

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 5月20日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究B

研究期間：2010～2012

課題番号：22791198

研究課題名（和文） Ad-p53 遺伝子治療併用粒子線治療に関する基礎的研究

研究課題名（英文） A fundamental study for particle radiotherapy with concurrent gene therapy using Ad-p53

研究代表者

宮脇 大輔 (MIYAWAKI DAISUKE)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30546502

研究成果の概要（和文）：過酸化チタンナノ粒子を用いた実験では、*in vitro* で、様々な ROS 反応試薬によるラジカルの同定を行い OH の可能性が高いことを確かめた。*in vivo* ではナノ粒子と放射線との併用により高い抗腫瘍効果を示すことを確かめた。MGDG を用いた実験では、*in vitro* で MGDG と放射線併用群において、放射線単独照射群と比較して apoptosis の増加を認めた。*in vivo* でも同様に抗腫瘍効果の増強が認められた。

研究成果の概要（英文）：TiO₂NP induced ROS generation with X-ray irradiation. Tumor growth inhibitions were significantly greater in mice treated with the combination compared with those treated with X-ray alone. The combination MGDG and X-ray irradiation significantly increased the proportion of apoptotic cells *in vitro*. *In vivo* studies, tumor growth inhibitions were significantly greater in mice treated with the combination compared with those treated with X-ray alone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：放射線治療、放射線抵抗性、放射線増感作用

1. 研究開始当初の背景

本邦のがん死亡者数は1981年に脳卒中を追い抜いて第1位となって以来、年々増加の一端をたどっている。今後もこの傾向は続くと思われる。国民の健康管理において「がんの制御」は最重要事項となっている。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粒子線治療は、最近最も注目を浴びている治療法のひとつである。

荷電粒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、がん周囲の重要臓器への不必要な照射を避けられ、がんそのものへの投与線量を増加でき、高いがん制御率と少ない副作用を両立できるとされ

ている。現在臨床応用されている粒子線は陽子線と炭素イオン線であるが、生物学的効果に関しては、陽子線はX線とほぼ同等、炭素イオン線はより優れた生物効果を持つとされている。しかし、実際の臨床では、粒子線治療は線量分布や生物学的効果に優れるが、そのエネルギーが高すぎる故に、病変と隣接する正常臓器（皮膚・筋肉・脳・神経など）に対して強い副作用を引き起こすことがある。

また、1990年代初めに米国で癌に対する遺伝子治療の臨床試験が実施されて以来、進行癌に対する副作用の少ない新たな治療法として遺伝子治療が一躍脚光を浴びようになり、現在までに世界中で1,000におよぶ臨床試験が実施されており、神戸大学は国内で最初にp53遺伝子治療をホルモン抵抗性前立腺癌に施行している。また我々はp53遺伝子の放射線増感効果に関して世界でも先駆的に開発し、その報告も数多く行ってきた。基礎的検討では変異したp53を有する培養癌細胞に正常p53遺伝子を導入することにより放射線感受性が増加することが報告されている。また臨床的には肺癌患者のX線治療にp53遺伝子治療を併用することにより正常組織障害を有意に減らすことが可能であったことも報告されている。

粒子線治療に遺伝子治療を併用することで、高い抗腫瘍効果を保ちつつ、局所制御線量の低減が可能となり、正常組織障害を軽減することができると思われ。

2. 研究の目的

遺伝子治療併用粒子線治療の臨床応用への第一段階として、培養腫瘍細胞に対して、in vitro および in vivo でのアデノウイルス・ベクターを用いた p53 遺伝子治療における遺伝子導入効率の確認、抗腫瘍効果の確認、粒子線治療との併用効果の確認などの基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) in vitro での Ad-p53 遺伝子治療併用、陽子線・炭素線照射効果の比較。Ad-p53 遺伝子治療薬を感染させる期間、感染させる時期、濃度を変化させて、粒子線（陽子線および炭素イオン線）感受性を検討する。具体的には単一線量に対しての感染期間、感染させる時期、濃度を段階的に変化させ、次に照射線量も変化させ、抗腫瘍効果としての至適条件を探求し、その結果が恒常的なものか否かを検討する。Ad-p53 遺伝子導入、およびその放射線照射の抗腫瘍効果の判定には clonogenic assay 及び cell survey assay を施行する予定である。またその効果の判定のために

TUNEL assay、apoptosis 関連遺伝子である p21、BAX の mRNA の PCR 法による定量的解析及び発現蛋白質の western blotting を施行し、抗腫瘍効果が apoptosis の機序によるものか否かの判定を行う。また残存細胞は Flow cytometry による DNA histogram を施行して解析し cell cycle の同定も併せて施行する。(2) in vivo での Ad-p53 遺伝子治療併用粒子線治療の効果の評価

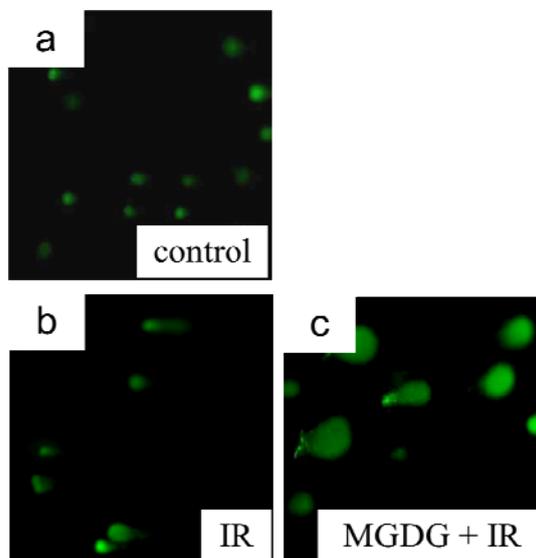
in vitro で得られた陽子線・炭素イオン線の結果が in vivo でも再現されることを確認する。in vitro 実験同様、培養細胞をヌードマウスの下腿、皮下に接種し、control 群、粒子線照射群、Ad-p53 遺伝子治療±粒子線治療群に分け、経時的に腫瘍のサイズを計測し、サイズ変化の差異を統計学的に検討する。

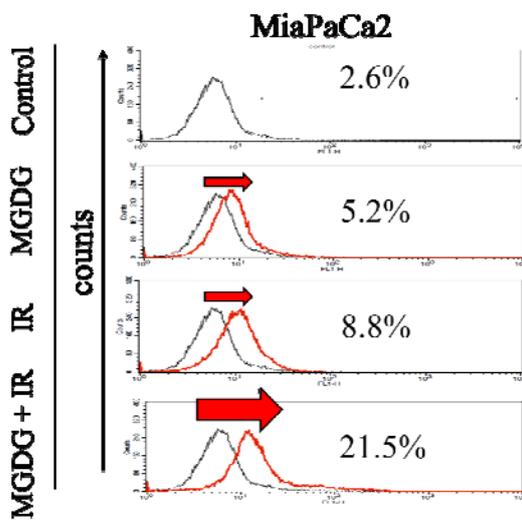
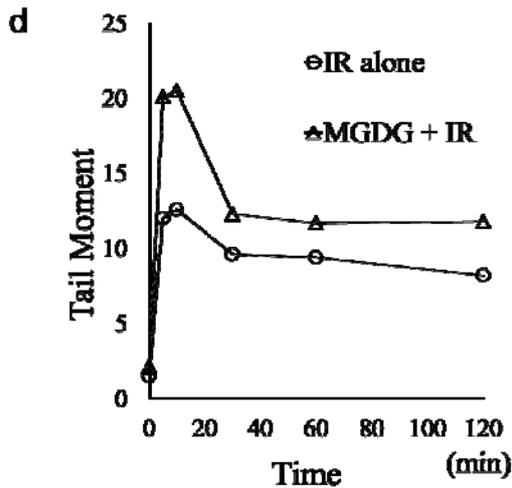
4. 研究成果

放射線増感作用について、in vitro、in vivo で様々な実験を行い、その機序・効果について確認した。

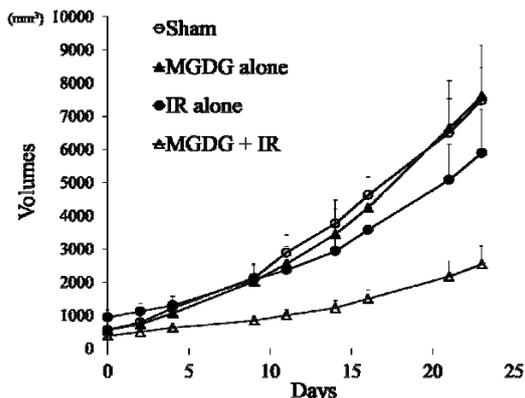
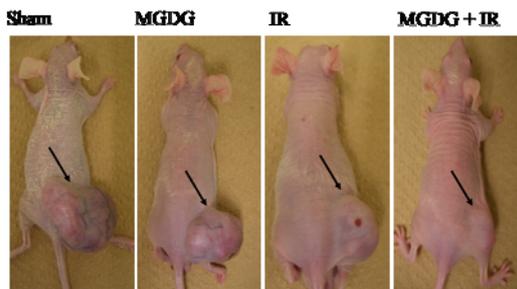
(1) 過酸化チタンナノ粒子を用いた放射線増感実験を行った。in vitro において、様々な ROS 反応試薬によるラジカルの同定を行い、OH の可能性が高いことを確かめた。また、in vivo においてはヌードマウス大腿部に腫瘍細胞を移植し、ナノ粒子と放射線との併用により高い抗腫瘍効果を示すことを確かめた。ヌードマウスを用いた実験では、腫瘍抑制効果が見られ、摘出した腫瘍には、ナノ粒子の集積が確認された。またマウスの長期生存を確認し、臓器異常の無いことも確認でき、新たな知見と考えられた。

(2) 放射線抵抗性腫瘍に対する増感作用という観点から DNA ポリメラーゼ分子種を選択的に阻害することが報告されている MGDG (monogalactosyl diacylglycerol) について、膵癌由来の癌細胞 MIA PaCa2 を用いて、in vivo、in vitro において MGDG の放射線増感効果の検討を行った。





in vitro では MGDG と放射線併用群において、MGDG 単独投与群、放射線単独照射群と比較して 3~4 倍近い apoptosis の増加を認めた。



in vivo では MGDG と放射線を併用することにより抗腫瘍効果の増強が認められた。

MGDG は放射線と併用することによって、in vitro, in vivo の双方において放射線増感効果を示した。以上より、将来的に MGDG は有効な放射線増感剤となり得る可能性が示唆され、新たな知見と考えられた。

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 9 件)

① Nishimura H, Sasaki R, Yoshida K, Miyawaki D, Okamoto Y, Kiyota N, Saito M, Otsuki N, Nibu K. Radiotherapy for Stage I or II hypopharyngeal carcinoma. J Radiat Res. 査読有 2012;53(6):892-9

② Uehara K, Sasayama T, Miyawaki D, Nishimura H, Yoshida K, Okamoto Y, Mukumoto N, Akasaka H, Nishihara M, Fujii O, Soejima T, Sugimura K, Kohmura E, Sasaki R. Patterns of failure after multimodal treatments for high-grade glioma: effectiveness of MIB-1 labeling index. Radiat Oncol. 査読有 2012;26(7):104

③ Hashimoto N, Sasaki R, Nishimura H, Yoshida K, Miyawaki D, Nakayama M, Uehara K, Okamoto Y, Ejima Y, Azumi A, Matsui T, Sugimura K. Long-term outcome and patterns of failure in primary ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 査読有 2012 Mar 15;82(4):1509-14

④ Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Niwa Y, Mima M, Fujii O, Sasaki R, Yamada I, Hori Y, Hishikawa Y, Abe M, Ku Y, Murakami M. The effectiveness of particle radiotherapy for hepatocellular carcinoma associated with inferior vena cava tumor thrombus. J Gastroenterol. 査読有 2011;46(7):913-20

⑤ Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Sasaki R, Hori Y, Hishikawa Y, Ku Y, Murakami M. Clinical results and risk factors of proton and carbon ion therapy for hepatocellular carcinoma. Cancer. 査読有 2011 Nov 1;117(21):4890-904

⑥ 西村英輝、佐々木良平、吉田賢史、宮脇大

輔、大月直樹、齊藤 幹、清田尚臣、副島俊典、杉村和朗、丹生健一。局所進行下咽頭癌に対する術後放射線療法の遡及的検討。頭頸部癌 査読有 2011;37: 62-66

⑦Iwata H, Murakami M, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Niwa Y, Mima M, Hishikawa Y, Shibamoto Y. High-Dose Proton Therapy and Carbon-Ion Therapy for Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. Cancer. 査読有 2010 May 15;116(10): 2476-85.

〔学会発表〕(計 107 件)

①D. Miyawaki, Ten Year Experience with Combined Modality Therapy Including Radiotherapy for Squamous Cell Carcinomas of Oropharynx, ECR 2013, 2013/3/7-11, Vienna (Austria)

②D. Miyawaki, Combined Modality Therapy Including Radiotherapy for Squamous Cell Carcinomas of Maxillary Sinus: A Retrospective Study, ASTRO 53rd annual meeting, 2011/10/2-6, Miami Beach (USA)

③ D.Miyawaki, Particle-Beam Radiation Therapy for Skull Base Chordomas:A Retrospective Study, ASTRO 52nd annual meeting, 2010/10/31-11/04, San Diego (USA)

〔図書〕(計 5 件)

①西村英輝、宮脇大輔、上原和之、中山雅央、カラーアトラス 目で見て学ぶ 放射線療法の有害反応, 7-19, 2011. 日本看護協会出版社

②宮脇大輔、カラーアトラス 目で見て学ぶ 放射線療法の有害反応, 51, 2011. 日本看護協会出版社

③宮脇大輔、カラーアトラス 目で見て学ぶ 放射線療法の有害反応, 57, 2011. 日本看護協会出版社

④宮脇大輔、佐々木良平、がん・放射線療法 2010, 625-632, 2010. 篠原出版新社

⑤宮脇大輔、佐々木良平、がん・放射線療法 2010 別冊, 18-19, 2010. 篠原出版新社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 大輔 (MIYAWAKI DAISUKE)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30546502