

令和元年6月14日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10408

研究課題名(和文) X線ならびに炭素線照射後における腫瘍再酸素化の機構解明に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on the mechanism of tumor reoxygenation after X-ray and carbon-ion irradiation

研究代表者

鵜澤 玲子 (Uzawa, Akiko)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・主任研究員(定常)

研究者番号：90250117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍再酸素化は放射線抵抗性低酸素細胞を克服するのに重要な現象であり、再酸素化現象をうまく利用することで、治療期間の短縮や腫瘍制御率の向上が期待できる。本研究では、担がんマウスに、様々な放射線を照射して、腫瘍の再酸素化の速度を調べた。重粒子線の中で高いLETをもつNeイオン線照射によって再酸素化が、照射30時間後に最も効果的に生じた。一方、X線では照射54時間後が最も効果的に再酸素化が生じた。このことから高LET放射線は腫瘍再酸素化を早期に引き起こすことが示唆された。早期再酸素化の機構を解明するために、血管密度や血管機能変化を調べたが、これらは早期再酸素化の直接的な要因ではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内の低酸素細胞は放射線に対し抵抗性を示すため、放射線がん治療において低酸素細胞への治療戦略は重要な課題である。マウス移植腫瘍に様々な放射線を照射し、腫瘍内の低酸素細胞を経時的に定量した結果、高いエネルギーを持つ重粒子線により再酸素化(低酸素状態だった細胞に酸素が届く状態になる)が早まることが示された。様々な放射線における腫瘍再酸素化現象を明らかにすることができ、再酸素化のタイミングをうまく利用することで、治療期間の短縮や腫瘍制御率の向上が期待され、腫瘍内低酸素を標的とした新しい放射線がん治療戦略の基礎知見を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：Tumor reoxygenation is an important phenomenon for overcoming radioresistant hypoxic cells. Further, if the reoxygenation can be well controlled, a shortening of treatment duration and an improvement of tumor control probability can be expected. In this study, tumor-bearing mice were irradiated with various radiations to investigate the rate of tumor reoxygenation. Reoxygenation occurred most effectively in 30 hours after Ne-ions at an LET of 80 keV/ μm . On the other hand, reoxygenation after X-irradiation occurred most effectively in 54 hours. It is suggested that high LET radiation causes early tumor reoxygenation. In order to elucidate the mechanism of early reoxygenation by high LET radiation, changes in vascular density and vascular function were investigated, but these changes were not a direct factors of early reoxygenation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：再酸素化 炭素線 X線 移植腫瘍

1. 研究開始当初の背景

放射線治療にとって腫瘍内に存在する低酸素細胞は治療抵抗性の一因となっており、解決しなければならない課題である。重粒子線は低酸素細胞に対し、有効な放射線の一つであることは我々の研究でも明らかになっている (Hirayama, Uzawa, et al., *Mutat. Res.* 2015)。また、重粒子線の一つである炭素線は腫瘍酸素化を加速し、X線やγ線などの光子放射線よりも早く再酸素化が誘導されることが報告され (Ando K et al., *Int. J. Radiat. Biol.* 1999; Oya N et al., *J. Radiat. Res.* 2001)、がん治療における炭素線の有効性は低酸素による放射線抵抗性克服において、酸素効果(酸素による放射線増感効果)と再酸素化(低酸素組織における酸素濃度上昇)の両面から支持されており、炭素線には光子放射線とは異なる生物効果が存在する。

酸素効果におけるX線並びに炭素線の作用機序は、DNA損傷生成およびその修復過程によって説明されてきたが、(Hirayama R, et al., *J. Radiat. Res.* 2005)、再酸素化の機構については、生体における放射線の物理・化学的作用だけでは十分に説明できず、むしろ腫瘍内における細胞・組織応答が腫瘍再酸素化に深く関わっていると推測できる。そこで、腫瘍内低酸素分画の割合と分布、腫瘍内血管周辺の細胞致死、細胞増殖、代謝活性および血管新生関連バイオマーカー発現の経時的変化などを観察することで、放射線による腫瘍内再酸素化の機構を放射線生物学および放射線腫瘍学の観点から解明することが重要と思われる。

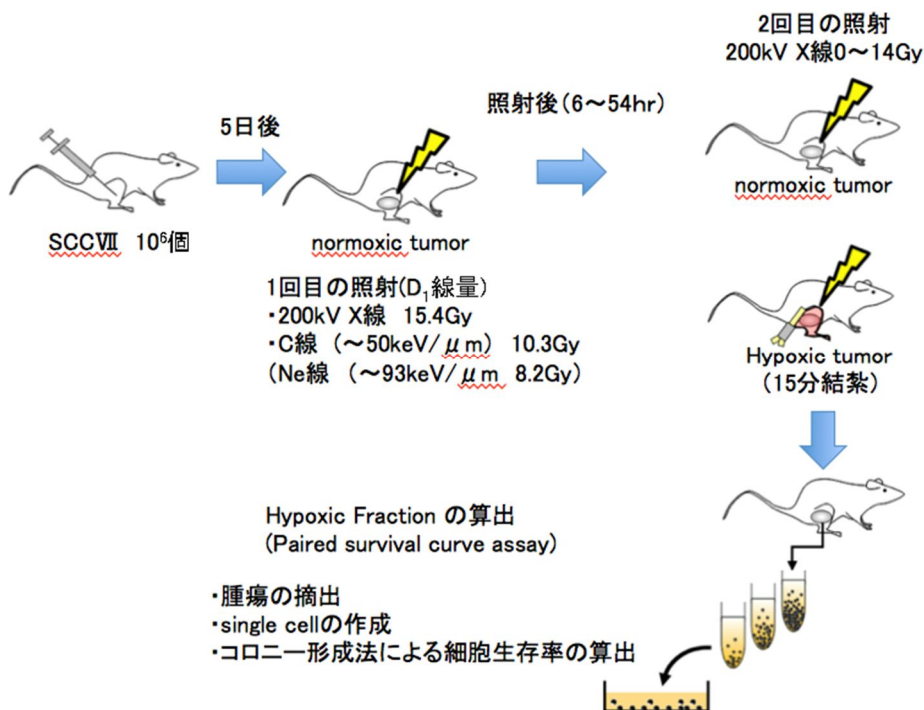
2. 研究の目的

本研究はX線ならびに炭素線による腫瘍内微小環境変化を明らかにし、腫瘍再酸素化機構に関連する生物応答を明らかにする。具体的には腫瘍細胞生存率から求めた腫瘍内低酸素分画の算出、腫瘍血管と低酸素マーカーによる腫瘍内低酸素環境の可視化を行い、腫瘍内低酸素分画の経時的変化と腫瘍血管周辺の微小環境変化の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

X線並びに炭素線照射による腫瘍再酸素化の速度測定

マウスがん細胞(SCC VII)をマウス下肢に移植し、5日後にX線、または炭素線をマウス下肢移植腫瘍部に照射する。照射後に腫瘍を取り出し単細胞懸濁液にしてコロニー形成法にて、線量依存的に変化する腫瘍細胞の生存率を求める。これにより、X線、炭素線それぞれの99%致死(D₁)線量を決定する。このD₁線量を用いて1回目の照射(X線または炭素線)をマウス下肢移植腫瘍部のみに行う。次に一定時間経過後、2回目の照射をX線で行う。この時に半数のマウスの下肢上部を結紮し、腫瘍を低酸素状態にしたまま照射を行い、生存率曲線を作成する。結紮の有無で生存率曲線の形に違いが見られれば、再酸素化により腫瘍細胞の放射線感受性が変化したことを意味し、下記の数式により腫瘍内低酸素分画を算出する。

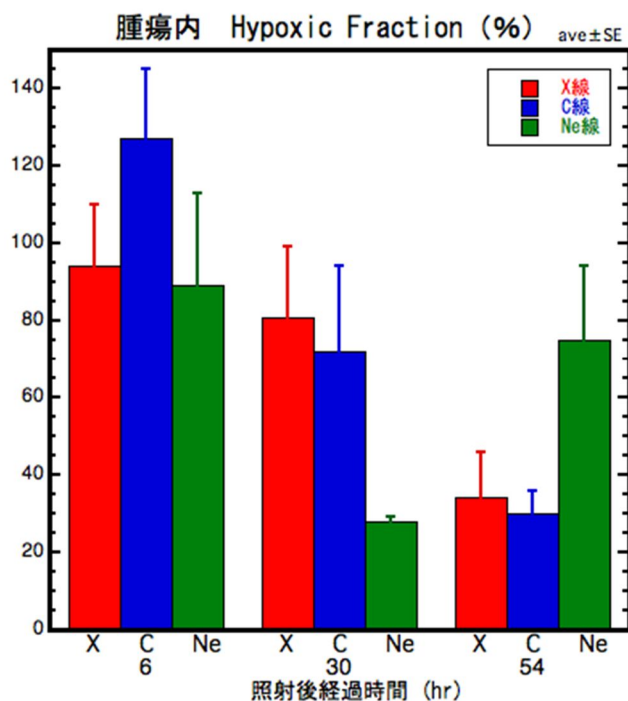


Hypoxic 状態 (結紮状態) での腫瘍生存率 $SF_H = m_H \cdot \exp(-\mu \cdot D)$

Normoxic 状態 (結紮無し) での腫瘍生存率 $SF_N = m_N \cdot \exp(-N \cdot D)$
 $H = N$ と仮定し、腫瘍内低酸素分画 (HF) の算出 $\log(HF) = \log(m_N) - \log(m_H)$
(SF: 細胞生存率、m: 生存率曲線の傾き、N: 生存率曲線の定数、D: 照射線量 (Gy))
1 回目の照射から 2 回目の照射までの間隔を変えることで、経時的に腫瘍内再酸素化を測定し、再酸素化の速度や程度を明らかにする。

放射線の違いによる腫瘍血管と低酸素領域の腫瘍内分布変化を測定
D₁ 線量を用いて X 線または炭素線照射をマウス下肢移植腫瘍部のみに行う。一定時間経過後、腫瘍組織摘出 75 分前に低酸素領域に蓄積する低酸素マーカーのピモニダゾールを尾静脈注射し、尚且つ 1 分前にヘキスト 33342 を尾静脈から注射することで、血管に隣接した細胞を染色し、血管から離れた領域に存在する低酸素領域 (ピモニダゾール陽性領域) の可視化を行う。腫瘍組織を摘出後、組織免疫化学により、腫瘍血管と低酸素領域の腫瘍内分布変化を明らかにする。
上記の研究計画より、腫瘍内低酸素分画の経時変化と腫瘍内微小環境変化の関連性を明らかにし、X 線ならびに炭素線による腫瘍再酸素化の機構解明を行う

4. 研究成果

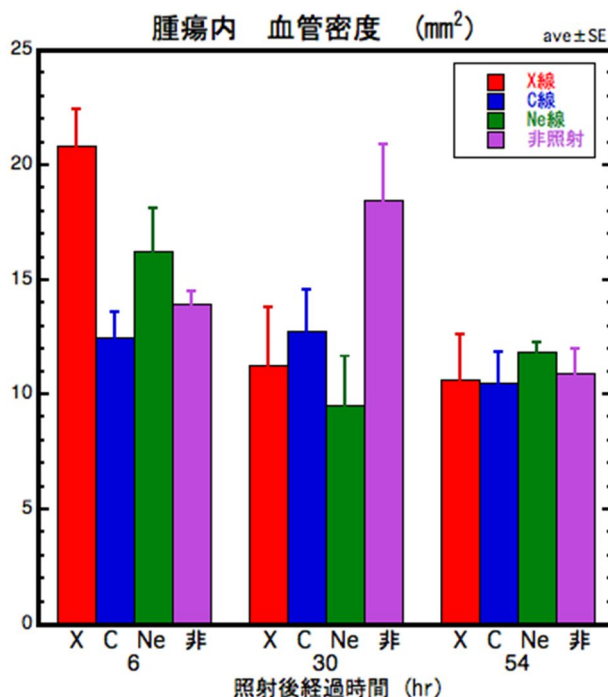


照射 6 時間、30 時間、54 時間後を中心に 0.5 時間～78 時間後までの、腫瘍内低酸素分画の割合を算出した。グラフには 6、30、54 時間後のみを示した。各ポイントでの値は、3 回以上行った実験結果の平均と、標準誤差を表記した。

左図にあるように X 線 (X: 赤カラム) と炭素線 (C: 青カラム) では、これまでの報告にあるような、炭素線での早い再酸素化の現象がはっきりとは見られなかった。

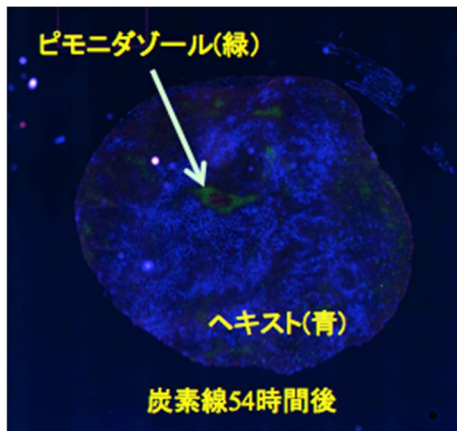
そこで、炭素線 (約 50keV/μm) より高いエネルギーを持つネオン線 (約 93keV/μm) を用いての実験を行うこととした。

ネオン線 (Ne: 緑カラム) では X 線や、炭素線より早く、照射 30 時間後には低酸素分画が約 30% まで下がったことが示された。これによって、より高いエネルギーを持った重粒子線では再酸素化が早まる傾向が示唆された。



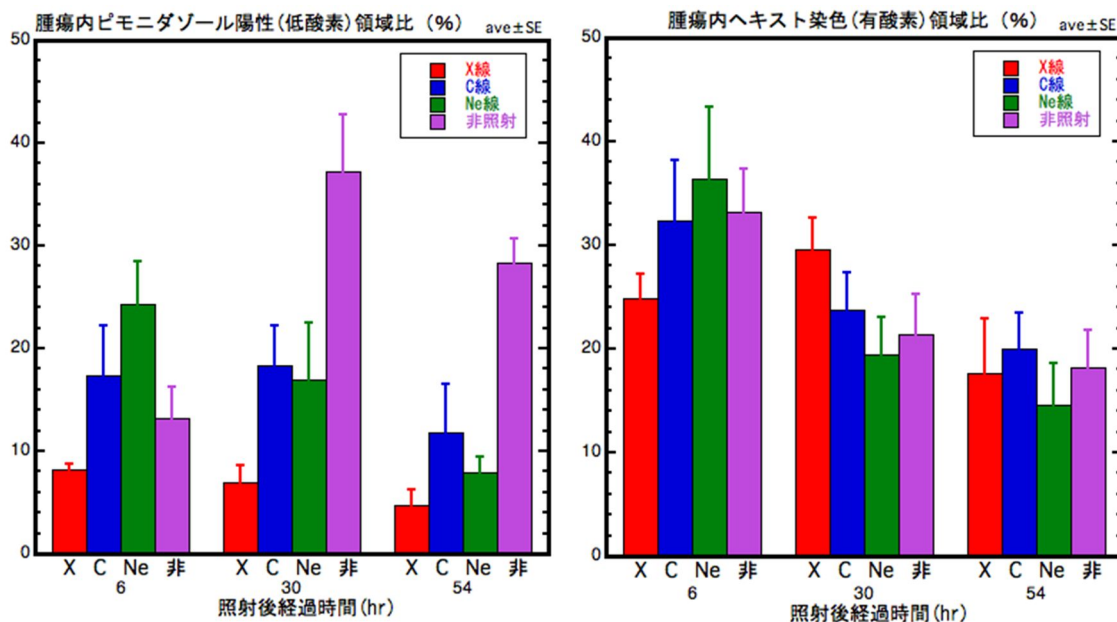
腫瘍再酸素化に伴う、腫瘍内の変化を観察するために、酸素の運搬経路として、腫瘍内単位面積あたりの血管数の変化を測定した。

なるべく腫瘍中心を通る断面の切片を HE 染色し、視認できた血管を計数して、1 平方ミリメートルあたりの血管数をプロットした。1 観察点につき 3 個体以上の腫瘍を使用した。X 線 (X: 赤カラム)、炭素線 (C: 青カラム)、ネオン線 (N: 緑カラム) の間で、照射 6 時間、30 時間、54 時間いずれの測定時間でも有意な差は認められなかった。



腫瘍内の、低酸素領域を可視化するために低酸素マーカー（ピモニダゾール）を、有酸素領域を可視化するためにヘキスト 33342 を尾静脈から投与して、組織免疫化学で観察した。

左の写真のように、血管から運ばれたヘキストは周囲の細胞核を染色し、青く見える。ピモニダゾールを取り込んだ細胞は、抗ピモニダゾール抗体-FITCによって緑色に見える。腫瘍切片中のピモニダゾール陽性領域とヘキスト染色領域を画像解析によって求めた。



低酸素領域は、X線(X:赤カラム)、炭素線(C:青カラム)、ネオン線(Ne:緑カラム)の何れにおいても観察した時間の範囲では、経時的に減少していた。Paired survival curve assay から求めた Hypoxic Fraction は、照射6時間後時点での差はほとんど無いにもかかわらず、低酸素マーカーから求めた腫瘍内低酸素領域の比率は、予想に反し、重粒子線照射群より、X線照射群が小さい傾向を示し、30時間後でも同様であった。非照射(非:紫カラム)と比較すると、30時間以降では、照射群の低酸素領域比は有意に低くなっていた。

1分間での血管からの浸透領域=有酸素領域としてヘキスト染色領域を観察したが、照射、非照射にかかわらず、経時的に減少した。6時間、30時間、54時間それぞれではどの群にも有意差は見られなかった。

Paired survival curve assay によって示された、重粒子線(ネオン線)の早い再酸素化のメカニズムを解明するため、腫瘍内の血管密度、低酸素領域、有酸素領域を調べたが、いずれも裏付けとなるような結果は得られなかった。

血管密度は、血管の有無だけで、機能までは判断できない。その為ヘキスト静注による血管からの浸透領域の観察も行ったが、放射線の種類による違いは示せなかった。ピモニダゾールによる、低酸素領域では、むしろ、X線の方が重粒子線よりも低い値を示した。これは、ピモニダゾールが、酸素分圧10mmHg以下を検出するのに対し、Paired survival curve assay では酸素分圧3mmHg以下を検出している事が影響していると考えられる。また、組織像の観察では、照射6、30、54時間後の状態を観察するのみで、その後生存するか否かまでは判断できない。一方、Paired survival curve assay ではその時点の細胞状態だけでは無く、その後も一定回数分裂する能力を有しているものを観察していることになる。これら実験手法の違いから、放射線による再酸素化のメカニズム解明について多くの課題が残る結果となってしまった。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

日本放射線影響学会第 60 回大会：X 線並びに重粒子線照射後の腫瘍再酸素化速度の検討
日本放射線影響学会第 61 回大会：重粒子線照射後の低酸素マーカーを用いた腫瘍再酸素化の可視化

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：平山 亮一

ローマ字氏名：Hirayama Ryoichi

所属研究機関名：国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

部局名：放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：90435701

研究分担者氏名：小原 麻希 (2018.5.10.削除)

ローマ字氏名：Obara Maki

所属研究機関名：国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

部局名：放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部

職名：業務補助員

研究者番号(8桁)：80736992

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。