

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461925

研究課題名(和文) 局所進行非小細胞肺癌に対する重粒子線・化学療法併用に向けての基礎的研究

研究課題名(英文) Interaction of heavy-ion radiotherapy combined with chemotherapy for locally advanced non-small-cell lung cancer

研究代表者

高橋 健夫 (TAKAHASHI, TAKEO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70241883

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)：ヒト非小細胞肺癌細胞H460細胞を用いてin vitroで炭素線照射と抗がん剤併用による細胞致死効果の増感性について検討した。群馬大学の炭素線治療装置を用いて、290MeV/μでSOBPビームを作成し実験を実施した(SOBPビーム中心のLETは50 keV/μm)。カルボプラチン、パクリタキセルの併用いずれにおいても炭素線照射に対して、細胞生存率曲線、細胞増殖能力測定において相乗効果を示すことが明らかとなった。細胞死のメカニズム解析ではアポトーシスとセネッセンスが抗がん剤併用炭素線照射でX線照射時に比べ有意に増加していた。その機序にp21、p53の発現増強が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that relative biological effectiveness (RBE) of high-LET carbon-ion irradiation is higher than that of low-LET radiation such as X-ray. We investigate the difference of radiosensitivities (clonogenic survival assay and cell proliferation) between carbon-ion beam irradiation combined with chemotherapy agents and X-ray irradiation combined with chemotherapy for non-small-cell lung cancer cell line, H460, in vitro. Carboplatin (CBDCA) or paclitaxel (PTX) was concomitantly used with carbon-ion irradiation. CBDCA and PTX showed a synergistic effect on cell-killing over carbon-ion beam for H460 cells in vitro. Carbon-ion beam combined with CBDCA or PTX induced apoptosis and senescence, and increased the expression of p21, p53, and Bax.

研究分野：医歯薬学

キーワード：重粒子線 炭素線 抗癌剤 増感効果 非小細胞肺癌 アポトーシス セネッセンス

## 1. 研究開始当初の背景

重粒子線治療の臨床における有用性が明らかになりつつあるが、今後、局所進行癌を対象とした集学的療法が普及するには、抗癌剤をはじめとする薬剤併用効果の機構の解明、ならびに治療効果の推定が重要である。特に通常の化学放射線療法では制御が困難な期非小細胞肺癌に対し、線量分布ならびに局所効果が極めて良好な重粒子線治療の併用が期待される。重粒子線治療の新たな臨床試験の作成、重粒子線治療における生物効果に基づく至適な治療計画作成のための、基礎的知見を得る。重粒子線(炭素線)治療により切除不能期非小細胞肺癌の臨床試験作成のため、必須な基礎的研究である。

## 2. 研究の目的

臨床試験の結果、頭頸部非扁平上皮癌や骨軟部腫瘍、悪性黒色腫など多くの放射線抵抗性腫瘍に対して良好な局所制御効果が報告されている。今後、炭素線治療の普及には common cancer に対する適応拡大が求められ、局所進行癌の集学的治療の一環として炭素線治療の有効性を科学的に示す必要がある。本研究では死亡率第一位で治療成績が不良な肺癌において、治療成績向上を目的とした局所進行非小細胞肺癌に対する炭素線治療の有効性を確立するための基礎的研究である。

In vitro でヒト肺癌細胞を用い、ブロードビームならびに細胞核のみ照射するマイクロビームで重粒子線が照射された場合の細胞応答の比較検討は、他に報告はなく極めて独創的で意義のある実験であると考えられる。その上、抗癌剤併用効果についてヒト肺癌細胞を用いて詳細に検討するもので、この課題から得られる結果は、重粒子線治療の適応を大きく広げる可能性に繋がるものである。いまだ報告のない抗癌剤併用による増感効果とその機序について解析を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト非小細胞肺癌細胞で樹立継代されている A549、H460 を用い、炭素線照射ならびに X 線照射と各種抗癌剤の併用効果を in vitro の実験で検討した。群馬大学重粒子線医学研究センターの炭素線治療装置を用いて、290MeV/μ で SOBП ビームを作成し照射実験を実施した(SOBП ビーム中心の LET は 50 keV/μm)。また日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の細胞局部照射装置(マイクロビーム)にてマイクロビーム照射を行う。抗癌剤は非小細胞肺癌に対する化学療法で汎用されているシスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセルならびにエトポシドを用いた。

### (1) 重粒子線・抗癌剤の併用効果:

抗癌剤は IC<sub>50</sub> 量を用い、殺細胞効果はコロニー形成法による細胞生残率曲線(D<sub>0</sub> 値, Dq 値, / 値)と細胞増殖能力測定から求め、X 線抗癌剤併用群の結果と比較検討し、Relative Biological Effectiveness (RBE) を求めた。

### (2) 増感効果のメカニズム:

抗癌剤同時併用の X 線照射後 6, 12, 24 時間後のアポトーシス、セネッセンス出現率、細胞周期の変動、ならびに DNA 修復蛋白(DNA-PK, Ku70, Ku80)、アポトーシス関連蛋白(Bax, p53, p21)の発現を確認した。EGFR ステータスの相違と炭素線に対する感受性の間の相関について検討した。

## 4. 研究成果

炭素線照射とカルボプラチン、パクリタキセル、エトポシドのいずれの併用においても、炭素線照射単独に対して相乗効果を示すことが明らかとなった。この現象は X 線照射の場合と同様に認められた。増感効果はそれぞれ 1.2~1.4 程度で同等であった。細胞生残率曲線、細胞増殖能力測定いずれの解析法で

も同様の相乗効果を示した。細胞死のメカニズム解析においてはアポトーシスとセネッセンスがX線照射時に比べ増加していた。アポトーシスならびにセネッセンスのいずれにおいても炭素線照射と抗がん剤併用で有意な増強が認められた。その機序としては炭素線照射とカルボプラチンもしくはパクリタキセルの併用でp21ならびにp53の発現増強が認められたことに関連すると考えられた。またKu70, Ku80発現の増強がいずれの炭素線、X線いずれの群においても認められた。今回の研究でEGFRステータスの相違による影響は明らかにできなかった。

## 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15件)

1. Ishiyama H, Kamitani N, Kawamura H, Kato K, Aoki M, Kariya S, Matsumura T, Kaidu M, Yoshida K, Hashimoto Y, Noda Y, H.C.Lim, Kawase T, Takahashi T, Inada K, Kumano M, Yoshikawa N, Yoshioka Y, Nakamura K, Hiratsuka J, Itami J, Hayakawa K.

Nationwide multi-institutional retrospective analysis of high-dose-rate brachytherapy combined with external beam radiotherapy for localized prostate cancer: An Asian Prostate HDR-BT Consortium. *American Brachytherapy Society* 16(3): 503-510, 2017 DOI:

10.1016/j.brachy.2017.01.006 査読有

2. Hatanaka S, Kawada Y, Washizu K, Utsumi N, Yamano T, Nishimura K, Watanabe T, Hosaka K, Todoroki K, Nakajima G, Shimbo M, Takahashi T. The Impact of Variation in Bladder Volume on the Doses of Target and Organ-at-Risk in Intensity-Modulated Radiation Therapy for Localized Prostate Cancer. *Journal of Cancer Therapy* 7:

741-751, 2016. DOI:

10.4236/jct.2016.710075 査読有

3. Shoji H, Motegi M, Osawa K, Okonogi N, Okazaki A, Andou Y, Asao T, Kuwano H, Takahashi T, Ogoshi K. Output-limiting symptoms induced by radiofrequency hyperthermia. Are they predictable?. *Int J Hyperthermia*. 32(2):199-203. 2016.

DOI: 10.3109/02656736.2015.1107760 査読有

4. Shoji H, Motegi M, Osawa K, Okonogi N, Okazaki A, Andou Y, Asao T, Kuwano H, Takahashi T, Ogoshi K. A novel strategy of radiofrequency hyperthermia (neotherapy) in combination with preoperative chemoradiotherapy for the treatment of advanced rectal cancer. A pilot study. *Cancer Med* 4(6): 834-843, 2015. DOI:

10.1002/cam4.431 査読有

5. Yoshida Y, Ando K, Ando K, Murata K, Yoshimoto Y, Musha A, Kubo N, Kawamura H, Koike S, Uzawa a, Takahashi T, Ohno T, Nakano T. Evaluation of therapeutic gain for fractionated carbon-ion radiotherapy using the tumor growth delay and crypt survival assays. *Radiother Oncol* 117 (2): 351-357, 2015. DOI:

10.1016/j.radonc.2015.09.027 査読有

6. Kubo N, Noda SE, Takahashi A, Yoshida Y, Oike T, Murata K, Musha A, Suzuki Y, Ohno T, Takahashi T, Nakano T.

Radiosensitizing effect of carboplatin and paclitaxel to carbon-ion beam irradiation in the non-small-cell lung cancer cell line H460. *J Radiat Res*. Mar;56 (2): 229-38, 2015. DOI:

10.1093/jrr/rru085 査読有

7. Shoji H, Motegi M, Osawa K, Okonogi N, Okazaki A, Andou Y, Asao T, Kuwano H, Takahashi T & Ogoshi K. A novel strategy

of radiofrequency hyperthermia(neothermia) in combination with preoperative chemoradiotherapy for the treatment of advanced rectal cancer: a pilot study. *Cancer Medicine* 4( 6):834-43, 2015. DOI: 10.1002/cam4.431 査読有

8. Takahashi T, Saitoh J, Shirai K, Nishimura K, Ohno T, Nakano T. Carbon-ion radiotherapy for non-squamous cell head and neck malignancies. *Journal of Radiology & Radiation Therapy* 2 (2): 1046, 2014 査読有

9. Takahashi T. Current Advances in Radiotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: from Conventional Radiotherapy to Carbon-Ion Radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology and Research* 2( 3): 1020, 2014 査読有

10. Shoji H, Motegi M, Osawa K, Okonogi N, Okazaki A, Andou Y, Asao T, Kuwano H, Takahashi T and Ogoshi K. Does standardization of radiofrequency hyperthermia benefit patients with malignancies? *Annals of Cancer Research and Therapy* 22 ( 1): 28-35, 2014. DOI: 10.4993/acrt.22.28 査読有

11. Murata K, Noda S, Oike T, Takahashi A, Yoshida Y, Suzuki Y, Ohno T, Funayama T, Kobayashi Y, Takahashi T and Nakano T. Increase in cell motility by carbon ion irradiation via the Rho signaling pathway and its inhibition by the ROCK inhibitor Y-27632 in lung adenocarcinoma A549 cells. *Journal of Radiation Research* 55 ( 4): 658-664, 2014. DOI: 10.1093/jrr/rru002 査読有

12. Imaeda M, Ishikawa H, Yoshida Y, Takahashi T, Ohkubo Y, Musha A, Komachi M, Nakazato Y and Nakano T. Long-term pathological and immunohistochemical

features in the liver after intraoperative whole-liver irradiation in rats. *Journal of Radiation Research* 55 ( 4): 665-673, 2014. DOI: 10.1093/jrr/rru005 査読有

13. Takahashi T, Nishimura K, Yamano T, Gika M. Role of palliative radiotherapy for bone metastasis. *J Palliat Care Med* 4(1) : 1-3, 2014. DOI: 10.4172/2165-7386.1000171 査読有

14. Shirai K, Tamaki Y, Kitamoto Y, Murata K, Satoh Y, Higuchi K, Ishikawa H, Nonaka T, Takahashi T, Nakano T. Prognosis was not deteriorated by multiple primary cancers in esophageal cancer patients treated by radiotherapy. *J Radiat Res.*54(4):706-11, 2013. DOI: 10.1093/jrr/rrt002 査読有

15. Takahashi T, Nishimura K, Yamano T. Role and Progression of Radiotherapy for Locally Advanced Esophageal Cancer. *Journal of Gastrointestinal & Digestive System* S1: 005, 2013. DOI: 10.4172/2161-069X.S1-005 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Ueno S, Yamano T, Nishimura K, Hondo M, Murata O, Hatanaka S, Yoshida K, Osada H, Shimbo M, Honda N, Takahashi T. Evaluation about quality of life and psychophysiological effect in patients treated with radiotherapy for cancer recurrence or metastasis. Japanese Society for Radiation Oncology Proceedings of the 28th Annual Meeting of JASTRO. Nov 19-21, 2015. Maebashi, Japan.

2. Yamano T, Takahashi T, Nishimura K, Ueno S, Hondo M, Murata O, Hatanaka S, Shimbo M, Kumagai Y, Osada H, Ishida H. Radiotherapy outcome of T4 esophageal

cancer in our institute. Japanese Society for Radiation Oncology Proceedings of the 28th Annual Meeting of JASTRO. Nov 19-21, 2015. Maebashi, Japan.

3. Nishimura K, Takahashi T, Yamano T, Ueno S, Hondo M, Murata O, Hatanaka S, Shimbo M, Ishibasi K, Osada H, Ishida H. Initial treatment experience of neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced lower rectal cancer. Japanese Society for Radiation Oncology Proceedings of the 28th Annual Meeting of JASTRO. Nov 19-21, 2015. Maebashi, Japan.

4. Yamano T, Takahashi T, Nishimura K, Ueno S, Shimbo M, Hondo M, Hatanaka S, Murata O, Okada T, Honda N. Treatment outcomes of hypofractionated stereotactic radiotherapy for inoperable cerebral arteriovenous malformations. 12th International Stereotactic Radiosurgery Society Congress. June 7-11, 2015. Yokohama, Japan.

5. Nishimura K, Takahashi T, Yamano T, Ueno S, Murata O, Hondo M, Ohno H, Watanabe W, Osada H, Honda N. Moderately-hypofractionated Stereotactic Body Radiotherapy for Lung Cancer. 15th International congress of Radiation Research. May 25-29, 2015. Kyoto, Japan

6. Suda S, O uji H, Sugawara K, Inbo K, Motegi M, Oosawa K, Ogoshi K, Takahashi T, Asao T, Kuwano H. Trial of prevention for complications induced during "Thermotron RF-8" treatment. The 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology The 31st Japanese Congress of Thermal Medicine. September 5-6, 2014, AOSSA.福井

7. Jinbo K, Shoji H, Sugawara K, Suda S, Motegi M, Oosawa K, Ogoshi K, Takahashi T, Asao T, Kuwano H. Correlation between

complications induced by [Thermotron RF-8] and physical status. The 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology The 31st Japanese Congress of Thermal Medicine. September 5-6, 2014, AOSSA.福井

8. Sugawara K, Shoji H, Jinbo K, Suda S, Motegi M, Oosawa K, Ogoshi K, Takahashi T, Asao T, Kuwano H. Trial of treatment-standardization ; similar quality of treatment of hyperthermia by "Thermotron RF-8". The 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology The 31st Japanese Congress of Thermal Medicine. September 5-6, 2014, AOSSA.福井

9. Takakusagi Y, Okonogi N, Okazaki A, Motegi M, Onishi M, Ogoshi K, Takahashi T, Asao T, Kuwano H, Nakano T. Preliminary result of hyperthermochemoradiotherapy using IMRT and capecitabine for advanced low-rectal cancer. The 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology The 31st Japanese Congress of Thermal Medicine. September 5-6, 2014, AOSSA.福井

10. Yamano T, Nishimura K, Ueno S, Shinbo M, Murata O, Ohno H, Shimizu Y, Osada H, Honda N, Takahashi T. Treatment outcomes of hypofractionated stereotactic radiotherapy for inoperable cerebral arteriovenous malformations. The 15th Asian Oceanian Congress of Radiology. September 24-28, 2014, Kobe Convention Center

11. Takahashi T. Carbon-ion Radiotherapy for Non-squamous Head and Neck Cancer. BIT 's 7th Annual World Cancer Congress 2014. May 16-18, 2014, Nanjing, China

12. Takahashi T, Subedi KS, Yamano T, Nishimura K, Saitoh J, Ueno S, Murata O, Osada H, Nakano T, Honda N. Usefulness of a Double Dose Contrast Enhanced Magnetic

Resonance Imaging for a Deliniation of  
Gross Tumor Volume in Stereotactic  
Radiotherapy for Metastatic Brain Tumors.  
The 6th World Cancer Congress 2013.  
Xian(China), May 23-25, 2013.

〔図書〕(計 2件)

- 1.高橋健夫.多発性骨髄腫に対する放射線治療.ブラッシュアップ多発性骨髄腫(木崎昌弘編著)186-193、2015.中外医学社
- 2.高橋健夫.造血器腫瘍に対する放射線治療の適応と有害事象.カラーテキスト血液病学(木崎昌弘編).197-202、2013.中外医学社.

## 6.研究組織

(1)研究代表者

高橋 健夫(TAKAHASHI TAKEO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号:70241883