

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19890130
 研究課題名（和文） 活性酸素種発生を利用した陽子線治療・天然化合物併用療法の開発
 研究課題名（英文） Combination Therapy of Proton Beam and Natural Compound Using Reactive Oxygen Species
 研究代表者
 出水 祐介（DEMIZU YUSUKE）
 神戸大学・大学院医学系研究科・医学研究員
 研究者番号：50452496

研究成果の概要：従来、活性酸素種（ROS）の関与が少ないと言われていた陽子線の殺細胞効果に ROS が重要な役割を果たしていることを示し、植物に含まれる天然化合物 PEITC（酸化促進物質）を併用することで陽子線治療の効果を高めることができる可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：活性酸素種、陽子線治療、粒子線治療、天然化合物、併用療法、がん治療

1. 研究開始当初の背景

外科治療、化学療法、放射線治療は「がん治療の三本柱」と呼ばれているが、中でも放射線治療の近年の技術的進歩および国民認知度の上昇は目覚しく、治療患者数は急激に増加している。その中でも放射線治療の一種である陽子線治療は、最近最も注目を浴びている治療法のひとつである。

陽子線はブラッグピークというX線にはない物理特性を持ち、がん病巣への高度な線量集中を可能にしているため、(1)がん周囲の重要臓器への不必要な照射を避けられる→(2)がんそのものへの投与線量を増加できる→(3)高いがん制御率と少ない副作用を両立できる。

しかし、陽子線の生物特性は従来のX線と同

等であり、さらなる治療成績の向上のためには併用療法の開発が必須である。放射線治療の併用療法として一般的なものは化学療法であるが、その効果と引き換えに激しい副作用に苦しむ患者が多いのが実情である。副作用の強い化学療法併用は、陽子線治療にとって「副作用が少ない」という利点を奪うことに他ならず、ほとんど試みられていない。

ところで、ブロッコリーやクレソンといった植物に含まれる天然化合物PEITCががん予防に効果があるということは以前から知られていたが、近年の研究によりがん治療にも使える可能性が示唆されている。いくつかの機序が提唱されているが、最もインパクトが強いのは、2006年、Trachoothamらによって発表された機序で、従来の「PEITCは抗酸化物質であり活性酸素種(ROS)を減少させることによりがん予防効果を持つ」という考えを根底から覆す、「PEITCはROS

を発生させることによりがん細胞を選択的に殺傷する」というものである。

申請者は、ROSを発生させることにより生物効果を発揮する放射線（“間接効果”として知られる）とこのPEITCを組み合わせることで、副作用の増加なしにがん細胞には相乗効果を上げることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これまで誰も検討してこなかった陽子線治療におけるROSの役割を解明し、それを土台として、天然化合物であるPEITC併用による“がん細胞の選択的殺傷”を実現し、最終的には臨床応用を目指すプロジェクトの第一段階である。

陽子線治療の臨床応用はまだ歴史が浅く、「単独治療で十分である」という考えが大勢を占める中、併用治療しかも従来型の抗がん剤ではなく、細胞内レドックス理論に裏づけされた天然化合物を用いて陽子線増感を行い、究極の高治療可能比（高腫瘍制御率かつ低有害事象）治療を目指す。

3. 研究の方法

(1)WST-8 アッセイによる X 線・陽子線照射後細胞生存率評価法の確立

放射線照射後の細胞生存率の評価には通常コロニー形成アッセイが用いられるが、本研究で主として用いた陽子線治療主要対象腫瘍の培養細胞（H1299：肺がん、HMV-2：粘膜悪性黒色腫）のうちHMV-2は良好なコロニーを形成せず、コロニー形成アッセイでの評価は困難なため、薬剤感受性試験で用いられる比色定量法の一つであるWST-8アッセイにて評価することとした。その前段階として、コロニー形成の良好なHSG細胞（唾液腺がん）を用いて、コロニー形成アッセイとWST-8アッセイの比較を行った。

(2)ROS 反応性蛍光色素およびフローサイトメトリーによる ROS 発生解析

H1299、HMV-2 に対してX線および陽子線を照射した後にフローサイトメトリーによるROS発生解析を行った。標識蛍光色素にはCM-H₂DCFDAを使用した。また、抗酸化物質であるN-アセチルシステイン（NAC）および酸化促進物質であるPEITCを併用した際のROS発生量の変化を測定した。

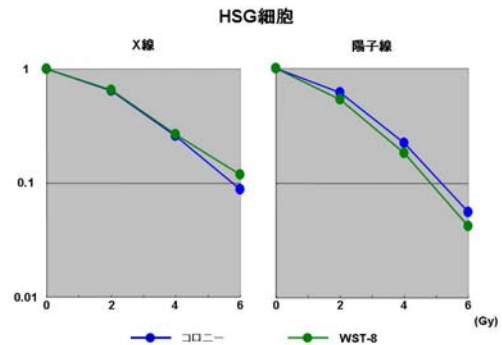
(3)NACまたはPEITC併用照射における細胞生存率の評価

(2)で得られたNACまたはPEITC併用によるROS発生量変化の細胞生存率に対する影響をWST-8アッセイにて評価した。

4. 研究成果

(1) WST-8 アッセイによる X 線・陽子線照射後細胞生存率評価法の確立

X 線・陽子線いずれにおいてもコロニー形成アッセイとWST-8アッセイの結果はよく一致し、WST-8アッセイが照射後の細胞生存率の評価に有用であることが分かった（図1）。

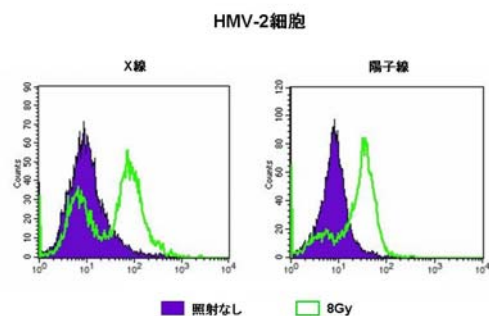


(図1)

(2)ROS 反応性蛍光色素およびフローサイトメトリーによる ROS 発生解析

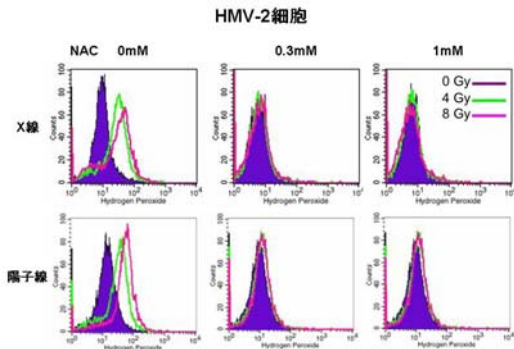
同一線量を照射した場合、陽子線照射後の方がX線照射後よりもROS発生量が少なかった（図2）。NAC 0.3~3mMの併用でX線および陽子線照射（4~8Gy）によるROS発生は完全に消去され、非照射と同レベルとなった（図3）。

PEITC単独でのROS発生および細胞毒性を検討したところ、0.3μMでは明らかなROS発生は見られず、3μMでは細胞毒性が強すぎたため、1μMが併用に最適であると考えられた。よって、PEITC 1μM併用下でX線および陽子線照射を行ったところ、いずれにおいても照射単独に比べてROS発生の増加を認めたが、陽子線照射においてより効率よく

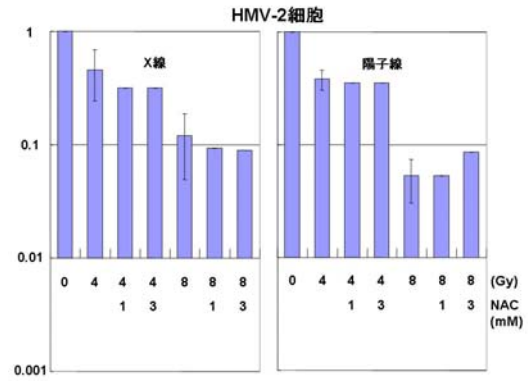


ROSを誘導することが分かった（図4）。

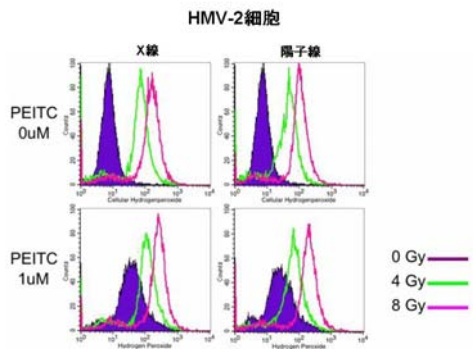
(図2)



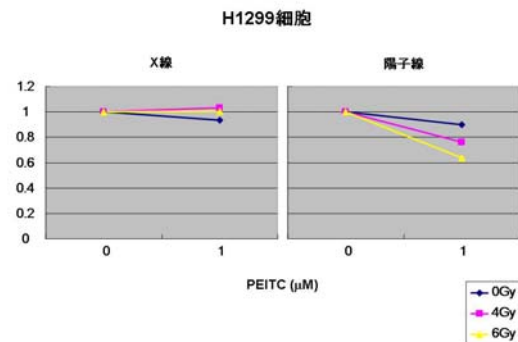
(図 3)



(図 6)



(図 4)



(図 7)

(3) NAC または PEITC 併用照射における細胞生存率の評価

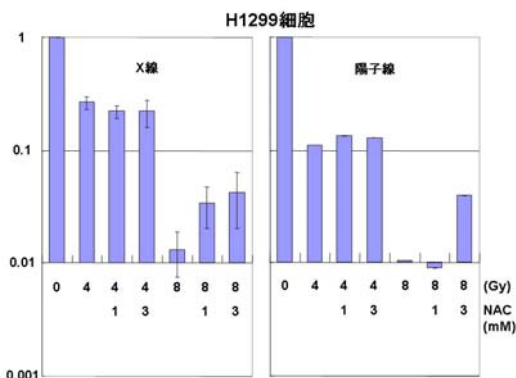
①NAC

H1299 において X 線 8Gy 時に 1~3mM 併用で細胞生存率が明らかに上昇した。また、陽子線 8Gy 時に 3mM 併用で明らかに上昇した (図 5)。

HMV-2 においては X 線では明らかな変化は見られず、陽子線 8Gy 時に 3mM 併用でわずかに上昇した (図 6)。

②PEITC

H1299 において X 線では明らかな変化を認めなかったが、陽子線 4~8Gy 時に 1μM 併用で細胞生存率の低下を認めた (図 7)。



(図 5)

(5) 研究成果の意義

陽子線を含む粒子線は X 線とは異なり、その殺細胞効果における ROS の役割は低いとされてきたが、本研究により陽子線でも照射後に ROS は発生し、それを NAC により消去することで陽子線による殺細胞効果は弱まること分かった。さらにデータを蓄積することにより、直接効果 (ROS が関与しない効果) と間接効果 (ROS が関与する効果) の比率も算出することが可能になり、治療戦略に役立てることができる。

また逆に、PEITC で ROS を増加させることにより殺細胞効果を高める可能性が示唆され、陽子線治療の増感に道が開けた。今後も研究を継続し、最終的には臨床応用へとつなげていく予定である。

国内外で類似の報告は皆無であり、陽子線治療施設の開設が相次いでいることと併せると、今後のがん治療に大きなインパクトを与えるものと思われる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. Murakami M, Demizu Y; Laser-Driven Proton Radiotherapy: Role, Status, and

Future at the HIBMC; Colloquium of PMRC; 2009/4/16; Kizu, Kyoto

2. 村上昌雄、出水祐介；粒子線治療によるがん治療；超小型粒子線治療装置のための新技術研究会；2009/2/24；千葉県千葉市
3. 永山伸一、出水祐介；粒子線医療センター生物実験室の立ち上げと今後の展望；兵庫粒子線治療研究会；2009/2/19；兵庫県神戸市
4. Murakami M, Demizu Y; Current Status of HIBMC, The 2nd International Symposium on Laser-Driven Relativistic Plasmas Applied for Science, Industry, and Medicine; 2009/1/19; Kizu, Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出水 祐介 (DEMIZU YUSUKE)

神戸大学・大学院医学系研究科・医学研究員

研究者番号：50452496

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし