

放射光のがん治療応用のための基礎研究 Cancer Therapy Application with Synchrotron Radiation

佐藤克俊、秋野祐一、松本政雄、沼崎穂高、木原彩佳、三上麻里、手島昭樹

Katsutoshi Sato, Yuichi Akino, Masao Matsumoto, Hodaka Numasaki, Ayaka Kihra,

Mari Mikami, Teruki Teshima

大阪大学大学院医学系研究科 医用物理工学講座

Department of Medical Physics & Engineering, Osaka University Graduate School of Medicine

アブストラクト

Photon Activation Therapy (PAT)のがん細胞の転移・浸潤能へ与える影響を評価する。IUdR を投与したヒト線維肉腫細胞株(HT1080)に 50keV 単色 X 線を照射し、生存率・浸潤・遊走・接着能・integrin の発現の変化を評価した。その結果、顕著な生存率低下が示され、浸潤能・遊走能は抑制、接着能は線量依存的に亢進、integrin の発現は若干亢進した。これらより、PAT はがん細胞の浸潤・遊走能を抑制する可能性が示唆された。

Abstract

The effects of Photon Activation Therapy (PAT) on cancer metastasis were evaluated. Human fibrosarcoma cell line (HT1080) was irradiated with 50 keV monochromatic X-ray after IUdR treatment. After irradiation, cell survival, invasion, chemotaxis, adhesion, and integrin expression were measured. In the result form irradiation with IUdR, cell survival was significantly decreased. Cell invasion and chemotaxis capability were inhibited. Cell adhesion was increased dose-dependent manner. Integrin expression was slightly promoted. These findings suggest that PAT inhibit cell invasion and chemotaxis capability.

背景と研究目的：

近年、放射光技術の発展により高強度 X 線が利用可能となり、Microbeam Radiation Therapy (MRT)や Photon Activation Therapy (PAT)について研究が行われている。PAT とはがん細胞に特定の元素を取り込ませた後、この元素の K 殻電離を引き起こすエネルギーの X 線を照射することにより発生する Auger 電子を利用して放射線増感効果を得る方法である。PAT において、細胞致死効果の研究はいくつか報告されているが¹⁾、がん治療において問題となる細胞の浸潤・転移能に対する研究は国内外でも行われていない。

我々は、亜致死線量の X 線ではがん細胞の転移能が亢進するが、炭素線・陽子線の照射により、転移能は抑制されることを明らかにした³⁾。本研究では、PAT の細胞生存率へ与える影響とともに、浸潤・転移能へ与える効果について検討する。

実験および方法：

① 対象および薬剤：細胞は HT1080（ヒト線維肉腫細胞株）を、¹²⁷I を DNA に摂取させるための薬剤として 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR)を用いた。

② 照射方法：IUdR 10 μ M を細胞培養液に添

加し、その 48 時間後に X 線照射した。エネルギーは 50keV、ビームサイズは 300mm×5mm、線量率は 0.04Gy/min の単色 X 線を用い、0、2、4、8Gy 照射した。

③ 実験方法：X 線照射後の生存率を Colony formation assay によって、照射 24 時間後の浸潤能、遊走能、接着能、integrin 発現の変化をそれぞれ、Matrigel invasion assay、Boyden chamber assay、Cell adhesion assay、Flow cytometry により評価した。

結果：

- ① Colony formation assay：IUdR 投与群において顕著な生存率低下を確認した(Fig. 1)。
- ② Matrigel invasion assay：IUdR 投与群に 8Gy 照射すると、浸潤能が抑制された (Fig. 2A)。IUdR 非投与群に 2、4、8Gy 照射すると、浸潤能が亢進した。一方、IUdR 投与群に各線量の X 線を照射すると、IUdR 非投与群でみられた浸潤能の上昇は抑制された (Fig. 2B)。
- ③ Boyden chamber assay：IUdR 投与群に対して 4、8Gy 照射すると、遊走能を大きく抑制できた(Fig. 3A)。また、IUdR 投与群においては線量依存的に遊走能が抑制される傾向が示された(Fig. 3B)。
- ④ Cell adhesion assay：collagen, laminin, fibronectin に対する接着能は IUdR 投与群において線量依存的に亢進した(Fig. 4A)。一方、IUdR 非投与群では非照射時(0Gy)と比較すると亢進する傾向を示したが、線量を増加させても接着能の変化はみられなかった(Fig. 4B)。
- ⑤ Flow cytometry： $\alpha v \beta 3$ の発現の変化はみられないものの、 $\alpha 3$ の発現が IUdR 投与群で若干亢進した(Fig. 5)。

考察：

細胞に IUdR を投与した場合、これらは DNA に取り込まれる。したがって、薬剤投与後に PAT を行った場合、DNA 近傍から Auger 電子が発生する。この電子により効率的に DNA 鎖切断を引き起こし、放射線増感効果をもたらすと考えられている。また、PAT に最適なエネルギーについての研究では、50keV で最大の増感効果が示された^{1), 2)}。

本研究における Colony formation assay による細胞生存率の評価では、IUdR10 μ M の投与により顕著な増感効果を確認できた。薬剤の濃度は Corde ら¹⁾の報告と同量であり、同等の増感効果であるといえる。しかし、用いた X 線エネルギーは 50keV のみであるため、この生存率減少の要因は、IUdR の毒性効果か、PAT の効果であるか証明できなかった。

Matrigel invasion assay、Boyden chamber assay において、PAT により浸潤能・遊走能を抑制できる可能性が示された。しかし、非照射時に薬剤の効果のみを比較すると IUdR の投与により浸潤能を亢進させ(Fig. 2A)、遊走能を抑制することがわかる(Fig. 3A)。これらより、浸潤能・遊走能に対する PAT の効果を評価するためにはこれらに影響のない薬剤濃度での実験が必要である。

Cell adhesion assay において IUdR 投与群に X 線照射を行った場合、線量依存的に各基質に対する接着能が亢進しており(Fig. 4A)、今後は異なる接着分子に対して Flow cytometry を行う必要がある。

以上より、単色 X 線による PAT は浸潤能・遊走能を抑制できる可能性が示唆された。

今後の展望：

今後は今回得られた結果をもとに、X線エネルギーを33、50、100keVとし照射を行う。さらに薬剤濃度を低下させて同様の実験を行い、再現性を得る必要がある。また、一般の放射線治療との有用性の比較のため、LINAC 4MV X線で照射する必要がある。

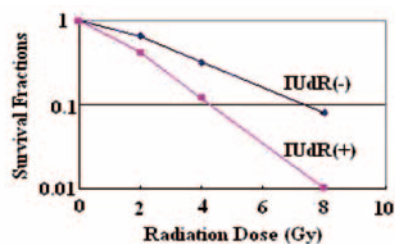


Fig. 1. Colony formation assay.

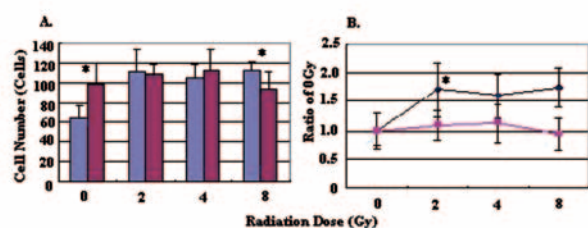


Fig. 2. Matrigel invasion assay. (A) ■: IUDR(-), ■: IUDR(+) (B) Blue and red line were shows IUDR(-) and IUDR(+), respectively. (*: $p < 0.05$)

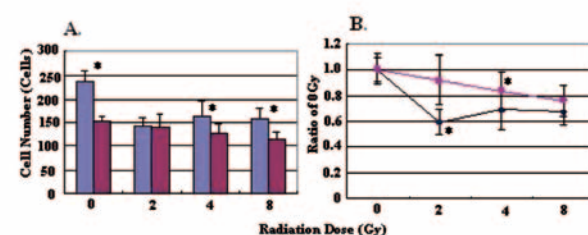


Fig. 3. Boyden chamber assay. ■: IUDR(-), ■: IUDR(+). (B) Blue and red line were shows IUDR(-) and IUDR(+), respectively. (*: $p < 0.05$)

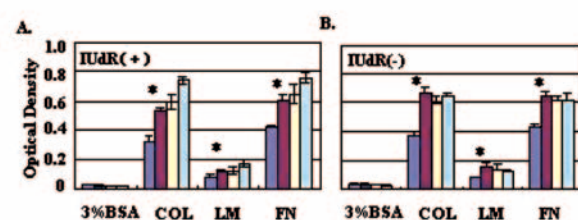


Fig. 4. Cell adhesion assay. ■: 0Gy, ■: 2Gy, ■: 4Gy, ■: 8Gy (*: $P < 0.05$)

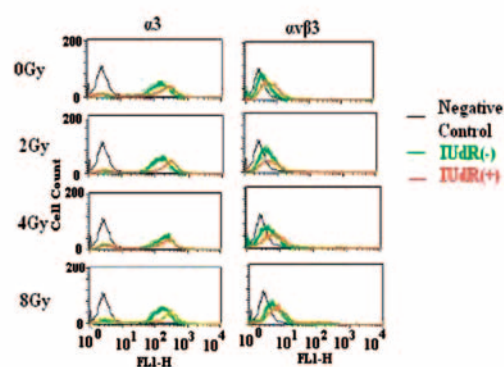


Fig. 5. Integrin expression using flow cytometry.

参考文献：

- 1) Corde S, Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity Enhancement following Photoelectric Effect on Stable iodinated Compounds. Br J Cancer 2004; 91:544-551.
- 2) Karnas J S, Optimal photon energies for IUDR K-edge radiosensitization with filtered x-ray and radioisotope sources. Phys. Med. Biol. 1999; 44:2537-2549.

論文発表状況：

- 3) Ogata T, Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. Cancer Res 2005; 65:113-120
- 4) Takahashi Y, heavy ion irradiation inhibits *in vitro* angiogenesis even at sublethal dose. Cancer Res 2003; 63:4253-4257.

キーワード：

放射線治療・放射線生物学・PAT (Photon Activation Therapy)