

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293272

研究課題名(和文) 病院併設型中性子捕捉療法を用いた難治性癌克服の研究

研究課題名(英文) Research on overcoming intractable cancers using hospital-equipped BNCT

研究代表者

福光 延吉 (FUKUMITSU, Nobuyoshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40277075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：BNCTの前臨床研究としてX線を用いた対象データの収集を中心とした研究を行った。膵臓癌細胞(BxPC-3)の細胞生存率は線量依存性に低下し、D10は1.28Gyであり、その線量でアポトーシスの頻度が上昇することを明らかにした。また、ウェスタンブロッティング法で細胞死関連タンパク質の発現解析では、Baxの発現は上昇するが、Bcl-2、caspase9、cleaved PARPの発現の上昇は見られなかった。動物実験でも同様の結果であった。乳癌細胞(MDA-MB-231)では、細胞生存率は線量依存的に低下し、D10は3.92Gyであり、その線量でアポトーシスの頻度が上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：As a preclinical study of BNCT, we focused on collecting target data using X-rays. Cell viability of pancreatic cancer cells (BxPC-3) decreased dose-dependently. D10 was 1.28 Gy, and it was clarified that frequency of apoptosis is increased at the dose level. Expression analysis of cell death related protein by Western blotting method also increased the expression of Bax, but did not increase the expression of Bcl-2, caspase 9, cleaved PARP. Similar results were obtained in animal experiments. In breast cancer cells (MDA-MB-231), the cell viability decreased in a dose-dependent manner, D10 was 3.92 Gy, and it was revealed that the dose increased frequency of apoptosis.

研究分野：放射線治療学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 膵臓癌 乳癌 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は硼素 (^{10}B) と中性子との核反応で生じるの α 粒子を用いる癌の放射線治療である。線は、通常放射線治療に用いられる X 線の約 20 倍の生物効果があり、細胞サイズ程度の飛程しか有さない。したがって、ホウ素含有アミノ酸化合物であるホウ素化フェニルアラニン (BPA) を取り込んだがん細胞のみを選択的に破壊する事ができる究極の癌細胞選択放射線治療である (図 1)。

がん細胞に取り込まれたホウ素化合物

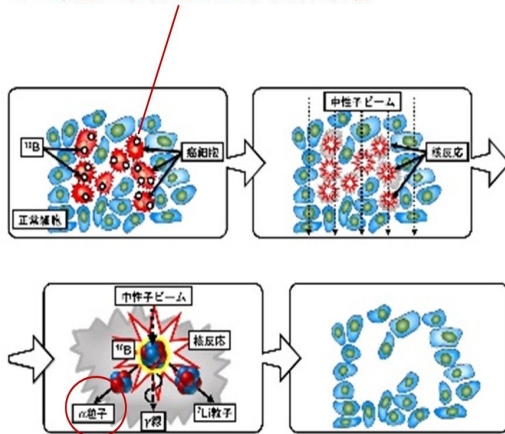


図 1 BNCT の原理

研究代表者らも、頭頸部癌での臨床的有用性学会発表、論文発表などでを明らかにしてきた。しかし、従来原子炉で行ってきた同治療は、管理、取り扱いの複雑さや法的規制から医療装置としては普及せず、2013年現在、世界で1か所しか稼働していない。したがって、脳腫瘍や頭頸部癌などの極めて限られた疾患に対してしか臨床研究が行われてこなかった。現在、つくば国際戦略総合特区の重点課題として、茨城県東海村に医療用加速器中性子源が設置され、基礎実験が行われている (図 2)。

加速器を使った同治療は、安全、簡便、コンパクトで医療装置として、病院内に設置可能となる。国内で他にも数施設で加速器を使った BNCT の開発が進められている。安全性と利便性が飛躍的に高まったために、病院併設型の医療用具として使用することが可能

になり、今後、適応疾患が大きく拡大することが予想される。従来の BNCT では、皮膚がん、メラノーマといった体表の疾患への治療が中心であったが、熱中性子線量の不足により治療困難であった体幹部の内臓疾患などの深部病変や巨大病変にも治療適応範囲が拡大していくことが予想されるうえ、照射時間の大幅な短縮も期待でき、患者にとってもより負担の少ない治療に様変わりすることが期待できる。本研究は、従来、BNCT の適応としてほとんど検討されてこなかったさまざまな難治性癌に対しての適応を実現することを目的とした研究である。

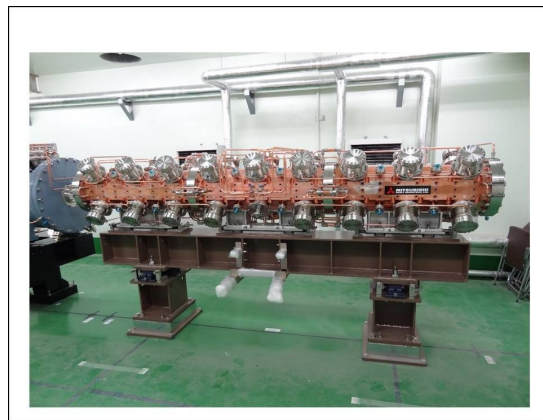


図 2 中性子発生源加速器

2. 研究の目的

病院併設可能な加速器タイプの次世代型硼素中性子捕捉療法 (new generation BNCT) が、治療適応疾患を拡大することで、医療機器として広く普及し、多くの癌患者の治療に貢献するためには難治性癌の治療に十分に対応できるかが重要である。本研究は、new generation BNCT が難治性癌に対して、どの程度治療効果を発揮できるか、細胞、動物の側面から研究すること目的とする。

今後、新たに治療適応になる事が期待される難治性癌として局所進行性膀胱癌、切除不能進行乳癌、の2つがあげられる。この2つの癌腫を用いて、細胞、動物レベルでの照射に伴う抗腫瘍効果、アポトーシスの変化についての研究を行う。具体的には、照射線量と細胞生存率との関連性、アポトーシスの定量的

評価とアポトーシスに導く経路を明らかにする。また、それらの変化が *in vivo* と *in vitro* で再現性の得られる結果であるか明らかにする。

同時に、対照となる X 線でのデータを取得する。

3. 研究の方法

本研究計画では、難治性癌として、局所進行性膵癌、切除不能進行乳癌を対象とした細胞実験、動物実験を行う。具体的には、膵臓癌、乳癌細胞を使った *in vitro/vivo* 研究では、照射線量を段階的に変化させて、抗腫瘍効果を細胞の生存率、アポトーシスの変化を明らかにする。

膵臓癌細胞の実験では、膵臓癌細胞 (BxPC-3) を培養後、照射実験を行う。次にがん細胞を回収してウェスタンブロッティング法で アクチン、p53、Bcl-2、Bax、カスパーゼ 3、9 の分離を評価する。また、フローサイトメトリーでアネキシン V を定量測定する。最後に、免疫組織化学染色で p53、Bcl-2、Bax、カスパーゼ 3、9 の発現を評価する。動物実験では、マウスの右足にがん細胞を移植、腫瘍径約 1cm の段階で照射実験を行う。照射終了後、定期的に腫瘍径を測定することで腫瘍抑制効果を観察し、そののちに腫瘍を摘出する。摘出された腫瘍に対し、上記と同様の手法でアポトーシスの変化を明らかにする。

乳癌細胞 (MDA-MB-231) でも同様の実験を行う。

4. 研究成果

BNCT の前臨床研究として細胞、動物を使った中性子線照射実験を計画していたが、中性子線発生装置の開発が当初の予定よりも遅

れたために対象データの収集を中心とした研究を行った。

膵臓癌では BxPC-3 細胞を用いて細胞、動物実験を行った。細胞生存率は線量依存性に低下し、D10 は 1.28Gy であった (図 3)。その D10 線量でアポトーシスの頻度が上昇することを明らかにした。また、X 線照射後にウェスタンブロッティング法で細胞死関連タンパク質の発現解析を行った結果では、Bax の発現は上昇するが、Bcl-2、caspase9、cleaved PARP の発現の上昇は見られなかった (図 4)。さらに、マウスに BxPC3 を移植して照射実験を行ったが、腫瘍増殖曲線は線量依存的に変化することが明らかになった。そのうえ、ゲムシタピンを加えることで、その抗腫瘍効果は増強することが明らかになった。腫瘍を摘出しウェスタンブロッティング法で解析を行った結果では、Bax の発現は上昇するが、Bcl-2、caspase9、cleaved PARP の発現の上昇は見られず、細胞実験の結果との整合性が得られた。一方、乳がんでは MDA-MB-231 を用いて細胞実験を行った。細胞生存率は線量依存的に低下し、D10 は 3.92Gy であった (図 3)。その D10 線量でアポトーシスが上昇することを明らかにした。したがって、膵臓癌、乳癌いずれの細胞でも細胞生存率は線量依存的に低下した。膵臓癌細胞では Bax の発現のみ上昇するが Bcl-2、caspase9、cleaved PARP の発現の上昇がないことから、アポトーシスの誘導には、Bcl-2、caspase9、cleaved PARP がかわらない経路の関与が示唆された。

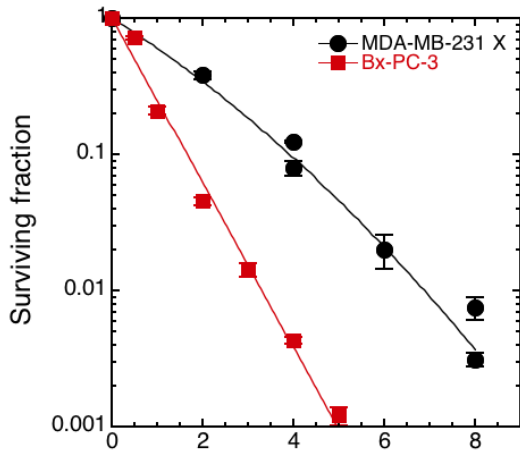


図3 X線照射後のBxPC-3およびMDA-MB-231の細胞生存率曲線

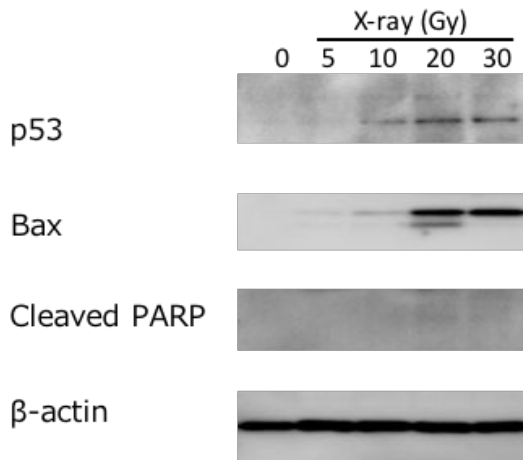


図4 X線照射後のBxPC-3におけるタンパク質発現変化

また、中性子線については、装置完成後ビームの安定的な調整に時間がかかっているが、従来の原子炉の約2.5倍程度の中性子フラックスが得られることが明らかになってきており、X線での対照実験との比較ができる段階まで到達した(図5)。

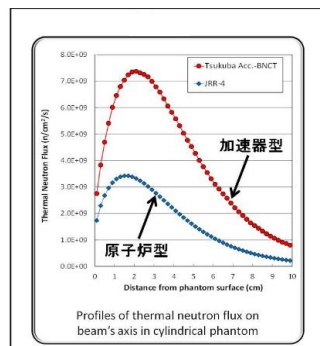


図5 中性子線フラックス比較

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
福光 延吉 (FUKUMITSU Nobuyoshi)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：40277075

(2)研究分担者
沼尻 晴子 (NUMAJIRI Haruko)
筑波大学・附属病院・病院講師
研究者番号：00712845

粟飯原 輝人 (AIHARA Teruhito)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30268619

大西 かよ子 (Ohnishi Kayoko)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：60529832

(3)連携研究者
豊原 潤 (TOYOHARA Jun)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セン

ター(東京都健康長寿医療センター研究
所)・東京都健康長寿医療センター研究所・
研究副部長
研究者番号： 50425659

簗野健太郎 (THATANO Kentarou)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：50228475

(4)研究協力者

()