

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861054

研究課題名(和文) がんラジオアイソトープ内用療法開始患者の治療予備能力を予測する因子の解明

研究課題名(英文) Investigation of reserve capacity factor(s) in cancer patients under radioactive drug treatment .

研究代表者

門前 暁 (Monzen, Satoru)

弘前大学・保健学研究科・講師

研究者番号：20514136

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)：本研究課題は、がんラジオアイソトープ内用療法施行患者における治療予後予測因子及び予備能力を把握するバイオマーカーを見出すための研究である。本課題では患者25名の末梢血液及び尿を70以上の検体を回収し解析を進めた。分化型甲状腺癌患者における放射性ヨウ素の内用は、内用4週後に細胞微小核頻度が最大になることを明らかにした。一方、甲状腺関連ホルモンの血中濃度変化によって微小核発現頻度に影響を及ぼすことも明らかにした。

尿中及び血清酸化ストレス応答因子である8-OHdGは放射線内用療法に応答性であった。これらの成果は、内用療法における予備能力評価法の一つになる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effect of radioisotope treatment on the extent of cytogenetic damage in lymphocytes and on the composition of the hematopoietic system, thyroid-related hormones and CD45+ cell cytotoxicity. 1st: On the patient analysis of radioactive iodine therapy (RIT) for ablation of differentiated thyroid carcinoma, it is suggested that the correlation between micronuclei frequency and the platelet system in peripheral blood may serve as a biomarker of exposure and, possibly, of sensitivity in DTC patients undergoing RIT following thyroid and lymph node surgery. 2nd: On the analysis of thyroid related hormone in peripheral blood, it was clarified that a higher concentration of thyroglobulin under abnormal conditions modifies radiation dose response of micronuclei frequency, and suggest that micronuclei frequency in cytogenetic dosimetry is affected by thyroid hormones.

研究分野：放射線防護・管理学

キーワード：ラジオアイソトープ内用療法 治療予備能力 微小核発現細胞 酸化ストレス 放射性ヨウ素 分化型甲状腺癌

1. 研究開始当初の背景

がん放射線療法のうちラジオアイソトープ内用療法 (RIT) は、臓器親和性化合物に飛程の短い高エネルギーβ線放出核種を標識して標的部に集積させて死滅させる分子標的療法である。これまで国内では甲状腺がんを対象とした放射性ヨード (^{131}I) カプセルが RI 内用療法の主流であったが、骨転移疼痛緩和を目的としたメタストロン (^{89}Sr) や悪性リンパ腫治療を目的としたゼヴァリン (^{90}Y) がそれぞれ承認され利用されたことにより QOL と共に治療効果が改善された。 ^{131}I 及び ^{89}Sr は一定間隔をもちながら複数回実施することが可能であるため、患者が持っている体力や生理機能 (予備能力) を把握することが次の治療を実施する判断材料となる。しかしながら、この予備能力を把握する決定的なツールが存在しないのが現状である。

研究代表者が所属する研究グループでは、これまでヒト臍帯血または末梢血の放射線影響を研究してきた。血液には、造血幹・前駆細胞、成熟血球、及び血清タンパクなどが含まれており、これらは放射線や外的酸化ストレスに対して高感受性である。そのため、RIT において末梢血は RI の輸送因子となるため、正常血液細胞へ影響を及ぼす。 ^{89}Sr では、造血細胞の被ばくによって血小板減少症が 14.4%、白血球減少症が 13.3%、貧血が 8.9% の患者での出現が明らかにされている (日本メジフィジックス社)。最近、所属研究グループでは血液中の造血細胞には放射線感受性個体差が存在することを明らかにした (*Radiat Res.* 2010)。更に臍帯血由来血清の酸化ストレス関連バイオマーカーから母体の状況を予測することが可能な事を明らかにした (*J Obstet Gynaecol Res.* 2010)。これらの経験から、全身の栄養輸送を担う末梢血は、生体の全身状態を反映する因子が数多く存在し、それらのいくつかを組合せることで RIT 施行患者の予備能力を予測可能ではないかと仮説を立て、血液に含まれるバイオマーカーのうち酸化ストレス関連因子の状態、及び造血細胞における損傷状態の評価解析によって明らかにする本研究課題の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RIT において治療開始後の患者個々及び核種ごとの予備能力を、末梢血の採血によって血清バイオマーカー及び造血細胞の損傷状態から予測し、本治療の最適化を行ない、質的向上を図ることである。この目的を達成させるため、研究期間内に下記 3 項目の内容について研究を進めた。

(1) RIT 施行後の患者末梢血中の造血細胞核及び染色体の異常の有無と関連性を解明する。

RIT によって生じる細胞核及び染色体形成異常はどの程度発生するのか、また長期

的に観察した場合それら異常がどのような応答を示すのかは不明である。これまでに外部被ばくによって明らかにされている報告と比較しながら、未だ報告のない RIT 施行患者における核種ごとの細胞核異常及び染色体異常を経時的に解析した。

(2) 血清酸化ストレスバイオマーカーと関連性の解明

生体内には、酸化ストレス因子として、DNA 塩基が酸化損傷によって生成される 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)、酸化ストレス度を示す reactive oxygen metabolites (dROMs)、及び抗酸化力を示す biochemical antioxidant potential (BAP) が知られている。更にストレスホルモンとしてプロゲステロン、コルチゾールなどが知られている (*J Obstet Gynaecol Res.* 2010)。これらが RIT 施行患者の予備能力に関連があるか定量解析によって明らかにする。

(3) 損傷造血前駆細胞及び成熟血球の機能と関連性の解明

RIT によって損傷造血前駆細胞のクローン原生能や成熟血球の各種機能性に関連性があるか細胞培養法にて明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は弘前大学医学研究科倫理委員会の承認のもと、日本国内の関連医療施設を対象に患者の同意を得て解析を進めた。

(1) 細胞核形成異常及び染色体異常解析：

採血された末梢血は、国際原子力機関が発行する Cytogenetic Dosimetry マニュアルに従い、造血機能を有する細胞及び成熟血球を対象として、染色体構造を可視化する in situ ハイブリダイゼーション法を用いて形態異常を確認した。また、損傷染色体が子孫細胞にどのように伝達されるか、細胞培養を用いた動的解析 (タイムラプス) によって子孫細胞が正常か評価した。

(2) 生体内酸化ストレスの定量解析：

末梢血より血清を分離した後、血清内の 8-OHdG、dROMs、BAP 及び酸化ストレス関連ホルモンについて定量した。また、一般生化学検査で得られる各血清タンパクとの関連性の有無も評価した。

(3) 末梢血由来造血前駆細胞のクローン原生能解析：

末梢血を比重遠心法及びフローサイトメトリ法によって分取したリンパ系、白血球系、赤血球系、及び巨核球系前駆細胞の分化・増殖能を培養によって状態を解析し、放射線感受性と産生血球から次世代の血球機能も含め解析した。

(4) 末梢血由来成熟血球の機能解析：

(3) で分離された赤血球、顆粒球、血小板を用いて血球機能評価を行なう。白血球系では食作用について、赤血球系では貧血性マーカーの発現について、巨核球系では血小板凝集能マーカーの発現について、それぞれ解析した。

4. 研究成果

(1) RIT 施行患者の末梢血細胞の評価:

同意の得られた 25 名(56 ± 11 歳)の ¹³¹I を内用する分化型甲状腺癌患者において、末梢血を内用 4 週間前、内用直前及び内用 4 週間後に採血し解析した。その結果、血球分画分析において、白血球系及び赤血球系の主要血球分画は内用 4 週間後にそれ以前に比べ有意に減少した。また、CD45 陽性血液細胞を対象とした細胞微小核頻度は、内用 4 週間後にそれ以前と比べ上昇した。更にそれら上昇の程度には個人差が存在した。

(2) RIT 施行患者の末梢血由来血清の評価:

(1)と同様の ¹³¹I 内用 RIT 患者及び血液サンプリング条件にて、採取された血清における酸化ストレス関連因子を解析した。その結果、抗酸化能を示す BAP 因子、酸化度を示す dROMs 及び DNA ストレス損傷を示す 8-OHdG それぞれにおいて、¹³¹I カプセルを内用したことによる大きな特徴はみられなかった。また、それら定量値は病期ステージ分類(TNM 分類)との有意な相関はみられなかった。

(3) RIT 施行患者の尿中代謝物の評価:

(1)(2)に並行して、¹³¹I 内用 RIT 患者の尿を継時的に回収した。その結果、内用 4 週間後の尿中 8-OHdG、BAP 及び dROMs 因子は内用直前に比べ有意に上昇した。更に、この変動のうち 8-OHdG 因子は TNM 分類特異的であり、更に変動率が大きいほど治療予後が良好である傾向を示した。

(4) RIT 施行患者における長期的な解析

RIT 施行患者における内部放射線ストレスの長期的な影響を明らかにするために、¹³¹I カプセル内用後 6 か月までの末梢血について評価解析した。その結果、内用 4 週間後における末梢血細胞微小核頻度が最大を示した。

(5) RIT 施行患者における血清代謝物の網羅的な評価

RIT 施行患者のうち ¹³¹I 内用 RIT 患者の末梢血由来血清に着目し、質量分析装置を用いたメタボローム解析を施行した。対象とした因子は既知の 900 種とし、内用 4 週間後の血清内代謝物は、内用前に比べ半数以上の因子が変動した。また、情報伝達解析による評価の結果、エネルギー代謝サイクルとして知られるクエン酸代謝回路が有意に活性化していた。

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 13 件)

1. Saga R, Monzen S, Chiba M, Yoshino H, Nakamura T, Hosokawa Y. Anti-tumor and anti-invasion effects of a combination of 4-methylumbelliferone and ionizing radiation in human fibrosarcoma cells. *Oncol Lett*, 13(1), 410-416, 2017. (査読有)
2. 冨前 暁, 千葉 満, 真里谷 靖. 分化型甲状腺癌患者における放射性ヨウ素内用療法の効果及び有害事象を予測する因子の探索. *臨床病理*, 64(suppl), 434, 2016. (査読無し)
3. 千葉 満, 冨前 暁. 血清中循環 microRNA に着目した新たな生物学的被ばく線量評価法の検討. *臨床病理*, 64(suppl), 446, 2016. (査読無し)
4. Monzen S, Chiba M, Hosokawa Y. Genetic network profiles associated with established resistance to ionizing radiation in acute promyelocytic leukemia cells and their extracellular vesicles. *Oncol Rep*, 35(2), 749-756, 2016. (査読有)
5. Nakamura A, Monzen S, Takasugi Y, Wojcik A, Mariya Y. Application of cell sorting for enhancing the performance of the cytokinesis-block micronucleus assay. *J Radiat Res*, 57(2), 121-126, 2016. (査読有)
6. 千葉 満, 冨前 暁, 真里谷 靖. 急性放射線障害の予測バイオマーカーとして有用な血清中 microRNA の探索. *臨床病理*, 63, 212, 2015. (査読無し)
7. 真里谷 靖, 冨前 暁, 對馬 恵, 千葉 満. 放射性ヨード内用療法施行甲状腺癌患者における身体影響評価法としての酸化ストレス関連マーカーの有用性. *臨床病理*, 63, 213, 2015. (査読無し)
8. 冨前 暁, 千葉 満, 真里谷 靖. 末梢血細胞を用いた Cytokinesis-block micronucleus assay による放射線医療被ばくの線量評価ツールの検討. *臨床病理*, 63, 212-213, 2015. (査読無し)
9. Monzen S, Chiba M. mRNA Expression Profiles in Human Lymphoid Progenitor Cell are Modified by High-dose Ionizing Radiation, *Radiat Emerg Med*, 4(2), 35-39, 2015. (査読有)
10. Monzen S, Mariya Y, Nakamura A, Kawamura C, Taira K, Chiba M, Takai Y. Cytogenetic dosimetry by micronucleus assay using peripheral blood cells is modified by thyroid hormones. *Radiat Prot Dosimetry*. 167(1-3): 321-325, 2015. (査読有)
11. Monzen S, Mariya Y, Wojcik A, Kawamura C, Nakamura A, Chiba M, Hosoda M, Takai Y. Predictive factors of cytotoxic damage in radioactive iodine treatment of differentiated thyroid cancer patients. *Mol Clin Oncol*, 3(3), 692-698, 2015. (査読有)
12. Monzen S, Saga R, Chiba M, Hosokawa Y. Acquisition of resistance to ionizing

radiation in acute promyelocytic leukemia cells occurs via modifications of several mRNA expression networks. *Int J Mol Med*. 34(S1): S51, 2014. (査読有)

13. Saga R, **Monzen S**, Yoshino H, Chiba M, Nakamura T, Hosokawa Y. Effects of radiation and combined impact as metastasis inhibitors 4-methylumbelliferone has on the human fibrosarcoma cell. *Int J Mol Med*. 34(S1): S51, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計38件)

1. **門前 暁**, 千葉 満, Lovisa Lundholm, Andrzej Wojcik. 放射線被ばくに対する生物学的線量評価の有効性の確認と新たな取組み. 平成28年度放射線安全取扱部会年次大会, 鎌倉芸術館(神奈川県鎌倉市), 要旨集 page 91 (D-09), 2016年11月10-11日.
2. 千葉 満, **門前 暁**. 血清中循環microRNAに着目した急性放射線症候群バイオマーカー. 日本放射線影響学会第59回大会, JMS アステールプラザ(広島県広島市), OA1-09, 2016年10月26-28日.
3. **門前 暁**, 千葉 満, Wojcik Andrzej, 真里谷 靖, 細川 洋一郎. ヒト白血球細胞における放射線抵抗性獲得後の細胞外小胞 mRNA 発現の特徴, 日本放射線影響学会第59回大会, JMS アステールプラザ(広島県広島市), P-030, 2016年10月26-28日.
4. **Monzen S**, Chiba M, Hosokawa Y, Mariya Y. Predictive biomarkers for detecting adverse effects using radioisotope ablation in patients with papillary thyroid carcinoma. *The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science (IFBLS2016)*, Kobe International Conference Center (Kobe, Japan), PO-12, 2016年09月31-10月4日.
5. Chiba M, **Monzen S**. Serum microRNAs for early diagnosis of acute radiation syndrome Serum miR-375-3p as a biomarker for early diagnosis of acute radiation syndrome. *The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science (IFBLS2016)*, Kobe International Conference Center (Kobe, Japan), PL-03, 2016年09月31-10月4日.
6. **門前 暁**, 新岡 優, 高杉 勇輝, Andrzej Wojcik, 千葉 満, 高井 良尋, 真里谷 靖. 甲状腺癌患者の血清代謝産物に着目した治療予後予測マーカーの探索. 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会, BMB2015, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2P1226, 2015年12月1-4日.
7. **Monzen S**, Chiba M, Iwaya C, Nakamura T, Mariya Y, Kashiwakura I. Predictive biomarker as acute radiation syndrome

using serum microRNAs in mice exposed to sublethal dose of ionizing radiation, *The 7th JARI & JSEV Annual Meeting*, グランドプリンスホテル広島(広島県広島市), PA-11, 2015年08月26-28日.

8. **門前 暁**, 細川 洋一郎, 嵯峨 涼, 千葉 満, 中村 敏也, 真里谷 靖. 4-メチルウンベリフェロンを併用したがん放射線療法の基礎的検討. *Cytometry Research*, お茶の水ソラシティーカンファレンス(東京都文京区), 25(Suppl): 54, 2015年07月11-12日.
9. **Monzen S**, Hosokawa Y, Saga R. Radioresistant Fraction of Acute Promyelocytic Leukemia Cells Shows CD38 Cell Surface Antigen and mRNA Expression. *15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015)*, 国立京都国際会館(京都府京都市), 4-PS1B-09, 2015年05月25-29日.
10. **Monzen S**, Mariya Y, Wojcik A, Takai Y. Cytotoxic Damage of Peripheral Blood Cells by ^{131}I treatment of Differentiated Thyroid Cancer Patients. *15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015)*, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2-PS2D-05, 2015年05月25-29日.
11. Chiba M, **Monzen S**, Kashiwakura I, Nakamura T. Up-regulated and Down-regulated Cis-natural Antisense Transcripts in the Human B Lymphoblastic Cells after X-ray Irradiation. *15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015)*, 国立京都国際会館(京都府京都市), 4-PS3G-07, 2015年05月25-29日.
12. Mariya Y, Kawamura C, Nakamura A, **Monzen S**, Takai Y, Saito A, Yonezawa T. Availability of Oxidative Stress-related Marker to Estimate Radiation Damage in the Thyroid Cancer Patients Undergoing ^{131}I treatment. *15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015)*, 国立京都国際会館(京都府京都市), 3-PS5G-10, 2015年05月25-29日.
13. 真里谷 靖, **門前 暁**. Cytokinesis-block micronucleus assayによる放射線誘発核損傷の評価. 第61回日本臨床検査医学学会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 62: 194, 2014年11月22-25日.
14. **門前 暁**, 真里谷 靖, Wojcik Andrzej, 川村 千香, 中村 歩美, 千葉 満, 高井 良尋. 分化型甲状腺癌患者の放射性ヨウ素内用療法時に生じる末梢血応答機構の解明. 第87回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 3P-512, 2014年10月15-18日.
15. **門前 暁**, 真里谷 靖, 千葉 満, 細川 洋一郎, 丸山 敦史, 高井 良尋. ^{131}I 内服が

- ん治療患者の生体内 cytotoxic response の評価. 日本放射線影響学会第 57 回大会, かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市), P-101, 2014 年 10 月 1-3 日.
16. 中村 歩美, **門前 暁**, 高杉 勇輝, Wojcik Andrzej, 真里谷 靖. Cytokinesis-block micronucleus assay を用いた被ばく線量評価における最適化の検討. 日本放射線影響学会第 57 回大会, かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市), P-111, 2014 年 10 月 1-3 日.
17. 川村 千香, **門前 暁**, 中村 歩美, Hagdoost Siamak, 真里谷 靖. 放射線治療患者における酸化ストレス関連マーカーの経時的変化, 日本放射線影響学会第 57 回大会, かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市), O3-4-5, 2014 年 10 月 1-3 日.
18. **Monzen S.**, Mariya Y, Kawamura C, Nakamura A, Takai Y. Cytogenetic dosimetry in peripheral blood cells of recurrent thyroid cancer patients, influenced by deficiency of thyroid hormone replacement. *The 9th International Symposium on the Natural Radiation Environment (NRE-IX)*, Hotel New Castle (青森県弘前市), 2014 年 09 月 23-26 日.
19. Kawamura C, **Monzen S.**, Nakamura A, Mariya Y. Analysis of serial change of oxidative stress-related markers in the patients with recurrent thyroid cancer undergoing ¹³¹I radionuclide therapy. , *The 9th International Symposium on the Natural Radiation Environment (NRE-IX)*, Hotel New Castle (青森県弘前市), 2014 年 09 月 23-26 日.
20. **門前 暁**, 千葉 満, 丸山 敦史, 嵯峨 涼, 真里谷 靖, 細川 洋一郎. 放射線抵抗性を獲得したヒト前骨髄性白血病細胞の情報伝達機構の特徴. 第 6 回日本 RNAi 研究会, グランドプリンスホテル広島(広島県広島市), PB-08, 2014 年 08 月 28-30 日.
21. **門前 暁**, 真里谷 靖, 千葉 満, 高井 良尋. 分化型甲状腺癌患者の ¹³¹I 内用療法が末梢血液に与える cytotoxic response の解析. 日本放射線腫瘍学会第 52 回生物部会学術大会, メルパルク京都(京都府京都市), O6-4, 2014 年 07 月 11-12 日.
22. 川村 千香, **門前 暁**, 中村 歩美, 甲藤 敬一, 真里谷 靖. 放射線治療患者における酸化ストレス関連マーカーの経時的変化. 日本放射線影響学会第 56 回大会, ホテルクラウンパレス青森(青森県青森市), O-1-2-5, 2013 年 10 月 18-20 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

門前 暁 (Monzen Satoru)

弘前大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号: 20514136

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

真里谷 靖 (Mariya Yasushi)

青森県むつ総合病院・副院長

弘前大学・大学院保健学研究科・客員研究員

研究者番号: 20239148

細川 洋一郎 (Hosokawa Yoichiro)

弘前大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 70173599