

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：83401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591854

研究課題名(和文)放射線がん治療における陽子線特異的細胞応答の機構解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of proton beam specific cellular response for radiation therapy

研究代表者

畑下 昌範 (HATASHITA, masanori)

公益財団法人若狭湾エネルギー研究センター・研究開発部・主任研究員

研究者番号：40359237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞における陽子線照射とX線照射との違いについて、突然変異誘発と変異スペクトルの観点から検討した。細胞死は、陽子線照射とX線照射とにおいてほぼ同等であった。一方、hprt遺伝子を指標とする突然変異率には違いが見られ、X線照射区に比べて陽子線照射区のほうが突然変異率は低かった。さらに、エクソン単位の欠失パターンにおいても、両者で異なる結果が得られた。これらの結果は、陽子線照射とX線照射とは、同じ生物学的効果比を示すにもかかわらず、変異誘発においては量的、質的な差異があることを示している。

研究成果の概要(英文)：The differences in mutation induction and mutation spectrum between proton beams and X-rays in human cells were investigated. Cell killing effect was almost the same between proton beams and X-rays, while a difference in mutation frequency was observed and the frequency of hprt mutation of cells irradiated with proton beams was lower than that of cells irradiated with X-rays. Furthermore, the deletion spectrum of exons was different in induced mutants between proton beams and X-rays. These findings suggest that there are quantitative and qualitative differences in mutation induction between proton beams and X-rays even if the RBE values are similar.

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：量子ビーム イオンビーム 突然変異 放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療用放射線照射装置の進歩・照射方法の工夫および治療後の患者の優れた QOL により放射線がん治療が高い評価を得ているが、さらに放射線腫瘍学および放射線生物学的なアプローチによる治療成績の向上が望まれている。

放射線治療においてその治療効果は、放射線による直接的ながん細胞の致死効果と放射線に対するがん細胞間での応答現象を介した間接的な致死効果 (Bystander 効果) の総和として現れてくると考えられる。我々は、被ばく細胞から放出される液性因子の 1 つに、NO ラジカルがあることを見だし、この NO ラジカルにより放射線抵抗性や温熱抵抗性が非被ばく細胞に誘導されることを見だした (Cancer Res., 59: 3239-3244, 1999.; Int. J. Radiat. Biol., 76: 1649-1657, 2000.; Radiat. Res., 155: 387-396, 2001.; Methods Enzymol., 359: 280-286, 2002.)。

現在、6-チオグアニンを用いた耐性コロニーの獲得数から、hprt 遺伝子の突然変異率を解析しているが、ヒト前立腺がん細胞 (DU145 細胞) においては、陽子線が他の放射線である X 線や炭素線に比べて特異的に突然変異率が低いという結果が得られている。

このような背景から、こうした陽子線に特異的な細胞応答がどのような分子機構で働いているのか、また放射線誘発バイスタンダー応答や放射線適応応答でみられた NO ラジカルの細胞間情報伝達の関与があるか否かについて検討する。

2. 研究の目的

本研究は、陽子線が他の放射線である X 線や炭素線に比べて特異的に突然変異率が低いというヒトがん細胞株で見だした現象に注目して、これらの細胞応答の分子機構を、分子生物学的、細胞生物学的手法により明らかにすることを通じて、放射線がん治療による二次発がんの予防およびオーダーメイド放射線がん治療へとつながるエビデンスの蓄積を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト正常細胞およびヒトがん細胞に対する種々の放射線照射に対する応答機構の解析を行った。ヒト正常線維芽細胞およびヒト非小細胞肺癌細胞を用いた。

(1) 種々の放射線照射後の放射線感受性の解析

上記細胞に対し、0~10Gy の X 線、陽子線、陽子線ピーク位置、炭素線を照射した。

照射後、コロニー形成法で生残細胞数を定量し、種々の放射線による放射線感受性を解析した。

(2) 種々の放射線照射後の突然変異率の解析

上記細胞に対し、0~6Gy の X 線、陽子線、

陽子線ピーク位置、炭素線を照射した。NO ラジカルの関与を解析するために NO 捕捉剤である c-PTIO を添加した試料および NO ラジカル発生剤である硝酸イソソルビドを添加した試料を同時に作製した。

照射後 1×10^6 個の細胞を継代培養し、複数回の分裂後に 6-チオグアニン耐性コロニーの出現数を定量し、hprt 遺伝子の突然変異率を解析した。さらに、マルチプレックス PCR 法により 6-チオグアニン耐性クローンにおける hprt 遺伝子の変異スペクトルを解析した。

(3) 種々の放射線照射後の DNA 損傷・修復シグナル因子の発現動態

上記細胞に対し、0~6Gy の X 線、陽子線、陽子線ピーク位置、炭素線を照射した。

経時的にそれぞれの細胞を回収し、mRNA を調製し、cDNA を作製した。この cDNA によるリアルタイム PCR アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、種々の放射線照射後の DNA 損傷・修復シグナル因子の発現動態を解析した。

4. 研究成果

ヒト正常線維芽細胞およびヒト非小細胞肺癌細胞を用い、種々の放射線照射後の放射線感受性を解析した。いずれの細胞においても、炭素線照射で高い放射線感受性を示した。また、X 線と陽子線とを比較すると、線量-生存率曲線はほぼ同じ曲線を示し、生存率もとに算出した生物学的効果比は、X 線に対し陽子線は 1~1.1 の値を示した。

陽子線と陽子線ピーク位置との比較では、低 LET 放射線の生存率曲線で見られる“肩”とよばれる部分が、陽子線照射で見られるのに対し、陽子線ピーク位置の照射では消失していた。しかし、放射線感受性を表す指標である D_0 値 (37% 生存率線量) では、ほぼ同等の値を示し、この結果から、陽子線入り口と陽子線ピーク位置とはほぼ同じ放射線感受性を示すことが明らかになった。

次に、6-チオグアニンを用いた耐性コロニーの獲得数から、hprt 遺伝子の突然変異率を解析した。以前の研究から、ヒト前立腺がん細胞 (DU145 細胞) においては、陽子線が他の放射線である X 線や炭素線に比べて特異的に突然変異率が低いという結果が得られていたが、今回用いた細胞においても、同様の結果が得られた。さらに、NO 捕捉剤である c-PTIO を添加した系では、突然変異率が上昇する結果が得られた。被ばく細胞からの NO を主とする細胞間シグナル伝達系が、周辺細胞の放射線感受性や放射線による突然変異誘発に影響を及ぼしていることが明らかになった。

マルチプレックス PCR 法を用いて hprt 遺伝子のエクソン単位での欠失パターンを解析した。その結果の一部を表 1 に示す。非照射時、すなわち自然突然変異においては、すべてのエクソンにバンドが見られ、DNA の大

きな構造変化は見られなかった。

炭素線照射により誘発された突然変異は、DNA に大きな構造変化を及ぼしており、多くの変異細胞において複数のエクソンの同時欠失が認められた。

X 線照射においては、エクソンの欠失はわずかであり、ほとんどの変異細胞ですべてのエクソンにバンドが見られ、DNA の大きな構造変化は見られなかった。

一方、陽子線照射においては、少数のエクソン単位での欠失が認められ、塩基対ベースで 1kbp 以下の比較的小規模の欠失が多いことが明らかになった。こうした現象は他の放射線にはあまり見られない現象であった。

表 1 各種放射線照射による hprt 遺伝子の欠失パターン

	Dose	ex2	ex3	ex4	ex5	ex6	ex7-8	ex9
control		○	○	○	○	○	○	○
Proton	2Gy	×	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	×	○
		○	○	○	○	○	×	○
		○	○	○	×	×	×	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	×	○
		○	○	○	○	○	○	○
X-ray	2Gy	○	×	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
Carbon	2Gy	×	×	×	×	×	×	×
		×	×	×	×	×	×	○
		×	×	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○

(○ : バンド有り、 × : バンド無し)

次に、X 線、陽子線、炭素線をそれぞれ照射した細胞から、経時的に mRNA を抽出、調製し、cDNA を作製した。この cDNA によるリアルタイム PCR アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、種々の放射線照射後の DNA 損傷・修復シグナル因子の発現動態を解析した。その結果、陽子線照射区の遺伝子発現量が X 線照射区のそれに比べて著明に低くなる遺伝子を 10 遺伝子見いだすことができた。また、著明に高くなる遺伝子を 1 遺伝子見いだすことができた。陽子線照射区で遺伝子発現量が低下した遺伝子には、二つある DNA 修復経路のうち、一方の修復経路に関わる因子が多く含まれており、こうした修復経路のバランスの変化が突然変異率の変化に関連することが示唆された。

本研究は、新たな現象として確認された陽子線に特異的な細胞応答について、その分子機構の解明を試みた。その中で、陽子線照射と X 線照射とは、細胞死に関して、ほぼ同じ生物学的効果比を示すにもかかわらず、変異

誘発においては量的、質的な差異があり、さらに遺伝子発現レベルでも異なる動態を示すことが明らかになった。がん患者自身が診療行為により健康上の便宜を得て、それが放射線被ばくにより受ける損害を上回るためには、こうした放射線による細胞応答の DNA 損傷修復系の細胞内情報伝達および細胞間情報伝達物質の関与の詳細な検討とエビデンスの蓄積が不可欠であり、こうした基盤研究が、放射線がん治療における治療成績のみならず、放射線防護体系の構築や被ばく障害の軽減に大きく寄与すると考えられる。

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)

M. Hatashita, M. Taniguchi, K. Baba, K. Koshiba, T. Sato, Y. Jujo, R. Suzuki, S. Hayashi, Sinodielide A exerts thermosensitizing effects and induces apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in DU145 human prostate cancer cells via the Ras/Raf/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. International Journal of Molecular Medicine, 査読有, 33(2), 2014, pp406-414
DOI: 10.3892/ijmm.2013.1568

小川良平、森井章裕、渡部明彦、崔正国、鍵谷豪、畑下昌範、久米恭、福田茂一、長谷川崇、近藤隆、放射線応答性遺伝子発現制御システムの開発、放射線生物研究、査読有、48(3)、2013、pp267-279
<http://rbrc.kenkyukai.jp/special/index.asp?id=11654>

R. Ogawa, A. Morii, A. Watanabe, Z.-G. Cui, G. Kagiya, S. Fukuda, K. Kume, T. Hasegawa, M. Hatashita, H. Izumi, T. Ishimoto, L. B. Feril Jr. Development of a therapeutically important radiation induced promoter. Bioengineered. 査読有, 4(1), 2013, pp 44-49
DOI: 10.4161/bioe.21965

R. Ogawa, A. Morii, A. Watanabe, Z.-G. Cui, G. Kagiya, S. Fukuda, K. Kume, T. Hasegawa, M. Hatashita, H. Izumi, T. Ishimoto, L. B. Feril Jr. Regulation of gene expression in retrovirus vectors by X-ray and proton beam radiation with artificially constructed promoters. The Journal of Gene Medicine. 査読有, 14(5), 2012, pp 316-327
DOI: 10.1002/jgm.2625

H. Matsumoto, M. Tomita, K. Otsuka, M. Hatashita, N. Hamada, Nitric Oxide is a key molecule serving as a bridge between

radiation-induced bystander and adaptive responses., 査読有, Curr Mol Pharmacol., 4(2), 2011, 126-134
DOI: 10.2174/1874467211104020126

〔学会発表〕(計2件)

M. Hatashita, K. Takagi, K. Kume, G. Kagiya and H. Matsumoto, Response of Human Cells to Proton Irradiation Compared to X-Ray Irradiation, The 14th International Congress of Radiation Research, 2011.8.30, Poland

H. Matsumoto, M. Tomita, K. Otsuka, M. Maeda, N. Hamada, M. Hatashita, Nitric Oxide is a Key Molecule Serving as a Bridge between Radiation-Induced Bystander and Adaptive Responses., The 14th International Congress of Radiation Research, 2011.8.30, Poland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑下 昌範 (HATASHITA, Masanori)
(公財)若狭湾エネルギー研究センター・主任研究員
研究者番号: 40359237

(2) 研究分担者

松本 英樹 (MATSUMOTO, Hideki)
福井大学高エネルギー医学研究センター・准教授
研究者番号: 40142377