

研究種目：基盤研究(G)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591679

研究課題名(和文) 加速器を用いた単色エネルギー中性子の生物学的効果の評価

研究課題名(英文) Biological effect of radiation using neutron beam: in vitro experiment for boron neutron capture therapy (BNCT)

研究代表者

濱 聖司 (HAMA SEIJI)

広島大学・大学院医歯薬学研究科・研究員

研究者番号：40397980

研究成果の概要：

本研究は、悪性脳腫瘍を選択的に死に至らしめる放射線照射として、中性子捕捉療法に注目した。ホウ素化合物を効果的に腫瘍細胞内に取り込ませることが最大の課題であるが、我々はアデノウイルスベクターにホウ素を含有する蛍光物質を結合させ、また、感染させることによってホウ素濃度を上昇させることを確認した。更に、放射線感受性に関わる因子の解析も同時に進めた。本研究の中で、中心体の過剰発現を伴う染色体不安定性が、放射線の感受性を高めることを発見した。この染色体不安定性は、細胞分裂に関わる Survivin の発現抑制によって、助長されることを見出した。また、ライセンス化因子のジェミニンの発現、p27 発現の細胞内局在なども、悪性グリオーマ患者の放射線治療後の予後に深くかかわっていることを明らかにした。今後、更なる検討により、悪性グリオーマの放射線感受性を高める治療の開発につながるものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性グリオーマ、ホウ素化合物、中性子、アデノウイルスベクター、放射線感受性、染色体不安定性、Survivin、ジェミニン

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは腫瘍細胞が正常脳組織内に深く浸潤する為、外科的全摘出は困難で、放射線照射で残存腫瘍を死滅させようとするれば、正常脳組織も損傷する。

中性子のうち、熱外中性子は単独では細胞

を障害しないが、ホウ素などの安定同位元素に衝突すると核反応を起して、飛程が短く高LETの重荷電粒子を発生する。この荷電粒子は非常に強い殺細胞効果を有するので、効果的に腫瘍細胞内に安定同位元素を導入できれば、細胞レベルで選択的に腫瘍細胞を死に

至らしめることが可能となり、脳腫瘍に対する選択的放射線治療として注目されている。安定同位元素のうち、生体に投与して腫瘍への集積が確認された化合物にホウ素があり、ホウ素を用いた中性子捕捉療法は BNCT と呼ばれている。

しかし、BNCT が臨床応用されてなお、十分な治療効果を得るには至っていない。その原因として、

(1) 安定同位元素を腫瘍のみに取り込ませることが不十分。

(2) 単独でも細胞を障害させる高速中性子・ $\gamma$ 線の混入による、正常脳組織の放射線壊死。

が挙げられる。

## 2. 研究の目的

今回我々は、以下に示す二つの検討が必要と考えた。

①従来よりも効率的に安定同位元素を腫瘍細胞内に取り込ませる新たな手法の開発。

②中性子照射の際の放射線被曝（中性子、 $\gamma$ 線）の生物学的特性を解明し、中性子照射の際の被曝を最小限にする。

①に関しては、従来から BNCT に汎用されているホウ素化合物（BPH, BSA）よりも、選択的に導入することを目的として、アデノウイルスベクターに着目した。すなわち、アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させ、その後、標的とする悪性グリオーマ培養細胞に感染させることにより、ホウ素を効率的に、標的細胞内へ導入することを目指した。

②に関しては、中性子被曝の生物学的特性と共に、中性子照射の際に混入する $\gamma$ 線が、BNCT 後の周囲正常脳組織の放射線障害を引き起こすことが問題であり、 $\gamma$ 線による放射線障害の生物学的特性についても注目して検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ①細胞内ホウ素濃度測定

$^{10}\text{B}$ 濃縮ホウ酸と $^{10}\text{B}$ 濃縮 BPA を入手。そして、悪性脳腫瘍培養細胞にホウ酸と BPA を添付し、ICP-MAS を用いて細胞内へ取り込まれたホウ素の量を調べた。すると、ホウ酸の取り込み量よりも BPA の方がより多く取り込まれていた。

### ②アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させる

ホウ素化合物をアデノウイルスに結合させる手法として、ホウ素を含む蛍光物質に着目し、その化合物をアデノウイルスベクターに付着させ、超遠心装置によってウイルスベクターを濃縮精製し、得られたウイルスを培養細胞に感染させて、細胞内へのホウ素化合物導入実験を試みた。すると、予定通り、ア

デノウイルスを感染させた細胞は、蛍光顕微鏡下に発色させることに成功した。

③放射線照射がヒト培養細胞に与える影響について、生存率等、臨床検体を用いた検討と、培養細胞を用いた分子生物学的な検討を進める。

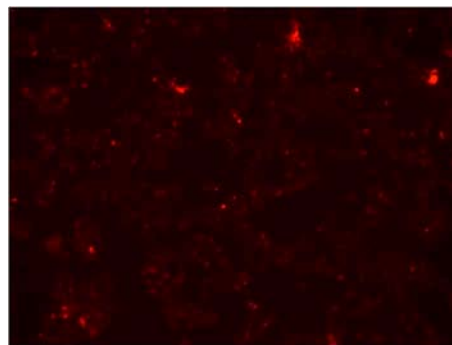
## 4. 研究成果

### ①細胞内ホウ素濃度測定方法の確立

悪性脳腫瘍培養細胞にホウ酸と BPA を添付した場合の細胞内ホウ素濃度は、ICP-MAS で測定した結果、ホウ酸の取り込み量よりも BPA の方がより多く取り込まれていた。これにより、細胞内ホウ素濃度の測定方法を確立した。

### ②アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させる方法の確立

ホウ素化合物結合アデノウイルスベクターを感染させた細胞は、細胞内に蛍光スポットが散在することを確認した（下図）。



次に、ホウ素化合物結合アデノウイルスベクターの感染細胞内ホウ素濃度を ICP-MAS を用いて測定した。実験は、ホウ素化合物結合アデノウイルスベクターではホウ素濃度が測定されたが、コントロールベクターではホウ素が殆ど検出されない結果であった。よって、アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させることが成功したものと考えられた。

アデノウイルスベクターを用いた中性子捕捉療法は、殆ど発表されていない。アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させる条件設定と、至的な感染効率を検討することで、世界的にも注目される成果が得られることが期待できる。現在、論文の作成・投稿の準備を進めている。

③中性子による細胞障害性を検討する手法として、細胞内の構造物の経時的な変化を追うことに着目した。細胞は細胞周期と運動して、放射線照射後に急速に死に至るものと、数日経過して死に至ることが知られ、後者については細胞の多核化が関与していることを以前、我々は報告した。そこで、細胞周期調節因子と細胞分裂との関連が指摘されているライセンス化因子の一つであるジェミ

ニンがグリオーマ細胞に及ぼす影響について検討した。今まで、ジェミニンの発現は、予後不良であるとする論文が多かった。しかし、我々の検討結果では、ジェミニン発現が多い患者群で予後が良好であり、ジェミニンが発現している細胞の放射線感受性が高まることによって、予後が改善される可能性を世界で初めて示唆した成果として論文で発表した。また、グリオーマ培養細胞において、細胞分裂を調節する因子の一つである Survivin を抑制する実験を行ったところ、Survivin を抑制された細胞は中心体が過剰複製されて染色体が不安定化し、アポトーシスとは異なる細胞死を来すことによって放射線感受性が高まることが示唆された。この研究では、染色体が不安定化することが放射線感受性を向上させる、という今までの研究で注目されてこなかった点に焦点を当てた、斬新な研究成果と考えられる。今後、更なる検討によって、今までとは異なる機序から、放射線感受性を高める治療法の開発を進めることが出来るものと期待される。

更に、悪性グリオーマに罹患した患者様の臨床検体を用いて、細胞内の細胞周期調節因子であるp27の発現と、手術・放射線照射後の生命予後との関連性について検討した。すると、p27因子が核内に高発現し、細胞質内の発現が低ければ、生命予後が良好、との結果が得られた。細胞内での局在によって、生物学的性質が異なる因子のことは、我々も今まで報告してきたが、それらの因子が放射線感受性にも関わっている可能性があることは大変興味深く、今後の悪性脳腫瘍患者の放射線治療の効果を引き上げるきっかけにもなると考えられるので、並行して検討を続けていきたいと考えている。

また、また、放射線照射後に起こる様々な障害の中で、下垂体ホルモン分泌異常が指摘されている。この中で、成長ホルモン（GH）分泌不全が様々な合併症を引き起こすことが知られ、GH補充療法がおこなわれている。しかし、頭蓋外悪性腫瘍ではGHレセプターの発現が悪性化の引き金になることが知られているので、GHを投与することが再発の危険を上げることが危惧される。そこで、各種頭蓋内腫瘍のGHレセプター発現を調べたところ、腫瘍が悪性化するにつれて、GHレセプターの発現が弱くなることが分かった。頭蓋内では、GHレセプターを介したGHの腫瘍悪性化はメインとなりえないことが示唆された。脳腫瘍の患者、特に若年例の患者を中心に、頭蓋内放射線照射による下垂体ホルモン分泌異常は、機能予後を不良にする因子の一つと考えられる。本研究成果は、ホルモンの補充療法の可能性を広げる研究と考えられ、現在、論文投稿中である。

## 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 5 件)

- ① Hidaka T, Hama S, Kurisu K, et al. The combination of low cytoplasmic and high nuclear expression of p27 predicts a better prognosis in high-grade astrocytoma. (査読あり) *Anticancer Research*. 29:2009:597-603.
- ② Saito T, Hama S, Kurisu K, et al. Centrosome amplification induced by survivin suppression enhances both chromosome instability and radiosensitivity in glioma cells. (査読あり) *British Journal of Cancer*. 98:2008:345-355.
- ③ Saito T, Arifin MT, Hama S, Kurisu K, et al. Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. (査読あり) *Journal of Neurooncology*. 82:2007:193-198.
- ④ Shrestha P, Saito T, Hama S, Kurisu K, et al. Geminin: a good prognostic factor in high-grade astrocytic brain tumors. (査読あり) *Cancer*. 109:2007:949-956.
- ⑤ Yamasaki F, Hama S, Kurisu K et al. Retinoblastoma protein prevents staurosporine-induced cell death in a retinoblastoma-defective human glioma cell line. (査読あり) *Pathobiology*. 74:22-31, 2007

[学会発表] (計 10 件)

- ① Kaoru Kurisu. Survivin - its importance and property on the biological aspects of glioma - . The world Federation of Neurosurgical Societies Meeting 2009. August 2008, Boston (USA).
- ② 迫口 哲彦, 富永 篤, 栗栖 薫, 濱聖司, 他. 下垂体腺腫細胞における成長ホルモンレセプターの免疫組織化学的検討. 1J-07-P13-04. 日本脳神経外科学会第67回学術総会. 2008年10月1日~3日、盛岡市. 2008年10月1日
- ③ 日高敏和, 濱聖司, 栗栖薫, 他. The combination of low cytoplasmic and high nuclear of p27 predicts a better prognosis in high-grade astrocytoma. 第26回日本脳腫瘍病理学会. 12-4. May 23-24. 2008 Tokyo.

- ④ 日高敏和, 濱聖司, 栗栖薫, 他. 悪性グリオーマにおける p27 の Subcellular localization の検討. 第 25 回日本脳腫瘍学会 (December 9-11, 2007 Tokyo). PS2-8. 2007.12.9.
- ⑤ 斎藤太一, 濱聖司, 泉 秀樹, 山崎文之, 梶原佳則, 松浦伸也, 日高敏和, 杉山一彦, 栗栖薫: Survivin抑制による中心体過剰複製はgliomの染色体不安定性と放射線感受性を上げる. 第 25 回日本脳腫瘍学会. 東京. 2007.
- ⑥ Shrestha Prabin, 濱聖司, 栗栖薫, 他. ジェミニン: 悪性グリオーマにおける予後良好因子. 第 66 回日本脳神経外科学会総会 (2007 Tokyo). 2007. 10. 05.
- ⑦ 斎藤 太一, 濱聖司, 栗栖薫, 他. Survivin 抑制による悪性グリオーマ細胞の放射線増感機序の検討-中心体過剰複製と染色体不安定性の検討-. 第66回日本脳神経外科学会総会 (2007 Tokyo). 2007. 10. 04.
- ⑧ 日高敏和, 濱聖司, ブラビン・シュレスタ, 斎藤太一, 梶原佳則, 山崎文之, 杉山一彦, 栗栖薫: 悪性グリオーマにおける P27kipl の Subcellular localizationの検討. 第 66 回日本脳神経外科学会総会. 東京. 2007.
- ⑨ 斎藤太一, 濱聖司, 栗栖薫, 他. 小脳 glioblastomaの免疫組織化学的所見と予後との関連についての検討: テント上 glioblastomaとの比較検討. 第 25 回日本脳腫瘍病理学会 (April 19-20, 2007 Kumamoto) P-17. 2007.4.19.
- ⑩ Shrestha P, Saito T, Hama S, Kurisu K, et al. Geminin: a good prognostic factor in high-grade astrocytic brain tumors. 第 25 回日本脳腫瘍病理学会 (April 19-20, 2007 Kumamoto). O-27. 2007.4.19.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱聖司 (HAMA SEIJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号: 40397980

### (2) 研究分担者

栗栖薫 (KURISU KAORU)

広島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号: 70201473

星 正治 (HOSHI MASAHARU)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 50099090

富永 篤 (TOMINAGA ATSUSHI)

広島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号: 60274049

### (3) 連携研究者

遠藤 暁 (ENDO SATORU)

広島大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 90243609

田中 憲一 (TANAKA KENICHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70363075