

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19838

研究課題名(和文)化学療法併用陽子線照射の生物学的増感効果の解明

研究課題名(英文)Evaluation of cellular response to proton radiation with chemotherapeutic agent in esophageal cancer cell lines

研究代表者

北條 秀博(Hojo, Hidehiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：60638774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：陽子線照射において、拡大ブラックピーク(SOBP)の位置による増感効果に違いがあるかを検討した。ヒト食道扁平上皮癌細胞株(OE-21)を用い、4つの深さに細胞を置き、陽子線照射を行い検討した。X線と比較した陽子線の生物学的効果比(RBE)は、SOBP遠位になるにしたがって上昇する傾向が見られたが、SOBPの位置による5-FUの増感効果に、違いは認められなかった。SOBP遠位ではDNA損傷修復が遅延する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the differences in the responses of cells treated with 5-FU to proton beam irradiation according to the position of the cells on the SOBP. OE21 human esophageal squamous cells were irradiated with a 235-MeV proton beam at 4 different positions on the SOBP. The degree of enhancement of the cellular sensitivity to proton beam irradiation by 5-FU was similar across all the positions on the SOBP. Furthermore, a marked increase in the number of residual H2AX foci at 24 h post irradiation was observed in the cells at the distal end of the SOBP. Our data indicated that the degree of enhancement by 5-FU of the sensitivity of the OE21 cells to proton beam irradiation did not differ significantly depending on the position on the SOBP; however, the 5-FU-induced cytotoxicity tended to be more marked at the distal end than at other positions on the SOBP.

研究分野：陽子線治療

キーワード：陽子線治療 生物学的効果比 増感剤効果比 拡大ブラックピーク

### 1. 研究開始当初の背景

近年、陽子線治療を含む粒子線治療の広がりは世界的に顕著で、施設の増加とともに治療症例も急速に増加している。その中で陽子線治療はその汎用性から適応範囲の拡大も試みられ、局所限局性の早期肺癌や前立腺癌などから、局所進行肺癌や食道癌などでもその有効性が報告されつつある。陽子線は物質中でビームが停止する直前に高いエネルギーを付与し、急激にエネルギーが低下する Bragg Peak という特性を有しており、Bragg Peak の幅や位置を調整することで腫瘍の深さや形態に合わせて線量を集中することができる(図1)。この物理学的な特性を生かし、有害事象を低減したまま線量増加することができ、X線で根治照射できない腫瘍に対しても治療成績の向上や抗腫瘍効果の向上が期待されている。陽子線治療の生物学的効果比(RBE)はX線と比較して1.1~1.2倍であることが示されたことから(Pagenetti et al. IJROBP 2002; 53(2): 407-421)、陽子線治療ではX線による放射線治療のこれまでの基礎ならびに臨床データなどが外挿しやすいと認識され、その線量分割や総線量などもX線による治療データに基づくものも少なくない。しかし、放射線生物学的には陽子線治療は、その性質や細胞応答にもX線と比較して相違点があるとの報告も散見される。陽子線はX線と比較してDNAの二重鎖切断が多く、アポトーシス、活性酸素がより多く出現し、X線よりも早期に出現すると報告された。(Gerelchuluun et al. Int. J. Biol 2011; 87(1): 57-70)。更には、mRNAの発現もX線と陽子線では異なることが報告されている(Finnberg et al. Cancer Biol Ther 2008; 7(12): 2023-2033)。また、最近の研究で拡大Bragg Peak (以下略記: SOBP) 後方(図1-四角網掛け部分)の生物学的効果が高い可能性があることが示された(Pankaj et al. IJROBP2014; 90(1): 27-35)。上記のRBEなどの報告により、これまでは化学療法併用効果もX線とほぼ同等との仮説に基づき、化学療法併用陽子線治療が頭頸部癌、肺癌、食道癌などを対象に実臨床や臨床試験で行われてきている。しかし、上記のような陽子線に関する生物研究の結果は、陽子線治療と化学療法との相互作用がX線とは必ずしも同じではない可能性を示唆している。このような背景から、陽子線治療と化学療法の至適な併用法を確立する意味でも、陽子線と化学療法薬剤との相互作用やその増感効果ならびにその機序などの基礎的な検証は必須である。また、化学療法併用により増感効果が認められた場合、SOBP内での生物学的効果の差異が大きくなり、治療計画と実際の効果が大きく異なる可能性も考えられる。これにより、予期せぬ有害事象の出現が懸念されるため、この観点での基礎的な裏付けも重要である。

### 2. 研究の目的

化学療法薬剤による陽子線照射の増感効果(放射線感受性の増強効果)について、1)陽子線照射における殺細胞効果の機序(アポトーシス誘導、DNA損傷修復過程、細胞周期調整など)、2)薬剤による増感効果、3)照射野内の位置による増感効果の差異を放射線生物学的な手法を用いて、in vitroで解析し、明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 感受性の異なる食道癌細胞(OE21, KYSE450)を用いてコロニー法でRBE(relative biological effectiveness)を測定: 照射野内の4か所の位置に細胞を置いて照射し(図1)、陽子線の生物学的効果を検討した。RBE = (X線である効果を得るのに要する吸収線量) / (陽子線で同一効果を得るのに要する吸収線量)である。

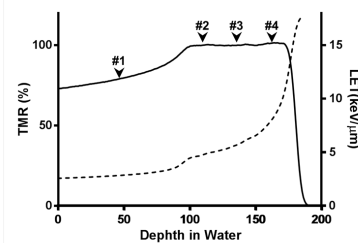


図1

(2) 5-FU 同時併用 X線、陽子線照射の増感作用の比較説明: OE21 食道癌細胞の培養液中に薬剤を添加し X線、陽子線照射を行った。照射後の生存率を X線、陽子線単独照射の場合と薬剤添加した場合を比較した。更に、照射野内の4か所に細胞を置いて照射し、それぞれの位置での増感効果を増感効果比(SER)で検討した。また、DNA二重鎖切断を、H2AXを用いて検出した。

(3) 薬剤付加し拡大ブラッグピークの位置を変えた際のRBEの測定: 5-FUを2-3時間前に培地に付加し、(1)と同様の位置での生存率を求め、増感効果が認められるかどうか、さらにどの程度の増感効果が存在するかを解析した。

### 4. 研究成果

(1) RBEはSOBP内で、遠位に行くに従って増加傾向であった。

		RBE(0.1)	RBE(0.37)
OE21	Proton(#1)	1.06 ± 0.04	1.16 ± 0.03
	Proton(#2)	1.17 ± 0.02	1.33 ± 0.04
	Proton(#3)	1.22 ± 0.03	1.31 ± 0.03
	Proton(#4)	1.24 ± 0.03	1.40 ± 0.06
KYSE450	Proton(#1)	1.03 ± 0.02	1.02 ± 0.04
	Proton(#2)	1.06 ± 0.02	1.09 ± 0.04
	Proton(#3)	1.20 ± 0.03	1.21 ± 0.04
	Proton(#4)	1.24 ± 0.02	1.27 ± 0.05

(2) DNA 損傷修復

OE21, KYSE450 のいずれの細胞も照射後 30 分で focus 数が増加したが、24 時間では SOBP 遠位になるにしたがって増加する傾向だった。また、陽子線照射 24 時間後の H2AX foci 数と線エネルギー付与 (LET) に相関する傾向が見られた (図 3)。

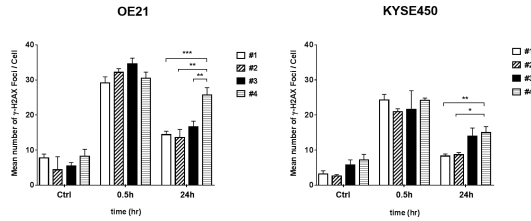


図 2 陽子線照射後の H2AX foci 数

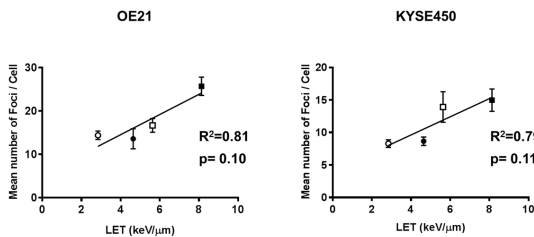


図 3 陽子線照射 24 時間の H2AX foci 数と LET の関係

(3) 5-FU の溶媒として dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いたため、DMSO 含有培地で照射した群をコントロールとし、5-FU 含有培地で照射した群と比較した。SER は SOBP の位置による変化を認めなかった。

		SER10	SER37
OE21	6MV X-ray	1.13 ± 0.02	1.14 ± 0.03
	Proton(#1)	1.26 ± 0.02	1.23 ± 0.03
	Proton(#2)	1.20 ± 0.03	1.27 ± 0.02
	Proton(#3)	1.19 ± 0.02	1.21 ± 0.03
	Proton(#4)	1.20 ± 0.01	1.23 ± 0.06

(4) 5-FU を併用した際の DNA 損傷修復

DMSO、5-FU いずれも照射後 30 分で focus 数が増加したが、24 時間でも focus は多く残存しており、SOBP 遠位になるにしたがって増加する傾向だった。増感割合が変わらないにもかかわらず、5-FU 併用でも同様な傾向が見られた (図 4)。

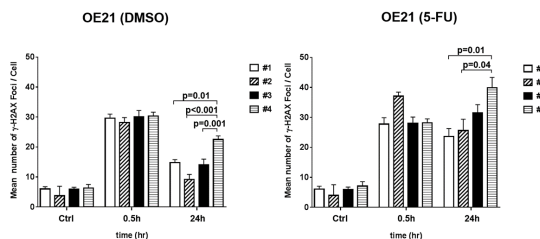


図 4 5-FU 併用陽子線照射の H2AX foci 数

(5) 生物学的線量を  $RBE \times SER \times TMR$  (組織最大線量比) と定義して検討すると、SOBP 遠位で増加する傾向が見られた。(図 5)

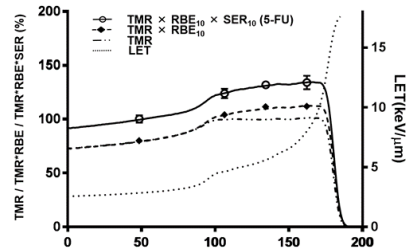


図 5 生物学的線量

(6) 感受性の異なる食道癌細胞に対する陽子線照射は、SOBP が遠位になるに従って RBE は増加する傾向にあり、DNA 修復は遅延する傾向が見られた。これらの現象は線エネルギー付与 (LET) が関与している可能性が示唆された。また、OE21 細胞において、SOBP 内での 5-FU の増感効果に差はなかったが、5-FU 含有培地下でも DNA 損傷修復が SOBP 遠位で遅延しており生物学的線量は増加した。

現在、陽子線治療は SOBP が均一であることを前提に治療計画を行っているが、生物学的は均一でない可能性が考えられた。また、5-FU を併用した場合でも同様な傾向が認められ、実際の効果と治療計画で差異がある可能性も示唆された。

しかし、細胞の種類や薬剤によっても感受性が異なる可能性があり、本研究は食道癌細胞株のみの検討であり、薬剤も 5-FU のみであることから、さらなる検討が必要となる。また、in vitro の研究であり、臨床に応用するには in vivo の検討が必須と考える。

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 1 件)

Hojo Hidehiro, Dohmae Takeshi, Hotta Kenji, Kohno Ryosuke, Motegi Atsushi, Yagishita Atsushi, Makinoshima Hideki, Tsuchihara Katsuya, Akimoto Tetsuo Radiation Oncology, 12 巻, 2017, 111 DOI:10.1186/s13014-017-0849-1

〔学会発表〕(計 4 件)

The 23rd Annual Meeting of International Association for the Sensitization of Cancer Treatment, 2017  
Particle Therapy Co-Operative Group 56 Conference, 2017  
ASTRO 58th Annual Meeting, 2016  
The 28th Annual Meeting of the Japanese Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2015

〔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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北條 秀博 (HOJO, Hidehiro)

研究者番号：60638774

##### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

道前 武 (DOHMAE, Takeshi)  
堀田 健二 (HOTTA, Kenji)  
影山 俊一郎 (KAGEYAMA, Shunichiro)  
馬場 大海 (BABA, Hiromi)  
河野 良介 (KOHNO, Ryosuke)  
茂木 厚 (MOTEGI, Atsushi)  
柳下 厚 (YAGISHITA, Atsushi)  
牧野嶋 秀樹 (MAKINOSHIMA, Hideki)  
土原 一哉 (TSUCHIHARA, Katsuya)  
秋元 哲夫 (AKIMOTO, Tetsuo)