

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390231

研究課題名（和文）放射線がん治療における低線量被ばくによる正常組織反応の機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for responses of normal tissues exposed to low dose radiation in the radiation cancer therapy.

研究代表者

松本 英樹（MATSUMOTO HIDEKI）

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号：40142377

研究成果の概要（和文）：正常マウス（Jcl:ICR マウス、5 週齢、雄）に炭素線（135 MeV/u、25 keV/μm）を 0.01～2.0 Gy 全身照射し、小腸および精巣でのアポトーシス誘導について精査した。その結果、小腸および精巣共にそれぞれの幹細胞および前駆細胞が分布する部位に特異的にアポトーシスが誘導されていた。また 0.05 Gy 以下の照射においても、小腸では非照射の対照マウスと比較して有意にアポトーシスの誘導が検出され、アポトーシス細胞の出現頻度は線量依存的に増加した。さらに特異的にアポトーシスが誘導されていた細胞を免疫組織化学染色により解析した結果、小腸および精巣いずれにおいてもアポトーシスが誘導されていた細胞は幹細胞およびその前駆細胞であることが明らかとなった。以上の結果から、炭素線の低線量被ばくにより正常組織の組織幹細胞および生殖幹細胞に特異的にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate mechanisms for responses of normal tissues exposed to low dose radiation, the induction of apoptosis in the small intestine and testis from whole body-irradiated ICR mice (Jcl:ICR, 5 weeks old, male) with carbon ion beams at 0.01 ~ 2.0 Gy. The apoptosis was specifically induced in the intestinal crypts and the outermost region of lobuli testis in the mice irradiated at 2.0 Gy. In addition, the apoptosis was detected in the intestine and testis from the mice irradiated at 0.01 ~ 0.05 Gy in the same manner. The incidence of apoptotic cells in the intestine increased in the dose-dependent manner. Finally, the immunohistochemical analysis indicated that the apoptotic cells induced in the intestine or testis were the tissue or germ stem cells and their progenitor cells, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

近年、照射装置の進歩・照射方法の工夫および治療後の患者の優れた QOL により放射線がん治療が高い評価を得ている。しかしながら、密封小線源による組織内照射では低線量率連続照射が行われ、周辺の正常組織に低線量被ばく域が存在している。強度変調放射線がん治療においても場合によっては低線量率照射となることがあり、周辺の正常組織に低線量被ばく域が存在している。また重粒子放射線治療においても粒子線の軌跡に沿って特に腫瘍の手前に低線量被ばく域が存在している。また既に診断用の X 線 (CT 検査) による発がんリスクに関する警鐘が鳴らされている (de Gonzalez AB., Darby S.: *Lancet*, 363: 345-351, 2004.)。従って、放射線がん治療における正常組織の低線量被ばくによる新たな問題が浮き彫りにされてくる可能性が考えられる。生物は、低線量放射線に対して高線量放射線に対するそれとは異なった応答様式を備えている。僅かな線量の放射線を被ばくした細胞の近傍に存在する被ばくしていない細胞に現れる応答反応が放射線誘発バスターンダール応答であり、細胞が予め僅かな線量を被ばくすることにより次に被ばくする高線量の放射線に対して抵抗性を示す応答反応が放射線適応応答である。これらの応答反応は、培養細胞のみならず正常マウス個体において認められている (Kovalchuk O. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol.*, 70: 554-562, 2008.)。つまり個体を形成する細胞は僅かな放射線に対して反応し、様々な特異的な応答を示す。

我々は、放射線誘発バスターンダール応答の中でも防護的な応答を誘導するイニシエーター (またはメディエーター) が一酸化窒素 (NO) ラジカルであることを世界に先駆けて発見した (Matsumoto H. *et al.*, *Radiat. Res.*, 155:387-396, 2001.)。さらに放射線適応応答のイニシエーター (またはメディエーター) も NO ラジカルであることを世界に先駆けて発見した (Matsumoto H. *et al.*, *Cancer Res.*, 67: 8574-8579, 2007.)。これらの発見は、当該研究分野において国内外から高い評価を得ている。

本研究は、低線量放射線に対する細胞の特異的な応答現象である「放射線誘発バスターンダール応答」および「放射線適応応答」の機構解明の研究成果を踏まえて、低線量放射線被ばくによる正常組織反応の分子機構を明らかにしようとする点が特色であり、独創的な点である。がん患者自身が診療行為により

健康上の便益を得て、それが放射線被ばくにより受ける損害を上回っているという前提で、医療被ばくには線量当量限度が設定されていない。しかし、放射線がん治療をはじめ放射線を利用した診療の実施に当たり、その目的を達成できる範囲で患者の被ばく線量を低減する必要がある。本研究は、この医療放射線防護の最適化に貢献し、低線量放射線のリスク評価に大きく寄与することが予想される。

2. 研究の目的

強度変調放射線がん治療および粒子線によるがん治療の普及に鑑み、低線量/低線量率放射線被ばくによる正常組織の応答機構を解明することを目的とした。当初は、ヒト正常細胞および正常マウスを用いて、放射線感受性の修飾・細胞周期調節因子の動態・アポトーシス誘導因子の動態を分子生物学的に明らかにし、さらにそれらの動態への NO の関与を明らかにすることを目的としたが、全身照射した正常マウスの小腸および精巣において、非常に特異的な部位に分布する細胞にアポトーシスが誘導されていることを見出し、このアポトーシス誘導の線量依存性およびアポトーシス細胞種を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 動物：ICR マウス (Jcl:ICR、5 週齢、雄) を用いた。
- (2) マウスへの全身照射：放射線医学総合研究所において、炭素線 (135 MeV/u、25 keV/μm) を用いて全身照射した。
 - ① 単回照射：0.01 ~ 2.0 Gy を照射した。
 - ② 2 回照射：先ず 0.02 Gy を全身照射し、24 時間後に 2.0 Gy を全身照射した。
- (3) アポトーシス細胞の検出：最終照射後 36 時間目に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、小腸および精巣を摘出し、TUNEL 染色法により行った。
- (4) アポトーシス細胞の同定：免疫組織化学染色法により、小腸幹細胞/前駆細胞および精子幹細胞/前駆細胞を同定した。
 - ① 小腸幹細胞の同定：抗 Lgr-5 および抗 Msi-1 抗体を用いた。
 - ② 小腸前駆細胞の同定：抗 Hes-1 抗体を用いた。
 - ③ 精子幹細胞の同定：抗 Haspin および抗 UCHL1 抗体を用いた。
 - ④ 精子前駆細胞の同定：抗 Zfp145 抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) 小腸および精巣でのアポトーシス誘導

- ① 2 Gy 単回照射：小腸および精巣において、顕著に TUNEL 陽性細胞（アポトーシス細胞）が認められた。アポトーシス細胞は、小腸では腺窩の基底部に、精巣では精巣小葉の最外層に局在して認められた（図 1）。
- ② 低線量（0.01 ~ 0.05 Gy）単回照射：小腸および精巣において、顕著に TUNEL 陽性細胞（アポトーシス細胞）が認められた。やはりアポトーシス細胞は、小腸では腺窩の基底部に、精巣では精巣小葉の最外層に局在して認められた（図 2）。また小腸においては、アポトーシス細胞の出現頻度に線量依存性が明らかに認められた（図 3）。
- ③ 2 回照射：先ず 0.02 Gy を全身照射し、24 時間後に 2.0 Gy を全身照射したマウスでも、小腸および精巣において顕著にアポトーシス細胞が認められた。しかしアポトーシス細胞の出現頻度は、2 Gy 単回照射と比較して明らかに少なく、放射線適応応答が誘導されていることが示唆された（図 4）。

(2) 小腸および精巣でのアポトーシス細胞の同定

- ① 小腸でのアポトーシス細胞の同定：0.02 Gy および 2.0 Gy を全身照射し、36 時間後に小腸を摘出し、抗 Lgr-5、抗 Msi-1、および抗 Hes-1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果、何れの線量においてもアポトーシスしているのは Lgr-5 あるいは Msi-1 陽性細胞であり、小腸幹細胞が特異的にアポトーシスしていることが示唆された。
- ② 精巣でのアポトーシス細胞の同定：0.02 Gy および 2.0 Gy を全身照射し、36 時間後に精巣を摘出し、抗 Haspin、抗 UCHL1、および抗 Zfp145 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果、何れの線量においてもアポトーシスしているのは Haspin あるいは UCHL1 陽性細胞であり、小腸幹細胞が特異的にアポトーシスしていることが示唆された。

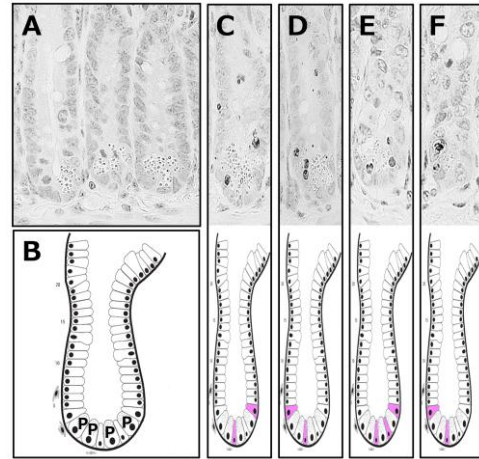


図 1. 炭素線（2.0 Gy）照射による小腸でのアポトーシス誘導（TUNEL 染色）。A、非照射マウスの小腸；B、小腸腺窩の模式図。P はパネート細胞を示す。C~F、炭素線（2.0 Gy）照射したマウスの小腸腺窩。下の模式図にアポトーシス細胞の分布を示す。

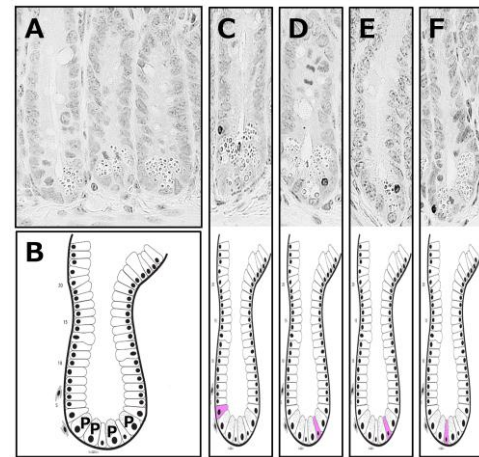


図 2. 炭素線（0.02 Gy）照射による小腸でのアポトーシス誘導（TUNEL 染色）。A、非照射マウスの小腸；B、小腸腺窩の模式図。P はパネート細胞を示す。C~F、炭素線（0.02 Gy）照射したマウスの小腸腺窩。下の模式図にアポトーシス細胞の分布を示す。

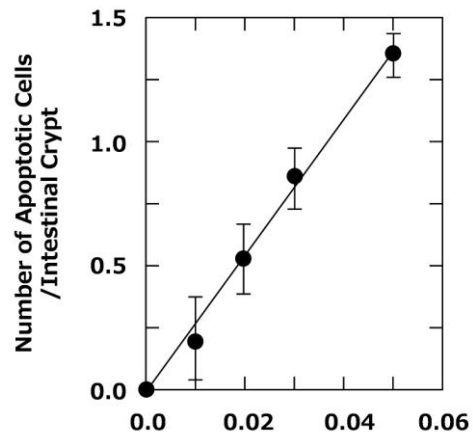


図 3. 小腸腺窩における炭素線（0.01 ~ 0.05 Gy）照射によるアポトーシス細胞の出現頻度（TUNEL 染色）。

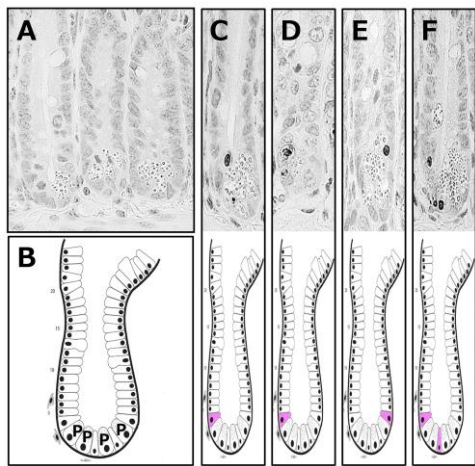


図4. 炭素線 (0.02 Gy → 24時間 → 2.0 Gy) 照射による小腸でのアポトーシス誘導 (TUNEL 染色). A、非照射マウスの小腸; B、小腸腺窩の模式図. P はパネート細胞を示す. C~F、炭素線 (2.0 Gy) 照射したマウスの小腸腺窩. 下の模式図にアポトーシス細胞の分布を示す.

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 7 件)

1. Maeda, M., Kobayashi, K., Matsumoto, H., Usami, N., Tomita, M.: X-ray-induced bystander responses reduced spontaneous mutation in V79 cells. *J. Radiat. Res.*, 2013. In press (査読有)
2. Otsuka, K., Hamada, N., Magae, J., Matsumoto, H., Hoshi, Y., Iwasaki, T.: Ionizing Radiation Leads to the Replacement and *de novo* Production of Colonic *Lgr5⁺* Stem Cells. *Radiat. Res.*, 2012. In press (査読有)
3. Tomita, M., Maeda, M., Kobayashi, K., Matsumoto, H.: Dose response of soft x-ray-induced bystander cell killing affected by *p53* status. *Radiat. Res.*, 179: 200-207, 2012. (10.1667/RR3010.1) (査読有)
4. Miura, K., Sakata, K., Someya, M., Matsumoto, Y., Matsumoto, H., Takahashi, A., Hareyama, M.: The combination of olaparib and camptothecin for effective radiosensitization. *Radiat. Oncol.* 7: 62, 2012. (10.1186/1748-717X-7-62) (査読有)
5. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M., Hamada, N.: Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses. *Curr. Mol. Pharmacol.* 4: 126-134, 2011. (10.2174/1874467211104020126) (査読有)
6. Narita, N., Fujieda, S., Kimura, Y., Ito, Y., Imoto, Y., Ogi, K., Takahashi, N., Tanaka, T., Tsuzuki, H., Yamada, T., Matsumoto, H.:

Suppression of histone deacetylase 3 (HDAC3) enhances apoptosis induced by paclitaxel in human maxillary cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396: 310-316, 2010. (10.1016/j.bbrc.2010.04.089.) (査読有)

7. Kawashima, D., Soga, M., Takeuchi, R., Matsumoto, H., Ohtsuka, K.: Molecular chaperone inducers facilitate the functional restoration of temperature-sensitive mutant p53 protein. *Thermal Med.*, 26: 1-17, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 30 件)

1. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Maeda, M., Hatashita, M.: Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses. (招待講演) The 3rd International Symposium of RIRBM – Biological Effects of Low Dose Radiation-. 2013・2・12 広島市
2. 松本英樹: 放射線によるシグナル伝達の修飾. (招待講演) 第3回放射線生物学セミナー 2013・2・2 東京都
3. 松本英樹: 低線量被ばくを考える 一福島第一原発事故を受けて一. (招待講演) 平成24年度北陸4大学連携まちなかセミナー 2012・10・20 富山市
4. 松本英樹: 低線量被ばくを考える 一福島第一原発事故を受けて一. (招待講演) 第49回放射線科学研究会 2012・10・19 大阪市
5. Matsumoto, H.: Development of first-aid medicines for emergency acute exposure by accident of nuclear power plant. The 58th Annual Meeting of the Radiation Research Society. 2012・10・3 San Juan (Puerto Rico)
6. 松本英樹, 畑下昌範, 前田宗利, 富田雅典, 大塚健介, 舟山知夫, 横田裕一郎, 武藤泰子, 鈴木芳代, 坂下哲哉, 小林泰彦: 放射線誘発バystander応答による放射線適応応答の誘導. 第7回高崎量子応用研究シンポジウム 2012・10・12 高崎市
7. 松本英樹: 私と放射線生物学. (招待講演) 日本放射線影響学会 第55回大会 2012・9・7 仙台市
8. 大塚健介, 馬替純二, 浜田信行, 松本英樹, 山内基弘, 富田雅典, 岩崎利泰: 腸管幹細胞の放射線誘発ターンオーバーの評価. 日本放射線影響学会 第55回大会 2012・9・6 仙台市
9. 前田宗利, 小林克己, 松本英樹, 宇佐美徳子, 富田雅典: X線マイクロビームを用いた細胞局所照射手法の開発と細胞質の放射線応答の解析. 日本放射線影響学会 第55回大会 2012・9・6 仙台市
10. 松本英樹, 高橋昭久, 大西武雄: 放射線

- 誘発バイスタンダー応答による放射線適応応答の誘導. 日本放射線影響学会 第55回大会 2012・9・6 仙台市
11. Matsumoto, H.: Stress-Induced, NO-mediated bystander responses for protecting cells themselves. (招待講演) The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology(ICH0) & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine(JCTM) 2012・8・30 京都市
 12. Matsumoto, H.: How to approach the microbeam experiments. -from broad- to micro-beams. The 2nd Microbeam Experiment Training Course in the 10th International Workshop for Microbeam Probes of Cellular Radiation Response. 2012・3・19 New York (USA)
 13. Matsumoto, H.: The evidence that low dose radiation involves non-targeted effects in targeted effects. (招待講演) The Sugahara Memorial International Symposium. 2012・1・26 京都市
 14. 松本英樹: NOをメディエーターとする生体応答ー基礎研究からイノベーションまでー. (招待講演) 第17回浜松自由基研究会 2011・12・6 浜松市
 15. 松本英樹、富田雅典、大塚健介、前田宗利、畑下昌範: 話題提供: エネルギーの異なる重粒子線照射によるバイスタンダー応答と適応応答. 日本放射線影響学会第54回大会. 2011・11・18 神戸市
 16. 松本英樹、渡邊正巳、田内広、立花章、鈴木啓司、宇佐美徳子、松本義久: 影響学会 Q&A 活動を通してみた社会的影響. 日本放射線影響学会第54回大会. 2011・11・18 神戸市
 17. 大塚健介、浜田信行、馬替純二、松本英樹、塚本徹哉、星裕子、野村崇治、富田雅典、前田宗利、吉田和生、丹羽太貴、岩崎利泰: 腸管組織の幹細胞ターンオーバー. 日本放射線影響学会第54回大会. 2011・11・18 神戸市
 18. 前田宗利、松本英樹、宇佐美徳子、小林克己、富田雅典: X線誘発バイスタンダー応答による自然発生突然変異の抑制. 日本放射線影響学会第54回大会. 2011・11・18 神戸市
 19. 松本英樹、畑下昌範: 陽子線がん治療における低線量被ばくによる正常組織反応の機構解明. (招待講演) 第13回若狭湾エネルギー研究センター研究報告会 2011・10・27 福井市
 20. 松本英樹、富田雅典、大塚健介、前田宗利、舟山知夫、横田裕一郎、武藤泰子、坂下哲哉、小林泰彦: アルゴン・マイクロビーム照射による放射線適応応答の誘導. (招待講演) 第6回高崎量子応用シンポジウム 2011・10・14 高崎市
 21. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Maeda, M., Hamada, N., Hatashita, M.: Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses. 14th International Congress of Radiation Research. 2011・8・30 Warsaw (Poland)
 22. 松本英樹: 原発事故による緊急被ばくに対する救急処置薬の開発. (招待講演) 福井大学新技術説明会 2011・8・22 東京都
 23. 松本英樹: 放射線誘発バイスタンダー応答による適応応答の誘導. (招待講演) PF研究会「エネルギー付与の不均一性に着目した放射線生物影響研究の展望」 2011・7・12 つくば市
 24. 松本英樹: 放射線によるシグナル伝達の修飾. (招待講演) 第2回放射線生物学セミナー 2011・2・5 東京都
 25. 松本英樹、大塚健介、富田雅典、畑下昌範: 粒子線誘発バイスタンダー応答による小腸および精巣でのアポトーシス. 日本放射線影響学会 第53回大会 2010・10・15 京都市
 26. 松本英樹: 放射線誘発バイスタンダー応答研究の展望. 日本放射線影響学会 第53回大会 2010・10・15 京都市
 27. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: Radioadaptive response can be induced even after priming irradiation of a limited number of cells with charged heavy particles. The 56th Annual Meeting Radiation Research Society. 2010・9・28 Maui (Hawaii)
 28. Matsumoto, H.: A redox status of tumor microenvironment in cancer therapy. The 5th Asian Congress of Hyperthermic Oncology (ACH0) The 27th Japanese Congress of Thermal Medicine(JCTM) 2010・9・15
 29. 松本英樹: ラジカル発生剤による放射線増感の可能性. (招待講演) 第49回日本医学放射線学会生物部会学術大会 第40回放射線による制癌シンポジウム 2010・7・23 札幌市
 30. Narita, N., Matsumoto, H., Yamamoto, H., Kimura, Y., Fujieda, S.: Analysis of molecular targets to overcome cisplatin-resistance in human maxillary cancer. 23rd Congress of the European Rhinologic Society (ERS) 29th International Symposium of Infection and Allergy of the Nose (ISIAN) 2010・6・20 Geneva (Switzerland)

〔図書〕（計1件）

1. ノーマン・エンディ(著)、松本英樹(訳)：何千人もの命を救い得る緊急被ばく時の医療プラン―広島と長崎の経験に基づいて― アマゾン・プレス 2013・3

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授
研究者番号：40142377

(2)研究分担者

北井 隆平 (KITAI RYUHEI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80251990
成田 憲彦 (NARITA NORIHIKO)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：80345678