

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461897

研究課題名(和文) 膠芽腫に対する新たな治療戦略の開発 - 低線量放射線高感受性に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Development of new strategy for glioblastoma focused on low-dose hyper-radiosensitivity

研究代表者

深田 淳一 (FUKADA, Junichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：50338159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は最も難治性の中枢神経原発悪性腫瘍である。低線量照射に対する細胞反応は放射線高感受性であることに着目し、基礎的検討を行った。膠芽腫細胞株に対して低線量照射を行い、細胞生存率と細胞周期、アポトーシス誘導を測定した。コロニー形成法による検討では、放射線超感受性を示唆する生存曲線が複数のセルラインで観察された。細胞周期やアポトーシス誘導の変化は検出困難であった。そこで低線量照射を反復して行ったところ、照射間隔が比較的長い(30分)群で細胞生存率の低下が観察され、照射後早期(30分)でG1期分画比率の減少とG2/M期分画の増加、アポトーシス分画の比率の増加が観察され、有効な治療法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is highly lethal disease. Radiotherapy plays important role but tumor recurrence is occurred in most of cases. We focused low-dose hyper-radiosensitivity phenomena as a new treatment strategy. Cell survival, cell cycle and rate of apoptosis were measured. Survival rate decreased in association with increasing dose on single low dose irradiation suggestive of hyper-radiosensitivity in some cell lines. On the other hand, the observed cell cycle change of G1/G2 ratio was less than 5%. The survival rate lowered when an interval became longer by low dose repeat irradiation (LDRR). The moderate change of the G1/G2 ratio was observed in the examination 30 minutes after irradiation only at 30 minutes interval. A rise of the apoptotic component was observed at 30 minutes interval. The LDRR at 30 minutes interval seems to be a promising approach, although, confirmation by other technique and elucidation of the further mechanism is warranted.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：膠芽腫 放射線照射 低線量照射

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠芽腫は最も難治性の中枢神経原発悪性腫瘍である。近年は少分割照射を含めた強度の高い放射線治療が臨床現場で試みられているが、重篤な有害事象も報告されている。少分割照射は通常分割照射に比して、腫瘍制御において有利と考えられたが、正常組織への有害事象が問題である。少ない照射線量でも局所制御が得られるように新しい治療戦略の開発が必要である。

(2) 1.0Gy 未満の低線量照射に対する細胞反応は、放射線高感受性であることが放射線生物学的に知られており、放射線超感受性と呼ばれている。低線量による反復照射を行うことで、少ない総線量で高い治療効果を得ることができれば、有害事象を増加することなく治療成績を改善できると考えた。

2. 研究の目的

膠芽腫細胞株に対して低線量反復照射を行い、細胞生存率と細胞周期、関連遺伝子の活性を測定することで基礎的検討を行い、膠芽腫に対する新たな治療戦略を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 代表的なヒト膠芽腫細胞のなかから使用する培養細胞株を複数選択する。単回の低線量放射線照射を行い、細胞生存率をコロニー形成法、アポトーシス分画の変化についてはフローサイトメトリーを用いて測定する。

(2) 照射前後で細胞周期の割合の変化を検出するため、細胞核の DNA 量含量をフローサイトメトリーで解析する。照射後の DNA 損傷は H2AX 抗体を用いて、蛍光顕微鏡で観察する。

(3) 細胞株に対する反復照射のため照射間隔を探索する。間隔は 0 分から 30 分程度まで検討する。コロニー形成法で細胞生存率を測定し、効果の高い照射間隔を探索する。

(4) 反復照射施行時のアポトーシス分画・細胞周期・DNA 損傷について測定、観察する。

(5) これまでの結果より、放射線低線量照射の有効性、効果的な反復照射間隔について検討する。

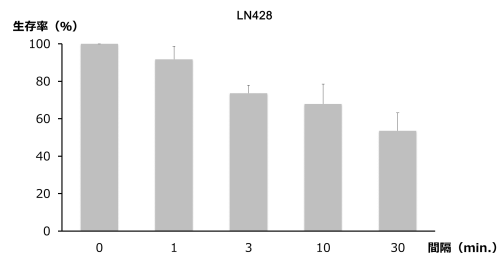
4. 研究成果

(1) ヒト膠芽腫細胞のなかから U_87、LN_229、U_251、LN_428 を選択した。低線量単回照射 (0.2Gy、0.4Gy、0.6Gy、0.8Gy) 施行により、線量依存性に細胞生存率の低下が観察された。LN_428 における 0.2Gy 照射時と LN_229 における 0.4Gy 照射時に比較的急峻な生存率低下が見られたが、これは U_87 と U_251 においては認められなかった。この結

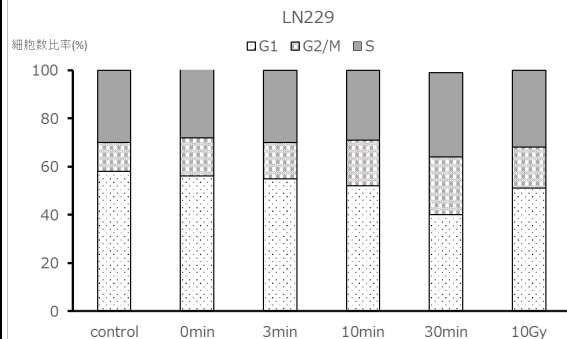
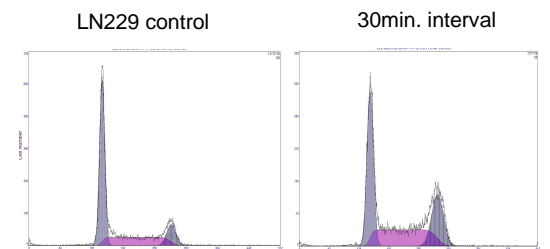
果からセルラインによる照射感受性の違いが推測された。アポトーシス分画の変化については明らかな変化を観察できなかった。

(2) フローサイトメトリー法で細胞周期を測定した。明らかな G0/G1 期と G2/M 期の比率変化は認められなかった。H2AX 抗体を用いた DNA 損傷の検出については蛍光顕微鏡で foci を観察可能であった。

(3) 各セルラインの照射間隔 (0 分、3 分、10 分、30 分) を変じて 0.2Gy x 10 回の低線量放射線照射を行い、コロニー形成法で生存率を測定した。いずれのセルラインにおいても、照射間隔が長くなるに従って生存率の低下が見られた。LN_428 における生存率を下図に示した。

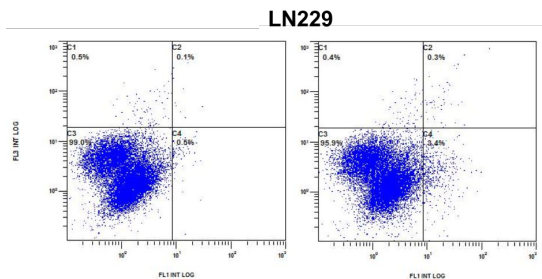


(4) 反復照射の照射間隔が長く、照射後短時間 (30 分) で回収、測定した群において G0/G1 期の低下が 10% 程度観察された。LN_229 の例では、G0/G1 期の細胞比率がコントロール、0 分、3 分、10 分、30 分、10Gy 照射でそれぞれ 58、56、55、52、40、51% であった。このような変化は 24 時間後、48 時間後では認められず、一過性の現象と推測された。



早期アポトーシス分画についても同様に照射 30 分後に回収した群において軽度の比

率の増加が観察された。LN_229 の例では、コントロール、0分、3分、10分、30分でそれぞれ、0.5、1.0、0.8、1.2、3.4%であった。24時間後、48時間後においては、明らかな比率の変化は観察できなかった。



(5) まとめとして、単回の放射線低線量照射においては線量依存性が観察された。低線量における超感受性については全細胞周期を用いた実験では確認できなかった。感受性が高いG2/M期に絞った検討を追加する必要があると示唆された。単回照射においては、フローサイトメトリーにて明らかな細胞周期の変化やアポトーシス分画の変化を観察できなかった。照射間隔を変じた反復照射を行い、照射間隔が比較的長い(30分)群で細胞生存率の低下が観察された。30分間隔で反復照射を行い、照射後早期(30分)で細胞周期を測定するとG1期分画比率の減少とG2/M期分画の増加が観察された。アポトーシス分画の比率も軽度増加が観察された。この変化は24時間後、48時間後には観察されなかった。

30分間隔の反復照射は有効な低線量照射法と考えられた。この有効性の原因が低線量における放射線超感受性として説明づけられかについてはさらなる検討が必要である。

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 10 件)

(1) 深田淳一、公田龍一、小池直義、三島真代、川田哲也、茂松直之
Low-dose-repeat-irradiation (LDRR) for glioma cell line 日本放射線腫瘍学会 第29回学術大会、2016年11月25-27日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

(2) Fukada J, Kota R, Koike N, Mishima M, Kawata T, Mishima K, Shigematsu N Low dose repeat irradiation in glioblastoma cell line. 62th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 16-19, October, 2016, Waikoloa Village (United States of America)

(3) Mishima K, Mishima-Kaneko M, Nishikawa R, Fukada J, Shigematsu N. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid in human glioma

cells. 62th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 16-19, October, 2016, Waikoloa Village (United States of America)

(4) Fukada J, Seki S, Kunieda E, Ohira T, Kawaguchi O, Tanaka T, Koike N, Yoshida K, Shigematsu N, Usefulness of single-isocenter stereotactic irradiation using a micro-multileaf collimator for multiple intracranial lesions -a dosimetric analysis- 12Th International Stereotactic Radiosurgery Congress, 7-11, June, 2015, Yokohama (Japan)

(5) Kawata T, Liu C, Fukada J, Kota R, Shigematsu N, Chromosomal Aberrations in Normal and AT Cells Exposed to High Dose of Low-dose-rate Irradiation, International congress of Radiation Research, 25-29, May, 2015, Kyoto (Japan)

(6) Shigematsu N, Fukada J, Kota R, Shiraishi Y, Kawata T, Cytogenetic Effects of Radiation and Caffeine on Normal Human Fibroblast and Ataxia Telangiectasia Heterozygous Fibroblast Cells International congress of Radiation Research, 25-29/May/2015, Kyoto (Japan)

(7) 高川佳明, 栗林徹, 深田淳一, 片山真 癌性髄膜炎を発症した転移性脳腫瘍に対する定位放射線治療の治療成績 第24回日本定位放射線治療学会 2015年5月15日、長崎ブリックホール(長崎県、長崎市)

(8) 公田龍一, サンペトラ オルテア, 大須賀覚, 川田哲也, 深田淳一, 佐谷秀行, 茂松直之 グリオーマ幹細胞の放射線照射後の細胞周期解析 日本放射線腫瘍学会第27回学術大会、2014年12月11日-13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(9) Mishima K, Mishima-Kaneko M, Saya H, Ishimaru N, Yamada K, Fukada J, Nishikawa R, Kawata T. Mre11-Rad50-Nbs1 complex inhibitor Mirin enhance radiosensitivity in human glioblastoma cells. 19th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology, 13-16, Nov, 2014, Miami, (United States of America)

(10) 公田龍一, サンペトラ オルテア, 小池直義, 深田淳一, 川田哲也, 佐谷秀行, 茂松直之 人工グリオーマ幹細胞の放射線照射後細胞周期イメージング 日本放射線腫瘍学会 第43回放射線による制癌シンポジウム・第52回生物部会学術大会 2014年7月、京都テルサ(京都府・京都市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深田 淳一 (FUKADA, Junichi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：50338159

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()