

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791358

研究課題名(和文)分割照射の転移に対する影響

研究課題名(英文)The effect of fractionated radiotherapy for tumor metastatic abilities

## 研究代表者

松本 孔貴 (Matsumoto, Yoshitaka)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70510395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 現在臨床では均等分割照射を用いているが、小線量照射の蓄積が肺転移を亢進させた例や転移能が一過性に亢進される結果が報告されており、転移制御の点から均等分割照射が最良なのか議論の余地が残る。

本研究では、まず腫瘍細胞及び移植腫瘍に炭素線及びX線による均等分割照射を行い、細胞致死及び浸潤能抑制効果と分割回数及び1回線量との関係を明らかにした。ついで、細胞及びスフェロイドを用いて、初回高線量あるいは最後高線量などの不均等分割照射による細胞致死効果またはスフェロイド制御率と浸潤能抑制効果を調べることで、腫瘍制御と転移抑制の観点からより効率的な分割照射法の提案を行った。

研究成果の概要(英文)： In clinic, even fractionated radiotherapy is being used for tumor therapy, however it was reported that low dose irradiation with low LET enhance the lung metastasis of mice bearing tumor and the invasion ability of cancer cells. Is even fractionated irradiation really best from the angle of the antimetastatic?

In this study, at first we tried to examine the effect of even fractionated irradiation of X-rays and carbon-ion (C-ions) beams to both cytotoxicity and anti-invasion ability, and the correlation between the effects and the fraction number and/or fraction size were clarified. Next, we examined the effects of un-even fractionated irradiation of X-rays and C-ions for to cytotoxicity and anti-metastatic effects using single layer cultured cells and multicellular spheroids techniques. As a result, it is suggested that the uneven fractionated radiotherapy with high dose at the first fraction is most useful to both induce the cell death and suppress the tumor invasiveness.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：不均等分割 初回高線量 粒子線治療 細胞死 転移能 浸潤能

1. 研究開始当初の背景

現在の分割照射法は1回2Gyを基本とした均等分割照射を行っている。しかし、移植腫瘍への小線量照射の蓄積が肺転移を亢進させた例や、X線の低線量照射により転移能が一過性に亢進されるデータが報告されており、転移の制御から考えて均等分割照射が適当なのか議論の余地が残る。一方、粒子線を用いた転移影響研究も徐々に知見が蓄積され、高LET放射線は非常に低線量の照射でも転移を抑制する結果が示されている。我々の過去の結果からも、X線では転移能が亢進した0.5-1.0 Gyの亜致死線量域でも、炭素線は顕著に抑制した。しかし、X線であっても高線量域では有意に転移能を抑制することから、最初に高LET放射線と同様に遊走や浸潤など転移に必要な因子を抑えるような高線量のX線を照射し、その後は従来の分割照射を行うような不均等分割照射法により、均等分割よりも転移を抑えられる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、既に得ている転移への放射線単回照射の効果を治療に適用するため分割照射を用い、転移抑制に繋がる知見の取得、及び転移抑制から見た分割照射方法の提案を目的とする。その手法として従来の均等分割に加え、最初だけ高線量を投与するなどの不均等分割照射法について検討する。この方法により、単回照射実験で見られたX線の低線量域で見られた転移能の亢進を回避し、転移の抑制に繋がる結果を示し、転移抑制を目的とした分割照射法が提案できる。また、炭素線は低線量域でも転移能を抑制することから、転移影響においても分割回数依存性が小さいことを証明し、現在用いる均等分割が妥当であることを提案する。さらに、転移抑制の観点から、線質に応じたあるいは腫瘍の転移性に応じた分割照射法の選択を提案する。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

①細胞：

実験には高転移性を有するマウス骨肉腫由来LM8細胞(RIKEN Bio Resource Center、RCB1450)を用い、E-MEM培地に10%牛胎児血清及び抗生物質を添加しCO<sub>2</sub>インキュベータ内にて37℃下で培養した。照射1日前にT25フラスコに播種し、照射サンプルとした。

②マウス：

移植にはC3H/Heマウス(日本SLC)を用いた。1x10<sup>6</sup>細胞/10 µlをマウスの右下肢に移植し、14日間飼育することで7.0-8.0 mm径の移植腫瘍を作成した。

③多細胞球スフェロイド

抗腫瘍効果の解析に多細胞球スフェロイ

ドを使用した。96穴スフェロイドプレート(住友ベークライト)を使用し、1穴当たり2000個の細胞を播種し7日間培養を行うことで、628±28 µm径のスフェロイドを取得した。作成したスフェロイドは照射前に6cmディッシュに播種し、6時間CO<sub>2</sub>インキュベータ内で静置培養することでディッシュ底面に接着させた。照射直前に培地を除去し、乾燥防止のために滅菌済カプトン膜を被せて照射を行った。

(2) 放射線照射

単層培養細胞、マウス移植腫瘍及びスフェロイドに対し、X線(TITAN 320型、200kV、20mA)または炭素線(290 MeV/u、6cm拡大ブラッグピークの中心、LET=50 keV/µm)により照射を行った。マウス照射はペントバルビタールの腹腔投与による深麻酔科で行った。分割回数は1回~5回を用い、分割間隔は24時間(1日)とした。不均等5分割照射の線量配分を表1、表2に示す。

Group	Dose					Total
	1fr	2fr	3fr	4fr	5fr	
UFS-1/5D	4d	4d	2d	2d	2d	14d
UFS-2/5D	4d	2d	2d	2d	4d	14d
UFS-3/5D	2d	2d	2d	4d	4d	14d
5fr/5D	2.8d	2.8d	2.8d	2.8d	2.8d	14d

表1. 5分割不均等分割照射スケジュール(単層培養細胞) d = 0.36 Gy, 4d = 5.04 Gy

Group	Dose					Total
	1fr	2fr	3fr	4fr	5fr	
UFS-1/5D	4d	4d	2d	2d	2d	14d
UFS-2/5D	4d	2d	2d	2d	4d	14d
UFS-3/5D	2d	2d	2d	4d	4d	14d
5fr/5D	2.8d	2.8d	2.8d	2.8d	2.8d	14d

表2. 5分割不均等分割照射スケジュール(スフェロイド) d = 0.18~2.86 Gy, 14d = 2.5~35 Gy

(3) 単層培養細胞生存率の解析

単層培養細胞の生存率はコロニー形成法を用いて求めた。照射後の細胞をPBSで洗浄後、トリプシン処理により単細胞化し、コールターカウンター(ベックマン)により細胞数を計数した後、適当数になるよう希釈し、細胞を播種した。14日間培養後コロニーを10%ホルマリンで固定し、1%メチレンブルー溶液で染色後、コロニー数をカウントして細胞生存率を算出した。

(5) 浸潤能解析

照射後、細胞及びスフェロイドをトリプシン処理により単細胞化し、Matrigel invasion assayを用い、マトリゲルを溶かして8 µmの穴を有するメンブレンを通り抜けた細胞を浸潤細胞として計数し、照射による細胞の浸潤能変化を解析した。

(6) 腫瘍内細胞生存率の解析

担癌マウスにX線及び炭素線による局所分割照射を行い、照射後マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、移植腫瘍を摘出した。腫瘍をトリプシン処理により単細胞化し、コロニー形成法により腫瘍内細胞の生存率を求めた。

(7) 肺転移結節数変化の解析

移植後 4.5 週（分割照射後 2 週間後）の時点でマウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、肺を摘出し蒸留水で洗浄後、ブアン液にて固定・染色を行った。実体顕微鏡下で肺コロニー数をカウントし、照射による肺コロニー数変化を解析した。

#### (8) スフェロイド制御率解析

6 cm ディッシュに播種して照射したスフェロイドに照射後培地を静かに添加し、14 日間 CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。培養後、コロニーを 10%ホルマリンで固定し、1%メチレンブルー溶液で染色後、コロニー数をカウントしてスフェロイドの生存率を求め、これをスフェロイド制御率とした。

#### (9) 統計解析

各群の有意差検定には Wilcoxon t-test を使い、 $p < 0.05$  を有意差有りとした。

### 4. 研究成果

#### (1) 均等分割照射による細胞致死効果と浸潤能抑制効果 (*in vitro* 実験)

1 回照射に比べて分割照射では、分割回数の増加に伴い生存率および浸潤能の亢進が見られ、その程度は X 線照射群でより顕著であった (図 1)。

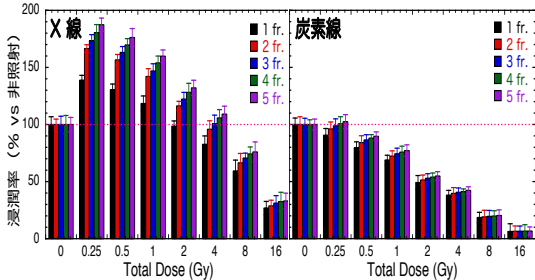


図1. 分割照射後の浸潤能の変化

#### (2) 均等分割照射による腫瘍内細胞致死効果と肺転移抑制効果 (*in vivo* 実験)

分割回数が増加するにつれて増殖抑制、腫瘍内細胞致死効果の低減および肺転移結節数の増加傾向が観察された。これらの程度についても炭素線では少なかった (図 2)。

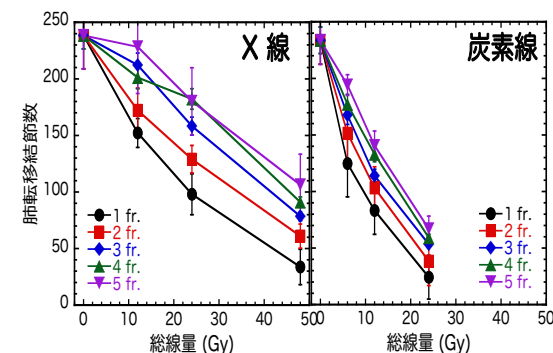


図2. 分割照射後の肺転移結節数の変化

#### (3) 不均等分割照射による細胞致死効果と浸潤能抑制効果 (*in vitro* 実験)

##### ① 単層培養細胞実験

表 1 の線量配分に従い不均等 5 分割照射を行った結果、初回高線量群 (UFS-1) が細胞致死効果及び浸潤能抑制効果の両面で最も効果が強く、最後高線量群 (UFS-3) が最も効果が弱かった (図 3)。高 LET である炭素線でも同様の傾向は観察されたが、X 線と異なり各不均等照射群での有意な差は細胞致死、浸潤能抑制の両エンドポイントで観察され

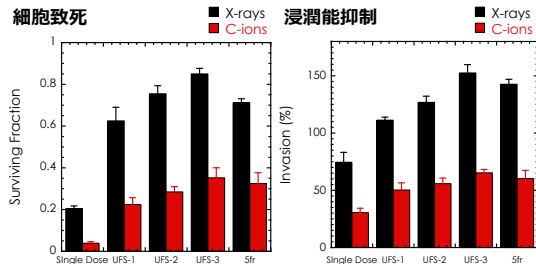


図3. 不均等5分割照射した単層培養細胞の細胞生存率及び浸潤能

なかった。

##### ② 多細胞球スフェロイド実験

表 2 の線量配分に従い、スフェロイドに対し不均等 5 分割照射を行った結果、単層培養細胞実験で見られたのと同様に初回高線量群 (UFS-1) でスフェロイド制御効果が最も強く、最後高線量群 (UFS-3) が最も効果が弱かった (図 4)。高 LET である炭素線でも同様の傾向は観察されたが、X 線群に比べ各群での差が小さかった。スフェロイドを 50% 制御する線量 : SCP<sub>50</sub> (Spheroid Control Probability at 50%) を求めた結果、X 線では 11.9~17.0 Gy (単回照射は 8.9 Gy)、炭素線では 5.8~8.3 Gy (単回照射は 5.1 Gy) の値を示した。不均等分割照射後スフェロイド制御における炭素線の RBE は、単回照射後の RBE に比べ 12~17% 大きな値を示した。

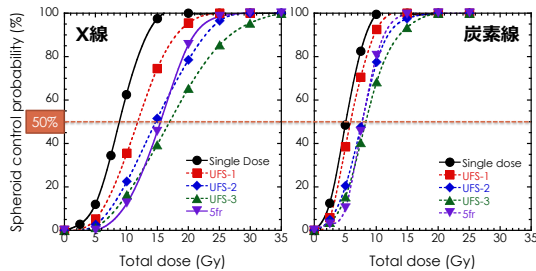


図4. 不均等5分割照射後のスフェロイド制御率

同様の不均等分割照射を行ったスフェロイド細胞の浸潤能を調べた結果、スフェロイド制御解析と同様に初回高線量群 (UFS-1) が最も浸潤能抑制効果が強く、最後高線量群 (UFS-3) が最も弱かった (図 5)。スフェロイド制御解析と同様に、浸潤能を 50% まで減少させる線量 (D<sub>50</sub>) を求めた結果、X 線で 14.4~22.6 Gy (単回照射は 10.8 Gy)、炭素線で 8.0~11.7 Gy (単回照射は 6.4 Gy) の値を示した。不均等分割照射後スフェロイド細胞の

浸潤能抑制における炭素線の RBE は、単回照射後の RBE に比べ 7~14% 大きな値を示した。

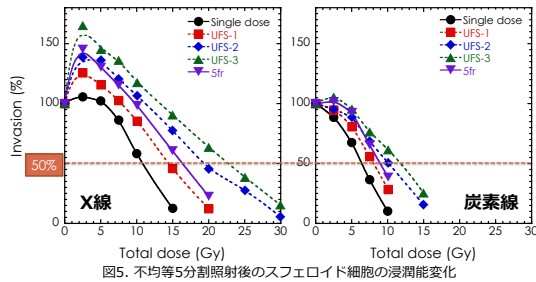


図5. 不均等5分割照射後のスフェロイド細胞の浸潤能変化

## 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3件)

1. Yoshitaka Matsumoto, Nobuyuki Hamada, Mizuho Aoki-Nakano, Tomoo Funayama, Tetsuya Sakashita, Seiichi Wada, Takehiko Kakizaki, Yasuhiko Kobayashi and Yoshiya Furusawa, Dependence of the bystander effect for micronucleus formation on dose of heavy-ion radiation in normal human fibroblasts. *Radiat Radiation Protection Dosimetry*, 2015, in press, 査読有り
2. Yoshitaka Matsumoto, Taeko Matsuura, Mami Wada, Yusuke Egashira, Teiji Nishio and Yoshiya Furusawa: Enhanced radiobiological effects at the distal end of a clinical proton beam: in vitro study. *Journal of Radiation Research*, 55: 816-822, 2014, 査読有り  
DOI:10.1093/jrr/rrt230
3. Yoshitaka Matsumoto, Kei Yamashita, Huizi Li and Yoshiya Furusawa: The effect of non-uniformity fractionation for tumor metastatic abilities. *Journal of Radiation Research*, 55 Supple 1: i137-138, 2014, 査読無し  
DOI:10.1093/jrr/rrt185

[学会発表] (計19件)

1. 松本孔貴: 放射線治療に資する生物学、第3回つくば放射線治療を学ぼう会(つくば) 2015年3月
2. 松本孔貴: 細胞致死と転移抑制から見た重粒子線の生物効果、第8回 Quantum Medicine 研究会(水戸) 2015年3月
3. 松本孔貴, (他14名1番目): 細胞致死と転移抑制の両面から見る重粒子線の抗腫瘍効果、第17回癌治療増感研究シンポジウム(奈良) 2015年2月
4. 松本孔貴, 山下慶, 李恵子, 金子由美子, 孫略, 盛武敬, 平山亮一, 鶴澤玲子, 安藤興一, 増永慎一郎, 白井敏之, 古澤佳也, 櫻井英幸: 間欠的低酸素環境経験がん細胞の転移能及び細胞生存に対する

重粒子線の効果、日本放射線影響学会第57回大会(鹿児島)、2014年10月

5. Yoshitaka Matsumoto, Kei Yamashita, Huizi Li, Yumiko Kaneko, Lue Sun, Takeshi Moritake, Akiko Uzawa, Ryoichi Hirayama, Koichi Ando, Shin-ichiro Masunaga, Toshiyuki Shirai, Yoshiya Furusawa and Hideyuki Sakurai: The effect of heavy-ion beam to metastatic abilities and survival of tumor cells cultured in cyclic hypoxia condition (Rhodes), Sep.16, 2014
6. 松本孔貴, 山下慶, 李恵子, 金子由美子, 孫略, 盛武敬, 平山亮一, 鶴澤玲子, 安藤興一, 増永慎一郎, 白井敏之, 古澤佳也, 櫻井英幸: 間欠的低酸素環境経験がん細胞に対する重粒子線の効果、京都大学原子炉実験所専門研究会(熊取)、2014年8月
7. 松本孔貴: 次世代加速器型ホウ素中性子捕捉療法の現状、京都大学原子炉実験所専門研究会(熊取)、2014年8月
8. 松本孔貴, 鶴澤玲子, 平山亮一, 小池幸子, 山下慶, 李恵子, 金子由美子, 岡安隆一, 安藤興一, 増永慎一郎, 坪井康次, 鎌田正, 古澤佳也, 櫻井英幸: 重粒子線の転移抑制効果、第52回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会(京都) 2014年7月
9. Yoshitaka Matsumoto, Nobuyuki Hamada, Mizuho Aoki-Nakano, Seiichi Wada, Tomoo Funayama, Tetsuya Sakashita, Noriko Usami, Takehiko Kakizaki, Katsumi Kobayashi, Yasuhiko Kobayashi, Yoshiya Furusawa: Dose and LET Dependency of Bystander-Induced Micronucleation in Normal Human Fibroblasts. 16th International Symposium of Microdosimetry (Treviso), Oct/2013
10. 松本孔貴, 山下慶, 李恵子, 鶴澤玲子, 平山亮一, 金子由美子, 増永慎一郎, 安藤興一, 白井敏之, 古澤佳也: 低酸素環境下がん細胞の転移能に対する放射線影響、日本放射線影響学会第56回大会(青森)、2013年10月
11. 松本孔貴, 山下慶, 李恵子, 金子由美子, 鶴澤玲子, 平山亮一, 増永慎一郎, 白井敏之, 古澤佳也: 低酸素環境下のがん細胞の転移能とそれに対する放射線の影響、京都大学原子炉実験所専門研究会(熊取)、2013年8月
12. 松本孔貴, 山下慶, 李恵子, 金子由美子, 古澤佳也: 不均等分割照射が細胞致死及び転移能に与える影響 The effect of uneven fractionation irradiation for tumor cell death and metastatic potential、第22回日本がん転移学会学術集会・総会(松本)、2013年7月



13. 松本孔貴、山下慶、李惠子、金子由美子、鵜澤玲子、平山亮一、増永慎一郎、安藤興一、白井敏之、古澤佳也：低酸素環境下のがん細胞の転移能とそれに対する放射線の影響、第 51 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会（仙台）2013 年 7 月
14. Yoshitaka Matsumoto、Akiko Uzawa、Ryoichi Hirayama、Sachiko Koike、Kana Koda、Shinichiro Masunaga、Koichi Ando、Yoshiya Furusawa: The effect of fractionated carbon-ion beams to tumor metastasis. 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society (Vietri sul Mare) Oct, 2012.
15. 松本孔貴、李惠子、山下慶、古澤佳也：初回高線量照射による効率的な転移能抑制効果の検討、京都大学原子炉実験所専門研究会（熊取）2012 年 8 月
16. 松本孔貴、鵜澤玲子、平山亮一、小池幸子、幸田華奈、増永慎一郎、安藤興一、古澤佳也：高転移性腫瘍に対する重粒子線分割照射の影響、第 21 回日本がん転移学会学術集会（広島）2012 年 7 月
17. 松本孔貴、増永慎一郎、皆巳和賢、尾方俊至、手島昭樹、松浦成昭、古澤佳也：放射線治療に資する転移研究～オーバービュー～、第 41 回放射線による制癌シンポジウム-基礎と臨床の対話- 領域を支える若手研究（宜野湾）2012 年 6 月
18. 松本孔貴、鵜澤玲子、平山亮一、幸田華奈、陳劍、小池幸子、和田麻美、鶴岡千鶴、増永慎一郎、安藤興一、古澤佳也：原発腫瘍への分割照射が遠隔転移に与える影響、第 50 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会（宜野湾）2012 年 6 月
19. 松本孔貴：悪性腫瘍の高転移能に対する重粒子線照射の影響、第 18 回癌治療増感研究会（大阪）2012 年 6 月

〔図書〕（計 6 件）

1. 松本孔貴、山下慶、李惠子、平山亮一、鵜澤玲子、安藤興一、増永慎一郎、古澤佳也、坪井康次、櫻井英幸：不均等分割照射による抗腫瘍効果と転移抑制効果、2014 Annual Report of the Research Project with Heavy Ion at NIRS-HIMAC, 153-157, 2015.
2. 安井博宣、戒田篤志、兵藤文紀、三浦大典、久下裕司、松本孔貴：新しいがんの放射線生物学を拓くイメージング技術 Radiation Biology Research Communications, 49: 263-283, 2014.
3. 松本孔貴、山下慶、李惠子、金子由美子、孫略、盛武敬、鵜澤玲子、平山亮一、尾崎匡邦、安藤興一、増永慎一郎、白井敏之、古澤佳也：低酸素環境を経験したがん細胞の転移能及び細胞致死に重粒子

線が与える影響、2013 Annual Report of the Research Project with Heavy Ion at NIRS-HIMAC, 152-157, 2014.

4. 松本孔貴、李惠子、山下慶、金子由美子、平山亮一、岡安隆一、白井敏之、古澤佳也：局所制御と転移抑制を目指した放射線との併用療法の検討、2013 Annual Report of the Research Project with Heavy Ion at NIRS-HIMAC, 115-121, 2014.
5. 松本孔貴、鵜澤玲子、山下慶、李惠子、平山亮一、幸田華奈、尾崎匡邦、陳劍、安藤興一、増永慎一郎、古澤佳也：分割照射の転移への影響、2012 Annual Report of the Research Project with Heavy Ion at NIRS-HIMAC, 159-160, 2013.
6. 松本孔貴、山下慶、李惠子、古澤佳也：2012 Annual Report of the Research Project with Heavy Ion at NIRS-HIMAC, 150-155, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 孔貴 (MATSUMOTO, YOSHITAKA)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70510395