

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591794

研究課題名(和文)放射性ヨード治療におけるリンパ球のDNA損傷に関する検討

研究課題名(英文) Evaluation of radiotoxicity after iodine-131 therapy using DNA damage in lymphocytes

研究代表者

渡邊 直人 (WATANABE, Naoto)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40210926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌の放射性ヨード治療の放射線障害について評価するために、DNA損傷部位に集積する γ -H2AXを用いて検討した。放射性ヨード治療の患者15名を対象とした。リンパ球に、 γ -H2AXに対する抗体で免疫染色を行い、DNA損傷部位を蛍光顕微鏡を用いて計測した。正常者のリンパ球X線外部照射し、DNA損傷を計測した。リンパ球のDNA損傷は、ヨード治療後有意な増加を示した。外部照射のリンパ球の照射量は、 0.77 ± 0.31 Gyであった。 γ -H2AXを用いた評価法は、甲状腺癌に対する放射性ヨード治療における放射線組織障害であるDNA損傷検出には有用であり、治療に伴う照射量評価も可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study was to evaluate the degree of cytological radiation damage to lymphocytes after I-131 therapy using γ -H2AX foci immunodetection. Methods: This study focused on 15 patients who underwent I-131 therapy. Venous blood samples were collected from each patient before therapy and 4 days thereafter. Lymphocytes were isolated and subjected to γ -H2AX immunofluorescence staining. Results: The number of foci per lymphocyte nucleus was 0.41 ± 0.51 before and 6.19 ± 1.80 after radioiodine therapy, and this difference was statistically significant. Absorbed doses estimated were 0.77 ± 0.31 Gy. Conclusion: Our study suggests that γ -H2AX foci immunodetection is useful as a biomarker for the evaluation of the radiotoxicity after I-131 therapy. γ -H2AX foci immunodetection in lymphocytes may detect radiation-induced DNA damage associated with I-131 therapy of thyroid cancer.

研究分野：核医学

キーワード：甲状腺癌 放射線障害 リンパ球 γ -H2AX

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来から甲状腺癌に対して放射性ヨードを用いた放射線内部照射治療が行われてきている。しかしながら、実際には放射性ヨードを用いた放射線内部照射治療では、様々な副作用が報告されてきた。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。ところが、放射線ヨードを用いた放射線内部照射治療に伴う、生体内のリンパ球自体への影響である放射性組織障害に関して、DNA 損傷を直接評価する検討は現在まで見られない。

(2) 我々は既に、遺伝子レベルの障害性が間接的に評価可能である小核試験を用いて、予備的検討として放射性ヨードを用いた放射線内部照射治療に伴うリンパ球自体の放射性組織障害に関する検討を報告している。

(3) そこで今回、放射性ヨード内部照射治療について、血液の中で最も放射線感受性が高いと考えられているリンパ球に対して、どの程度の放射性組織障害が出現するのか、DNA 損傷部位に集積することが知られている γ -H2AX を用いて基礎的に検討しようと考えた。

2. 研究の目的

(1) γ -H2AX に対する抗体で細胞の免疫染色を行うと、DNA 損傷部位が核内の点として染色され、光学顕微鏡で DNA 損傷の個数を数えることができる。この方法を用いて、治療前後の末梢血リンパ球に発生する DNA 損傷数を定量する事が可能である。

(2) 治療によるリンパ球の被曝線量は、正常リンパ球を外部照射してできる DNA 損傷数と照射量との関係から求めた標準線より推定することが可能であると考えられる。

(3) 放射性ヨード内部照射治療について、血液の中で最も放射線感受性が高いと考えられているリンパ球に対して、どの程度の放射性組織障害が出現するのか、DNA 損傷部位に集積す

ることが知られている γ -H2AX を用いて検討することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 金沢医科大学倫理委員会で承認された甲状腺癌術後ヨード大量治療目的患者の 15 名 (男性 7 名、女性 8 名) で、放射性ヨード 3.7 GBq の投与治療を受ける患者を対象とした。放射性ヨード治療前、及び治療 4 日後に患者より採血を行う。採血された血液中のリンパ球を、リンパ球分離溶液 (LYMPHO SEPARATION MEDIUM; MP) を用いて遠心分離しリンパ球を得た。

(2) 特殊スライドガラス上 (ImmunoSelect[®] ADHISION SLIDES squarix) に固定したリンパ球に、 γ -H2AX に対する抗体 (clone JBW301; Upstate) さらにそれに対する抗体 (Polyclonal Rabbit Anti-mouse IgG-TRITC; DakoCytomation) 及び 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) with mounting medium (PermaFlour[™] Aqueous Mounting Medium Thermo) で細胞の免疫染色を行った (図 1)。

蛍光顕微鏡 (Olympus BX50) にてリンパ球細胞核 30 個辺りの DNA 損傷部位が核内の点として染色された DNA 損傷の個数を測定した (図 2)。

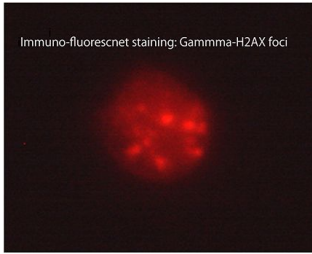
図 1

リンパ球の DAPI 核染色



図 2

リンパ球の核内の γ -H2AX を用いた DNA 損傷焦点



(3) 同意の得られた正常者(7名)より採血して、リンパ球をリンパ球分離溶液を用いて遠心分離する。In vitro でX線外部照射する実験で、分離リンパ球にはそれぞれ 0.5Gy, 1Gy, 2Gy, 3Gy をX線外部照射(VARIAN CLINAC iX, 10MeV)し、外部照射してできるDNA損傷数と照射量との関係から求めた標準線を作成し、治療によるリンパ球の照射線量を推定した。

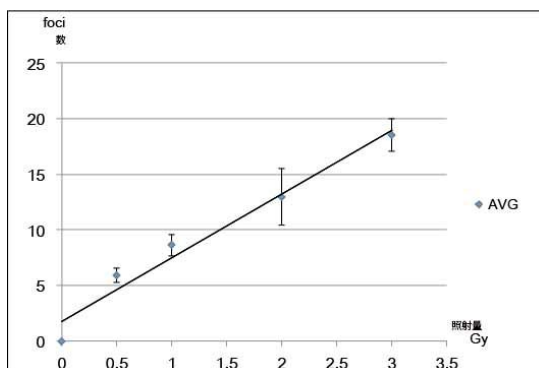
4. 研究成果

(1) 放射性ヨード 3.7 GBq の投与治療を受けた患者のリンパ球 30 個あたりの -H2AX を用いた DNA 損傷の個数は、治療前が 0.41 ± 0.51 (mean \pm SD) で治療後が 6.19 ± 1.80 と治療後有意な増加を示した (Wilcoxon's signed rank test, $P=0.001$)

X線外部照射とリンパ球のDNA損傷の個数の関係は、照射によりDNA損傷数は直線的に増加しており、 $Y=5.7X+1.7$, $R^2=0.96$ として求められた(図3)。

図3

-H2AX を用いた DNA 損傷焦点数と照射量との関係



-H2AX を用いた DNA 損傷焦点数と照射量との関係から、放射性ヨード 3.7 GBq の投与治療を受けた患者 15 名の推定されたリンパ球の照射量は、 0.77 ± 0.31 Gy であった。

(2) 放射線照射によるDNA損傷刺激に晒された細胞の核内では、損傷を受けたDNAが初期応答として、ヒストンH2AXをリン酸化して、リン酸化されたH2AX(H2AX)が損傷部位に集積する。DNA損傷であるDNA二重鎖切断をこのH2AXに対する抗体を用いて、損傷数を集積点数として評価することが可能である。H2AXに対する抗体を用いた評価法は、低線量被曝にも有用な方法と考えられている。

(3) 我々は、I-131 3.7GBq 投与の甲状腺癌患者におけるリンパ球の生物学的な放射線障害の程度について、H2AXに対する抗体を用いて評価した。ヨード治療後のリンパ球には、有意なH2AXの点の数の増加として検出された。外部照射してできるDNA損傷数と照射量との関係から求めた標準線より、リンパ球の照射線量を推定した。推定されたリンパ球の照射量は0.77 Gyであった。

(4) DNA損傷部位に集積することが知られている-H2AX用いた評価法は、甲状腺癌に対する放射性ヨード治療における放射線組織障害を評価可能で、さらには治療に伴う照射量評価にも有用であると考えられた。

< 引用文献 >

Hamilton JG, Lawrence JH: Recent clinical developments in the therapeutic application of radio-phosphorus and radio-iodine. J. Clin. Invest. 1942;21:642.

Leeper RD, Shimaoka K: Treatment of metastatic thyroid cancer. Clin Endocrinol Metab. 1980;9:383-04

Watanabe N, Yokoyama K, Kinuya S, et al. Evaluation of radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using the micronucleus assay. J Nucl Med. 39:436-40, 1998

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem 1998;273:5858-68

Rogakou EP, Boon C, Redon C, et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. J Cell Biol 1999;146:905-15

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1件)

渡邊直人、**甲状腺癌のヨード治療におけるリンパ球の放射線障害について**。金沢医科大学雑誌、査読あり、40巻、2015、182-185

[学会発表](計4件)

渡邊直人、Radiation-induced damage in lymphocytes after radioisotope therapy for bone metastases.第74回日本医学放射線学会総会、2015年4月16日~4月19日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

道合万里子、除痛目的のアイソトープ治療におけるリンパ球放射線組織障害に関する検討(第二報)、第54回日本核医学総会、2014年11月06日~11月08日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)

道合万里子、除痛目的のアイソトープ治療におけるリンパ球放射線組織障害に関する検討、第53回日本核医学総会、2013年11月08日~11月10日、福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

道合万里子、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(第二報)、第52回日本核医学総会、2012年10月11日~10月13日、ロイトン札幌(北海道、札幌)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊直人(WATANABE, Naoto)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40210926

(2)研究分担者

岩淵邦芳(IWABUCHI, Kuniyoshi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：10232696

道合万里子(DOAI, Mariko)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：40515673