる様に 10 分割の放射線照射 (1 回 2 または 3Gy、週 5 回、2 週間) を行った。がんの増殖は、腫瘍サイズ、および腫瘍重量の計測により評価した。ヒト治療装置として 4MeV ビームエネルギーのヒト治療用リニアック (PRIMUS Mid-Energy, 東芝メディカルシステムズ株式会社)、チャンバー式放射線装置として管電流 160kV のキャビネット式 X 線装置 Faxitron CP-160 (アクロバリオ株式会社) を用いた。

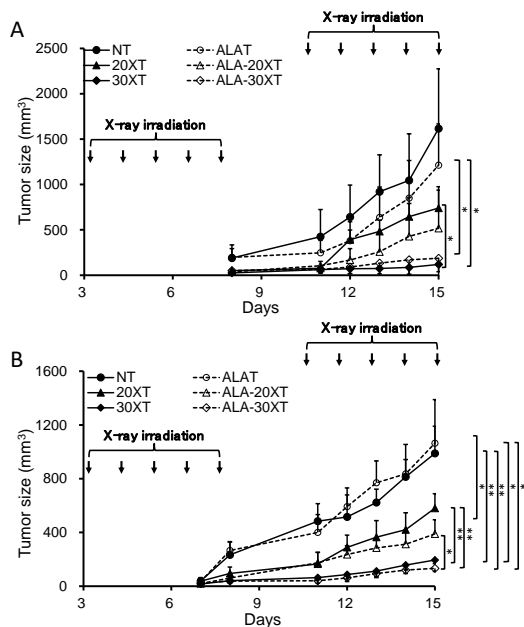


図 3.1 放射線照射装置による ALA-RDT の効果の比較 - 腫瘍サイズ A. リニアック、B. チャンバー式放射線照射装置

図 3 に示される様に、リニアックおよびチャンバー式放射線照射装置の何れを用いても ALA 併用すると X 線単独処理より、さらに腫瘍増殖の抑制が観察された。この傾向は特に総線量 20Gy で顕著であった。これは 30Gy

では ALA の効果が低いというより、放射線単独でも十分腫瘍増殖が抑制されている為であると思われた。

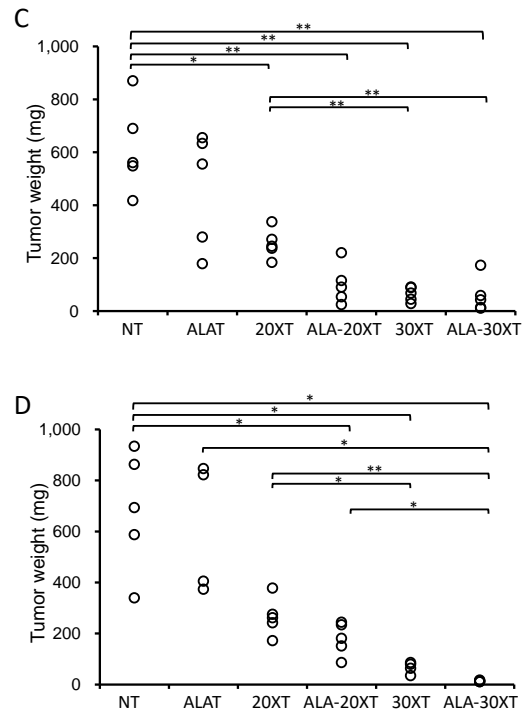


図 3.2 放射線照射装置による ALA-RDT の効果の比較 - 腫瘍重量 C. リニアック、D. チャンバー式放射線照射装置

3-2) 腫瘍組織の形態学的観察

放射線照射終了後、摘出した腫瘍の HE 染色を行った。

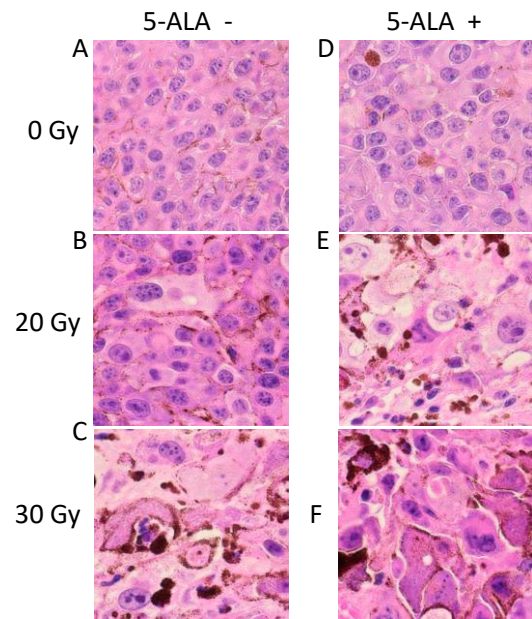


図 4 放射線照射終了後の腫瘍組織の組織学的観察

X 線を照射をしない腫瘍細胞は均一であるのに対して (図 4 A, B)、X 線を照射すると、

分裂異常に伴う細胞の巨大化が観察された。これは総線量の増加、および ALA 併用により、より顕著であった。

3-3) マイクロアレイを用いた腫瘍細胞の網羅的遺伝子発現解析

放射線照射終了後、摘出した腫瘍について照射無し (NT, n=3)、ALA (ALAT, n=3) 処理、20Gy 照射 (20XT, n=4)、ALA 併用 20Gy 照射 (ALA-20XT, n=4)、30Gy 照射 (30XT, n=4)、ALA 併用 30Gy 照射 (ALA-30XT, n=4) のマイクロアレイ解析を行った。照射無し (NT, ALAT) と比較して、誘導または抑制された遺伝子数を表 1 にまとめた。誘導または抑制される遺伝子数は ALA 併用による影響より、照射線量による影響が大きいと思われた。X 線単独照射、もしくは ALA 併用 X 線照射により変動した遺伝子について、遺伝子オントロジーで定義される生物学的な機能による分類ごとの変動を表 2 にまとめた。変動した遺伝子は、細胞周期、RNA 代謝、DNA 代謝に関連する分類に属するものがほとんどであることが判明した。

表 1 マイクロアレイ解析の概要

	20XT	ALA-20XT	30XT	ALA-30XT
Up-regulation	1151	863	1710	1401
Down-regulation	1272	972	2199	2281
Total	2423	1835	3909	3682

表 2 GO term に変動した遺伝子の分類

Function	Accession	Term
cell cycle	GO:000070	mitotic sister chromatid segregation
	GO:0007049	cell cycle
	GO:0007059	chromosome segregation
	GO:0007067	mitotic nuclear division
	GO:0007076	mitotic chromosome condensation
	GO:0007094	mitotic spindle assembly checkpoint
	GO:0008283	cell proliferation
	GO:0030261	chromosome condensation
	GO:0030308	negative regulation of cell growth
	GO:0051301	cell division
GO:0051726	regulation of cell cycle	
DNA	GO:0006260	DNA replication
	GO:0006261	DNA-dependent DNA replication
	GO:0006270	DNA replication initiation
	GO:0006281	DNA repair
metabolic process	GO:0006310	DNA recombination
	GO:0006974	cellular response to DNA damage
	GO:1900264	positive regulation of DNA-directed
	GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome
RNA	GO:0006364	rRNA processing
	GO:0006397	mRNA processing
	GO:0008380	RNA splicing
metabolic process	GO:0051028	mRNA transport
	GO:0006629	lipid metabolic process
other	GO:0006810	Transport
	GO:0008152	metabolic process
	GO:0015031	protein transport
	GO:0055114	oxidation-reduction process

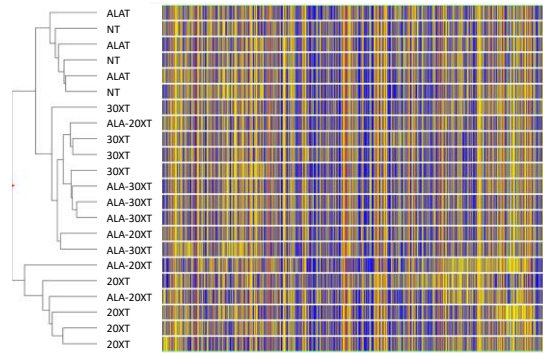
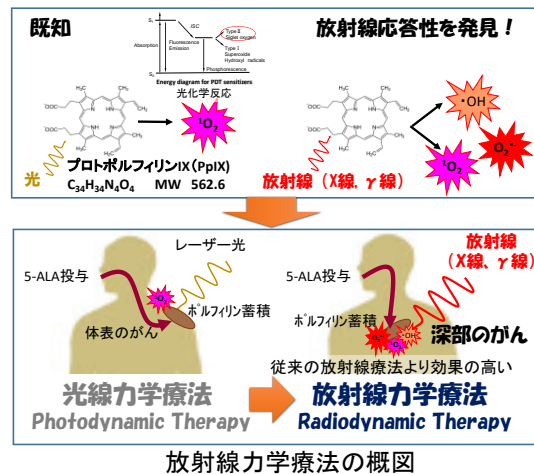


図 5 放射線照射終了後の腫瘍組織のマイクロアレイのクラスター解析

それぞれの試料のアレイの類似性を評価する為、クラスター解析を行った。クラスターは大きく NT と ALAT、20XT と ALA-20XT、ALA-20XT と 30XT および ALA-30XT により形成される 3 つに分かれた。これは、①放射線処理しない場合は ALA を併用しても遺伝子発現はあまり変わらない、②遺伝子初発パターンへの影響は、どちらかと言えば放射線の線量による影響が大きい、しかし③ALA 併用した 20Gy の X 線処理は個体によっては、30Gy の X 線処理の発現パターンと近くなるものがあることを示した。

以上、ALA の併用は X 線単独より高い治療効果を示した。ALA 併用のメカニズムは、遺伝子損傷を原因とする細胞周期の停止が増強されることであると推察された。また、この作用はヒト治療用のリン酸を用いた場合も検証された。



放射線力学療法の概図

以上のことから、外因性の 5-ALA が腫瘍細胞に PpIX を蓄積させ、そこに放射線を照射すると PpIX が活性酸素生成を増強することにより放射線増感効果を示す「放射線力学療法」の実現の可能性が示された。

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 9 件)

- ① Toyama M, Mori T, Takahashi J, Iwahashi H. Luteolin as reactive oxygen generator by X-ray and UV irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 査読有 146:11-18, (2018)
doi: 10.1016/j.radphyschem.2017.12.022
- ② Takahashi J, Murakami M, Mori T, Iwahashi H. Verification of radiodynamic therapy by medical linear accelerator using a mouse melanoma tumor model. *Scientific Reports*. 査読有 8(1):2728. (2018)
doi: 10.1038/s41598-018-21152-z.
- ③ Takahashi J, Iwahashi H. Introduction to 5-Aminolevulinic Acid-Protoporphyrin IX Mediated Radiodynamic Therapy (RDT) Clinics in Oncology 査読有 2:1330 (2017)
- ④ Takahashi J, Misawa M, Iwahashi H. Combined treatment with X-ray irradiation and 5-aminolevulinic acid elicits better transcriptomic response of cell cycle-related factors than X-ray irradiation alone. *International Journal of Radiation Biology* 査読有 12:1-16. (2016)
- ⑤ Takahashi J, Iwahashi H. Spectrum analysis of X-ray irradiated protoporphyrin IX: radiosensitizer for radiodynamic therapy. *ALA porphyrin Science* 査読有 5(1), 29-34. (2016)
- ⑥ Takahashi J, Iwahashi H. 5-aminolevulinic acid - Protoporphyrin IX mediated radiodynamic therapy (RDT). *ALA porphyrin Science* 査読有 5(1):35-38. (2016)
- ⑦ Takahashi J, Misawa M, Iwahashi H. Gene expression profiling can predict the fate of HeLa cells exposed to X-ray irradiation with or without protoporphyrin accumulation. *Genomic Data* 査読有 5:192-4. (2015) doi: 10.1016/j.gdata.2015.05.044
- ⑧ Takahashi J, Misawa M, Iwahashi H. Transcriptome Analysis of Porphyrin-Accumulated and X-Ray-Irradiated Cell Cultures under Limited Proliferation

and Non-Lethal Conditions. *Microarrays (Basel)* 査読有 4(1):25-40. (2015)
doi: 10.3390/nmicroarrays4010025

- ⑨ Takahashi J, Misawa M, Murakami M, Mori T, Nomura K, Iwahashi H. 5-Aminolevulinic acid enhances cancer radiotherapy in a mouse tumor model. *Springerplus* 査読有 2:602 (2013)
doi: 10.1186/2193-1801-2-602.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 高橋淳子、村上麻美、森崇、岩橋均. 担癌マウスに対する 5-アミノレブリン酸放射線力学療法 (RDT) の線量低減効果. ポルフィリン-ALA 学会 2016 年 04 月 22 日 東京大学、東京、日本
- ② Takahashi J, Misawa M, Iwahashi H. Combined treatment with X-ray irradiation and 5-aminolevulinic acid inhibits tumor growth in mouse tumor models. The 3rd International ALA and Porphyrin Symposium (国際学会) 2015 年 12 月 17 日 ハワイ(アメリカ)
- ③ Takahashi J, Misawa M, Iwahashi H. Transcriptome analysis of porphyrin-accumulated and X-ray irradiated cell cultures. The 3rd International ALA and Porphyrin Symposium (国際学会) 2015 年 12 月 17 日 ハワイ(アメリカ)
- ④ Toyama M, Mori T, Mizowaki Y, Takahashi J, Iwahashi H. Screening for new non-toxic X-ray responsive substance. 日本農芸化学会 2016 年 03 月 27~30 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌)
- ⑤ 高橋淳子、三澤雅樹、岩橋均 ALA を利用した放射線増感の可能性. 第 5 回ポルフィリン-ALA 学会年会 2015 年 04 月 25~26 日 東京
- ⑥ 森崇、村上麻美、岩橋均、三澤雅樹、高橋淳子 担癌マウスを用いた 5-アミノレブリン酸の X 線増感効果の検証. 第 5 回ポルフィリン-ALA 学会年会 2015 年 04 月 25~26 日 東京
- ⑦ 岩橋均、森崇、村上麻美、三澤雅樹、高橋淳子. ALA 投与による放射線増感効果-細胞応答の網羅的遺伝子発現解析. 第 5 回ポルフィリン-ALA 学会年会 2015 年 04 月 25~26 日 東京

[産業財産権]

○出願状況（計 1 件）

名称：ALA と鉄剤の併用による放射線増感効果

発明者：高橋淳子，岩橋均，井垣宏，成田善孝，田中徹，石塚昌宏，原武史

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所，国立がん研究センター，SBI ファーマ株式会社

種類：特許

番号：8. 特願 2017-253583

出願年月日：2017. 12. 28

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 淳子 (TAKAHASHI, Junko)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：80415702

(2) 研究分担者

岩橋 均 (IWAHASHI, Hitoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・分子生命科学コース・教授

研究者番号：60356540

森 崇 (MORI, Takashi)

岐阜大学・応用生物科学部・分子生命科学コース・教授

研究者番号：40402218