

イオンビームと X 線の併用によるがん治療高度化に向けた治療生物学的な研究

公益財団法人若狭湾エネルギー研究センター
研究開発部 粒子線医療研究室
主任研究員 前田 宗利
mmaeda@werc.or.jp

1. はじめに

福井県若狭湾エネルギー研究センター（福井県敦賀市、以下「エネ研」）では、様々な原子力関連施設が集積している若狭湾周辺地域の発展のために、関連科学技術を有効活用した様々な研究開発を推進している。1998年の開所以来、エネ研では陽子線がん治療の社会実装を目指した研究開発を進めてきた。放射線治療には X 線が多用されているが、体表近くで線量が最大になり、深部に行くにしたがって減衰していく。一方で、荷電粒子（イオンビーム）である陽子線は、体表近くでは比較的低線量であるが、深部で停止する直前に最大のエネルギーを放出する（ブラッグピーク）という物理特性を持っている。このブラッグピークを体内の腫瘍の大きさに合わせて調節した拡大ブラッグピーク（spread out Bragg peak, SOBP）を用いて治療を行うことで、周辺の正常組織への線量を低く保ったまま腫瘍に高線量を照射することができる。このため、陽子線治療は、従来よりも正常組織への悪影響が小さく、治療後も高い生活の質（quality of life, QOL）を維持できる治療法として期待されていた。エネ研の陽子線がん治療装置（日立製作所の粒子線治療システムの原型機）は 2001 年に完成した。2002～2009 年度にかけて同装置の治験および陽子線がん治療の臨床研究を実施し、累計 62 例（前立腺がん 55 例、肝細胞がん 6 例、非小細胞肺癌 1 例）の治療を行い、良好な成果を得た。この間に得られた様々な知見は、次世代の治療装置に反映され、国内外に多くの陽子線治療施設が稼働あるいは建設が進められている。福井県では、エネ研で培われた技術や経験を基に、陽子線治療専用施設として陽子線を多方向から自在に照射することのできる回転ガントリー照射室を備えた陽子線がん治療センターが福井県立病院に 2011 年 3 月に開設された。2022 年 3 月までに 1,688 名の患者さんが治療を受けている。陽子線治

療の社会実装が実現し、臨床機能が県立病院へ移転された後、エネ研では、細胞から動物レベルまでの幅広い基礎研究に対応するための施設整備を行った。現在は、医療現場や近隣大学、福井県など地域に根差した連携体制を構築し、医療現場のニーズに対応した研究開発や粒子線医療の高度化に向けた基礎研究に取り組んでいる。本稿では、一連の基礎研究から得られた、陽子線と X 線の併用が細胞致死効果に与える影響およびその作用機序、陽子線と X 線の併用によるがん治療効果について概説する。

2. 陽子線と X 線を併用した集学的がん治療の構想

がんは日本人の死因として第 1 位（約 30%）の疾患で、生涯のうちに国民の 2 人に 1 人が罹患すると推計されている^{1,2)}。がんの治療法は、外科的療法、内科的療法、放射線療法の 3 つに大別されるが、近年では、様々な治療法の長所を組み合わせた集学的治療が積極的に活用されつつある。一連の研究を開始した 2013 年頃、原発病巣以外の転移がん、治療部位に放射線治療の既往がある場合や、比較的広範囲に病変が見られる進行がんなどは陽子線治療の適用外の症例であった。福井県立病院陽子線がん治療センターでは、線量の集中性が良好でがん細胞を殺傷する効率の高い陽子線治療と広い範囲を治療しやすい X 線治療を組み合わせること（混合放射線治療）により適用症例の拡大を図り、さらに将来的には抗がん剤などによる内科的療法の併用（混合化学放射線治療）を視野に入れた新しい集学的がん治療構想が検討されていた³⁾。具体的には、原発病巣やリンパ節転移を陽子線で治療し、その周辺の腫瘍の浸潤が予測される領域や予防領域を X 線で治療することで、広範囲に病変のある進行がんの治療を実現し、抗がん剤などを併用してさらに治療効果の拡大を図る構想であった。その一方で、異なる種類

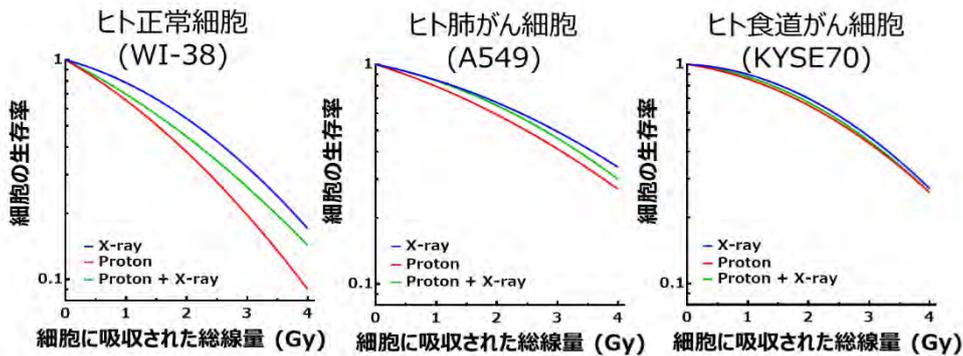


図1 同線量の陽子線とX線を模擬的に同時に照射した細胞の線量-生存率曲線

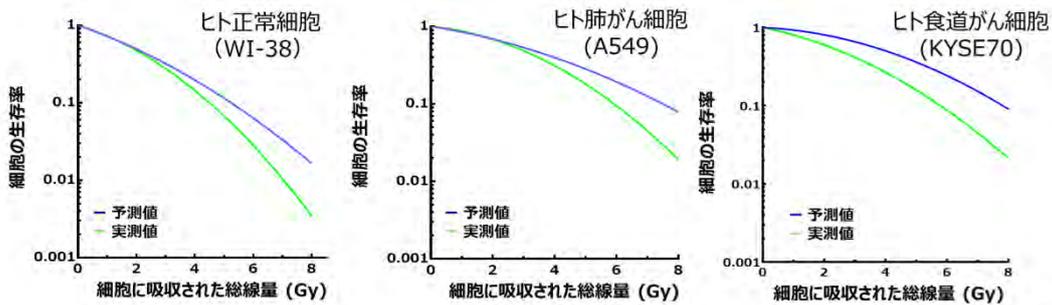


図2 同線量の陽子線とX線を同時に照射した細胞の生存率の予測値と実測値

の放射線を併用した場合の細胞の応答は十分に解明されておらず、この治療法を確立するためには陽子線とX線の併用が細胞死に与える影響などを詳しく評価する必要がある。

3. 陽子線照射とX線照射の併用が細胞致死効果に与える影響

放射線の種類による生物学的影響の大きさは一般的に相加的に評価されているが、線質の異なる放射線による複合被ばくが細胞死に与える影響を定量的に評価した研究は少ない。NASAが取り纏めた銀河宇宙放射線に関する総説では、異なる種類の放射線に曝露された生体において、それぞれの放射線が独立して作用する相加的效果のみならず、相互作用による相乗効果が生じる場合も紹介されており、これらを統べて解釈する段階に至っていない⁴⁾。がん治療と銀河宇宙放射線への曝露では、生体内における時間的、空間的なエネルギー付与の状態が異なる。がん治療を念頭に置いた研究では、X線と重粒子線治療に用いる炭素線を併用した場合の細胞致死効果を検証した文献⁵⁾があるものの、治療用陽子線との併用による効果は不明であった。

本研究では、福井県立病院のニーズを踏まえ、治療対象として想定される肺がんや食道がん由来する細胞(それぞれA549, KYSE-70)と、ヒトの正常細胞(WI-38)を同線量の陽子線とX線で同時に

照射した場合の細胞致死効果を検証した。陽子線照射には、福井県若狭湾エネルギー研究センターに設置されている多目的シンクロトロン・タンデム加速器システムの陽子線がん治療研究装置から得られる治療用陽子線ビーム(200 MeV, SOBP)を用いた。また、X線照射には、X線照射装置(150 kV, 20 mA, 0.5 mm Al + 0.1 mm Cu フィルター)を用いた。X線照射装置は、陽子線ビームラインとは別の建屋に設置されているため、照射中および移動中の細胞試料を低温環境に保持することで細胞内の生物応答が進まないように工夫し、可能な限り速やかに移動(5分程度)することで陽子線とX線の同時照射を模擬した。陽子線あるいはX線による単独照射、両者を併用した照射による細胞の生存率をコロニー形成法により測定し、線量-生存率曲線を求めた(図1)。ヒト正常細胞およびヒト肺がん細胞では、X線照射よりも陽子線照射による細胞致死効果が高く、陽子線とX線を併用した場合には、両者を単独で照射した場合の中間程度の効果が得られることが示された。また、ヒト食道がん細胞においても、差は小さいものの同様の傾向が確認された。一連の成果を福井県立病院へフィードバックしたところ、陽子線とX線を併用しても臨床治療において極端な治療効果の増大や減弱は生じず、従来の陽子線あるいはX線治療の経験に基づいた治療計画を立案できると判断され、陽子線とX線に加えて抗がん剤を併用し

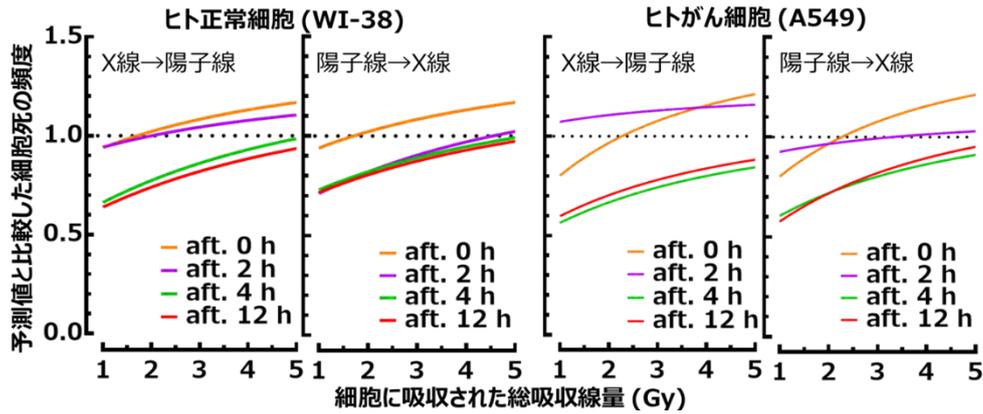


図3 陽子線と X 線の併用照射における照射の順番と間隔が細胞死に与える影響

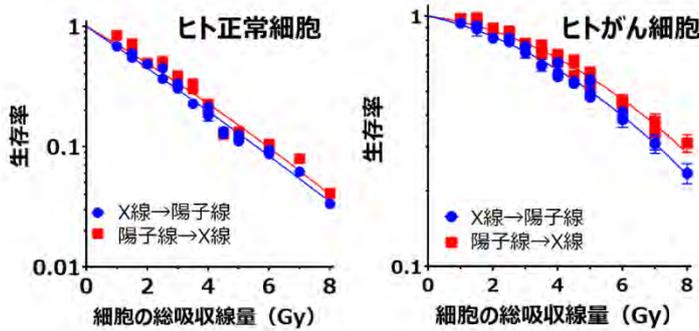


図4 陽子線と X 線の併用照射における線量の組み合わせと細胞致死効果の関係 (照射順番毎に全組み合わせをプロット)

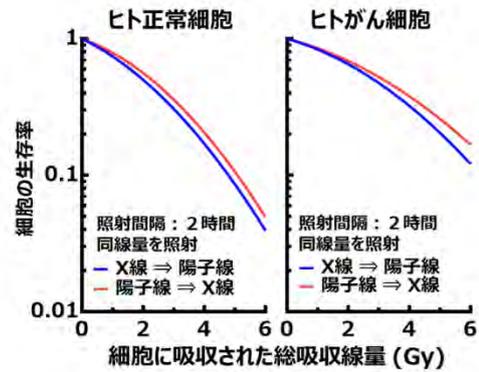


図5 同線量の陽子線と X 線を 2 時間の間隔で照射した場合の生存率

た食道がんを対象とする「混合化学放射線治療」の臨床試験の開始に繋がった。

一方で、得られたデータを精査したところ、陽子線と X 線の併用照射による細胞致死効果が、陽子線および X 線の単独照射による効果の単純な足し合わせ (生存率の積) として予測される細胞致死効果よりも有意に高いことが明らかとなった (図 2)。陽子線と X 線を併用することで細胞死の誘導に相乗効果が生じる可能性が示された。そこで、陽子線と X 線の併用により細胞死が増大する条件 (照射の順番、照射の間隔、照射線量の組み合わせ) およびそのメカニズムについて検証を進めた。ヒトの正常細胞 (WI-38) およびがん細胞 (A549) を用いて、「陽子線照射後に X 線を照射」した場合と「X 線を照射後に陽子線を照射」した場合の双方について、「照射の間隔」が細胞致死効果に与える影響を解析した。図 2 に示した照射の間隔が 0 時間の場合の予測生存率を基準とし、各照射条件で得られた細胞生存率から算出した細胞致死効果比を図 3 に示した。いずれの照射条件においても、照射間隔が増加すると細胞致死効果は減弱し、4 時間以上では同程度の細胞致死効果となることが示された。また、照射間隔が 2

時間の場合、いずれの細胞においても、「陽子線照射後に X 線を照射」する場合よりも「X 線照射後に陽子線を照射」する場合に高い細胞致死効果が得られた。次に、X 線あるいは陽子線を照射した 2 時間後に陽子線あるいは X 線を様々な「線量の組み合わせ」で照射した細胞の生存率を測定し、照射の順番毎に全ての組み合わせをプロットした (図 4)。細胞の線量応答評価を行う際に一般的に用いられている Linear-quadratic model (LQ モデル; $SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$)、 SF : Surviving fraction、 D : Dose) を用いて近似曲線を求めたところ、いずれの場合にも、その寄与率 (r^2 値) は 0.9 以上であった。したがって、「線量の組み合わせのパターン (線量混合比)」は細胞致死効果に大きな影響を与えず、総吸収線量に依存して細胞死が誘導されることが明らかとなった。また、「陽子線照射後に X 線を照射」した場合よりも「X 線照射後に陽子線を照射」した場合に細胞致死効果が高いことも再確認された。

一連の研究成果から、X 線照射から短時間のうちに陽子線を照射すると細胞致死効果が増強されることが明らかとなった。

表1 陽子線と X 線の併用による細胞致死効果の LQ モデルによる解析

LQモデルにおけるパラメーター				
	陽子線 ⇒ X線		X線 ⇒ 陽子線	
	α	β	α	β
正常細胞	0.17	0.06	0.26	0.05
がん細胞	0.13	0.03	0.16	0.03

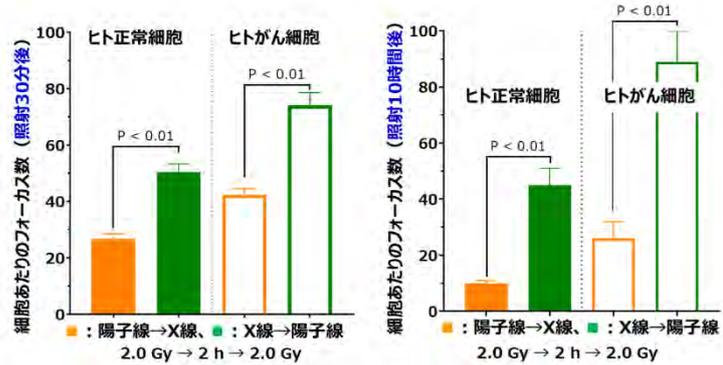


図6 陽子線と X 線の照射の順番と DSB 量の時間変化

4. 陽子線と X 線の併用により細胞致死効果が増大するメカニズム

放射線による細胞死は、細胞核内に存在する DNA の放射線損傷とその修復の結果として発現すると考えられている。上述の LQ モデルによる線量応答評価では、直線成分の α 項は「単独で死ぬ損傷」、二次曲線成分の β 項は「単独では死なない損傷」の寄与を反映すると考えられている。照射の間隔を 2 時間とし、同線量の陽子線と X 線を照射の順番を変えて照射した場合の線量-生存率曲線 (図 5) を LQ モデルにより解析した (表 1)。正常細胞とがん細胞の双方において、照射の順番に関係無く β 値はほぼ等しい一方で、 α 値は「X 線照射後に陽子線を照射」した場合よりも大きく、より多くの重篤な DNA 損傷が生じていることが示唆された。GeneChip[®]を用いて遺伝子発現変化の網羅的解析を実施した所、いずれの細胞においても陽子線と X 線を併用した場合、それらを単独で照射した場合よりも細胞周期制御や DNA 損傷修復に関与する遺伝子の発現が大きく変化しており、併用照射においてより複雑な DNA 損傷が形成される可能性が示された。一方で、陽子線と X 線の照射の順番に依存した明確な遺伝子発現の差は認められなかった。いずれの場合にも生存および致死の誘導に関与する遺伝子群の発現が認められたことから、これらの遺伝子発現のバランスの変化に繋がると考えられる DNA 損傷の質的な変化、即ちより重篤な DNA 損傷の形成が照射の順番に依存した細胞死増大の主因と考えられた。そこで、陽子線と X 線の照射の順番が DNA 損傷とその修復に与える影響を致死性の DNA 損傷である DNA 二本鎖切断 (DSB) を指標に解析した。DNA はヒストンタンパク質に巻きついてヌクレオソームを形成し、線維状に圧縮された構造 (クロマチン構造) をとっている。DSB が形成されると、DSB 周辺の数百から

数千のヒストン H2AX (ヌクレオソームを構成するコアヒストンの一つである H2A のバリエーション) が直ちにリン酸化される⁶⁾。このリン酸化された H2AX は γ -H2AX と呼ばれ、DNA 損傷の修復に関係する多くのタンパク質がこの γ -H2AX と相互作用し、損傷部位に集積して DSB を修復する。また、DSB 修復が完了するとこのリン酸化は解消される。免疫蛍光抗体法を用いると、 γ -H2AX の集積部位 (フォーカス) を検出できるため、DSB の高感度マーカーとして活用されている。本研究では、この γ -H2AX フォーカスを指標として、陽子線と X 線の照射の順番と DSB 生成量、DSB の修復効率を比較した。2 回目の照射の 30 分後に形成された細胞あたりの平均フォーカス数は、ヒト正常細胞、がん細胞共に、「X 線照射後に陽子線を照射」した場合に「陽子線照射後に X 線を照射」した場合と比べて有意に増加した (図 6)。一方、2 回目の照射の 10 時間後に形成されたフォーカス数を 30 分後に形成されたフォーカス数と比較すると、「陽子線照射後に X 線を照射」した場合には 40~60%程度減少したのに対し、「X 線照射後に陽子線を照射」した場合にはほとんど減少しなかった (図 6)。「X 線照射後に陽子線を照射」した場合、「陽子線照射後に X 線を照射」した場合よりも修復されにくい DSB が多く生じることが明らかとなった。

5. 陽子線と X 線の併用によるがん治療効果

培養細胞を用いた一連の研究から、DNA 損傷の量と質の双方が陽子線と X 線の照射の順番によって変化し得ることが示された。そこで、陽子線と X 線の照射の順番ががん治療効果に与える影響について検証した。ヒト肺がん細胞 (A549 Red-FLuc) をヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) の大腿部に移植した担がんモデルマウスを作製し、表 2 に示した条件を用いて陽子線と X 線を併用 (1 日 1 セット) し

表2 モデルマウスに対する陽子線と X 線を併用した模擬治療の条件

照射の順番と間隔		線量の組み合わせ (1セット/1日)	総吸収線量 (8セット)
陽子線照射 ↓ 2時間 ↓ X線照射	X線照射 ↓ 2時間 ↓ 陽子線照射	1.0 Gy → 1.0 Gy	16 Gy
		2.0 Gy → 2.0 Gy	32 Gy
		3.5 Gy → 3.5 Gy	56 Gy
		5.0 Gy → 5.0 Gy	80 Gy

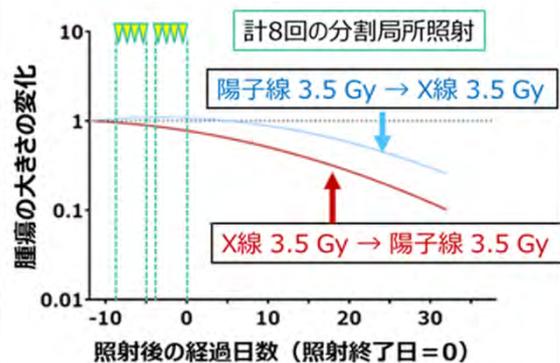


図7 モデルマウスを用いた陽子線と X 線の併用によるがん治療効果 (総吸収線量 56 Gy)

た分割局所照射による 8 日間 (8 セット) の治療を行った。このがん細胞にはホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれているため、ルシフェリンを投与すると生きているがん細胞だけが発光する。このため、生体内の目に見えない非常に微弱な発光や蛍光を定量化することができる発光/蛍光イメージングシステム (IVIS) を用いて発光強度を計測することで腫瘍分布を精密に測定することができる。照射の順番にかかわらず、「1.0 Gy→1.0 Gy (総吸収線量 16 Gy)」および「2.0 Gy→2.0 Gy (総吸収線量 32 Gy)」群では、腫瘍の増殖はほぼ抑制されたものの、ほとんど縮小しなかった。一方、「3.5 Gy→3.5 Gy (総吸収線量 56 Gy)」(図 7) および「5.0 Gy→5.0 Gy (総吸収線量 80 Gy)」群では、腫瘍が縮小する明確な治療効果が観察された。この時、「陽子線照射後に X 線を照射」した場合よりも「X 線照射後に陽子線を照射」した場合に有意な治療効果の増強が認められた (図 7)。ヒトの臨床治療では、一般的に総吸収線量 60 Gy 程度 (1 日 1 回 2 Gy×週 5 回×6 週) が用いられているが、本研究において有意な腫瘍の縮小が観察された総吸収線量の範囲に含まれていることから、検証した陽子線と X 線の併用照射の方法がヒトにおいても治療効果を発揮する可能性が示された。

6. おわりに

本研究から、モデル動物に対する陽子線と X 線を併用したがん治療においても、「X 線照射から短時間のうちに陽子線を照射すると細胞致死効果が増強される」ことが実証された。本研究の成果は、陽子線と X 線を併用する場合、その照射方法を最適化することで治療効果が 1.2~1.5 倍程度増強される可能性を示しており、臨床への応用が期待される。また、近年、異なる線質の放射線を併用する集学的が

ん治療が検討されてきており、異種放射線の照射の順番が DNA 損傷の重篤度に影響を与える可能性を明らかにした本研究は、先行研究としても重要と考えられる。引き続き、陽子線治療を基軸とした集学的治療によるがん治療効果および QOL の更なる向上を目指した研究開発を進めていきたい。

謝辞

本稿で紹介した一連の研究は、福井県委託調査事業「陽子線がん治療高度化研究：陽子線と X 線の併用によるがん治療高度化・臨床研究に向けた細胞生物学的な検討」(2013~2014 年度)、福井県特別電源所在県科学技術振興事業補助金研究事業「異種放射線の併用によるがん治療の高度化に向けた治療生物学的な検討」(2017~2021 年度)により実施した。本研究の推進にご連携頂いた福井県立病院陽子線がん治療センターの山本和高先生、玉村裕保先生をはじめとする皆様、生物実験にご協力頂いた福井大学の松本英樹先生、エネ研の前田未佳先生、陽子線照射にご協力頂いたエネ研の久米恭先生、ビームの安定供給にご尽力頂いた加速器室の皆様、ならびに種々のご協力を頂いた関係各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 令和 2 年 (2020) 人口動態統計 (確定数) の概況、厚生労働省、2022 年 2 月 25 日公開
- [2] 最新がん統計、国立研究開発法人国立がん研究センター、2022 年 6 月 8 日更新
- [3] 佐々木誠 他、放射線生物研究、2016; **51**: 382-396.
- [4] Norbury JW *et al.* *Life Sci Space Res (Amst)*. 2016; **8**: 38-51.
- [5] Demizu Y *et al.* *Radiother Oncol*. 2004; **71**: 207-211.
- [6] Ibuki Y, Toyooka T. *J Radiat Res*. 2015; **56**: 220-228.