論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目　　高LET放射線を用いた線量分布およびDNA修復タンパク質の挙動と放射線増感に関する研究

(Studies on dose distribution, dynamics of DNA repair proteins and radio-sensitization associated with high LET radiation)

氏　　名　　藤澤　寛

日本の医療においてがんによる死亡数および罹患数は共に増加し続けており、現在では3.5人に1人はがんで亡くなっている。高齢化率が25%という高齢社会の日本において、がん医療の重要性が増すとともに喫緊の課題となっている。がん治療は大きく分けると三つに分類でき一つは外科的にがん組織を取り除く外科的手術療法、そして抗がん剤や制がん剤などの薬を用いた治療を行う化学療法、さらに放射線をがん患部に照射することにより治療を行う放射線療法である。放射線をがん治療に用いることが出来るのは、放射線は物質を透過し電離・励起させる作用があるからである。放射線は細胞のDNAに損傷を与えることでがん細胞を死に至らしめることが可能である。放射線治療にはX線やγ線の光子線（電磁波）を用いる場合と、陽子線や炭素イオン線などの粒子線を用いる場合がある。放射線治療の多くは光子線であるX線やγ線が用いられているが、近年目覚ましい発展を遂げているのが粒子線治療である。粒子線治療は炭素イオンや陽子などの粒子を高速に加速し腫瘍に照射するがん治療の方法である。

粒子線の特徴の一つに優れた線量分布が挙げられる。X線やγ線の線量付与は体の表面近くが最も高く、深部に行くに従い線量は指数関数的に低くなるのに対し、炭素イオン線や陽子線の粒子線は体内を透過しながら停止直前に最大のエネルギーを付与する。これをブラッグBragg曲線といいピークの部分をブラッグピークと呼ぶ。体表面の入り口からブラッグピークまでの線量が低く抑えられるため、正常組織への被ばくを少なくでき、またブラッグピークの深さを腫瘍の位置に合わせることで高い線量集中性を実現している。粒子線治療は固形がんの治療において優れた臨床成績をあげているが、治療研究施設が少ない等の理由から基礎的な放射線生物学データが不足しているという課題がある。

線量分布の特徴に加えて重要な放射線の指標に線エネルギー付与LET(keV/μm)がある。これは単位長さ当たりに物質に付与するエネルギーを意味しており、炭素イオン線などの重粒子線は高LET放射線に分類され、陽子線やX線、γ線は低LET放射線に分類される。高LET

放射線は低LET放射線に比べて密な電離を起こして物質にエネルギーを付与し、狭い領域に塩基損傷や一本鎖切断、二本鎖切断DSBなどの複数の傷を生じさせる。また高密度電離によりDNAの切断末端が複雑な構造をとることからこのような傷を複雑なDNA損傷またはクラスターDNA損傷と呼んでいる。この複雑なDNA損傷は修復が困難であるため細胞致死効果が大きいとされている。高LET放射線により生じるDNA損傷は、X線のような低LET放射線により出来る傷とは質的に異なるということができ、DNA損傷そのものやその後のDSB修復過程もこれまで明らかにされてきた低LET放射線の知見と異なると考えられている。そのため複雑なDNA損傷を受けた細胞がどのような修復経路を選択し、どのような細胞運命を辿るのかその詳細は分かっていない。

そこで本研究では高LET粒子放射線の特徴といえる①体内での優れた深部線量分布、②がん細胞への高い生物致死効果に着目し、高LET放射線照射による生物学的応答を細胞単位で明らかにし、放射線生物学データの収集と解析により高LET放射線治療の高度化に繋げることを目的とする。

まず炭素イオン線と陽子線の深部線量分布に関する生物効果の比較において脊索腫細胞を用いた。脊索腫は骨腫瘍の一つであり頭蓋底や仙骨等の深部の骨から発生し、周辺には重要臓器が存在するため通常のX線放射線治療は難しく、また脊索腫は放射線抵抗性である。さらに外科的切除により摘出出来た場合でも、仙骨を取り除いてしまうとQOLを著しく低下させる懸念がある。そのため深部線量分布がよい粒子線が用いられ臨床において良い治療成績を上げている。しかしながら脊索腫細胞の増殖が遅いという特徴や細胞株数が少ないこと、さらに粒子線を扱える施設が少ないなどの理由によって基礎的な放射線生物学的データがほとんど報告されておらず、炭素イオン線と陽子線の放射線感受性の直接比較も行われていない。そこでOptiCell細胞培養システムを積層し三次元in vitroモデルを構築することで、290MeV/nエネルギーの炭素イオン線と70MeVエネルギーの陽子線の深部線量分布に対する脊索腫細胞生存率の比較評価を行った。細胞生存率は水中を進むに従い低下しブラッグピーク付近で最小となった。細胞生存率の低下の線量依存性と、ブラッグピークを越えた位置での生存率の上昇が確認できた。水中の深さ毎の生存率をLETの大きさに分けて評価することで、脊索腫細胞に対し炭素イオンがLETと線量に依存した細胞致死効果を持つ結果となり、これはin vitro生物学的観点から脊索腫に対して炭素イオン線が優れていることを表す。我々の用いた三次元in vitro体系は高LET炭素イオン線を含め他の電荷粒子線や光子線を評価するのにも用いることが可能であり、脊索腫細胞だけでなく他の腫瘍組織でも検証できることを示している。この体系はin vivoの脊索腫環境に近い状態で細胞の生物学を理解でき、これからの脊索腫研究にも役立つといえる。

次に高LET放射線の高い生物効果を引き起こす理由の一つである複雑なDNA損傷に着目し、DNA修復経路選択の制御メカニズムを解明するため、高LET放射線照射後のDNA修復タンパク質の挙動を検証した。近年DNA修復経路選択に「DNA末端リセクション」が重要であることが報告され、このリセクション過程にCtIP修復タンパク質が関与していることが分かって

きた。我々は既に「複雑なDNA損傷が効率よくDNA末端リセクションを引き起こす」ことを報告しているため、本研究では高LET放射線を用いてCtIPの放射線照射後の挙動を調べた。ウェスタンブロッティングや蛍光免疫染色により、CtIPが高リン酸化作用を受けてDNA切断末端の削り込みに働き、その後低リン酸化状態を維持しながらDSB箇所でフォーカスを形成し続けることを示した。そしてフォーカス動態は一定ではなく常に分裂と分解を繰り返しており、低リン酸化状態とフォーカス維持にはATM/ATRリン酸化酵素が作用していることを明らかにし、これらの結果はCtIPタンパク質の新たな挙動を表しているといえる。新たな挙動とはCtIPが持つDNA末端リセクションの始動というこれまでの役割とは異なる役割を持っている可能性を示している。DNA修復メカニズムを明らかにするためには、修復経路の選択がどのように制御されバランスを保っているのかに関心が置かれており、修復経路を決定している一つの因子「DNA末端リセクション」において重要なCtIPの新たな挙動を示したことは、今後のCtIPの研究を推し進めるきっかけとなる。今後注目すべきはCtIPの新たな機能の発見であり、我々はいくつか提案を行った。例えばCtIPのDSB末端に生じるリセクションの長さや終点を制御している可能性、CtIPのDSB末端を繋ぎとめる機能の可能性、CtIPのRPAとRad51の置き換わりを制御している可能性などである。本研究で示したCtIPの新しい挙動はDNA末端リセクションの制御やDNA修復機構を明らかにするための手掛りとなるといえる。

最後に高LET放射線の生物効果をより高めるために放射線増感作用の検証を行った。炭素イオン線を用いても完全に治療できない腫瘍が存在するため、炭素イオン線の治療効果をより高めるための効果的な薬剤つまり放射線増感剤の探索が必要とされているからである。複雑なDNA損傷がDNA末端リセクションを引き起こすということは、高LET放射線照射後の細胞はATRリン酸化酵素の活性が高いと考えることができる。なぜならリセクション過程が進行してRPAタンパク質にコートされた一本鎖DNAが生じると、続いてATRがリクルートされ活性化が起こることが分かっているからである。本研究では炭素イオン線とATRリン酸化酵素の阻害剤を用いて、細胞周期解析や小核法、細胞生存率によりATR阻害剤の放射線増感効果を検証した。その結果、ATR阻害剤VE-821により炭素イオン線誘導のDNA損傷G2/M細胞周期チェックポイントが解除され、DNA損傷を持ったまま細胞分裂を引き起こすことで分裂異常となり、細胞生存率の低下に至ることが分かった。またU2OSがん細胞において炭素イオン線とVE-821の併用は、Ｘ線との併用と比べてより複数の小核を生じさせることが分かった。特にVE-821の放射線増感作用はがん細胞で大きな効果を持ち、正常細胞ではほとんど効果を示さなかったことはがん治療における正常組織の障害の低減という点で非常に重要である。

このように本研究の実施は放射線生物学データの収集と解析によりDNA修復メカニズムの解明から粒子の線量分布と放射線増感作用を検討し、高LET放射線をがん治療に用いることの有用性を示し、放射線治療の高度化に大きく貢献すると考えられる。現在では粒子加速器の小型化や、スポットスキャニング照射というビームを細くしたまま移動させて腫瘍

を塗りつぶす照射方法の開発が進められ、粒子線治療の保険適応の疾患の増加と同時にますます粒子線治療が普及すると考えられる。ドラッグデリバリーシステムの研究が進むことで、放射線との併用による化学放射線療法が今後期待される。炭素イオン線治療の高度化には本研究で示したがん細胞特異的な増感剤の研究やDNA修復メカニズムの解明が必要となる。