

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 25 年 06 月 16 日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591586
 研究課題名（和文） 高輝度放射光のマイクロビーム照射が脳腫瘍を選択的に壊死させる機序について
 研究課題名（英文） Selective brain tumor cell death caused by synchrotron microbeam X-ray radiation
 研究代表者
 近藤 威 (KONDOH TAKESHI)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：50273769

研究成果の概要（和文）：実験的に 100Gy 以上の線量の平板状放射線を幅数十ミクロン程度で照射すると、照射された幅（peak 領域）の領域は細胞死に陥ることが確認された。隣接する非照射領域（valley 領域）は細胞死に至らず、結果として照射された脳組織の構築は保たれた。さらに、この X 線を 200 ミクロン間隔のすだれ状（あるいは格子状）にしてラット大脳半球に照射しても脳の構築は保たれた。

組織学的には、正常脳組織では高線量が当たった peak 領域で 1 週間程度かかって神経細胞死が完成する。一方、毛細血管は microbeam で分断されても血流低下を来すまでには至らない。また、慢性期になっても反応性の血管内皮増殖は無視でき、閉塞性機転を示すこともない。細動脈レベルや頸動脈でも高線量 microbeam 照射で血管内皮の反応は乏しい。

研究成果の概要（英文）：Microbeam radiation therapy (MRT) with wide (100 μm) peak width in co-planar or cross planar manner was applied on human U251 glioma cells and compared with narrow (20 μm) MRT. X-ray was generated at SPring-8, a large scale synchrotron radiation facility, and newly designed adjustable collimator was used. Spacing distances on center of beams in wide and narrow width microbeam were 500 μm and 100 μm , setting the same ratio to beam width of five. Narrow width MRT provide sufficient antitumoral effect at the peak dose of 130 Gy. Wide MRT has less effect, but in cross-planar manner or by repeating twice, wide MRT showed comparative effect to narrow MRT. Apoptotic cell death did not increased in neither wide nor narrow MRT, indicating direct cell death did not account for tumor growth suppression. Functional mechanisms in cell and tissue biology is essential for clinical purpose of MRT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脳腫瘍、高輝度放射光、放射線治療、マイクロビーム

1. 研究開始当初の背景

これまでの放射線治療の戦略は、癌細胞に効率よく高エネルギー線量をあてることを目

的としてきた。MRT が学術的に画期的な点は、腫瘍組織を“すだれ状”に細胞を死滅させることであり、これまでの線量に依存して腫瘍

全体を抑制しようとする原理と根本的に異なる。現在我々が使用している条件では“すだれ”の幅は 25um であり、ひとつの腫瘍細胞の径に匹敵する精度を誇る。

国内の研究動向：このような精度の高い MRT 実験を行うため、第三世代シンクロトン設備から作られる拡散のほとんどない平行な放射光を使う必要がある。国内では研究可能な施設が限られており、悪性脳腫瘍を用いて研究発表を行っているのは我々のグループだけである(2007年2008年2009年日本脳神経外科学会総会、2007年2008年癌学会総会、2009年日本放射線腫瘍学会、2009年日本脳腫瘍学会)。これまで他の研究グループからは、わずかに放医研グループが正常ラットの小脳への照射後のアポトーシスについて検討した例があるが、論文未発表で中断された。我々は、これまで不可能であったマイクロミリメートル単位での照射線量測定の手法を2年間かかって開発し、すでに論文発表を行った。

国外の研究動向：国外での MRT 研究は Dilmanian らのグループが先行している。国外での研究は主に生存率と照射条件に重きを置いた研究のみである。生存率が伸びる理論について、腫瘍の増殖抑制と正常脳の保護の観点からはなんら検討が加えられていない。MRT では非照射範囲が広いので(“すだれ”の間の谷の部分)、MRT を治療の中に組み入れることにより broad 照射よりも放射線耐性を克服できる理論的根拠がある。さらには、正常脳組織における放射線障害と神経幹細胞についても、神経幹細胞が脆弱であることが知られ、谷を持った「すだれ状」放射線は正常神経細胞保持の点でも有利である。

これまでの研究：我々は、2006年夏より SPring-8 にて MRT 照射実験を開始し、これまで右図のように、C6 rat glioma 細胞を移植したラットで MRT が生存率を上昇させることを既に確認し、国際学会で報告した(2008年6月グルノーブル)。また、正常脳組織における「すだれ状」照射の peak/valley での組織反応性の違いについて、主に glial cell marker を用いて組織学的に報告した(2007年癌学会総会)。脳血流測定については、

SPring-8 で照射後を秋田脳研にて MRI 撮像を繰り返しており、正常脳での照射後血流低下と脳浮腫について既にパイロットデータを得ている(2008、2009年日本脳神経外科総会、癌学会)。

2. 研究の目的

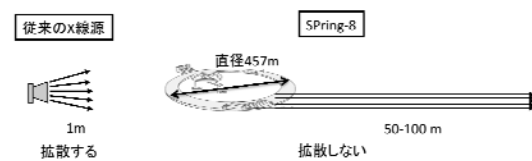
1) 本研究の目的は、高輝度放射光設備(SPring-8)を用いて、幅 25 ミクロンの X 線照射(microbeam radiation treatment: MRT)を“すだれ状”あるいは“格子状”に行い、新たな悪性脳腫瘍の治療手段となることを実験的に検証することである。

2) これまで4年間の実験の経験を踏まえて、脳内での腫瘍新生血管と正常脳内血管の MRT に対する反応性の違いに着目し、HIF(Hypoxia-inducible factor)の関与を判定する。また、内在性神経幹細胞の照射後の脳再生に果たす可能性についても評価を加えた。

3) 臨床応用に向けては、高輝度放射光設備ではなく、医療用 X 線源を用いたミリ単位のすだれ状照射でどこまで効果を発揮することが出来るかを検証することが重要であり、本年度新たに導入された可変式コリメータを用いた実験を行った。

3. 研究の方法

① 兵庫県播磨の高輝度光科学研究センター(SPring-8)のBL28B2第2光学ハッチを用いる。線量計測用イオンチェンバー、マイクロスリットとこれの位置合わせ機構、ハッチ据付のメインゴニオメータの上に載せた実験動物または培養細胞、照射位置確認用の画像検出器の順で配置する。



② ハッチ据付の X 線シャッターで照射時間を制御して、すだれ状マイクロビームを実験動物に照射する。

細胞株：C6 glioma細胞株を試料とした。
照射条件：microbeamとして、co-planar microbeam, seamless (broad) beam の2種の方法を一回照射法で検討する。マイクロコリメータの設定：beam幅を10-100um、

beam間隔を100umから1000umまでを分ける。このため新たに開発中の可変式コリメータを使用する。また、doseとしては、一回照射なので2Gyから300Gyまでの間で subgroup を分けた。

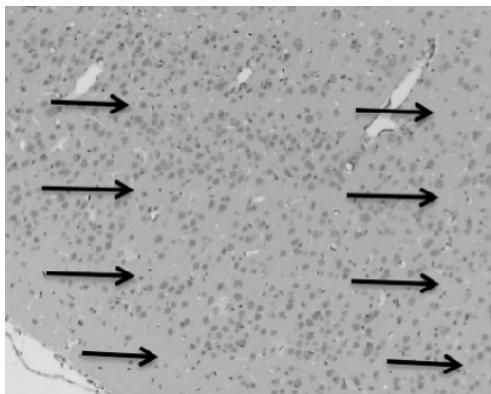
③正常ラットで生存率をdoseおよびbeam幅beam間隔の3パラメータで評価し、動物個体としての照射可能な最大線量を決定する。生存ラットでの照射脳の組織学的ダメージを評価し、神経細胞の脱落と新生血管の異常について、各種マーカーを用い、免疫染色を行った。

4. 研究成果

<正常生体の反応>

このすだれ状に並べた microbeam を、腫瘍を含めた正常組織全体に一回照射で高線量を照射するのが、MRT の手法である。peak線量はおよそ 100-500 Gy であり、これだけの高線量が当たるのであるから、peak幅(20 μm)にほぼ一致した線状の領域は壊死に陥る。これは正常組織であろうと、腫瘍組織であろうと差異はない。

血管の壊死も生じるわけで、peak部分に一致した出血がもたらされるかということ、わずか20ミクロンの幅の血管腔(毛細血管)の障害では、血管の破綻までは生じない。また、細動脈レベルでも照射実験を行ったが、高線量照射でも、形態学的な異常は全く認められず、血流の途絶は起きなかった。



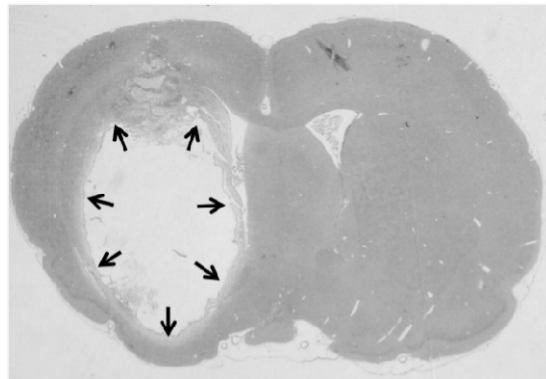
それでは valley部分の生物学的反応はどうであろうか?正常組織での valley部分、すなわち非照射領域の反応は、その構築は基本的には破壊されずに保たれている。脳組織では神経線維のネットワークが分断

されて多少の神経細胞の退行変性が生じているかもしれない。マクロで見て若干の脳萎縮は生じている。照射後急性期には目立った変化はなく、1週間程度かかって、peak領域の細胞脱落がはっきりとしてきて、これは数ヵ月後でも変化なく存在する。

なお、正常脳では反応性アストロサイトが valley部に広範囲に出現しており、valley部では損傷脳周囲の再生反応がミクロレベルで生じていることが予想される。

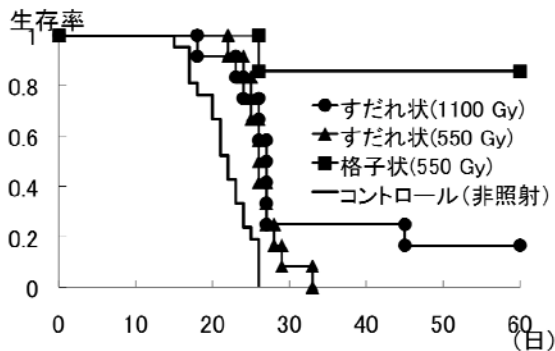
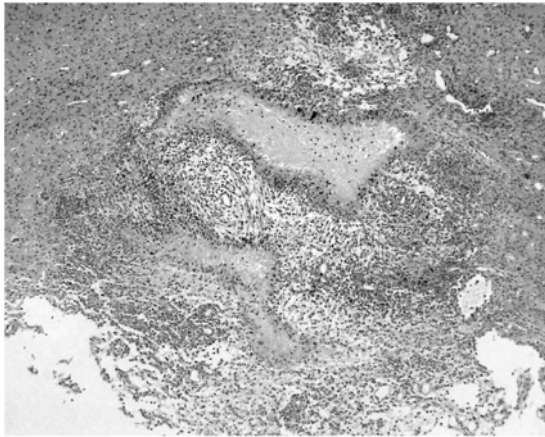
<腫瘍組織の反応>

一方腫瘍組織では、valley部分を含めた全体に劇的な変化が生じる。抗腫瘍効果を高めるために、現在では水平にスリットを



重ねた「すだれ状」照射から、すだれ状一回照射後直ちに動物を90°体位を変えてもう一回すだれ状照射を行う「格子状」照射を行っているので、その結果を提示する。一側大脳半球に腫瘍が存在したと思われるだけの腔を残して腫瘍細胞は全滅しているのがわかる。

周辺の正常脳には「格子状」の照射跡が確認され、確かに半側脳全体に microbeam が照射されたことは確認できる。このような変化はいつ始まっているかを確認するために、照射後急性期に組織を取り出してみると、わずか数日で腫瘍内腔の壊死と出血性変化が認められた。この反応は、peak、valleyの区別なく、腫瘍組織内全体に起きている。

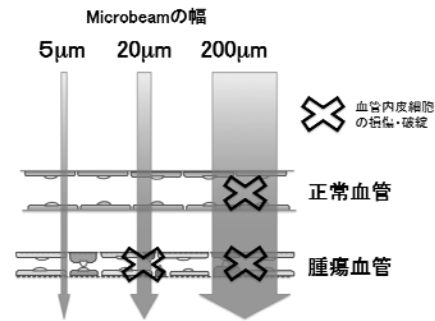


照射の条件を各種変えてみたところ、最もラットの生存率が良好であったグループは、peak線量550 Gyのすだれ状microbeamX線を格子状に組み合わせたグループで、平均生存率51日(非照射コントロールグループ;21日)であった。

<臨床医学応用へ向けての意義>

放射線治療は癌の治療上欠かせない手段であるにもかかわらず、その生物学的な基礎実験は、分子標的治療や遺伝子治療の基礎実験に比べて極端に少ない。高線量を高精度に標的腫瘍に照射する、という従来のアプローチは転移性脳腫瘍を始めとする固形癌には間違いのないアプローチであるが、び慢性浸潤性の癌や播種した癌に対しては限界があることも当然である。腫瘍内の微小環境における循環代謝の変化が鍵と考えられるマイクロビーム空間的分割照射の研究は、未だ基礎的な観察に過ぎないが、癌を制御するための手法を考える上で、一つのヒントを提示しているものと考えられる。

高線量を高精度に標的腫瘍に照射するというアプローチは境界が鮮明な腫瘍に適し



たアプローチであるが、浸潤性の悪性脳腫瘍に対しては限界がある。微小環境における低酸素状態を標的とするマイクロ単位の高線量空間的分割照射は、放射線利用の新たな領域を開く可能性がある。

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) Uyama A, Kondoh T, Nariyama N, (他4名、2番目) 査読有 A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an in vivo study using implanted human glioma cells. J Synchrotron Radiat. 18: 671-678, 2011. doi: 10.1107/S090904951101185X

(2) Nariyama N, Umetani K, Shinohara K, (他3名、4番目) 査読有 Micro-Scale Dose Distribution of Microplanar X Rays from Synchrotron Radiation: Measurement and Monte Carlo Calculation Progress in NUCLEAR SCIENCE and TECHNOLOGY, Vol. 2, pp.312-317, 2011.

(3) Nagano T, Kotani Y, Kobayashi K, (他7名、9番目) 査読有 Long-term outcome after multidisciplinary approach for leptomeningeal carcinomatosis in a non-small cell lung cancer patient with poor performance status. Intern Med. 50(24):3019-3022, 2011. PMID: 22185996

(4) Nakamizo S, Sasayama T, Kondoh T, (他8名、3番目) 査読有 Supratentorial pure cortical ependymoma. J Clin Neurosci. 19(10):1453-1455, 2012. 2. doi: 10.1016/j.jocn.2011.09.039.

東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：60156809

(5) 近藤威、甲村英二、篠原邦夫、(他1名、1番目)、査読無、空間的分割照射:格子状X線平板ビーム照射、『新時代の脳腫瘍学』日本臨牀 68 卷 増刊号 10 号 pp432-436, 日本臨牀社、2010 年

〔学会発表〕(計5件)

(1) 近藤 威、篠原邦夫、福本 学、成山展照、梅谷啓二、「高輝度放射光を用いたがん治療の研究」第73回応用物理学会学術講演会(2012.9.09-12)愛媛

(2) 近藤 威、福本 学、栗原 愛、梅谷啓二、篠原邦夫、「白色X線マイクロビームの実験動物への照射実験」日本放射線影響学会第55回大会(2012/09/06-07)仙台

(3) 近藤 威、シンポジウム「脳腫瘍の放射線治療に伴う脳壊死—機序と対策」

「Microbeam X線照射による 選択的腫瘍壊死」日本放射線腫瘍学会第24回学術大会(2011.11.17-19)神戸

(4) Takeshi Kondoh, Atsushi Uyama, Eiji Kohmura, Ai Kurihara, Manabu Fukumoto, Nobuteru Nariyama, Keiji Umetani, and Kunio Shinohara, “Histology of Glioma and Normal Brain Tissue after Microbeam Irradiation” 10th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation and 6th International Workshop on Medical Applications of Synchrotron Radiation (2010.02.15-18) Melbourne, Australia

(5) 近藤 威、篠原邦夫、梅谷啓二、「放射線照射を1mm以下に絞ったら何が起きるか？」第3回放射線外科学会(2012.1.14)大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 威 (KONDOH TAKESHI)
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：50273769

(2) 研究分担者

甲村 英二 (KOHMURA EIJI)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30225388
篠山 隆司 (SASAYAMA TAKASHI)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10379399

(3) 連携研究者

福本 学 (FUKUMOTO MANABU)