

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461851

研究課題名(和文)ストロンチウム治療後におけるリンパ球の放射線組織障害の検討

研究課題名(英文) Radiotoxicity after radioisotope therapy for bone metastases using gamma-H2AX foci of DNA damage in lymphocytes

研究代表者

道合 万里子 (DOAI, Mariko)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：40515673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線ストロンチウム内部照射療法の副作用の一つであるリンパ球の一過性減少は問題視されているが、リンパ球に直接どの程度の放射線組織障害性があるか解明されていない。本研究ではDNA損傷部位に集積する γ -H2AX抗体を用いて、生物学的なリンパ球の照射推定量の検討を行った。また、放射線組織障害によって起きうるリンパ球のアポトーシスの定量評価も検討した。結果として、治療後にDNA損傷部位として検出する foci は有意に増加を認め、アポトーシス細胞の検出も認められた。
-H2AXを用いたリンパ球の組織障害の検討は評価可能であり、また、アポトーシスに移行する細胞も検出可能である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the degree of radiotoxicity to lymphocytes following strontium-89 (Sr-89) therapy for bone metastases using γ -H2AX foci immunodetection. In addition, the degree of radiotoxicity to apoptosis of lymphocytes was also examined. This study was compared the γ -H2AX focus incidence in in vivo and in vitro irradiated lymphocytes to estimate the effective absorbed radiation dose to lymphocytes in vivo. As a result, the radiation-induced DNA damage to the lymphocytes exposed to Sr-89 could be detectable using γ -H2AX foci immunodetection.
The apoptotic cells may also facilitate estimation of the radiotoxicity with this therapy. The γ -H2AX foci immunodetection and detection of apoptotic cells may facilitate estimation of the radiation doses absorbed and the degree of radiotoxicity to lymphocytes with this therapy

研究分野：画像診断

キーワード：ストロンチウム 放射線組織障害 γ -H2AX リンパ球

1. 研究開始当初の背景

造骨性骨転移患者の除痛目的で導入されている放射線ストロンチウム内部照射療法には様々な副作用が報告されている。特に、リンパ球に関しては、血中数の一過性の減少を認めた報告は多い。しかしながら、リンパ球自体に直接どの程度の放射線組織障害性があるか解明されていないのが現状である。従来、放射線ストロンチウム内部照射療法に対して、その被曝線量に関してはMIRD法等を用いて、計算上に血液・骨髄などの臓器照射量を推定する試みがなされてはいる。また、ストロンチウム 89 の場合は、純粹線放出核種であり、その推定は線放出核種と違い、DNA2重鎖切断がどの程度の検出可能であるかは不明である。

我々は既にDNA損傷部位における最も早期の細胞応答の一つである γ -H2AX(リン酸化ヒストンタンパク質)を用いて特殊蛍光抗体による免疫染色でのDNA損傷の定量評価を検討中である。よって、DNA損傷検出の点ではより感度の高い手法であると考えられる γ -H2AXを用いる評価法を、放射線ストロンチウム内部照射療法における放射線組織障害の新たな検討方法として確立を試みた。 $(\gamma$ -H2AX:リン酸化ヒストンタンパク質とはDNA損傷時の最も早期の細胞応答の一つであるH2AX:ヒストンタンパク質の139番セリン部位のリン酸化のことをいう。よって特異的な蛍光標識抗体を用いることで、DNA損傷を視覚的に検出することが可能となる。

また、放射線組織障害によって起きうるリンパ球のアポトーシスの定量評価も検討し、治療によるリンパ球減少を早期に評価することが可能となるかどうか検討をした。

2. 研究の目的

放射線ストロンチウム内部照射療法の副作用の一つであるリンパ球の一過性減少は問題視されているが、リンパ球自体に直接どの程度の放射線組織障害性があるか解明されていない。従って、DNA損傷部位に集積する γ -H2AX抗体を用いて、生物学的なリンパ球の照射推定量の検討可能かどうか評価を行う。

また、アポトーシス細胞のDNA断片をTUNEL(Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling)法にて評価することで、リンパ球減少を早期に推定可能となる。また、本法が確立されれば、放射線組織障害性の短期的な副作用評価の簡便法として臨床的にも普及することも考えられる。

3. 研究の方法

基礎的研究として健常者から採取したリンパ球に段階的に外照射を行い、 γ -H2AX抗体で染色し核内のfociをカウントすることで、

照射量とfoci数が正の相関を持って増加することを確認する。その結果より、推定照射量の基礎となる標準線を使用し、臨床検討を行う。

(1) 基礎的検討:

正常者(4名)より採血しin vitroで段階的に外照射を行う。

外部照射は0Gy, 1Gy, 2Gy, 3Gyの4段階で行う(VARIAN CLINAC iX, 10MeV, 検体前6cm、後10cmのsolid waterを置き、横方向から照射)。免疫染色法や核の観察方法は臨床的検討と同様の方法で行う。

(2) 臨床的検討:

放射線ストロンチウム治療を行う対象患者に対し、治療前と治療後1日目の採血を行う。血液はLYMPHO SEPARATION MEDIUM; MPを使用し、遠心分離を行いリンパ球を分離する。分離したリンパ球を、専用スライドグラス上に固定をする。スライドは固定特殊ImmunoSelect ADHISION SLIDE Ssqarixを使用し、20,000から30,000個の細胞数が得られるように血球計算盤で細胞数を数える。細胞固定は4%パラホルムルデヒドで15分間固定を行う。リン酸緩衝生理食塩液(Phosphate buffered saline:PBS)で洗浄をし、permearizationを0.1%NP40+PBSで行う。次に、核染色とDNA損傷部位に集積する γ -H2AX抗体を用いてリンパ球の免疫染色を行う。蛍光抗体は2次抗体法で行う。先に、抗 γ -H2AX(1次抗体:clone JBW301; Upstate)で室温で60分間反応させる。反応後、PBSで3回洗浄をする。次に、抗 γ -H2AXの抗体(2次抗体:polyclonal rabbit anti-mouse IgGTRITC;DakoCytomation)で室温40分間反応させる。再度PBSで3回洗浄を行う。最後に、核染色を4'-6-diamino-2-phenylindole(DAPI)と蛍光染色封入剤mounting medium(PermaFlour™ Aqueous Mounting Medium Thermo)で行う。

DNA損傷数のカウントは目視で行う。蛍光顕微鏡(Olympus BX50)を使用する。

1症例当たり、30個の核内のfoci数をカウントする。(目視方法は、先の健常者で行った方法と同様で施行する。)

検討の際には、まず核染色の状態を評価する。核の形状が円形を保ち、染色状態が良好なもののみを評価対象とする。

治療前、治療後のDNA損傷数(foci数)を先に得た、標準線を使用し、推定照射量を検討する。

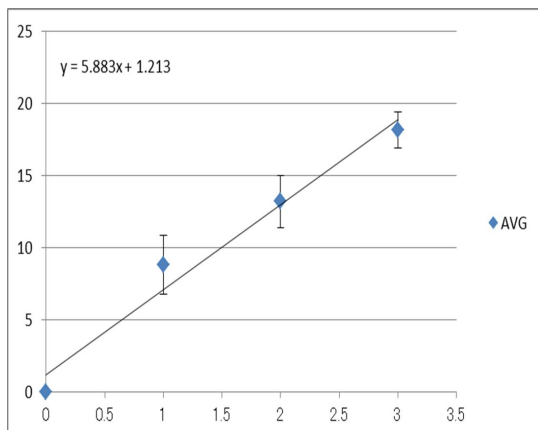
また、同一のリンパ球を使用し、同時にリンパ球のアポトーシスの評価も行う。

TUNEL法にて免疫染色し、アポトーシス定量評価も目視で行う。

治療前・治療後のアポトーシス検出の有無をカウントし、定量評価を行う。

4. 研究成果

基礎的検討として健常者（4名）から採取した血液に対し段階的に外照射を行い、リンパ球を分離し、 γ -H2AX 抗体にて染色を行った。核内の DNA 損傷をカウントし、外照射量と正の相関を認め、標準線を得た。



図：The number (mean \pm SD) of γ -H2AX foci after external irradiation in vitro increased linearly with radiation dose. (n=4)

次に臨床的検討として、放射線ストロンチウム内部照射療法の対象患者に対し、治療前、治療後1日目に採血を行い、リンパ球を分離し、基礎的検討と同様に γ -H2AX 抗体にて染色を行い、DNA 損傷数をカウントした。純粋線放出核種あるストロンチウムによる DNA 損傷は γ -H2AX 抗体による免疫染色によって検出可能であり、DNA2 重鎖切断での評価は可能であった。

対象となった患者は 13 名で、治療後1日目で DNA 損傷を観察できたのは 7 症例であった。DNA 損傷としての foci 数の平均は治療前で 0.4 ± 0.5 、治療後1日目で 7.7 ± 2.9 であった。これは観察できなかった症例は除外した値である。DNA 損傷を観察できなかった症例は治療前の段階より、核の変形が目立つものが多く、先に行われていた化学放射線治療の影響による変化の可能性が考えられた。評価可能であった症例に対しての結果からは、治療前と比較して、治療後は明らかに foci 数の増加を認めた。検討できた症例数は少ないが、 γ -H2AX を用いたリンパ球の組織障害の検討は評価可能と考えられる。

また、リンパ球自体に起きうるアポトーシスの評価の結果は、治療前はアポトーシスは検出せず、治療後はそれぞれ 1/300 個、1/200 個のアポトーシスを観察した。DNA 損傷は修復せず、アポトーシスに移行する細胞も検出可能である可能性が示唆された。今後、更に症例数を重ね、また、治療後の経過における数か月程度の間隔ごとの変化を

検討することによって、リンパ球減少との相関性を検討できれば、 γ -H2AX を用いた評価は放射線組織障害の副作用評価の簡便法となり得るのではないかと考えられる。

また、リンパ球のアポトーシスの存在に關しても、治療早期にどの程度出現し、その後のリンパ球減少との関係を明らかにすることによって、臨床的にリンパ球減少に対して、早期より対応可能となる評価法となり得る可能性が示唆されたと考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

渡邊直人、道合万里子、高橋知子、利波久雄、岩淵邦芳
第 74 回日本医学放射線学会総会、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜、2015 年 4 月 16 ~ 19 日
Radiation-induced damage in lymphocytes after radioisotope therapy for bone metastases

道合万里子、渡邊直人、高橋知子、利波久雄
第 54 回日本核医学会学術総会、大阪府大阪市、大阪国際会議場、2014 年 11 月 6 ~ 8 日
除痛目的のアイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害に関する検討

道合万里子、渡邊直人、高橋知子、利波久雄、岩淵邦芳
第 73 回日本医学放射線学会総会、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜、2014 年 4 月 10 ~ 13 日
Radiotoxicity after radioisotope for bone metastases using γ -H2AX of DNA damage in lymphocytes

道合万里子、渡邊直人、高橋知子、利波久雄
第 54 回日本核医学会学術総会、福岡県福岡市、福岡国際会議場、2013 年 11 月 8 ~ 10 日
除痛目的のアイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害に関する検討

6. 研究組織

(1)研究代表者

道合 万里子 (DOAI, Mariko)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：40515673

(2)研究分担者

渡邊 直人 (WATANABE, Naoto)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号： 40210926

岩淵 邦芳 (IWABUCHI, Kuniyoshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号： 10232696