

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18790917
研究課題名（和文）1 回大線量照射の放射線生物学的・分子生物学的側面からの基礎的検討
研究課題名（英文）Basic examination of the high-dose-irradiation per fraction from the point of view of radiation biology and molecular biology.
研究代表者
中村 香織（NAKAMURA KAORI）
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：40339023

研究成果の概要:定位的放射線治療の際に多く用いられる 1 回大線量照射(8Gy 以上)について、生物学的な有利性の裏付けを得る目的で行われた研究である。外陰癌、肺癌、食道癌、前立腺癌のいずれでも 1 回線量 6Gy 以上では細胞生残率 5%以下となり、8Gy 以上では生残率 1%未満であった。ある線量以上の線量が照射されると細胞死の抑制が解除されるように働く機構が存在することを発見することを目標としており、研究を継続中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,067,975	0	2,067,975
2007 年度	132,025	0	132,025
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：1 回大線量，放射線，スイッチ機能

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療は、効果が良好で侵襲・副作用が少なく治療期間・治療回数が少ないことなどこれらの全ての因子を満たすものが理想的な治療法と考えられており、臨床での最終的な治療方針の決定は、これらの因子に加えて、年齢・全身状態そして本人の希望などを考慮して行っている。また、最近では、がん治療といえども Quality of

Life (QOL) が考慮され、臓器温存を重視した治療に関心が集まっている。

現在の放射線治療は、コンピュータや放射線物理学の進歩により、腫瘍部分への照射線量を増加させ、正常組織への照射線量を減少させることを可能になった結果、治療効果を良好に保ちながら副作用を抑えることができるようになってきている。そのような時代背景の中で、根治的ながん治療に対しても臓器温存を目的に放射線

療法を用いることが多くなってきている。

特に、定位放射線治療では従来から行われている根治的放射線治療(所要期間約6-7週間・30-35回程度)に比べて治療期間・治療回数を非常に少なくする事が可能であり、脳腫瘍や肺腫瘍に関しては良好な治療成績が報告され始めていることから、非常に注目が集まっている。

しかしながら、従来からの放射線生物学的な観点からは、比較的小さな1回線量(1.5-4Gy程度)で多くの回数を照射する方が大きな1回線量で少ない回数を照射するよりも、有利であるとされている。それは、腫瘍細胞の $\alpha/\beta$ 比は高いものが多く、腫瘍周囲に存在する正常組織細胞については、 $\alpha/\beta$ 比は腫瘍細胞同様に高いものから脊髄や脳などのように非常に低いものまで広く存在していることに起因する。 $\alpha/\beta$ 比が大きい腫瘍組織の照射期間中の再酸素化ならびに再構築による抗腫瘍効果の増強は、1回線量を小さくして照射回数を増やすことが有利である。かつ、 $\alpha/\beta$ 比が高くない周囲正常組織の回復を考えた場合には、1回線量が少なく照射回数が多い方が障害の低減に対して有利である。

臨床で行われる放射線治療としては、1回大線量寡分割照射がさらに広く用いられていく可能性があるが、1回大線量照射がどのように生物学的あるいは分子生物学的に影響するかに関連した基礎的実験は意外なほど少ない。

しかし2005年にCh'angらはSpmd-1欠損による放射線耐性マウスにbFGFによる放射線耐性処置を施し、放射線照射を行った際の小腸腺窩細胞が、18Gy未達の照射ではATM(=DNA修復タンパク)がセラミドの合成を抑制することで細胞死を抑制するが、18Gyを超える大線量ではATMによる細胞死の抑制が起こらなかったと報告している(Hui-Ju Ch'ang et al. Nat. Med. 11(5): 484-90, 2005)。これは、ある種のタンパクが「スイッチ機能」を持ち、照射線量がある閾値線量よりも小さければ細胞死は抑制され、大きければその抑制機能が働かなくなる事を示唆している。

腫瘍細胞において1回大線量照射時の生死に関するシグナル伝達機構を検討した先行報告はない。小腸腺窩細胞と同様に $\alpha/\beta$ 比が大きな腫瘍細胞への大線量照射においても、ある種のタンパクが「スイッチ機能」を有していることが判明すれば、1回大線量照射による良好な治療成績が従来からの放射線生物学的には説明し得なかった部分からのパラダイムシフトとなり得ると考え、今研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

1回大線量照射による定位放射線治療による、臨床的有用性・有効性が報告され始めている。また、生物学的にも、先行研究で、定位放射線治療に用いる1回10Gy~25Gy前後の照射に関して、腫瘍細胞と同様に大きな $\alpha/\beta$ 比を有する小腸腺窩細胞で、放射線照射という同一の外的刺激でありながら、18Gyという線量を限界として、ある種のタンパクで反対の機能(線量が少ないときには「細胞死の抑制経路」を活性化、線量が大きくなると「細胞死の抑制経路」を活性化しない)が引き起こされるという結果が得られている。

しかしながら、従来からの放射線生物学的には、腫瘍細胞のような $\alpha/\beta$ 比の大きな細胞は、大きな1回線量で少ない回数を照射するよりも、比較的小さな1回線量(1.5-4Gy程度)で多くの回数を照射する方が有利であるとされている。これに関連した研究は旧来から多数行われ、すでに確立されていると言っても過言ではない。

今回の研究では、1回大線量照射に関して、通常臨床で使用している照射線量と比較し、放射線分子生物学的な反応についてどのような相違点があるのか?さらには「生物学的優位性はどのような点にあるのか?」を明らかにすることを目的としている。

具体的には、腫瘍細胞での、低線量照射時と大線量照射時の増殖シグナル因子、線量の大小による、(EGFR・FGF・TGF- $\beta$ )、生存シグナル因子(AKT・NF- $\kappa$ B・bcl2)、細胞死・細胞周期シグナル(p53, caspase3, サイクリン)の発現変化をタンパクレベルで評価し、ある閾値線量で発現が非直線的に変化しているものを発見することで、細胞死の促進ないしは細胞死の抑制機能の無機能化が起こっていることを証明するが目標となる。

実際には、大線量が照射された細胞の生残率曲線を解析し、その曲線の変曲点(加速的に生残率が減少する点)があることの有無を確認することが最初の目標となり得る。その線量が生存シグナル因子のスイッチングが起きる「閾値線量」である可能性が高く、臨床的にはその「閾値線量」よりも大きな1回線量が投与できるようにすれば、より有効な1回大線量寡分割照射が行い得るようになるため、臨床的には、この「閾値線量」の発見も一つの重要な目的となる。

## 3. 研究の方法

(1) p53 status や細胞起源が異なる数種の細胞株に対し放射線照射をおこない細胞生残率曲線を作成する。

#### 使用細胞株：

- ・ A431：ヒト外陰；扁平上皮癌細胞株
- ・ A549：ヒト肺；腺癌細胞株
- ・ NMT-1：ラット；卵黄囊腫瘍細胞 (wild-type p53 細胞株)
- ・ NMT-1R：ラット；卵黄囊腫瘍細胞 (mutant-type p53 細胞株)
- ・ TE-1：ヒト食道；扁平上皮癌細胞株 (mutant-type p53 細胞株)
- ・ PC-3：ヒト前立腺；腺癌細胞株
- ・ LN-Cap：ヒト前立腺；腺癌細胞株 (アンドロゲン感受性)

\*高線量域では、生残率曲線が不安定となってくるため、細胞数を増やした状態での照射の必要性があり、かつ、生残率が低くなってきた変曲点近傍の線量では、照射線量と播く細胞数の組み合わせを変えた試行が必要となることが予測された。

(2)高線量率領域での MTT アッセイとスフェロイド形成法による細胞生残率評価を行い、コロニー形成法で作成した細胞生残率曲線ともマッチングを行い、変曲点の存在を検討する。

(3)照射前後の増殖シグナル因子 (EGFR・FGF・TGF- $\beta$ ・KIT など)、生存シグナル因子 (AKT・NF- $\kappa$ B・PKC・p38・bcl2 など)、そして、細胞死や細胞周期に関連しているシグナル (p53・JNK・caspase3,9・CDK・サイクリン・TRAIL 受容体 DR5 など) の発現変化をタンパクレベルで評価し、高線量照射と低線量照射によって異なる発現変化を示した細胞株を検討する。特に、細胞生残率曲線の変曲点が明瞭であった場合には、その前後でのタンパクレベルの変化が key となっている可能性が高いため、照射線量のプロット間隔を短くする必要性が予測される。

(4)(1)-(3)の検討で、高線量照射と低線量照射によって異なる発現変化を示した細胞株について、細胞死の形態・性状などが高線量照射と低線量照射の線量の違いによってどのように差異があるのか、形態学的な相違については顕微鏡的にも評価する。かつ、アポトーシスの多寡などの細胞死の評価に関しても、DNA 電気泳動や PI 染色によるレーザースキャニングサイトメータを用いて検討する。

#### 4. 研究成果

##### 使用細胞株：

- ・ A431：ヒト外陰；類上皮癌細胞株
- ・ A549：ヒト肺；腺癌細胞株

- ・ NMT-1：ラット；卵黄囊腫瘍細胞 (wild-type p53 細胞株)
- ・ NMT-1R：ラット；卵黄囊腫瘍細胞 (mutant-type p53 細胞株)
- ・ TE-1：ヒト；食道扁平上皮癌細胞株 (mutant-type p53 細胞株)
- ・ PC-3：ヒト；前立腺癌細胞株
- ・ LN-CaP：ヒト；前立腺癌細胞株 (アンドロゲン感受性)

コロニー形成法により、上記細胞株の細胞生残率曲線を作成した。予測されていたごとく、いずれの細胞株においても、5-6Gy 以降からコロニー形成率が5%以下となり、7-10Gy では生残率が1%未満となることから、播く細胞数を増やすことによってコロニー形成を認めても、生残率のパラッキがとて大きくならず、安定した生残率曲線を得ることができなかった。特に10-15Gy 以降では播く細胞を増やすことによっても、いずれの細胞でも生残率0-0.01%となり、非常に再現性に乏しいコロニー形成状況であった。

そこで、さらに、5Gy 以降は生残率曲線を1Gy,0.5Gy,0.2Gy 刻みで行う試行をしたが、手技によるアーチファクトの影響があるためか、10Gy 以上では生残率曲線からの変曲点を観察し得るには、不十分な結果であった。

スフェロイド法による培養を試行したが、細胞自体の growth curve が安定しないことから、この状態にさらに照射付加条件での検討を加えることは困難であると判断し、検討は中断した。

照射線量6-20Gy に関して、MTT アッセイで細胞生残率を評価した。A431,TE-1 に関しては、6-10Gy での安定した生残率曲線を得ることができたが、低線量照射域では、細胞生残数が多いことから、むしろ不安定な曲線となり、コロニー形成法での曲線とは mismatch であった。コロニー形成法と MTT アッセイ施行時の環境が異なってしまったことが原因と考えられたため、再試するも結果は不要であった。10-20Gy 照射でも生残率曲線を描き得たが、再現性は乏しく、かつ、誤差値による変動があるため、変曲性のあるグラフとしての解釈を行うには、無理がある結果であった。現在は、A549, LN-Cap で実験を続行している。

照射線量毎の再増殖の変化を cell count 法でみると、A431 に関しては、6Gy 以上の照射群では24時間以内での再増殖を認めなかった。

#### 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 0件)  
[学会発表](計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 香織 (NAKAMURA KAORI)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40339023

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし