

令和 5 年 5 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17260

研究課題名（和文）化学療法併用重粒子線治療による核形態変化と抗腫瘍効果の探索

研究課題名（英文）Exploring Nuclear Morphological Changes and Antitumor Effects of  
Chemotherapy-Combined Carbon-ion Radiotherapy

研究代表者

小林 大二郎（Kobayashi, Daijiro）

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30827225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では同時併用化学重粒子線治療法の確立に向けた基礎データの取得を主目的とした。そのために化学療法と重粒子線治療を同時投与した際の細胞変化を観察した。具体的には子宮頸がん患者の組織検体を治療前後で採取し核形態の変化を比較した。その結果、治療前に比べて治療開始1週間時点では核形態を観察した際に微小核の発現が有意に上昇していた。微小核は免疫反応を誘導することが知られており、微小核の発現上昇は今後の癌治療において重粒子線治療と免疫治療の併用療法の基礎的根拠となる。本結果は過去に報告がなく重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療において免疫治療が果たす役割は拡大している。今までは治療困難だった癌の制御が免疫治療の登場により可能となってきた。放射線治療領域においては重粒子線治療によって治療抵抗性だった腫瘍の制御が可能となりつつある。本研究は化学療法と重粒子線治療の併用療法の確立に向けた基礎データ取得が主目的である。その対照研究として化学療法とX線治療を併用した子宮頸がん患者の生検検体を用いた研究を行った。その結果は、同時併用前後で組織検体中の微小核の発現割合の増加が確認された。微小核は免疫応答を惹起することが知られており、化学療法と放射線治療の併用は免疫応答の起点となることが示された。

研究成果の概要（英文）：The main objective of this study was to obtain fundamental data for the establishment of concurrent chemoradiotherapy using heavy ion beams. To achieve this, we observed changes in cellular morphology when chemotherapy and radiation therapy were administered concurrently as a control study. Specifically, we compared changes in nuclear morphology in tissue samples from patients with cervical cancer before and after treatment. As a result, we found a significant increase in the expression of micronuclei when compared to the pre-treatment stage, one week after the start of treatment. Micronuclei are known to induce an immune response, and the increase in their expression provides a basic rationale for the combination therapy of radiation therapy and immunotherapy in cancer treatment in the future. This result is an important finding that has not been reported previously.

研究分野：腫瘍放射線学

キーワード：重粒子線治療 放射線治療 免疫治療 粒子線治療 子宮頸がん テーラーメイド治療 細胞死 核形態

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

化学療法併用重粒子線治療の臨床データは報告数が限られており、併用療法を支持する基礎データも不足している。また生検検体内での反応を報告したものは皆無である。我々は過去の研究 (in vitro) で放射線治療後の核形態変化を 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) 染色して観察した。各治療法により誘導される核形態変化は、X線またはシスプラチンでは apoptosis が優位だったのに対して重粒子線では mitotic catastrophe が増加していた。同研究内で癌細胞の放射線感受性は X線とシスプラチンで強い相関を示した。一方で重粒子線とシスプラチンでは感受性に強い相関は見られず、このことは異なる細胞死機序の存在を示唆していた。以上のことから重粒子線と他治療との感受性の弱い相関に mitotic catastrophe が関連していることが示唆された。しかしこれはあくまでも in vitro の結果であり、生体内の癌細胞生育環境下でも再現可能性があるかを確認することは、今後の化学療法併用重粒子線治療の最適化には必要不可欠な知見となる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は重粒子線・シスプラチン併用の有効性を細胞死形態の観点から明らかにするため、重粒子線治療を受けた患者の腫瘍組織を顕微鏡で解析することである。重粒子線が有する高い殺細胞効果の要因の一つとして複雑な DNA 二重鎖切断の発生が過去の報告から示唆されており、我々は生検検体を用いて世界で初めてその可視化に成功した。しかしこの研究は重粒子線単独治療での生検検体であり、化学療法併用重粒子線治療における生体内での細胞死機序について検討した報告はない。このことが適切な処方線量、使用薬剤の至適濃度決定を困難にしている。本研究は同時化学重粒子線治療の生体内での影響を核形態変化を通じて解析する点に学術的独自性がある。本研究は化学療法を併用した重粒子線治療の生体内での変化を観察した初めての研究である。またこの知見は今後化学療法の強度の最適化において重要なデータとなりうる。さらに今後の重粒子線治療と化学療法併用の適応拡大に大きく貢献できる可能性があり、本研究はその基礎的な研究となることが期待される。

### 3. 研究の方法

重粒子線照射装置は群馬大学重粒子線医学研究センターにおいて、患者治療に使われている。in vitro 研究用の X線照射装置や細胞培養用の CO<sub>2</sub> インキュベーターなど、当研究において必要となる研究機器に関しては当教室ですでに稼働中である。次世代超高解像度顕微鏡 Deltavision OMX を用いた DNA 二重鎖切断の画像化および DAPI 染色による核形態の可視化についてはすでに論文で発表済みである。

対象は 2017 年 11 月から 2018 年 11 月の間に群馬大学病院で放射線治療を受けた子宮頸がん患者である。放射線治療は 10MV X 線を用いた外照射 50Gy/25 回と腔内照射を組み合わせで行った。化学療法はシスプラチン 40mg/m<sup>2</sup> を週に 1 回投与した。組織検体は放射線治療開始前と 10Gy の照射後に子宮頸部の腫瘍の中心部からパンチ生検で採取した。腫瘍標本に含まれる核を DAPI 染色し、蛍光顕微鏡で核形態の変化を観察した。200 個の核を観察しそのうちに含まれる核小体の割合を算出した。

### 4. 研究成果

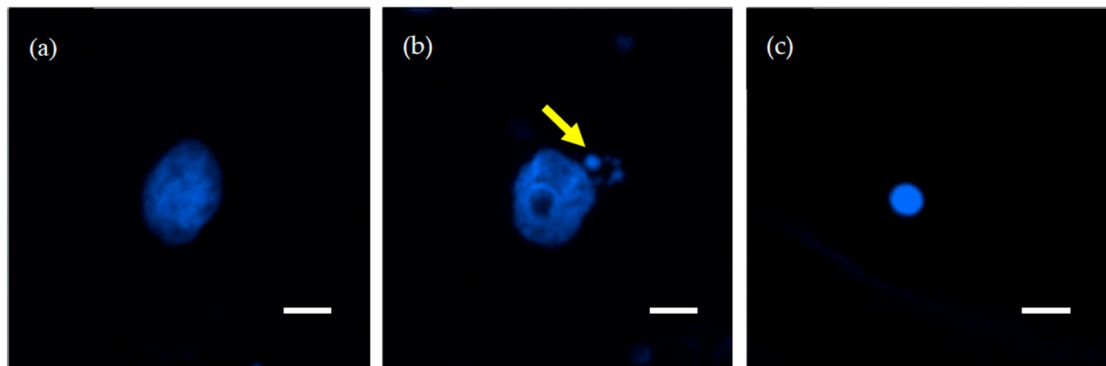
本研究には 7 名の患者が登録された。年齢の中央値は 57 (42 - 82) 歳だった。4 人の患者はシスプラチン 40 mg/m<sup>2</sup> を毎週投与する同時化学放射線治療を受け、残りの 3 人は高齢のために照射単独で治療を受けた。外照射の総線量中央値は 55.6 (55.0 - 58.0) Gy だった。腫瘍生検は照射前と 10 Gy 照射後に実施した。2 回の生検の間隔の中央値は 7 (4 - 10) 日だった。各サンプルにおける微小核とアポトーシスは DAPI 染色した核の形態的評価によって決定した (Figure 1)。

各検体で 200 個の核形態を評価した。その結果、微小核を有する核は照射前の中央値 28 (0 - 61) に対して、照射後は 151 (16 - 327) であり、照射前の検体に比べて 10 Gy 照射後の検体で有意に増加していた ( $p = 0.015$ ) (Figure 2)。微小核とは対照的にアポトーシスの数は照射の前後で有意差はなかった。

照射と同時に化学療法が微小核誘導に及ぼす影響を調べるために、同時化学放射線治療群と照射単独群で微小核の誘導率を比較した。その結果、両群間で誘導率に有意差はなかった ( $p = 0.22$ )。

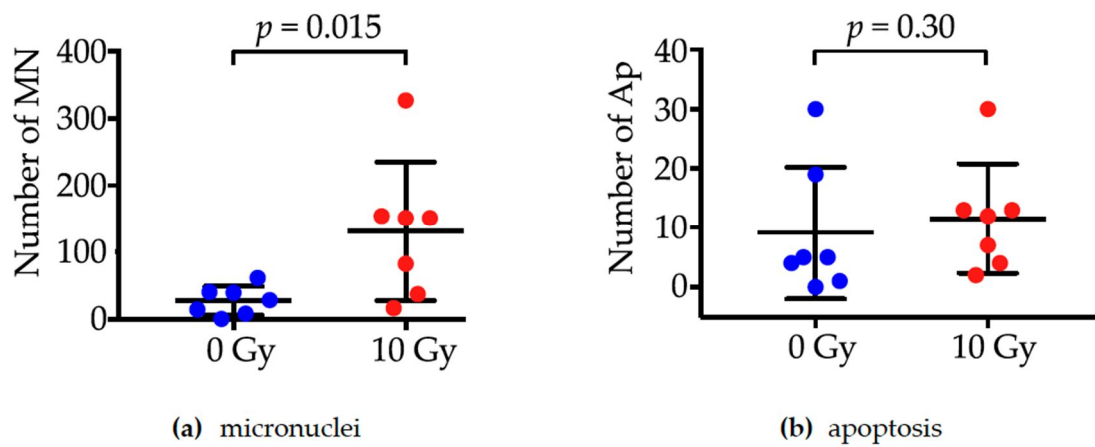
本研究の新規性は照射により微小核が誘導されることを臨床的に初めて証明したことである。

Figure 1



**Figure 1.** Representative images of nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride. (a) Normal nucleus. (b) Nucleus harboring micronuclei (arrow). (c) Apoptosis. Scale bar = 10 μm.

Figure 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daijiro Kobayashi, Takahiro Oike, Kazutoshi Murata, Daisuke Irie, Yuka Hirota, Hiro Sato, Atsushi Shibata and Tatsuya Ohno	4. 巻 10
2. 論文標題 Induction of Micronuclei in Cervical Cancer Treated with Radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------