

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870382

研究課題名(和文) 中性子捕捉療法後組織に生じるDNA二本鎖切断の H2AXによる検出

研究課題名(英文) Detection of gamma H2AX foci in mouse normal brain and brain tumor after boron neutron capture therapy

研究代表者

近藤 夏子 (Kondo, Natsuko)

京都大学・原子炉実験所・助教

研究者番号：00582131

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)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)では硼素化合物を患者に投与し、熱外中性子を患者の患部に照射する。腫瘍選択的に取り込まれた硼素(^{10}B)に中性子が照射されると、 ^4He 粒子と ^7Li 原子核に分裂するので、その分裂の際に生じる高LET放射線で腫瘍細胞を選択的に破壊する。高LET放射線は、 γ 線などの低LET放射線に比べて修復されない致命的なDNA二本鎖切断(DSB)を生成すると考えられている。本研究ではBNCTで生じるDSBをそのマーカーである H2AXを指標にマウス脳腫瘍モデルの免疫組織染色で調べた。BNCTで生じたDSBは24時間後も修復されず残ったが、 γ 線成分によるDSBは消失した。

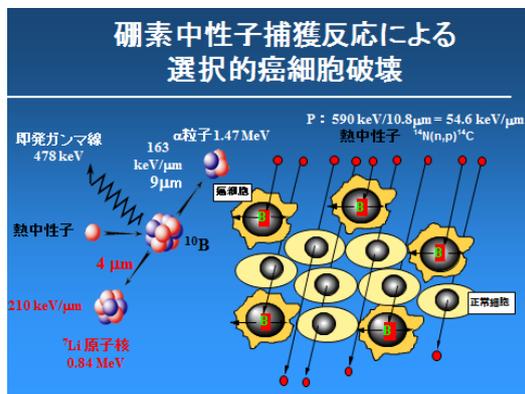
研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is a particle radiation therapy in combination of thermal neutron irradiation and boron compound that specifically accumulates in the tumor. ^{10}B captures neutrons and produces an alpha particle (^4He) and lithium (^7Li) nucleus. These particles have the characteristics of extremely high linear energy transfer (LET) radiation and therefore have marked biological effects. As the high LET radiation induces complex DNA double strand breaks (DSBs), large proportions of DSBs are considered to remain not repaired in comparison with those induced by low LET radiation. In this study, we investigated H2AX foci as markers of DSBs in normal brain and brain tumor tissues in mouse after BNCT. H2AX foci induced by $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ reaction remained 24 h after neutron beam irradiation. In contrast, H2AX foci produced by γ -ray irradiation at contaminated dose in BNCT disappeared 24 h after irradiation in these tissue.

研究分野：脳腫瘍学、ホウ素中性子捕捉療法

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 DNA二本鎖切断 H2AX 悪性グリオーマ

1. 研究開始当初の背景

中性子捕捉療法は、硼素化合物 (^{10}B) を取り込んだ癌細胞に熱中性子線を照射し、発生する α 粒子 ($163 \text{ keV}/\mu\text{m}$) と Li 原子核 ($210 \text{ keV}/\mu\text{m}$) の核分裂エネルギーを利用した高 LET 放射線治療である。硼素中性子捕捉反応によって重篤な DNA 損傷である DSB が生成される。細胞に生成された DSB は γH2AX focus 形成によって標識できると考えられている。重粒子線などの high LET 放射線によって生じる DSB は γ 線や X 線などの低 LET 放射線によって生じる DSB よりもサイズが大きく、修復されにくいと報告されている。このことを踏まえて、ヒトの細胞、組織レベルで中性子捕捉反応後にどのような大きさの DSB が生成され、それは修復されるのかを γH2AX の focus を用いて調べる着想に至った。



2. 研究の目的

中性子捕捉療法によって生じる DSB のサイズを γH2AX の focus のサイズを指標にして、正常細胞、腫瘍細胞を用いて in vivo で調べることを目的とする。

3. 研究の方法

脳腫瘍移植モデル

使用するマウス ; BALB/C nu-nu マウス
 移植する細胞 ; ヒトグリオブラストーマ細胞 U251。マウスの脳にヒトグリオブラストーマ細胞 U251 を脳定位固定装置を用いて移植する。

薬物投与

マウスに生食または Boronophenylalanine: BPA を照射 1 時間前に皮下投与した。

照射方法 ; 京都大学原子炉実験所重水設備台車を用いて 1 時間、頭部を照射。体はフッ化リチウム入りの熱可塑性樹脂で覆って遮蔽した。

γ 線照射は京都大学原子炉実験所コバルト-60 γ 線照射装置を用いて行う。 γ 線照射は京都大学原子炉実験所コバルト-60 γ 線照射装置を用いて行う。

線量評価 ; 金箔活性化法を用いて行う。混合する γ 線は $\text{MgSiO}_2(\text{Tb})$ thermo luminescence dosimeter にて計測する。

免疫組織染色 ; 照射後、30 分後、24 時間後、に脳を取り出し凍結保存する。凍結切片を作成し、1 次抗体としてモノクローナル γH2AX 抗体を用いて免疫組織染色を行う。

γH2AX focus の検出、サイズ計測 ;

蛍光顕微鏡下で BZ-9000 BZII image analysis system (KEYENCE) を用いて行う。 γ 線照射によって生じた γH2AX focus と比較する。

4. 研究成果

腫瘍を移植していないマウスの脳 (正常脳) の評価

生食投与群、BPA 投与群の中性子照射後の γH2AX の focus の数は、30 分後それぞれ両群とも 5-6 個であった。24 時間経過するとそれぞれ 2 個、3.5 個であった(図 1)。

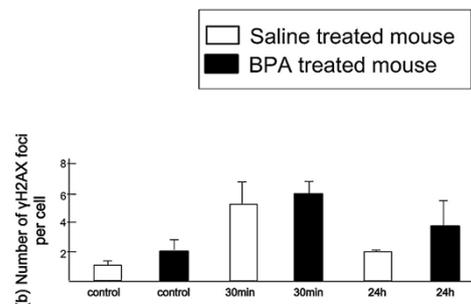


図 1. 中性子照射後正常脳にみられる γH2AX

脳腫瘍モデルの腫瘍組織の評価

生食投与群、BPA 投与群の中性子照射後の γH2AX の focus の数は、24 時間経過するとそれぞれ 0 個、3.3 個であった (図 2)。

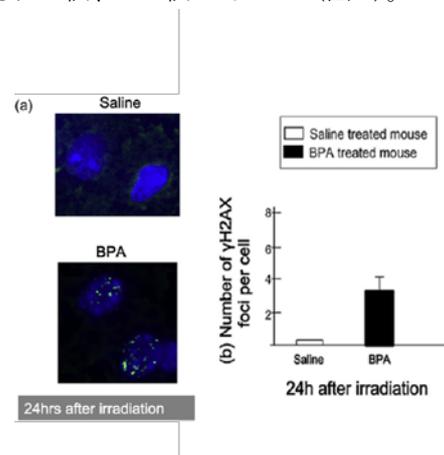


図 2. 中性子照射 24 時間後脳腫瘍組織にみられる γH2AX の数

γ線照射群の評価

中性子照射時の混在照射線量である 1.1Gy の γ 線を照射した場合、正常脳、脳腫瘍組織ともに 24 時間後は γH2AX の focus は消失していた (図 3)。

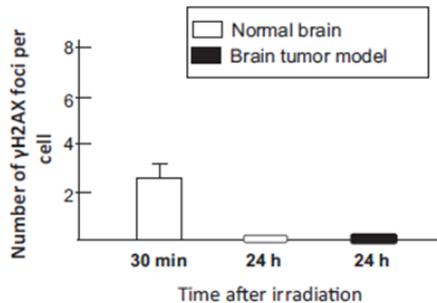


図 3. γ線照射後にみられる γH2AX の数

腫瘍組織において中性子照射後、中性子と硼素が反応して生じた high LET 放射線・Nα 反応によって生じた DSB が修復されずに残ったと考えられる。これは、BNCT の高い抗腫瘍効果を表していると考えられる。

γ線と Nα 反応によって生じた DSB の大きさの違いは本研究では明らかな差を認めなかった。

In vitro の研究では High LET 放射線によって生じる DSB の主な修復経路である Non Homologous End Joining repair の DNA ligase IV (Lig4) の欠損株と野生株に対して中性子線照射を行い、DNA ligase IV が Nα 反応によって発生する DSB の修復に寄与するかどうかを調べた。

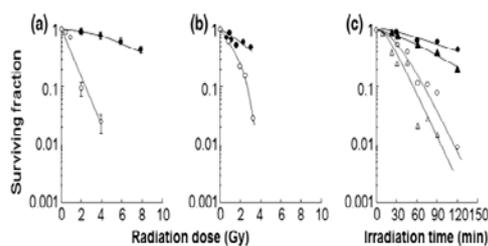


図 4. *Lig4*^{-/-}*p53*^{-/-} cell と *Lig4*^{+/+}*p53*^{-/-} cell に対する生存曲線 a) γ線照射、b) 中性子線照射、c) 中性子線照射 with or without BPA、○ *Lig4*^{-/-}*p53*^{-/-} cell, ● *Lig4*^{+/+}*p53*^{-/-} cell, without BPA, △ *Lig4*^{-/-}*p53*^{-/-} cell, ▲ *Lig4*^{+/+}*p53*^{-/-} cell, with BPA)

その結果、DNA ligase IV が Nα 反応によって発生する DSB の修復に一部寄与することがわかった。

H27 年度も原子炉が動かなかったため、原子炉を使わないで本研究に関与する実験を行った。γH2AX の発現に関しては cell line によって、異なることが知られている。よって本研究ですでに使用した既知の cell line U251 以外の、手術で摘出したヒトグリオブラストーマ組織より樹立した脳腫瘍幹細胞の cell line について、γH2AX の発現を調べる予備実験に取り組んだ。また樹立した cell line をヌードマウスに移植してヒトと同様のグリオブラストーマを腫瘍形成することを確認した (図 5)。今後はこの樹立した脳腫瘍幹細胞の cell line とそれをヌードマウスに移植した脳腫瘍モデルに中性子線照射を行い γH2AX の解析を進めていく。

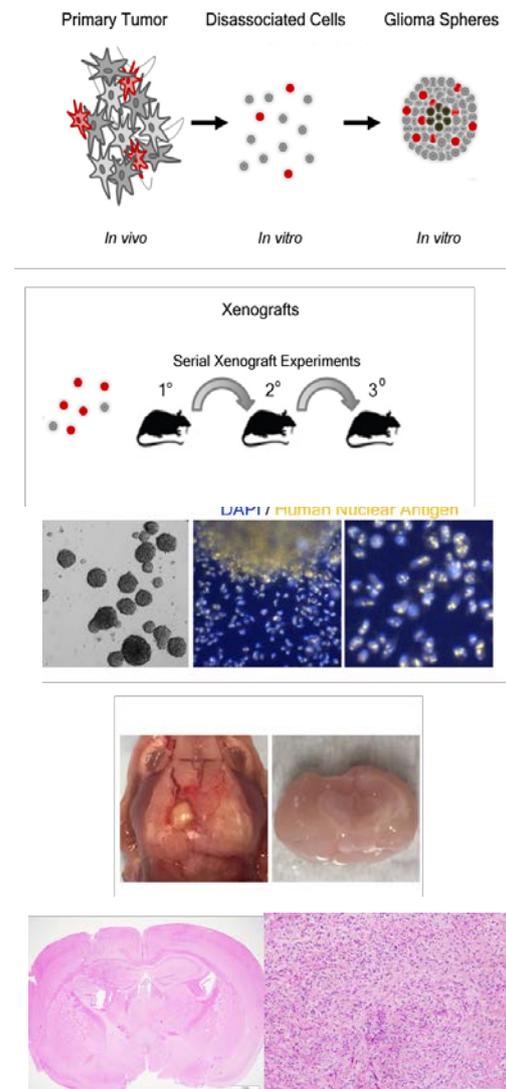


図 5. ヒトグリオブラストーマ組織より脳腫瘍幹細胞の樹立とマウス脳腫瘍形成の確認

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 N. Kondo et al., Detection of γ H2AX foci in mouse normal brain and brain tumor after boron neutron capture therapy. Rep. Pract Oncol. 2016;21:108-12. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpor.2014.10.005>
- ② N. Kondo et al., DNA damage induced by boron neutron capture therapy is partially repaired by DNA ligase IV. Radiat Environ Biophys. 2016; 55:89-94. 査読有
- ③ N. Kondo et al., Localized radiation necrosis model in mouse brain using proton ion beams. Appl Radiat Isot, 2015; 106: 242-6. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 近藤夏子、中性子捕獲反応後組織に生じる DNA 二本鎖切断の γ H2AX による検出、中性子捕捉療法学会、2013 年 9 月 7 日、岡山市
- ② 近藤夏子、中性子捕獲反応後組織に生じる DNA 二本鎖切断の γ H2AX による検出、日本放射線腫瘍学会、2013 年 10 月 20 日、青森市
- ③ N. Kondo, Detection of γ H2AX foci in mouse normal brain and brain tumor after boron neutron capture therapy., 7th Young Researchers BNCT meeting, Sep. 23, 2013, Granada
- ④ N. Kondo, Detection of γ H2AX foci in mouse brain tissue after boron neutron capture therapy., 6th Trilateral BNCT meeting between Taiwan and Japan, Dec. 13, 2013, Taipei
- ⑤ N. Kondo, Radiation necrosis model in mouse brain following dose escalation., 8th Young Researchers BNCT meeting, Sep. 14, 2015, Pavia
- ⑥ 近藤夏子、脳腫瘍 BNCT のための生物学的基礎研究-脳壊死モデルと脳腫瘍幹細胞に関する研究 -、京都大学原子炉実験所 学術講演会、2016 年 1 月 27 日、泉南郡
- ⑦ 近藤夏子、脳腫瘍 BNCT のための生物学的基礎研究-脳壊死モデルと脳腫瘍幹細胞に関する研究 -、京都大学原子炉実験所 専門研究会、2015 年 11 月 10 日、泉南郡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 夏子 (KONDO, Natsuko)
京都大学・原子炉実験所・助教
研究者番号：00582131