

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293399

研究課題名(和文) I-125シードを用いた新規口腔癌小線源治療法の開発

研究課題名(英文) Development of brachytherapy for early stage oral cancer using I-125 seeds

研究代表者

三浦 雅彦 (Miura, Masahiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10272600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：早期口腔癌を切らずに治す治療法として、小線源治療が確立されているが、東日本大震災以来、線源として用いられるAu-198グレインの供給が不十分な状況になっている。そこで、元来前立腺癌の治療に用いられるI-125シードによって代替できないかを、物理的吸収線量シミュレーションとFucciとよばれる細胞周期可視化法を用いた照射後のG2期への蓄積動態の時空間的可視化によって検討した。その結果、義歯にAuグレインを埋め込み、一定期間義歯を装着することで治療を行うモールド療法を想定した場合、Auの10倍の数のIシードを用いることで、同等の反応が得られる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Low dose-rate brachytherapy is a definitive radiotherapy for early stage oral cancer. Au-198 grains are often used for the therapy; however, their supply has been insufficient since The Great East Japan Earthquake. The objective of this study was to examine whether Au-198 grains could be replaced by I-125 seeds usually used for the prostate cancer treatment. For this purpose, three dimensional absorption dose distribution was simulated and temporo-spatial kinetics of G2 arrest was analyzed. When applied to mold therapy using transient treatment instead of eternal implant, we tentatively propose that Au-198 grains could be replaced by I-125 seeds when ten times more number of I-125 seeds are used compared with that of Au-198 grains.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：小線源治療

1. 研究開始当初の背景

初期口腔癌の治療において、口腔機能や形態を温存でき、かつ外科療法に匹敵する局所制御率を有する治療法として、低線量率小線源治療が知られている。東日本大震災以前には、東海村の原子炉で線源が製造され、国内供給がなされていたが、震災によって原子炉の稼働が休止し、オランダとオーストラリアからの輸入に依存せざるを得ない状況となった。その結果、Au-198 グレインに至っては、現在、月一度のみの供給に留まっている。こうした口腔癌の小線源治療の状況とは異なり、前立腺癌の小線源治療に用いられる I-125 シードは震災前と同様に安定した供給がなされている。その理由は、前立腺癌患者数が口腔癌患者数より遥かに多く、かつ世界的に実施されているという市場原理が働いているためである。

こうした状況を踏まえ、本来前立腺癌に用いられる I-125 シードを、口腔癌に適用できないかという発想に至った。しかしながら、口腔癌は、前立腺癌に比べ、増殖が著しく速いこと、I-125 の線のエネルギーは、Au-198 の 1/10 以下であること、半減期が著しく長いこと等、多くの相違点があるため、前立腺癌に対して確立された線量投与方法をそのまま口腔癌に適用することはできない。そこで、義歯を作製して義歯側に線源を埋入し、一定期間照射するモールド療法を想定して、Au-198 グレインを用いた時と同様な効果を腫瘍にもたらすことが可能になる様、物理的、生物学的に検討することを計画した。生物学的な効果を見る上で、これまで我々が研究を行ってきた細胞周期を可視化する手法を導入することが、本研究の大きな特徴である。

Fucci とよばれる細胞周期を可視化する手法は、DNA 複製ライセンス因子である Cdt1 とその阻害因子である Geminin が、細胞周期特異的に変化するユビキチンリガーゼ活性によってユビキチン化を受け分解されることを利用して、G1 期には赤色、S/G2/M 期には緑色の蛍光を発する様にエンジニアリングされたシステムである。我々は、口腔癌等に頻繁に認められる p53 が機能しない癌細胞において、照射後に起こる G2 アレストがこのシステムによって明確に可視化できることを示してきており、この手法によって G2 アレストの時空間的情報を得ることが可能になる。本研究において有用なツールになるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで口腔癌の治療に用いられてきた Au-198 グレインの代わりに、供給が安定して得られる前立腺癌の治療に用いられる I-125 シードを用い、まず物理的に線量分布を 3 次元的に模倣し、その上で、Fucci システムを導入した口腔癌細胞株における照射後の G2 アレストを空間的に求め、DNA 損傷応答への影響も指標として、代替

の可能性を探るものである。さらに、新規微小管阻害剤の開発も行い、放射線との併用効果を検討する。

3. 研究の方法

1) 吸収線量の 3 次元分布の評価: 2cm x 2cm の治療域を設定し、Au-198 グレインで 10 個配置した際に線源面から 5mm 離れた位置で同等の吸収線量になるようにまず Paterson-Parker 法により、I-125 シードの数を求めた。さらに、その数で、MathWorks 社の数値解析ソフト MATLAB を用いて、吸収線量の 3 次元分布を求めた。

2) 細胞株

Fucci システムを導入した HeLa-Fucci 細胞、口腔癌細胞株である SAS-Fucci 細胞、HSC3-Fucci 細胞、HSC4-Fucci 細胞を実験に用いた。

3) I-125 シードと Au-198 グレイン

前立腺癌と口腔癌に臨床で使用される小線源を、日本アイソトープ協会から購入し、東京医科歯科大学 RI センターにて、電離放射線障害防止規則に則って実験を行った。

4) 照射後 G2 アレスト動態の Fucci による時空間的分布解析

細胞をプラスチックシャーレに培養し、その底部に線源を固定し、RI センターのインキュベータで種々の時間培養後、KEYENCE 社の蛍光顕微鏡で緑色と赤色の蛍光の変化から、G2 アレスト動態を求めた。

4) 動物モデルでの検討

ヌードマウスの後脚、または背部の皮下に腫瘍を移植し、テープで線源を固定して、G2 アレスト動態の検討を試みた。

4. 研究成果

1) 物理的吸収線量の 3 次元分布

Paterson-Parker 法から、実際の臨床で一辺 2cm の正方形を治療域とした際に 10 個の Au-198 グレインで治療期間を 6 日間とすると、5mm 離れた位置で 71Gy の計算になる。これと同等の吸収線量を I-125 シードで得るためには、100 個必要な計算となった。

次に、この治療域に Au および I をそれぞれ 10 個、100 個配置した際の、線源面から 2mm および 5mm 離れた位置でシミュレーションした線量分布を求めた。吸収線量をヒートマップとして表現したものを図 1 に示す。Au グレインは、線のエネルギーが高いが、個数が少ない分、分布の不均一性が認められた。しかしながら、吸収線量のヒートマップからわかる様に、いずれも外側に比べ中央部が高くなっているものの、両者に大きな違いはないことがわかった。これらの結果から、線源面から少なくとも 5mm までの距離において Au グレインとほぼ同等な線量分布を得るためには、I シードは、Au グレインの 10 倍の数が必要であることがわかった。

Au グレイン 10 個 1 シード 100 個

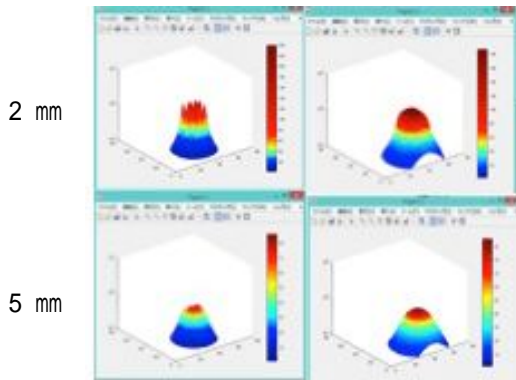


図 1. Au グレインと 1 シードによる吸収線量分布 1 辺 2cm の正方形内に Au グレイン 10 個、1 シード 100 個を配置して、線源面から 2 mm、5 mm 離れた位置での吸収線量を求め、色分けしてヒートマップとして表現した図を示す。

2) Fucci による G2 アレストの時空間的可視化

種々の Fucci 発現細胞をシャーレに培養し、その底面に 10 個の 1 シードを図の様に固定して (5 個ずつ 2 列に固定; 図はそのうち 3 個分の配置部位を表示) 蛍光の動態を観察した。1 シード直上の細胞は、いずれも 3 日目までに増殖しながら次第に G2 アレストを起こして細胞死に至るが、細胞死の程度は HSC3-Fucci 細胞において多い傾向が認められた。これを 1 個の Au グレインの場合と比べると、細胞死までの時間が Au グレインでやや早い傾向を示した。興味深いことに、線源周辺の細胞においても、時間の経過とともに線量は次第に増加していくが、G2 アレストを起こした後、それがずっと持続するのではなく、赤色にシフトしていく細胞の存在が認められた。

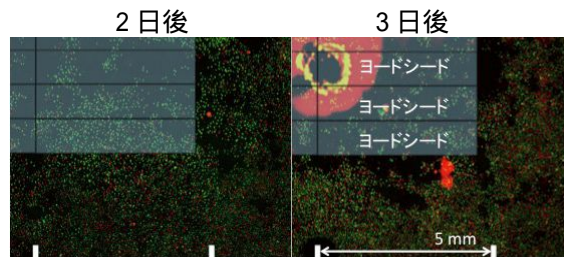


図 2. SAS-Fucci 細胞における 10 個の 1 シードが及ぼす細胞周期動態への影響

3) 新規微小管阻害剤の開発と放射線増感効果

プリナブリンとよばれる現在臨床試験中の微小管阻害剤をベースに構造活性相関を検討した結果、ベンゾフェノン-ジケトピペラジン型のユニークな構造を持ち、プリナブリンよりも小さな LD₅₀ 値を有する誘導体 (KPU-300, 図 3) が合成された。この薬剤に 24 時間作用させてから照射すると著しい放射線増感が起きたが (図 4)、そのメカニズム

として、最も放射線感受性の高い早期 M 期に同調するためであることが、Fucci を導入した腫瘍細胞の解析により判明した。

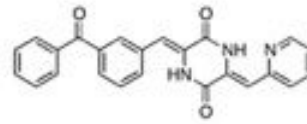


図 3. KPU-300 の化学構造

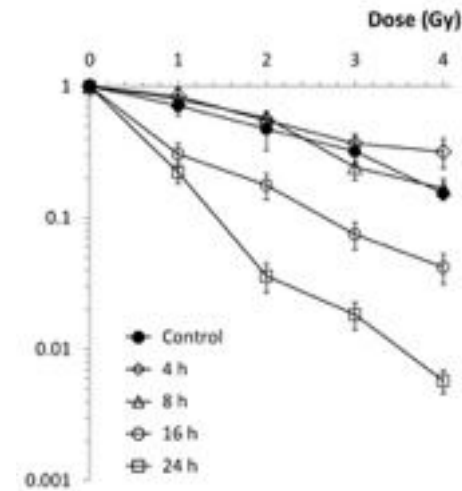


図 4. KPU-300 による放射線増感効果 30nM KPU-300 にて種々の処理時間後に放射線を照射し、コロニー法によって生存率を求めた。

考察:

本研究によって、口腔癌への永久刺入ではなく、一定期間 Au グレインによって照射をするモールド療法を想定し、Au グレインの 10 倍数の 1 シードを配置することで、少なくとも吸収線量の 3 次元的分布、G2 アレストの時空間的動態から判断する限り、代替可能であろうとの結論に至った。コスト的には、現在、Au グレインが 1 個約 4 万円、1 シードが約 6 千円であるので、やや割高になるものの許容範囲内と思われる。

腫瘍細胞が照射され続けているにもかかわらず、生じた G2 アレストからリリースされる細胞が存在するという現象は、極めて興味深い。通常、G2 アレストには DNA 損傷の閾値が存在し、DNA 二重鎖切断 (DSB) がある一定値まで修復されてはじめてリリースされると考えられている。低線量率での照射中に、G2 チェックポイントシグナルが減弱する可能性を示しており、今後、分子レベルでの解明が待たれる。また、新規微小管阻害薬 KPU-300 の開発に成功したが、そのメカニズムは、この薬剤が細胞を最も放射線感受性の高い細胞周期相である早期 M 期に同調するためであった。したがって、先に述べた G2 アレストからリリースされる細胞は、本薬剤との併用により、最も放射線感受性の高い早期

M 期に細胞を留めることができ、その位置で照射が継続されれば、大きな放射線増感が期待できると考えられた。更なる検討が必要であるが、本剤の有効な使用法の1つとなる可能性がある。

本研究では、動物実験も試みたが、線源をテープで固定する方法では、しだいにずれが生じてしまい、組織レベルでの解析を行うことはできなかった。固定するための手段を講じる必要がある。正常組織障害の指標として、皮膚反応等は、今後の課題となった。動物実験から、ヒトの腫瘍や正常組織に対する反応への外挿には限界があるため、臨床試験段階での判断は必須であるが、本研究は、その前臨床試験として、有用な情報を提供するものと思われる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Onozato Y, Kaida A, Haraada H, Miura M: Radiosensitivity of quiescent and proliferating cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Sci*, 108(4): 704-712, 2017, 査読有
DOI: [10.1111/cas.13178](https://doi.org/10.1111/cas.13178)

Ozaki Y, Watanabe H, Kaida A, Miura M, Nakagawa K, Toda K, Yoshimura R, Sumi Y, Kurabayashi T : Estimation of whole-body radiation exposure from brachytherapy for oral cancer using a Monte Carlo simulation. *J Radiat Res*. 24:1-6, 2017, 査読有
DOI :[10.1093/jrr/rrx002](https://doi.org/10.1093/jrr/rrx002)

Kaida A, Watanabe H, Toda K, Yuasa-Nakagawa K, Yoshimura R, Miura M: Effect of dose rate on early and late complications in low dose rate brachytherapy for mobile tongue carcinoma using Ir-192 sources. *Oral Radiol*, in press, 査読有
DOI:[10.1007/s11282-016-0263-7](https://doi.org/10.1007/s11282-016-0263-7)

Manila NG(Nisha Gowri Manila), Kaida A, Miura M: Kinetic analysis of radiation-induced cell-cycle alterations in HeLa cells expressing fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci). *Radiat Environ Med*, 5(2): 16-21, 2016, 査読有

Asahina T, Kaida A, Goto T, Yoshimura R, Sasai K, Miura M: Temporo-spatial cell-cycle kinetics in HeLa cells irradiated by Ir-192 high dose-rate remote afterloading system (HDR-RALS). *Radiat Oncol*, 11(99): 2016, 査読有
DOI: [10.1186/s13014-016-0669-8](https://doi.org/10.1186/s13014-016-0669-8)

Okuyama K, Kaida A, Hayashi Y, Hayashi Y, Harada K, Miura M: KPU-300, a novel benzophenone-diketopiperazine-type anti-microtubule agent with a 2-pyridyl structure, is a potent radiosensitizer that synchronizes the cell cycle in early M phase. *PLoS One*, 10(12); e0145995, 2015, 査読有
DOI:[10.1371/journal.pone.0145995](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145995)

⑦ Goto T, Kaida A, Miura M: Visualizing cell-cycle kinetics after hypoxia/reoxygenation in HeLa cells expressing fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci). *Exp Cell Res*, 339(2); 389-396, 2015, 査読有
DOI: [10.1016/j.yexcr.2015.10.019](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.019)

⑧ Kaida A, Miura M: Unusual prolongation of radiation-induced G2 arrest in tumor xenografts derived from HeLa cells. *CancerSci*,106(10):1370-1376, 2015, 査読有 DOI:[10.1111/cas.12748](https://doi.org/10.1111/cas.12748)

⑨ Tsuchida E, Kaida A, Pratama E, Ikeda M-A, Suzuki K, Harada K, Miura M: Effect of X-irradiation at different stages in the cell cycle on individual cell-based kinetics in an asynchronous cell population. PLoS One, 10(6): e0128090, 2015, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0128090

⑩ Yamada C, Kaida A, Okuyama K, Harada K, Miura M: Effects of Chk1 inhibitor or paclitaxel on cisplatin-induced cell-cycle kinetics and survival in parental and cisplatin-resistant HeLa cells expressing fluorescent ubiquitination based cell cycle indicator (Fucci). Integr Cancer Sci Ther, 2:87-92, 2015, 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Masahiko Miura : Oral Cancer and brachytherapy. The 39th Annual Scientific Conference on Dental Research. April 3-4 2017, Ho chi Minh City, Vietnam

三浦雅彦、戒田篤志、小野里祐祐 : Fucci による腫瘍微小環境下での静止期、増殖期細胞の可能性、分離とその放射線感受性. 第 19 回癌治療増感研究シンポジウム, 2017 年 2 月 3-4 日, 奈良県文化会館 (奈良県・奈良市)

Masahiko Miura : Cell cycle kinetics and radiosensitivity. The 29th Annual Meeting of JASTRO, 25-27 Nov 2016, Kyoto, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

三浦雅彦 : 細胞周期の可視化による腫瘍細胞動態解析. 群馬大学重粒子線医工学グローバルリーダー養成プログラム, 2016 年 1 月 5 日, 群馬大学 (群馬県・前橋市)

三浦雅彦、戒田篤志 : Radiobiology for stereotactic radiotherapy. 日本放射線腫瘍

学会第 28 回学術大会ワークショップ, 2015 年 11 月 19 日, ベイシア文化ホール・前橋商工会議所 (群馬県・前橋市)

Masahiko Miura : Basics of radiation biology with a focus on 4Rs. 12th International Stereotactic Radiosurgery Society Congress. 教育講演, 7 June 2015, Yokohama パシフィコ横浜会議センター (神奈川県・横浜市)

⑦ Masahiko Miura : Visualizing cell cycle kinetics in HeLa cell in vitro and in vivo following X irradiation. 15th International Congress of Radiation Research. 25-29 May 2015, Kyoto International Conference Center 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

⑧ 三浦雅彦 : 口腔癌に対する放射線治療向上のための物理学的、生物学的アプローチの可能性. 第 69 回日本口腔科学学会総会・学術大会シンポジウム, 2015 年 5 月 15 日, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

⑨ 三浦雅彦 : 分子標的薬の併用において考慮すべき放射線生物学. 第 10 回新潟 Radiology Update 学術講演会, 2015 年 2 月 28 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

⑩ 三浦雅彦 : 腫瘍微小環境が照射後の腫瘍細胞動態に及ぼす影響の可視化. 第 5 回国際放射線神経生物学会大会シンポジウム. 2015 年 2 月 21 日, 高崎シティギャラリー (群馬県・高崎市)

〔図書〕(計 1 件)

三浦雅彦 : 新版 放射線医科学-生体と放射線・電磁波・超音波-1 章 放射線作用の基礎-分子から細胞へ 1.9 放射線感受性の修飾 (酸素・分割・線量率). p32-34, 大西武雄監修. 医療科学社, 2016

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：装填器

発明者：三浦雅彦他

権利者：東京医科大学,東京工業大学

種類：特許

番号：特許 6085800 号

取得年月日：2017 年 2 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 雅彦 (MIURA, Masahiko)

東京医科歯科大・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：10272600

(2)研究分担者

戒田 篤志 (KAIDA, Atsushi)

東京医科歯科大・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：40632097

(3)研究分担者

林 良雄 (HAYASHI, Yoshio)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：1032562

(4)研究分担者

吉村 亮一 (YOSHIMURA, Ryoichi)

東京医科歯科大・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：40302864

(5)研究分担者

岡本 裕之 (OKAMOTO, Hiroyuki)

国立がんセンター・中央病院放射線治療
科・医学物理士

研究者番号：90595729