

放医研シンポジウムシリーズ

第6回重粒子医科学センターシンポジウム

放射線がん治療を支える基礎研究



岡安 隆一 編

独立行政法人 放射線医学総合研究所



NIRS-M-199

ISBN978-4-938987-41-1

放医研シンポジウムシリーズ

第6回重粒子医科学センターシンポジウム

放射線がん治療を支える基礎研究

岡安 隆一 編



独立行政法人 放射線医学総合研究所

はじめに

第6回重粒子医科学センターシンポジウムは「放射線がん治療を支える基礎研究」と題して、2006年12月14日、15日の両日、放射線医学総合研究所・大会議室にて開催されました。1994年より始められた放医研での重粒子線による治療は本年度でその登録数が3000名を超え、まさにその業績にふさわしい活発なシンポジウムでした。所内外よりの出席者は200人を越え、多くの方々から好評を受けました。

本シンポジウムは、重粒子医科学センターで生物研究を担当している研究者が中心になって企画し、多くの先端研究者を招いて有意義な会議でした。タイトルの性質上、放射線生物学関係の研究発表が多かったのですが、それにくわえて、重粒子線がん治療の臨床に関する講演、放射線物理学の基礎研究、分子イメージングの基礎研究等、充実した発表が多いシンポジウムでした。

1日目の特別講演では、DNA鎖切断によって活性化されるポリADP-リボシル化に関する最近の興味深い知見が発表され、さらに2日目の特別講演ではタンパク質リン酸化による細胞周期の制御等最新の情報が紹介され、聴衆を魅了しました。

また各々のセッションでは、炭素線の照射が、治療のオーバービューのセッションで触れられたような良い成績を上げていることの裏付けになるような研究、臨床検体を使った研究、照射後の遺伝子発現の研究、また放射線治療をサポートするイメージングの意味深い仕事等が紹介され大変有意義でした。

さらに最近話題になっている血管新生と放射線治療の関係、古くて新しい放射線生物のテーマである個人の放射線感受性に関する研究、アポトーシスやバイスタンダー効果の話等、盛りだくさんでありました。これからの特に近年の幹細胞の研究に見られるように、放射線生物学の研究が臨床に近づいていく可能性を秘めた講演等は将来性を感じさせました。

最後に、本シンポジウムに尽力して下さった実行委員会の方々、国際・交流課の方々、講演者の方々、また出席された全ての方々に心より謝意を表したいと存じます。ありがとうございました。

平成19年 3月

第6回重粒子医科学センターシンポジウム

実行委員会委員長 岡安隆一

目 次

はじめに	岡安隆一(放医研)
重粒子線がん治療	
重粒子線治療—オーバービュー	鎌田 正(放医研) …………… 1
膵癌に対する治療の現状	山田 滋(放医研) …………… 4
婦人科がんに対する放射線治療：臨床検体を用いた 制がんと発がんの研究	大野達也(放医研) ……………11
癌治療と基礎研究	
遺伝子発現プロファイルからみた炭素線治療効果 炭素線治療の生物学的利点	岩川真由美(放医研) ……………21 安藤興一(放医研) ……………26
特別講演	
ポリ ADP-リボシル化反応	三輪正直(長浜バイオ大)……………35
分子イメージング基礎研究	
放射線誘発核内ドメインの動態	田代 聡(広島大) ……………41
放射線治療のサポートを目的とする磁気共鳴 ファンクショナルイメージング法の開発	松本謙一郎(放医研) ……………46
オーバーハウザーMRIによる生体内レドックスの 分子イメージング*	内海英雄(九州大) ……………59
放射線物理学基礎研究	
治療用炭素線の物理的性質 放射線と原子物理学*	小森雅孝(放医研) ……………63 東 俊行(首都大東京) ……………74
放射線生物学基礎研究	
個人間の放射線感受性の指標 血管新生の制御と放射線治療効果	加藤宝光(放医研) ……………77 三浦雅彦(東京医科歯科大) ……81
特別講演	
蛋白質リン酸化による細胞増殖制御-Tob, Kiz を 中心に*	山本 雅(東京大) ……………89
放射線生物学基礎研究	
腫瘍細胞の放射線応答への NO ラジカルの関与 細胞内酸化ストレス修飾による放射線アポトーシスの 増感と防護 がん幹細胞と放射線治療抵抗性	松本英樹(福井大) ……………93 近藤 隆(富山大) ……………97 丹羽太貴(京都大) …………… 102

* 要旨掲載

重粒子線がん治療

重粒子線治療—オーバービュー

放医研 重粒子医科学センター病院
鎌田 正

1・はじめに

我が国では1981年にがんが死亡原因の一位をしめるようになったが、現在も死亡数は増加傾向を示し、2004年の全国のがんによる死亡者は約32万人を超えている。がんは一種の加齢現象とも考えられ、急速な高齢化社会を迎えている我が国では今後がんが増え続けると予測される。

現在、がんの治療法としては、外科治療、放射線療法、化学療法などがあるが、放射線医学総合研究所（放医研）では1961年の病院開設以降40年以上、放射線によるがん治療法の研究開発に取り組んで来た。なかでも重粒子線によるがん治療の研究・開発は国の第一次対がん10カ年総合戦略の一環として1983年に開始され、1994年からその臨床応用を行っている。これまでの放医研における重粒子線がん治療研究の概要について述べる。

2・新しい放射線治療「重粒子線治療」の特長

多くのがん細胞は正常な細胞よりも活発に分裂し、増え続ける性質を持っている。一般に盛んに分裂する細胞ほど放射線の影響を受けやすく、がん細胞は正常な細胞よりも放射線で死滅しやすくなっている。このようながん細胞の性質を利用して、がん細胞だけを死滅させようとするのが放射線療法であり、これまで放射線療法の分野では、がんを効率よく死滅させる方法やがんが存在している場所（病巣）にいかにか放射線を集中して照射するかについて研究が行われて来た。しかし、がんの中には放射線に対して抵抗性を示すものもあり、またエックス線やガンマ線などでは体の表面に近いところに大部分が当たり、病巣に十分な量の放射線を照射しようとする周辺に正常な組織にも多くの放射線が照射されてしまうという欠点があった。これらを改善するため、薬物の併用で放射線の効果を高めたり、正常組織の防護を試みたり、さらには分割法を変えることによる治療比の向上など試みられている。また、さまざまな方向から放射線を病巣に照射することにより病巣に線量を集中させる工夫も行われているが、このような放射線療法とは全く異なるのが重粒子線によるがん治療である。重粒子線は電子よりも重い粒子（原子核など）を加速器で高速に加速すると出来る人工の放射線で、放医研では炭素の原子核を光速の約8割近くまで加速して治療に用いている。この重粒子線には従来の放射線にはない優れた特長が2つある。ひとつは、体のなかにはいった重粒子線は加速されたエネルギーにしたがってある一定の深さのところまで進み、それ以上、先には進まないという点である。したがって重粒子線の止まる深さをがんのあるところに調節すればがんにも重粒子線を集中可能である。も

う一つの特長は、重粒子線は止まる寸前に大きなエネルギーを放出するため、その場所ではこれまでのエックス線などに比べると細胞の致死効果が数倍以上大きく、放射線抵抗性の細胞にも効果を発揮できるという点である。このような重粒子線の特長を利用すると、線量をがんに集中できるとともに効率よく死滅させることが出来、周囲の正常な組織にかかる負担を下げる事が期待できる。(図1)

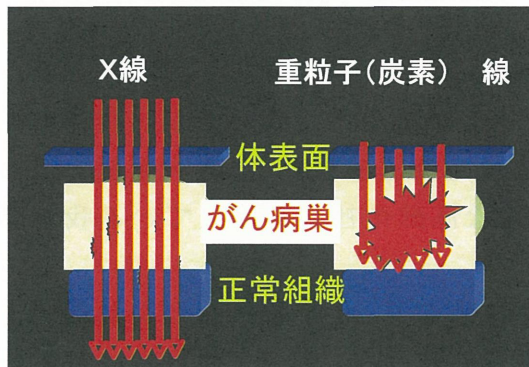


図1・エックス線と重粒子線

3・重粒子線がん治療の概要

放医研が治療に使っている重粒子加速装置は、国の第一次「対がん10カ年総合戦略」の一環として、1993年に完成したもので、通称ハイマック(HIMAC: Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba)と呼ばれ医療専用の重粒子線加速器としては世界初のものである。

1994年6月以来、ハイマックを用いて、重粒子線の安全性と有効性を知るために約40のプロトコルを用いて臨床試験を行ってきた。この間、2003年11月には先進医療「固形がんに対する重粒子線治療」(自己負担314万円)として厚生労働省の承認を得ている。現在、臨床試験を可能なものから順次終了し、先進医療としての重粒子線治療を実施している。2006年8月までに重粒子線治療症例として登録された患者は2,867名に達している。(図2)

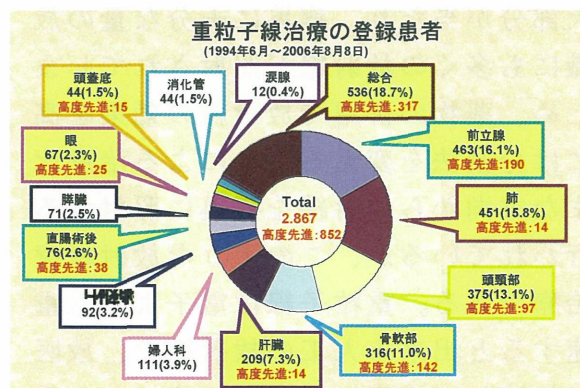


図2・各部位における登録患者数

これまでの臨床試験は、主として従来の治療では十分な治療効果が期待できないと判断されたがんを対象としており、従来の治療法との直接、比較を行うことは困難であるが、

- 1) 他の治療では治らないがんが重粒子線ですること

2) より短期間で安全に治せること

等が明らかとなった。

臨床試験の対象となった主ながんの治療結果は以下の如くである。

- ① 頭頸部癌：鼻・副鼻腔腫瘍の進行癌、組織型では腺癌系（腺癌、腺様嚢胞癌）および悪性黒色腫で良好な抗腫瘍効果が得られた。（先進医療として実施）
 - ② 肺癌：手術非適応の早期肺癌（Stage I）のなかでも肺野抹消型に対して、短期照射（9回/3週、および4回/1週）の安全性が確認され、その抗腫瘍効果も手術と同等あるいはそれ以上の成績が得られている。現在、さらに超短期照射（1日1回で終了）の線量増加試験を実施中である。
 - ③ 肝癌：他の治療法では制御困難な腫瘍に対して、照射回数と期間を15回/5週、12回/3週、8回/2週、4回/1週、2回/2日と減少させてきたが、重篤な有害反応は認められず、局所制御率も良好であった。この結果に基づいて、現在は超短期照射法（2回/2日）を用いて治療を実施している。（先進医療として実施）
 - ④ 前立腺癌：局所進行癌に対する線量増加試験において、直腸および尿道の耐容線量はいずれも66GyE/20回/5週であり、この線量は局所制御を得るためにほぼ十分な量であることがわかった。これまでの臨床試験をもとに、高リスク群（進行癌）あるいは中リスク群に対しては炭素イオン線照射とホルモン併用療法、低リスク群に対しては炭素イオン線単独療法を採用し、いずれにおいても良好な成績が得られている。（先進医療として実施）
 - ⑤ 骨・軟部腫瘍：対象として手術切除が困難な骨肉腫、脊索腫、軟部組織肉腫など、部位的には骨盤・傍脊髄腫瘍で良好な成績が得られている。なかでも、骨肉腫と脊索腫は症例数も多く、良好な成績が得られている。（先進医療として実施）
- この他、頭蓋底腫瘍、脈絡膜メラノーマ（眼）、直腸癌（術後再発）はいずれもすでに先進医療として実施しているが、子宮癌、膀胱癌等においても優れた局所効果が得られている。

4・理想のがん治療の実現に向けて

理想のがん治療を「よくなおる」「すぐに」「元の通りに」「痛くも苦しくもなく」と考えると、重粒子線を用いたがん治療はこのような理想の治療を実現しつつある。一方、この治療を行うためには重粒子加速器の建設が必要であり、また、その運用には、現状では従来の放射線治療よりも多くの人員、費用が必要で、一般の病院でこの治療を行うことは簡単ではない。この治療を「いつでも」「だれでも」「どこでも」受けることができないことが問題になっている。

2005年度には放射線医学総合研究所を中心に行ってきた小型で運用の容易な重粒子線がん治療装置の開発を終了し、2006年4月からその一号機の建設も始まっている。そう遠くない将来、重粒子線がん治療装置を用いて「よくなおる」「すぐに」「元の通りに」「痛くも苦しくもなく」そして「いつでも」「だれでも」「どこでも」という理想のがん治療が実現するものと期待される。

膵癌に対する治療の現状

放医研 重粒子医科学センター病院
山田 滋、加藤 博敏、原 竜介、
安田 茂雄、加野 将之

膵癌の現状

2006年の米国の統計では、大腸癌は新患者数106,680人に対し死亡者数55,170人であったが、膵癌は33,730人の新患者数に対し死亡者数は32,300人と新患者数と死亡者数がほぼ同数であり、5年生存率は2%前後と極めて予後の悪い疾患であることが示されている¹⁾。膵癌は近年増加の傾向を示し、我が国の年次別人口10万対膵癌死亡率をみると男女ともに最近では1950年当時の20倍を超える増加で、1999年には全癌死亡数の6.4%（約2万人）を占め第5位となっている。膵癌に対する治療は外科的切除が主流であるが、切除の適応となる患者は全膵癌の約15%である。しかし、切除例でも全国切除例5496例の5年生存率は18%と低く、消化器癌の中で最も治療成績が悪い²⁾。さらには85%を占める切除不能膵癌の予後は極めて悪い。膵癌の予後を改善させるには放射線療法や化学療法などの非手術療法の発展が必須である。しかし、確実な効果を有する放射線療法や化学療法はなく、その多くは臨床試験の段階にある。

重粒子線（重イオン線）の特徴

図1は、治療に使われてきた放射線を分類したものである。これまでがん治療には、主にX線、ガンマ線、電子線などが使われてきた。重粒子とは、原子核やそれをつくる粒子のことをいい、重粒子を高速に加速したものは「重粒子線」と呼ばれる。重粒子線は軌道に与える電離密度が高いため高LET線と称し、①線量分布が優れている、②生物学的効果が高いという2つの大きな特徴を有する。これらの特徴により腫瘍周囲の正常組織の照射線量を抑え、腫瘍にのみ高線量を集中させることが可能となり、さらに従来のX線・陽子線などの低LET線に対し抵抗性であった低酸素細胞およびS期の細胞に対しても殺細胞効果が高いという利点を有している。

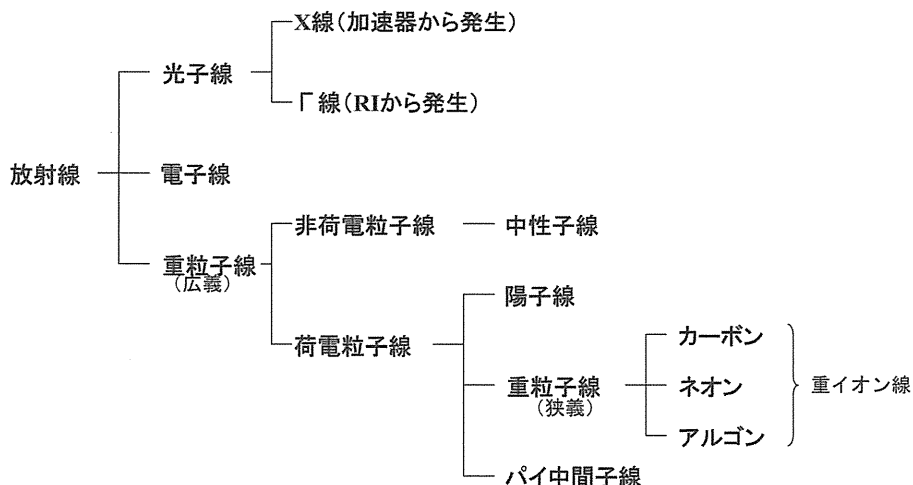


図1 放射線の種類

膵臓の癌組織の平均酸素分圧は正常膵組織の酸素分圧の10分の1以下であり、低酸素細胞の割合が多いとされている³⁾。低酸素細胞は低LET線に対しては放射線抵抗性であり、実験でも同じ殺細胞効果を得るのに通常の状態より約3-4倍の線量が必要とされている(図2)⁴⁾。このことが膵臓の治療を困難にしている一因である。一方高LET線である重粒子線は酸素濃度に比較的依存せずに殺細胞効果を示す。これらの点からも高LET線である重粒子線は低酸素細胞の割合が多い膵臓の治療手段として有利であると考えられた。

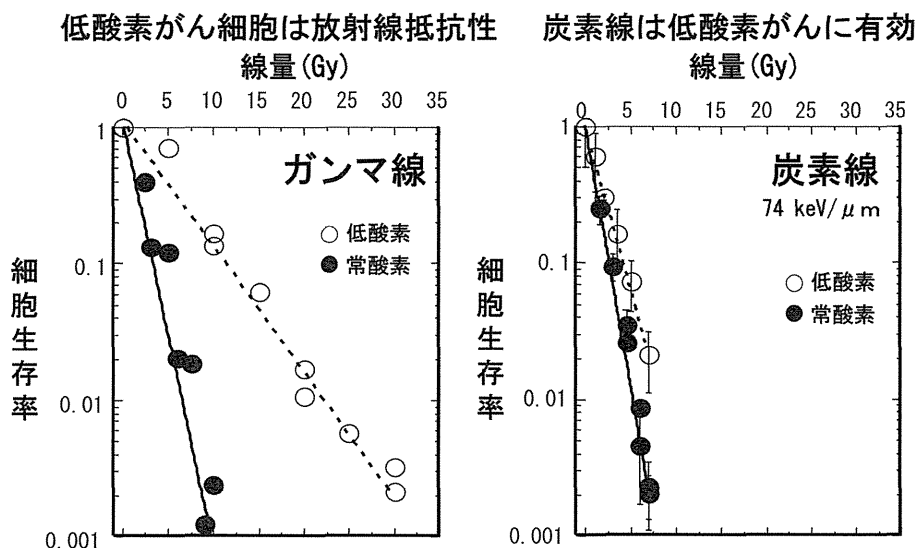


図2
マウス線維肉腫における常酸素下 (○) および低酸素下 (●) での γ 線と炭素線照射の細胞生存率 低LET線である γ 線では低酸素下では常酸素下に比べて約4倍抵抗性となっている。(文献6より引用)

膵臓に対する外科的治療

外科的治療の現状

膵臓に対しては切除ができて5年生存率は低い。この原因の一つに、肝転移と並んで膵臓周囲の癌遺残が挙げられている。ヨーロッパで施行されたESPAC1の臨床試験では18.7%、また米国で施行されたRTOG9704でも34%に手術後病理学的解析にて膵臓周囲に癌が遺残していたことが示されている^{5,6)}。遺残していた部位としては、上腸間膜動脈周囲および後腹膜など、手術で郭清することが比較的難しい部位であった。このため、膵周囲および腹部大動脈周囲を徹底的に郭清する拡大手術が行われるようになり、顕微鏡的に癌を切除し得た治療切除例の再発がある程度改善された。しかし、拡大手術では下痢・栄養吸収障害などの合併症が高率であった。また肉眼的に治療手術であっても、後腹膜における微少癌遺残が原因で組織学的非治療切除となることが多く、技術的にはこれ以上の拡大郭清は困難であり、日本で行われた臨床試験でも拡大郭清を行っても予後の改善は認められなかった。このため安全に膵後腹膜等への癌浸潤をいかに制御するかが、膵臓の外科的治療成績を上げるための課題であった。

放射線を用いた術後、術前治療の成績

膵周囲からの再発をおさえるため、切除例に対し術前・術中・術後照射がX線・電子線を用いて試みられてきたが、再発率および生存率とも非照射群に対し大きな差は認められなかった^{7,8)}。最近では5-FUなどを併用する放射線化学療法が切除例に対する補助療法として行われている。治癒切除後の補助療法として、Gastrointestinal Tumor Study Groupにより行われた唯一の無作為比較試験では、膵頭十二指腸切除後の放射線治療と5-FUの投与により、生存期間中央値が11か月から20か月に有意に延長することが示された⁹⁾。しかし、24%の患者が切除後の回復遅延のため、当臨床試験における放射線化学療法を行えなかったと報告している。これに対して、術前治療は、切除という大きな侵襲を後ろにもってこることにより、全治療期間の短縮、全治療を完遂できる患者の割合の増加、微小転移の抑制等の観点からみて意義の高い戦略といえる。これまでに行われた術前放射線化学療法としては、Fox Chase Cancer Centerの5FUを併用する術前放射線化学療法の第2相試験があり、局所再発率は13%と良好であったが、44%の患者がGrade3以上の肝毒性を示すなど合併症が高率であったと報告されている¹⁰⁾。

膵癌に対する術前重粒子線臨床試験の成績

膵臓癌に対する術前炭素イオン線治療は、2000年6月からphase I/II臨床試験を開始し、総線量44.8GyEおよび48.0GyE/16回/4週間（1回線量2.8GyE~3.0GyE）の2段階の線量で治療が行われた。結果は、局所再発が1例に認められるのみで、切除標本の病理組織学的解析では全例にGrade2（組織学的に生存しうる癌細胞が3分の1以下）と高い効果が示された。本試験の十分な安全性と高い局所制御効果をうけて、本試験は重粒子線の特性を生かした短期照射（8回照射）に2003年より移行し現在継続中である。

切除不能膵癌に対する治療

非切除例（局所進行膵癌）に対する放射線化学療法

局所進行膵癌に対する放射線単独治療は総線量60-70Gyでおこなわれてきたが、治療成績は不良で2年生存率10%前後、平均生存月数4-12か月であり消化管潰瘍などの合併症の発生率も高く単独治療には限界があった¹¹⁾。そこで最近では総線量を45-54Gyに下げ、化学療法を併用する放射線化学療法が試みられてきたが、5-FUを用いた放射線化学療法では50%生存期間が8-10か月と満足すべき結果は得られなかった¹²⁾。Gemcitabine (GEM)は新しいdeoxycytidine誘導体であり、膵癌を含む様々な固形癌に幅広く抗腫瘍効果を示している。進行膵癌患者に対して5FUと比較してGEMは症状の改善および生存率の向上が有意に高かった。現在、局所進行膵癌に対する標準的化学療法はGEMが第一選択であることをU. S. Food and Drug Administrationが承認している。これに伴い放射線化学療法もGEMとの併用療法が主体となっている。in vivoの膵癌培養細胞を用いた実験では照射24から48時間前投与することで最も高い放射線増感効果が得られた¹³⁾。さらにC3Hマウスを用いたin vivoの実験でも、GEM 50mg/kg i. v.を照射24-60時間前に投与することで最も高い増感効果が得られた¹⁴⁾。GEMの放射線増感作用の機序については十分に解明されているわけではないが、DNAを直接障害したり、放射線により形成されたDNA損傷の修復を阻害するのではなく、細胞周期を同調することにより放射線感受性の高いG2/M期などにそろえることで増感作用を示すと考えられている。

人に対する治療では、GEMと放射線の併用療法は大きく2つに分けられる¹⁵⁾。GEMと放射線との併用療法ではdose-limiting toxicities(DLT)が血液障害より胃腸障害となることが多い。このため照射野にいかに関腸管を含めないかがDLTを減らすポイントとなる。GEMとの併用法には大きく2通りの方法がある。一つはGEMを十分量投与し、主腫瘍および転移リンパ節のみに照射する方法である¹⁶⁾。照射野はできるだけ小さくし、消化管の線量を低くすることが特徴である。McGinnらはGEMを1000mg/m²(3回/3週で1週休)投与し照射線量を24-42Gy/15frと増量する第1相試験を施行している。42Gyでは7例中2例に消化管潰瘍・嘔吐などのGrade3以上の障害が認められたため、36Gyが推奨用量と報告している。本邦では山崎らが手術不能膵癌15人に対しGEM1000mg/m²と50Gy/25frの放射線化学療法を行い11人に完遂することができ有害事象は許容範囲であったことを報告している¹⁷⁾。もう一つは照射が中心でGEMは放射線増感剤として少量用いる方法である¹⁸⁾。照射野は所属リンパ節も含め広く、消化管が含まれる容積が増えるためGEMの投与量が低いことが特徴である。Poggiらが施行した照射線量を54.0-55.8Gy/30-31fr(1.8Gy/1fr)に固定し、GEMを増量する第1相試験からは550mg/m²では5例中2例に白血球減少・血小板減少などのGrade3以上の障害が認められたため、440mg/m²が推奨用量と報告している¹⁹⁾。本邦では、池田らが照射線量を50.4Gy/28fr(1.8Gy/1fr)に固定し、GEMを増量する第1相試験が施行された。350mg/m²では6例中3例に白血球減少・肝機能障害などのGrade3以上の障害が認められたため、250mg/m²が推奨用量と報告している。高い抗腫瘍効果が期待される一方、高率に発生する正常組織障害とくに血液・消化器毒性が臨床上大きな問題であった²⁰⁾。さらに奥坂らがphaseIIを施行し生存中央値9.5月、1年生存率28%であったことを報告している²¹⁾。本試験では中等度の効果は認められたが、早期におこる遠隔転移が問題であった。

膵癌に対する新しい治療法

最近では、抗癌剤である *Paclitaxel(TXL)* が注目されている。放射線生物学的にはTXLはGEMと同様に癌細胞を放射線高感受性期であるG2/M期に同調することで放射線に対し増感作用を示す。RTOGでは外照射50GyとTXL150mg/m²を109人に施行し、生存中央値は11.2月で1、2年生存率は43%、13%であった。TXL併用放射線療法は照射野を大きくとつても障害は少ないという利点があった。また、新しい抗癌剤である分子標的治療薬と放射線との併用療法も多くの研究がなされている。Vascular endothelial growth factor(VEGF)やepidermal growth factor receptor(EGFR)は他の化学療法あるいは放射線療法と併用することにより、相加ないし相乗効果があることが示されている。RTOGでは現在Bevacizumab(抗VEGF抗体)と放射線とcapecitabineとの併用療法が施行されている。Erlotinibは経口のEGFR阻害剤であるが、GEM単独と比較しGEMと併用することにより転移を有する膵臓癌に対して生存率の改善が示されている。

局所進行膵癌に対する重粒子線治療臨床試験

手術不能である局所進行膵臓癌に対する炭素イオン線の臨床試験が2003年4月より開始され、38.4-48.0GyE/12回/3週間の線量分割法で31人に治療が行われた。正常組織障害では重篤なものは認められず、消化器・血液に対する障害は通常の放射線治療より極めて低い傾向であつ

た。局所制御率(治療終了後、対象となった病変および隣接する領域に腫瘍の再増殖・新たな病変の出現がない割合)45.6GyE以上では93%と高い効果が示されているが、生存率の向上は未だ満足すべきものではない。この原因は、肝などへの遠隔転移の早期出現が原因と考えられた。これらの結果より、遠隔転移を制御可能な治療法と重粒子線との効果的な併用療法が望まれた。重粒子線では周囲の消化管などの照射線量を一般的な放射線治療に比較して約1/2から1/3にすることが可能であり、より正常組織障害を最小限に抑えることが可能である。これより「局所進行膵癌に対するGemcitabine・炭素イオン線同時併用療法の第I/II相試験」が立案され承認されて来期より開始予定である。

臨床から望まれる基礎研究

放射線治療においては物理的な要素が大きな領域を占めてきたが、現在では生物学的な研究が望まれる比重が高くなってきている。生物学的研究は大きく2つの方法がある。①重粒子線治療で得られた結果を解析することで得られた新しい知見を今後の治療に応用する、②新しい治療法を開発することで今後の治療に応用することである。例えば、局所進行膵癌に対する重粒子線治療の臨床試験の結果から、膵臓癌に対する照射線量が38.4GyEから5%ずつ48.0GyEまで増加するにつれて肝転移が減少する傾向が示された。基礎研究では、OgataはマウスLM6骨肉腫細胞を用いた実験で、炭素イオン線照射をすることにより腫瘍の浸潤能が減り肺転移が減少したが、X線照射ではこのような現象が認められなかったことを示している。重粒子線の転移抑制機序の解明は、重粒子線治療のみならず今後の癌治療に極めて有用であると思われる。また、新しい治療法の研究については、既存の治療法および新しい治療法と重粒子線の併用に関する研究が挙げられる。重粒子線と併用する療法の研究としては、重粒子線の増感作用を示す治療法が期待されるが、通常、X線のような低LET線で増感作用を示す薬剤も、重粒子線のような高LET線では増感作用がなくなることがほとんどである。DocetaxelはX線治療においても増感効果を示す有用な抗癌剤であるが、Kitabayashiはヒト食道癌培養細胞を用い重粒子線でもX線と同様に増感作用があることを報告している。この種の抗癌剤は重粒子線の標的である核の形態を変えることにより標的が放射線の影響を受けやすくなるためと考えられているが、このような傾向は高LET線の方がより影響を受けやすいと考えられている。既存の治療法との組み合わせは臨床応用が比較的容易であり即戦力として期待される。抗癌剤の種類と量・タイミング・回数など生物学的な基礎実験から得られたデータを臨床に外挿することから、生物の担う役割は大きい。また、新しい治療法として副作用が比較的少ない分子標的治療・遺伝子治療や免疫療法との併用も期待される。

現在、物理的な発展は重粒子線治療装置の汎用性・実用性は進展させる方向で進んでいる。今後、重粒子線治療の適応を拡大し、さらなる治療成績の向上を目指すためには生物学的な発展が必須であり大いに期待したい。

参考文献

- 1) Jamal A, Siegel R, Ward E, et al: Cancer statistics, 2006. CA cancer J Clin 56: 106-130, 2006
- 2) 松野正紀: 膵癌全国登録調査報告 (20年間の総括, 膵臓 18:101-169, 2003)

- 3) Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H et al : A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer, *N Engl J Med* 350: 1200, 2004
- 4) Regine WF, Winter KW, Abrams R et al: RTOG 9704 a phase III study of adjuvant pre and post chemoradiation 5FU vs gemcitabine for resected pancreatic adenocarcinoma, *J Clin Oncol* 24 :180, 2006
- 5) Koong AC, Mehta VK, Le QT et. al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 48:919-922, 2000
- 6) Ando K, Koike S., Kojima K et al: Mouse skin reactions following fractionated irradiation with carbon ions. *Int J Radiat Biol* 74: 129-138, 1998
- 7) Staley CA, Lee JE, Cleary KR Preoperative Chemoradiation, Pancreaticoduodenectomy, and Intraoperative Radiation Therapy for Adenocarcinoma of the Pancreas Head. *Am J Surg* 171:118-125, 1996
- 8) Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S et al Concomitant benefit of preoperative irradiation in preventing pancreas fistula formation after pancreatoduodenectomy. *Arch Surg*, 126: 885-889, 1991
- 9) Gastrointestinal Tumor Study Group: Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer: *Cancer* 59: 2006-2010, 1987
- 10) Hoffman PH, Lipsitz S, Pisansky T Phase II trial of preoperative radiation therapy and chemotherapy for patients with localized, respectable adenocarcinoma of pancreas: *J Clin Oncol* 16 :317-323, 1998
- 11) Roldan GE, Gunderson LL, Nagorney DM et al External beam versus intraoperative and extrabeam irradiation for locally advanced pancreatic cancer: *Cancer* 61:1110-1116, 1988
- 12) Moertel CG, Gunderson LL, Mailliard JA et al Early evaluation of combined fluorouracil and leucovorin as a radiation enhancer for locally unresectable, residual, or recurrent gastrointestinal carcinoma. *J. Clin Oncol* 12:21-27, 1994
- 13) Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM et al. Delayed radiosensitization of human colon carcinoma cells after a brief exposure to 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine *Clin. Cancer Res.* 3:777-782, 1997
- 14) Milas L, Fujii T, Hunter N et al. Enhancement of tumor radioresponse in vivo by gemcitabine. *Cancer Res.* 59: 107-114, 1999
- 15) Crane CH, Wolff RA, Abbruzzese JL et al. Combining gemcitabine with radiation in pancreatic cancer *Seminars in Oncology* 28: 25-33, 2001
- 16) McGinn CJ, Zalupinski MM, Schureiqi I et al. Phase I trial of radiation dose escalation with concurrent weekly full-dose gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer *J Clin Oncol* 19: 4202-4208, 2001
- 17) 山崎秀哉、西山謹司、小泉雅彦：手術不能膵臓癌に対するゲムシタビン同時併用放射線化学療法。 *日医放*64:216-219, 2004
- 18) Wolff RA, Evans DB, Gravel DM et al. Phase I trial of gemcitabine combined with radiation for the treatment of locally advanced pancreatic adenocarcinoma *Clin. Cancer Res.* 7:2246-2253, 2001
- 19) Poggi MM, Kroog GS, Russo A et al. Phase I study of weekly gemcitabine as a radiation sensitizer for unresectable pancreatic cancer. *Int J Radiation Oncology Biol. Phys.* 54 670-676, 2002
- 20) Ikeda M, Okada S, Tokuyue K. A phase I trial of weekly gemcitabine and concurrent radiotherapy

in patients with locally advanced pancreatic cancer. Br J Cancer 86: 1151-1554, 2002

21) Okusaka T, Ito Y, Ueno H. Phase II study of radiotherapy combined with gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer. Br J Cancer 1-5, 2004

婦人科がんに対する放射線治療：臨床検体を用いた制がんと発がんの研究

放医研 重粒子医科学センター病院
大野 達也

はじめに

放射線治療は「切らずになおす」がんの局所療法である。これは、患者の側からは体に優しい治療であるが、医療者側にとっては「切らない」が故に照射した腫瘍が治っているか直接確認することは困難である。がんの個性を知ることが治療の個別化には重要であるが、放射線治療においては生検試料が腫瘍の特性を伝える貴重な情報源となる。本稿では、治療前または治療中の生検試料を用いて放射線治療効果を予測することの意義について、我々のこれまでの成果や展望を交えて臨床の立場から述べる。

近年、高精度に局所を狙う放射線治療法の開発や化学療法の併用により放射線治療成績は向上している。一方、標的外健常組織の低線量照射容積の増加や、化学療法併用による発がん作用増加についての懸念も生じており、長期生存者における新たながん（2次がん）の発生は今後重要な問題となりうる。ここでは、放医研における子宮頸癌患者の2次がん解析結果を紹介するとともに、臨床的観点から、基礎研究をどのように取り入れていくかについての展望も述べる。

局所進行子宮頸癌に対する放射線治療の現状と問題点

局所進行子宮頸癌に対する標準治療として近年急速に広まっているのが、化学放射線治療である。これは、放射線治療にシスプラチンを含む化学療法を同時に併用し、骨盤内病変に対する増感効果とミクロ的な遠隔転移巢の制御を目的とする治療法である。本治療の背景には、米国で行われた5つのランダム化比較試験で化学放射線治療群が対照群に比べて30-50%の有意な生存率の改善を示したこと、さらに、化学放射線治療群では骨盤内再発の抑制のみならず遠隔転移も抑制されていたという科学的なエビデンスが存在する¹⁾。しかし、いまだ30%の骨盤内再発が認められたことや、急性期の消化器および血液毒性が強かったこと、本来放射線治療単独でも治癒が見込める症例群が含まれていた可能性など、解決されるべき問題点も指摘されている²⁾。よって、さらなる治療法の個別化と改良が求められており、放射線生物学的アプローチに期待する所は大きい。

放射線腫瘍医が制がんについて知りたいこと

手術療法では、摘出標本から得られる病理学的情報に基づき術後のリスク分類が行われ、補助療法の方針を決めることが可能である。

放射線治療では、部位的制限のため組織学的に治療効果を確認することは困難な場合が多く、画像診断や血清中の腫瘍マーカーなどを駆使して臨床的に判断しているのが実情といえる。しかし、肺癌など放射線治療後に生じる2次的な肺繊維症のために腫瘍の評価が困難になる場合や、高分化型腺癌のように腫瘍の縮小が遅い場合には、腫瘍制御の有無を見極めるには月単位

での時間を要する。もし、計画した照射範囲と線量分割でがんは制御できるかについて、治療前もしくは治療開始後のなるべく早期に知ることが出来れば、放射線治療の計画を修正するのに役立つと考えられる。特に、制御困難が予想される場合には、増感剤の併用や効果不足の部位に局限した追加照射を検討しなければならない。

もう一つ、治療方針に影響を与えるのは、腫瘍は転移を来しやすいのかどうか、その部位はいずれなのかということである。これは、腫瘍の転移リスクに基づき、局所療法のみでよいのか全身療法の併用を考慮すべきなのかを判断する上で重要となる。

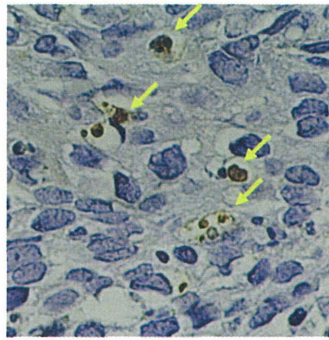
子宮頸癌が生物学的研究に適する理由

腫瘍制御や転移の可能性を予測するために、我々は、これまで子宮頸癌の生検標本を用いて *in situ* における検討を行ってきた。子宮頸癌が生物学的研究に適する理由は、以下の通りである。1) 同一患者において、治療前のみならず、治療中の腫瘍組織を採取出来ること。これは、照射前の腫瘍の個性だけでなく、治療手段としての放射線に対する応答を調べることが出来る点で大きな長所となる。2) X線での反応を基準にして、X線+化学療法や炭素イオン線治療など、治療法別の対比が出来る。3) 代表的な癌の組織である腺癌と扁平上皮癌の反応を比較出来る。子宮頸部に発生する癌の15%は腺癌であり、扁平上皮癌の80%に比べて少ないが、腺癌の発生頻度は近年増加傾向にある。腺癌のX線感受性が扁平上皮癌に比べて低いと言われる理由を実際の臨床検体において解明することは、照射抵抗性克服の点からも興味深い。

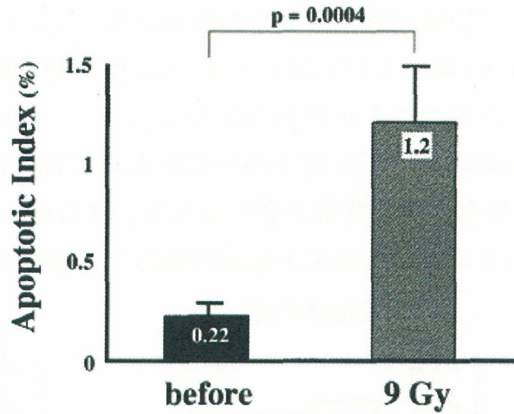
一方、腫瘍組織から得られる分子病理学的特徴と対比される臨床情報においても正確さが要求される。我々は、医療情報室や紹介医とも連携し、長期間高精度の経過観察を行っている³⁾。

放射線誘発アポトーシス

アポトーシスは放射線感受性に関わる因子の一つである。これまでの基礎研究では、リンパ腫や白血病など、本来放射線感受性の高い腫瘍に対して1回大線量(10Gyなど)を投与した際の照射応答に関する報告が多く、固形腫瘍に対して1回1.8-2Gyの分割照射を行った際のアポトーシス頻度は明らかではなかった。我々は、治療前と9Gy時の検体においてアポトーシス細胞の頻度を調べた結果、それぞれ0.22%と1.2%であることがわかり、照射後の腫瘍細胞の多くが、実際には壊死の経路をたどっていることを報告した⁴⁾。では、1-2%しか観察されないアポトーシスには、放射線治療における意義はないのであろうか。第1に、放射線治療を受けた子宮頸癌において、アポトーシスの頻度が予後因子となることが報告されている^{5,6)}。これらの報告において、観察されたアポトーシス細胞の頻度は0.9-2.5%であった。第2に、アポトーシスは照射により有意に増加し、関連蛋白であるBax蛋白と正の相関が認められていた(図1-a, b)^{4,7)}。よって、子宮頸癌の放射線誘発アポトーシス細胞の出現にはBax蛋白の発現を介する経路が関与しており、照射効果にも寄与していると考えられる。



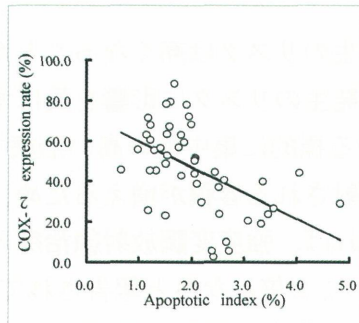
a. X線誘発アポトーシス(9Gy/5fr後)



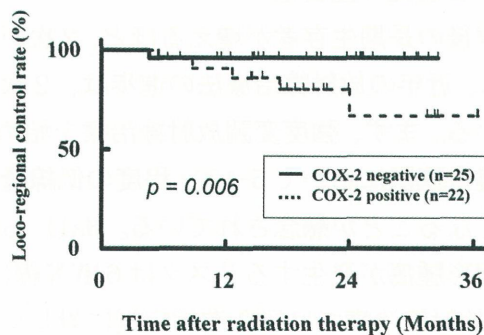
b. X線治療によるアポトーシスの変化

図1 放射線誘発アポトーシス

COX-2 は、アラキドン酸からプロスタグランジンを産生する際に必要な酵素である。Hanらは、COX-2 ノックアウト細胞では COX-2 発現のある細胞に比べて、p53 依存性アポトーシスが增強されること、および、COX-2 発現のある細胞は COX-2 阻害剤により p53 依存性アポトーシスが增強されることを報告した⁸⁾。これは、p53 依存性アポトーシスに対して、COX-2 は阻害作用を有する可能性を示している。我々は、放射線治療を受けた子宮頸癌の腫瘍組織における COX-2 の発現を調べ、9Gy 時の放射線誘発アポトーシス頻度との相関を調べた。その結果、COX-2 の発現が高い腫瘍はアポトーシスの頻度が低く、局所制御率も低いことが明らかとなった(図2-a, b)⁹⁾。これは、アポトーシスを起こしやすい腫瘍では放射線感受性の高い腫瘍の特徴を有している可能性を示している。他にも、子宮頸癌の COX-2 陽性群ではリンパ節転移や遠隔転移の頻度が上昇し、予後不良とする報告がある^{10, 11, 12)}。現在、米国の放射線腫瘍医の臨床試験グループは、標準治療である放射線治療+シスプラチンに、分子標的薬である COX-2 阻害薬を併用した第2相臨床試験を行っており、その安全性と有効性を評価している。



a. X線誘発アポトーシスとCOX-2には負の相関が認められた



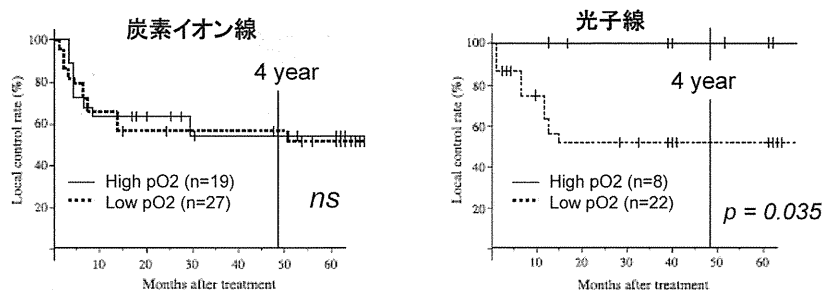
b. COX-2の高発現群で局所制御不良

図2 COX-2 の発現と放射線誘発アポトーシス、骨盤内制御

電極針を用いた腫瘍内酸素濃度の測定

ポーラログラフィー針電極を用いた酸素濃度測定法は、腫瘍内 Hypoxia を調べる Golden standard の1つとされてきた。我々は、エッペンドルフ社製よりもさらに細い直径 200 μm の

電極針を用いて腫瘍内酸素濃度を治療前と 9Gy 時に測定し、治療予後との相関を調べた。通常の放射線治療 (X線およびγ線) では、9Gy 照射時の腫瘍内酸素濃度が 20mmHg 以下では有意に局所制御不良となることが明らかとなった¹³⁾。一方、同様な検討を炭素イオン線治療で行ったところ、酸素濃度が低い群と高い群において局所制御に有意差は認められなかった (図 3-a, b)¹⁴⁾。線量や症例の背景が異なるため、さらなる検討が必要ではあるものの、生物学分布に優れた炭素イオン線の効果が臨床の検体でも検証された貴重な報告である。



a. 炭素イオン線では酸素濃度による有意差はなし b. 光子線では低酸素濃度群で局所制御不良

図 3 腫瘍内酸素濃度と局所制御

一方、針電極針を用いた酸素濃度測定法は、測定時間の長さや手技の煩雑さのために患者への負担が少なくはなく、より低侵襲の検査法が待望される。中でも、低酸素細胞に集積するとされる Cu-ATSM を用いた PET への期待は大きい。Dehdashti らは、放射線治療を受けた子宮頸癌患者 14 名に対して治療前に Cu-ATSM を用いた PET を行い、集積の強い群では有意に予後不良であったと報告している¹⁵⁾。今後は、さらに多数例での追試が必要であり、内因性の低酸素マーカーである CA9 や HIF-1 α との相関も調べる必要があるであろう。

発がんに関する研究の重要性

放射線治療後の長期生存者が増えるほど、2次がん発生のリスクは高くなることが知られている。さらに、近年の放射線治療法の進歩は、2次がん発生のリスクに影響を及ぼす可能性が指摘されている。まず、強度変調放射線治療を始めとする標的に集中性の高い治療では、標的以外の周囲健常臓器において 5-10Gy 程度の低線量を照射される容積が増えるため、2次がんリスクが高くなることが懸念されている。Hall らによれば、強度変調放射線治療の場合、長期生存者に固形腫瘍が発生するリスクは 6 MV X線に比べて 2 倍になると報告されている¹⁶⁾。次に、近年の放射線治療では局所進行症例に対しシスプラチンを主体とする抗がん剤が同時併用される機会が多くなっているが、卵巣癌や精巣腫瘍では、シスプラチンの投与量が多くなると白血病のリスクが高くなると報告されている^{17, 18)}。

放医研で 1961 年から 1986 年に放射線治療 (光子線) を受けた 2167 名の子宮頸癌患者を 97% の追跡率で長期間経過観察した結果を示す。2次がんの発生は 210 名にみられ、年齢や性別をマッチさせた一般人と比べて相対リスクは 20% 有意に増加していた。しかし、絶対リスクで見ると、年間 0.16%、つまり、20 年間でも約 3% の増加分にすぎなかった¹⁹⁾。これまでの欧米の疫学研究でも 10-40% 程度の相対リスクの増加と年間 0.04-0.33% の絶対リスクの増加が報告

されている。これまでの報告が主に低線量率腔内照射を欧米人に対して用いた結果であるのに対して、我々の報告は高線量率腔内照射をアジア人に対して用いた結果であるが、2次がんリスクはほぼ同等であると考えられた（表1）。いずれにしても、他に有効な治療手段の無かった症例が多く、放射線治療後に半数の患者が10年以上生存していたことを考慮すると、放射線治療の利益は2次がんリスクを大きく上回っていると考えられる。

No.	Author	Diagnosis years	Person-years	Mean period of observation	RR (95%CI)	AR	General Control
(1)	Boice	1960 - 1970	623,798	7.6	1.1 (1.0-1.2)	4.2	Westerner in 8 countries
(2)	Curtis	1935 - 1982	51,730	7.9	1.4 # (NR)	33.0	Connecticut
(3)	Storm	1943 - 1982	203,098	10.1	1.1 # (NR)	6.0	Danish
(4)	Kleinerman	1935 - 1990	532,740	10.7	1.2 (1.2-1.3)	18.1	Westerner in 5 countries
(5)	Bergfeldt	1958 - 1992	60,001	11.3	1.3 (1.2-1.4)	23.3	Swede
(6)	NIRS	1961 - 1986	25,666	11.8	1.2 (1.1-1.4)	15.8	Japanese

$p < 0.05$ NR: Not reported RR: Relative risk AR: Absolute risk CI: Confidence interval
 (1)-(5): Patients were treated with low-dose rate brachytherapy.
 (6): 82% of patients were treated with high-dose rate brachytherapy.

表1 子宮頸癌放射線治療後の2次がんリスク

炭素イオン線治療においても、2次がんの発生は基礎・臨床を問わず関心の一つである。しかし、炭素イオン線治療後の2次がんリスクの評価が可能となるのは少なくとも今後10-20年先であり、データベースや生物統計家の協力が必要である。2次がんが発生するメカニズムの解明、およびリスクを増加させる因子の特定は、将来の有効な患者追跡プログラムや、予防および治療法の開発に役立つであろう。また、部分照射時の全身における吸収線量の評価は、医学物理学の助けなくしては成立しない。つまり、2次がんの研究には、生物・物理・生物統計家・データベースなど、幅広い分野の協力が長期間にわたり必要となる。将来の2次がんリスクを明らかとすることは、患者、医療者、基礎研究者、社会における2次がん発生への過剰な不安を拭うのに役立つと考えられる。

まとめ

子宮頸癌の放射線治療における臨床検体を用いた研究において、基礎研究で明らかとされたメカニズムを実際の腫瘍で検証し、予後と相関する分子マーカーの候補を特定することが期待できる。しかし、候補となる分子マーカーの有用性が多施設で検証されて初めて、実地臨床では使用可能となる。前述したように、臨床側の提供するアウトカムの質が重要であることを考慮すると、多施設共同臨床試験の付随研究において、候補となる分子マーカーの有用性を検証することが最も効果的ではないだろうか。このため、臨床医と基礎研究者は研究目的や方向性の確認を常に共同で行う必要があり、積極的な関わりが互いに求められる。

文献

- (1) Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med*. 1999;340:1144-1153.
- (2) Ohno T, Kato S, Tsujii H. Concurrent chemoradiotherapy for cervical cancer: A review of randomized trials and perspectives for Asian countries. *Austral-Asian J Cancer*. 2006;5:283-290.
- (3) Nakano T, Kato S, Ohno T, et al. Long-term results of high-dose-rate intracavitary brachytherapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*. 2005;103:92-101.
- (4) Ohno T, Nakano T, Niibe Y, et al. Bax protein expression correlates with radiation-induced apoptosis in radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer*. 1998;83:103-110.
- (5) Wheeler JA, Stephens LC, Tornos C, et al. ASTRO Research Fellowship: apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. *American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;32:1487-1493.
- (6) Levine EL, Davidson SE, Roberts SA, et al. Apoptosis as predictor of response to radiotherapy in cervical carcinoma. *Lancet*. 1994;344:472.
- (7) Kokawa K, Shikone T, Otani T, et al. Transient increases of apoptosis and Bax expression occurring during radiotherapy in patients with invasive cervical carcinoma. *Cancer*. 1999;86:79-87.
- (8) Han JA, Kim J-I, Ongusaha PP, et al. p53-mediated induction of COX-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. *EMBO J*. 2002;21:5635-5644.
- (9) Ishikawa H, Ohno T, Kato S, et al. Cyclooxygenase-2 Impairs treatment Effects of Radiotherapy for Cervical Cancer by Inhibition of Radiation-Induced Apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66:1347-1355.
- (10) Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, et al. Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3117-3123.
- (11) Kim HJ, Wu HG, Park IA, et al. High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;55:16-20.
- (12) Ryu HS, Chang KH, Yang HW, et al. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Gynecol Oncol*. 2000;76:320-325.
- (13) Suzuki Y, Nakano T, Ohno T, et al. Oxygenated and reoxygenated tumors show better local control in radiation therapy for cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16:306-311.
- (14) Nakano T, Suzuki Y, Ohno T, et al. Carbon beam therapy overcomes the radiation resistance of uterine cervical cancer originating from hypoxia. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2185-2190.
- (15) Dehdashti F, Grigsby PW, Mintun MA, et al. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by positron emission tomography with ⁶⁰Cu-ATSM: relationship to therapeutic response-a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;55:1233-1238.

- (16) Hall EJ, Wu CS: Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56:83-88.
- (17) Travis LB, Holowaty EJ, Bergfeldt K, et al. Risk of leukemia after platinum-based chemotherapy for ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:351-357.
- (18) Travis LB, Andersson M, Gospodarowicz M, et al. Treatment-associated leukemia following testicular cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2000;92:1165-1171.
- (19) Ohno T, Shizuko Kakinuma S, Kato S, et al. Risk of second cancers after radiotherapy for cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006;6:49-57.

癌治療と基礎研究

遺伝子発現プロファイルからみた炭素線治療効果

放医研 重粒子医科学センター

ゲノム診断研究グループ

岩川 真由美(E-mail:mayumii@nirs.go.jp)

1. はじめに

放射線治療を支える基礎研究の使命として、治療効果の生物学的作用機序解明がある。詳細な作用機序が解明されれば、新たな治療法開発や、適応患者群の選別など、臨床現場での展開が期待できる。ゲノム診断研究グループは、患者個人個人の放射線感受性指標となる SNP マーカー研究に加えて、がんの持つゲノム動態の全体像を対象とするマイクロアレイ技術を用いた治療効果の作用機序解明の研究も行っている¹⁻⁴⁾。最近のマイクロアレイ技術は、定量性および網羅性に優れ、加えて国際的ガイドラインの整備により、生命科学コミュニティの中で、質の高い明瞭な再現性のある研究手段へと技術的発展を遂げている。今回、この技術を基盤とした遺伝子発現プロファイル解析の研究成果を報告した。本研究の総合研究テーマは、「炭素線治療の生物学的効果は、従来の光子線照射効果と異なるのかあるいは、同一なのか？」という命題とした。

2. 材料と方法

対象は、ヒト腫瘍細胞株 (92-1, C32TG, Colo679, HMV-1, HMV-2, MeWo)、マウス腫瘍動物モデル (NR-S1, NFSa, MMCa, SCCVII, #8520, Mca#4)、臨床子宮頸癌生検サンプル 63 例の 3 項目を対象とした。マイクロアレイは、約 44000 の遺伝子配列に対応するプローブが搭載された一色法アレイ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を用い、アレイデータの解析には、Resolver (Rosetta Biosoftware, Seattle, WA) を使用した。

細胞株実験では、炭素線および X 線を 2 Gy 照射し、照射後 1 時間および 3 時間のサンプルから RNA を抽出しアレイ解析を行った。マウス実験では、炭素線は、30 Gy、ガンマ線は、30, 50, 70 Gy をそれぞれ一回照射し、6 時間、12 時間、1 日後、3 日後の腫瘍から RNA を抽出しアレイ解析を行った。炭素線は、いずれも、290 MeV/u, carbon-12, SOBP を用いて照射した。臨床サンプルは、治療開始前と同一症例において開始後一週間後に施行した生検試料を対として用いた。

細胞株実験における炭素線の治療効果比は、照射線量生存率曲線から求め、マウス実験では、照射後腫瘍増殖遅延曲線から求めた。発現変化を呈した遺伝子群の変化確認には、RT-PCR 実験と、タンパク発現解析を用い、機能に關与する実験として、細胞株実験では細胞周期解析、マウスモデルでは病理学的検討、臨床生検サンプルではアポトーシス検出解析を行った。

3. 結果

6 種のヒト悪性黒色腫細胞株炭素線照射効果を、線量反応生存曲線でみると、明らかに炭素線の抗腫瘍効果が高いが、X 線に対しては抵抗性であっても炭素線では著効を示すもの、X 線炭

素線どちらでも有効なもの、他の細胞株に比べると炭素線効果が明らかでないものなど、各々の細胞株毎に特徴があった。この6種に対し、2 Gy の等しい物理線量で照射し、1 時間後、3 時間後の発現変化を比較検討した。照射後発現プロファイルの「教師なしクラスタリング」主成分分析では、細胞株毎の個性が発現全体の個性となり、細胞株毎に分別され、2 Gy の炭素線照射と X 線照射という刺激より、細胞株毎の遺伝的背景が発現に及ぼす影響が高いことを示した。次いで、照射後発現変化が明らかであった遺伝子群を抽出すると、既知の X 線による DNA 損傷のメカニズムに関わる遺伝子群、すなわち p53 下流にある GADD45a, p21 が、炭素線でも同様に変化を示した。一方、細胞周期制御分子 CCNA2 は、炭素線において、著明に CCNA2 発現抑制され、細胞周期解析にて、炭素線では、2 Gy 照射後 30 時間を経ても細胞周期が G2M ブロックによる細胞周期停止が誘導され、その抗腫瘍効果に関与することが示唆された。

マウス腫瘍モデルにおいても、やはり炭素線治療効果は、ガンマ線より優れていたが、細胞株と同様、腫瘍増殖遅延効果で判定した放射線感受性、および発現プロファイルもともに、腫瘍毎の遺伝的背景が及ぼす影響が強いことを示した (図 1、2)。マウス腫瘍に対する炭素線照射 6 時間後に 1.5 倍以上の発現変化がある遺伝子の多くは、細胞周期関連遺伝子であり、その多くが抑制されていた。その抑制は、照射後 5 日のサンプルにおいても確認された。一方、発現増加したものもあり、その多くはサイトカインなど、免疫反応関連遺伝子であった (図 3)。

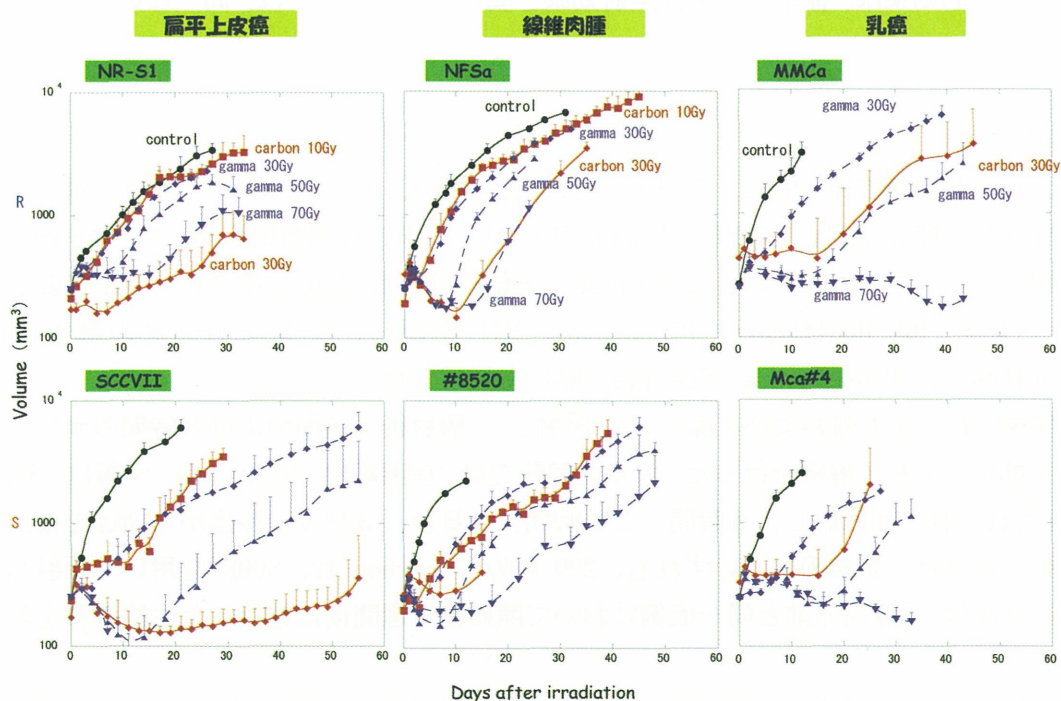


図 1 マウス腫瘍 6 種類における照射後増殖曲線。

いずれの腫瘍においても、炭素線は同じ物理線量のガンマ線に比し、優れた腫瘍増殖遅延効果を示した。ただし、その効果比は、個々の腫瘍により異なっていた。

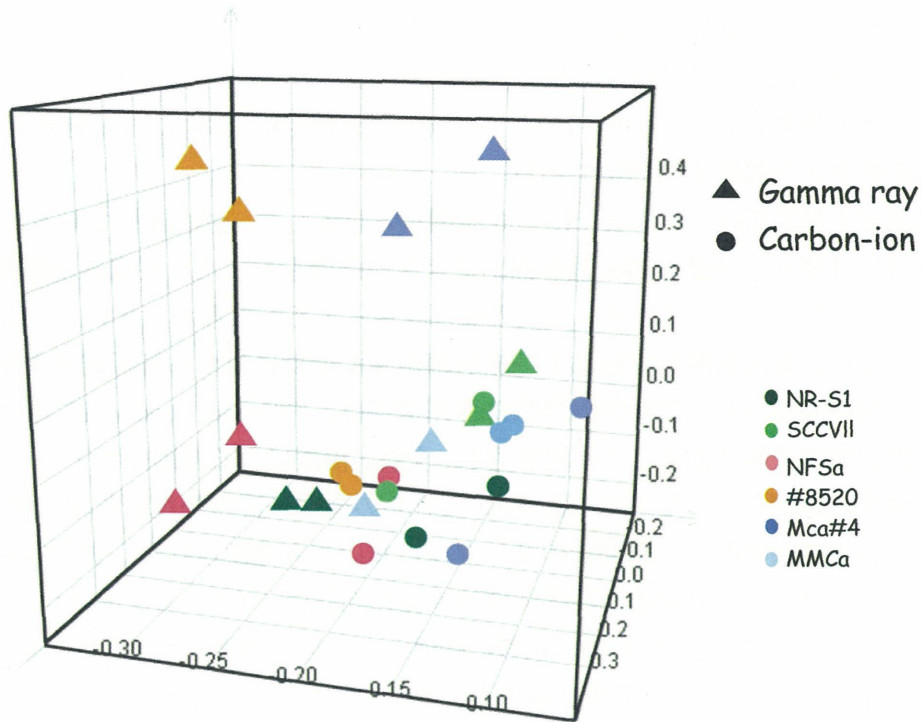


図2 マウス腫瘍6種類における照射後遺伝子発現プロファイルに対する主成分分析。すべての遺伝子発現変化の情報の総和として、三次元空間に圧縮すると、それぞれのプロファイルの類似性が明らかとなる。この図から、炭素線とガンマ線の二線質による発現変化の差より、それぞれの腫瘍毎の個性（遺伝的背景）が持つ発現変化の特徴の方が類別化に関与していることがわかる。

●印は炭素線、▲印はガンマ線をあらわす。

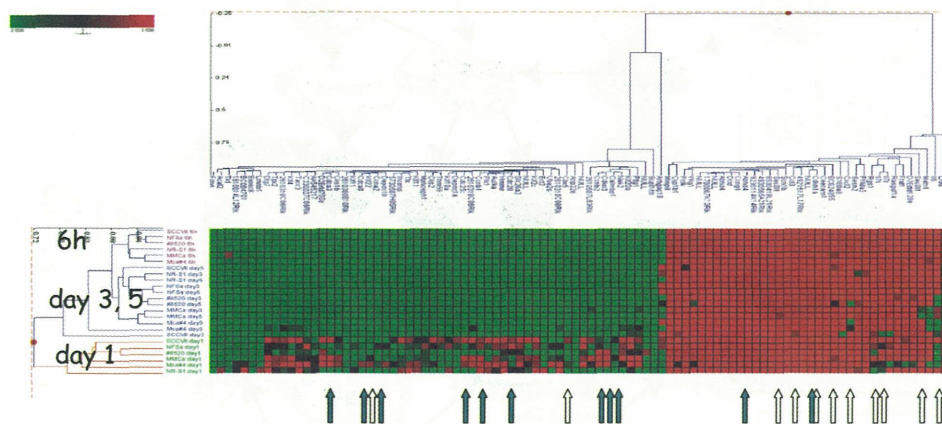


図3 マウス腫瘍6種類における照射後遺伝子発現変化を呈した遺伝子群によるクラスタリング。

炭素線照射後6時間で1.5倍以上発現変化がある遺伝子の多くは、細胞周期関連遺伝子であり、その多くが、抑制されており、その抑制は、照射後5日のサンプルにおいても確認された。一方、発現増加したものもあり、その多くはサイトカインなど、免疫反応関連遺伝子であった。青矢印は細胞周期関連遺伝子、白矢印は免疫反応関連遺伝子をあらわす。

照射後経時的な病理変化は、照射直後には、顕微鏡下で明らかな変化は見られず、一日後に、クロマチンの局在変化、細胞膜の不鮮明化、間質の増強が見られ、三日以降には、小円形細胞の著明な浸潤が観察され、分裂間期に同調し、停止像を呈する細胞を多数認めた。更に再発腫瘍特有の発現変化も観察された。その中には、放射線抵抗性腫瘍においてのみ発現上昇する分子があり、血管新生との関連を検討中である。

子宮頸癌臨床生検試料は、これまでに 150 症例から収集した。生検試料であるため、マイクロアレイ解析に必要な十分量の RNA 量を抽出できない症例もあった。炭素線治療群の症例は、病理診断が多岐にわたっているため、今後の症例収集によるところが大きい。今回は、子宮頸部扁平上皮がんの化学放射線治療群および放射線単独治療群に対する解析結果を報告した。マイクロアレイ解析結果から、化学放射線療法作用機序は、TNF-mediated cell death pathway 関連遺伝子群の発現上昇にあることが示唆され、更に、治療による細胞外マトリックスに関わる分子の発現変化が明らかとなった（図 4）。これらの遺伝子群の発現変化は、炭素線治療症例の照射前、および治療開始一週間後のサンプルにおいても確認された。放射線治療において、生検試料内にアポトーシス細胞出現率の増加も認められた。マイクロアレイから抽出された細胞外マトリックス関連分子は、再発／転移に関連して临床上重要と考え、更に解析中である。その中で、例えば、CD44 は、子宮頸部扁平上皮癌症例において、炭素線療法後、その発現が抑制されるが、腺癌症例においては、染色像の強染が認められる結果となった。マイクロアレイにより抽出された細胞外マトリックス関連遺伝子群に対して、他アッセイ系を用いた検討を加えることにより、放射線抵抗性機構解明や、新たな転移マーカーの発見につながると考えている。

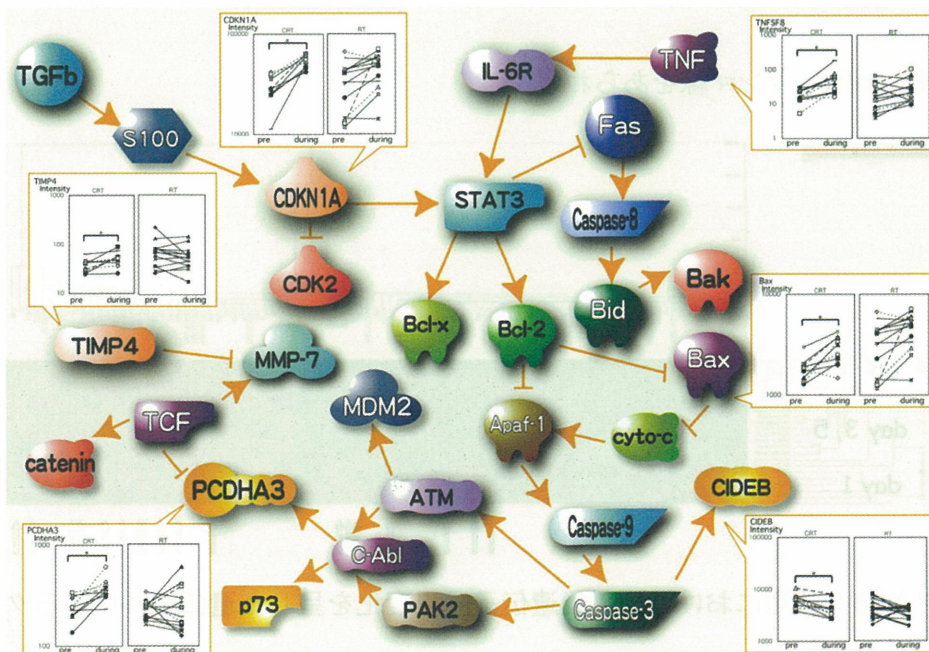


図 4 放射線治療により活性化される遺伝子ネットワークの仮想図および、実際の遺伝子発現量変化。

CRT は化学放射線療法、RT は放射線単独療法をあらわす。

4. おわりに

以上、ゲノム診断グループにおける遺伝子発現プロファイルを用いた研究成果を報告した。今後も、ゲノム動態の全体を把握する網羅的手段として、マイクロアレイを用いた研究を行い、このスクリーニング解析を研究の基盤として、重粒子医科学の生物研究を進めて行く予定である。

参考文献

- 1) Ken-ichi Ishikawa, Kumiko Saegusa, Yoshimi Otsuka, et al: Gene expression profile changes correlating with radioresistance in human cell lines, *Int J Radiat Oncol. Biol. Phys.*, 65(1):234-245, 2006
- 2) Shuhei Noda, Mayumi Iwakawa, Toshie Oota, et al : Inter-strain variance in late phase of erythematous reaction or leg contracture after local irradiation among three strains of mice, *Cancer Detect. Prev.*, 29(4):376-82, 2005
- 3) Toshie Oota, Mayumi Iwakawa, Chisa Kitazawa, et al : Fractionated irradiation augments inter-strain variation of skin reactions among three strains of mice., *J. Radiat. Res.*, 45(4): 515-519, 2004
- 4) Mayumi Iwakawa, Shuhei Noda, Toshie Oota, et al : Strain dependent differences in a histological study of CD44 and collagen fibers with expression analysis of inflammatory response related genes in irradiated murine lung., *J. Radiat. Res.*, 45(3): 423-433, 2004

炭素線治療の生物学的利点

放医研 特別上席研究員
(兼：粒子線生物研究グループ)
安藤 興一

1. はじめに

1994年放医研にて治療研究が開始されて以来今日に至るまで、3000名を超す患者が炭素線治療を受けてきている。この間における生物研究ではHIMACシンクロトロンの共同利用研究体制の基に、分子レベルから個体レベルまで幅広い実験が行われてきており、所内外や海外の多数研究者が新しい知見をもたらしてきた。我々は炭素線治療がX線などの光子線治療と比べて、生物学的にどう違うのか、その違いをどう治療で活かすのか、という問題に対する答えを出すべく、主にマウスを用いた研究を行ってきた。本論文では、過去10年にわたり我々が行ってきた実験で得たデータを基にして、炭素線治療の生物学的利点について検討したい。

2. 炭素線照射による組織反応—腫瘍と皮膚の比較^{1, 2)}

放医研が行っている治療法には様々な新規性が取り入れられているが、なかでも分割照射回数を少なくすることにより、治療期間が短縮され、患者の負担が減少し、治療件数を増やすことができるようになったことは特筆に値する。X線治療で分割照射を行う理由は正常組織が損傷回復することを期待するからであり、腫瘍にはより大きい線量を与えることで正常組織の保存と腫瘍の治癒を両立させている。一方、生物効果の高い高LET放射線は細胞損傷力が強く、照射後の回復はX線より少ないことは従前から知られていた。X線と異なり、炭素線のLETは体内深部になると高くなる様に治療ビームが設計されている。LETが異なると、損傷やその回復の程度が変わってくるため、分割照射効果も一定ではない。では、どのようなLETで分割照射すると腫瘍と正常組織の生物効果がどのように変わり、その結果得られる効果的照射方法とは何か？ この疑問に対する答えを出すために、我々はマウスを用いて実験を行い、その結果、炭素線拡大ブラッグピークによる少数分割照射が良いことを見いだした。

以下に実験の概要を述べる。まず、腫瘍はNFSaを用いることとした。この腫瘍はC3Hマウスに自然発生した繊維肉腫であり、極めて放射線抵抗性である。種々の照射方法の間で照射効果を比較するためには、照射時における腫瘍の大きさを揃えておく必要がある。半年前に決められたマシントイムに合わせて腫瘍を一定サイズに揃えるためには、増殖の早い腫瘍である必要がある。NFSa細胞の 10^6 ヶをC3H雄マウス右下肢部皮下に移植すると、7日目と8日目で略100%のマウスにて径7mmの腫瘍が得られる。図1に、マウス下肢に炭素線照射する実験風景を示す。図左パネルでは5匹のマウスが麻酔下にてルサイト板にテープで固定されている。右足が中央へ伸ばされて固定されており、2本のテープの間に設定した2.8mm x 100mmが照射野である。図は次に述べる皮膚照射実験のものであるが、腫瘍照射でも全く同じセッティングである。一群は5匹、全部で881匹を腫瘍実験に用いた。正常組

織の代表として皮膚を選んだ。どのような腫瘍であれ、外部照射では皮膚が必ず被ばくするからであるし、早期皮膚反応は線量制限因子となるからである。同じC3Hマウスの雌2、3匹を皮膚反応実験に充てた。照射3日前に右下肢体毛を脱毛クリームにて除毛しておき、皮膚反応が観察しやすい様にしておいた。



- HIMAC synchrotron
- carbon ions
- 290 MeV/u

Local Irradiation to the right hind legs

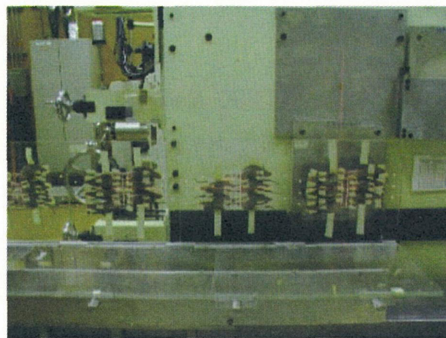


図1. マウス炭素線照射のセッティング

炭素線は 290MeV/n に加速したビームを用いて、ビーム方向に 6 cm 幅に広げた拡大ブラッグピークとした。図2で示したごとく、深さ方向で炭素線の線量と線エネルギー付与 (LET, Linear Energy Transfer) が変化する。線量と LET の設定は、皮膚照射では下肢外側皮膚表面、腫瘍では中心部 4mm 深さとした。腫瘍は照射後、ノギスにて直径を3方向から計測し、体積を経日で表す腫瘍増殖曲線を求めた。図3は SOBP 内の LET 74 keV/μm にて一回照射したものである。線量の増加とともに、増殖曲線が右方向に移動している。このグラフから、照射時体積が5倍 (図3では約 1000 mm³) になるまでの日数を各群について求め、非照射群との差を Growth Delay (日数) とした。皮膚については、照射後に発現する皮膚反応に対して10段階から成るスコアをつけ、経日的にスコアの変化を調べた。図4は炭素線ないしγ線で一回照射した個体についての結果である。スコアの最大値5個を平均して、その個体における平均値とした。

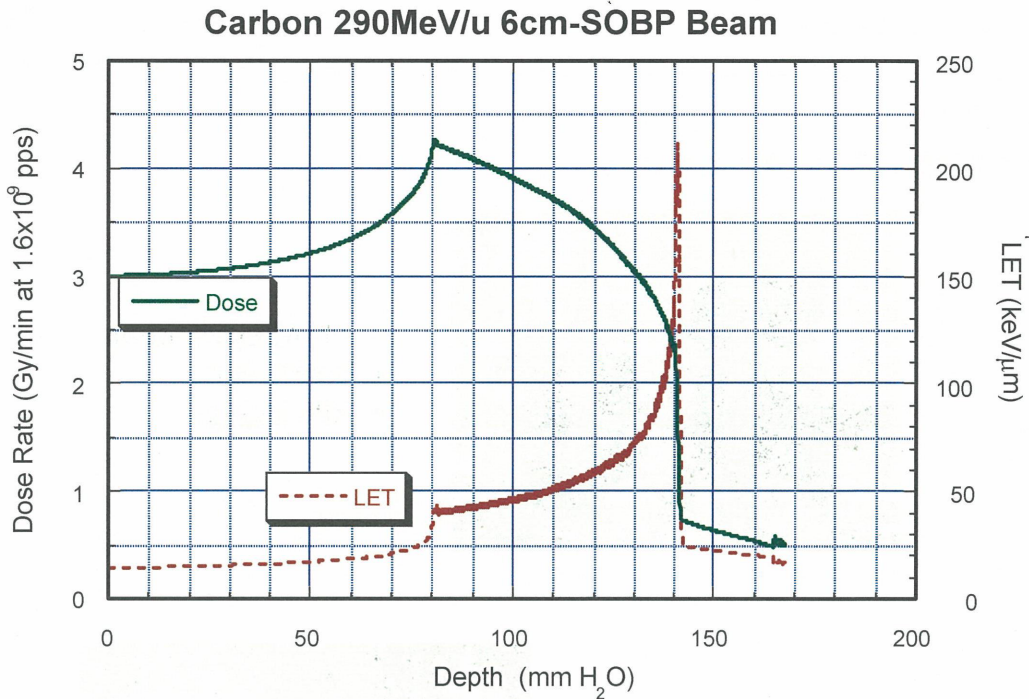


図2. 290 MeV/n 炭素線の拡大ブラッグピーク.

ピークの種々な位置を選ぶことによりマウス下肢に対するLETを変化させた照射ができる。

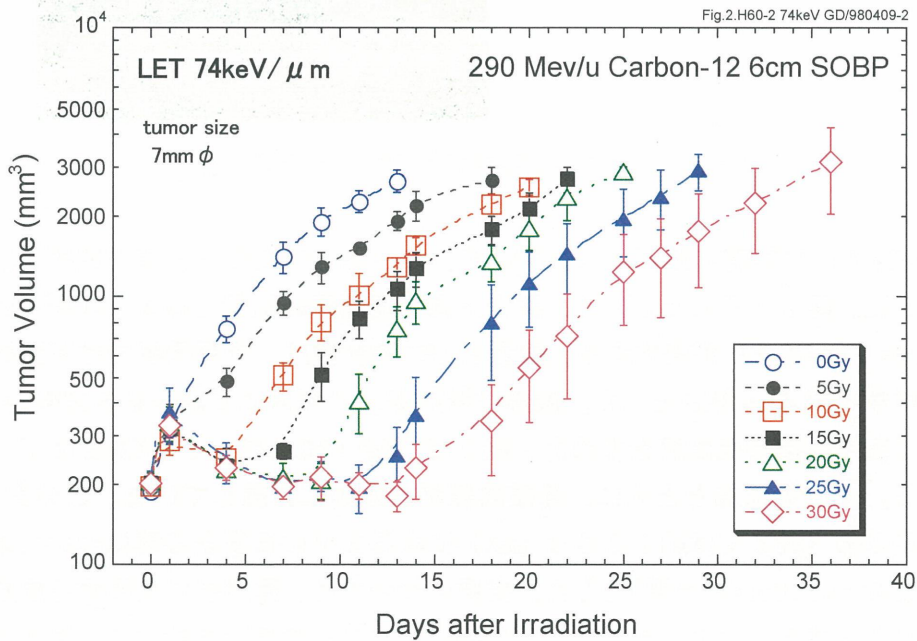


図3. 腫瘍増殖曲線

NFSa 繊維肉腫に対して炭素線一回照射した後に腫瘍径を隔日で計測して腫瘍体積を求めた。

100 keV/μm 炭素線の 21 Gy (●) ないし γ 線の 25 Gy (○) を一回照射した後の皮膚反応を示す。照射後1週間で皮膚反応が認められ、3週目で最大の反応が現れ、5週目には早期反応は終了する。線量やLETにより、ピークの高さと位置は変動する。

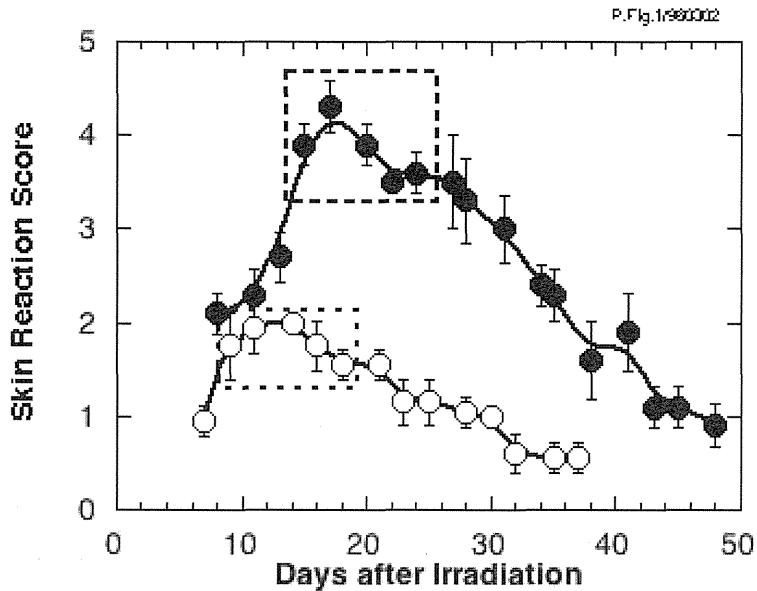


図4. 皮膚反応の経日変化

腫瘍と皮膚で得られた結果を線量に対してプロットしたものが図5である。種々LETの炭素線および対象セシウム γ 線にて4日間に4回の分割照射した結果である。腫瘍、皮膚ともに最左側には77 keV/ μm という一番高いLETで照射したときの線量-効果曲線がある。最右側には◇印で表した γ 線の曲線があるが、その直ぐ左の14 keV/ μm 炭素線では腫瘍と皮膚の間に違いがある。照射効果を実験群間で比較するために、同一の効果をもたらす線量、すなわち、等効果線量を用いることは有効である。腫瘍ではGrowth Delayが15日、皮膚では皮膚反応スコアが3、をそれぞれの等効果として、この効果をもたらす線量を各実験群について求めた。図6に、分割照射回数と等効果線量の関係を示す。 γ 線では分割回数の増加と

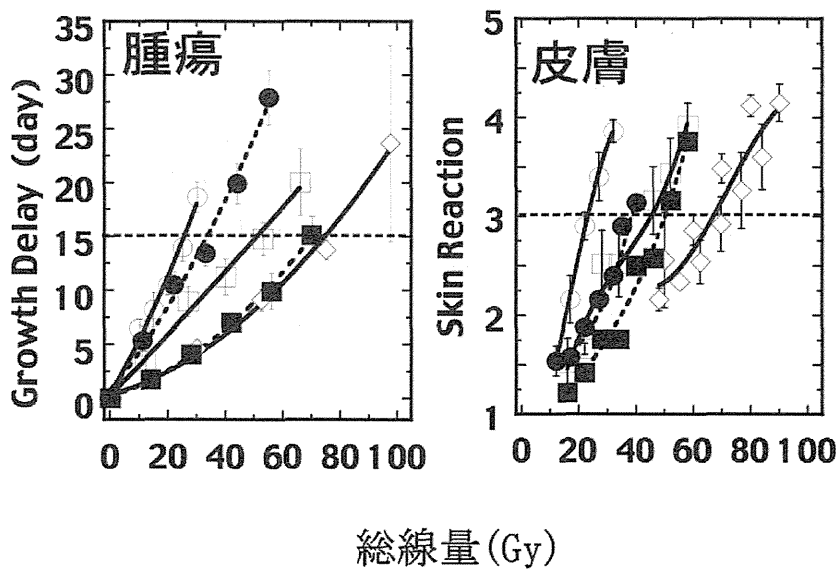


図5 線量-効果関係

各シンボルは、 γ 線 (◇) 炭素線 14(■), 20(□), 42(●) ないし 77 (○)keV/ μm を示す。

ともに等効果線量が増大し、また腫瘍 (●) の方が皮膚 (◇) よりも大きい等効果線量を示した。炭素線照射では、等効果線量が少なくなるとともに腫瘍と皮膚の間における等効果線量の差が小さくなっていった。この炭素線照射の特徴は LET が高いほど顕著であった。こうして得られた等効果線量を使って、各分割照射回数ごとに種々 LET 炭素線の RBE をもとめることができる。そして得られた腫瘍での RBE と皮膚での RBE を比較した結果を図 7 に示す。この比較は腫瘍での RBE を皮膚での RBE で割った値を使っており、縦軸が 1 よりも大きければ炭素線の方が γ 線よりも生物学的に治療効果比が大きいことを意味する。

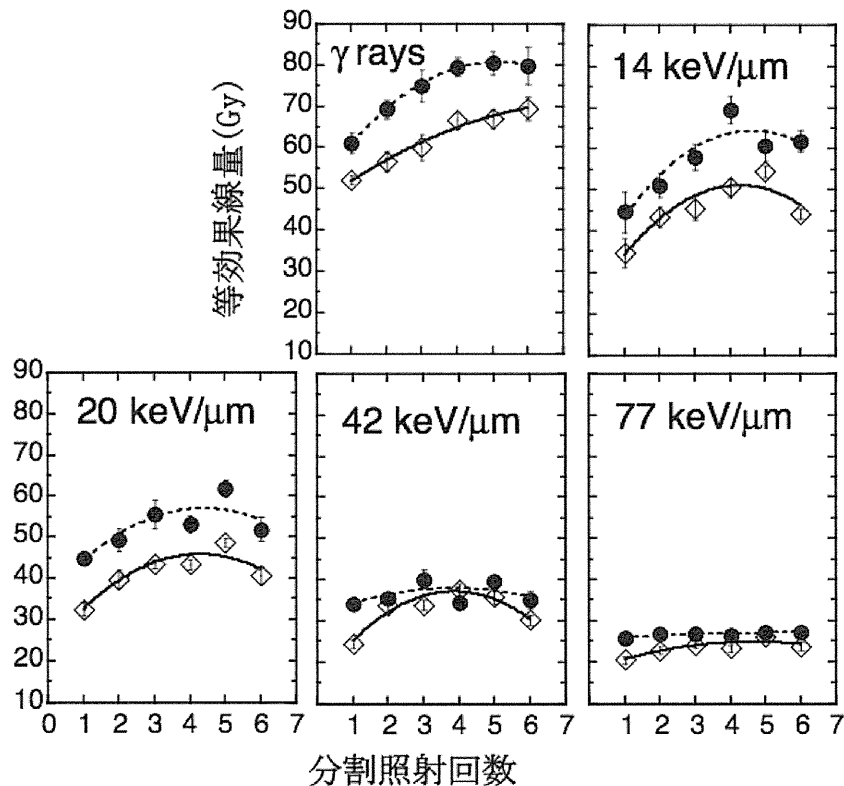
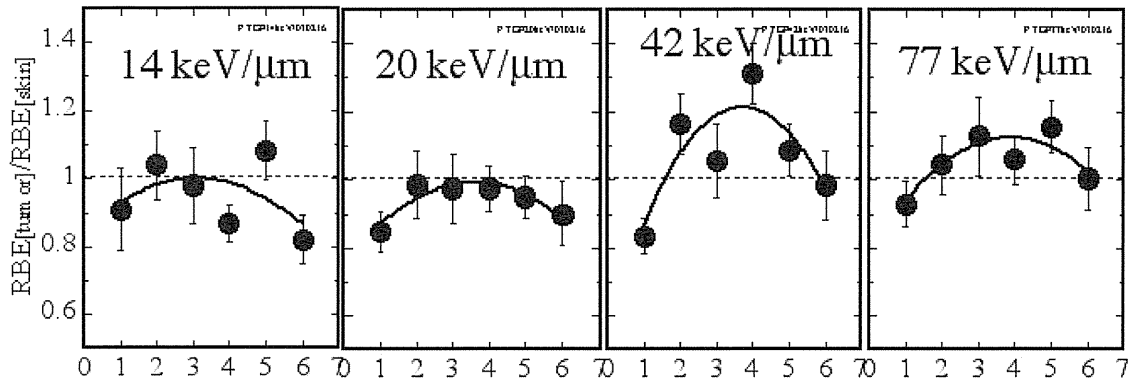


図 6 分割照射回数と等効果線量の関係
●は腫瘍増殖遅延、◇は皮膚反応を示す。

図 7 から明らかになったことは、42 keV/ μ m と 77 keV/ μ m の炭素線で少数分割照射すると治療効果比が 1 を超すことである。20 keV/ μ m 以下の低い LET 炭素線の治療効果比は 1 を超えなかった。因に 42 keV/ μ m と 77 keV/ μ m は拡大ブラッグピーク内であり、20 keV/ μ m 以下は入射平坦部にある。従って、拡大ブラッグピーク炭素線の少数分割は、皮膚早よりも腫瘍に対してより強い効果をもたらすと言える。腫瘍と皮膚の間における RBE の違いが起因するところは、炭素線損傷の修復能や低酸素/酸素効果などが考えられる。これらについては別途に報告してある^{3,4)}。



分割照射回数

図7 生物学的治療効果比

図6から腫瘍と皮膚それぞれの炭素線RBEを求め、RBEの比(腫瘍のRBE/皮膚のRBE)を計算して、ここの縦軸にとった。

2. 炭素線照射による発ガン⁵⁾

上記実験のうち皮膚照射で用いたマウスを長期観察すると半年後以降に発ガンが見られた(図8)。これを解析したところ、組織学的には96%が悪性腫瘍であり、殆どは肉腫であった。線量-効果関係から得た炭素線の発ガンRBEは2.2であり、発ガン個体が照射早期(一ヶ月)に生じた皮膚反応RBEの1.9に近い値であった。

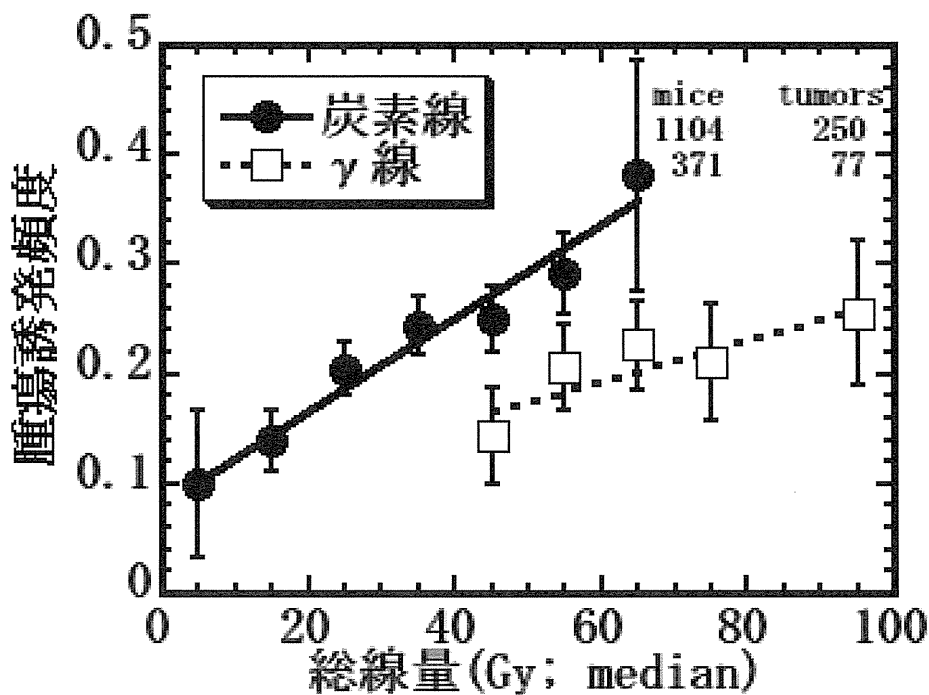


図8 放射線誘発腫瘍

炭素線照射した1104匹のうち250匹に、またγ線照射した371匹のうち77匹に腫瘍が誘発された。

この解析では炭素線の LET、線量、分割照射回数などが異なる個体をグループ化して用いたため、新たにより単純化した発ガン照射実験が望ましい。そこで、LET を3種類、照射回数を1回、同一実験群の個体数を50匹、とした実験を行って、現在データを得つつある。

暫定的結果から見ると、正常組織が照射される低 LET(15 keV/μm)炭素線の発ガン RBE は1よりも小さいことが明らかになってきている。高い LET では RBE が1より大きくなるが、用いた LET の中で最大の 75 keV/μm 炭素線で RBE は約 1.5 であり、決して大きな値ではない。低 LET 炭素線で発ガンが低い理由は不明であるが、発ガンは標的細胞の生存確率と発ガンポテンシャルの積で決まることから考えると両因子のいずれの一つないし双方が低いのではなかろうか。炭素線発ガンに関する今後の研究発展に期待したい。

おわりに

マウスを用いた研究により、炭素線の少数分割照射が有用であることが判明した。また、照射後の発ガンについても炭素線 RBE が決して大きいものではないことが明らかになりつつある。今後、更なる生物研究により、重粒子線治療が発展することを信じている

引用文献

- 1) Koike, S., Ando, K., Uzawa, A., Takai, N., Furusawa, Y., Oohira, C., Aoki, M., Monobe, M., Lee, R., Suzuki, M. and Nojima, K.: Radiation Protection Dosimetry 99, No.1-4, 405-408 (2002)
- 2) Koichi Ando, Sachiko Koike, Akiko Uzawa, Nobuhiko Takai, Takeshi Fukawa, Yoshiya Furusawa, Mizuho Aoki and Yasuyuki Miyato : Journal of Radiation Research 46, 51-57 (2005)
- 3) K. Ando, S. Koike, C. Ohira, Y.-J. Chen, K. Nojima, S. Ando, T. Ohbuchi, N. Kobayashi, W. Shimizu and M. Urano. : Int. J. Radiat. Biol. 75(4), 505-512 (1999)
- 4) Koichi Ando, Sachiko Koike, Akiko Uzawa, Nobuhiko Takai, Takeshi Fukawa, Yoshiya Furusawa, Mizuho Aoki and Ryoichi Hirayama. : Journal of Radiation Research 47, 167-174 (2006)
- 5) Koichi Ando, Sachiko Koike, Chisa Oohira, Toshiaki Ogiu and Fumio Yatagai. : Journal of Radiation Research 46, 185-190 (2005)

特別講演

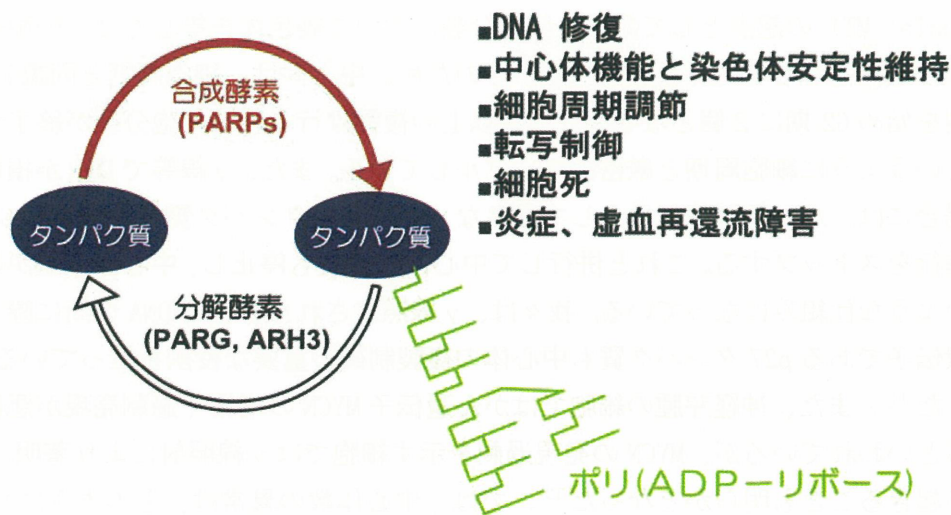
ポリ ADP-リボシル化反応

長浜バイオ大学
バイオサイエンス学部
三輪 正直

1. はじめに：

我々の生命活動を支えているのは、遺伝子により指令されて合成されるタンパク質であるが、タンパク質はそのままでは十分機能せず、タンパク質にリン酸化、アセチル化、メチル化などの比較的 low molecular weight の化合物が結合することにより本来の機能を示す場合が多い。このようにタンパク質が作られてから別の化合物が結合することを翻訳後修飾と呼んでいる。ポリ ADP-リボシル化反応もそのような翻訳後修飾に携わる分子の一つである。この反応は、ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARPs) が NAD^+ を基質として用いる酵素反応であり、その特徴は、結合するポリ (ADP-リボース) 分子は短いものでも分子量として 700 程度から、長いものは、18 万に及ぶものまで実に多様であることである¹⁾ (図 1)。ゲノム情報が明らかになったおかげで PARP には、現在までに、18 種類のファミリーが知られるようになり、その機能も多岐にわたると推定されている (図 1)。

ポリ ADP-リボシル化 の役割



“プロテオモディフィコミックス (PMM) への展開”

図 1 翻訳後修飾の一つポリ ADP-リボシル化反応の役割。PARPs, poly(ADP-ribose) polymerases; PARG, poly(ADP-ribose) glycohydrolase; ARH3, ADP-ribose-(arginine) protein hydrolase 3; PMM, proteomodificomics.

2. ポリ ADP-リボシル化阻害剤の抗がん効果増強

古典的なメンバーとしての PARP-1 は、細胞内では殆どが核画分に存在することから、核内でのイベントに関与すると考えられて来た¹⁾。特に DNA の切断端が PARP-1 を活性化することにより、DNA 修復へ関与、特に塩基除去修復に関与するとされる。そのため、PARP 阻害剤は、放射線などの DNA 傷害性抗がん剤の効果増強剤として使用できるのではないかと考えられてきた²⁾。実際、動物実験レベルで PARP 阻害剤の benzamide や 3-aminobenzamide が Ehrlich の腹水乳がん細胞に対する、ブレオマイシンの抗がん作用を増強した^{3) 4)}。また、最近、より強力な阻害剤である AG14361 やその誘導体の AG14669 が英国で開発され、メチル化抗がん剤の temozolomide との併用の悪性メラノーマに対する臨床第 2 相試験が進行中である⁵⁾。家族性ヒト乳がんで見いだされたがん抑制遺伝子の BRCA 遺伝子は、相同組み換え (homologous recombination) に必要な遺伝子である。そのため、BRCA が変異を起こしているがん細胞では、相同組み換えが出来ず、さらに PARP 阻害剤による 1 本鎖切断の塩基除去修復も抑えることが出来る。そうすると、DNA 複製フォークが、たまたま 1 本鎖切断を持つ部位にきた際には、修復不可能な 2 本鎖切断が生じる結果となり、がん細胞が死ぬことになる。抗がん剤を使用すること無く、PARP 阻害剤だけで BRCA に変異を持つがんの治療が可能になるという訳である⁶⁾⁷⁾。しかし、細胞株の性質による差などを含めて今後さらに詳細な検討が必要である⁸⁾。

3. 中心体と PARP-1

PARP の中でも最も代表的な分子の PARP-1 は、主に核画分に存在するが、我々は、最近 PARP-1 が中心体にも存在することを明らかにした^{9) 10)}。これは、ポリ ADP-リボシル化反応の新しい意義の発見ではないかと考えている。中心体は、細胞骨格を形成する微小管 (microtubule: MT) の起点として働き、細胞分裂において染色体を等しく 2 つの娘細胞に分配する際の紡錘体極として働くものである。そのため、中心体は、細胞周期と同調し、G1/S 期より複製を始め G2 期に 2 個となるが、それ以上の複製は行なわず細胞分裂が終了すると 1 個となるというように細胞周期と厳密にカップルしている。また、 γ 線等で DNA が損傷され切断された場合には、がん抑制遺伝子として有名な p53 や p21 タンパク質が増加して G1/S への細胞周期進行をストップする。これと併行して中心体の複製も停止し、中心体の数がむやみに増加しないような仕組みになっている。我々は、 γ 線照射された細胞で DNA 切断に際して他のがん抑制遺伝子である p27 タンパク質も中心体の複製制御の重要な役割を担っていることを明らかにした¹¹⁾。また、神経芽腫の細胞ではがん遺伝子 MYCN の増幅や過剰発現が悪性化に関わっているといわれているが、MYCN の発現過剰を示す細胞では γ 線照射により著明な中心体数の異常が起きることも明らかとなった¹²⁾。では、中心体数の異常は、どのようにがんに関わっているのでしょうか？

4. 中心体機能異常と発がんに関する Boveri の仮説

1914 年、Boveri は、悪性腫瘍で特徴的に見られる細胞極性の消失や染色体の異数性 (Aneuploidy) は、中心体の機能異常によって起きるとの仮説を提唱した¹³⁾。確かに、中心体が染色体の分配に関与しているならば、その異常は細胞における染色体の異数性を示すことが容易に考えられる。事実、多くのがん細胞では染色体の異数性が、認められており、最近中

心体の数の異常もかなりの数のがんが報告されてきた。私どもも最近、成人 T 細胞白血病でも中心体の異常を認め報告した¹⁴⁾。中心体異常や染色体の異数性は、発がんの原因なのか結果なのかはいまだ不明であるが、染色体の異数性と中心体の数の異常はがん細胞の一つの大きな性質であることは意外と忘れられているのではないだろうか？

前述のように、中心体に PARP-1 が存在するのであれば、中心体でもポリ ADP-リボシル化反応が起きていないだろうか？ポリ (ADP-リボース) に対するモノクローン抗体を用いて、中心体にもポリ ADP-リボシル化された物質が存在することも明らかにした。これらの中心体におけるポリ ADP-リボシル化の意味は何であろうか？PARPs の阻害剤 3-aminobenzamide を添加して 1 週間培養したマウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) においては、3 個以上の中心体を持つ異常な細胞が 60% を占めるようになった。これらの異常な数の中心体 (中心体増幅) は、正常中心体が分断されたものではなく、ポリ ADP-リボシル化の阻害により中心体の異常な複製が起きたものであることも確かめられた。PARP-1 の活性低下が中心体数の異常をおこす可能性をさらに確かめるため PARP-1 のノックアウトマウスの胎生 13.5 日の初代培養の MEF を調べたところ、PARP-1 ノックアウト細胞 (PARP-1^{-/-}細胞) では、27-32% が、異常な中心体を示し、これは、PARP-1 が正常な細胞の 0-3% に比べて明らかに高い値であった¹⁰⁾。PARP-1^{-/-}細胞で起きている中心体複製の異常は、染色体の分配にも影響を与える可能性がある。そこで、PARP-1^{-/-}細胞の染色体のパターンを FACS により調べたところ、2N と 4N のピークに加えて、8N、1N、3N といった異常な DNA 量をもつ細胞のピークが観察された。現在のところ、PARP-1 の活性低下がどのようにして中心体の複製異常をおこすかのメカニズムは不明であるが、PARPs が染色体の安定性を維持するために重要であると考えられる。

5. ポリ (ADP-リボース) の分解反応から見た細胞死、がん治療における役割

ポリ ADP-リボシル化反応は、ダイナミックに合成と分解反応のバランスの上で種々の細胞機能に関係していると考えている (図 1)。そこで分解反応が重要な役割を果たしていることが考えられる。現在までに、ポリ (ADP-リボース) 分解に関する酵素としては PARG が知られており、PARG を欠失した場合における個体の影響を調べる為に、我々は動物レベルで初めてとなった PARG 遺伝子ノックアウトショウジョウバエの作成に成功した¹⁵⁾。このハエは、普通の培養温度 (25°C) では羽化できず温度を 29°C にあげると初めて羽化してくる。さらに、神経症状を呈し、運動が鈍く飛ぶことが出来ない。調べてみると脳の細胞においてポリ ADP-リボシル化物質の蓄積と細胞死が観察された。また、この後で作出された PARG ノックアウトマウスは胎生致死を呈すると報告されている¹⁾。これらの結果は PARG が細胞機能維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。この考え方を支持する知見として最近、PARG 阻害剤を抗がん剤と併用することにより抗がん作用を増強するという知見が出ており、新たなターゲットとして興味を持たれている。例えば PARG 阻害剤として、*N*-bis-(3-phenyl-propyl)-9-oxo-fluorene-2,7-diamide が temozolomide との併用により temozolomide に耐性になったがんに対しても有効であると発表している¹⁶⁾。

6. おわりに

タンパク質の翻訳後修飾という基礎的な研究分野が発がんや、制がんの分野と結びつきつ

ある。従来からの DNA 修復における役割に加えて、中心体機能を介しての染色体の安定性への関与という新しい観点が加わった。染色体の異数性を来す場合は、多くの場合細胞死を誘導しこれは一方ではがん治療一つの方向として見直されてよいのではないだろうか？今回は、ポリ ADP-リボシル化というタンパク質の一つの翻訳後修飾についてのみ考察したが、リン酸化、アセチル化、メチル化などの多くの翻訳後修飾が存在し、それらはお互いに拮抗または協調して働いている。このような翻訳後修飾間の相互作用の総合的研究 (Proteomodificomics)¹⁾ の面からのがん治療への貢献が期待される。

7. 引用文献

- 1) 三輪正直、益谷美都子：生化学, 78, 1050-185 (2006).
- 2) F. Althaus and H. Richter: Mol. Biol. Biochem. Biophys. 37, 1-237 (1987).
- 3) H. Kawamitsu, M. Miwa, et al.: J. Pharmacobiodyn. 5, 900-904 (1982).
- 4) H. Sakamoto, H. Kawamitsu, et al.: J. Antibiot. (Tokyo), 36, 296-300 (1983).
- 5) C. R. Calabrese, R. Almassy, et al.: J. Natul. Cancer Inst., 96, 56-67 (2004).
- 6) H. E. Bryant, N. Schultz, et al.: Nature, 434, 913-917 (2005).
- 7) H. Farmer, N. McCabe, et al.: Nature, 434, 917-921 (2005).
- 8) E. Gallmeier and S. E. Kern: Cancer Biol. Ther., 4, 703-706 (2005).
- 9) M. Kanai, M. Uchida, et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 278, 385-389 (2000)
- 10) M. Kanai, Wei-Min Tong, et al.: Mol. Cell. Biol., 23, 2451-2462 (2003).
- 11) E. Sugihara, M. Kanai, et al.: Cancer Res., 66, 4020-4029 (2006).
- 12) E. Sugihara, M. Kanai, et al.: Oncogene, 23, 1005-1009 (2004).
- 13) T. H. Boveri: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, 1-64 (1914).
- 14) T. Nitta, M. Kanai, et al.: Cancer Sci., 97, 836-841 (2006).
- 15) S. Hanai, M. Kanai, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 82-86 (2004).
- 16) L. Tentori, C. Leonetti, et al.: Eur. J. Cancer, 41, 2948-2957 (2005).

分子イメージング基礎研究

放射線誘発核内ドメインの動態

広島大学 原爆放射線医科学研究所
細胞再生学研究分野

田代 聡(Email: ktashiro@hiroshima-u.ac.jp)

1. はじめに

放射線による DNA 二本鎖切断 (DSBs) は、一つでも修復されずに残存すると細胞死にいたる重篤なゲノム損傷である。このため、すべての生物はゲノム損傷を修復し生命の恒常性を維持するゲノム修復システムを有している。DSBs 修復機構の研究は、大腸菌、酵母の遺伝学的・生化学的手法を中心とした解析から進められてきた。ヒト細胞 DSBs 修復機構の解析は 1993 年の RAD51 の同定に始まり、MRE11、NBS1 など次々と新しい DSBs 修復関連タンパク質が同定され、それらの機能解析が精力的に行われている。また、DSBs に応答したヒストン H2AX リン酸化などクロマチンの変化についても次々と新しい知見が報告されている。

ヒト細胞の DSBs 修復機構は、主に損傷部位とその部位と相同な染色体 DNA との間での組換えを用いて DSBs を正確に修復する相同組換え修復機構 (homologous recombinational repair) と、断端を直接融合して修復する末端融合機構 (non-homologous end-joining repair) に分けられる¹⁾。酵母では、主に相同組換えが DSBs 修復に使われるが、高等真核生物では染色体は染色体領域を形成しているため、分裂間期には相同染色体を用いた組換え修復を行うことが困難である。このため、ヒト細胞などの高等真核生物は、複製後で姉妹染色体が隣接している時期を除いて、主に末端融合機構による DSBs 修復を行っていると考えられる。興味深いことに、DSBs の相同組換え修復機構に関与するタンパク質の一部は、放射線照射によるゲノム損傷誘導後に放射線誘発核内フォーカス (Radiation Induced Repair Foci, RIRF) を形成する。さらに、放射線誘発核内フォーカスの形成には DNA 損傷誘導後のヒストンの修飾を含めたクロマチン構造の変化が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。本稿では、まず代表的な DSBs 修復関連核内ドメインである RAD51 フォーカス、MRE11-RAD50-NBS1 フォーカス、および DSBs 修復のみならず他の様々な核機能に関連することが知られている PML ボディについてのこれまでの知見について概説し、次いで放射線誘発核内ドメインの形成機構について討論する。

2. RAD51 フォーカス

RAD51 は酵母からヒトまで保存されている大腸菌 RecA のホモログであり、酵母では減数分裂や DSBs 修復における相同 DNA 組換え機構で中心的役割を果たしている。RAD51 遺伝子破壊マウスは胎生致死であり、また RAD51 欠損 DT40 細胞では染色体切断による細胞死が誘導されるため²⁾、RAD51 は高等真核生物のゲノム修復においても重要な役割を果たしていると考えら

れる。ヒト RAD51 は、RAD51 パラログと呼ばれる XRCC2、XRCC3、RAD51B、RAD51C、RAD51D や RAD52、RPA、BRCA1 などの修復関連タンパク質と結合することが知られている。

RAD51 の核内フォーカス形成は放射線照射後に顕著となり、RAD51 フォーカスを持つ細胞の割合は DNA 損傷誘導後に増加する³⁾。RAD51 の放射線誘発核内フォーカスの形成には、RAD54、XRCC2、XRCC3 が必要であることが明らかにされた。さらに、放射線照射後に RAD51 がフォーカスを形成する部位では、相同組換えの中間体と考えられる一本鎖 DNA も存在することが示された⁴⁾。このため、RAD51 は損傷修復の「場」に形成されると考えられた。しかし、RAD51 は放射線照射をしていない正常細胞で S 期から G2 期にかけても核内フォーカスを形成することから⁵⁾、Rad51 フォーカスが実際に相同組換え修復を行っている場なのか、それとも単に Rad51 およびその関連タンパク質が貯蔵されている部位なのかは不明であった。我々は、紫外線パルスレーザーと Bromodeoxyuridine によるクロマチン標識法を組み合わせることにより、核の限局した領域に DSBs を誘導する系を確立し、RAD51 が実際に DNA 損傷を含む部分に集積しフォーカスを形成すること、およびこの領域に一致して組換え修復の中間産物であると考えられる一本鎖 DNA が形成されていることを確認した⁶⁾。更に、DNA 損傷を誘導していない細胞にみられる S 期フォーカスの一部は DNA 複製後クロマチンと共局在しており、RAD51 フォーカスの一部は複製後 DNA 組換え修復タンパク質複合体であると考えている。また、RAD51 は、S 期に認められる RAD51 フォーカスから DNA 損傷部位へリクルートされていることも明らかになったため、RAD51 フォーカスには、DNA 修復を行っているフォーカスと前述したクロマチン間領域に貯蔵されている RAD51 が形成するフォーカスの 2 種類が存在すると考えられる。

一方、GFP で標識された RAD51、RAD52、RAD54 の安定発現細胞株を用いた研究により、RAD51 は安定的に RAD51 の放射線誘発核内フォーカスに結合しているが、RAD52 と RAD54 は速やかな入れ替わりをしていることが示された⁷⁾。このような生細胞実験系を用いた修復関連タンパク質の解析法は、ゲノム修復機構を解明する上での新しいツールとして注目されている。

3. MRE11-RAD50-NBS1 フォーカス

MRE11、RAD50 および NBS1 (酵母では Xrs2) からなるタンパク質複合体である MRN 複合体は、ゲノム損傷のセンシングから DSBs 修復の相同組換えおよび末端融合によるゲノム修復機構の両方に係わっているとされている⁸⁾。MRE11 と RAD50 は酵母からヒトまで保存されているが、Xrs2 は保存されておらず、高等真核生物では NBS1 が Xrs2 の機能的なホモログとされている。実際、ニワトリ DT40 細胞を用いた NBS1 欠損細胞の解析から NBS1 が相同組換え修復に必須であることが示されている⁹⁾。MRE11 は、DNA nuclease、strand-dissociation および strand annealing 活性を持ち、また RAD50 は DNA 断端に結合し MRE11 の nuclease 活性の制御を行っていると考えられている。一方、NBS1 は、MRN 複合体全体の活性調節に係わっているとされている。

MRE11 は、当初核内ドメインを形成しないと考えられていたが、細胞固定前に界面活性剤処理をほどこすことにより、MRE11 は損傷誘導前には PML ボディと一致するフォーカスを形成していること、DNA 損傷誘導後 10 分までにゲノム損傷部位に核内フォーカスを形成することが明らかになった¹⁰⁾。また、RAD50 や NBS1 も同様に放射線誘発核内フォーカスを形成することが知られており、MRE11 フォーカスには、BRCA1 や BLM などの DNA 修復関連タンパク質が様々な条件下で共局在することが報告されている¹¹⁾。さらに、MRE11 フォーカスは、S 期に染色体

テロメアに局在することが示され、テロメアの維持にゲノム修復関連タンパク質が関わっている可能性が示唆されている¹²⁾。

4. PML ボディ

PML は、急性前骨髄球性白血病の疾患特異的染色体転座 15;17 転座の転座点からクローニングされ、高等真核生物のほぼすべての細胞で PML ボディと呼ばれる直径 300nm - 1 μ m の核内ドメインを数個から数十個形成することが知られている¹³⁾。PML タンパク質は、細胞死誘導経路に関わっていることが示されているが、PML ボディには p53 や CBP をはじめ遺伝子転写調節、細胞死、ゲノム修復などさまざまな核機能に関連するタンパク質が集積している。このため、PML タンパク質が形成する PML ボディは細胞死誘導のみならずさまざまな核機能に関わっているとされているが、その詳細は不明である¹³⁾。

PML は、SUMO 化修飾という翻訳後修飾を受ける。PML の SUMO 化修飾は、PML ボディを構成するタンパク質をリクルートするために必要であるとされ、また PML ボディに集積するタンパク質も SUMO 化される。さらに、最近 PML は、SUMO 化修飾を受ける領域だけではなく、SUMO 修飾を受けた他のタンパク質に結合するために必要な領域を持つことが示され、これらの領域が PML ボディの形成に必要であることが示された¹⁴⁾。

PML ボディの構成タンパク質は、常に PML ボディ内に存在するのではなく、さまざまな刺激により集積と離散を繰り返す。さらに、PML ボディ自体も、さまざまなストレスにより分裂や融合する。特に、DSBs が誘導された場所の近くに存在する PML ボディは、分裂し、数時間後には DSBs を含む場所に局在する¹⁵⁾。このため、PML ボディの DSBs 修復における役割が注目されている。

5. 放射線誘発フォーカス形成のメカニズム

これら、ゲノム修復関連タンパク質が形成する放射線誘発フォーカス形成、すなわちどのような機構でゲノム損傷部位にこれらのタンパク質が集積してくるのであろうか？最も考えやすいのは、損傷を受けたクロマチンがなんらかの形で標識され、ゲノム修復関連タンパク質がこの標識された場所にリクルートされるという仕組みである。ゲノム損傷を受けたクロマチンの変化としては、損傷誘導によりリン酸化されたヒストン H2AX が形成する γ -H2AX フォーカスが知られている¹⁶⁾。ヒストン H2AX はヒストン H2A のバリエーションであり、ヒストン H2AX 遺伝子破壊マウスは DNA 損傷に対してゲノム不安定性を示し¹⁷⁾、またリン酸化部位に変異を導入したヒストン H2AX を発現する細胞では、野生型と比較して DNA 損傷後の組換え効率が低下するとの報告もあり¹⁸⁾、ゲノム修復にリン酸化を含めてヒストン H2AX が何らかの形で関わっていると考えられている。また、H2AX のリン酸化は、NBS1、BRCA1、53BP1 などの初期の修復タンパク質のリクルートには必要ないが、DSBs 損傷部位に集積した修復タンパク質が形成するフォーカスの維持に必要である¹⁸⁾。

一方、ゲノム損傷におけるクロマチン構造変化に TIP60 や INO80 などのヒストン修飾因子が関わっていることが最近明らかになってきている¹⁹⁾。さらに酵母では、DNA 損傷部位近傍のクロマチンからヒストンが放出され、このことが組換え修復に関連する RAD51 の損傷領域への結合に必要であることが明らかになった²⁰⁾。このようなゲノム損傷部位でのヒストン修飾やヒ

ストン放出などによるクロマチンの構造変化は、放射線誘発フォーカスの形成に深く関わっていると考えられる。

5. おわりに

放射線によるゲノム損傷の生物学的評価には、現在主に染色体分析が用いられている。しかし、染色体異常は、細胞が DNA 損傷の修復に失敗しさらに細胞分裂期に入った場合に形成されるため、細胞が受けたゲノム損傷の量を直接評価することにはなっていない。さらに、代表的な染色体解析であるギムザ分染法は熟練を要する上に非常に手間と時間がかかり、また新しい染色体解析法である Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 法も高度な技術と時間が要求されるため、医療の現場では迅速かつ簡便に DNA 損傷を評価するシステムの開発が求められている。一方、免疫蛍光抗体法を用いたゲノム修復関連タンパク質により形成される核内フォーカスの検出では、間期核でのゲノム損傷を直接評価することが可能であり、またその手法も染色体解析や FISH 法と比較して簡便かつ迅速に行える。さまざまなゲノム修復関連タンパク質が形成する放射線誘発核内フォーカス間の共局在のパターンが非常に多様であり、共局在するとされるタンパク質が形成するフォーカスでも 100%の共局在を示すものは少なく、また共局在しているタンパク質の量もまちまちである (図 1)。この理由としては、これらのタンパク質は非常にダイナミックに核内を移動しており、一定の条件下でのみ共局在を示していることが考えられる。また、それぞれのフォーカスで営まれている DNA 修復の段階の違い、あるいは DNA 損傷の質と量の違いによりゲノム修復に用いられる機構が異なることが考えられる。逆に考えれば、これらの放射線誘発核内ドメインの形成パターンはゲノム損傷の量および質を反映している可能性が示唆される。このため、染色体解析とともに放射線誘発核内フォーカスの局在パターンの解析などを組み合わせて用いることで、より迅速で正確な放射線障害によるゲノム損傷の評価が可能になると考えられる。

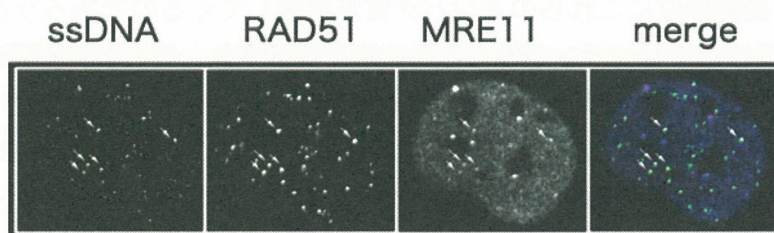


図 1 放射線誘発核内フォーカスの共局在

ヒト繊維芽細胞に 12 Gy ガンマ線照射をした 24 時間後に細胞を固定し、RAD51 (緑)、MRE11 (青) および DSBs 修復のために形成された一本鎖 DNA (ssDNA) (赤) を免疫蛍光抗体法を用いて検出した。矢印で示した放射線誘発核内フォーカスのみが、RAD51、MRE11、ssDNA の 3 者が共局在を示す。

引用文献

1. D. C. van Gent, J. H. Hoeijmakers, *et al.* *Nat Rev Genet*, *2*: 196–206, (2001).
2. E. Sonoda, M. S. Sasaki, *et al.* *Embo J*, *17*: 598–608, (1998).
3. T. Haaf, E. I. Golub, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*: 2298–2302, (1995).
4. E. Raderschall, E. I. Golub, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*: 1921–1926, (1999).
5. S. Tashiro, N. Kotomura, *et al.* *Oncogene*, *12*: 2165–2170, (1996).
6. S. Tashiro, J. Walter, *et al.* *J Cell Biol*, *150*: 283–291, (2000).
7. J. Essers, A. B. Houtsmuller, *et al.* *Embo J*, *21*: 2030–2037, (2002).
8. D. D’Amours and S. P. Jackson. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*: 317–327, (2002).
9. H. Tauchi, J. Kobayashi, *et al.* *Nature*, *420*: 93–98, (2002).
10. O. K. Mirzoeva and J. H. Petrini. *Mol Cell Biol*, *21*: 281–288, (2001).
11. Y. Wang, D. Cortez, *et al.* *Genes Dev*, *14*: 927–939, (2000).
12. X. D. Zhu, B. Kuster, *et al.* *Nat Genet*, *25*: 347–352, (2000).
13. G. Dellaire and D. P. Bazett-Jones. *Bioessays*, *26*: 963–977, (2004).
14. T. H. Shen, H. K. Lin, *et al.* *Mol Cell*, *24*: 331–339, (2006).
15. G. Dellaire, R. W. Ching, *et al.* *J Cell Biol*, *175*: 55–66, (2006).
16. E. P. Rogakou, C. Boon, *et al.* *J Cell Biol*, *146*: 905–916, (1999).
17. A. Celeste, S. Petersen, *et al.* *Science*, *296*: 922–927, (2002).
18. A. Celeste, O. Fernandez-Capetillo, *et al.* *Nat Cell Biol*, *5*: 675–679, (2003).
19. H. van Attikum and S. M. Gasser. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*: 757–765, (2005).
20. T. Tsukuda, A. B. Fleming, *et al.* *Nature*, *438*: 379–383, (2005).

放射線治療のサポートを目的とする磁気共鳴ファンクショナルイメージング法の開発

放医研 重粒子医科学センター 粒子線生物研究グループ

松本謙一郎 (E-mail : matsumok@nirs.go.jp)

X線などの線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer : LET) の低い放射線によく知られている酸素効果は、X線や γ 線による低酸素腫瘍の治療に際して非常に厄介な存在である。最近の研究から、高LET放射線である重粒子線でさえ、LETに依存して小さくなるものの完全には無くならず、2倍程度以下ではあるがわずかに酸素効果があることが明らかになってきた。重粒子線は既ががん治療に使われているが、その作用機序の詳細に至っては未だに不明な点も多く、重粒子線照射前後の組織の状態や機能の変化を評価できる方法の確立が急がれる。

生体に放射線を照射すると生体組織内に生じた活性酸素種に起因して様々な酸化還元 (レドックス) 状態の変化が起こると考えられている。また放射線による組織細胞への障害とその後の回復の過程は、組織での酸素消費量に大きな変化を与えると予想され、それに基づく組織内の酸素濃度の変化が組織のレドックス状態に大きな影響を与えている可能性がある。安全かつ効率的に癌の放射線治療を行うためには、癌組織や周囲の正常組織の状態に応じた適切な放射線照射計画を行うことが重要である。例えば、組織中のレドックス状態あるいは酸素濃度 (酸素分圧) などの情報を治療の前後で測定し、その情報に従って放射線に対する増感や防護など適切な処置を施していくことが必要と思われる。特に重粒子線治療においては、周囲の組織への影響などが十分に理解されていない部分が多く残っており、これらの基礎情報の収集が今後の治療効果および予後の向上に大きく貢献するであろう。

組織内の酸素濃度は、酸素効果に基づく放射線増感に深い関わりをもつ。一方、組織内のレドックス状態は、ニトロキシラジカルを用いた正常組織に対する放射線防護に深く関わっている。しかし組織内の酸素濃度とドックス状態は、放射線の総合的な作用を考える上では互いに密接に関連する重要な情報である。組織中酸素濃度の測定と組織中レドックス状態の測定を目的として、これまでに様々な方法が開発されてきた。そこで最近までに開発されてきた幾つかの方法とその開発の経緯を紹介する。

電子常磁性共鳴 (Electron Paramagnetic Resonance: EPR)、別名電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance: ESR) は、電子スピンによるマイクロ波の共鳴吸収を観察する磁気分光学的な手法である。EPRの測定対象は、分子中の不対電子 (遊離基、フリーラジカル) あるいは結晶中の自由電子で、これらを持つ物質をフリーラジカル種とか後者も含めた広い意味で常磁性種と呼んでいる。分子状酸素は最外殻に不対電子を二つもっているので、一種のフリーラジカル種であり、すなわち常磁性種である。EPRオキシメトリー (酸素濃度測定法) は、組織内の酸素濃度を非破壊・無侵襲かつ定量的に測定できる唯一の方法で、リチウムフタロシアニ (LiPc) やトリアリルメチル (TAM) ラジカルなどの比較的安定な常磁性種をプローブとして測定を行う。常磁性プローブと酸素分子上の電子スピン同士の衝突によって、電子スピンの緩和時間が変化し、常磁性プローブのEPRスペクトルの線幅が変化する。EPR線幅

の変化と酸素濃度との間には直線的な関係があり、予め作成した検量線によって酸素濃度を定量的に測定することが可能となる (Fig. 1)。

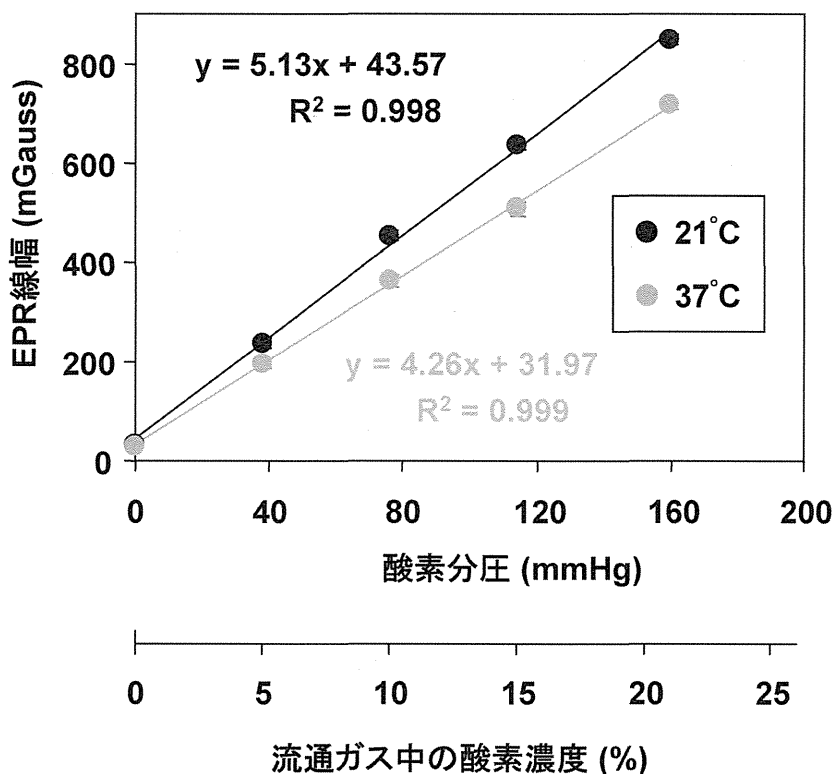


Fig. 1. LiPc の EPR 線幅と pO_2 の関係。LiPc クリスタルをガス透過性のテフロンチューブに取り、テフロンチューブ内を PBS で満たした。LiPc クリスタルが直径 7 mm のサーフェイコイルリゾネーターの中心にくるように試料を固定し、試料およびリゾネータをプラスチック製のチューブで覆った。21%、15%、10%、5%、1.25%、および 0% の酸素を含むガスを 700 mL/min で 30 分以上チューブ内に流通し、ガス流通下、EPR スペクトルを測定した。EPR 測定条件は、マイクロ波周波数 700 MHz、磁場掃引速度 0.25 mT/sec、時定数 0.003 sec、磁場変調周波数 13.5 kHz で、マイクロ波出力 (0.005–0.3 mW) と磁場変調幅 (0.01–0.07 mT) は、EPR 線幅に従って随時最適値に調整した。試料の温度を 37°C に制御した場合 (灰) と室温 (およそ 22°C) (黒) での違いは、37°C と 22°C での水への酸素の溶解度の違いにほぼ一致する。

LiPc などの個体常磁性プローブを動物の組織に植え付けし、サーフェイルコイル型共振器等を使ってその EPR スペクトルを測定すれば、その線幅から組織の酸素濃度を知ることができる¹⁾。大腿部筋肉組織内および腹部乳腺周囲の脂肪組織内に LiPc を植え付けたマウスにカルボジェン (酸素 95% : 二酸化炭素 5% の混合気体) を吸わせた時、筋肉組織の酸素濃度は比較的速やかに上昇して 40 分程度でプラトーに達するのに対し、脂肪組織の酸素濃度は 60 分までゆっくりと上昇し続けた。更に、60 分経過した時点で吸入するガスをカルボジェンから空気に切り替えると、筋肉組織の酸素濃度は 10 分以内にもとのレベル付近まで低下するのに対し、脂肪組織の酸素濃度は 30 分以上掛けてゆっくりと低下した (Fig. 2)。また別の実験では、LiPc を移植した肢の付け根をゴムで縛って駆血すると、筋肉組織の酸素濃度は急

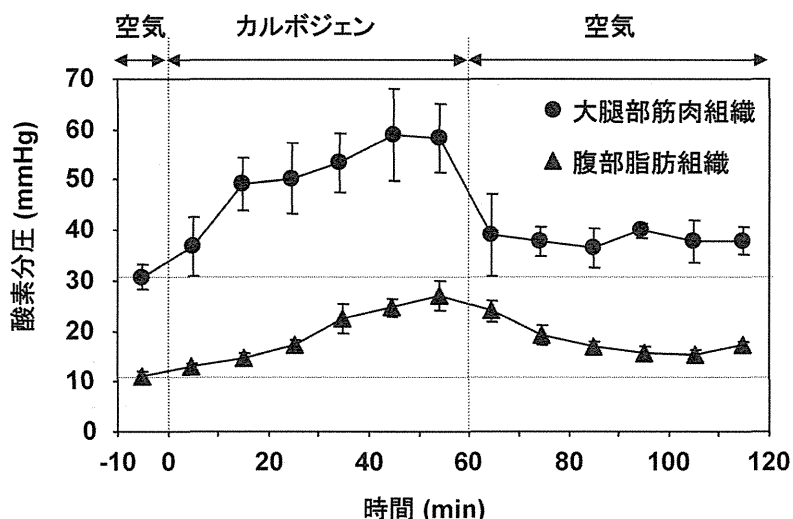


Fig. 2. カルボジェン吸入前、吸入中、吸入後の筋肉組織内と脂肪組織内の酸素分圧の変化。数値は3匹のマウスの平均値±SEで示した。

激に低下し、5分以内に2 mmHg以下のレベルまで下がった。ゴムを取り除くと、筋肉組織の酸素濃度は徐々に上昇し、40分程度でもとよりもいくらか高いレベルまで達した。ここでマウスを頸椎脱臼により屠殺すると、筋肉組織の酸素濃度は再び急激に低下し、5分以内に2 mmHg以下のレベルまで下がった (Fig. 3)。すなわち血液 (酸素) の供給を止めると、筋肉組織の酸素濃度は急激に低下することが分かった。このことから筋肉組織では酸素の消費が比較的速いことが示唆されると同時に、組織の酸素濃度を考える時には、酸素の供給と消費のバランスを考えることが重要であることが分かった。このような個体常磁性プローブを使った酸素濃度測定は、感度も良くまた非常に再現性も良い。しかしながら測定可能な範囲がプローブを植え付けた一点のみであること、また植え付けに伴う傷の回復を待たなければならないことなどから、腫瘍組織全体の測定あるいはその中から低酸素部位を見つけ出すような目的には適さない。

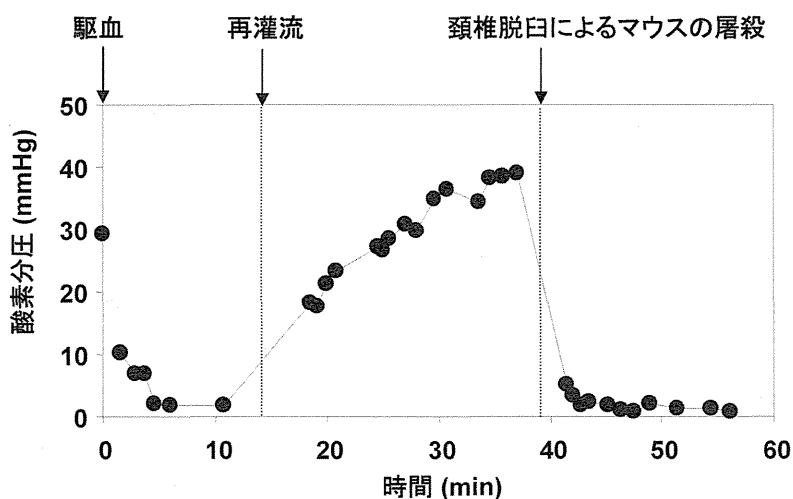


Fig. 3. マウス後肢の付け根をゴムで縛って駆血した後、およびマウスを頸椎脱臼で屠殺した後の大腿部筋肉組織内の酸素分圧の変化。時間0の値は、後肢の付け根を縛る直前に測定した値。

組織全体あるいは前身の酸素濃度測定を行うためには、細い EPR 線幅を有し、体内で安定で、血中に投与可能で全身に行き渡ることができ、且つ毒性の低い常磁性プローブが必要となる。これと画像化技術とを組み合わせ、EPR 線幅に基づく情報をマッピングすることによって、組織の広い範囲にわたる酸素濃度分布を知ることが可能となる。Oxo63 や Oxo31 と呼ばれる毒性の低い TAM ラジカルの開発によって、画像化法と組み合わせた EPR オキシメトリーの応用技術が一気に広がったと言える²⁾。

オーバーハウザー効果 MRI (Overhauser MRI: OMRI) は電子スピンと核スピンの二重共鳴法で、別名を Proton Electron Double Resonance Imaging (PEDRI) とも言う。先ずフリーラジカルと水を含む試料に RF パルス (EPR パルス) を照射し電子スピンが飽和した状態を作り出すと、励起された電子スピンのエネルギー遷移により核スピンのボルツマン分布比が変化し、ここで NMR 信号を観測すると NMR 信号が数百倍に増加する。OMRI の信号強度は電子スピンの緩和機構に強く依存しており、電子スピンの緩和が遅いほど、すなわち使用するフリーラジカルの EPR 線幅が狭いほど強く増強される。OMRI 信号強度は試料中のラジカル濃度にも依存するので、試料中のラジカル濃度が一定と仮定すれば、試料中の酸素濃度が増加すれば電子スピンの緩和速度が速まり OMRI 信号強度が低下する。従って、幾つかの (2 つ以上の) 異なる EPR パルス出力で得た何枚かの画像強度の変化に基づいて、試料中の酸素濃度およびラジカル濃度の両方を定量することが可能となる³⁾。OMRI では、比較的良好な解剖学的画像に重ね合わせて酸素濃度マッピングを得ることが出来る (Fig. 4)。一方、市販の OMRI スキャナーでは 8.1 mT で 226 MHz の EPR パルスを照射した後に 15 mT (625 kHz) で MRI を測定しているのだが、この 15 mT という磁場は通常の MRI と比較すると極端に低い磁場であり、15 mT のネイティブ MRI 画像 (EPR パルス出力 = 0 W、すなわち EPR パルス照射無しの画像) のシグナル/ノイズ比 (SNR) は非常に低いことになる (Fig. 4)。ところが OMRI 画像強度からの酸素濃度の算出には、画像強度の増幅率を求める過程でネイティブ MRI 画像強度が使われる。S/N の悪いネイティブ MRI 画像の強度が計算の分母として使われることによって、結果として得られる酸素濃度マッピングの S/N を低下させてしまう。市販の OMRI で得られる酸素濃度マッピングの精度はおおよそ ±5~10 mmHg 程度であるので、30~40 mmHg 以下と予想される組織中の酸素濃度を評価するには些か厳しいことになる。

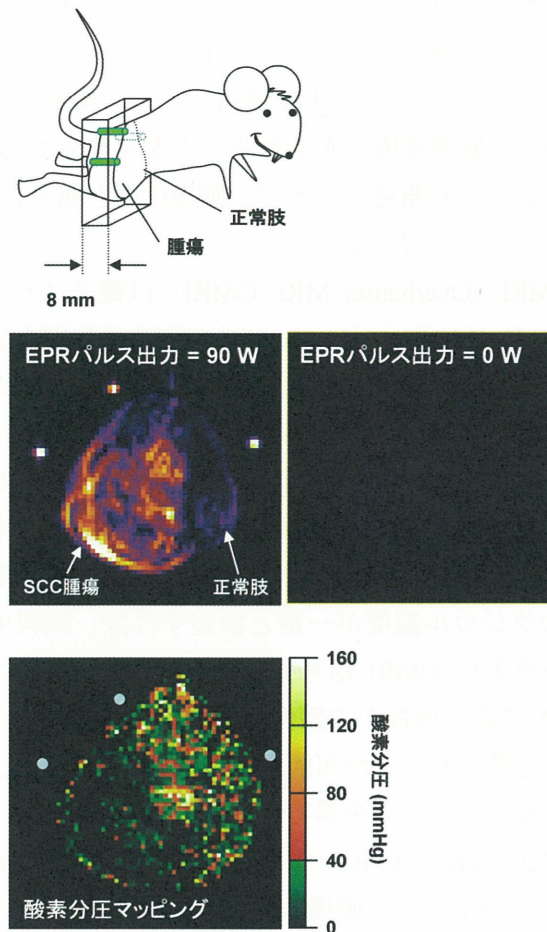


Fig. 4. OMRI オキシメトリー。上図は撮像したマウス大腿部横断面の位置。中左図は、Oxo63 連続投与 (0.75 $\mu\text{mol/g}$ b.w. 単回投与に続いて 0.06 $\mu\text{mol/min/g}$ b.w. 連続投与) 開始から約 35 分後に撮像したハイパワー EPR 照射による OMRI 画像。撮像条件は、TR = 750 ms、TE = 25 ms、 $T_{\text{EPR}} = 500$ ms、EPR power = 90 W、 $N_{\text{EX}} = 2$ 、FOV = 32 \times 32 mm、slice = 8 mm、resolution = 64 \times 64。中右図はネイティブ MRI 像 (EPR power = 0 W)。下図は酸素濃度マッピング。酸素濃度の計算には、ハイパワー画像とネイティブ MRI 像の他に、ローパワー (EPR power = 45 W) 画像が使われた。

そこで酸素濃度マッピングの定量性の向上を図って、パルス EPR による電子スピンの T_2^* に基づく酸素濃度マッピング法が開発された⁴⁾。パルス EPR は、別名フーリエ変換 EPR (FT-EPR)、または時系列 (Time-domain) EPR とも呼ばれる。パルス EPR の画像化には、シングルポイントイメージング (SPI) 法と呼ばれる手法が用いられており、これは別名コンスタントタイムイメージング (CTI) 法とも呼ぶ。パルス EPR における酸素濃度マッピング法は、実はこの CTI 法に基づいたスペクトル空間画像化法 (SSI) が基礎となっている。ある軸 x とそれに直行する軸 y の磁場勾配の大きさを $-G_{\text{max}}$ から $+G_{\text{max}}$ まで、それぞれ n ステップで変化させ、 $n \times n$ 個の FID データを得ることが出来る。得られた FID データを $n \times n \times$ データ点数の k -空間マトリックスに配置し (Fig. 5A)、 x 軸と y 軸の 2 次元フーリエ変換をすると、パルス後の時間に沿ってデータ点数分のコンスタントタイム画像 (あるいはシングルポイン

ト画像) を得ることが出来る。この時点では各コンスタントタイム画像の FOV がパルス後の時間とともに変化しているので、一定の FOV の範囲を抽出し (Fig. 5B)、一定の画素数に置き換えてやればパルス後の時間-空間-空間という 3 次元画像が得られ (Fig. 5C)、画素毎に FID が再校正される。更にパルス後の時間の軸をフーリエ変換すれば、スペクトル-空間-空間 3 次元に置き換わるので、我々はこれを FT-CTSSI と読んでいます。更に z 軸の磁場勾配も変化させれば 4 次元スペクトル-空間データを得ることも可能である。3 次元および 4 次元のスペクトル-空間データからは、それぞれ 2 次元および 3 次元の酸素濃度マッピングを得ることが出来る。

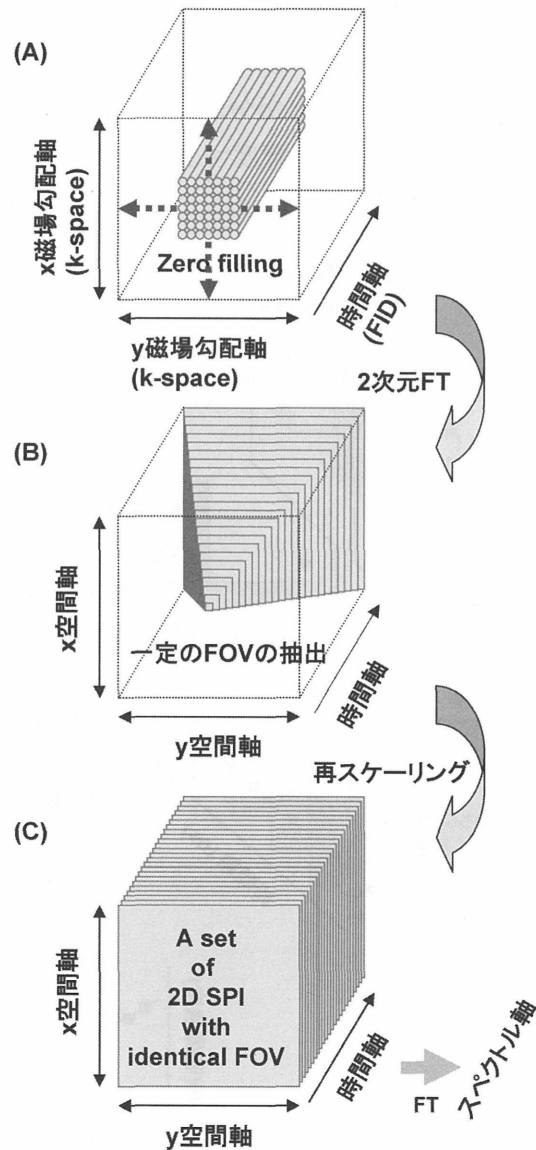


Fig. 5. 3D CTSSI の再構成。(A) 2次元の磁場勾配の組み合わせによって得られた FID データを k-空間に置き、 $2^n \times 2^n$ のマトリックスになるように 0 を外挿する。磁場勾配軸を 2次元フーリエ変換すると、磁場勾配軸は空間軸に変換され、時間軸に沿って FID のデータ点数分の画像が得られる。ここでは各画像の FOV は一定ではなく、時間軸に沿って変化している。 $FOV (cm) = N \cdot 2\pi / (\gamma_e \cdot G_{max} \cdot \tau_p) \times 10^9$ 。ここで N は k-空間のサンプル数 (磁場勾配ステップ数)、 γ_e 電子の磁気回転比 ($1.76 \times 10^7 \text{ s}^{-1}\text{Gauss}^{-1}$)、 G_{max} は最大磁場勾配 (Gauss/cm)、 τ_p はパ

ルス後の時間 (ns)。(B) 一定の FOV のみを抽出すると灰色部のように見える。(C) 全ての画像から一定の FOV の範囲を抽出して、一定の画素数に置き直せば、空間-空間-時間 (FID) からなる 3次元マトリックスが得られる。時間軸をフーリエ変化すれば、スペクトル軸に置き換えることができる。

ところが、パルス後の時間軸に沿って変化しているのは FOV だけではなく、実は画像解像度も変化していることに注意しなければならない。これを補正するためには、幾つかの異なる最大磁場勾配を使って得られた複数のデータセットから、同じ解像度で且つ同じ FOV のデータを抽出し、それらを再編成して新たなデータセットを構成する (Fig. 6)。複数のデータセットを使って EPR 線幅と酸素分圧の検量線を得たとき、0~40 mmHg の酸素分圧の範囲では、 ± 1 mmHg 程度の精度が得られることが分かった (Fig. 7)。Figure 8 は、マウス大腿部に移殖した SCC 腫瘍と正常肢の 3次元酸素濃度マッピングで、腫瘍の中央部に低酸素部位を見ることができた。

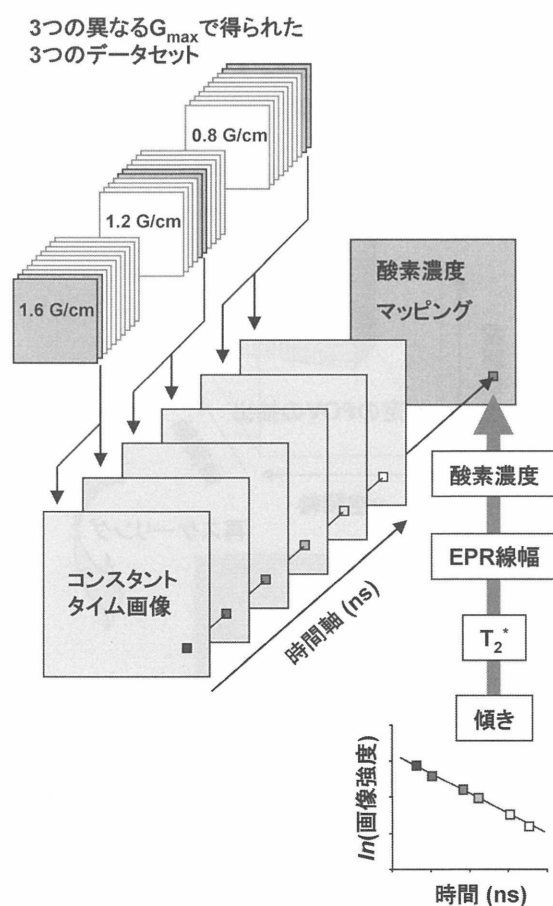


Fig. 6. pO_2 の定量性向上。幾つかの異なる G_{max} で複数の CTSSI データセットを撮像し、それぞれのデータセットから同一 FOV 且つ同一解像度の画像を抽出し、新たに CTSSI 画像セットを再構成する。各ピクセルの画像強度の対数値を時間軸に沿ってプロットし、その傾きから T_{2e}^* 、続いて EPR 線幅が求められ、更に、予め求めておいた検量線によって酸素濃度が得られる。最後に、ピクセル毎に得られた酸素濃度の値を 2次元画像として表示すれば、酸素濃度マッピングが得られる。

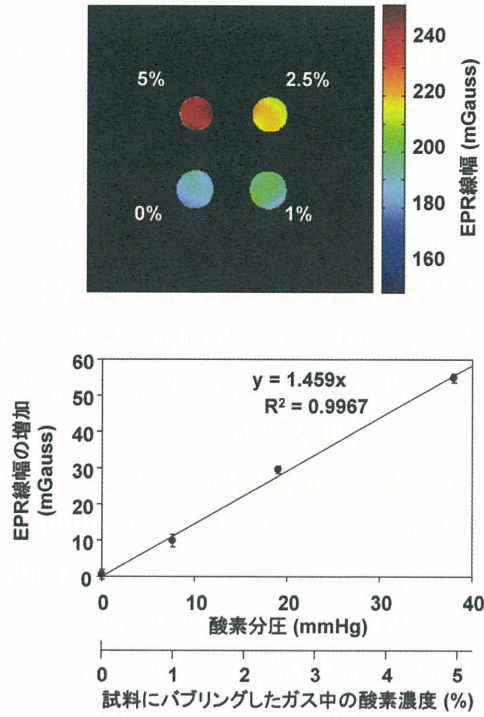


Fig. 7. FT EPR CTSSI 法で得られた EPR 線幅と酸素濃度との関係。(A) FT EPR CTSSI 法で得られた EPR 線幅の 2 次元マッピング。(B) 試料にバブリングしたガス中の酸素濃度に対する EPR 線幅のプロット。値は 374 画素の ROI 内の平均値 \pm SD で示した。

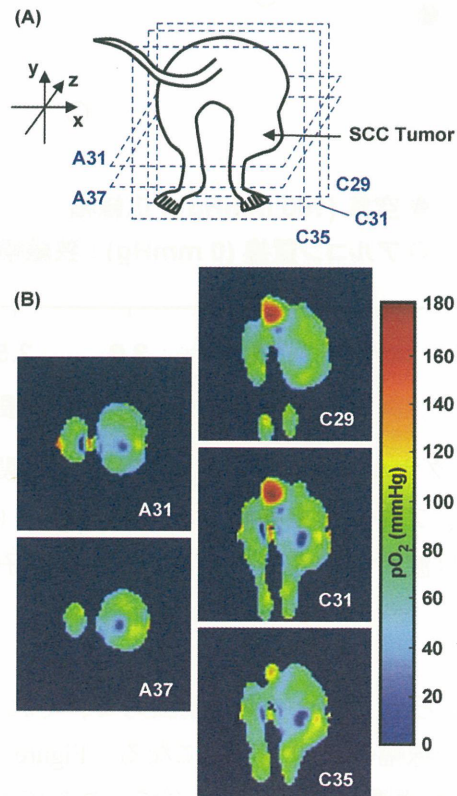


Fig. 8. SCC 腫瘍を移植したマウス大腿部での *in vivo* 3 次元酸素分圧マッピング。(A) マウス大腿部とスライスの関係を示す模式図。3 つの異なる G_{max} (1.5、1.2、0.8 Gauss/cm) を使って、

それぞれ 21^3 の FID データを得た。(B) 3次元画像は 64^3 画素に再構成したので画素解像度は 0.7 mm^3 となるが、FOV が 46 mm で磁場勾配のステップ数が 21 であるので実質の解像度は 2.2 mm である。腫瘍の中央部に低酸素部位を確認できる。

FT-CTSSI による酸素濃度マッピングは非常に定量性に優れているのだが、3次元の酸素濃度マッピングを得るためには、4次元のデータセットを数個得る必要があり、データの処理と保存に莫大なメモリー容量と保存容量を要する。空間解像度の高いデータでは、測定時間は数十秒から数分であるにもかかわらず、データの移動と処理に数時間を要することさえある。腫瘍内の酸素濃度分布の時間的なinhomogeneityが懸念されており、処理速度を速くするための方法を開発することも今後重要となる。

CW EPR では電子スピンの T_1 に基づく酸素濃度マッピング法が考案されている⁵⁾。電子スピンの緩和時間が長く緩和の起こりにくい場合、すなわち EPR 線幅が狭い場合には、マイクロ波の飽和現象が起こりやすくなる。しかし電子スピンの緩和時間が短く緩和が起こりやすい場合、すなわち EPR 線幅が広い場合には、マイクロ波の飽和が起こりにくい。つまり、酸素濃度が低い試料中ではマイクロ波の飽和が起こりやすいが、酸素濃度の高い試料ではマイクロ波の飽和は起こりにくくなる (Fig. 9)。そこで、緩和の起こらないであろう低いマイク

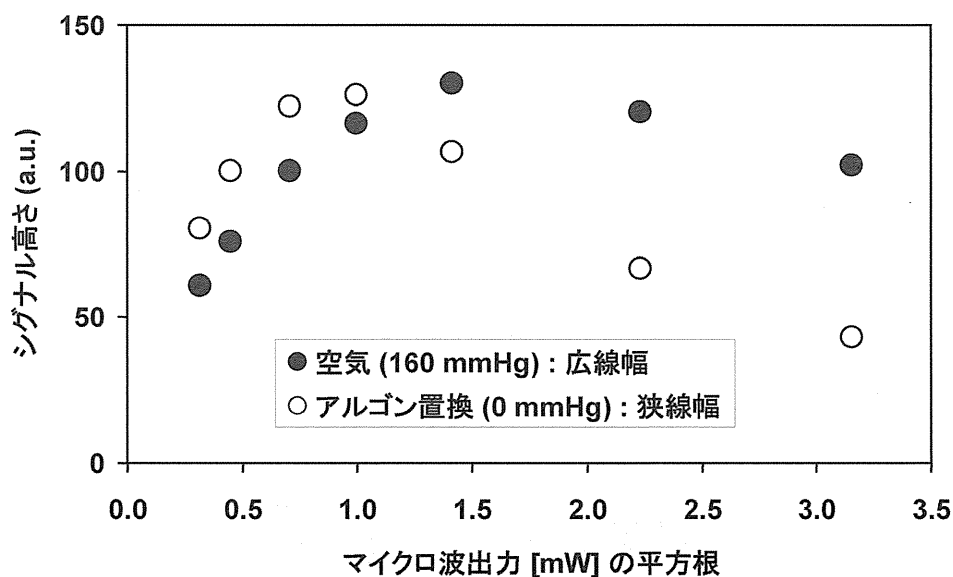


Fig. 9. 2 mM Oxo63 水溶液のシグナル高さとマイクロ波出力との関係。空気と平衡にある試料 ($pO_2 = 160 \text{ mmHg}$) (黒) と、アルゴンで置換した試料 ($pO_2 = 0 \text{ mmHg}$) (白) とでは、アルゴン置換した試料でマイクロ波が飽和されやすい。これは電子スピンの T_1 の変化に基づいている。

ロ波出力と、緩和が起こるのである高いマイクロ波出力で、それぞれ EPR 画像を測定してその画像強度を比較すれば元々の線幅の予測が可能になる。Figure 10 はマウス大腿部に移植した SCC 腫瘍と正常肢の 3次元酸素濃度のマッピングで、ここでも腫瘍の中央部に低酸素部位を見ることができた。CW 法の磁場掃引によるデータ取得では一つのスペクトルを得るのに最短でも 3 秒程度必要となるので、 18×18 個のデータから 3次元の画像を得るとして単純計

算で 16 分 12 秒掛かり、更にマイクロ波出力を変えてもう一つデータを取るのので、酸素濃度マッピングのためのデータ取得には合計で 32 分 24 秒が必要である。しかしその画像処理に掛かる時間は、今やパソコンレベルでも数秒程度である。この方法はパルス EPR の FT-CTSSI 法に比べると、定量性は低くなるものの、原理も比較的解り易くでデータの量も少なく処理も単純である。

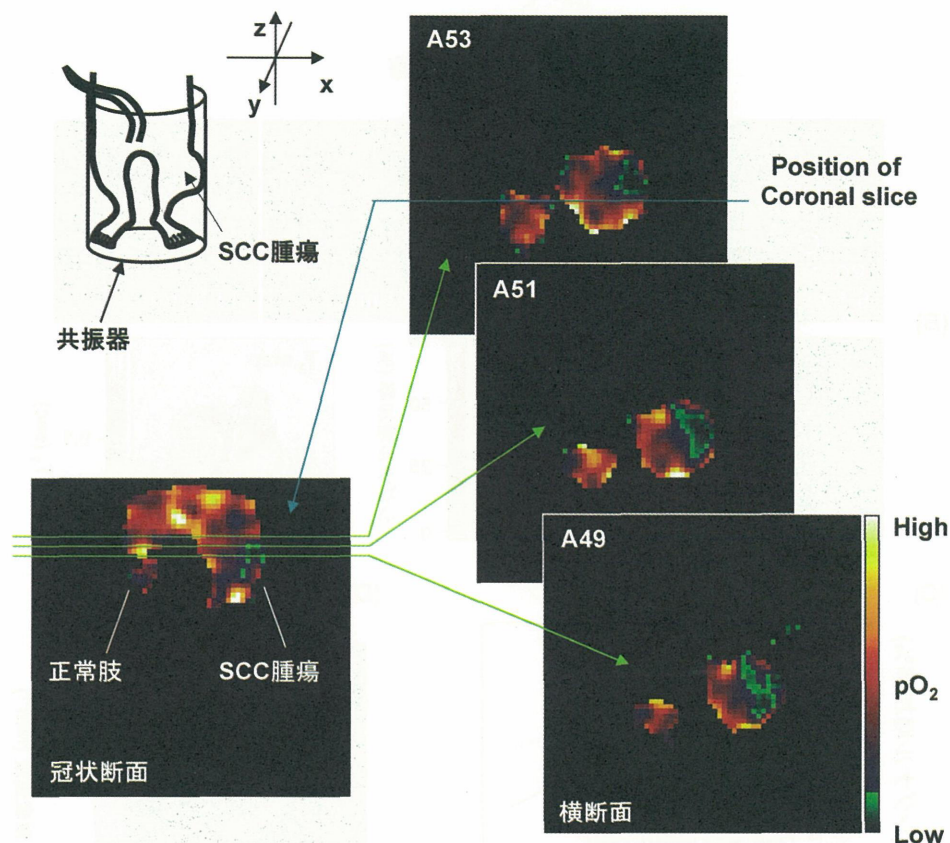


Fig. 10. CW EPR によるマイクロ波飽和を利用した *in vivo* 3次元酸素濃度マッピングの例。SCC腫瘍を移植したマウス大腿部の3次元画像。腫瘍内に低酸素部位を見ることが出来る。

ニトロキシルラジカルは、水素原子供与体の存在下、酵素的あるいは化学的に還元されてヒドロキシルアミン体となりその常磁性を失う。またヒドロキシルアミン体は、過酸化水素と金属イオンの共存下でニトロキシルラジカルへ再酸化され常磁性を取り戻すことができる。そこでニトロキシルラジカルをプローブとして、その常磁性の消失あるいは回復を EPRI あるいは T₁強調 MRI で経時的に画像を得ることにより組織の酸化還元状態を非侵襲的に評価することができる。MRI によるレドックスマッピングでは、腫瘍組織とその周辺の正常組織でのレドックスの違いを見ることも可能である (Fig. 11)。比較的酸素濃度の高い正常組織内では、ヒドロキシルアミン体からニトロキシルラジカル体への再酸化が起こり易いため、ニトロキシルラジカル体の濃度がある程度保たれている。しかし酸素濃度の低い腫瘍組織内では再酸化が起こり難く、ニトロキシルラジカルは殆ど全てがヒドロキシルアミン体へ還元されてしまう。つまりニトロキシルラジカルの還元速度は、正常組織では遅く、低酸素濃度

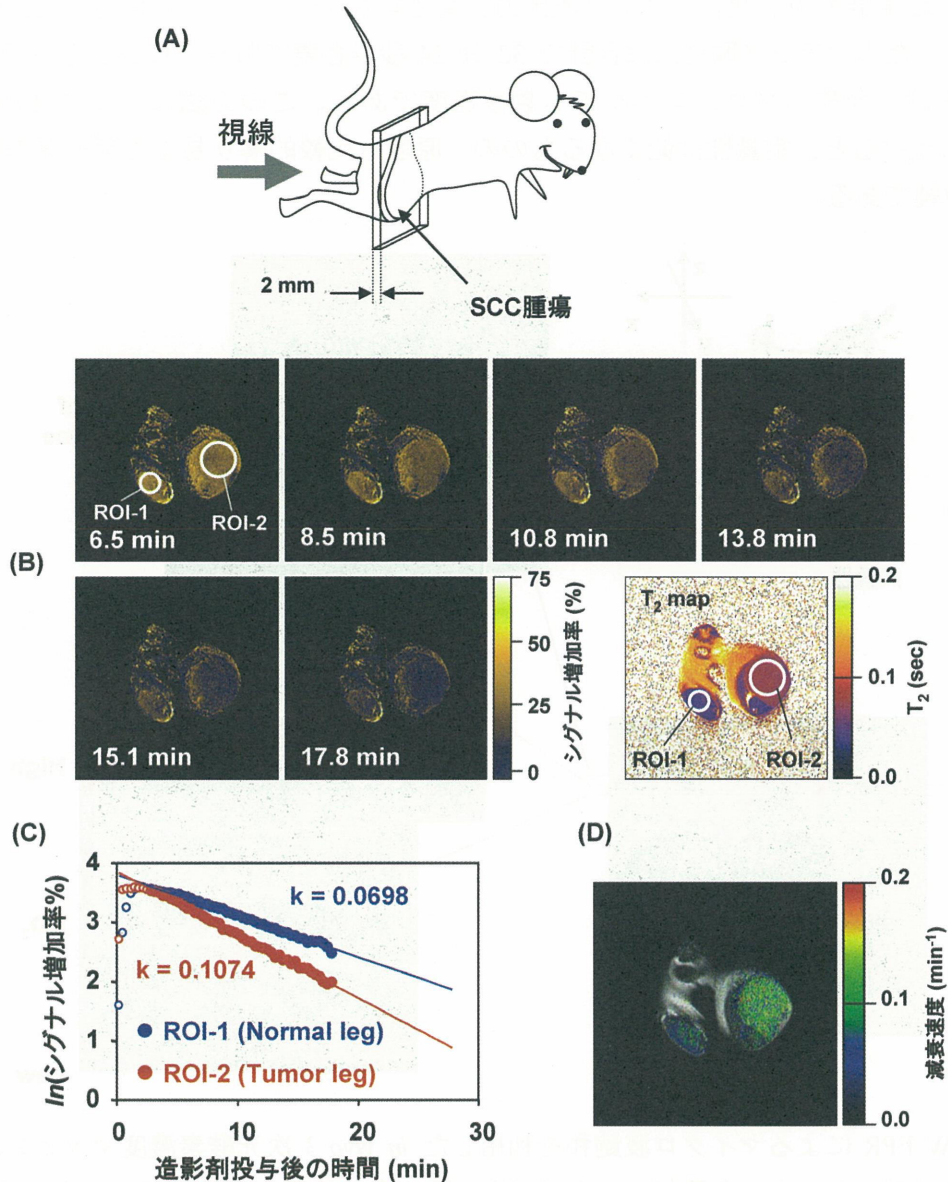


Fig. 11. MRIによるレドックスマッピング (A) MRIスライスの位置。4.7 TのMRIでSPGRシーケンスを使って T_1 強調画像を連続撮影し、マウス尾静脈からニトロキシラジカル造影剤を投与した。(B) 造影剤投与前の画像からの T_1 コントラストの増加率の経時変化。右下の図は T_2 マッピングで、腫瘍部位はピンク色に正常組織は紫色に描出されており、ROI-1およびROI-2を得るために使用した。画像は 256×256 画素に再構成し、FOVは 3.2×3.2 cm.である。(C) ROI-1およびROI-2内の T_1 コントラスト増加率の対数値の経時変化。 T_1 コントラストの減衰速度は、正常組織よりも腫瘍で速い。(D) 減衰速度マッピングとMSME画像の重ね合わせ。

の腫瘍組織で速いことが知られており、このレドックス状態に基づく腫瘍の低酸素部位の造影が可能になる。ここで重要なのは、造影剤が血液を介して到達でき、つまり血液の供給が在ってなおかつ低酸素の部位が造影される点である⁶⁾。

またニトロキシラジカルは、グルタチオンなどの水素供与体の存在下、放射線によって生じた活性酸素種を捕獲する。そのためニトロキシラジカルは放射線防護剤として働くこ

とが出来る。酸素濃度の低い腫瘍組織内ではニトロキシルラジカルの還元が速く、ニトロキシルラジカルは殆ど全てが放射線防護効果を持たないヒドロキシルアミン体へ還元されてしまう。しかし酸素濃度が幾分高い正常組織では、ある程度までニトロキシルラジカル体の濃度を維持することが出来る。つまりニトロキシルラジカルは、正常組織に特異的な放射線防護剤として働くことが出来る。すなわち、放射線治療に先立って、組織レドックス評価に際して投与されたニトロキシルラジカル造影剤は、引き続いて行われる放射線治療において正常組織特異的な放射線防御剤として働くことができると期待される。

酸素濃度とレドックスを考えるに際して、血流と血流量に関する情報が必要となる。MR アンジオグラムによる血流の造影、USPIO などの造影剤による血液ボリュームの造影、これらの重ねあわせによって組織内の血管系の働きを予想することが出来る。更にこれに酸素濃度画像あるいはレドックス画像を重ね合わせることによって、酸素濃度あるいはレドックス状態の変化のメカニズムをより明確に理解できるようになると思われる。

組織中の酸素濃度は、パルス EPR、CW EPR、OMRI によって定量的に測定することが可能である。組織のレドックス状態は EPRI、 T_1 強調 MRI によって解析することが出来るほか、OMRI でも同様に解析が可能である。血流および血流量に関しては、MR アンジオグラムや USPIO によって解析が可能となっているが、適した造影剤を見つけられれば OMRI でも血液量の解析が可能になると考えられる。酸素濃度の定量性では EPR が優れていると言える。画像解像度では MRI が特に優れている。一台で総合的に解析できるという面から見ると OMRI が優れていると言える。それぞれの特質や機器の普及の現状等を考慮した場合に、EPR/OMRI、EPR/MRI、あるいは OMRI/MRI という組み合わせで発展していく可能性も高いと考えられる。それぞれの研究の方向性や、あるいは臨床に至った際にどのデータを最優先するかによって今後の開発の方向が決まっていくであろう。

引用文献

1. Matsumoto A, Matsumoto S, Sowers AL, Koscielniak JW, Trigg NJ, Kuppusamy P, Mitchell JB, Subramanian S, Krishna MC, Matsumoto K. Absolute oxygen tension (pO_2) in murine fatty and muscle tissue as determined by EPR. *J Magn Reson* **54**, 1530-1535, 2005.
2. Krishna MC, English S, Yamada K, Yoo J, Murugesan R, Devasahayam N, Cook JA, Golman K, Ardenkjaer-Larsen JH, Subramanian S, Mitchell JB. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: Coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2216-21, 2002.
3. Subramanian S, Matsumoto K, Mitchell JB, Krishna MC. Radio frequency continuous-wave and time-domain EPR imaging and Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging of small animals: Instrumental developments and comparison of relative merits for functional imaging. *NMR Biomed* **17**, 263-294, 2004.
4. Matsumoto K, Subramanian S, Devasahayam N, TAravalluvan T, Murugesan R, Cook JA, Mitchell JB, Krishna MC. Electron paramagnetic resonance imaging of tumor hypoxia: Enhanced spatial and temporal resolution for in vivo pO_2 determination. *Magn Reson Med* **55**, 1157-1163, 2006.

5. Hama Y, Matsumoto K, Subramanian S, Devasahayam N, Koscielniak JW, Hyodo F, Sowers A, Cook JA, Mitchell JB, and Krishna MC. Continuous wave EPR oximetric imaging using radiofrequency power saturation effects. EPR-2005 A Joint Conference of 11th In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging and 8th International EPR Spin Trapping, Columbus, OH, Sep. 4-8, 2005.
6. Matsumoto K, Hyodo F, Matsumoto A, Koretsky AP, Sowers AL, Mitchell JB, Krishna MC. High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. *Cancer Res* **12**, 2455-2462, 2006.

オーバーハウザーMRIによる生体内レドックスの分子イメージング

九州大学大学院薬学研究院

内海 英雄、山田 健一 (yamada@pch.phar.kyushu-u.ac.jp)

生体内で産生されるフリーラジカルは抗酸化物質と共に酸化・還元、すなわち生体内レドックス状態の恒常性維持に寄与しているが、このレドックスバランスが破綻すると生活習慣病や虚血再灌流傷害など様々な酸化ストレス性疾患の発症や進展を引き起こすと考えられている。酸化ストレス性疾患の病因解明、さらに創薬研究・治療戦略の構築のためには、フリーラジカルが“どこで”、“どのように”、“いつ”生じているかを解析することが不可欠である。当研究室ではこれまでフリーラジカルを直接観察できる生体計測電子スピン共鳴装置(ESR)とニトロキシルラジカルをスピンプローブ剤として用い、生体内フリーラジカル反応を解析できることを様々な疾患モデルを用いて明らかにしてきた。これはニトロキシルラジカルが生体内でフリーラジカルと鋭敏に反応し、そのシグナル強度が減衰することを利用したものである。さらにニトロキシルラジカルの置換基を様々修飾すると生体内分布・移行性を制御することも明らかにしてきた。一方、最近開発された水素核と電子の二重共鳴を利用した装置であるオーバーハウザーMRI (OMRI) は、フリーラジカルを高感度に短時間で画像解析できる装置である。そこで本研究では、生体計測 ESR/スピンプローブ法の知見を OMRI へ発展応用し、細胞内外のフリーラジカル動態を同時に無侵襲画像解析することを目的とした。

細胞内・外での画像化を行うために、新たに OMRI の ESR 照射時の外部磁場を ^{14}N 、 ^{15}N 体それぞれの共鳴磁場に一致させる新たなシーケンスを開発した。本シーケンスを用いることで ^{14}N 、 ^{15}N 標識ニトロキシルラジカルを擬似試料(ファントム)中でそれぞれ分離して画像化できた。さらに、ファントム中に酸化剤、あるいは還元剤を添加することで、酸化・還元反応の画像化に成功し、この輝度変化はそれぞれの酵素濃度依存的であった。一方、アスコルビン酸含有リポソームでは、膜透過性プローブでのみリポソーム内のアスコルビン酸と反応し、顕著に画像輝度減衰速度が増加した。すなわちプローブの物性を生かすことで、レドックス反応やリポソーム膜内外を切り分けて、それぞれで生じる反応を同時に分離して画像解析できることに初めて成功した。さらに本手法を、潰瘍性大腸炎モデルにも適用し、膜透過性造影剤でのみ画像輝度が減衰し、疾患モデル動物でより詳細なフリーラジカル生成部位の特定が可能になることが示唆された。

今後、本手法を応用し、様々な酸化ストレス性疾患におけるレドックス動態を非侵襲的に、高感度画像解析することで、酸化ストレス性疾患の解明や創薬研究・治療戦略の構築につながると期待できる。

放射線物理学基礎研究

治療用炭素線の物理的性質

放医研 重粒子医科学センター 物理工学部
小森 雅孝 (E-mail: m_komori@nirs.go.jp)

1. はじめに

重粒子線は線量集中性に優れており、高LETであるために高い生物効果をもつという利点がある。最初に重粒子線を用いたがん治療が行われたのは、1977年から1993年にかけて、米国LBL研究所である¹⁾。主に450–585 MeV/nのネオンビームが用いられ、約500人の患者の治療が行われた。放射線医学総合研究所HIMACでは1994年から290、350、400 MeV/nの炭素ビームを用いて治療を行っている²⁾。約3000人の患者を治療しており、良好な治療結果を得ている。ドイツGSI研究所では1997年から、85–430 MeV/nの炭素ビームを用いて治療を行っている³⁾。2002年からは兵庫県立粒子線医療センターでも、炭素ビームを用いた治療を開始している。さらに日本やヨーロッパを中心にいくつかの重粒子線治療施設の建設プロジェクトがあり、重粒子線がん治療にかかる期待は非常に大きい。しかしながら、重粒子線特有の問題もある。物理・工学の側面からは核破砕反応（フラグメント反応）がそのうちのひとつである。

核子あたり290–400 MeV/nに加速された炭素ビームは散乱体及びワブラー電磁石によって直径10~20 cmの一様ビーム（ブロードビーム）に拡大された後、リッジフィルタや多葉コリメータ、ボラスといった機器を用いて患者個々の腫瘍形状に合致するように整形され患者体内に入射する。患者体内に入射した炭素ビームは、ある確率で体内の原子核と衝突してフラグメント反応を起こし、双方はより軽い核種（フラグメント）へと破砕する。この反応で放出されたフラグメント粒子は、反応がおこった位置で元々持っていた速度・方向をほぼ保ち体内を進行する。よって、入射ビームの種類、エネルギーはよくわかっているとしても、照射標的である患者体内の腫瘍付近（体内深度10~15 cm程度）ではさまざまなフラグメント粒子が、さまざまなエネルギーで照射されることになる。ここで、荷電粒子が生物に与える影響すなわち生物効果（RBE）を評価するには、粒子の種類、量（フルエンス）及びLETというパラメータ、いわゆる“線質”が必要である。またこれらのフラグメント粒子は、入射粒子よりも質量が軽いため入射粒子の飛程を飛び越え、標的奥にフラグメントテールと呼ばれる線量寄与を与える。よって重粒子線の生体組成等価物質に対するフラグメント粒子のフルエンス及び、そのLETを測定し、線質のデータを取得することは重粒子線治療において必須である。

2. 実験方法

実験は放射線医学総合研究所HIMACの生物照射室で行われた。ワブラー法で形成されたブロードビームをPMMA標的に照射して、生成されたフラグメント粒子を $\Delta E - E$ カウンターテレスコープ及び、LETカウンターで測定する。実験概略図を図1に示す。

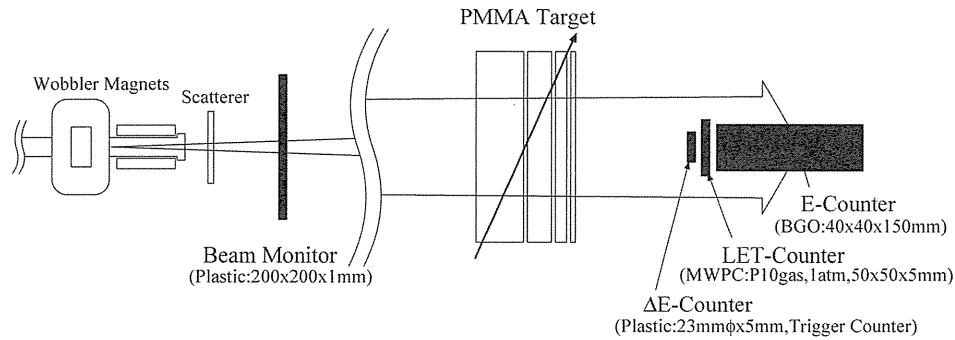


図 1 : 実験装置概略図。

2-1. 照射システム

アイソセンターから 10.5 m 上流に設置された水平、垂直 2 台のワブラー電磁石及び散乱体で、10 cm φ 照射野を形成する。使用したビームのエネルギーは 290、350、400 MeV/n である。拡大ブラッグピーク (SOBP) に関してはビームコースに設置されたアルミ製のリッジフィルタによって形成される。このリッジフィルタは HSG 細胞の生残率が一定になるように設計されている。実験で使用したビーム強度は 10^4 particles/s であり、治療で使用されているビーム強度 10^9 particles/s と比較すると非常に微弱であるが、これは粒子 1 つ 1 つのエネルギーを測定するためである。

2-2. 標的物質

標的には PMMA (polymethyl methacrylate (Lucite), $\rho=1.16\text{g/cm}^3$, $(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_n$) を用いた。標的はアイソセンターの 30 cm 上流に設置されていて、512 mm まで 0.5 mm ステップで厚さを変更することが可能である。PMMA は人体等価物質である水の代替物質として用いられている。これは ^{12}C ビームの全荷電変換断面積が PMMA と水でよい一致を示しているためである⁴⁾。また深部線量分布に関しても、PMMA と水とでよい一致を示すことから、標的として PMMA を採用することとした。

2-3. 検出器システム

入射粒子の総量を計測するため有感領域 200×200 mm、厚さ 1 mm (水等価厚 1.1 mm) の NE102A プラスチックシンチレーターを、実験室最上流に設置した (図 1 での beam monitor)。他の検出器と独立に測定を行うため、この検出器の出力はビジュアルスケーラーに入力されている。その他の検出器はアイソセンターに設置されている。粒子識別には ΔE -E カウンターテレスコープ法を採用した。上流側から ΔE カウンター、LET カウンター、E カウンターの順で配置されている。 ΔE カウンターは有感領域 $23\text{mm}\phi$ で厚さ 5 mm (水等価厚 5.4 mm) の NE102A プラスチックシンチレーターを用いた。この検出器の有感領域は、他の検出器よりも小さくなっており、この ΔE カウンターが検出器システムの立体角を決定していて、トリガーカウンターになっている。 ΔE カウンターのエネルギー分解能は、350 MeV/n の ^{12}C ビームに対して 8.5% (FWHM) である。LET カウンターはマルチワイヤー型比例計数管で、LET スペクトルを測定する。有感領域は $50\text{mm} \times 50\text{mm}$ で厚

さは5 mmである。使用しているガスはアルゴン90%、メタン10%混合ガス（P10ガス）で、1気圧で使用している。LETカウンターのレスポンスは使用するガスに強く依存している。P10ガスはレスポンスの平坦度、S/N比ともに最も優れた特性を示す⁵⁾。LETカウンターの水等価厚は7 μ mであり、これは細胞の大きさと同程度である。エネルギー分解能は²⁴¹Am線源の5.5 MeVアルファ線に対して、15%（FWHM）である。Eカウンターは有感領域40 mm \times 40 mm、厚さ200 mmのBGOシンチレーターを使用している。エネルギー分解能は350 MeV/nの¹²Cビームに対して4.0%（FWHM）である。各検出器からの出力はアンプ等のNIMモジュールを経由してADCに送られ、CAMACバスを通じてPCにリストモードで収集される。

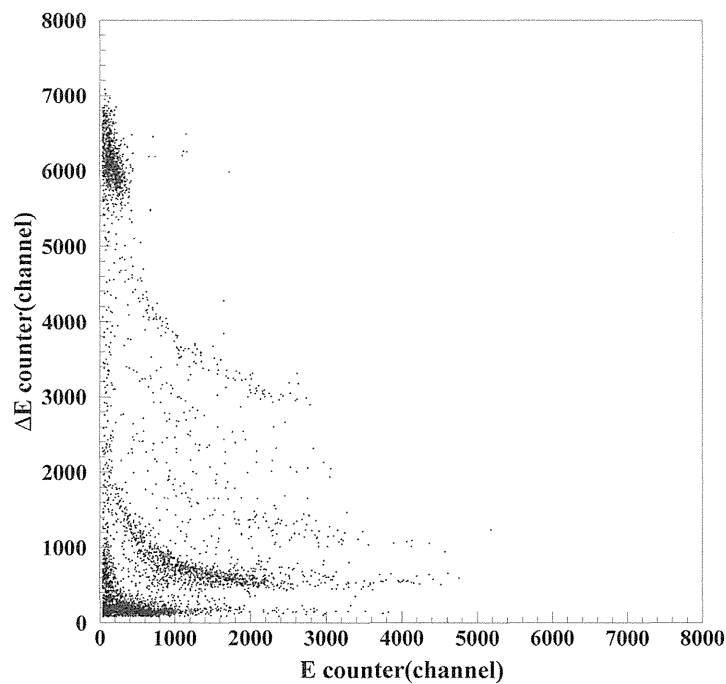


図2：350 MeV/nビームを用いた標的厚197 mmでの $\Delta E - E$ 2次元プロット。

3. データ解析

3-1. 粒子識別

図2に350 MeV/nビームを用いて、ブラッグピーク近傍である標的厚197 mm（水等価厚）で測定した $\Delta E - E$ 2次元プロットを示す。各フラグメント粒子がきれいに識別されているのが分かる。フラグメント粒子はヘリウムまでは確実に測定できているが、水素に関しては ΔE カウンターの出力が微小であるため、その一部分は測定できていない。粒子識別は以下の粒子識別関数を用いて行われた。 ΔE 及び E はそれぞれの検出器からの出力を表す。

$$F_{p,i} = (\Delta E + E)^a - E^a \quad (1)$$

定数 a は数百 MeV/n から $1 \text{ GeV}/n$ のエネルギー領域では、粒子種によらず一定である。フラグメント粒子の同位体の識別は ΔE カウンター及び E カウンターのエネルギー分解能が不十分なため不可能である。よって粒子識別はフラグメント粒子の電荷の違いのみ識別している。図3に典型的な粒子識別関数を示す。各フラグメント成分が明確に識別することが可能である。

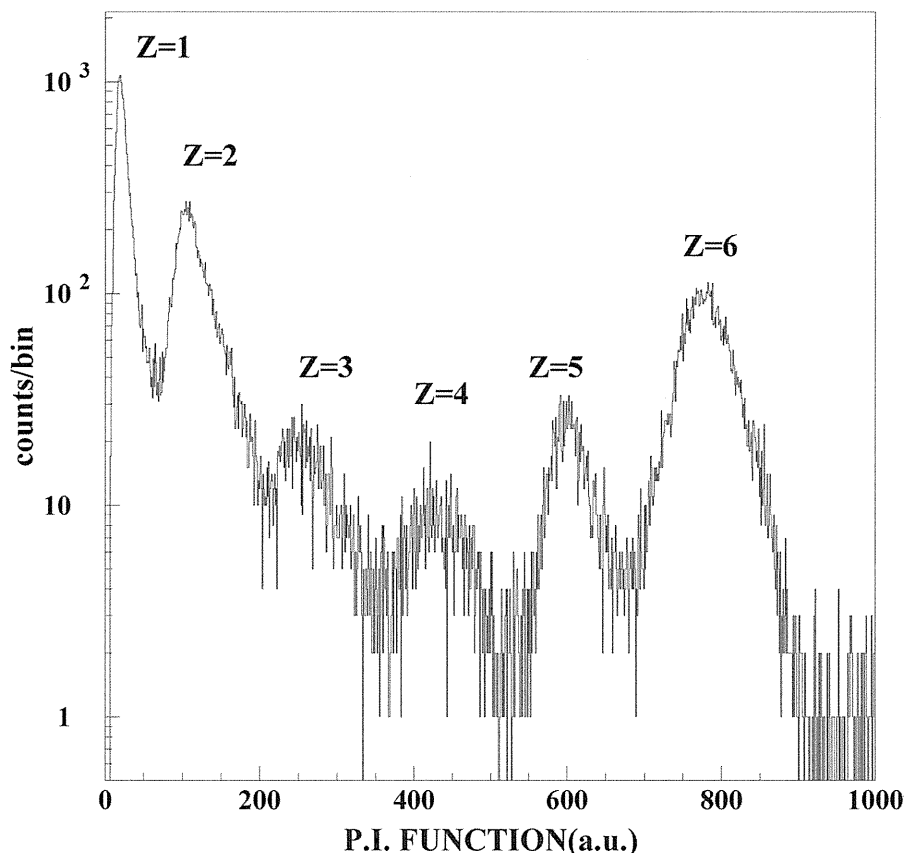


図3：350 MeV/n ビームを用いた標的厚197 mmでの粒子識別関数。

3-2. LETスペクトル

350 MeV/n ビームの典型的なLETスペクトルを図4に示す。1次粒子のピークは標的の厚さが増すにつれてLET値が高いほうへシフトしていく様子がわかる。また、標的の厚さが増加するにつれて、エネルギーストラグリングによってピークがブロードになっていく。標的厚の厚いところでの低LET成分がフラグメント粒子のLETである。LETの絶対値は阻止能計算コードSRIM⁶⁾を用いて、標的厚0 mmでのトラック平均LET値で較正を行った。測定したLETスペクトルから相対線量、線量平均LET、トラック平均LETを導出することができる。LETカウンターで測定した深部線量分布と平行平板電離箱（PTW社製、TYPE 23343）で測定した深部線量分布を比較するために、また線量及びトラック平均LETを標的厚の水等価厚の関数として導出するために、P10ガスと空気及びP10ガスと水の阻止能比をSRIMコードで計算し、補正係数として用いた。各標的厚での規格化された線量は、以下のようになる。

$$Dose = \frac{1}{N} \sum_i \psi_i S_i LET_i \quad (2)$$

ここで N はビームモニターで測定した総入射粒子数、 ψ_i は各 LET 値でのフラックス、 S_i は P10 ガスと空気の阻止能比の補正係数を表す。線量平均 LET 及びトラック平均 LET は以下のようなになる。ここで S_i は P10 ガスと水の阻止能比の補正係数を表す。

$$\overline{LET}_D = \frac{\sum_i \psi_i (S_i LET_i)^2}{\sum_i \psi_i S_i LET_i} \quad (3)$$

$$\overline{LET}_T = \frac{\sum_i \psi_i S_i LET_i}{\sum_i \psi_i} \quad (4)$$

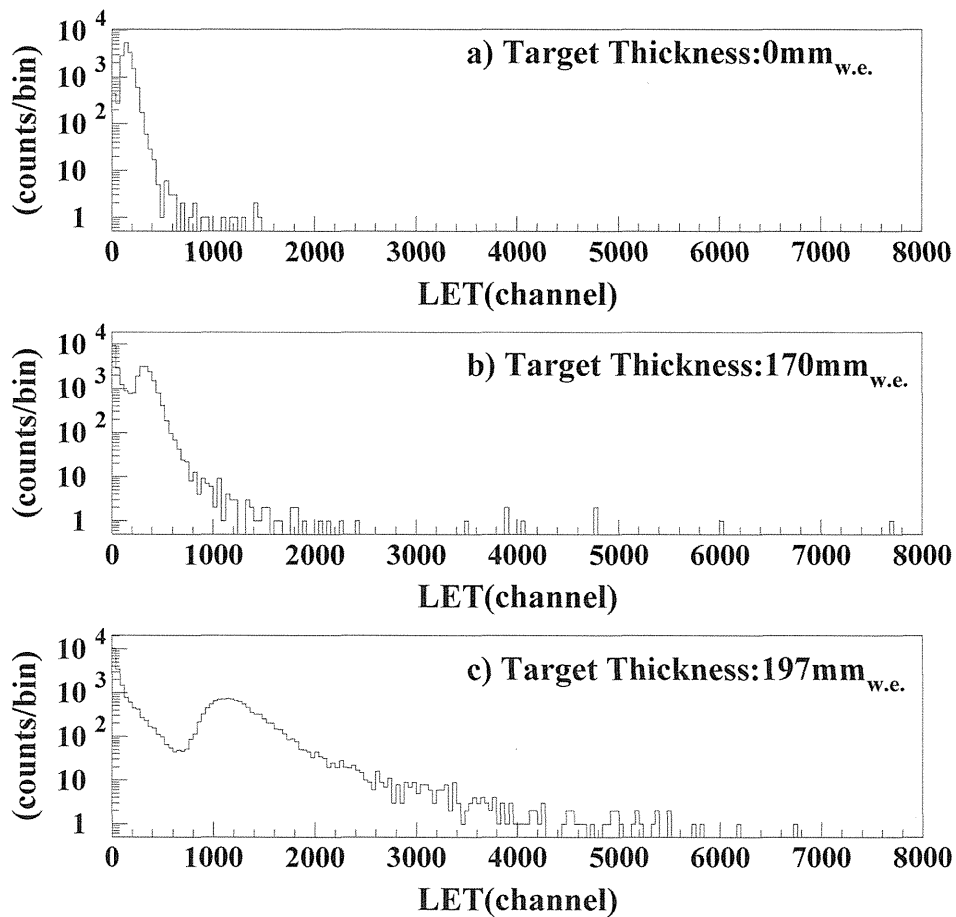


図4：350 MeV/n ビームを用いた LET スペクトル。標的厚はそれぞれ 0、170、197 mm。

4. 結果と考察

測定の正確さを確認するために、1) LETカウンターで測定したLETスペクトルから導出した深部線量分布と、平行平板電離箱で測定した深部線量分布を比較する、2) 1次粒子のトラック平均LETをSRIMコードで計算した阻止能と比較する、3) 1次粒子の全荷電変換断面積を他の実験グループが測定したデータと比較することを行った。炭素ビームの線量及びトラック平均LET、フラグメント粒子種毎のフルエンス、線量への寄与率が最終的に得られる結果となる。

4-1. 深部線量分布の比較

LETカウンターで測定したLETスペクトルから式(2)を用いて導出した深部線量分布と、電離箱で測定した深部線量分布の比較を行った。良く知られているように、電離箱による線量測定は最も信頼性のあるものである。よって電離箱で測定した深部線量分布との比較は、実験の精度検証を行ううえで最適な方法である。標的にはPMMAと水の両方を用いた。図5に得られた深部線量分布を示す。LETカウンターで測定した深部線量分布は電離箱で測定した分布とよく一致している。

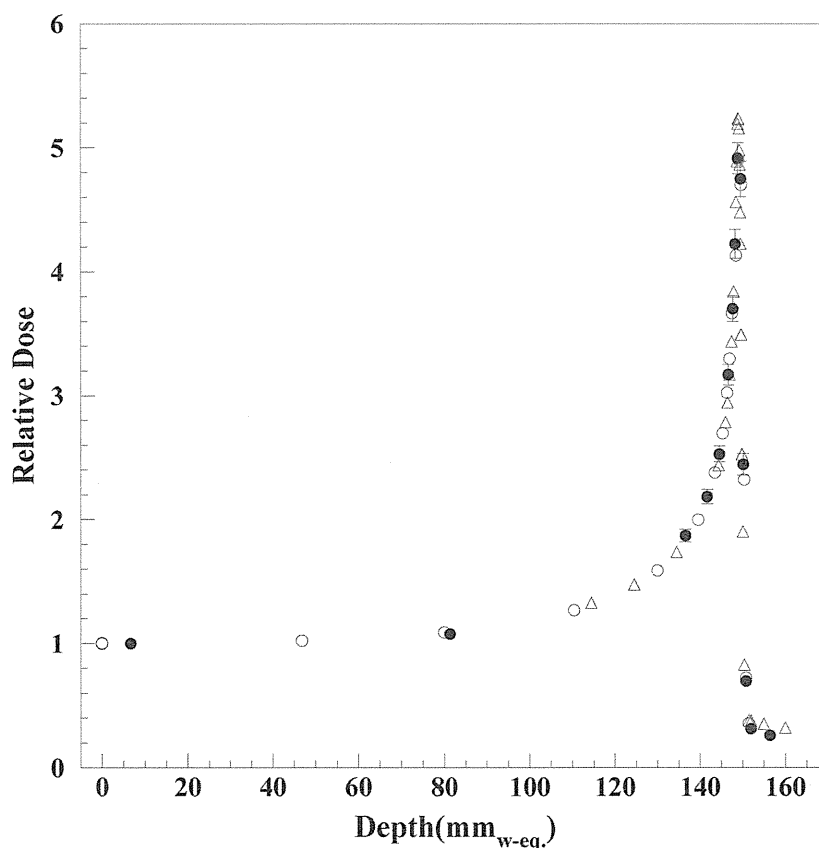


図5：290 MeV/n ビームでの深部線量分布。△と○はそれぞれ水標的とPMMA標的を用いて電離箱で測定したプロットを示し、●はPMMA標的を用いてLETカウンターで測定したプロットを示す。

4-2. トラック平均LETの比較

式(1)を用いて粒子識別した後、 $Z=6$ の粒子に関して式(4)を用いてトラック平均LETを導出した。1種類の粒子のLETは阻止能として良く知られているのでトラック平均LETに関して測定で得られた結果と計算値を比較することで、測定したLETスペクトルの正当性の評価を行うことができる。阻止能の計算はSRIMコードで行った。図6に測定で得られたLETと計算で得られたLETを示す。粒子識別の項でも述べたように、本実験での粒子識別は粒子の Z しか識別できず、同位体に関しては識別することができない。よって、 $Z=6$ の粒子には全ての同位体が含まれている。 ^{12}C より軽い炭素の同位体の阻止能は ^{12}C より大きいので、飛程は短くなる。フラグメント反応で生成された主な炭素の同位体である ^{11}C と ^{10}C が、計算のLETには考慮されている。ブラッグピーク領域において ^{11}C と ^{10}C の ^{12}C に対する割合はそれぞれ2%と0.2%程度である。測定されたLETは誤差の範囲内で計算値と良く一致しているため、LETスペクトルが正しく測定されていることが分かる。

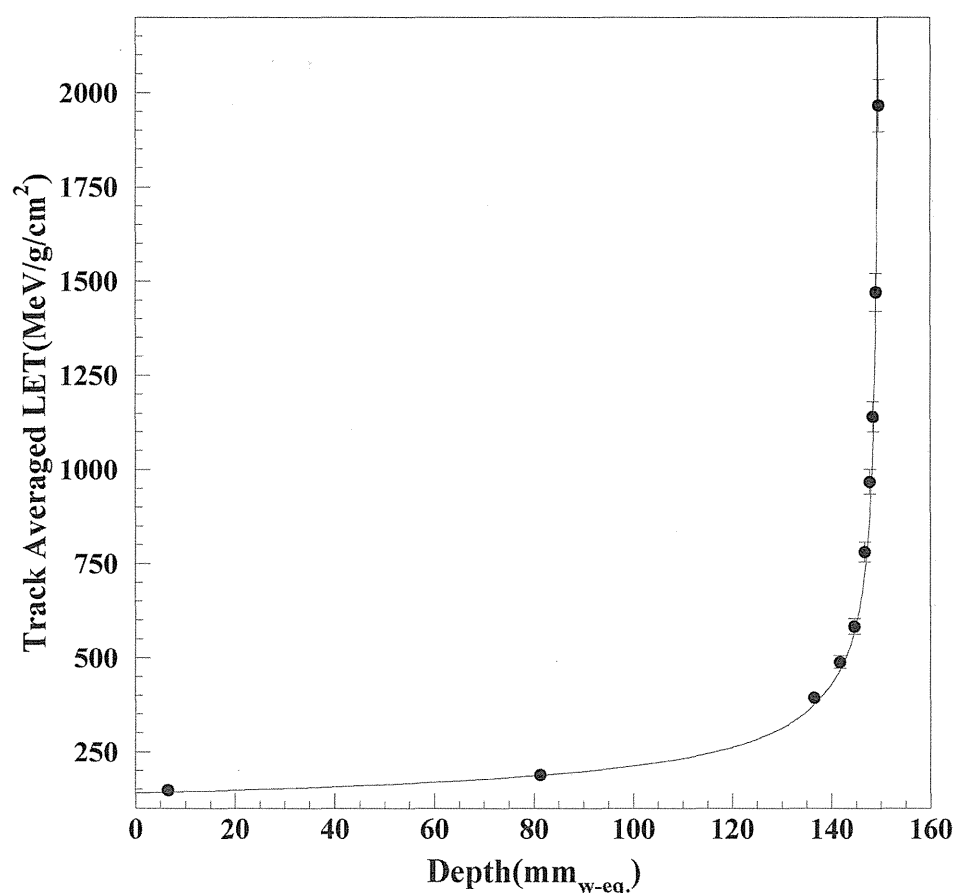


図6：290 MeV/nビームのトラック平均LET。シンボルが実験結果を示し、実線が計算値を示す。

4-3. 全荷電変換断面積の比較

測定したフルエンスを他の実験グループと比較するために、炭素ビームの全荷電変換断面積を導出した。散乱断面積を導出するために炭素のフルエンスを3次の多項式でフィットした。 λ をフルエンスカーブ($(\text{g}/\text{cm}^2)^{-1}$)とすると、全荷電変換散乱断面積 σ_{tot} は次式で与えられる。

ここで A_t は標的の原子量あるいは分子量を表し、 N_A はアボガドロ数を表す。

$$\sigma_{tot} = \frac{10^{24} \times \lambda \times A_t}{N_A} \text{ (barn)} \quad (5)$$

図7に400 MeV/n炭素ビームを用いたPMMA標的での我々の実験結果及び、比較のため Schall et al. ⁴⁾、Golovchenko et al. ⁷⁾、Fukumura et al. ⁸⁾ らの実験結果を示す。我々の実験結果は他の研究グループの実験結果と良く一致していることから、フルエンス測定が正しく行われていることが示された。

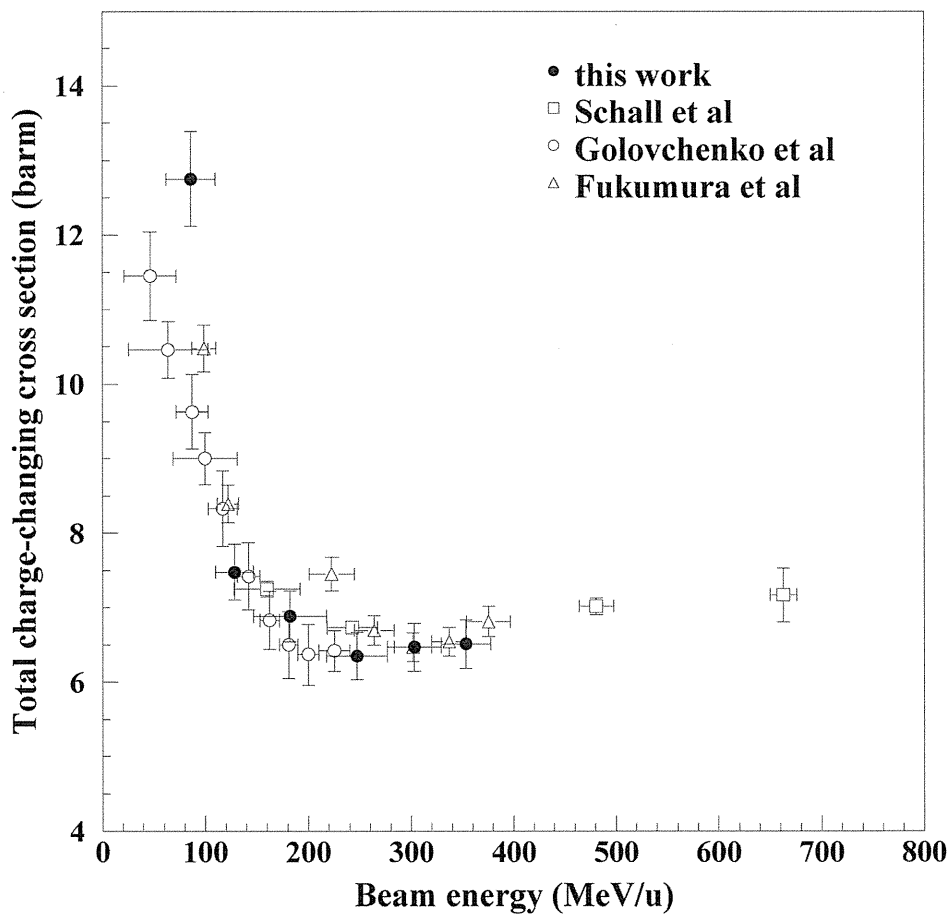


図7：PMMA標的に対する炭素ビームの全荷電変換断面積。

4-4. 測定結果と考察

図8にエネルギー290、350、400 MeV/nの炭素ビームの線量平均及びトラック平均LETを示す。ビームエネルギーが高くなるにしたがって、ブラッグピーク領域でのLETの最高値は小さくなっていく。これはエネルギーが高くなるにつれて、ブラッグピーク領域まで到達する1次粒子の割合が減少すること、またレンジストラグリングが大きくなってブラッグピークがブロードになることが原因である。

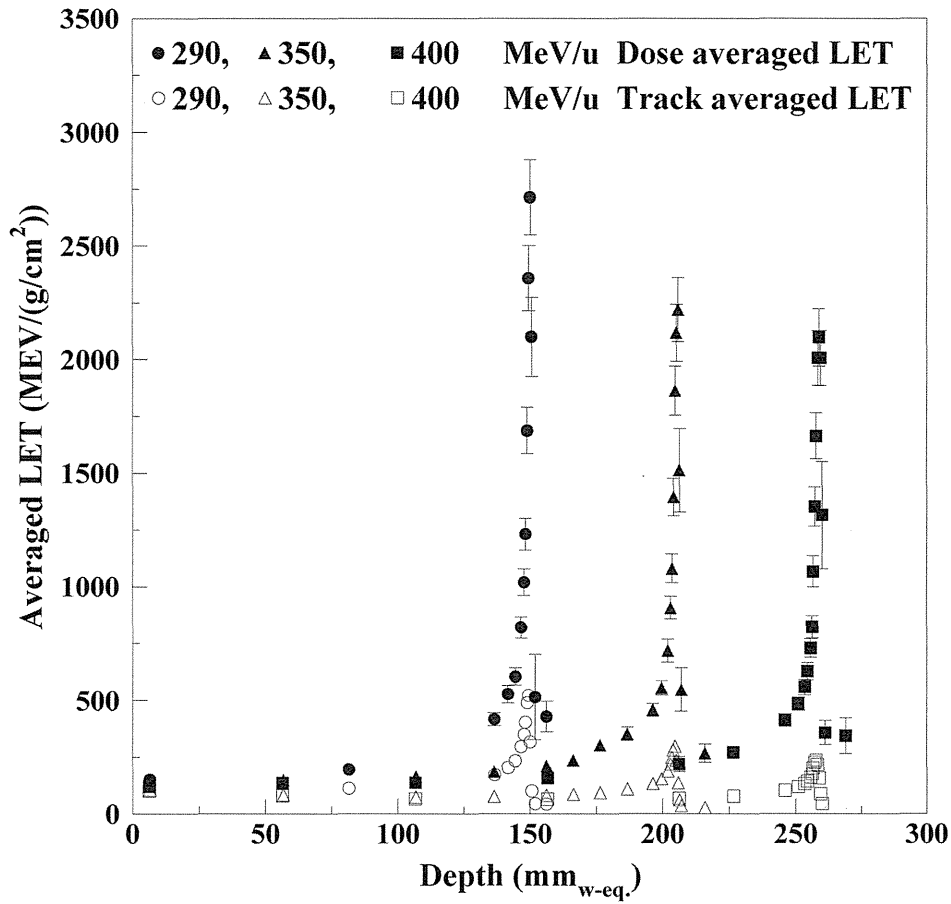


図8：290、350、400 MeV/nビームの線量平均及びトラック平均LET。

図9にエネルギー290 MeV/nの各フラグメント粒子のフルエンスを示す。標的厚0 mmでの総量が100%になるように規格化されている。ブラッグピーク領域では1次粒子である炭素の割合は50%程度まで減少している。一方、フラグメント反応で生成された水素とヘリウムは炭素と同程度の割合まで増加している。リシウム、ベリリウム、ホウ素は10%以下の割合である。

図10にエネルギー290 MeV/nの各フラグメント粒子からの線量寄与を示す。各深さでの総線量が100%になるように規格化されている。1次粒子である炭素のフルエンスはブラッグピーク領域で50%程度まで減少しているにもかかわらず、そのLETが高いために線量の90%以上は炭素からの寄与によるものである。

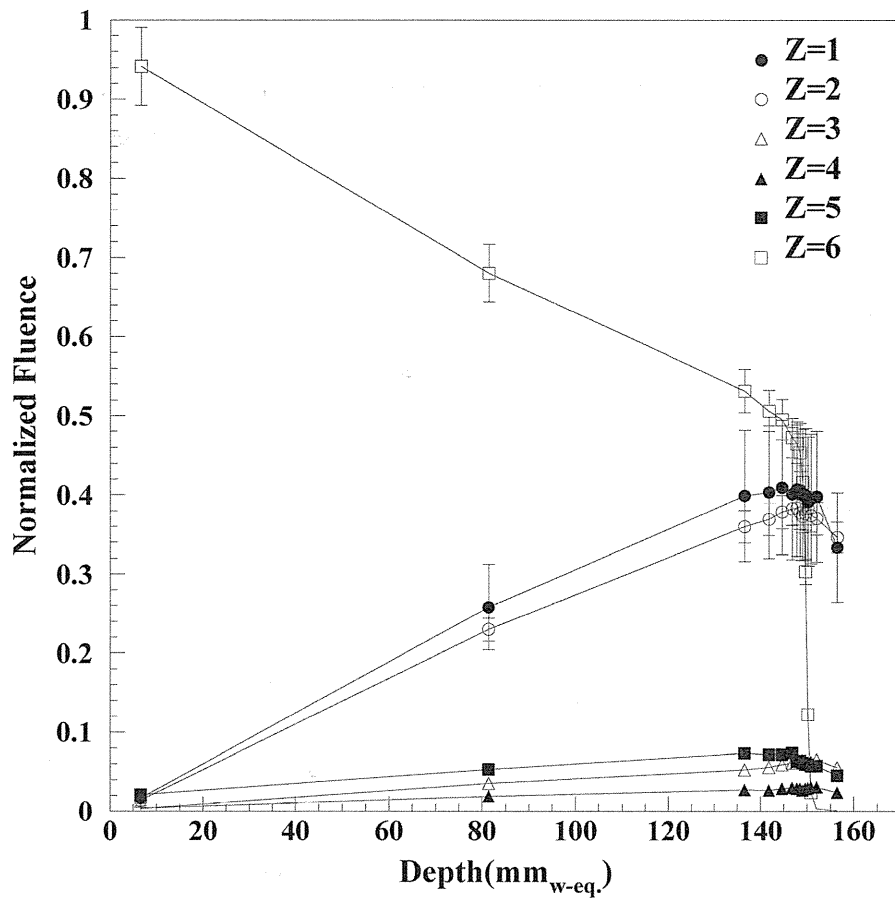


図9：290MeV/nビームのフラグメント粒子種毎のフルエンス。

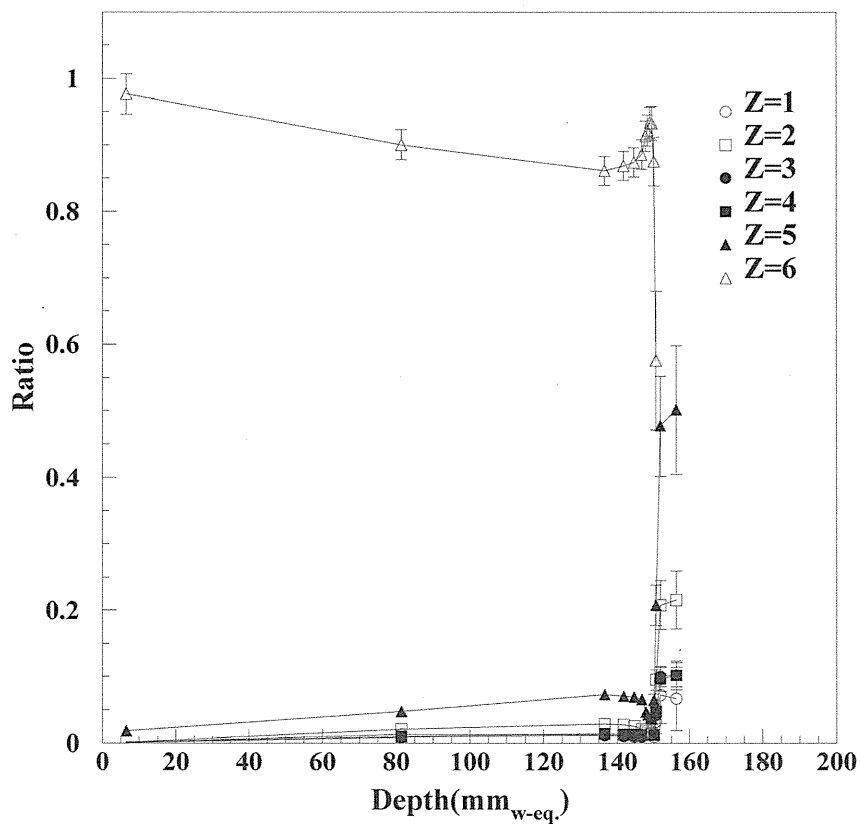


図10：290MeV/nビームのフラグメント粒子種毎の線量への寄与率。

5. おわりに

治療用炭素ビームのフルエンス、LETをブラッグピーク領域まで測定し、線量平均LET、フラグメント粒子種毎のフルエンス及び線量への寄与率を、PMMA標的の水等価厚の関数として導出した。線量平均LETは生物学的効果を評価する上で有用なデータである。エネルギー290 MeV/nのビームでは、ブラッグピーク領域では1次粒子である炭素のフルエンスは50%程度に減少しているが、そのLETが高いために線量への寄与率で見ると90%以上を占めていることが分かった。

引用文献

- 1) C. A. Tobias, R. P. Wenke and E. V. Benon: Science, 182, 474-476 (1973)
- 2) Y. Hirao, H. Ogawa, *et al.*: Nucl. Phys. A, 538, 541c-550c (1992)
- 3) G. Kraft, *et al.*: *Proc. 6th European Particle Accelerator Conf.* vol.1, 212-216 (1998)
- 4) I. Schall, D. Schardt, *et al.*: Nucl. Instr. and Meth. B, 117, 221-234 (1996)
- 5) T. Kohno, T. Kiyota, *et al.*: Nucl. Instr. and Meth. A, 450, 456-466 (2000)
- 6) <http://www.srim.org>
- 7) A. N. Golovchenko, J. Skvarc, *et al.*: Nucl. Instr. and Meth. B, 159, 233-240 (1999)
- 8) A. Fukumura, T. Hiraoka, *et al.*: *Proceedings of International Nuclear Physics Conference, INPC 2001*, 281-284 (2001)

放射線と原子物理学

首都大学東京 理工学研究科 物理学専攻
東 俊行 (E-mail: azuma@phys.metro-u.ac.jp)

20世紀初頭に活躍したキュリー婦人を、放射性元素の発見とともに放射線癌治療のパイオニアの仕事をしたと評価するならば、ほぼ同世代に生きたラザフォードが、原子物理学の父と呼ばれる由縁は、 α 線と β 線の発見さらにラザフォード散乱による原子模型の提案からである。すなわち、放射線利用の研究と原子物理学は、ほぼ同時に始まったと考えて良い。その後、実験技術として加速器の進歩により高エネルギー荷電粒子ビームが作り出されるようになる一方で、量子力学の発展とともに、ボルン近似を用いたベータによる阻止能理論が展開され、これらの高エネルギー荷電粒子ビームの物質中での相互作用の理解へと進んだ。これが、イオンビーム癌治療において重要な要素であるブラッグピークを説明することはいうまでもない。

本講演では、21世紀の今、黎明期から一世紀を経て原子物理学はいかに進歩したかを、重イオンビーム利用に深く関係する内容を中心に紹介したい。一つは「劇的に発展した」側面、もう一つは「進歩が着実ながら遅いために、まだまだ未知の部分」である。現在、原子物理学が、再び革命的に進歩し脚光を浴びていることは、昨今多くのノーベル賞物理学賞が原子物理学に与えられていることから明らかである。レーザーの発明、さらにその進歩とともに発展した量子状態のコヒーレント制御やこれを利用した原子の冷却技術がその対象であり、我々の常識を覆す量子力学上の予想が机上の空論ではなく、実際に次々と検証されているのである。講演では、HIMAC重粒子ビームを使った、現在進行形の原子物理学研究の例も紹介したい。二つの物理現象、すなわち、静止している空間的周期性電場が高速粒子に及ぼす効果と、「光」一時間的に振動しながら高速(まさに光速)で進む電磁場一が、静止している粒子に与える効果との同一性が最近明らかになってきた。これはHIMAC重粒子ビームが基礎物理学の最前線に貢献している好例のひとつである。

その一方で、原子の衝突が関与するダイナミクスを研究対象とする分野は、実験・理論両面において取り扱いが難しく発展は困難を極めてきた。高速粒子と標的の衝突において、関与するすべての粒子を、3次元的に測定する完全実験が行われたのは、21世紀に入ってからである。核子あたり100MeVの炭素イオンビームというHIMACにおける治療ビームとほぼ同様の重イオンビームと、単純なHe原子との衝突により生成する2次電子放出の様子が観測された。その結果、誰もがその反応機構を十分に理解していると信じていたこの衝突現象が、最新の理論でも説明できないことがわかり、我々に衝撃を与えた。

より複雑な生体分子についてのダイナミクスは、原子物理学の視点から見ると、最近まで理解があまり進んでいなかった。入射エネルギーを制御した荷電粒子一個と、生体分子一個の衝突で何が起こるかといったデータが全く欠けていたのである。最近、水分子のイオン化や崩壊のデータが整備されはじめ、重要な生体分子の反応断面積が測定され始めた。これは、生体分子をイオン化するイオン源と、これを加速蓄積するイオン蓄積リングが発達したためである。講演では、特定の入射粒子エネルギーで起こる共鳴現象などの報告例の紹介を通じて、原子物理学が果たしうるこれからの役割を議論したい。

放射線生物学基礎研究

個人間の放射線感受性の指標

放医研 重粒子医科学センター
粒子線生物研究グループ
加藤宝光

1. はじめに

一般にヒト個人間には放射線感受性において差があることが知られている。その差を決定付けるのは、DNA 修復に関わる遺伝子の突然変異、転写活性の違い、エピジェネティクスなど多くの理由が考えられる。多くの遺伝性突然変異は、各種の有名な疾患とともに現れるため、容易に放射線感受性を推測できる。だが、遺伝性突然変異の劣性遺伝ヘテロザイゴートなど、一見しただけでは疾患症状と結びつかないが、放射線感受性は通常より高いというケースなども多い。

また、興味深いことに、セルバンクで入手可能な 10 の正常培養皮膚細胞のうち、3 つが放射線感受性であることが示され¹⁾、さらに非遺伝性 Retinoblastoma (RB) の子供を持つ 5 組の両親が未知の原因で放射線感受性であることが、ハーバード大の Dr. Little のグループから続けて報告された²⁾。つまり、このように、一見正常で、目に付くような疾患のない我々の間にも大きな放射線感受性の違いがあることが示唆されている。また、こういった放射線への高感受性は発がんリスクとも密接に関わることが知られており、個人の放射線感受性を知ることは、科学的、社会的に重要なことである。

放射線感受性を測る手段としては、サバイバル法、Micronucleus 法、染色体損傷、特に G2 染色体損傷、G1 ブロック法など、多数の方法がすでに存在しているが、高度な技術と専門知識が必要であったり、資金、施設面での制限などから大規模な集団を用いてのスクリーニングにはあまり向かず、新しい方法の開発が必要であると考えた。そこで、我々は細胞の生死を決定づけるもの、つまり染色体損傷、突然変異を引き起こす DNA 二本鎖切断に注目し、その修復を測定した。

2. 研究結果

我々は、マイルドに放射線感受性な個人をスクリーニングするために、低線量率照射 γ H2AX 法、G2M γ H2AX 法を開発した。 γ H2AX とはヒストン H2A の Variant である H2AX が DNA 二本鎖切断の近傍でリン酸化されたものであり、これを免疫染色することで、細胞内での DNA 二本鎖切断の数、位置を可視化することが可能である。この γ H2AX 法は強力な方法で、他の DNA 二本鎖切断を測定する電気泳動法などでは測定不可能な数 cGy の放射線照射後の DNA 損傷を測定できる。また、一般に、放射線照射時に低線量率では、損傷修復の程度の影響が大きくなるため、感受性の違いが大きくなると言われている。我々は、細胞を G0/G1 期に同調させ、10 cGy/hour で 24 時間 γ 線を照射した。

まず、マイルドに放射線感受性であると言われている Atm ヘテロザイゴートなマウスから細胞系を樹立し、この培養細胞を低線量率照射、すぐに固定、染色を行った。このときの

Atm ヘテロザイゴートのマウス細胞では、 γ H2AX の発現が Atm ホモザイゴートと Atm ノーマルの細胞のちょうど中間地点程度になっていて、その平均値はこれら 3 つの細胞系で有意に異なっていた。このような有意差は、通常の高線量率照射では見られず (Atm ヘテロザイゴートでは γ H2AX の発現がはじめ、ノーマルに比べやや遅いが、その発現レベルは照射後 3 時間にはノーマルと有意な差が見られなくなる)、低線量率照射の優位性が明らかにされた³⁾。

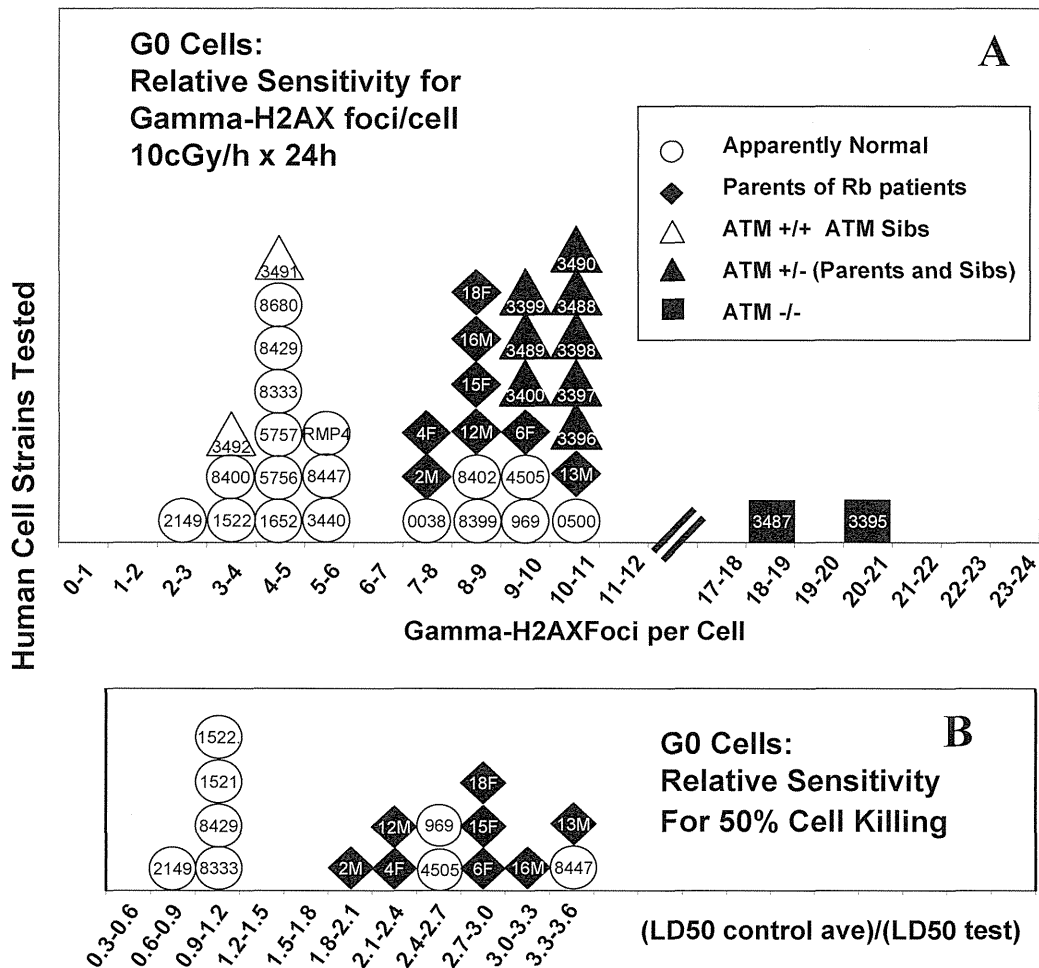
第二に、マウスではなく、人間の場合を考えた。AT (Ataxia Telangiectasia) 患者のいる家族では子の一人が AT 患者である以上は明らかに父親、母親が AT ヘテロザイゴートとなる。他の子供の AT ステータスは、AT を発症していない以上は AT ヘテロザイゴートあるいはノーマルとなるが、PCR などでスクリーニングをしないとはっきりとはわからない。ここで AT ステータスを知ることの意義であるが、AT ヘテロザイゴートな個人は、ガン発症のリスクが高まり、また AT ホモザイゴートの子供を含め、その子供のガン発症リスクも高まるだろう。

2 つの AT 家族の fibroblast 細胞をセルバンクから入手し、これについて低線量率 γ H2AX 法を用い、また同時に ATM の突然変異箇所がわかっていたため、これらを PCR で増幅、シーケンスし、AT ステータスの不明であった子供について明らかにした。ここで得られた AT ステータスと低線量率 γ H2AX 法の結果は一致した。すなわち、2 つの家族の AT ステータス不明の 6 人のうち、4 人が AT ヘテロザイゴートであり、かつ γ H2AX 発現量が高かった。また、この時、正常細胞として使用した 6 つの細胞のうちの 1 つが大きく正常細胞の γ H2AX 発現レベルから外れた。この結果は予想外であり、この細胞が AT ヘテロである可能性を示唆するものではなく、6 つの細胞の中に、1 つ感受性の高い細胞株が存在することを示唆したのみである⁴⁾。

最後に、冒頭で述べた非遺伝性 RB 患者の両親 (8 細胞)、そして一見正常な放射線感受性細胞 (8 細胞)、正常な放射線感受性の細胞 (8 細胞) について、その放射線感受性をテストした。低線量率 γ H2AX 法では全ての非遺伝性 RB 患者の両親の細胞、また一見正常であるが放射線感受性な細胞の一部を特定することができた。また、放射線感受性と細胞周期は密接に関係しているため、G2M γ H2AX 法を新たに開発した。この方法は、Sanford らの G2 アッセイの γ H2AX バージョンで、log 期の細胞に放射線を 0.5-2Gy 程度照射し、30 分後にコルセミドを入れ、1-3 時間後に Metaphase を回収し、その染色体損傷を測定する。我々は、手間のかかる染色体損傷の測定を避け、Metaphase 上に存在する γ H2AX の数を数えることとした。通常の G2 法と我々の G2M γ H2AX 法に、相関関係があることは論文内で述べた。この方法でも、一見正常であるが、放射線感受性な細胞の一部、非遺伝性 RB の両親の全てで、通常の細胞と比較し、多くの γ H2AX が見られ、その差を有意に見ることができた。なぜ、低線量率 γ H2AX 法で検出できなかった放射線感受性細胞を G2M γ H2AX 法では検出できたかについては、細胞周期や Homologous Recombination Repair など多くの要因が関係していると推察できる⁵⁾。また、この G2M γ H2AX 法の有利な点は、低線量率照射装置という特殊な装置が必要ではないということ。また、末梢血液サンプルを用いた大規模なスクリーニングに応用可能な点であることである。

3. おわりに

このような軽度の放射線感受性は、通常の高線量率ではスクリーニングすることは難しく、我々は、低線量率照射によるスクリーニングの優位性とその結果を示した。また、G2 染色体損傷法よりも簡便な G2M γ H2AX 法についてもその優位性を示した。このような個人間の放射線感受性の測定は、放射線治療にも重要なデータであり、今後も継続して研究してゆく必要があると思う。また、さらなるスクリーニング法の開発も必要であるとする。最後に低線量率照射 γ H2AX 法で測定された感受性のデータを Figure にまとめる。



4. 引用文献

- 1) Nagasawa H, Little JB. Radiosensitivities of ten apparently normal human diploid fibroblast strains to cell killing, G2-phase chromosomal aberrations, and cell cycle delay. *Cancer Res.* 1988 Aug 15;48(16):4535-8.
- 2) Fitzek MM, Dahlberg WK, Nagasawa H, Mukai S, Munzenrider JE, Little JB. Unexpected sensitivity to radiation of fibroblasts from unaffected parents of children with hereditary retinoblastoma. *Int J Cancer.* 2002 Jun 10;99(5):764-8.
- 3) Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Genik PC, Little JB, Bedford JS.

gamma-H2AX foci after low-dose-rate irradiation reveal atm haploinsufficiency in mice. Radiat Res. 2006 Jul;166(1 Pt 1):47-54.

4) Kato TA, Nagasawa H, Weil MM, Little JB, Bedford JS.

Levels of gamma-H2AX Foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual. Radiat Res. 2006 Sep;166(3):443-53.

5) Kato TA, Wilson PF, Nagasawa H, Fitzek MM, Weil MM, Little JB, and Bedford JS.

A defect in DNA double strand break processing in cells from unaffected parents of retinoblastoma patients and other apparently normal humans. DNA Repair, in press, 2007.

血管新生の制御と放射線治療効果

東京医科歯科大学大学院

医歯学総合研究科

口腔放射線腫瘍学分野

三浦 雅彦(E-mail: masa.mdth@tmd.ac.jp)

1. はじめに

腫瘍細胞の増殖には、酸素と栄養分が不可欠である。固形腫瘍においては、血管がその運搬役を担い、血管壁からの拡散によって腫瘍細胞に供給される。拡散には限界があるため、既存血管からの拡散のみではたちまち腫瘍は酸欠状態となってしまう。これを克服して腫瘍が増大するためには、血管を既存血管から造成する血管新生というプロセスが必須となる。Folkman は、1971 年に血管新生阻害が癌の治療法となる可能性を提唱したものの¹⁾、しばらくの間、有効な手段は見いだされなかった。その20年後、彼らは自らプラスミノゲンの断片であるアンギオスタチン²⁾、コラーゲン XVIII の断片であるエンドスタチン³⁾と呼ばれる内因性血管新生阻害因子を次々に発見し、ついにその具体策が出現した。これらの阻害因子の標的は、血管新生過程にある増殖している血管内皮細胞(EC)であった。動物実験レベルでは、数回の繰り返し投与により、極めて小さい腫瘍のまま休眠状態に入って増殖が永続的に停止したり、治癒してしまうという驚くべき結果であった⁴⁾。血管新生は、腫瘍組織において著しく活性が高いため、薬剤の副作用はほとんど起こらず、また、EC は正常細胞であるため遺伝的安定性が高く、薬剤耐性も起こらないことが予想され、夢の癌治療が可能になると大きな期待が寄せられた。実際には、Avastin という抗 VEGF 抗体の治療が先行し、2004 年2月には FDA の認可を受けたものの、血管新生阻害剤単独では有効性は示されず、血栓や出血等の副作用も報告された。しかし、化学療法との併用においては、化学療法単独に比べ、有意な生存期間の延長が認められた。そして、アンギオスタチンとエンドスタチンの発見者であり、血管新生阻害療法開発の先頭に立っていた Dr. O'Reilly 自身が、血管新生阻害療法を含め、単一分子を標的とする癌治療には限界があり、化学療法や放射線療法との併用は必須であると述べるに至った⁵⁾。一方、血管新生阻害剤の研究とは独立に、放射線治療における EC の重要性を示す論文が、2003 年に Science 誌に掲載された⁶⁾。驚くべきことに、腫瘍の放射線反応性を規定している因子は、腫瘍細胞の内因性放射線感受性ではなく、放射線照射後、数時間以内に起こる EC のアポトーシス頻度であるという内容であった。この論文は、後に放射線生物学の大御所たちに批判を浴びたが、放射線治療において EC を増感の標的に考えられないかというヒントを我々に与えてくれた。

2. 血管新生阻害型放射線増感剤の概念とその候補物質の探索

放射線増感剤の定義は、その薬剤単独では癌細胞に毒性はないが、放射線と併用すると相乗的に癌細胞の生存率の低下が引き起こされるというものである。我々は、この概念を、EC にあてはめて考えた。すなわち、その薬剤単独では EC に毒性はないが、放射線と併用すると相乗的に EC の生存率、あるいは血管新生能の低下を引き起こすようなものは、結果として腫瘍細胞の放射線増感につながるのではないかと仮説を立て、血管新生阻害型放射線増感剤なる薬剤の探索を始めた。

札幌医大の Sahara らのグループは、利尻島からとれるウニの中腸腺から、腫瘍の増殖を抑制する生理活性物質を抽出した⁷⁾。この物質は、糖脂質の一種であり、興味深いことに、*in vitro*での作用はほとんどなく、*in vivo*でのみ効果が認められるものであった⁸⁾。また、東京理科大の Ohta らのグループは、緑色植物や海藻から抽出した糖脂質が、DNA ポリメラーゼ α の阻害剤であることを見

いだした⁹⁾。後に、これらの物質は同一であることが判明し、sulfoquinovosylacylglycerol (SQAG) というもので、東京理科大グループがその人工合成にも成功した^{8,10)}。ところが、DNA ポリメラーゼ α 阻害剤としては、*in vitro* で効果がないという知見を説明できなかった。Sahara らは、SQAG のうち脂肪酸を1つもつ SQMG (図1) で解析を進め、SQMG によって増殖が抑制された腫瘍では、出血性壊死が認められる場合があることを述べている⁸⁾。我々は、東京理科大、札幌医大と共同研究を始め、SQMG は、DNA ポリメラーゼ α 以外にも標的があり、低濃度で EC の膜上のタンパクに作用するのではないかと考えた。SQMG は膜透過性が低く、生細胞の DNA 合成を抑制するためには高濃度の SQMG が必要であることがその根拠であった。実際、EC の管腔様形成能が、*in vitro* で 20-30 μ M 程度から有意に抑制されることが判明した。また、この濃度では EC の DNA 合成や細胞増殖は影響を受けないことから、ここでも DNA ポリメラーゼ α が標的ではないことが示唆された。

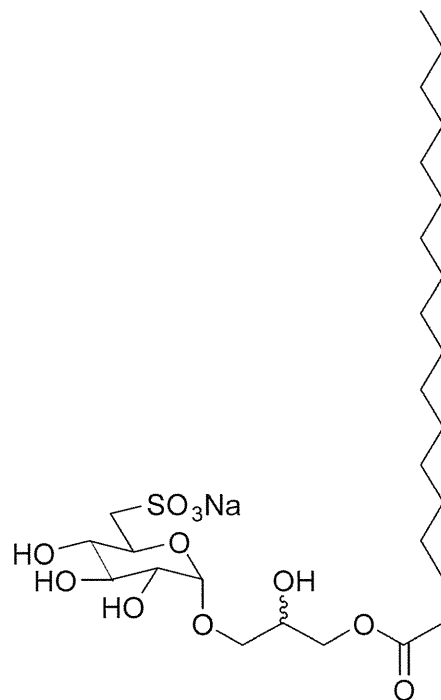


図1 α -SQMG(C18:0)の構造 α は、 α 型、 β 型異性体のうち前者であることを示す。天然物質には、 α 型しか存在しない。C18:0は、脂肪酸の炭素数が18で、飽和型であることを示す。

3. コロニー法による血管内皮細胞の放射線感受性に対する影響

この SQMG という物質が、果たして我々が求める物質なのかを検討した。放射線増感剤としての薬剤の条件として、単剤では奏功せず、放射線との併用によってのみ増強されることを述べた。そこで、コロニー法を用いて、EC の放射線感受性に対する影響について調べてみた。SQMG にて 24 時間処理してコロニーアッセイを行うと、25 μ M まで生存率の低下は全く認められなかった。次に、24 時間処理後に放射線を照射して生存率への影響を調べると、相乗的な生存率の低下がみられ、その低下の程度は線量が高くなるにつれて小さくなることがわかった。少なくともこの条件では、ヒト舌癌、子宮癌、食道癌細胞において、このような増感効果はみられなかった。さらに、血管内皮細胞における増感メカニズムを調べるために、アポトーシス発現頻度について、形態学的観察、Western プロットでの PARP の切断、フローサイトメトリーによる subG1 の検出を試みた。いずれの方法でも併用による有意なアポトーシス頻度の上昇は認められなかった。

4. 併用による老化様形質発現の亢進

アポトーシスでないとするとどのような機構で増感が起こっているのか？この答えを見つけるべく、コロニー法に用いたフラスコをつぶさに観察した。ヒト腫瘍細胞では、コロニーの大きさ、数に放射線単独と併用において全く差は認められなかった。血管内皮細胞においては、照射単独では大きなコロニーが数多く認められるが、併用群では、1個のコロニー当たりの細胞数が50に満たないマイクロコロニーが数多く存在することに気がついた。さらに興味深いことに、このようなコロニーの細胞は、扁平巨大化していた。この特徴はまさに老化様形質と一致する。そこで、老化のマーカーとして知られる β ガラクトシダーゼ活性を調べると、このような細胞のほとんどは陽性で、しかもp21/Waf1の発現が増加していた。種々のストレスにより、replicative senescenceのようなテロメアの短縮を伴わないが、細胞生物学的にも生化学的にもきわめてそれと類似した老化様形質が発現することは既に知られている¹¹⁾。また我々は最近、8 Gy程度の放射線を照射すると、それのみで~90%のECが老化を引き起こすことを見いだした。これらの結果から、2 Gy程度の放射線でもSQMGとの併用によって老化様形質の発現が亢進し、増殖が停止してしまったために生存率の低下が引き起こされたものと推測された。生存曲線において高線量域での増感比が低くなることは、高線量ではそれのみで老化様形質が発現することによって説明することができる。

5. 放射線とSQMGの併用による血管新生阻害効果

次に、ECの血管新生能に及ぼす影響を調べるために、1-10 μ MオーダーのSQMG濃度、この濃度では全く血管新生を抑制しないが、これを添加した場合としない場合とで、放射線によるマトリゲル上でECの管腔様構造の形成に影響を受けるかどうかについて検討した。放射線2 Gy程度では管腔形成に全く影響は認められなかった。ところが、1 μ M SQMGと併用すると、有意に管腔構造の形成が抑制され、5 μ Mではほぼ完全に抑制されることがわかった(図2)。血管新生を行うためには、癌細胞のように基底膜を透過するための浸潤能がECに求められる。そこで、Boydenチャンバーを用いてマトリゲル上に置いたECがそれをくぐり抜け、反対側に移動する能力によって浸潤能に対する影響を評価した。1-10 μ Mオーダーで放射線2 Gyまたは4 Gyでの併用により、

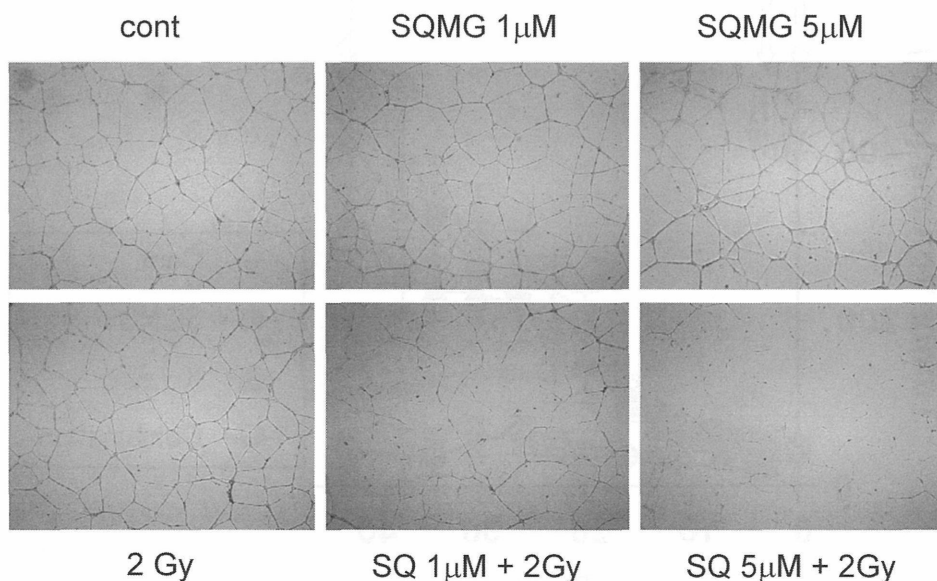


図2 マトリゲル上における血管内皮細胞の管腔様構造形成能に対する放射線-SQMG併用効果
併用実験では、SQMGで1 h処理後放射線照射され、さらに21 h後の状態を示している。

相乗的に抑制されることがわかった。SQMG または放射線の単独処理では、浸潤能は全く影響を受けなかった。さらに、線維芽細胞と EC の共培養アッセイによる管腔形成実験では、 $1-10 \mu\text{M}$ の SQMG では影響されないものの、 2 Gy 単独では有意に抑制されることが示された。しかし、併用すると、相乗的な抑制効果がここでも認められた。この実験系は、EC の増殖を反映した血管新生をみることが可能で、*in vitro* で最も優れた血管新生アッセイと考えられている。

6. *in vivo* での放射線増感効果

こうして、SQMG は、EC に対する放射線増感剤であり、血管新生の相乗的阻害剤であることがわかったので、いよいよヌードマウスに移植した腫瘍の増殖に対する効果を調べた。増感剤としての機能を考慮して、SQMG 単剤ではほとんど効果を示さない状況で、放射線による効果を増強できるかどうかについて検討することを試みた。まず、マウスに投与する SQMG 濃度を検討した。血管新生は、正常組織ではほとんど起こらないと考えられていたが、その後の研究で、脂肪組織の増大にも血管新生は必須であることが判明した¹²⁾。この効果を調べるために ob/ob マウスという満腹中枢を刺激するレプチンを欠損した肥満モデルマウスに血管新生阻害を投与し、その体重変化が指標として用いられている¹²⁾。そこで SQMG を ob/ob マウスに腹腔投与したところ、 5 mg/kg にて週 5 回、5 週投与によっても体重増加率に影響は認められなかったが、 10 mg/kg では、同じ投与方法で 2 週間後には体重増加率が有意に低下することがわかった。そこで、より安全な濃度として 1 mg/kg からスタートした。ヒト舌癌細胞をヌードマウスの大腿部皮下に移植して、約 50 mm^3 に達したところで 1 日に 1 mg/kg の SQMG i.p. 投与と 2 Gy 照射を毎日 5 日間繰り返した。その結果、SQMG 単剤では全く腫瘍の増殖に影響を与えなかったが、照射単独では有意に増殖の抑制が認められた。併用した腫瘍では、照射単独に比べ、相乗的に腫瘍の増殖抑制がみられた。また、肺腺癌については、SQMG 1 mg/kg i.p. 5 回、 4 Gy 2 回投与にて、著しい増感効果が認められた (図 3)。また、腫瘍内の血管密度を調べると、併用した場合において、相乗的な低下が認められた。

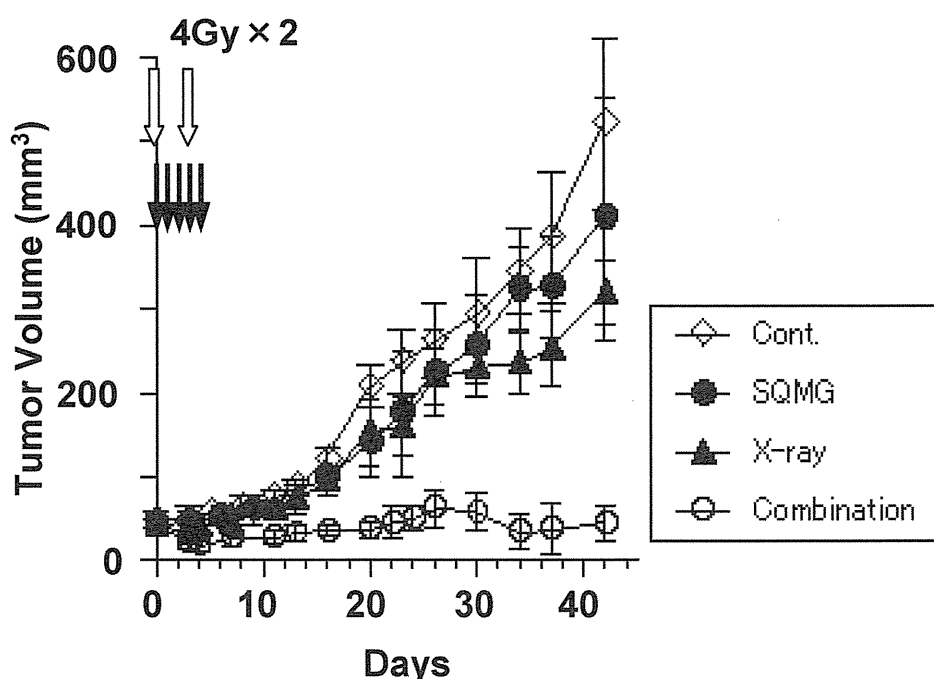


図3 ヌードマウス移植肺腺癌 A549 の腫瘍増殖に対する放射線-SQMG 併用効果

以上の結果から SQMG は、放射線と併用することで相乗的な血管新生阻害効果を示し、*in vivo* においては相乗的な腫瘍増殖遅延効果を示すことが判明した。すなわち、SQMG は、血管新生阻害型放射線増感剤としての特性を有することが動物実験により示された^{13,14)}。

7. おわりに

本稿では、EC を標的とした放射線増感物質 SQMG が、腫瘍の放射線増感に結びつく可能性を我々の *in vitro* での実験と動物実験を例に紹介した。この物質と放射線との併用によって EC の老化という現象が見いだされたが、我々は、8 Gy 程度の放射線照射単独でも増殖中のほとんどの EC が老化様形態を示して増殖を停止し、さらに、そうした細胞では、マトリゲルを介した 3次元での遊走能、浸潤能が有意に抑制されることを見いだしている。このことは、EC の老化という現象が、血管新生に要求される EC の重要な能力を多段階に抑制する可能性を示唆している。こうした現象が *in vivo* でも本当に起こっているかどうかを確認することは、アポトーシスの検出と異なり、現段階では極めてむずかしい。しかし、もし起こっているならば、Garcia-Barros らが述べた EC のアポトーシスが腫瘍の放射線反応性を規定するという説⁶⁾に一石を投じることとなるであろう。現在、我々は放射線と SQMG の併用が特異的に EC の遺伝子発現に及ぼす影響について解析しており、血管新生阻害を説明する興味深い候補が得られつつある。さらに、SQMG が直接結合するタンパクの解析も進めており、既に EC 特異的に膜上に発現する受容体タンパクがその候補として同定され、さらにその下流のシグナル伝達機構に関する研究も行っている。また、毒性試験や pharmacokinetics 等、実用化に向けた解析も進行中である。

低酸素細胞増感剤開発失敗のトラウマが、特に日本の製薬会社に根強く残っており、この種の開発に消極的であることは極めて残念な状況である。しかし、今後日本でも米国並みに放射線治療症例が増えていくことが予想されており、是非とも新しい放射線増感剤の治験が今よりも容易にできるような環境が整備され、可能性のある多くの物質が世に出て行くことを期待する。

謝辞

本研究は、東京理科大学理工学部（菅原二三男教授、坂口謙吾教授）、札幌医科大学医学部病理学講座（佐藤昇志教授）、東洋水産株式会社（崎元一平研究員、太田慶祐博士）との共同研究によって行われたもので、心より感謝の意を表します。尚、本研究は、文科省科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

引用文献

- 1) J. Folkman: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-86.
- 2) M.S. O'Reilly, L. Himgren, et al.: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328 (1994).
- 3) M.S. O'Reilly, T. Boehm, et al.: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285 (1997).
- 4) T. Boehm, J. Folkman J, et al.: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-407 (1997).
- 5) M.S. O'Reilly: Targeting multiple biological pathways as a strategy to improve the treatment of cancer. *Clin Cancer Res* 8, 3309-3310 (2002).
- 6) M. Garcia-Barros, F. Paris, et al.: Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell

- apoptosis. *Science* 300, 1155-1159 (2003).
- 7) H. Sahara, M. Ishikawa, et al.: *In vivo* anti-tumour effect of 3'-sulphonoquinovosyl 1'-monoacylglyceride isolated from sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) intestine. *Br J Cancer* 75, 324-332 (1997).
 - 8) H. Sahara, S. Hanashima, et al.: Anti-tumor effect of chemically synthesized sulfolipids based on sea urchin's natural sulfonoquinovosylmonoacylglycerols. *Jpn J Cancer Res* 93, 85-92 (2002).
 - 9) K. Ohta K, Y. Mizushima, et al.: Sulfoquinovosyldiacylglycerol, KM043, a new potent inhibitor of eukaryotic DNA polymerases and HIV-reverse transcriptase type 1 from a marine red alga, *Gigartina tenella*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 46, 684-686 (1998).
 - 10) C. Murakami, T. Yamazaki, et al.: A novel DNA polymerase inhibitor and a potent apoptosis inducer: 2-mono-O-acyl-3-O-(alpha-D-sulfoquinovosyl)-glyceride with stearic acid. *Biochim Biophys Acta* 1645, 72-80 (2003).
 - 11) K. Suzuki, I. Mori, et al.: Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res* 155, 248-253 (2001).
 - 12) M.A. Rupnick, D. Panigrahy, et al.: Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10730-10735 (2002).
 - 13) Sakimoto I, Ohta K, et al.: α -Sulfoquinovosylmonoacylglycerol is a novel potent radiosensitizer targeting tumor angiogenesis. *Cancer Res* 66, 2287-2295 (2006).
 - 14) Miura M, Sakimoto I, et al.: Sulfoglycolipids as candidate antiangiogenic radiosensitizers. *Anticancer Drugs*. 18, 1-5 (2007).

特別講演

蛋白質リン酸化による細胞増殖制御・Tob, Kiz を中心に

東京大学医科学研究所 がん細胞シグナル研究分野
山本 雅 (e-mail: tyamamot@ims.u-tokyo.ac.jp)

細胞の増殖は生命現象の基本とあってよい。私たちの体も一個の受精卵細胞が増殖・分化することによって作られている。大人になっても必要に応じて細胞は増殖し、さまざまな機能を発現する。例えば抗原刺激を受けた免疫細胞は増殖し抗原特異的抗体産生をするようになる。一方で細胞が無秩序に増え続けることは、がんの発症につながっていく。細胞は生体の調節機構のなかで制御されて増えることが我々の生命維持に必要なのである。

細胞の増殖は一定の周期を持って進行する。これは細胞周期と呼ばれており、G₁ 期—DNA 合成期 (S 期)—G₂ 期—細胞分裂期 (M 期) からなっている。多くの場合、休止期の細胞は増殖因子、栄養因子、抗原、サイトカインなどの刺激を受けて増殖期に入る。このときに細胞内では蛋白質リン酸化反応などのシグナル伝達系が作動している。増殖期では、DNA 合成により遺伝情報が複製され、引き続き分裂期に移っていく。これらの過程でもさまざまなキナーゼ、ホスファターゼが働いている。

私たちは、休止期 (G₀ 期) の細胞が増殖刺激により活性化されて G₁ 期に移行する過程を研究し、古くは受容体型チロシンキナーゼを見出し、それが増殖刺激を最初に細胞内に伝える上で重要であるという概念を作るうえで貢献した。また最近、受容体型チロシンキナーゼの下流で重要な働きをする MAP キナーゼの標的分子であり、細胞増殖抑制活性をもつ Tob を見出している。Tob は MAP キナーゼによりリン酸化されるとその増殖抑制活性を失い、細胞を G₁ 期に移行しやすくさせる。このように Tob は増殖制御機構で重要な役割を果たしている一方、骨形成や精子形成といった様々な現象に係わっていることが明らかになってきた。また私たちは最近、M 期の進行を調節するキナーゼについても研究を進めている。M 期進行には多くのキナーゼに係わっているが、なかでも Plk (Polo like kinase)1 に注目した。Plk1 の新たな基質を探す中で、いくつかの異なる蛋白質を同定した。それらは M 期進行の様々な時期に Plk1 でリン酸化されていると想像しているが、そのうちのひとつを Kiz と命名し、Kiz が特に分裂前期に機能していて、中心体が 2 極からなる紡錘体を形成する上で重要であることを明らかにした。

本シンポジウムでは、Tob が多様な機能を持つことの分子機構、また Kiz の作用の分子機構をデータに基づいて議論し、蛋白質リン酸化反応による細胞周期の制御の一端を紹介したい。また、細胞周期進行に係わるキナーゼのいくつかについて発癌との関わりにも触れ、我々の研究がいかに医療に貢献しうるかについても言及する。

放射線生物学基礎研究

腫瘍細胞の放射線応答への NO ラジカルの関与

福井大学高エネルギー医学研究センター腫瘍制御部門
松本 英樹 (E-mail: hidekim@u-fukui.ac.jp)

1. はじめに

近年、照射装置の進歩・照射方法の工夫により、放射線がん治療において低線量あるいは低線量率放射線被曝の問題が唱えられつつある。治療期間の短縮・生物効果の不均一性の克服を考慮した密封小線源による組織内照射では、低線量率連続照射が行われている。強度変調放射線治療 (IMRT) においても、線量率から考えると場合によっては低線量率照射となることがあり、また周辺の正常組織に低線量被曝域が存在している。これら、放射線がん治療における低線量・低線量率放射線の照射および被ばくが新たな問題を浮き彫りにしてくる可能性が考えられる。また腫瘍細胞の放射線に対する応答により分泌される細胞産生物質への二次的な応答が放射線がん治療における腫瘍細胞の致死感受性に大きく影響することが予想される。

この様な背景を踏まえて、低線量放射線に対する細胞応答現象の中で最近注目されている放射線誘発バイスタンダー効果と一酸化窒素 (nitric oxide、NO) ラジカルとの関連性について概説する。

2. 放射線による NO 生合成の誘導

NO ラジカルは 3 種類の NO 合成酵素 (NO synthase、NOS)、神経細胞型 NOS (nNOS or NOS3)、血管内皮細胞型 NOS (eNOS or NOS1) および誘導型 NOS (iNOS or NOS2) によって触媒される L-arginine から L-citrulline への転換反応の副産物として内因的に生合成される¹⁾。これらの酵素の内、カルシウム非依存的な iNOS は放射線等の様々な誘導因子によって発現誘導され、発現誘導された iNOS は持続的に高濃度の NO ラジカルを産生する²⁾。がん抑制遺伝子 *p53* の遺伝子型以外同一の遺伝的背景を有する細胞を用いた実験において、放射線による iNOS の発現誘導は正常型 *p53* により抑制されることが示されている^{3,4)}。正常型 *p53* による iNOS の発現誘導抑制には、① iNOS の誘導に必須の特異的転写因子の認識配列への結合阻止、② iNOS の誘導に必須の転写因子 (例えば NF- κ B) への *p53* の結合による不活化、③ TATA 結合タンパク質 (TBP) への *p53* の結合による TFIIID 複合体形成阻止、④ iNOS 遺伝子のプロモーター領域への *p53* の結合による転写抑制等の仮説が唱えられている⁵⁾。また放射線によるカルシウム依存性の eNOS の発現誘導および活性化も示されている⁶⁾。高濃度の NO ラジカルおよびその反応産物 (例えば N_2O_3 および $ONOO^-$) は DNA 損傷を引き起こし、変異原としての作用を有する⁷⁾。一方、NO ラジカルは免疫応答、神経興奮伝達、血管拡張における重要な調節因子でもある⁸⁾。従って、生体内において NO ラジカルは、その濃度依存的に、高濃度では細胞毒として、低濃度では細胞保護剤として作用していることが示唆されている⁹⁾。

3. 放射線誘発バイスタンダー効果への NO ラジカルの関与

1992年、NagasawaとLittleが非標的細胞におけるDNA損傷に因らない間接的な放射線影響について報告したのが放射線誘発バイスタンダー効果の最初の論文であり¹⁰⁾、その後多くの放射線誘発バイスタンダー効果に関する論文が報告されているが、その殆どが低線量の α 粒子を用いた実験である。細胞死の亢進、姉妹染色分体交換、染色体不安定性、突然変異、細胞内活性酸素種の増加、p53細胞内含有量の増加あるいは減少等様々な生物現象が放射線誘発バイスタンダー効果において観察されている。

放射線誘発バイスタンダー効果のメカニズムは十分に明らかにされていないが、放射線に直接曝露された標的細胞とそうでない非標的細胞(バイスタンダー細胞)間のシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることは容易に想像がつく。隣接する細胞間での低分子物質の交換に関わっているのがギャップ結合である。ある細胞を低線量放射線が通過すると放射線応答シグナルによる化学反応が誘発され、その反応産物(バイスタンダー因子)が隣接するバイスタンダー細胞へギャップ結合を通じて移行し、バイスタンダー効果が誘発されるというモデルが提唱されている¹¹⁾。もう一つの隣接する細胞同士の結合様式としてリガンドとその受容体による結合があり、これによっても放射線誘発バイスタンダー効果が生まれる可能性が考えられる。標的細胞とバイスタンダー細胞間でのFasおよびFasリガンドによるアポトーシス誘導はこのモデルの典型であるが¹²⁾、1 Gy以下の低線量放射線によるFasあるいはFasリガンドの誘導は報告されていない。

隣接せず離れた場所に存在する細胞間でのバイスタンダー効果の誘発には、放射線に曝露された標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子が関与していることが報告されている。MothersillとSeymourは、0.5 Gyの γ 線を照射した細胞のコンディション培地(irradiated conditioned medium、ICM)への曝露によるバイスタンダー細胞の生存率の低下を見出し、標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子がタンパク質様の生理活性物質であることを示した¹³⁾。Lehnertらは、8.4 cGyの α 粒子を照射された標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子が活性酸素種、TNF- α あるいはTGF- β 1である可能性を示した^{14,15)}。Barcellos-Hoffらも標的細胞から分泌される可溶性のバイスタンダー因子がTGF- β 1である可能性を示唆している¹⁶⁾。筆者らは、ヒト神経膠芽腫細胞を用いてX線および炭素線誘発バイスタンダー効果をもたらす因子の一つがiNOS由来のNOラジカルであることを世界に先駆けて見出している^{3,4)}。続いてShaoらがNOラジカルを介した放射線誘発バイスタンダー効果により細胞増殖の促進および微小核形成の誘発が引き起こされることを示している¹⁷⁾。これらの報告を手掛かりにして、英国グレイがん研究所からも放射線誘発バイスタンダー効果をもたらす因子の一つがNOラジカルであることが示されている¹⁸⁾。また最近、細胞からのカルシウムイオンの流出が放射線誘発バイスタンダー効果を修飾していることが示されている¹⁹⁾。これはカルシウムイオンによるシグナル伝達が放射線誘発バイスタンダー効果を誘導するための初期反応の一部を担っている可能性を示唆している。さらに米国と中国の研究グループは、カルシウム依存性のcNOS(eNOSあるいはnNOS)由来のNOラジカルが放射線誘発バイスタンダー効果をもたらす因子の一つであることを示している²⁰⁾。これらの報告は、NOラジカルとその反応産物が放射線誘発バイスタンダー効果をもたらす非常に重要な因子であることを強く示唆している²¹⁾(図1)。

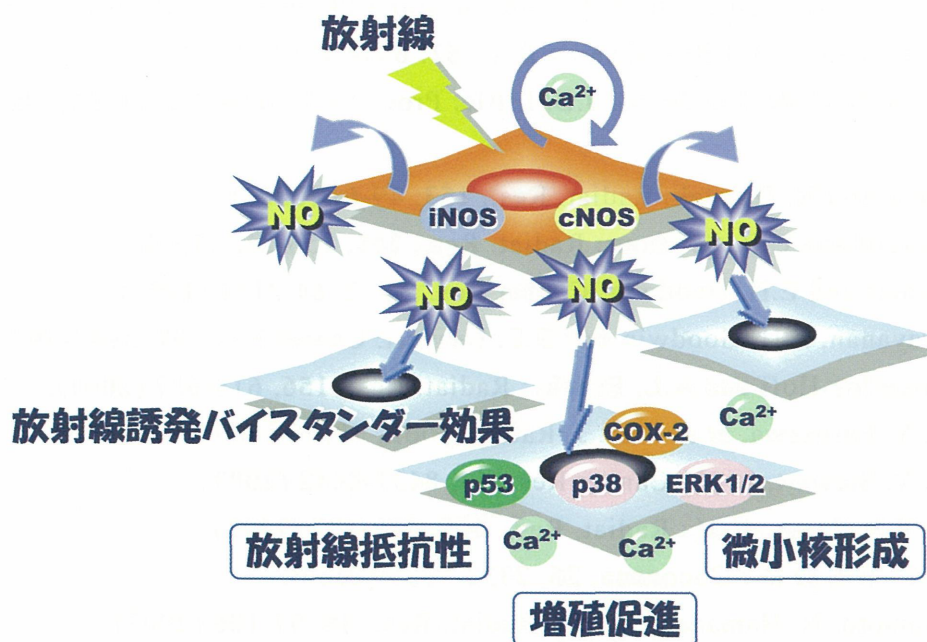


図 1. NO ラジカルを介した放射線誘発バイスタンダー効果.

4. おわりに

放射線誘発バイスタンダー効果の知見は、未だ大半が培養細胞レベルの実験結果であり、生体レベルでの知見は乏しい。しかしながら以前から放射線がん治療に関する基礎的および臨床的知見には放射線誘発バイスタンダー効果が関与していると思われる現象が報告されている。その代表が、「腫瘍床効果 (Tumor bed effect)」および「遠達効果 (Abscopal effect)」である。遠達効果は生体におけるバイスタンダー効果そのものであるとも考えられる。さらに生体における放射線誘発バイスタンダー効果、特に NO ラジカルを介した放射線誘発バイスタンダー効果の誘導機序・作用機序を明らかにすることが放射線がん治療の向上につながるものと確信して止まない。

最後になりましたが、執筆の機会を与えて下さいました関係各位に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) C. Nathan: FASEB J., **6**, 3051-3064 (1992).
- 2) K.L. MacNaul and N.I. Hutchinson: Biochem. Biophys. Res. Commun., **196**, 1330-1334 (1993).
- 3) H. Matsumoto, S. Hayashi, *et al.*: Int. J. Radiat. Biol., **76**, 1649-1657 (2000).
- 4) H. Matsumoto, S. Hayashi, *et al.*: Radiat. Res., **155**, 387-396 (2001).
- 5) S. Ambs, S.P. Hussain and C.C. Harris: FASEB J., **11**, 443-448 (1997).
- 6) J.K. Leach, S.M. Black, *et al.*: J. Biol. Chem., **277**, 15400-15406 (2002).
- 7) D.A. Wink, K.S. Kasprzak, *et al.*: Science, **254**, 1001-1003 (1991).
- 8) S. Moncada, R.M. Palmer and E.A. Higgs: Pharmacol Rev, **43**, 109-142 (1991).

- 9) B. Brüne, A. von Knethen and K.B. Sandau: Eur J Pharmacol, **351**, 261-272 (1998).
- 10) H. Nagasawa and J.B. Little: Cancer Res., **52**: 6394-6396 (1992).
- 11) E.I. Azzam, S.M. de Toledo and J.B. Little: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **98**, 473-478 (2001).
- 12) J. Albanese and N. Dainiak: Radiat. Res., **153**, 49-61 (2000).
- 13) C. Mothersill and C.B. Seymour: Radiat. Res., **149**, 256-262 (1998).
- 14) B.E. Lehnert and E.H. Goodwin: Cancer Res., **57**, 2164-2171 (1997).
- 15) P.K. Narayanan, E.H. Goodwin and B.E. Lehnert: Cancer Res., **57**, 3963-3971 (1997).
- 16) M.H. Barcellos-Hoff and A.L. Brooks: Radiat. Res., **156**, 618-627 (2001).
- 17) C. Shao, Y. Furusawa, *et al.*: Int. J. Radiat. Biol., **78**, 837-844 (2002).
- 18) C. Shao, V. Stewart, *et al.*: Cancer Res., **63**, 8437-8442 (2003).
- 19) C. Shao, F.M. Lyng, *et al.*: Radiat. Res., **166**, 479-487 (2006).
- 20) W. Han, L. Wu, *et al.*: Oncogene, **26**, 2330-2339 (2007).
- 21) H. Matsumoto, N. Hamada, *et al.*: J. Radiat. Res., **48**, 97-106 (2007).

細胞内酸化ストレス修飾による放射線アポトーシスの増感と防護

富山大学 大学院医学薬学研究部放射線基礎医学講座
近藤 隆 (E-mail: kondot@med.u-toyama.ac.jp)

1. はじめに

生体にとって酸素は生命活動に必須の分子であるが、酸素はその特異的な電子状態によりビラジカルと称され、電子移動により、より反応性の高い活性酸素に変化し、老化、発癌、そして多くの疾患の原因となる。放射線は、直接水分子を分解して細胞内に活性酸素を生成する。放射線による細胞死の多くは細胞内に生成した活性酸素に依存するので、この制御が重要となる。アポトーシスは遺伝子制御された細胞死であり、がん治療においても、この効率的誘導が一つの理想とされ、その過程に活性酸素・フリーラジカルが関与することが判明してきた。最近の研究で、温熱や超音波でも細胞内に活性酸素が生成し、これがアポトーシスに重要な役割を担うことが明らかとなった^{1, 2)}。放射線はがん治療の一翼を担っており、その重要性は益々増している。熱を利用したがん治療にはハイパーサーミアおよびラジオ波による組織アブレーションがある。近年、高密度焦点式集束超音波を用いた組織アブレーションも注目を集め、非観血的癌治療法として、前立腺癌や乳癌治療に利用され始めている。興味あることに、これらの制癌因子は生体作用の点では作用機序が異なるにも関わらずアポトーシスに細胞内活性酸素が関係することは共通している。本稿では、前半で放射線アポトーシスにおける細胞内活性酸素修飾による増感と防護について述べ、後半で温熱や超音波によるアポトーシスと細胞内活性酸素の関連に言及する。

2. 6-ホルミルプテリンによる放射線誘発アポトーシスの増感

生体内で葉酸代謝物として生成される 6-ホルミルプテリン(6-FP)は、細胞内で過酸化水素を生成し、生体防御に関与する。6-FP は、葉酸代謝産物として癌組織から分泌され尿中に認められることが知られている。本研究では放射線によるアポトーシス誘発に関する 6-FP 機能を探索し、放射線増感剤としての可能性を検討した。U937 細胞を用いて、6-FP 存在下で X 線(10Gy)照射、6 時間後のアポトーシス指標(DNA 断片化、形態学的変化、ホスファチジルセリンの細胞膜表面への発現、ミトコンドリアの膜電位の低下、カスパーゼ-3 活性、細胞内 Ca^{2+} の濃度)を調べた。6-FP は細胞毒性を示さない濃度でアポトーシスを増強した。過酸化物の測定に供した蛍光色素 DCFH の蛍光強度は 6-FP 処理および X 線照射により増加し、併用でさらに増加した。6-FP は細胞内で過酸化水素を恒常的に発生させ、アポトーシスを増強し、6-FP が放射線増感剤として利用できる可能性を示した。関連するアポトーシス情報伝達経路を調べたところ、併用時には PKC δ の細胞質からミトコンドリアへの移動、Fas 発現の増加、カスパーゼ-8、Bid の活性化、ミトコンドリア膜電位の低下、シトクロム c の遊離、およびカスパーゼ-3活性等の増強を認め、恒常的な過剰の活

性酸素生成が放射線アポトーシスの増強に参与することが判明した(図1)³⁾。

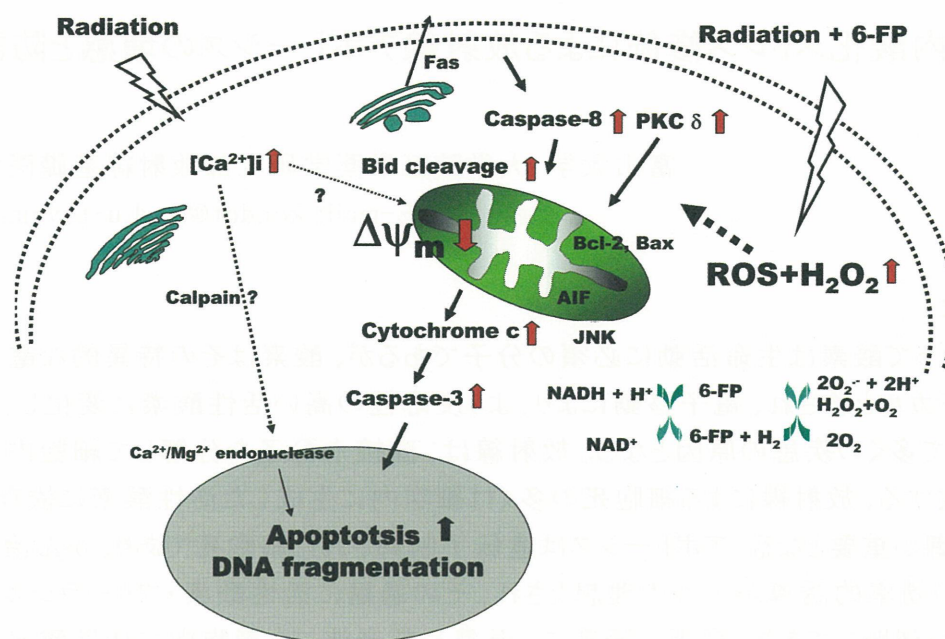


図1 6-FPによる放射線誘発アポトーシス増強の機構

6-FPは細胞内で過酸化水素を生成し、アポトーシス誘導を示さない濃度で、放射線誘発アポトーシスを増強する。図中の上向きおよび下向きの矢印(赤色)は6-FPおよび放射線併用によるアポトーシスの増強を示す。

3. シメチジンによる放射線誘発アポトーシスの防護

シメチジンは H₂ 受容体拮抗剤であり抗潰瘍薬として世界的に臨床に使用されているが、強力なヒドロキシルラジカル(・OH)消去作用を有することも知られている。また動物実験ではγ線、速中性子線などの放射線防護剤として作用することが報告されているが、細胞レベルにおける防護機構の詳細は未だ不明な点が多い。本研究ではヒトリンパ球を用いて、シメチジンの放射線誘発小核形成およびアポトーシスへの影響について検討した。ヒト末梢血リンパ球を分離し、放射線照射前後シメチジンで処理し、放射線誘発小核生成を調べた。アポトーシス、細胞内過酸化物およびスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂⁻)、カスパーゼ-3 活性の測定にはフローサイトメトリーを用いた。放射線誘発・OHとシメチジンの反応速度定数の測定には 5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド(DMPO) を用いて電子スピン共鳴(ESR)-スピン捕捉法で調べた。シメチジンを放射線照射前に添加した場合、放射線誘発小核形成率は濃度依存性に低下した。また照射直後に添加した場合も、小核形成率は低下した。また、シメチジンは放射線照射前処理、後処理のいずれにおいても放射線誘発早期アポトーシスを抑制し、カスパーゼ 3 活性を有する細胞の比率も有意に抑制した。細胞内過酸化物およびスーパーオキシド生成も低下傾向を示した。放射線誘発・OHとの反応速度定数が報告されている6種類の薬剤について、DMPO-OH 付加体量が 50%減少する薬剤濃度を求め、シメチジンのそれと比較することにより反応速度定数を得たところ、4.5×10⁹ L/mol/s であった。この値はギ酸ナトリウムに匹敵する高い値であ

り、シメチジンは強力な $\cdot\text{OH}$ 消去剤であることが示された。以上の結果より、防護効果は $\cdot\text{OH}$ 消去作用と細胞内での抗酸化作用によると考えられる。シメチジンは他の防護剤と比較して毒性が低いため、照射後投与が有効な放射線防護剤として有望と思われる⁴⁾。

4. 各種抗酸化剤による放射線および温熱誘発アポトーシスの防護

活性酸素である $\cdot\text{OH}$ と $\text{O}_2^{\cdot-}$ は様々な細胞傷害および細胞死、あるいは細胞内情報伝達において重要な役割を果たしている。特に前者は放射線による生体分子の初期損傷の主因とされ、また後者は温熱により細胞内に生成することが知られている。今まで抗酸化物質によるアポトーシス抑制効果に関して多くの研究成果が報告されているが、アポトーシスにおける両ラジカル、 $\cdot\text{OH}$ と $\text{O}_2^{\cdot-}$ の役割は、必ずしも明確でない。そこで、本研究では両者のアポトーシスへの関与を検討するため、アポトーシス抑制作用が知られている10種類の抗酸化物質による放射線および温熱アポトーシスの抑制効果と、これらのフリーラジカル消去効果の相関関係について調べた。両ラジカルと各種抗酸化物質との反応速度定数をDMPOを用いたESR-スピン捕捉法で調べた。その結果、放射線あるいは温熱誘発アポトーシスにおける抗酸化物質の抑制効果は、単純に $\cdot\text{OH}$ および $\text{O}_2^{\cdot-}$ の消去活性に依存しないことが示された。但し、薬剤の疎水性と温熱誘発アポトーシス抑制効果には有意な相関が認められ、細胞内での部位特異的な酸化ストレスが温熱アポトーシス制御に重要であることが示唆される⁵⁾。

5. ニトロキンドによる放射線および温熱誘発アポトーシスの増感

ニトロキンドであるTempoは常温で安定なフリーラジカルであり、細胞内スーパーオキシド除去、低酸素細胞の放射線増感および酸素性細胞放射線防護など多様な作用をもち、さらにJNK活性化作用を持つことが報告されている。本研究ではTempoが放射線および温熱アポトーシスを防護するのか、または増強するのかについて調べた。ヒトリンパ腫細胞株U937を用いて、第一に放射線アポトーシスへの影響を検討したところ、低酸素条件下では増強効果が、通常の空気条件下では抑制効果が認められた。

一方、Tempoを温熱処理と併用するとアポトーシスを顕著に増強することを新たに見出した。特にアポトーシスを誘導しない濃度の5 mM Tempoを44°C/10分間の温熱処理と併用すると44°C/30分処理に匹敵する顕著なアポトーシス増強を誘発した。10 mM Tempo及び44°C/30分間処理では30および80%のアポトーシスを誘発し、その分子機構としてBaxによるシトクロムcの遊離およびDEVDase活性化を認めた。両者併用処理でBaxによるシトクロムcの遊離を誘発し、さらに特異的なpyknotic細胞死を誘発し、回復不能な細胞増殖抑制を認めた。Tempoは早期に一時的に H_2O_2 と $\text{O}_2^{\cdot-}$ の上昇を誘導し、温熱は遅れて $\text{O}_2^{\cdot-}$ だけを誘導した。Tempo、温熱および併用処理のどの処理でもミトコンドリアの Ca^{2+} 上昇が認められた。10 mM Tempoと44°C/30分間併用処理では不可逆的なミトコンドリア機能低下を介して約97%のzVAD-抵抗性低ミトコンドリア膜電位細胞を誘発した。以上の結果からTempoおよび温熱処理では酸化ストレスあるいはミトコンドリアの Ca^{2+} はBaxを介したシトクロムcの遊離によるアポトーシスを促進した。Tempoは温熱併用時に増感剤として作用し、回復不

能な pyknotic 細胞死を誘導し、その機構は不可逆的ミトコンドリア機能低下を介することが判明した⁶⁾。

6. 温熱および超音波誘発アポトーシスと細胞内酸化ストレス

癌のハイパーサーミア治療においても効率的アポトーシス誘導は重要である。当教室では温熱誘発アポトーシス時に、過剰の細胞内活性酸素生成を認め、この修飾が温熱誘発アポトーシスを増強あるいは抑制することを報告してきた⁷⁻¹²⁾。

また、癌の診断に広く利用されている超音波の新たな癌治療応用の可能性を期待し、主に遺伝子導入、アポトーシス誘導および遺伝子発現の変化について検討してきた。超音波誘発アポトーシスの機構について、超音波照射後に添加した抗酸化剤が、有意にアポトーシスを抑制することから、超音波によるミトコンドリア損傷に起因する細胞内酸化ストレスが重要な役割を果たすことが判明した。また、薬剤の併用によるアポトーシスの増強および低強度パルス波によるアポトーシスの誘発を見出した。超音波により発現変動する遺伝子の網羅的検討を行い、発現が増強された遺伝子としてヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) と v-jun、低下した遺伝子として v-myb と カセプシン G を認めた。HO-1 の誘導機構について、照射後に添加した抗酸化剤が有意に HO-1 発現を抑制することから細胞内に生成する活性酸素種の重要性を示した¹³⁻¹⁷⁾。

7. おわりに

物理的エネルギーの癌治療への応用と最適化をめざして、放射線、超音波、および温熱を対象に、これらの作用を比較しながらアポトーシス研究を進めてきた。癌細胞に効率的にアポトーシスを誘導できれば癌治療の効率を高めると思われる。癌細胞はその発生過程において p53 変異やアノイキス耐性を獲得するなど、一般にアポトーシス誘導に抵抗性を示す。一方、放射線誘発アポトーシスに抵抗性の癌細胞も、ある種の抗癌剤に対しては相当のアポトーシスを起こす、あるいは、非同調時にはアポトーシスを起こさないが、細胞周期の同調によりアポトーシスを起こすことが可能となるなど、アポトーシスの情報伝達の機構が明らかになってきた現在でも、不明な点が数多く残されている。放射線は、直接水分子を分解して細胞内に活性酸素を生成し、これが放射線の間接作用として知られ、生物作用の主たる原因とされるが、アポトーシスに関しては必ずしもこれがあてはまるとはいえない。一方、超音波や温熱は細胞内に直接、活性酸素を生成するとは考えにくい。アポトーシスに関しては細胞内に生成する活性酸素が重要な役割を果たすものと思われる。これらの制癌因子は作用機序が異なるにも関わらずアポトーシスにおける細胞内活性酸素の重要性では共通性があり、今後、細胞内活性酸素修飾によるアポトーシスの増感と防護についてさらに研究する必要がある。

8. 文献

- 1) H. Hirano, Y. Tabuchi et al.: Apoptosis 10: 331-340 (2005).
- 2) H. Honda, T. Kondo et al.: Ultrasound Med. Biol. 30, 683-692 (2004).
- 3) Z.-G. Cui, T. Kondo et al.: Free Radic. Res. 38, 363-373 (2004).
- 4) Y. Kojima, T. Kondo et al.: Free Radic. Res. 36, 255-263 (2002).

- 5) Z.-G. Cui, T. Kondo et al.: *Apoptosis* 9, 757-763 (2004).
- 6) Q.-L. Zhao, Y. Fujiwara and T. Kondo: *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1131-1143 (2006).
- 7) F.-J. Li, T. Kondo et al.: *Free Radic. Res.* 35, 281-299 (2001).
- 8) Y. Arai, T. Kondo et al.: *J. Biol. Chem.* 277, 18986-18993 (2002).
- 9) F.-J. Li, T. Kondo et al.: *Int. J. Hyperthermia* 19, 165-177 (2003).
- 10) H. Yuki, T. Kondo et al. *Free Radic. Res.* 37, 631-643 (2003).
- 11) S. Wada, Z.-G. Cui, et al.: *Int. J. Hyperthermia* 21, 231-246 (2005).
- 12) Z.-G. Cui, T. Kondo, and H. Matsumoto: *J. Cell. Physiol.* 206, 468 (2006).
- 13) Y. Tabuchi, T. Kondo et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 498-503 (2002).
- 14) L.B. Feril Jr. and T. Kondo: *J. Radiat. Res.* 45, 479-489 (2004).
- 15) L.B. Feril Jr., T. Kondo et al.: *Cancer Lett.* 221, 145-152 (2005).
- 16) G. Kagiya, R. Ogawa et al.: *Ultrason. Sonochem.* 13, 388-396 (2006).
- 17) H. Ando, L.B. Feril Jr. et al.: *Cancer Lett.* 242, 37-45 (2006)

がん幹細胞と放射線治療抵抗性

京都大学放射線生物研究センター

丹羽太貫

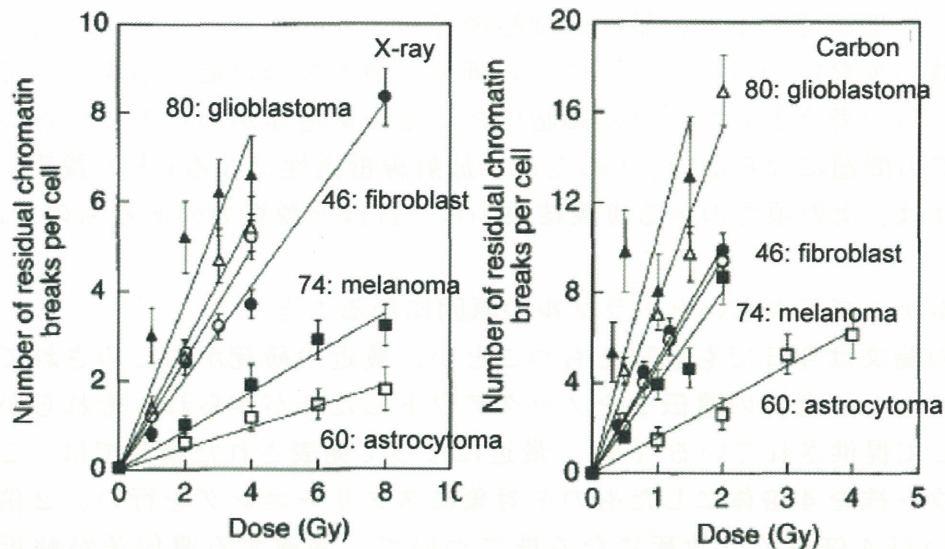
1. はじめに

放射線の医学利用は X 線の発見後まもなく始まったが、研究については放射線作用ではなく、もっぱら物理工学サイドで展開した。しかし 1950 年代に生物物理学が誕生し、ここで放射線が多用されたことから放射線生物学が生まれ、これが放射線治療の理論的基盤として有用であったため急速に研究が展開した。しかし、明らかになった細胞の放射線感受性の機構で放射線治療の現場に強い影響を与えたものは、分割照射の機構としての **sublethal damage repair** くらいで、近年の放射線治療の発展は、ひとえに腫瘍への線量の集中を可能にした物理工学的手法に負っている。これは放射線医学に特異な状況で、他の医療分野では生命科学の取り入れが急であることと好対照をなしている。その一方で放射線生物学が深く関わっている細胞の損傷応答と DNA 損傷修復の研究は、生命科学の最先端分野として展開しており、そのなかから治療にとってもきわめて重要なものが現れ始めている。そして生命科学のなかで急速に展開している幹細胞生物学も、「がん幹細胞」の存在が明らかになったことから、放射線治療の副作用に対する治療としてのみならず、がんそのものの治療における意味も急速にましている。

本講演では、まずこれまでに放医研で明らかにされた細胞レベル放射線感受性の研究成果について述べ、次にこの研究の放射線生物学での位置づけ、最近になって展開しているがん幹細胞との接点、などをまとめた。

2. 極めて放射線抵抗性のがん細胞があること

がん細胞の放射線感受性に関してこれまで多くの研究があり、放医研の研究でも、放射線抵抗性がん細胞の奇妙な側面が明らかになっている。例えば放医研の鈴木雅雄博士は、複数の神経膠腫細胞株について X 線と炭素線による照射後、コロニー形成率で放射線感受性を、24 時間後の染色体断片数で修復能を、それぞれしらべている (1)。両放射線ともにコロニー生存率で星状膠細胞腫 (染色体数 60 本) では、ヒト正常 2 倍体繊維芽細胞 (染色体数 46 本) にくらべて倍近い放射線抵抗性を示す。図 1 は照射後の染色体断片数であるが、星状膠細胞腫では正常細胞の 1/4 程度ときわめて低い。これは放射線抵抗性と修復能が相関することを示すもので、放射線生物学の常識からきわめてもったもな結論といえる。



Int J Radiat Biol 76, 1189, 2000

図1 放射線抵抗性のがん細胞があること（図中の数字は染色体数）

しかし不思議なのは、星状膠細胞腫は正常細胞にくらべて染色体数が多いので、照射直後の染色体断片数は多いはずにもかかわらず、24 時間後の染色体断片数は少ない点である。図2は1964年に H. S. Kaplan 先生が発表したもので、1本鎖核酸のウイルスから哺乳動物細胞まで、放射線感受性とゲノムサイズの関係を示している。生命進化にともなって修復能が増大すること、および同じ修復能であればゲノムサイズが大きいほど放射線感受性が高くなることを示し、損傷数が感受性を規定していることを示す放射線生物学の古典となっている（2）。これに照ら

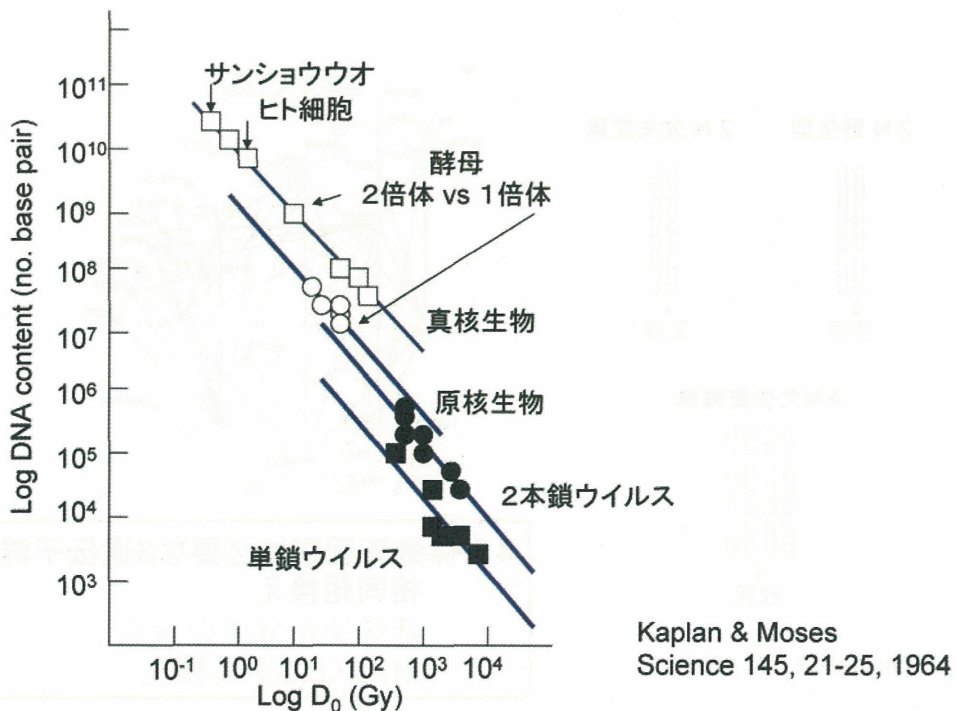


図2 ゲノムサイズと放射線感受性

して図1の結果を考えると、星状膠細胞腫でゲノムサイズが大きいにもかかわらず染色体数が少ないのは、ひとえにこの細胞の強大な修復能を示すものである。ただ以前からの考えとして「がん細胞はたくさん染色体があるのでひとつぐらいなくなっても問題にならない、そのために放射線抵抗性になる」との説明がある。しかしこれは、次の項でのべる実験結果からそれほど説得力のあるものではない。

3. ゲノムサイズが大きいとトラブルの原因になること

文献2の論文は今日でも意味をもつことが、最近の研究からしめされている。酵母ではほとんど全ての遺伝子をノックアウトした株が作られ、それらがライブラリーとして提供されている(3)。最近になって発表された論文では、これらのノックアウト株を4倍体にしたものを対象にスクリーニングを行い、2倍体では影響がないが4倍体では致死になる株について、関連する遺伝子が解析された(4)。その結果4倍体で欠損があると生存できない遺伝子は、相同組換え、姉妹染色分体の接着、M期スピンドル装置、の3群に分類されることが明らかになった。これは、自然状態でゲノムには常に損傷が作られており、それはゲノムサイズに依存して増加すること、そしてゲノム安定性保持機構が機能しないと問題が深刻になって細胞は生存できないこと、を示している。以前から Rad51 欠損は酵母では問題ないのに、哺乳類や鳥類の細胞では重篤な影響を持つことが知られていた。これは両生物の Rad51 が異なる機能を持つためと説明されていたが、今回の論文からすると結局は酵母とのゲノムサイズの差すなわち損傷の数の差で説明がつく。すなわち、がん細胞での放射線抵抗性についての「染色体が少しくらいなくなっても問題にならない」という説明は説得力がない。

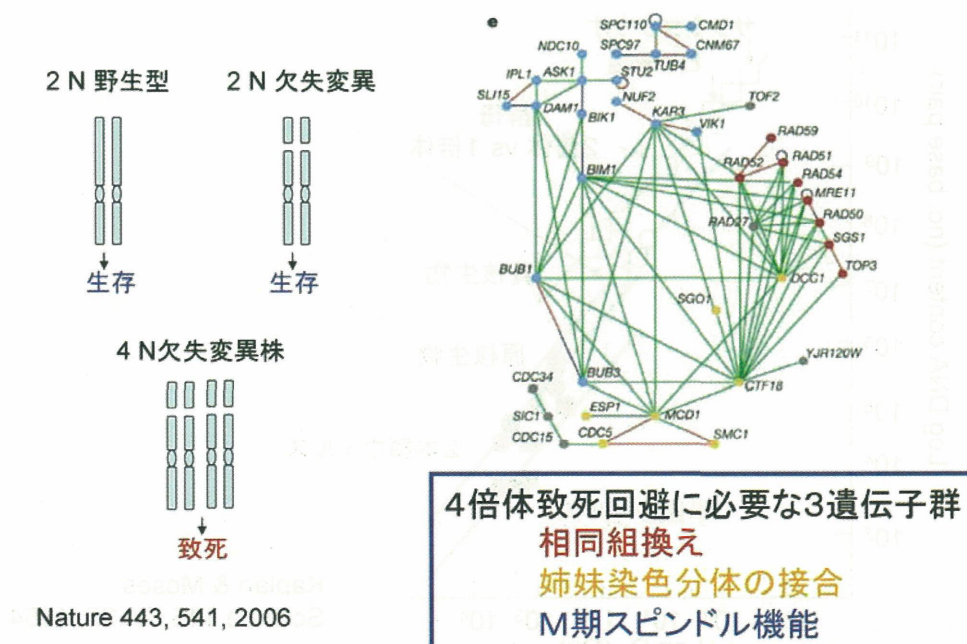


図3 ゲノムサイズとゲノム安定化機構

4. がん細胞の放射線抵抗性とがん幹細胞

がんの放射線抵抗性の機序については、すでにみた細胞レベルの抵抗性と低酸素などの組織レベルの問題がある。しかしこれらの抵抗性の機序の詳細はまだ不明な部分が多い。ただ最近になってがんの生物学が急速に発展し、腫瘤を形成する細胞には、不死性をもち少数の細胞の移植でもがんを作りうるものと、移植性の低い細胞が混在していることが明らかになった。この2者のうち、前者はがん幹細胞とよばれ、前立腺がん、乳がん、すい臓がん、肺がん、脳腫瘍、軟部組織腫瘍、それに造血器腫瘍、で存在が証明されている。これらのがん幹細胞は、母地組織の組織幹細胞と多くの共通性を持っている。

さてこのような研究の発展から、がん治療についての従来の考え方が変わりつつある。すなわち従来の治療では、がん細胞であれば根こそぎ根絶するというものであった。これに対して、がん幹細胞さえ殺せばあとの下っ端がん細胞は自動的に根絶やしになるという治療の基本が提唱されはじめた。そして治療過程のモデル化研究でもがん幹細胞を殺すことの重要性が示されている（5）。

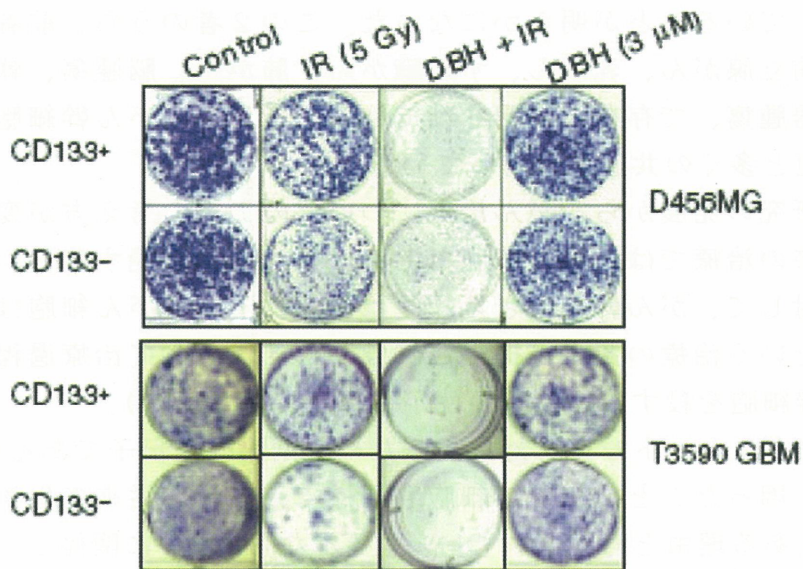
組織幹細胞はさまざまなストレスに対抗するため薬剤耐性遺伝子であるMDRの発現レベルが高い。困ったことにがん幹細胞も同様で、これが従来の化学療法で効果がいまひとつである理由と考えられている。それならMDRに関係しない放射線治療ならがん幹細胞を殺せるかというところでもないことが最近明らかになり、放射線でもがん幹細胞の問題は避けて通れないことがしめされつつある（6）。

放射線治療抵抗性で悪名高い神経膠腫には、神経幹細胞の表面抗原であるCD133を持つがん幹細胞が存在する。ヒト神経膠腫あるいはそれを培養したもので放射線照射後に調べると、CD133を持つがん幹細胞の相対比が増加していることが明らかになった（6）。CD133発現細胞を分取し、幹細胞と非幹細胞にわけて放射線照射を行うと、果たせるかな前者は抵抗性であることが示された。そしてその抵抗性の機構としてがん幹細胞でATM、Rad17、Chk1、Chk2などの損傷応答機構タンパクの活性が常に上昇して、DNA2重鎖切断の再結合能も高いことが示された。ここでみられた放射線抵抗性は、図4に示したようにChk1とChk2の阻害剤であるdebromohymenialdisineの投与で失われる。以上は神経膠腫のがん幹細胞が放射線抵抗性が損傷応答機構と不可分に関係していることを示し、今後の難治性がんの放射線治療を考えるうえできわめて重要である。

5. まとめ

がん細胞の放射線抵抗性の機序は、従来低酸素細胞の放射線抵抗性のみが明らかにされており、これについてはHIFとの関係で研究が進展している。しかしここでのべた神経膠腫の研究から、がん幹細胞の生物学的特性という新たな問題が浮上してきた。しかしながら低酸素分画とがん幹細胞の問題はかならずしも不可分ではなく、密接に関連している可能性がある。すなわち、組織幹細胞の多くは組織の低酸素部位に局在する。がん幹細胞が腫瘤のなかでどの部分に多いのか、いまだに研究はなされていないが、組織幹細胞との類似性からすれば、腫瘤中の

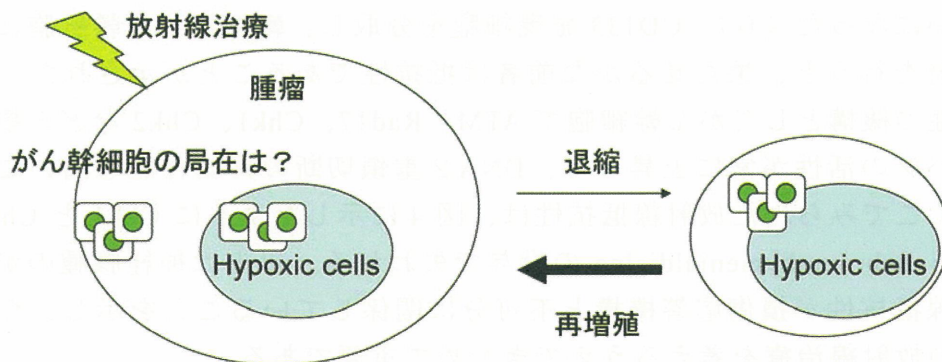
低酸素部位にあっても不思議はない。すなわち、図5に示すように、がん幹細胞については、幹細胞としての特性と、腫瘍内微小環境の特性の両方から解析されるべきであろう。従来物理工学が全てであったがんの放射線治療は、ここで述べたような研究を通じて放射線生物学も取り込み、より総合性のたかいものに展開してゆくことが望まれる。



CD133+ 神経膠腫細胞のChk1/2 阻害剤による増感

Nature 444, 756, 2006

図4 神経膠腫幹細胞の放射線抵抗性



Hypoxic cell と 幹細胞の関係は？

図5 放射線治療の標的：hypoxia+がん幹細胞

文献

- 1) Suzuki M et al. Correlation between cell killing and residual chromatin breaks measured by PCC in six human cell lines irradiated with different radiation types. Int J Radiat Biol. 76, 1189-1196, 2000.

- 2) Kaplan HS and Brown LE. Biological complexity and radiosensitivity. *Science* 145, 25, 1964.
- 3) Winzeler EA et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285, 901-906, 1999.
- 4) Storchova Z et al. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* 443, 541-547, 2006.
- 5) Michor F et al. Dynamics of chronic myeloid leukemia. *Nature* 435, 1267-1270, 2005.
- 6) Bao S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of DNA damage response. *Nature* 444, 756-760, 2006.

独立行政法人放射線医学総合研究所
第6回重粒子医科学センターシンポジウム
「放射線がん治療を支える基礎研究」

主 催：独立行政法人放射線医学総合研究所
後 援：日本放射線影響学会
場 所：放射線医学総合研究所
重粒子治療推進棟2階・大会議室
日 時：平成18年12月14日(木)・15日(金)
参加費：無料

第1日目 12月14日(木)

時 間	セッション及び演題	座長・演者
9:30- 9:45	開会の辞	岡安隆一(総合司会) 米倉義晴(放医研理事長)
9:45-10:35	重粒子線がん治療 オーバービュー	座長：遠藤真広(放医研) 鎌田 正(放医研)
10:35-10:50	(コーヒーブレイク)	
10:50-11:20	消化器癌に対する重粒子線治療の現状	座長：岩川真由美(放医研) 山田 滋(放医研)
11:20-11:50	婦人科がんに対する放射線治療：臨床検体を用いた制がんと発がんの研究	大野達也(放医研)
11:50-13:30	(昼 食)	
13:30-14:00	癌治療と基礎研究 遺伝子発現プロファイルからみた炭素線治療効果	座長：今井高志(放医研) 岩川真由美(放医研)
14:00-14:30	炭素線治療の生物学的利点	安藤興一(放医研)
14:30-15:20	特別講演 ポリADP-リボシル化反応	三輪正直(長浜バイオ大学)
15:20-15:35	(コーヒーブレイク)	
15:35-16:05	分子イメージング基礎研究 放射線誘発核内ドメインの動態	座長：安西和紀(放医研) 田代 聡(広島大学)
16:05-16:35	放射線治療のサポートを目的とする磁気共鳴ファンクショナルイメージング法の開発	松本謙一郎(放医研)
16:35-17:05	オーバーハウザーMRIによる生体内レドックスの分子イメージング	内海英雄(九州大学)
17:05-17:35	総合討論	座長：岡安隆一(放医研)
17:35-19:00	懇親会(於・重粒子治療推進棟1階食堂)	

第2日目 12月15日(金)

時 間	セッション及び演題	座長・演者
9:45-10:15	放射線物理学基礎研究	座長：金井達明（放医研）
10:15-10:45	治療用炭素線の物理的性質	小森雅孝（放医研）
	放射線と原子物理学	東 俊行（首都大学東京）
10:45-11:00	（コーヒーブレイク）	
	放射線生物学基礎研究	座長：安倍真澄（放医研）
11:00-11:30	個人の放射線感受性とその指標	加藤宝光（放医研）
11:30-12:00	血管新生の制御と放射線治療効果	三浦雅彦（東京医科歯科大学）
12:00-13:30	（昼 食）	
13:30-14:20	特別講演	座長：丹羽太貫（京都大学）
	蛋白質リン酸化による細胞増殖制御-Tob、Kizを中心に	山本 雅（東京大学）
14:20-14:35	（コーヒーブレイク）	
	放射線生物学基礎研究	座長：古澤佳也（放医研）
14:35-15:05	腫瘍細胞の放射線応答へのNOラジカルの関与	松本英樹（福井大学）
15:05-15:35	細胞内酸化ストレス修飾による放射線アポトーシスの増感と防護	近藤 隆（富山大学）
15:35-16:05	組織再生、発がん、制がん、と幹細胞放射線生物学	丹羽太貫（京都大学）
16:05-16:35	総合討論	座長：岡安隆一（放医研）
16:35-16:45	閉会の辞	辻井博彦（放医研重粒子医科学センター長）

第6回放医研重粒子医科学センターシンポジウム
 実行ワーキンググループ（平成18年度）

事務局：重粒子医科学センター
 企画部国際・交流課

区分	氏名	所属及び職名
委員長	岡安 隆一	粒子線生物研究グループリーダー
委員	松本謙一郎	粒子線生物研究グループ放射線効果修飾研究チーム主任研究員
委員	藤森 亮	粒子線生物研究グループ細胞分子機構研究チームリーダー
委員	小橋 元	ゲノム診断研究グループ遺伝統計研究チームリーダー
委員	石川 顕一	ゲノム診断研究グループ遺伝情報研究チーム研究員
委員	齋藤 俊行	先端遺伝子発現研究グループ遺伝子発現研究チーム主任研究員
委員	田端 義巖	先端遺伝子発現研究グループ博士研究員
委員	今井 礼子	病院治療課第1治療室医長
委員	田巻 倫明	病院治療課医員
委員	兼松 伸幸	物理工学部治療システム開発室主任研究員

放医研シンポジウムシリーズ
第6回重粒子医科学センターシンポジウム
「放射線がん治療を支える基礎研究」
平成19年3月刊行

発行 独立行政法人 放射線医学総合研究所
郵便番号 263-8555
住所 千葉県千葉市稲毛区穴川4丁目9番1号
連絡先 独立行政法人 放射線医学総合研究所
企画部 国際・交流課
TEL : 043-206-3024 FAX : 043-206-4061
ホームページ <http://www.nirs.go.jp>

印刷 株式会社 さくら印刷