

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591839

研究課題名(和文)放射線生存曲線パラメータを規定する分子生物学的因子の包括的スクリーニング

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of molecular factors that impact on radiation dose response using the Linear-quadratic model

研究代表者

瀬尾 雄二 (SEO, YUJI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00302000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：52種類のがん細胞を用いて、遺伝子発現情報やがん遺伝子変異の有無が放射線照射後の生存率に与える影響を調べた。近年発展しつつある定位放射線治療では1回あたりにより高い線量が投与される。そのためこの研究では特に放射線の線量による反応の違い(1-3 Gyの低線量域に対して6-12 Gyの高線量域)に着目し、Linear-quadraticモデルを用いて分析した。また放射線照射と薬物療法を併用する場合の放射線線量による反応の違いについても分析した。その結果、低線量と高線量照射を比較して、治療効果に影響を与える分子生物学的因子の違いや1回高線量の照射と併用するのに適した放射線増感剤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated an association between molecular factors and radiation dose response in 52 types of cancer cell lines using the Linear-quadratic model. The analysis revealed basal gene expression profiles and cancer gene mutation status that impact on the cellular response to a high-dose radiation per fraction compared with a lower-dose radiation. In addition, drug-radiation interactions were analyzed when radiation was given at a high dose versus low dose per fraction. The results suggested that there are several molecular targets and radiosensitizing agents that may affect treatment outcomes in a high-precision hypofractionated radiotherapy.

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：がん治療 放射線治療 定位放射線治療 LQモデル 放射線増感作用 線量依存性

1. 研究開始当初の背景

画像誘導放射線治療をはじめとした高精度放射線治療技術の進歩により、国内海外の多くの施設で体幹部を含めた定位放射線照射が行われつつある。現時点では中枢神経系、頭頸部腫瘍、肺腫瘍を中心に寡分割定位照射が施行されてきているが、今後さらに肝腫瘍をはじめとした腹部疾患にも適応拡大が進むと考えられている。通常これらの定位照射は物理的に標的に線量を集中させることにより、治療効果比の改善を得ている。しかし、最適な線量分割法は腫瘍の放射線生存曲線の形状すなわち Linear-quadratic (LQ) モデルにおける α 、 β 、 α/β 値に依存するため、これら LQ モデルのパラメータを推定することは寡分割定位照射法を確立するための重要な戦略の一つとなる。

放射線感受性と遺伝子発現量もしくは癌(抑制)遺伝子変異との関連に関する研究結果はこれまでも多く報告されてきている。DNA 損傷修復機構や細胞周期チェックポイントに関わる遺伝子の過剰発現や遺伝学的もしくは薬理的抑制が放射線感受性を修飾することは多くの研究で示されてきた。また DNA microarray を用いた研究では 1 回 2 Gy 照射による癌細胞の生存率は特定の遺伝子発現量のセットで予測可能なことが示されている。さらに TP53 や RAS の遺伝子変異が放射線抵抗性の要因となることが報告されている。

しかしながら、放射線生存曲線の形状すなわち LQ モデルにおける α 、 β 、および α/β 値との関連を質的、量的に評価したデータの報告はない。特定の遺伝子発現量やがん遺伝子変異の有無により放射線感受性を予測するだけでなく、最適な線量分割を予測できれば新たなタイプのオーダーメイド放射線治療の開発に寄与する可能性があると考えられる。

化学療法と放射線治療の同時併用療法は種々の癌種において予後を改善した。化学療法による放射線増感作用に関してこれまで非常に多数の報告がなされているが、そのほとんどは 1 回 2 Gy の通常分割照射を前提として研究がなされてきた。そのため、1 回により高線量を投与する寡分割定位放射線治療と薬物療法の相互作用に関しては解明すべき点が多く残されている。遺伝子発現や変異情報と放射線生存曲線の形状の関連が示されれば、高線量域での放射線感受性修飾を目指した新しい放射線増感剤の標的の解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では主な研究対象として NCI-60 細胞群を用いる。NCI-60 細胞群は 8 臓器由来の 60 種の株化癌細胞である。

- (1) NCI-60 細胞群の放射線生存曲線における LQ model のパラメータ α 、 β 、 α/β 値を測定し、データベースを作成する。
- (2) NCI-60 細胞群において、放射線生存曲線パラメータと関連する遺伝子発現情報を DNA microarray データを用いて明らかにする。
- (3) 放射線生存曲線パラメータと関連する癌遺伝子変異を明らかにする。
- (4) 放射線増感作用の線量依存性を調べる。すなわち、低線量照射 (2 Gy) と高線量照射 (10 Gy) において放射線増感剤の作用の大小や作用機序を比較検討する。高線量照射との併用に適した放射線増感剤を探索し、その機構について検討する。

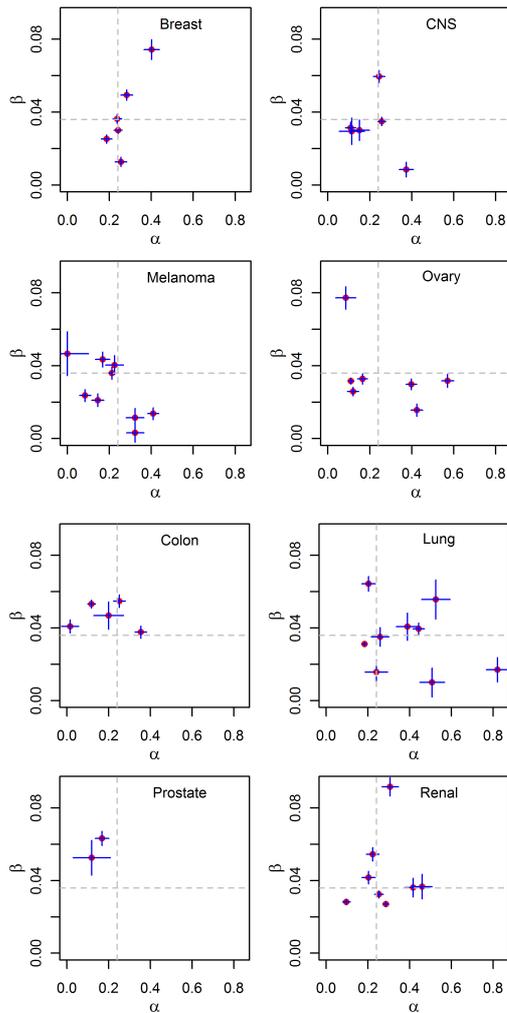
3. 研究の方法

- (1) NCI-60 細胞群のうち 52 種の固形腫瘍細胞株において標準的な clonogenic survival assay を施行した。放射線照射は Cs-137 γ -irradiator を用い、0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12Gy の線量で放射線生存曲線を測定した。各細胞に対して測定は各線量で triplicate を 3 回繰り返し、混合効果モデルを用いて LQ model のパラメータを推定した。
- (2) NCI-60 における DNA microarray data は ArrayExpress[®] (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) で公開されている 427 サンプルからなる 3 つの独立したデータセットを使用した。研究方法 (1) で得られた NCI-60 の LQ モデルパラメータと遺伝子発現情報の関連を Parametric Analysis of Gene set Enrichment で解析した。
- (3) (2) と同様に多変量解析により、癌遺伝子変異データと放射線生存曲線パラメータとの関連を分析する。NCI-60 細胞群のがん遺伝子変異情報は Cancer genome project (www.sanger.ac.uk) で公開されているものを用いた。
- (4) 17 種類の化学療法薬もしくは標的治療薬を用いて放射線増感作用を標準的な Clonogenic survival assay にて測定した。それぞれの薬物は MTT assay で決定した 50% 成長阻害濃度で照射 2 時間前から照射後 48 時間まで投与した。

4. 研究成果

- (1) 8臓器由来の52種類のヒト癌細胞株に対して Clonogenic survival assay を行い放射線生存曲線における LQ モデルパラメータ α と β を決定した(図1)。

図1 LQ モデルパラメータ



- (2) LQ モデルパラメータと DNA microarray による遺伝子発現情報との関連を分析した。

減数分裂、ミトコンドリア、呼吸鎖、TCA サイクルは高 β 値と関連を示した。一方、細胞分裂、M 期、G1/S チェックポイント、HIV、インターフェロンシグナル伝達経路、RAF/MAPK シグナル伝達経路、インテグリンは低 β 値と関連を示した。

高 α 値と関連を示す因子として、細胞分裂、HIV、インフルエンザウイルス、mRNA 転写、chromatin/chromosome、ribosome があげられた。一方、イン

スリンシグナル伝達経路、炭水化物・脂質代謝、プロスタサイクリン・トロンボキサン代謝、PDGF シグナル伝達経路、細胞外マトリックス、コラーゲン、インテグリン、基底膜、ER、ゴルジ装置は低 α 値との関連を示した。

- (3) LQ モデルパラメータと 26 種の癌遺伝子変異との関連を分析した。LKB1 変異は高 β 値と、BRAF, PTEN, EGFR 変異は低 β 値とそれぞれ関連を示した。更に EGFR 変異は低 α 値との関連を示した。高 α 値と関連を示す癌遺伝子変異は認めなかった。

- (4) (2)、(3)では α 値と β 値に対してそれぞれ異なる複数の因子が関与していることを示した。これは単なる放射線感受性の高低だけでなく、放射線生存曲線の形状にも分子生物学的因子が関与していることを示し、線量分割法の最適化や放射線増感剤の線量依存性に関わる分子標的が存在することが示唆された。

- (5) 17 種類の放射線増感剤に対して、その増感作用の大きさを低線量 (2 Gy) と高線量 (10 Gy) で比較し、1 回高線量の寡分割照射との併用に適した増感剤を探索した。肺癌細胞 A549 (図2) および大腸癌細胞 HT29 (図3)を用いた実験において、低線量に比し高線量で最も大きな放射線増感作用を示したのはいずれの細胞でも PARP1 阻害剤であった。

図2 A549 肺癌細胞

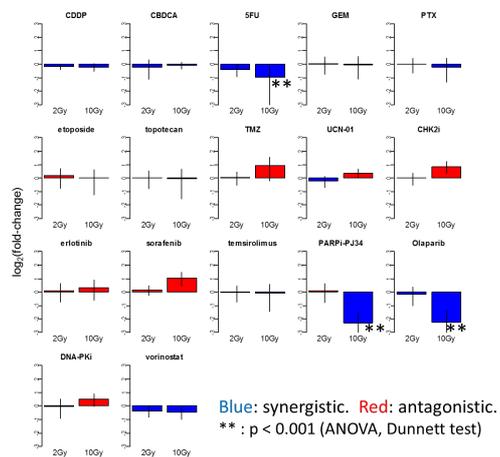
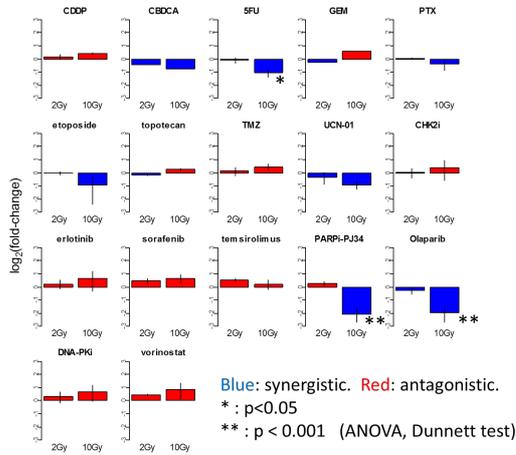
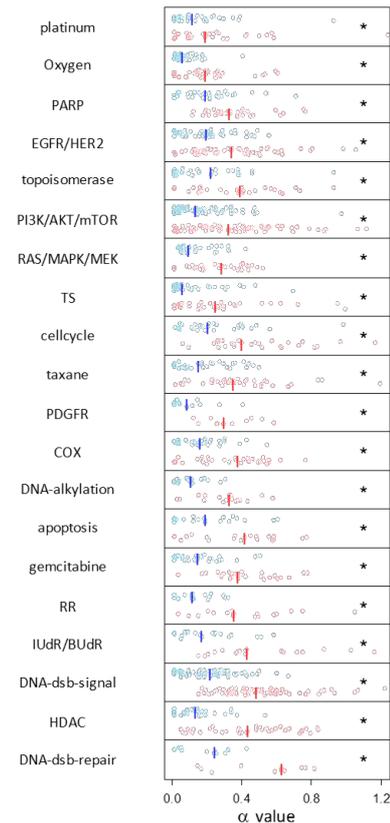


図 3 HT29 大腸癌細胞



(6) 更に網羅的に検討するため、放射線照射後の生存率を修飾する種々の薬剤もしくは分子標的を検討した文献を検索した。論文上の放射線生存曲線をデジタル化した上で放射線増感作用を定量した。種々の放射線増感剤を便宜上 20 種類に分類し検討したデータを図 4, 5 に示す。値は 20 群全てにおいて増感剤を使用することによって放射線のみと比べ有意な上昇を認めた (図 4)。

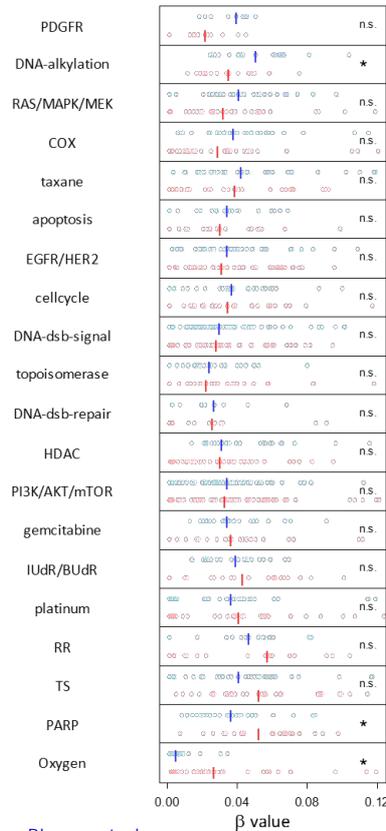
図 4 放射線増感剤による 値の変化



Blue: control
 Red: with sensitization
 *: adjusted p < 0.05 (Wilcoxon signed rank sum test)

対照的に 値の増加を認めたのは PARP 阻害剤と酸素・低酸素増感剤のみであった。多くの増感剤では 値に有意な変化を認めず、逆に DNA アルキル化剤では放射線単独よりも 値が有意に低下した (図 5)。つまり、増感剤の使用により多くの場合、放射線生存曲線は放射線のみと比べてより直線的になり低線量域と比べて高線量での増感作用に乏しいことが示された。その中で PARP1 阻害剤や低酸素増感剤は高線量での増感作用が期待できる増感剤であることが示唆された。

図 5 放射線増感剤による 値の変化



Blue: control
 Red: with sensitization
 *: adjusted p < 0.05 (Wilcoxon signed rank sum test)

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)

[学会発表] (計 1 件)

American Society for Radiation Oncology Annual Meeting 2013. Atlanta, GA, USA.

Y. Seo, F. Isohashi, K. Tamari, K. Hayashi, M. Koizumi, K. Ogawa.

Association between linear-quadratic model parameters and basal gene expression profiles in the NCI-60 cancer cell line panel.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 雄二 (SEO YUJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00302000