

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791234

研究課題名（和文） マウス悪性黒色腫由来細胞の高転移能に対する重粒子線の影響

研究課題名（英文） Effect of carbon-ion beams for highly metastatic potentials of mouse malignant melanomas

研究代表者

松本 孔貴（MATSUMOTO YOSHITAKA）

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・研究員

研究者番号：70510395

研究成果の概要（和文）：

本研究では高転移性がんの生存率及び転移能に対する炭素線と光子線の効果を細胞及び動物実験にて調べた。その結果、炭素線は細胞致死だけでなく遊走、浸潤、接着など転移に関わる因子の抑制効果についても光子線より優れている事が明らかとなった。また、動物実験においても、炭素線は光子線よりも顕著に肺転移数を抑制し、その効果は腫瘍内細胞致死における等効果線量で比べた場合でも顕著であった。炭素線などの高LET放射線は γ 線やX線などの光子線に比べ有意に転移を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the effects of the carbon-ion beam (C-ions) and photon beam to the cytotoxic affects and metastasis abilities of highly metastatic cancer were investigated using cell and animal experiments. C-ions showed superior effects to not only cell death but also inhibition of cell migration, invasion and adhesion abilities concerned with metastasis than photons. Additionally, the C-ions significantly suppressed the number of lung metastasis compared with photons in animal experiment, and the effect was remarkable even when compared with biological iso-effective dose on tumor cell survival. It was suggested that high-LET radiation, such as C-ions, would suppress the metastasis significantly compared with photon beams, such as a gamma ray and X-rays.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：粒子線治療

1. 研究開始当初の背景

日本では癌による死亡者数が1981年以降

死亡原因の第 1 位となっており、2005 年には 30 万人以上が癌で死亡している。癌の治療法として、従来は外科的治療が第 1 選択であったが、放射線治療に関わる様々な技術の目覚ましい進歩により、現在日本でも癌患者の 3 人に 1 人が放射線治療の恩恵に与っている。近年、癌の診断技術や三次元治療計画装置、外部放射線治療機器の高性能化により、放射線を病変の形状に正確に一致させて照射する定位放射線治療や優れた深部線量分布を有する重粒子線治療などが行われている。これにより、外部照射で限りなく腫瘍部分に放射線量を集中させることが可能となり、癌の局所制御は飛躍的に向上してきている。一方で、癌死亡者数の約 3 分の 2 に転移や再発が関与していることから、線量集中と線量増加により局所制御率の向上が得られても、治療成績全体の向上には単純には結びつかないことが想像できる。

放射線治療の転移に対する影響は古くから着目されており、X 線や γ 線により転移が促進される結果を示した臨床報告や基礎研究が多々見られるものの、結論には未だ達していない。一方で、重粒子線に関する報告は極めて少なく、重粒子線の転移に対する影響を語る材料は充分ではない。本研究では、癌の転移数及び転移能と重粒子線の線量及び LET との相関関係を明らかにし、重粒子線治療後の転移を抑制し生存率向上を目指した戦略遂行に役立つ基礎データの取得を目的とする。

放医研では重粒子線治療施設（以下、HIMAC）を用いた炭素線治療の臨床試行が 1994 年から始まり、2008 年 3 月までに 3800 症例以上の治療を行っている。優れた線量分布（物理学的利点）と強い生物効果（生物学的利点）により、従来の光子線治療に難治性を示す様々な癌に対して炭素線治療の優れた効果が確認されてきている。しかし、悪性黒色腫や睪腺癌、悪性神経膠腫など、癌の種類によっては治療後の遠隔転移が問題となり生存率の低下を招いている⁴⁾。中でも頭頸部悪性黒色腫は、炭素線で優れた 3 年局所制御率（80-90%）が得られる反面、遠隔転移による 5 年生存率の低下（50%程度）が見られる代表的な疾患と言える⁴⁾。このような癌に対する重粒子線の治療成績を向上させるには、転移に対する重粒子線の効果を明確にし、それに加え転移を抑制する薬剤との併用療法などの確立が急務である。数少ない重粒子線の転移に対する効果を調べた研究では、

重粒子線照射後の骨肉腫細胞や膠芽腫細胞の転移能は、X 線照射後のそれより抑制されるなど炭素線の有効性を報告している。しかし、生存率、浸潤能、接着能の評価は完全な *in vitro* 環境下での培養細胞を用いており、動物移植モデルを用いて腫瘍内環境を反映した細胞での解析が必要である。動物実験においては人工肺転移モデルでの評価のみが報告されており⁶⁾、自然肺転移モデルを用いてすべての形成過程を包括した転移に対する重粒子線の効果を評価することが必須の課題である。さらに、転移と照射線量及び LET との相関を明らかにすることができれば、重粒子線の更なる有用性を示すことができ、転移が多発する癌に対する新しい重粒子線治療法（イオン種の使い分けなど）の提案が可能となると考える。このような背景を踏まえ、重粒子線の転移に対する効果の解明のための以下の戦略を提案する。

2. 研究の目的

本研究では、高転移性がん細胞に対して炭素線を照射した場合の細胞致死効果と転移抑制効果の線量依存性及び LET 依存性を細胞及び動物実験の両面にて評価し、基準放射線である X 線との比較を行い、転移抑制の点での高 LET 放射線の有用性を提唱する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

実験には高転移性を有するマウス悪性黒色腫由来細胞 B16/BL6 を用いた。移植実験では 7-8 週齢の C3H/He マウス（メス）を用いた。

(2) 放射線照射

細胞及び移植腫瘍への炭素線照射は、それぞれ LET=13, 50, 75 keV/ μ m に相当する異なる 3 つの深さで行った。生物効果の評価に必要な基準放射線として低 LET 放射線を用い、細胞実験では X 線、動物実験では γ 線を用いた。

(3) *in vitro* 環境下での細胞生存率

細胞生存率はコロニー形成法により求めた。50 個以上の細胞からなるコロニーを 1 つの生存細胞由来として生存率を求め、生存率曲線を取得した。曲線のフッティングには Linear-Quadratic model の式を用いた

(4) 遊走能、浸潤能及び接着能の測定

転移能の指標となる遊走能、浸潤能、接着能は、それぞれ Boyden chamber assay、Matrigel invasion assay、Cell adhesion assay を用いて求めた。照射後の細胞をそれぞれのアッセイ系で処置し、遊走は 6 時間、浸潤は 24 時間、接着は 2 時間のインキュベートをを行った (図 1)。

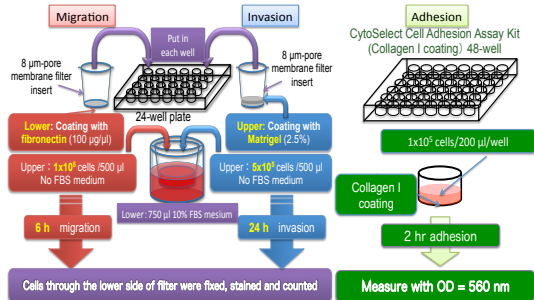


図 1 転移能実験プロトコル

(5) in vivo 環境下 (腫瘍環境下) での細胞生存率

B16/BL6 細胞を C3H/He マウスの右下肢に $1 \times 10^6 / 10 \mu\text{l}$ /マウスの濃度で移植し、腫瘍が $7.5 \pm 0.5 \text{ mm}$ 径に成育した時点で照射を行った。照射後腫瘍を外科的に取り出し、外科ばさみにより細かくした後トリプシン処理で単細胞化した。その後は方法 (3) に示す通常のコロニー形成法を行い、腫瘍内細胞生存率を求めた (図 2)。

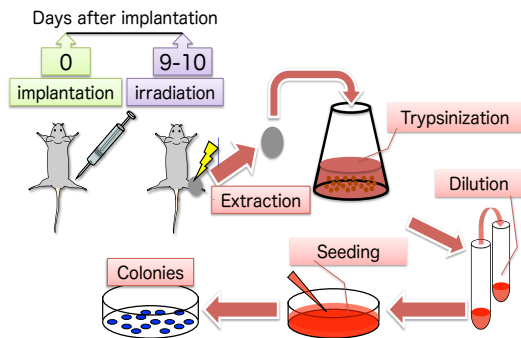


図 2 in vivo-in vitro 実験プロトコル

(6) 原発巣から形成された肺転移数の評価

照射までのプロトコルは方法 (5) に準ずる。悪性度の高い B16/BL6 腫瘍によるマウス個体の死亡を回避するため、照射後 3 日の時点で外科的に原発巣を摘出した。移植後 35 日 (5 週間) の時点でマウスを屠殺し、肺を摘出してブアン液にて固定・染色を行った。倒立顕微鏡下で肺に形成された転移結節数を計数した (図 3)。

4. 研究成果

(1) in vitro 環境下での細胞致死に対する炭素線の効果

照射後の細胞生存率を求めた結果、炭素線

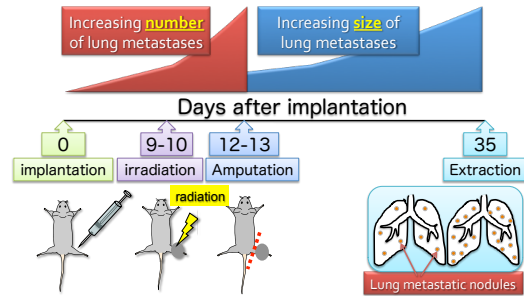


図 3 自然肺転移実験モデルプロトコル

の優れた細胞致死効果が確認された (図 4)。また、生物学的等効果線量である D_{10} (10% 生存率線量) から炭素線の生物学的効果比 (以下、RBE) を求めた結果、13, 50, 75 keV/ μm に対してそれぞれ 1.3, 2.0 及び 2.5 であった。

(2) 遊走能、浸潤能、接着能に対する炭素線の効果

X 線照射後、0.5-1.0 Gy の低線量域におい

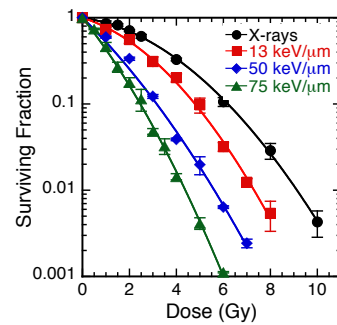


図 4. 照射後の細胞生存率

て遊走能及び浸潤能が一過性に亢進される可能性が示唆された (図 5a, b)。その線量域を超えると遊走能、浸潤能、接着能共に線量依存的に抑制された (図 5)。

一方、炭素線照射後が細胞の遊走能、浸潤能、接着能が低線量域も含めて線量依存的に抑制され、その効果は LET が高くなるにつれより顕著であることが明らかとなった (図 5)。

生物学的等効果線量から細胞致死も含めた各 end point での炭素線の RBE を求めた結果、炭素線の効果は細胞致死よりも転移抑制でより顕著であることが明らかとなった (図 5d)

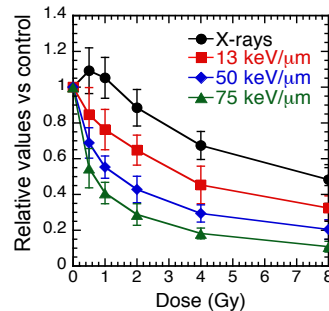


図 5a 照射後の遊走能

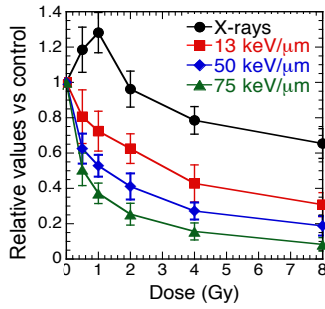


図 5b 照射後の浸潤能の変化

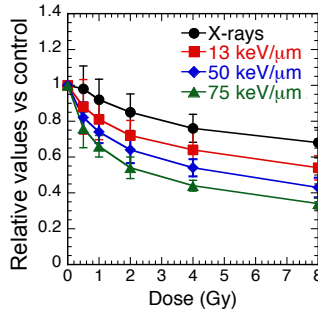


図 5c 照射後の接着能変化

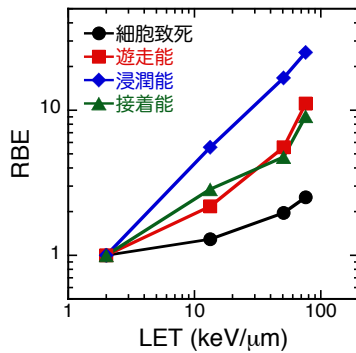


図 5d 各 endpoint における RBE

(3) in vivo (腫瘍) 環境下での腫瘍内細胞致死に対する炭素線の効果

腫瘍環境において照射を行った場合においても、in vitro 条件下と同様にγ線に比べ炭素線が優れた細胞致死効果を示した(図6)。炭素線の RBE を求めた結果、14, 50, 75 keV/μm においてそれぞれ 1.2, 1.8, 2.6 であった。

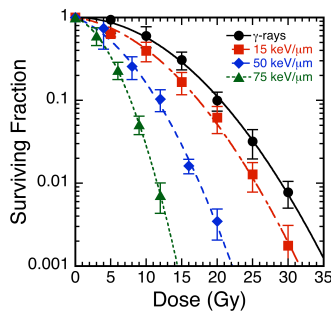


図 6 腫瘍内細胞生存率

(4) 原発巣照射後の肺転移数の変化

原発巣に対して炭素線及びγ線照射後の肺転移数を調べた結果、線量依存的に肺転移数が抑制され、その効果はγ線に比べ炭素線照射群でより顕著だった(図7)。また、この抑制効果は LET が大きくなるにつれより強い物であった。

さらに、in vivo-in vitro アッセイから得られた腫瘍内細胞生存率から、同じ生存率レベルで肺転移数を比較した場合においても、炭素線はより顕著に転移を抑えることが明らかとなった(図8)。

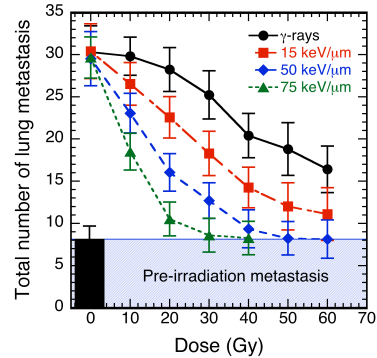


図 7 照射後の肺転移数変化

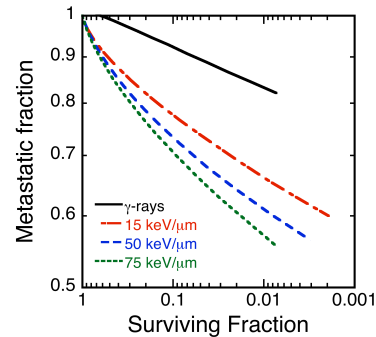


図 8 腫瘍内細胞生存率と肺転移数の関係

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 14 件)

- ① 松本 孔貴、がん転移に対する放射線影響研究～歴史的背景と近況～、放射線生物研究、査読無し、46: 247-270 (2011)。
- ② Hiroyuki Okamoto, Toshiyuki Kohno, Tatsuaki Kanai, Yuki Kase, Yoshitaka Matsumoto, et al., Microdosimetric study on influence of low energy photons on relative biological effectiveness under therapeutic conditions using 6 MV linac. Med. Phys. 査読有り, 38: 4714-4722 (2011)
- ③ Ping Li, Libin Zhou, Zhongying Dai,

- Xiaodong Jin, Xinguo Liu, Yoshitaka Matsumoto, et al., High LET radiation enhances nocodazole induced cell death in HeLa cells through mitotic catastrophe and apoptosis. *J. Radiat. Res.* 査読有り, 52: 481-489 (2011)
- ④ Xiaodong Jin, Qiang Li, Qinggeng Wu, Ping Li, Yoshitaka Matsumoto, et al., Radiosensitization by inhibiting Survivin in human hepatoma HepG2 cells to high-LET radiation. *J. Radiat. Res.* 査読有り, 52: 335-341 (2011)
- ⑤ Xing Cui, Kazuhiko Oonishi, Hirohiko Tsujii, Takeshi Yasuda, Yoshitaka Matsumoto, et al., Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays. *Cancer Res.* 査読有り, 71: 3676-3687 (2011)
- ⑥ Hiroyuki Okamoto, Tatsuaki Kanai, Yuki Kase, Yoshitaka Matsumoto, et al., Relation between lineal energy distribution and relative biological effectiveness for photon beams according to the microdosimetric kinetic model. *J. Radiat. Res.* 査読有り, 52: 75-81 (2011)
- ⑦ Ryoichi Hirayama, Akiko Uzawa, Yoshitaka Matsumoto, et al., Induction of DNA DSB and its rejoining in clamped and non-clamped tumours after exposure to carbon ion beams in comparison to X rays. *Radiat. Prot. Dosim.* 査読有り, 143: 508-512 (2011)
- ⑧ Shin-ichiro Masunaga, Yoshitaka Matsumoto, et.al., Significance of manipulating tumour hypoxia and radiation dose rate in terms of local tumour response and lung metastatic potential, referring to the response of quiescent cell populations. *Br. J. Radiol.* 査読有り, 83: 776-784 (2010)
- ⑨ Arata Tomiyama, Ken Tachibana, Kaori Suzuki, Shizuka Seino, Jun Sunayama, Yoshitaka Matsumoto, et.al., MEK-ERK-dependent multiple caspase activation by mitochondrial proapoptotic Bcl-2 family proteins is essential for heavy ion irradiation-induced glioma cell death. *Cell Death Dis.* 査読有り, 29: 1-13 (2010)
- ⑩ Taeko Matsuura, Yusuke Egashira, Teiji Nishio, Yoshitaka Matsumoto, et.al., Apparent absence of a proton beam dose rate effect and possible differences in RBE between Bragg peak and plateau. *Med. Phys.* 査読有り, 37: 5376-5381 (2010)
- ⑪ Taku Inaniwa, Takuji Furukawa, Yuki Kase, Naruhiro Matsufuji, Toshiyuki Toshito, Yoshitaka Matsumoto, et.al., Treatment planning for carbon-ion scanning irradiation with modified Microdosimetric Kinetic Model. *Phys Med Biol* 55: 6721-6737 (2010)
- ⑫ Shin-ichiro Masunaga, Yoshitaka Matsumoto, et.al., Significance of manipulating intratumor hypoxia in the effect on lung metastases in radiotherapy, with reference to its effect on the sensitivity of intratumor quiescent cells. *Clin. Exp. Metastasis* 査読有り, 26: 693-700 (2009)
- ⑬ Akiko Uzawa, Koichi Ando, Sachiko Koike, Yoshiya Furusawa, Yoshitaka Matsumoto, et.al., Comparison of Biological effectiveness of Carbon-Ion Beams in Japan and Germany. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 査読有り, 73: 1545-1551 (2009)
- ⑭ Ryoichi Hirayama, Atsushi Ito, Masanori Tomita, Teruyo Tsukada, Fumio Yatagai, Miho Noguchi, Yoshitaka Matsumoto, et al., Contributions of direct and indirect actions in cell killing by high LET radiations. *Radiat. Res.* 査読有り, 171: 212-218 (2009)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 松本孔貴、鶴澤玲子、平山亮一、小池幸子、和田麻美、鶴岡千鶴、安藤興一、増永慎一郎、古澤佳也、高転移性腫瘍に対する分割照射の影響、日本放射線影響学会第 54 回大会 (神戸) 2011 年 11 月
- ② Yoshitaka Matsumoto、Enhanced Radiobiological Effects at Distal-End of Proton SOBP Beam. International Open Laboratory Radiation Quality Research Unit Kick-Off Meeting (Darmstadt) Sep. 2011
- ③ 松本孔貴、鶴澤玲子、平山亮一、小池幸子、岡安隆一、安藤興一、増永慎一郎、古澤佳也、重粒子線の転移抑制効果～in vitro、in vivo 両面からの評価～、日本放射線影響学会第 53 回大会 (京都) 2010 年 10 月
- ④ Yoshitaka Matsumoto、Akiko Uzawa、Ryoichi Hirayama、Sachiko Koike、Ryuichi Okayasu、Koichi Ando、Shin-ichiro Masunaga、Yoshiya Furusawa、

Tumor metastasis exposed to high-LET radiations, NIRS-KI Joint Symposium on Carbon Ion Therapy (Stochholm) 2010年9月

- ⑤ 松本孔貴、鶴澤玲子、平山亮一、小池幸子、安藤興一、増永慎一郎、古澤佳也、マウス悪性黒色腫由来細胞の高転移能に対する重粒子線の影響、第49回日本医学放射線学会生物部会学術大会&第40回放射線による制癌シンポジウム(札幌) 2010年7月
- ⑥ 松本孔貴、小池幸子、鶴澤玲子、平山亮一、岡安隆一、安藤興一、増永慎一郎、古澤佳也：マウス悪性黒色腫の高転移能に対する重粒子線の影響、第19回日本がん転移学会学術集会・総会(金沢) 2010年6月
- ⑦ Yoshitaka Matsumoto, Taku Inaniwa, Mami Wada, Yuki Kase, Shinji Satou, Takuji Furukawa, Eri Takeshita, Takeshi Himukai, Kouji Noda, Thilo Elsasser, Michael Sholz, Naruhiro Matsufuji, Yoshiya Furusawa, Comparison of Biological Efficiencies of Scanning and Broad Carbon-ion Beams, 49th Annual Meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group (前橋) 2010年5月
- ⑧ Yoshitaka Matsumoto, Sachiko Koike, Akiko Uzawa, Ryoichi Hirayama, Ryuichi Okayasu, Koichi Ando, Shin-ichiro Masunaga and Yoshiya Furusawa, The effects of heavy-ion and photon beams to mouse malignant melanoma cell line having highly metastatic potential, 49th Annual Meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group (前橋) 2010年5月
- ⑨ 松本孔貴、小池幸子、鶴澤玲子、平山亮一、崔星、高瀬信宏、安藤興一、岡安隆一、古澤佳也、高転移能を有するマウス悪性黒色腫由来細胞に対する重粒子線と光子線の効果、日本放射線影響学会第52回大会(広島) 2009年11月
- ⑩ Yoshitaka Matsumoto, Ryoichi Hirayama, Sei Sai, Koichi Ando, Akiko Uzawa, Nobuhiro Takase, Sachiko Koike, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa, ABROGATION OF THE G2/M ARREST ENHANCED THE CYTOTOXIC EFFECTS BY CARBON-ION BEAMS, 15th International Symposium on microdosimetry (Italy) 2009年10月
- ⑪ 松本孔貴、マウス悪性黒色腫由来細胞の高転移能に対する重粒子線の影響、平成21年度京都大学原子炉実験所専門研究会(熊取) 2009年8月
- ⑫ 松本孔貴、RBE for ion beam therapy at high dose, 4th NIRS International Open

Laboratory Workshop on Cellular and Molecular Effects of Light Ions (Chiba) 2009年4月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 孔貴 (MATSUMOTO YOSHITAKA)
独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医学センター・研究員
研究者番号：70510395

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：