

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390324

研究課題名 (和文) 放射線感受性の腫瘍内不均一性に関する分子生物学的解析

研究課題名 (英文) Molecular biological analysis of intratumoral inhomogeneous radiosensitivity

研究代表者

長谷川 正俊 (HASEGAWA MASATOSHI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251111

研究成果の概要 (和文)：放射線感受性の腫瘍内不均一性を解析する目的で、p53 遺伝子型の異なるヒト由来腫瘍をヌードマウスに移植して、炭素線、X線を照射後、cDNA アレイ解析、アポトーシス誘発、GFAP 発現等の検討を行なった。p53 野生型腫瘍では小線量でも高率なアポトーシス誘発と顕著な遺伝子発現の変化を認めたが、同一腫瘍内でも GFAP 陽性細胞のアポトーシスは低率で遺伝子発現も異なる傾向を認めた。p53 変異型では大線量照射後の遺伝子発現に有意な変化を認めたが、X線と炭素線で異なることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Tumors of human origin with wild-type (wt) p53 or mutant-type (mt) p53 were transplanted to nude mice and irradiated with carbon ion beams or X-rays to analyze intratumoral inhomogeneous radiosensitivity. In wt-p53 tumors, apoptosis increased after low dose irradiation and significant changes in gene expression were found. Little difference between the profiles induced by carbon ion and those by X-rays was shown, but the two types of tumor cells in a tumor showed different profiles. In mt-p53 tumors, significant changes in gene expression were shown after high dose irradiation, but the profiles induced by carbon ion and those by X-rays were different.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	10,700,000	3,210,000	13,910,000

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：放射線感受性、腫瘍内不均一性、分子生物学、アポトーシス、p53

## 1. 研究開始当初の背景

X線、 $\gamma$ 線、粒子線等によるDNA損傷に伴って誘発されるp53依存性アポトーシスについては既に多数の報告があるが、実際の臨床

例では放射線誘発アポトーシスの頻度はそれほど程高くない。特に放射線抵抗性腫瘍では、p53遺伝子型にかかわらずアポトーシスは低率で、照射後に放射線抵抗性細胞が再増殖す

るので、アポトーシス以外の機序による腫瘍制御の解明も重要と考えられている。放射線感受性腫瘍においても、すべての細胞が一律にアポトーシスに陥るわけではない。腫瘍内の放射線感受性が不均一な原因として細胞周期、分化、低酸素、他の影響が示唆されているが、遺伝子レベルで個々の腫瘍組織内の不均一性について検討した報告はまだ乏しい。

従来、細胞死は、アポトーシスとネクロシスに分けられることが多かったが、最近ではアポトーシス以外のプログラム細胞死の存在も明らかになっている。しかし、その臨床例における意義はまだほとんど解明されていない。

以上のような背景から、放射線治療抵抗性腫瘍の治療成績改善には、放射線感受性の腫瘍内不均一性を解明することが重要と考えられ、腫瘍間および腫瘍内の感受性の相違について組織レベルから遺伝子レベルで解明することの有用性が示唆された。

なお、本研究開始前後に研究代表者等が並行して関連分野でおこなってきた主な研究は以下のとおりである。

(1) p53依存性、p53非依存性アポトーシスの解明

p53野生型の高感受性腫瘍や正常組織における放射線誘発アポトーシスのp53依存性とその経時的变化、他の癌関連遺伝子の関与を明らかにすると同時に、p53変異型の腫瘍におけるp53非依存性のアポトーシスが低率に出現することも報告した。さらに、p53ノックアウトマウスを用いた実験で、高感受性の正常組織におけるp53依存性を確認した。X線以外では、特に種々の抗悪性腫瘍剤や高LETの重イオン線によって誘発されるアポトーシスの一部がp53非依存性であることも報告した。実験では樹立したヌードマウス可移植性でp53野生型と変異型のヒト腫瘍、p53遺伝子型の異なるマウス腫瘍を使用した。

(2) p53遺伝子型の異なるヒトおよびマウス腫瘍系の樹立

p53野生型腫瘍、変異型腫瘍株を樹立し、保有している。ヌードマウスに可移植性のヒト腫瘍も複数あり、特に放射線感受性でp53依存性アポトーシスを起こしやすい腫瘍や壊死を起こしやすい腫瘍、p53変異型で放射線抵抗性の腫瘍等を種々の実験で報告してきた。また、p53遺伝子型の異なる3種のマウス線維肉腫 (p53<sup>-/-</sup>, p53<sup>+/-</sup>, p53<sup>+/+</sup>) も樹立して、p53依存性および非依存性アポトーシスの研究を行ってきた。

(3) 高LET放射線 (重イオン線、重イオンマ

イクロビーム等) の放射線生物学的研究

放射線医学総合研究所の重イオン線照射装置、日本原子力研究開発機構の重イオンマイクロビーム、大気マイクロPIXEを使用した研究を実施してきた。前者では、高LETの炭素イオン線で誘発されるアポトーシスについて、ヌードマウスに移植した放射線抵抗性腫瘍、放射線感受性腫瘍および正常組織について検索し、アポトーシス誘発を指標とした生物効果比RBEは、放射線抵抗性腫瘍では3-5と大きく、感受性腫瘍では3-4、感受性正常組織では1-2程度と相対的に小さいことを報告して、炭素イオン線が治療可能比の点から放射線抵抗性腫瘍に特に有用であることを示唆してきた。さらに、重イオン線の分割照射による増殖遅延とアポトーシス誘発の関係についても報告した。

## 2. 研究の目的

(1) 腫瘍内の放射線感受性の不均一性の組織レベルでの解明

感受性の不均一性について、特に分化の影響を組織レベルで明らかにする。腫瘍内でも幹細胞に相当する細胞と種々の分化傾向を示す細胞では放射線感受性が異なることが示唆されているので、この点を種々の腫瘍系で明らかにする。高率にアポトーシスが誘発される上衣芽腫では腫瘍内にアポトーシスが特に高率な部分と低率な部分があるという予備データを得ていたので、本研究では上衣芽腫、膠芽腫等における各種の形態学的分化や Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 等の蛋白発現からみた分化と感受性の相関をまず明確にする。

(2) 放射線によって誘発される細胞死の相違と遺伝子発現の相関の解明

X線、重イオン線 (炭素線) によって誘発される細胞死の中で、p53依存性アポトーシスおよびそれ以外の細胞死、特にp53非依存性アポトーシス、ネクロシス等についての研究をおこない、これらの細胞死に伴う遺伝子発現プロファイルとカリウム、リン、カルシウム等の元素分布とその動態とこれに伴う形態学的変化の関係を明らかにする。

(3) 腫瘍内の放射線感受性不均一性の遺伝子レベルでの解明

(1)、(2)の結果を踏まえて、同一腫瘍内における放射線感受性の異なる腫瘍細胞におけるX線、重イオン線照射後の遺伝子発現を解明する。すなわち、腫瘍間および腫瘍内の放射線感受性不均一性に関与する遺伝子発現を明らかにして、放射線抵抗性への関与を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) p53 野生型の上衣芽腫 (EB)、原始神経外胚葉性腫瘍 (PNET)、p53 変異型の膠芽腫 (GB) をヌードマウス皮下に移植して、炭素イオン線 (290MeV/u, 6 cm-SOBP, NIRS)、X線 (200kV: 20mA) 2Gy の1回照射をおこない、4、6、24 時間後に腫瘍を摘出して、その一部を直ちに RNA 安定液に浸透後、RNA を抽出して cDNA アレイ解析、階層型クラスタリング、Gene Ontology 解析、Pathway 解析を実施した。さらに他の組織では、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作成して、H.E. 染色、TUNEL 染色、GFAP の免疫組織化学をおこない、アポトーシス誘発、グリアへの分化を検索した。

(2) 膠芽腫については、0.5Gy、2Gy、8Gy、16Gy の1回照射をおこない、6 時間後に腫瘍を摘出して、RNA 安定液に浸透後、RNA を抽出して cDNA アレイ解析、階層型クラスタリング、Gene Ontology 解析、Pathway 解析を実施した。さらにホルマリン固定、パラフィン包埋切片で TUNEL 染色をおこない、アポトーシスを検索した。

(3) 上衣芽腫については、2Gy 照射後6時間の組織から凍結切片を作製して、血管周囲の腫瘍細胞 (A) とそれ以外の部位の腫瘍細胞 (B) をレーザーマイクロダイセクションで採取して、それぞれから RNA を抽出して上記と同様の解析をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) p53 野生型の2腫瘍 (上衣芽腫、PNET) における解析では、炭素イオン線、X線のいずれでも照射後4、6時間に高率なアポトーシス誘発を認めたが、24時間後には減少していた。このアポトーシス誘発にほぼ一致して、顕著な遺伝子発現の変化がみられ (図1)、特にアポトーシス、p53 伝達、細胞周期等に関与する経路の遺伝子発現を認めたが、炭素イオン線とX線は同様の傾向を示した (図2)。一方、p53 変異型の放射線抵抗性腫瘍の2Gy 照射後では上記のようなアポトーシス誘発、遺伝子発現の変化は乏しかった (図1)。

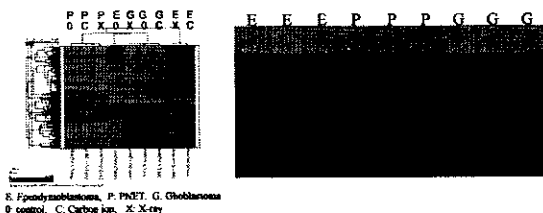


図1. Hierarchical clustering of the gene expression 0h and 6h after C-ion and X-ray irradiation (EB、PNET: wt-p53、GB: mt-p53)

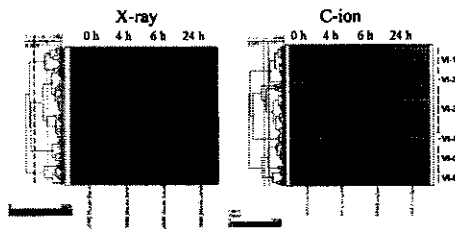


図2. Hierarchical clustering of the gene expression 0, 4, 6, and 24 h after irradiation (EB: wt-p53)

(2) アポトーシスの頻度については、H.E. 染色と TUNEL 染色で検討したが、同一線量の比較では、炭素イオン線照射後の方がX線照射後に比して高率であった。アポトーシスが比較的高率に誘発された p53 野生型の2腫瘍の比較では、上衣芽腫の方が高率であったが、その腫瘍内に不均一な分布が認められた。未熟な小型細胞が上衣細胞への分化を示すロゼットの部分ではアポトーシスが特に高率であったが、GFAP 陽性でグリアへの分化を示す細胞が血管周囲に分布している部分では、相対的に低率であった (図3)。

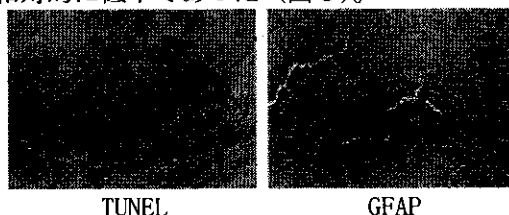


図3. Microscopic features: 6 hours after 2Gy of carbon ion irradiation (EB with wt-p53)

(3) p53 変異型の膠芽腫の2Gy 照射後6時間における遺伝子発現は非照射対照群とほぼ同様であったが、8Gy および 16Gy 照射群では顕著な遺伝子発現がみられ、さらにX線と炭素イオンでは異なる発現を認め、特に炭素イオン線 16Gy 照射後で最も明瞭であった。(詳細については解析を継続中である。)

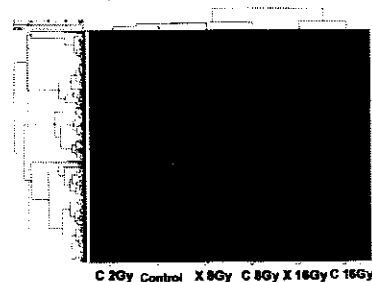
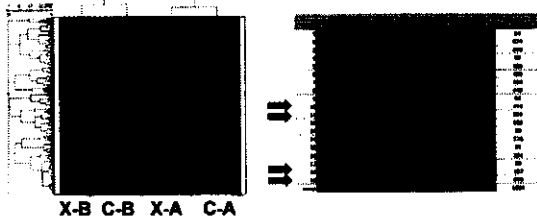


図4. Hierarchical clustering of the gene expression 6h after 2-16Gy C-ion and X-ray irradiation (GB: mt-p53)

(4) p53 野生型の上皮芽腫、2Gy 照射後 6 時間では X 線、炭素イオン線のいずれでも高率なアポトーシス誘発と顕著な遺伝子発現がみられ、その Pathway 解析でアポトーシス、p53 伝達経路、細胞周期等に関与する遺伝子の有意な発現が認められたが、血管周囲の腫瘍細胞 (A) にはグリアへの分化がみられ、アポトーシスが低率で、レーザーマイクロダイセクション後の解析でも遺伝子発現において、他の部位 (B) と異なる傾向を認めた (図 5)。



Hierarchical clustering of the gene expression 6h after irradiation (EB: wt-p53: A and B)

## 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 4 件)

- ① Sakurai H, Okamoto M, Hasegawa M, Satoh T, Oikawa M, Kamiya T, Arakawa K, Nakano T. Direct visualization and quantification of the anticancer agent, cis-diamminedichloro-platinum(II), in human lung cancer cells using in-air microparticle-induced X-ray emission analysis. *Cancer Sci*. 査読有、99 巻、2008、901-904
- ② Harada K, Nonaka T, Hamada N, Sakurai H, Hasegawa M, Funayama T, Kakizaki T, Kobayashi Y, Nakano T. Heavy-ion-induced bystander killing of human lung cancer cells: role of gap junctional intercellular communication. *Cancer Sci* 査読有、100 巻、2009、684-688
- ③ Shirai K, Suzuki Y, Oka K, Noda SE, Katoh H, Suzuki Y, Itoh J, Itoh H, Ishiuchi S, Sakurai H, Hasegawa M, Nakano T. Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma. *J Neurooncol* 査読有、91 巻、2009、353-358
- ④ Uto F, Shiba E, Onoue S, Yoshimura H, Takada M, Tsuji Y, Fukugami S, Asakawa I, Tamamoto T, Hasegawa M. Phantom Study on

Radiotherapy Planning using PET/CT -Delineation of GTV by Evaluating SUV-. *J Radiat Res* 査読有、51 巻、2010、157-164

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① 長谷川正俊、他. アポトーシスと増殖遅延を指標とした炭素イオン線の RBE の検討. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007 年 10 月 4 日. 横浜.
- ② Masatoshi Hasegawa, et al. Carbon ion beam-induced gene expression profiles in human tumors with different p53 status. 50th Annual Meeting of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2008 年 9 月 23 日. アメリカ合衆国ボストン.
- ③ 長谷川正俊、他. 重イオン線照射によるアポトーシス誘発に関与する遺伝子発現の検討. 日本放射線腫瘍学会 第 21 回学術大会. 2008 年 10 月 16 日. 札幌.
- ④ Masatoshi Hasegawa, et al. Heavy ion beam- and X-ray-induced gene expression profiles in human radiosensitive tumors with wild-type p53. 第 67 回 日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 28 日. 名古屋.
- ⑤ 長谷川正俊、他. 重粒子線誘発アポトーシスで評価した腫瘍内の放射線感受性の不均一性と遺伝子発現の検討. 第 68 回日本医学放射線学会. 2009 年 4 月 19 日. 横浜.
- ⑥ 長谷川正俊、他. 放射線感受性に応じた光子線と重粒子線の選択に関する生物学的検討. 第 39 回放射線による制癌シンポジウム. 2009 年 7 月 11 日. 富山.
- ⑦ 長谷川正俊、他. 腫瘍内の分化と放射線感受性の不均一性に関与する遺伝子発現の検討. 日本放射線腫瘍学会 第 22 回学術大会. 2009 年 9 月 17 日. 京都.
- ⑧ Masatoshi Hasegawa, et al. Differentiation, radiosensitivity, and gene expression profiles following heavy ion irradiation. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 3 日. 横浜.
- ⑨ Masatoshi Hasegawa, et al. Effect of heavy ion beams on gene expression profiles in intratumoral radiosensitive and radioresistant cells. 51st Annual Meeting of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2009 年 11 月 2 日. アメリカ合衆国シカゴ.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 正俊 (HASEGAWA MASATOSHI)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50251111

### (2) 研究分担者

大野 達也 (OHNO TATSUYA)  
群馬大学・重粒子線医学研究センター・  
准教授  
研究者番号：10344601  
(H19-H20→H21：連携研究者)

及川 将一 (OIKAWA MASAKAZU)  
日本原子力研究開発機構・放射線高度利用  
施設部・研究員  
研究者番号：10391301  
(H19-H20→H21：連携研究者)

浅川 勇雄 (ASAKAWA ISAO)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20382319  
(H20-21)

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

加藤 真吾、村上 健  
放射線医学総合研究所

新 雅子、中野 隆史  
群馬大学大学院

藤村 浩子 崎山 まゆみ  
榎本 喜久子 玉本 哲郎  
大西 武雄  
奈良県立医科大学