

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790877
研究課題名（和文） 炭素イオン線治療で悪性脳腫瘍を完治させるための基礎的研究
研究課題名（英文） Basical study for curing malignant brain tumor with carbon-ion
beam therapy
研究代表者
鈴木 義行（SUZUKI YOSHIYUKI）
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60334116

研究成果の概要（和文）：

- 1) 炭素イオン線の、未熟な脳神経細胞に対する殺細胞効果は、アポトーシスを指標とした場合、X線の約10倍大きかった。
- 2) グリア細胞は、細胞の成熟度によるX線に対する感受性の差はほとんどなく、神経細胞と比べると、ややX線感受性は低かった。
- 3) ノードマウス皮下移植腫瘍においては、テモダール（TMZ）併用時の、炭素イオン線のX線に対する生物学的効果比（RBE）は約3であり、TMZ非併用時とほぼ同等であった。また、TMZの併用効果は、相加効果であった。マウス脳内移植モデルにおいて、X線照射時では、TMZ併用により1.6倍の腫瘍縮小効果が認められた。また、TMZにさらにGYKI52466を併用することで、約10%の腫瘍縮小効果増強が認められた。腫瘍細胞の遊走については、X線単独で増強したが、TMZもしくはGYKI52466を併用することで完全に抑制された。
- 4) ヒトでの通常の使用量（体重あたり）のTMZ併用時には、非併用時に比べ、明らかな炭素イオン線の効果増強作用は認められなかった。
- 5) X線照射によりAkt, PDK1の発現増強が認められ、また、PDK1の発現増強は脳腫瘍細胞の遊走能増加と関連し、臨床検体における活性型Akt・PDK1発現の増強は、神経膠芽腫患者における予後不良因子であった。

研究成果の概要（英文）：

- 1) According to the rate of radiation induced apoptosis, effect of Carbon-ion beam to immature neuron was about ten times higher than that of X-ray.
- 2) As for glial cell, there was little difference in X-ray radiosensitivity between immature and mature cells. X-ray radiosensitivity of glial cell was a little low compared with that of neuronal cell.
- 3) As for anti-tumor effect, the effect of X-ray with concurrent TMZ was 1.6 times higher than that without TMZ. Moreover, the effect of X-ray with concurrent TMZ

and GYKI52466 was 10% higher than that with TMZ alone in the brain transplant model. As for RBE, when TMZ was used concurrently, the RBE of carbon-ion beam to X-ray was estimated about 3, similar to the RBE without TMZ in in vivo model. Also, the combinational effect of TMZ was an additive effect. As for cell motility, though the motility of tumor cell was enhanced by X-ray alone, it was completely controlled by the use of either TMZ or GYKI52466.

- 4) Concurrent use of TMZ with carbon-ion beam did not enhance the radiation effect.
 5) Expression of Akt and PDK1 in malignant brain tumor cell were increased by X-ray irradiation and the increased expression of PDK1 correlated to activation of cell motility. In clinical, strong expression of activated Akt and PDK1 were significant poor prognostic factor in the Glioblastoma patients treated with radiation therapy..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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： 炭素イオン線、悪性脳腫瘍、遊走能、増感剤、ニューロン

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は、現在行われている治療法(手術+X線+抗がん剤)で生存率が10%以下という、非常に予後が不良な疾患であり、新規抗がん剤・テモダールが日本においても昨年承認され急速に普及しつつあるもの、予後を劇的に改善するほどの効果は無く、早急に新たな治療法の確立が求められている。群馬大学では、2009年を目標に、放射線抵抗性難治腫瘍の新たな治療法確立のため、世界で4番目となる炭素イオン線治療施設を建設

中であり、放射線(低LET線：X線など)に対して非常に抵抗性である悪性脳腫瘍は、高LET線である炭素イオン線の強い殺細胞効果に大きな期待が寄せられている。しかしながら、現在までに報告された基礎・臨床研究においては、悪性脳腫瘍に対する重粒子線治療は、1) 正常組織への副作用が予想以上に強い可能性が高い、2) 線量増加により照射範囲内は制御される可能性があるものの、その外側に早期に再発してしまう(つまり腫瘍に対する効果は十分であるが、腫瘍

が遊走し照射野外に広がるため外側に再発する)、などによりいまだ十分な効果を期待するに至っておらず、早急な治療戦略の改善が求められている。

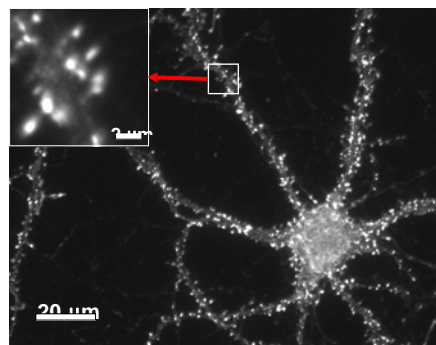
2. 研究の目的

以上から、炭素イオン線による悪性脳腫瘍の治療戦略を作成する上で、上記の1)を克服するために、①脳組織の炭素イオン線耐容線量の詳細な検討(特に今後併用されるであろう新規抗がん剤・分子標的薬併用時の)が必要であり、2)を克服するには、②悪性脳腫瘍細胞の遊走能を抑制させる検討を行い、その薬剤との併用時における腫瘍と正常組織(細胞)との炭素イオン線感受性の検討が必要と考えられる。

具体的には、①に関しては、脳正常組織・神経細胞(図3)・他における炭素イオン線のX線に対するRBE(生物学的効果比)の検討を、新規抗がん剤テモダールや、悪性脳腫瘍で高頻度に異常が見つかっており、効果が期待されている抗EGFRや抗PI3K/Akt/mTOR経路分子標的薬との併用時において行う。

②に関しては、特に悪性度が高く、遊走能の大きい脳膠芽腫細胞を用い、遊走能と関係があるとされる、Rho、Akt関連蛋白について、その阻害剤などを併用して、炭素イオン線の効果についてX線と比較検討する。

さらには、近年、神経幹細胞が成人にも存在することが確認され、その放射線(X線)感受性が正常脳組織よりも低い可能性があることが報告されている。神経幹細胞の炭素イオン線感受性が悪性腫瘍細胞より低ければ、神経幹細胞を残して腫瘍細胞を死滅させることも不可能ではないため、神経幹細胞の炭素イオン線感受性についても検討する。



正常神経細胞 (Day 21)

3. 研究の方法

1) 正常脳神経細胞における炭素イオン線のX線に対する生物学的効果比 (RBE) Bunker法で培養した未熟(生後7日目)ニューロンに対し、X線・炭素イオン線照射を行い、照射24時間後にパラホルムアルデヒドで固定した後、TUNEL染色を行いアポトーシスの頻度を測定し、炭素イオン線とX線の照射効果を比較した。

2) 正常グリア細胞のX線感受性(正常神経細胞との比較も含む)

同一の胎児ラットから摘出・培養したグリア細胞・ニューロン細胞を、摘出後7日目(未熟)、21日目(成熟)にX線照射を行い、24時間後にパラホルムアルデヒドで固定した後、TUNEL染色を行いアポトーシスの頻度を測定し、グリア細胞・ニューロン細胞における照射効果を比較した。また、それぞれの細胞において、成熟度によるX線に対する感受性の差についても検討した。

3) ヒト悪性脳腫瘍細胞における、テモダールおよびAMPA拮抗薬 (GYKI52466) 併用時の炭素イオン線の生物学的効果比
ヌードマウス皮下にヒト悪性脳腫瘍細胞を移植し、長径が約1cmになった時点で、照射単独・テモダール(TMZ)併用・TMZおよびGYKI52466併用のX線照射を行った

後、腫瘍計の経時的に測定した。次に、ヌードマウスの脳内にヒト悪性脳腫瘍細胞を移植し、同様に、照射単独・テモダール (TMZ) 併用・TMZおよびGYKI52466併用のX線照射を行い、照射後10日目に脳組織を摘出・フォルマリン固定し、パラフィン切片を作成し、HE染色にて腫瘍量・遊走量について比較検討した。

4) 正常ラット脳組織における、テモダール併用時の炭素イオン線の効果

正常ラットから脳組織を摘出・薄切しスライスカルチャーを作成した。その脳組織にX線・炭素イオン線を照射し、組織学的変化について比較した。

5) ヒト悪性脳腫瘍細胞における、X線によるAkt, PDK1の発現

In vitroで培養されたヒト悪性脳腫瘍細胞にX線照射を行い、Akt・PDK1の発現をウェスタンブロットにて解析した。腫瘍細胞の遊走能については、スクラッチアッセイにて、時間当たりの細胞遊走距離を計測した。また、神経膠芽腫患者の臨床検体を免疫組織化学染色し、活性型Akt・PDK1の発現と予後との相関について検討した。

4. 研究成果

1) 正常脳神経細胞における炭素イオン線のX線に対する生物学的効果比 (RBE)

アポトーシスを指標とした場合、炭素イオン線の、未熟 (生後7日目) な脳神経細胞に対する殺細胞効果は、X線の約10倍大きく、脳腫瘍に対する重粒子線治療を行う際には、未熟な神経細胞が存在する海馬付近への照射線量を減らす必要があることが判明した。(論文投稿中)

2) 正常グリア細胞のX線感受性 (正常神経細胞との比較も含む)

グリア細胞は細胞の成熟度によるX線に対

する感受性の差はほとんどなく、神経細胞と比べると、ややX線線感受性は低かった。

3) ヒト悪性脳腫瘍細胞における、TMZおよびAMPA拮抗薬 (GYKI52466) 併用時の炭素イオン線の生物学的効果比

ヌードマウス皮下移植腫瘍においては、炭素イオン線のX線に対する生物学的効果比 (RBE) は約3であり、TMZ非併用時とほぼ同等であった。また、TMZの併用効果は、相加効果であった。マウス脳内移植モデルにおいて、TMZ併用により1.6倍の腫瘍縮小効果が認められた。また、TMZにさらにGYKI52466を併用することで、約10%の腫瘍縮小効果増強が認められた。腫瘍細胞の遊走については、X線単独で増強したが、TMZもしくはGYKI52466を併用することで完全に抑制された。X線単独では、抗腫瘍が小さいだけでなく腫瘍細胞の遊走能増強をもたらすことが、再発の一因であることが示唆され、TMZ等の併用が必要であることが示唆された。炭素イオン線による実験については、現在施行中である。

4) 正常ラット脳組織における、TMZ併用時の炭素イオン線の効果

ヒトでの通常の使用量 (体重あたり) のTMZ併用時には、非併用時に比べ、明らかな炭素イオン線の効果増強作用は認められなかった。

5) ヒト悪性脳腫瘍細胞における、X線によるAkt, PDK1の発現

X線によりAkt, PDK1の発現増強が認められ、また、PDK1の発現増強は脳腫瘍細胞の遊走能増加と関連し、臨床検体における活性型Akt・PDK1発現の増強は予後不良因子であった。(論文投稿中)

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 10 件)

- 1) Ishikawa H, Nonaka T, Suzuki Y, et al.
Usefulness of Intraluminal Brachytherapy combined with External Beam Radiation Therapy for Submucosal Esophageal Cancer:
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010;76(2):452-459 査読有
- 2) Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takahashi T
Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer
J Radiat Res (Tokyo). 51:1-8, 2010. 査読有
- 3) Suzuki Y, Shirai K, Oka K, et al.
Higher pAkt Expression Predicts a Significant Worse Prognosis in Glioblastomas
J Radiat Res (Tokyo). 2010 in press 査読有
- 4) Zhang M, Coen JJ, Suzuki Y, et al.
Survivin is a Potential Mediator of Prostate Cancer Metastasis
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010 in press 査読有
- 5) Shirai K, Suzuki Y, Oka K, et al.
Nuclear Survivin Expression Predicts Poorer Prognosis in Glioblastoma
J Neurooncol. 2009;91(3):353-8 査読有
- 6) Suzuki Y, Nakano N, Ohno T, et al.
Prognostic Impact of Mitotic Index Of Proliferating Cell Populations (pMI) in Cervical Cancer Patients Treated with Carbon Ion Beam.

Cancer. 2009;115(9):1875-82. 査読有

- 7) Zhang M, Ho A, Hammond EH, Suzuki Y, et al.
Prognostic Value of Survivin in Locally Advanced Prostate Cancer
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 15;73(4):1033-42. 査読有
 - 8) Al-Jahdari W, Suzuki Y, Yoshida Y, et al.
The radiobiological effectiveness of carbon- ion beams on growing neurons
Int J Radat Biol. 2009;85(8):700-709. 査読有
 - 9) Noda S, Lautenschlaeger T, Suzuki Y, et al.
Technological Advances in Radiation Oncology for Central Nervous System Tumors
Semin Radiat Oncol. 2009;19(3):179-186. 査読有
 - 10) Okamoto M, Suzuki Y, Shirai K, et al.
Effect of Irradiation on the Development of Immature Hippocampal Neurons In Vitro.
Radiat Res. 2009 Dec;172(6):718-724. 査読有
- [学会発表] (計 6 件)
- 1) Suzuki Y (Invited lecture)
Carbon beam therapy overcomes hypoxia-originating radiation-resistant nature of uterine cervical cancer.
ERSC Winter Symposium, Feb. 22, 2010, Maebashi, Japan
 - 2) 鈴木義行 (招待講演)
光子線および重粒子線治療された子宮頸癌患者における、放射線治療中の細胞動態

と治療効果

第12回癌治療増感研究シンポジウム、2010年2月13-14日、奈良、奈良

3) Al-Jahdari WS, Suzuki Y, et al.
Role Of Nitric Oxide (NO) In Hypoxic Cancer cells Radio-Sensitivity
ASTRO: the 2009 Annual meeting, Nov. 1-5, 2009, Chicago, IL, USA

4) Y. Suzuki, K. Oka, et al
Prognostic Impact of Mitotic Index Of Proliferating Cell Populations (pMI) in Cervical Cancer Patients Treated with Carbon Ion Beam.
PTCOG: the 48th meeting, Sep. 28- Oct. 5, 2009, Heidelberg, Germany

5) Inoue K, Nozaki A, Suzuki Y, et al
Multisession Cyberknife radiosurgery for large brain metastasis
Inter. Stereotactic Radiosurgery, Jun. 8-11, 2009, Seoul, Korea

6) 鈴木義行
新時代の免疫療法と高精度放射線治療の併用治療戦略
群馬大学 がんプロフェッショナル養成プランインテンシブコース 第1回、2009年5月16日、前橋、群馬

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木義行 (SUZUKI YOSHIYUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60334116

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：