

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10400

研究課題名(和文) 最新陽子線治療技術下の超寡分割照射と長時間間歇照射と適応応答の影響と臨床応用

研究課題名(英文) The influence of superhypo-fractionated irradiation with long interfraction intervals and adaptive responses and clinical application in the latest proton beam technology

研究代表者

杉江 愛生 (Sugie, Chikao)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：80509258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：最新技術を用いた陽子線照射後の亜致死損傷の回復(SLDR)は時間・分単位ともにX線に比し抑制されていた。陽子線の潜在致死損傷の回復(PLDR)はX線と差がなかった。陽子線ではX線に比し間接作用より直接作用の影響が増強されていた。低線量率長時間放射線被曝により、in vivoでは放射線ホルミシスによる生体成長促進効果と腫瘍生着遅延効果が示された。in vitroでは適応応答と考えられる大線量照射後の細胞生存率の上昇が認められ、DNA二本鎖切断(DNA DSB)の修復効果の増強によると考えられた。X線・陽子線ともに、Hsp90阻害薬による増感効果を認め、DNA DSBの修復阻害効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陽子線照射後のSLDRはX線に比し抑制されていること、陽子線の直接作用の割合がX線より高いことを明らかにすることで、陽子線治療が放射線生物学的効果に優れるということを立証した。低線量率長時間放射線被曝の生体内および細胞レベルでの影響を明らかにし、その放射線生物学的機序につき一定の知見を得た。また、Hsp90阻害薬による陽子線照射の増感効果とその機序につき明らかにしつつある。以上の研究成果は、最新技術を用いた陽子線治療の最適な治療指針の確立とその効果の増強という目的に向けて有意義なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Compared with that seen after X-ray irradiation, Sublethal damage recovery (SLDR) might take place to a lesser extent after proton beam irradiation. The extent of potentially lethal damage recovery (PLDR) does not differ between these two conditions. The contribution of the direct effect in proton beam irradiation seemed to be greater than that in X-rays. In vivo, hormetic effects by continuous low-dose irradiation were demonstrated using low-dose-radiation-emitting sheets. These effects included promotion of growth and an increase in the time to tumor development. In vitro, the adaptive response by continuous low-dose radiation was demonstrated. One reason for the adaptive response may be efficient DNA double-strand break (DSB) repair. Anti-tumor effects of a Hsp90 inhibitor was observed in combination with both X-ray irradiation and proton beam irradiation. The mechanism behind this effect is likely to relate to the observed downregulation of DNA DSB repair.

研究分野：放射線医学分野

キーワード：亜致死損傷の回復(SLDR) 潜在致死損傷の回復(PLDR) 直接作用 低線量率長時間放射線被曝 Hsp90阻害薬 DNA二本鎖切断(DNA DSB) 適応応答 放射線ホルミシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レンジモジュレーションホイールを用いた二重散乱体方式、およびスポットスキニング法を用いた最新式の陽子線治療は、臨床での有用性が実証されつつあり、将来の発展が期待されている。

新技術の発展により短時間間歇照射や一回大線量寡分割照射が積極的に臨床応用されているが、それらに関連する放射線生物学的検討ははまだ不十分であり、最適な治療の確立に向けて研究の進行が必要である。

また、相対的に高線量率の低線量放射線被曝の生物学的影響の評価は放射線ホルミシス仮説・適応応答についての報告が多くなされているが、低線量率長時間持続被曝の生物学的影響については評価が不十分と考えられている。

加えて、さらなる陽子線治療の効果の増強を目的に、Heat shock protein 90 (Hsp90)阻害薬による陽子線増感効果と DNA 二本鎖切断修復阻害効果の検討も計画した。

2. 研究の目的

陽子線治療の『亜致死損傷の回復 (Sub-Lethal Damage Repair (SLDR))』・『潜在致死損傷の回復 (Potentially Lethal Damage Repair (PLDR))』の短時間間歇照射に対する影響について評価し、放射線生物学的根拠にもとづいた陽子線治療指針についての考案につなげる。

超低線量率および低線量率の長時間放射線照射下における生物学的影響を評価する。

Hsp90 阻害薬による陽子線増感効果と DNA 二本鎖切断 (DNA DSB) 修復阻害効果を評価し、さらなる陽子線治療効果の増強を目的とした陽子線増感剤としての臨床応用につなげる。

3. 研究の方法

(1) 亜致死損傷の回復 (SLDR)・潜在致死損傷の回復 (PLDR) の評価、および直接作用の評価の実験には、2 種類の培養細胞系 (EMT6 マウス乳腺肉腫細胞、HSG ヒト唾液腺細胞 (HeLa 汚染株)) を用いた。

X 線については実験用 X 線照射装置、陽子線については前述の最新式の陽子線治療装置を使用した。

1 回大線量照射群と、時間単位の照射間隔を設けた 2 分割照射群、分単位の照射間隔を設けた 5 分割照射群につき、それぞれコロニーアッセイ法を用いて X 線と陽子線の結果につき比較検討し、亜致死損傷の回復 (SLDR) を評価した。

各細胞系の Exponential Growth Phase (EGP) と Plateau Phase (PP) の状態に対し、それぞれ X 線と陽子線を照射後に各種時間をおいて播き直し、一定期間培養後コロニーアッセイを施行し、X 線と陽子線の細胞生存率につき比較検討し、潜在致死損傷の回復 (PLDR) を評価した。OH ラジカルのスカベンジャーである Dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加し間接作用を抑制した状態で照射を行い X 線と陽子線の直接作用を比較検討した。

(2) 超低線量率および低線量率の長時間放射線照射下における生物学的影響の評価には、in vivo では蚕の幼虫と Balb/c マウス、in vitro では HSG ヒト唾液腺細胞 (HeLa 汚染株) を用いた。

In vivo では、超低線量率および低線量率放射線放出シート上にて蚕を孵化・成長させ経時的に体重測定を施行した。また同様のシート上にて孵化後に各種の線量の X 線照射を施行後、同様に幼虫の成長過程の体重測定を経時的に施行した。

また、超低線量率および低線量率放射線放出シート上にて Balb/c マウスを成育させ経時的に体重測定を施行した。また一定期間シート上で成育させた Balb/c マウスに EMT6 細胞を移植し生着率を評価した。

In vitro では、超低線量率および低線量率放射線放出シート上にて HSG 細胞を培養し、一定期間ごとの細胞の増殖率・生着率および X 線照射に対する生存率を評価した。またシート上にて一定期間培養した HSG 細胞を DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)にて免疫染色し、anti-phospho histone H2AX を用いてリン酸化ヒストン H2AX (γ-H2AX) を同定・定量し、DNA DSB を評価した。

(3) Hsp90 阻害薬 DS-2248 の X 線と陽子線の増感効果と DNA 二本鎖切断 (DNA DSB) 修復阻害効果についての評価を、in vitro にてマウス黒色腫細胞 B16-F0 を用いて検討した。

X 線について実験用 X 線照射装置、陽子線については前述の最新式の陽子線治療装置を使用した。

播種した B16-F0 に対し DS-2248 を添加したのち一定線量の X 線・陽子線を照射し、コロニーアッセイ法を用いて増感効果を評価した。また上述の γ-H2AX 免疫染色を用いて DNA DSB の修復阻害効果を評価した。

4. 研究成果

(1) SLDR については、EMT6・HSG 両細胞ともに、時間単位・分単位の照射間隔のいずれにおいても、X 線に比して陽子線では抑制される傾向がみられた ($p < 0.001$ 、図 1)。

PLDR については、X 線・陽子線間にて有意差はみられなかった。

直接作用については、DMSO による防護効果が陽子線に比し X 線で強く認められ(p < 0.001、図 2)、X 線に比し陽子線で、間接作用に比し直接作用の影響がより強いと考えられた。

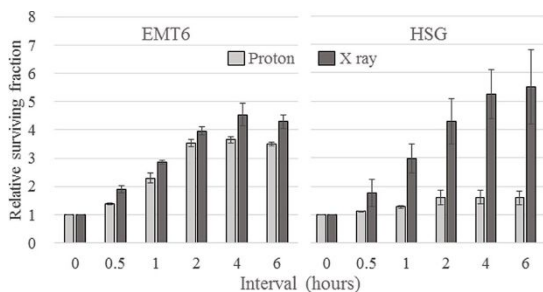


図 1 相対生存率による亜致死損傷の回復 (SLDR) の評価 (上図: 時間単位 2 分割照射実験、下図: 分単位 5 分割照射実験)

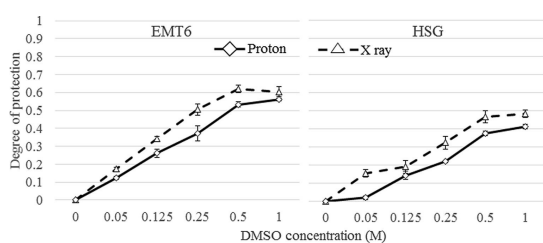
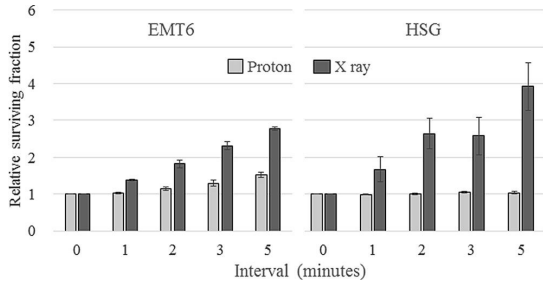


図 2 DMSO による防護効果 (実線: 陽子線、点線: X 線)

(2) In vivo では、低線量率放射線放出シート上で育成した蚕は control 群に比しより体重増加がみられた(p < 0.001、図 3)。各種 X 線照射後の蚕の育成には促進効果はみられなかった。放射線放出シート上における Balb/c マウスの育成実験では体重増加速度に有意差を認めなかった。Balb/c マウスへの EMT6 細胞の移植実験では、超低線量率シート上で育成した群のみ腫瘍生着の遅延が認められたが (p = 0.02)、低線量率シート群では有意差は認められなかった (図 4)。

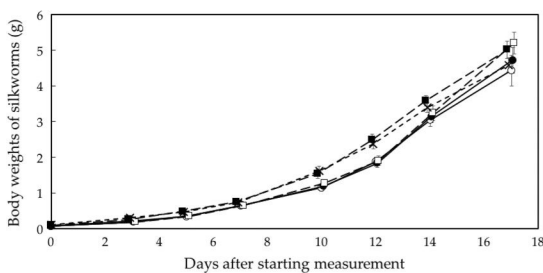


図 3 蚕の体重の経時的変化 (○: control 群、●: 超低線量率群、×: 低線量率群)

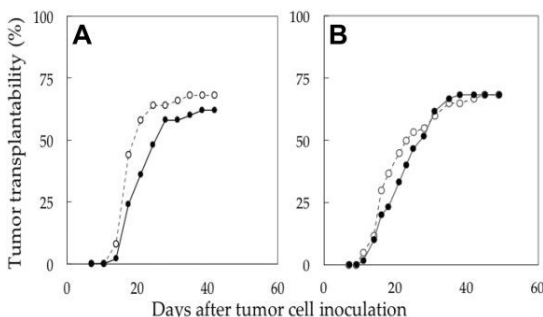


図 4 EMT6 細胞の生着率 (○: control 群、●: X 線照射群) (A は超低線量率群・B は低線量率群)

In vitro では、放射線放出シート上で培養した一定期間ごとの HSG 細胞の増殖率・生着率には有意な影響は認められなかった。一定期間超低線量率および低線量率放射線放出シート上で培養した細胞に対する X 線照射に対

する生存率は、大部分の群にて control 群に比し有意に高い傾向がみられた ($p < 0.01$ 、図 5、ただし 6 週間培養の低線量率シート群は有意差なし)

H2AX 免疫染色を用いた DNA DSB の修復阻害効果の評価においては、低線量率シート群にて照射後 1~6 時間で有意な H2AX foci/nucleus score の増加傾向を認めたが、24 時間後には逆に低下傾向がみられ ($p < 0.05$ 、図 6) DNA DSB の修復効果の相対的な増強が示唆された。この要因としては、照射後 2 時間前後で起こるとされる非相同末端結合 (NHEJ) よりも、照射後 12 時間前後を要するとされる相同組換え修復 (HR) の影響がより強いと推測された。以上から、超低線量率~低線量率放射線長時間照射によって、in vivo では放射線ホルミシスによる生体成長促進効果と腫瘍生着遅延効果が示唆され、in vitro では適応応答現象が認められた。

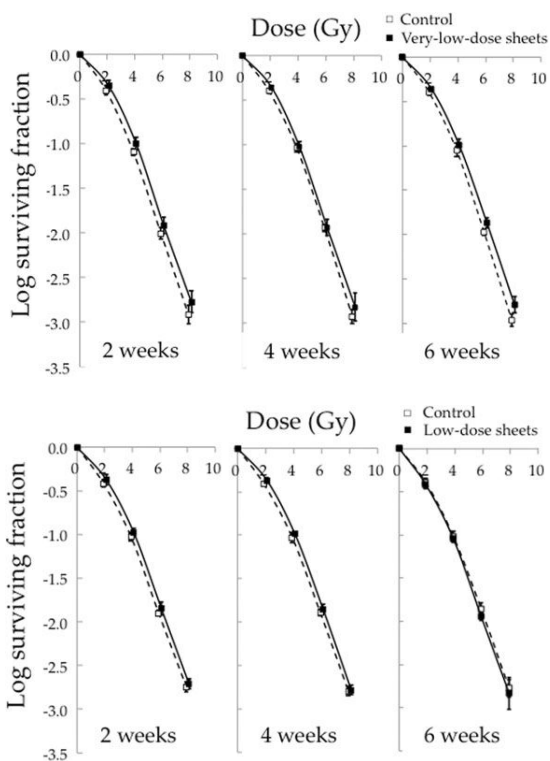


図 5 各期間培養後の X 線照射後の生存率 (上図: 超低線量率、下図: 低線量率)

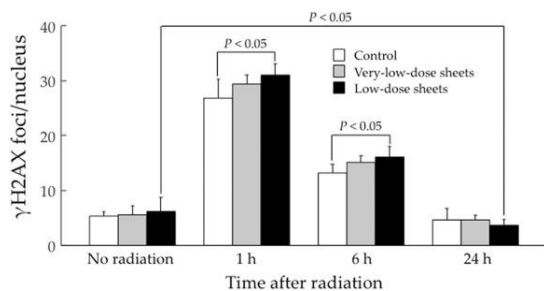


図 6 H2AX foci/nucleus の経時的变化

(3) X 線・陽子線ともに、DS-2248 による有意な増感効果が認められた。また X 線・陽子線ともに、照射後 6 時間にて DNA DSB の修復阻害効果が認められた。現在、線量・薬剤作用時間を変更した各種条件下での実験を重ねていく方向で研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakashima M, Sugie C, Wang Z, Kondo T1, Manabe Y, Murai T, Shibamoto Y.	4. 巻 16(4)
2. 論文標題 Biological Effects of Continuous Low-Dose-Rate Irradiation in Silkworms and Mice: Growth Promotion and Tumor Transplantability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dose Response	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1559325818811753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashimoto S, Sugie C, Iwata H, Ogino H, Omachi C, Yasui K, Mizoe JE, Shibamoto Y	4. 巻 194(4)
2. 論文標題 Recovery from sublethal damage and potentially lethal damage : Proton beam irradiation vs. X-ray irradiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Strahlenther Onkol.	6. 最初と最後の頁 343-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00066-017-1223-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Z, Sugie C, Nakashima M, Kondo T, Iwata H, Tsuchiya T, Shibamoto Y.	4. 巻 17(2)
2. 論文標題 Changes in the Proliferation Rate, Clonogenicity, and Radiosensitivity of Cultured Cells During and After Continuous Low-Dose-Rate Irradiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dose Response	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1559325819842733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masahiro Nakashima
2. 発表標題 Biological effects of continuous low-dose-rate irradiation in silkworms and mice: growth promotion and tumor transplantability.
3. 学会等名 International Society of Radiation Neurobiology-2019 (ISRN-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Zhen Wang
2 . 発表標題 Changes in the proliferation rate, clonogenicity, and radiosensitivity of cultured cells during and after continuous low-dose-rate irradiation.
3 . 学会等名 International Society of Radiation Neurobiology-2019 (ISRN-2019) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Chikao Sugie, Yuta Shibamoto, et al.
2 . 発表標題 Biological Effects of a Radiation Hormesis Sheet Emitting Very Low-Dose-Rate Rays
3 . 学会等名 American Society for Radiation Oncology (ASTRO) 2016 Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Shingo Hashimoto, Chikao Sugie, et al.
2 . 発表標題 Potentially Lethal Damage Repair and Sublethal Damage Repair After Proton Beam Irradiation: Comparison With X-ray Treatment
3 . 学会等名 American Society for Radiation Oncology (ASTRO) 2016 Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Wang Z, Sugie C, Nakashima M, et al.
2 . 発表標題 Biological Effects of Continuous Low-Dose-Rate Irradiation on Proliferation and Radiosensitivity of Cultured Cells In Vitro.
3 . 学会等名 the Chubu radiation oncology group-Rad51 society joint symposium (国際学会)
4 . 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岩田 宏満 (Iwata Hiromitsu) (40611588)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	
研究 分担者	荻野 浩幸 (Ogino Hiroyuki) (60315885)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・高度医療教育 研究センター教授 (23903)	