

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461884

研究課題名(和文)ホウ素中性子捕捉反応で放出される粒子線の生物効果(DNA損傷・修復)の解析

研究課題名(英文)Biological Effects (DNA damage and repair) of Particle Radiation emitted by Bron Neutron Capture Reaction

研究代表者

高橋 千太郎 (TAKAHASHI, SENTARO)

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号：60163268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の治療効果向上に資するため、分割照射、腫瘍細胞の遺伝的背景、化学療法剤(テモゾロミド)との併用、中性子線のエネルギースペクトルの4点が、細胞生存率やDNA二重鎖切断の誘発に及ぼす影響について、培養細胞(ヒトグリオーマ細胞及びチャイニーズハムスター卵巣細胞)を用いて検討した。その結果、分割照射や腫瘍細胞のp53突然変異で細胞生存率は変動するが、中性子線ではガンマ線ほど顕著でなかった。また、化学療法剤により細胞の生存率は相乗的に低下すること、中性子線のエネルギースペクトルの違いは細胞生存率に大きく影響しないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：The effects of 1) fractionated irradiation, 2) genetic background of tumor cells, 3) co-existence of anti-cancer drug (Temozolomide), 4) energy spectrum of neutron beam, on the cell survival and the induction of DNA double strand breaks were investigated in vitro culture systems using human glioblastoma cell lines and Chinese hamster ovary cell line (CHO).

The fractionation of irradiation and mutation of p53 of glioblastoma cells modified the cell survivals and the induction of DNA-dsb. The extent of the effects was more remarkable in gamma-ray irradiation than neutron irradiation. The co-existence of Temozolomide during the irradiation period decreased the cell survival synergistically in the neutron irradiation. The neutron energy spectrum did not affect so much the cell survivals and DNA-dsb induction.

研究分野：放射線管理学、放射線生物学、環境毒性学

キーワード：BNCT ホウ素中性子捕捉療法 分割照射 p53 テモゾロミド エネルギースペクトル 細胞生存率 DNA二重鎖切断

## 1. 研究開始当初の背景

放射線によるがん治療は、欧米では治療の第一選択肢であり、本邦でもその利用は急速に増大している。特に、従来の X 線を用いた治療は高精度定位放射線治療の開発により良好な成績をあげ、陽子線や重粒子線といった荷電粒子線を用いた治療は、その生物効果の高さと線量集中性の良好なことから注目を得ている。しかしながら、グリオーマなどの一部の悪性腫瘍は、放射線や抗がん剤に抵抗性である上に、正常組織との境界が不明確なため、外科手術はもとより、放射線治療や化学療法も十分な効果が期待できず、新たな治療法の開発が強く求められている。

ホウ素中性子捕捉反応を用いたがん治療 (BNCT) は、がん細胞への集積性が高いホウ素化合物をあらかじめ投与しておき、その後中性子線を照射することにより  $^{10}\text{B} (n, \gamma) ^7\text{Li}$  反応を誘起してがん細胞を死傷する治療法である。放出されるアルファ (  $\alpha$  ) 線並びにリチウム (Li) 線は荷電粒子線であり生物効果が高いこと、また、その飛程が 5~7 ミクロンと短いことから、がん細胞にのみ特異的に損傷を与え、近傍の正常組織には影響しないすぐれた治療法とされている。

当研究所では、1994 年に世界で初めて BPA-BNCT を悪性脳腫瘍に実施して以降、2001 年から再発頭頸部癌、2004 年からは多発肝臓癌や悪性中皮腫へ応用するなど、何れも世界で最初の先導的研究を実施し、臨床試験治療の件数は 500 例以上である。また、BNCT 専用の加速器を用いた治療が当実験所で開始され、国立がんセンター、筑波大学病院、南東北病院などで設置が進み、一部に施設建設が始まるなど、臨床応用が急速に進んでいる。

しかしながら、BNCT の基礎となる生物学的な研究は十分に実施されてきているとは言えず、特に、治療効果の基礎となる DNA の損傷と修復については、十分な知見が集積されていない。ホウ素中性子捕捉反応 (以下、BNC 反応と略す。) に伴う  $\alpha$  線並びに Li 線の生物効果については、染色体異常、細胞死と亜致死性損傷、小核形成、突然変異などのクラシックな指標 (実験系) を用いた先行研究 (2-3) はあるが、近年、解析方法が進んできた DNA 損傷の誘発、特に細胞致死に重要な役割を有していると考えられている DNA 二重鎖切断 (以下、DNA-dsb と略す。) の誘発と修復を指標とした研究は、ほとんど行われていない。また、現在は単回の照射のみ実施されているが、現状は、その反復照射の効果や化学療法剤との併用による治療効果 (殺腫瘍効果) や有害反応 (正常組織反応) についての基礎的な知見が不足している。今後、BNCT を適切かつ効果的に利用していくためには、そのような多様な治療プロトコルを実施するうえで必要な生物学的知見が求められている。

## 2. 研究の目的

現在行われている BNCT 臨床試験からみて、今後より治療効果を高めるとともに多様な病態に対応した実用化を進めるには、依然、様々な問題を解決する必要がある。生物学的な基礎研究で求められている問題としては、

BNCT において分割照射は可能か、腫瘍細胞の殺傷効果や正常組織の有害事象は分割や線量率によって変化するのか、脳腫瘍においては腫瘍の遺伝的な背景 (例えば p53 の変異) が放射線感受性にどの程度影響するのか、化学療法剤との併用は BNCT による腫瘍細胞殺傷効果にどのような影響を与えるか、使用する中性子線のエネルギースペクトラムが異なると治療効果や正常細胞の有害事象はどのように異なるか、などを挙げることができる。

特に、原子炉中性子源から加速器中性子源に移行していくことは明白であり、加速器中性子源では中性子の照射線量率や中性子のエネルギースペクトラムを変化させることが容易になり、患者の負担低減や正常組織の有害事象低減のために、分割照射が考慮されるようになってきた。生物学的に見て、ホウ素中性子捕捉により放出される粒子線照射において、分割照射や線量率の変化が腫瘍細胞の殺傷効果にどのような影響を与えるか生物学的な基礎データが求められている。

また、現在進んでいる神経膠種を対象とした知見プロトコルでは、BNCT 照射の前後にテモゾロミドによる化学療法がおこなわれている。しかしながら、BNCT と化学療法との併用が生物学的にどのような効果を有するかについては、十分な知見がない。効果は相加的か相乗的か、腫瘍細胞と正常細胞間で、どのように反応が異なるのかなど、生物学的な基礎データが求められている。

以上のことから、本研究では、腫瘍細胞並びに正常細胞に対する中性子やホウ素中性子捕捉反応に伴う粒子線の生物効果を、特に、分割照射、線量率、中性子エネルギースペクトル、テモゾロミドのような抗がん剤との併用の観点から実験的に明らかにすることを目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

研究は培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で実施した。培養細胞としては一般的に正常細胞を模擬できるとされ毒性試験等に広く利用されているチャイニーズハムスタ卵巣由来細胞 (CHO 細胞) およびヒト神経膠腫を模擬した培養グリオーマ細胞 (A172 細胞および T98 細胞) を用い、BNCT 医療照射用の原子炉重水照射装置を用いて臨床治療と同等の熱外中性子を照射した。また、中性子線のエネルギースペクトルに影響を調べるため、量子研究機構放射線医学総合研究所の生物実験用中性子線源 (NASBEE) を用いて中・

高速中性子線の照射を行った。

照射後のアッセイは、コロニー形成法による生存率、小核形成率などの従来の生物効果に係わるアッセイ方法に加え、gamma-H2AX や 53BP1 などの修復酵素のフォーカスアッセイなど、最近利用可能になった手法を活用して、DNA-dsb 誘発とその修復の解析を行った。研究初年度は、実験手法の確立と習熟、特に原子炉中性子線の照射における線量評価や残放射線量の測定などの技術的な検討を行った。研究第2年度は、原子炉中性子を用いて線量率の影響や、実際の治療を想定した分割照射（単一照射、24時間間隔の2～5回照射）について実験を行った。また、原子炉の中性子ビームとはエネルギースペクトルの異なる放医研のNASBEEを用いて照射実験を行い、このようなエネルギー分布の違いによって正常細胞が受ける致死効果がどの程度異なるのかを明らかにした。

研究第2年度末から第3年度は、東京電力福島第一原子力発電所の事故をうけての規制強化に伴い、研究用原子炉KURは新規性基準への適合検査等のため運転されなかった。このため、研究実施期間を1年延長するような計画に変更し、この間は、ガンマ線を用いてCHO細胞や培養グリオーマ細胞の放射線感受性に及ぼす分割照射や化学療法剤テモゾロミドとの併用による影響を明らかにした。

#### 4. 研究成果

本研究の目的として設定した基礎的な知見を必要とする事項からに関して、いくつかの新しい知見を得ることができた。上記「研究の目的」に記したようにKURの中性子線が利用できなくなる期間があったが、その時には対照群としてガンマ線照射実験を行うなどの工夫により影響を最小限とした。各からの目的に対して得られて具体的な結果は以下の通りである。

分割照射の影響：はガンマ線では回復が認められるがBNCTに使用する中性子線では分割照射による回復現象は顕著ではなかった。BNCT反応に伴う粒子線でも回復現象は顕著ではなかった。このことはBNCTによる腫瘍の治療にあたっては分割照射を利用して単回照射と同程度の効果が期待できるが、正常組織側の有害事象からみれば、分割照射によって有害事象が低減されるということは少ないことを意味している。これらの研究は口頭発表するとともに、AntiCancer誌に原著論文として報告した。

遺伝的背景：他の種類の放射線でも多く研究されているように、p53の変異は中性子線へのグリオーマの感受性を修飾していることが明らかにされた。しかしながら、ガンマ線ほどにはp53の変異が影響を及ぼさないように見られ、BNCTが比較的p53の変異に関わらず有効であることが推察される結果が得られている。この知見は国際会議で発表さ

れるとともにAntiCancer誌に掲載されている。

化学療法剤との併用：して脳腫瘍の治療に広く使用されているテモゾロミドと中性子線およびガンマ線の複合効果について実験を行った。正常組織での有害事象の発生に着目し、CHO細胞の生存率を中心に実験してところ、ガンマ線では相加的な効果しか認められなかったのに対し、中性子線では相乗的な効果が観察されている。本結果は若手のBNCT研究者の国際的なミーティングである9T-YBNCTにおいて発表されている。

エネルギースペクトルの影響：原子炉BNCTに代えて加速器BNCTの実用化が進み、使用する中性子線のエネルギースペクトルの違いがどの程度、細胞の致死効果等に影響するかは重要な問題である。CHO細胞を用い京大原子炉KURの熱中性子と放医研NSBEEの中・高速中性子の細胞致死効果の違いを調べた。結果としては、いずれの中性子線でも細胞致死効果は大きくは異なっていないことが分かった。この結果はRadioisotope誌に原著論文として掲載されている。

以上の実験結果を実際のBNCTの治療という観点から考察すれば、照射を分割しても腫瘍の殺傷効果には大きな影響は無いが、一方、正常組織の分割照射による回復も期待できないことに留意すべきである。p53の変異は他の放射線治療で見られているような影響を生じるが、中性子線がガンマ線に比してその程度は小さいようである。テモゾロミドが照射中に共存しても、少なくとも中性子線の効果を減じることはなく、むしろ相乗的な効果も期待できることから、BNCTの施行中に同剤が共存しても問題は無いということが示唆された。KURの熱中性子とNASBEEの中・高速中性子で細胞の殺傷効果に大きな差は認められなかった。KUR熱中性子線にはガンマ線や高速中性子の混入があり、結果を不明確にしているのかもしれない。

KURが原子炉等規正法に基づく新規基準への適合性確認のため研究の途中で停止したことは非常に研究の実施に阻害要因となったが、利用できない期間にガンマ線照射を用いた対照群の実験を進めるなどして影響を最小限に押さえ、概ね当初の目的を達成できたと考えている。

#### 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3件)

K.Seki, Y.Kinashi, S.Takahashi,  
Influence of p53 Status on the Effects of the Born Capture Therapy in Glioblastoma, Anticancer Research, 査読有、35、2015、169-174

E.Kitajima, S.Takahashi, Y.kinashi,  
Y.Kubota, R.Okayasu, H.Tanaka, M.Takada,

K.Ono, A Comparative Study of the Biological Effects of Neutron Beams with Different Energy Profiles, Radiiodotopes, 査読有、64、2015、291-297

DOI:<https://doi.org/10.3769/radioidsotopes.64.291>

Y.Kinashi, N.Yokomizo, S.Takahashi, DNA Double-strand Breaks Induced by Fractionated Neutron Beam Irradiation for Boron Neutron Capture Therapy, Anticancer Research, 査読有、37、2017、1681 - 1685

Cinii-URL:10.21873/anticanres.11499

〔学会発表〕(計9件)

横溝夏也、ホウ素中性子捕捉療法に用いる中性子線の分割照射が細胞の生存率とDNA二重鎖切断誘発に及ぼす影響、第57回日本放射線影響学会、2014

Y.Kinashi, Influence of the p53 status on the biological effects of glioblastoma cells following boron neutron capture therapy, 2014

T. Ikawa. Influence of p53 and MGMT status on the effect of BNCT, International Congress of Radiation Research, 2015.

Y. Kinashi, Evaluation of relative biological effectiveness in SCID mice following thermal neutron irradiation of boron neutron capture therapy, International Congress of Radiation Research, 2015.

木梨 友子、53BPIを指標とした中性子のDNA二重鎖切断損傷・修復の特徴、第59回日本放射線影響学会、2016

Y. Kinashi, The DNA double-strand breaks CHO cells Induced by the fractionated neutron irradiation, 17<sup>th</sup> International Congress of Neutron Capture Therapy, 2016

R. Akayama, Y. Kinashi, S. Takahashi: Cell Survival and DNA-double-strand-breaks in Glioblastoma Cell Lines with Different p53 Status after Neutron Irradiation and Exposure to DNA-alkylating Agent, 9<sup>th</sup> Young Reserchers BNCT Meeting, 2017

木梨 友子、高橋千太郎:ホウ素中性子捕捉療法における抹消血リンパ球解析による生物学的被ばく線量測定、第16回日本中性子療法学会、2017

木梨 友子、遺伝子の発現が異なる神経膠芽腫細胞における中性子照射感受性およびDNアルキル化剤感受性、第60回日本放射線影響学会、2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 千太郎 (TAKAHASHI Sentaro)

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号: 60163268

(2)研究分担者

木梨 友子 (KINASHI Yuko)

京都大学・原子炉実験所・准教授

研究者番号: 80252534