

平成21年5月12日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591454  
 研究課題名（和文） ヒト癌放射線感受性予測法としての未成熟染色体凝集法の改良に関する基礎的臨床的研究  
 研究課題名（英文） Development of a method of prediction for tumor cell radiosensitivity using Premature Chromosome Condensation  
 研究代表者  
 笹井 啓資 (SASAI KEISUKE)  
 新潟大学・医歯学系・教授  
 研究者番号：20225858

## 研究成果の概要：

センダイウイルスエンベロープ（HVJ-E）を用いて、未成熟染色体凝集（PCC）を簡便に誘導できた。放射線照射24時間後、すなわちDNA修復がほぼ完全に終了した時点で誘導したPCCから第4染色体断片数を測定し、さらに照射前の第4染色体数で補正したところ、断片数と細胞生存率の関係は、従来の報告とほぼ一致した。HVJ-Eを用いる本方法でも放射線感受性が測定できることが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

## 研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科・放射線科学

キーワード：放射線感受性 未成熟染色体凝集 HVJ-envelope

## 1. 研究開始当初の背景

放射線照射後の染色体障害と細胞の生存率の間に密接な関連があることは知られている。未成熟染色体凝集法（PCC:Premature Chromosome Condensation）は、M期細胞を間期細胞と細胞融合する事により、M期細胞の染色体凝集因子により間期細胞の染色体に凝集が誘導される現象で、間期細胞の染色体障害を細胞を培養せず観察することが可能

である。申請者らは *in vitro* の研究で、放射線照射後放射線障害からの回復がほぼ終了時点の染色体障害から細胞生存率が予測される可能性を示してきた。本法は、細胞培養することなく施行できる利点があるので、腫瘍細胞の内因的感受性のみならず、腫瘍放射線感受性を総合的に評価することができる可能性がある。また、本方法は、放射線照射により起こり得る全ての影響が終了後、細胞

胞生存を短期間で細胞培養の必要が無く総合的に判断できる大きな利点がある。

しかし、従来の研究から問題点として、腫瘍細胞と正常細胞との鑑別、PCC の収率、Ploidity の問題、アポトーシスの影響などがあり課題となったが、このうち Ploidity の問題、アポトーシスの影響評価は解決できることを明らかにした。本方法の最大の弱点は PCC の収率でこの点が障害となって臨床応用に結びつかなかった。

センダイウイルスを用いる方法は、ポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法に比較して高い収率が期待できるが、残念ながら不活化センダイウイルスの入手が難しく研究を中断せざるを得なかった。不活化センダイウイルスエンベロープ (HVJ-E) が市販され、簡便に安全に使用できるようになった。

## 2. 研究の目的

市販されている HVJ-E を用いて細胞融合をおこなうことでヒト由来腫瘍細胞 PCC の収率をどこまで高められるか、および放射線照射後種々の時間経過後に PCC を誘導し、染色体障害を検出し細胞生存率との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### PCC の誘導法

ヒト由来腫瘍細胞として京都大学より供与をうけたヒト食道癌細胞 KYSE-150 細胞を使用した。継代数 259 の保存細胞を融解し、最大継代数 10 回程度までのものを実験に供した。M 期細胞は Hela 細胞は Hydroxy Urea で半同調し、コルセミドで M 期でブロック後 Terashima-Tolmach 法で収集した。

M 期細胞と同数の G0 期 KYSE-150 細胞を HVJ-E を用いて細胞融合させた。G0 期細胞に PCC を誘導されるまで 65 分間培養した。添加する HVJ-E 量および添加後の遠心を加えるか否か

を検討し、もっとも PCC の収率が高まる条件を求めた。

### PCC 誘導 G0 期細胞染色体障害の検出

PCC が誘導された細胞を低浸透圧処理して膨化させ、さらに氷冷したメタノール 3 : 酢酸 1 混合液で固定を行った。細胞をスライドガラスに伸展し、第 4 染色体特異プローブを用いて蛍光 in situ hybridization 法 (FISH) にて第 4 染色体を蛍光染色した (図 1)。

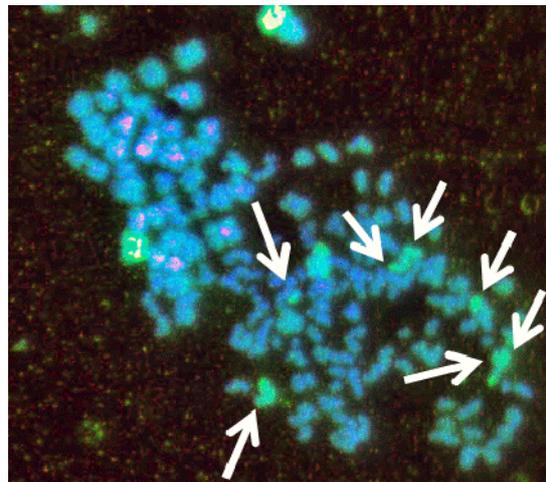


図 1 6Gy 照射直後に PCC 誘導した細胞における PCC-FISH 法で検出された第 4 染色体断片 (→)

### 検討項目

以下の項目に関して検討した。

- (1) PCC を誘導する適切な条件の決定
- (2) 放射線照射からの時間経過と PCC-FISH 法により検出された第 4 染色体断片の変化
- (3) 照射線量と第 4 染色体断片数の関連

## 4. 研究成果

(1) PCC を誘導する適切な条件の決定条件を変化させた結果を図 2 に示す。HVJ-E 懸濁液量が  $18.0 \mu\text{l}$  添加し 100rpm/min 以下の遠心を加えて細胞間の密着度を上げたものが最も収率が高かった。

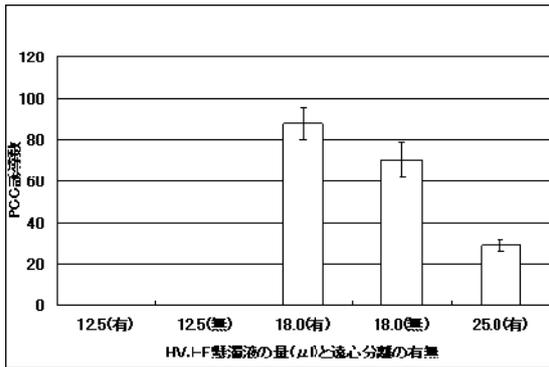


図2 HVJ-E 量と遠心分離の有無による PCC 収率

(2) 放射線照射からの時間経過と染色細胞を冷水中で 6Gy 照射後、培養条件下に戻し、0分から24時間後にPCCを誘導した。なお1時間までは浮遊細胞として照射し、それ以上では付着細胞で照射した。照射直後から第4染色体断片数の減少が起こり、6時間後ではほぼ一定となった。図3に結果を示す。

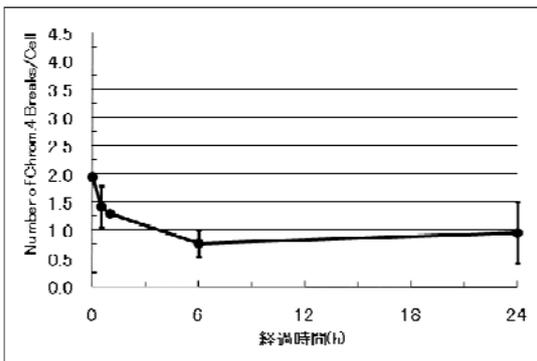


図3 照射後の第4染色体断片数変化

(3) 照射線量と第4染色体断片数 照射0時間での第4染色体断片数と照射線量との関連について求めた(図4)。

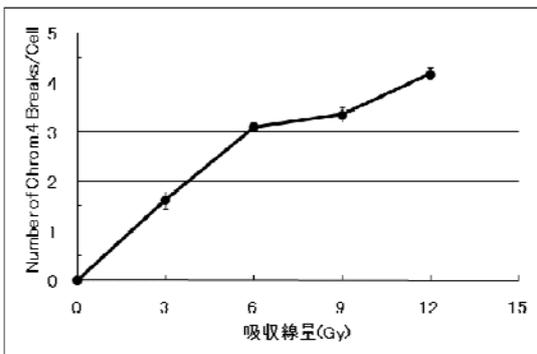


図4 照射0時間における第4染色体断片数

次に図3からDNA修復がほぼ終了したと考えられる照射24時間後における線量と第4染色体断片数との関連について求めた。図5にその結果を示す。

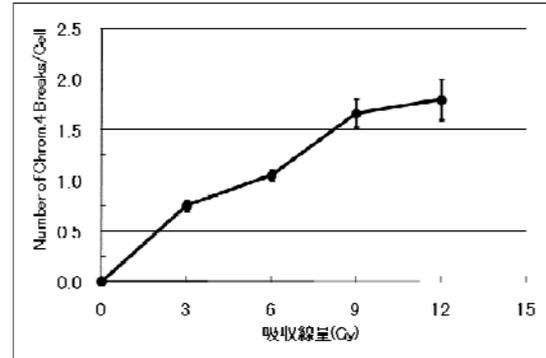


図5 照射24時間の第4染色体断片数

以上の結果を用いて照射24時間後の細胞を用いてコロニー法で求めた細胞生存率と、第4染色体断片数との関連を求めた(図6)。

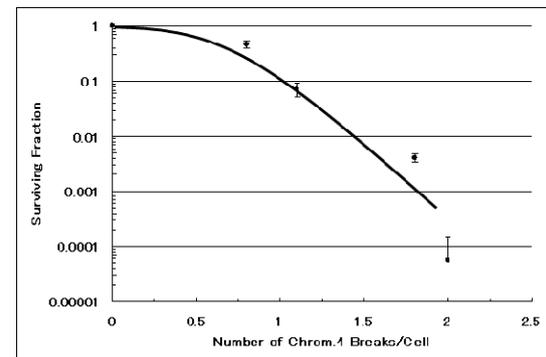


図6 照射24時間後の染色体断片数と細胞生存率(第4染色体の断片数=各照射線量の第4染色体の断片数-照射線量0Gy時の第4染色体の断片数(2.5))

#### (4) 考察

当初の目的であった、安定して高率でPCCを誘導することは、市販HVJ-Eを用いることで容易に達成できた。PEGを用いる方法に比較してHVJを用いる方法は、誘導時の条件が幅広いために簡便に可能である。一方、不活化HVJの入手が困難で、さらに感染性を100%否定することができないため、取り扱いが煩雑

であった。今回、使用した HVJ-E は市販されているため容易に入手可能で、かつ感染性がないため PCC 誘導に有効な試薬を言える。染色体障害と細胞生存率の関係が、全ての細胞に共通するとすれば細胞培養することなく、染色体障害を測定することで細胞生存率曲線、すなわち細胞の放射線感受性が測定できる。図 6 は染色体障害と細胞生存率の関係を表したものであるが、図 7 に示す従来の報告と大きく乖離していた。

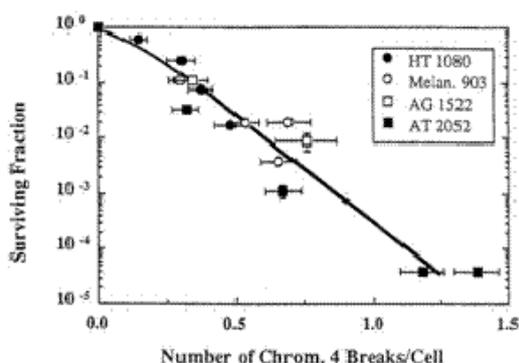
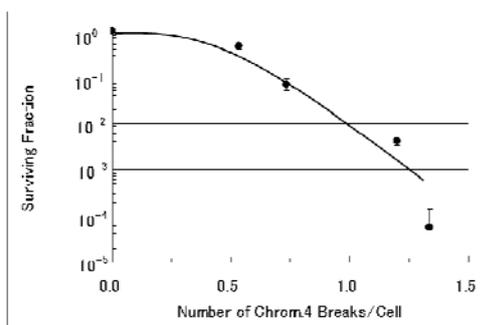


図 7 Sasai et al 1994 (Int. J. Radat. Oncol. Biol. Phys)

この原因として、腫瘍細胞の異数性が考えられる。染色体断片数を DNA 量や染色体数で補正する必要性が考えられる。図 6 を染色体数で補正した場合 (図 8)、図 7 で示した染色体断片数と細胞生存率の関係に極めて類似した関係が得られた。



今後、さらに対象とする腫瘍細胞の種類を増やして本方法の有用性を検討する必要がある。また、細胞死は必ずしも染色体損傷によ

るものばかりではない。放射線感受性の高い細胞ではアポトーシスによる間期死が多く、アポトーシスを同時に評価する必要があると考えられる。

#### (6) 結論

市販の HVJ-E を用いて、簡便に PCC を誘導できた。放射線照射 24 時間後、すなわち DNA 修復がほぼ完全に終了した時点で誘導した PCC から第 4 染色代断片数を測定し、さらに照射前の第 4 染色体数で補正したところ、断片数と細胞生存率の関係は、従来の報告とほぼ一致した。本方法でも放射線感受性が測定できることが示された。

#### 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 2 件)

- ① Kaidu M, Oyamatu M, Sato K, Saitou A, Yamamoto S, Yoshimura N, Sasai K. Diagnostic limitations of 10 mm thickness single-slice computed tomography for patients with suspected appendicitis. Radiat Med. 26(2):63-69, 2008 (査読有)
- ② Ozaki T, Kamura T, Ajioka Y, Shirai Y, Kurosaki I, Yamamoto S, Sasai K. Dynamic computed tomography findings of malignant intraductal papillary mucinous tumor compared with invasive ductal adenocarcinoma. Radiat Med. 25(9) 446-452, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 後藤直樹、高橋俊博、笹井啓資 PCC-FISH 法による放射線感受性予測法の改良 第 11 回癌治療増感研究シンポジウム 平成 21 年 2 月 15 日奈良県奈良市
- ② SASAMOTO R, TSUCHIDA E, ABE E, FUKUDA T, KAWAGUCHI G, SASAI K Chemoradiotherapy using low-dose protracted infusion of 5-FU alone is as effective as 5-FU combined with cisplatin for advanced esophageal cancer. 49th Annual Meeting of the ASTRO Oct 28 - Nov 1, 2007, Los

Angeles Convention Center, Los  
Angeles, CA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 啓資 (SASAI KEISUKE)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20225858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし