

2013.06

Vol.56

第56巻 第02号

放射線科学

Radiological Sciences

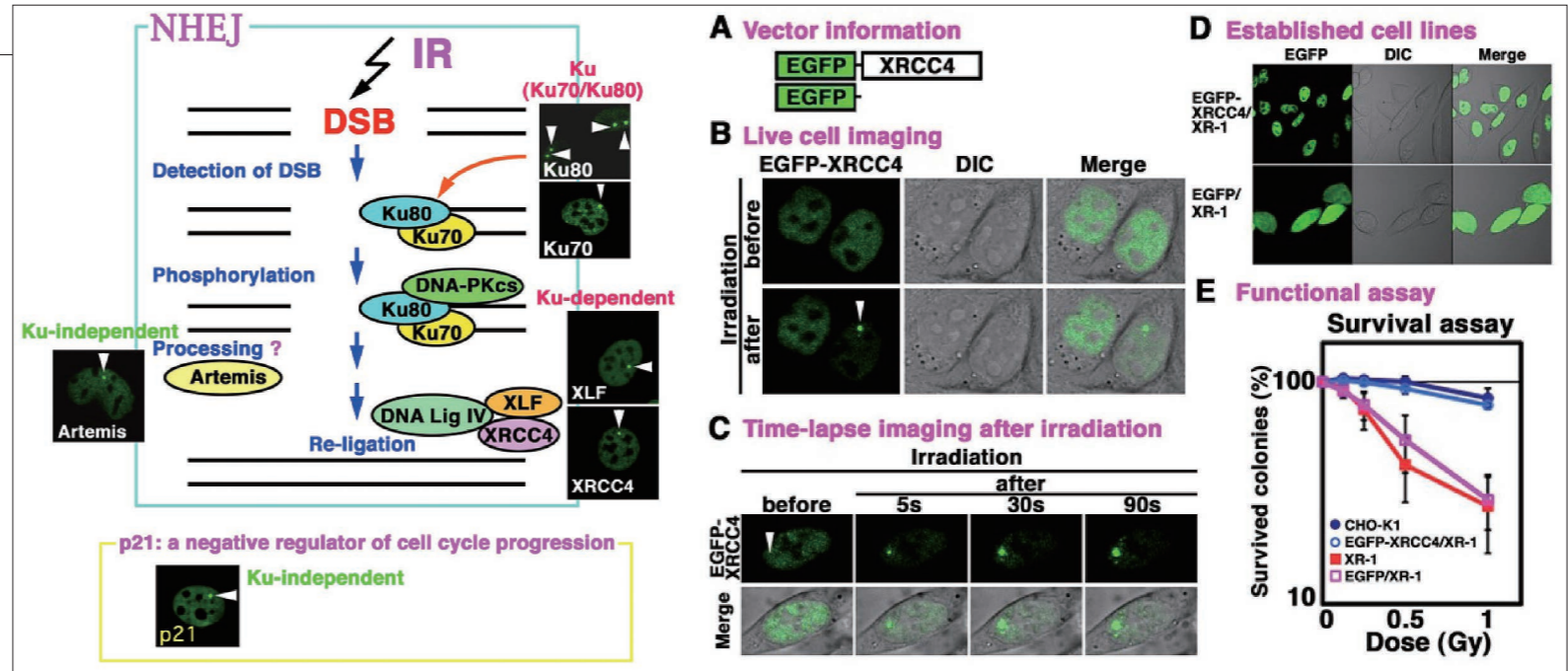
特集

- 放射線感受性個人差要因の解明と
リスク低減化を目指して
- 個人の放射線治療
効果予測のための基礎研究
治療効果の異なる腫瘍や
転移がんの生物学的特徴を基にした、
重粒子がん治療の適用条件を
明らかにするための基礎研究

特集1

放射線感受性 個人差要因の解明と リスク低減化を 目指して

放射線防護研究センター
リスク低減化研究プログラム
根井 充・中島 徹夫・王 冰・石井 洋子・
Guillaume Vares・勝部 孝則・二宮 康晴・
田中 薫・小池 亜紀・小池 学

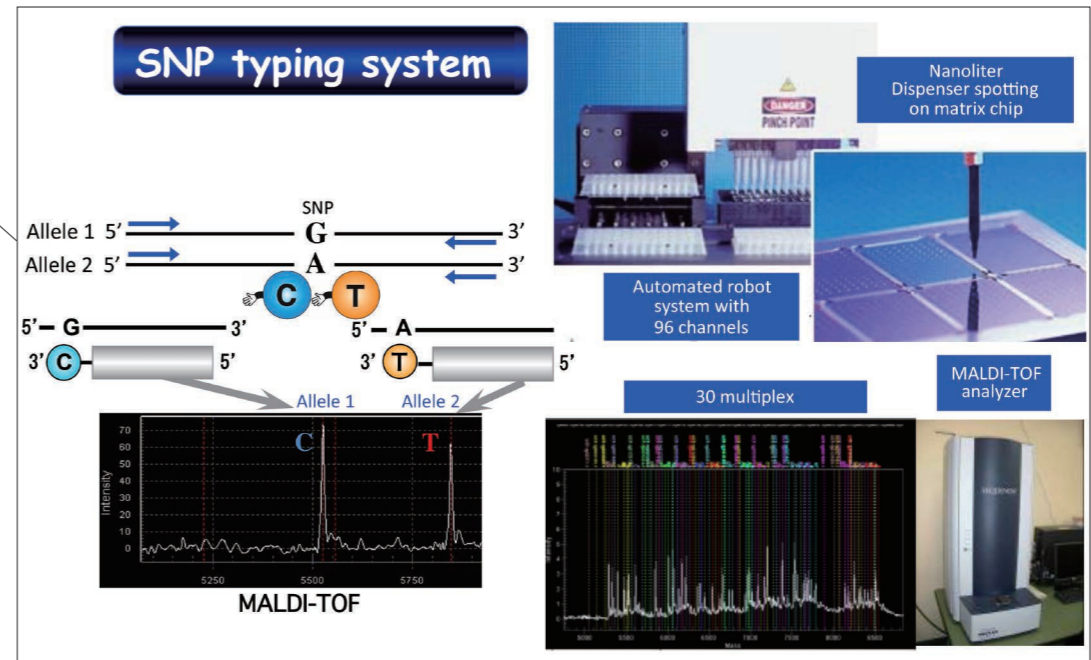


特集2

個人の放射線治療 効果予測のための 基礎研究

治療効果の異なる腫瘍や転移がんの生物学的特徴を基にした、
重粒子がん治療の適用条件を明らかにするための基礎研究

重粒子医科学センター
先端粒子線生物研究プログラム
今井 高志・下川 卓志・松本 謙一郎・中山 文明・中西 郁夫・石川 顕一・
藤田 真由美・佐藤 克俊・馬 立秋・上野 恵美・石川 敦子・
菅 智・今留 香織・中渡 美也子・荘司 好美・大塚 裕美



最近の成果

放射線応答性ハイドロゲルの開発

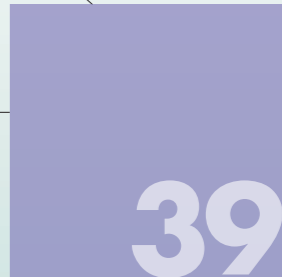
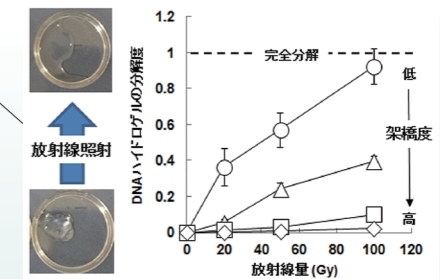
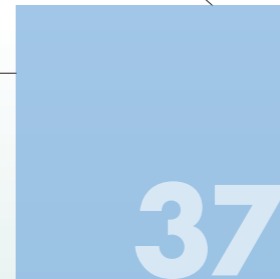
～薬剤送達システムを活用した新しい放射線治療技術へ～

分子イメージング研究センター
分子病態イメージング研究プログラム
城 潤一郎・青木 伊知男・佐賀 恒夫

連載

橋渡しと連携のための疫学

放射線医学総合研究所
研究倫理企画支援室 小橋 元



特集1 放射線感受性個人差要因の解明と リスク低減化を目指して



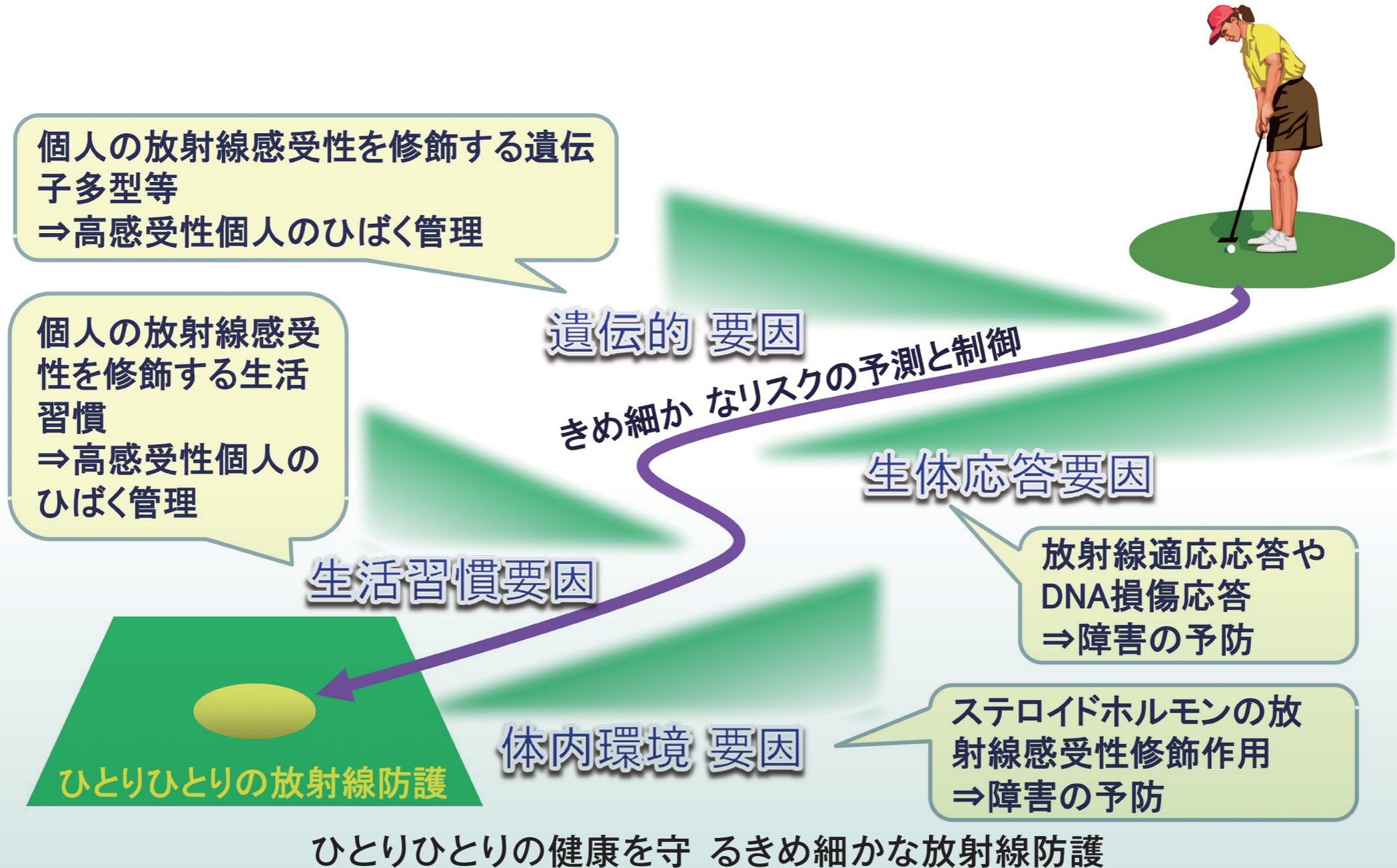
放射線防護研究センター
リスク低減化研究プログラム
根井 充・中島 徹夫・王 冰・石井 洋子・Guillaume Vares・
勝部 孝則・二宮 康晴・田中 薫・小池 亜紀・小池 学

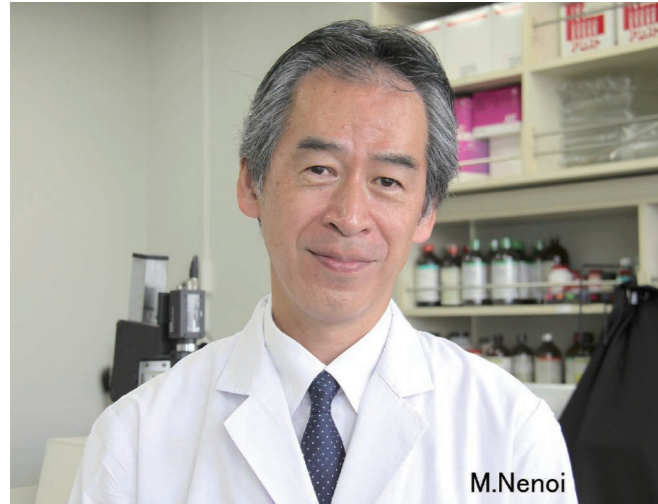
放射線防護の最も重要な目的の一つは、放射線の発がん作用と遺伝的影響(被ばくした人の子や孫に現れる放射線の影響)から人を守ることです。これらの障害が被ばく線量に比例した頻度で発症すると仮定する限り、許容できる

発症頻度に相当する線量を被ばくの限度として放射線管理が行われなければなりません。従って単位線量当たりのがんもしくは遺伝的影響が発症するリスク(これをリスク係数という)を求めることは放射線防護の第一歩となります。

しかし放射線に対する感受性には個人差があるため、リスク係数はヒト集団の平均的な数値から選ばれているというのが実情です。放射線感受性の個人差要因としては年齢や性別が知られており、例えば国際放射線防護委員会(ICRP)の勧告において、子供を含む場合と含まない場合で異なるリスク係数が示されています。また、米国科学アカデミー電離放射線の生物学的影響に関する委員会(Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation: BEIR 委員会)は、喫煙習慣がα線被ばくの影響と相互作用して、肺がんリスクを相乗的に高めると報告しています。一方、食生活等の生活習慣の影響はまだ定量的評価がされていないものの、マウスの摂取カロリーを約80%に制限することによって照射後の骨髄性白血病の発生率が低下することが示されたこと等、放射線感受性を変動させようとする

に足る科学的な根拠が数多くあります。また、放射線から健康を守るために働いている生体防御遺伝子の機能や遺伝子産物(タンパク質)の活性が個人によって異なる可能性もあります。なぜならば、ヒトのゲノムを構成する30億個の塩基の並びの中で約100万個の塩基はヒト集団の中で多様性(多型)があると考えられており、そのような一塩基多型(SNPs)がDNA修復遺伝子の中にも存在しているからです。DNA修復遺伝子におけるSNPsは生体防御機能の個人差をもたらすと考えられます。従来の放射線防護は、ヒト集団の中の平均的なヒトの安全に主眼を置き、放射線感受性の個人差が考慮されることはありませんでした。今後実現すべき将来的な課題として、個人ごとの放射線感受性を適切に評価することにより、一人ひとりを守るきめ細かな放射線防護の実現を目指す必要があります。





近年、国際的にも放射線感受性の個人差に配慮したきめ細かな放射線防護の必要性が認識され始めています。経済協力開発機構傘下の原子力機関 (Organization for Economic Cooperation and Development/Nuclear Energy Agency: OECD/NEA) は、今後の新たな研究課題として、「非標的作用(放射線がヒットしていない細胞における影響)」や「心血管系疾患」とともに「放射線感受性の個人差」を挙げています。将来的に個人差を補正するための加重係数を用いた個人別の線量管理の可能性を見込んで、特に低い線量域の放射線に対する感受性に個人差があるか、あればそのメカニズムは何かについて課題提起しています。また、ヨーロッパにおける低線量影響研究における高度専門家グループ (High Level Expert Group: HLEG) が、欧州原子力共同体 (EURATOM) のプロジェクト等における低線量影響に関する研究成果をとりまとめ、今後の問題点を指摘した上で新たな低線量影響研究の枠組み (Multidisciplinary European Low Dose Initiative: MELODI) の構築を提案しています。その中でも「がんリスクの個人差と遺伝的発がん感受性」の課題を挙げ、年齢、性別、生活習慣、生殖状態、化学物質、感染、感受性組織の相対量等に応じた放射線感受性の変動を評価する必要性を訴えています (図1)。これら要因の中には遺伝的要因や食習慣等、人種や文化によって異なると思われるものも多くあります。そのような要因を、日本でも独自に評価していくことが重要です。一方、国内では、旧原子力安全委員会の「原子力の重点安全研究計画(第2期)」において、個人の感受性や生活環境等を反映したより細やかな放射線防護(テーラード放射線防護)の確立をうたっていたように、古くから課題として認識されていました。

これまで、放射線感受性の個人差要因を系統的に研究することは、感受性の指標に関する知見が乏しいために困難でした。しかし、近年、遺伝子操作を用いた研究や計算機を用いた

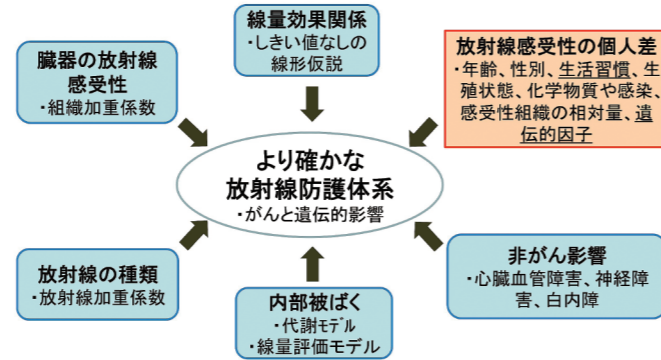


図1: MELODIの枠組みで取り上げられている放射線防護研究の今後の方向性
放射線感受性の個人差は、非がん影響とともに新規な課題として掲げられている。その中で生活習慣と遺伝的因子は、人種ごとに大きく異なると考えられる。

生物情報科学の技術革新、および実験動物を用いた評価等により、放射線のリスクを修飾する様々な遺伝子因子や生活習慣等非遺伝子要因が示唆されるようになり、個人ごとの放射線防護の研究を実施するための技術基盤が構築されつつあります。第二期中期計画において、当研究プログラムの前身に当たる生体影響機構研究グループは、被ばくしていないマウスから被ばくしたマウスに移植された胸腺が被ばく線量に依存してがん化するという、いわゆる非標的放射線発がんの機構を調べ、体内環境(骨髄からの胸腺への前駆細胞の供給低下)が放射線発がんのリスクを修飾し得ることを明らかにしてきました。また、非相同末端結合修復と呼ばれるDNA修復システムに関連する遺伝子XRCC4、Artemis、MDC1等の機能が、放射線発がんのリスクを修飾する可能性を示唆しました。さらに、低線量放射線の照射により一過性に放射線抵抗性が誘導される現象(放射線適応応答という)は、DNA修復効率の変動を伴うことがあることを明らかにし、人為的処置により個人の放射線感受性を制御できる可能性を示唆しました。これら実績に基づいて、私たちは、放射線感受性の個人差要因を解明すること、さらにこれを人為的に制御することにより、放射線リスクを低減する方策を提案することを目的として、本研究プログラムを開始しました。

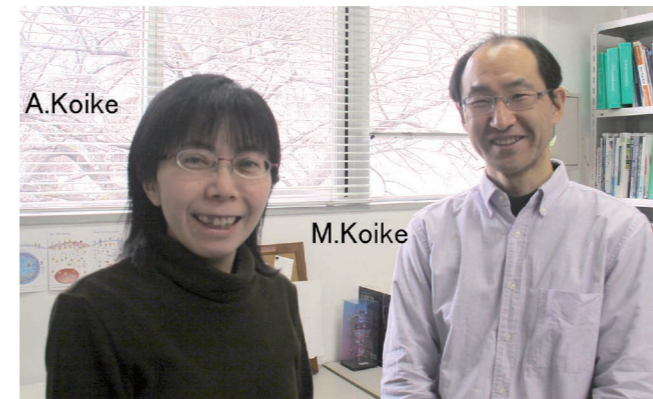
実効線量は、少なくとも100mSv以上では放射線発がんや遺伝的影響のリスクと線形的に相関する被ばく線量として用いられています。その定義においては、放射線の線質による生物効果の違いを補正するため放射線加重係数が導入され、また臓器による放射線発がん感受性の違いを補正するために組織加重係数が導入されています。本研究プログラムが目指す先には、放射線発がんと遺伝的影響を指標とした放射線感受性の個人差を補正するための「個人加重係数」の導入があります。そして、特に医療被ばく分野で放射線感受性を修飾する諸因子を人為的に制御するための積極的方策の実用化があります。

放射線感受性を修飾する遺伝的要因の解明と制御

小池 学・勝部 孝則・小池 亜紀

1. DNA修復における放射線感受性修飾要因

本研究プログラムの目的は、放射線感受性の個人差要因を明らかにし、これを利用して放射線リスクを人為的に低減するために必要な科学的知見を提供することです。そのために、放射線感受性を変動させる遺伝的要因を明らかにすることは一つの重要なアプローチです。これを行うために、本研究プログラムでは培養細胞を用いたインビトロ実験系を構築しました。以下でその概要とこれまでに得られた知見について記載します。



がんの発症は多段階過程であり、多くの突然変異の発生が必要と考えられています。放射線発がんも例外ではありません。しかし、公衆被ばく線量限度内の低い線量の放射線が、遺伝的に正常なヒトの特定の細胞に1度に多くの突然変異を引き起こすことはまず考えられません。というのはDNA修復システムがヒトのゲノムを放射線から守っているからです。放射線が生物影響を引き起こす際の最も重要な標的の一つはDNAであり、特にDNA2本鎖切断(Double Strand Break: DSB)が放射線障害と密接に関連する重要な損傷であると考えられています。ゲノムDNAをもっているあらゆる生物は、進化の過程でDSBを修復するメカニズムを獲得してきましたが、ヒトでは非相同末端結合(Non-Homologous End-Joining: NHEJ)が最も主要なDSB修復システムとなっています。NHEJは、修復に際して間違いを起こす可能性があるシステムですが、NHEJの機能が不全に陥った場合、(1)類似した短い塩基配列を介する末端結合(Microhomology-mediated End-Joining)のようなものと高頻度で間違いを起こしやすい修復システムが機能を肩代わりすること、(2)細胞のゲノムの安定性も低下する(不安定化)こと等から、ゲノムを安定に維持する上で非常に重要と考えられています。従って、DNA修復遺伝子、特にNHEJ

の中核で機能する重要遺伝子(core-NHEJ遺伝子という)が果たす役割は、放射線発がんの防御において極めて重要です。事実、NHEJ遺伝子にDNA修復能が低下するような変異が起きると、いくつかのタイプのがんを発症しやすくなることがヒトで報告されています。また、core-NHEJ遺伝子と呼ばれるArtemisやDNA-PKcs、DNA Ligase IV、XLF等に突然変異がある遺伝病の患者さんの存在が報告されており、患者さんの細胞が放射線に高感受性であるばかりでなく、一部の患者さんはある種のがんを発症しやすいことが明らかにされています。同じことはcore-NHEJ遺伝子の機能を人為的に欠損させた実験動物モデルでも示されています。これらのことから私たちは、放射線感受性の個人差要因となりうるNHEJ因子のアミノ酸変異(タンパク質マーカー)を同定することを目的として本研究を開始しました。

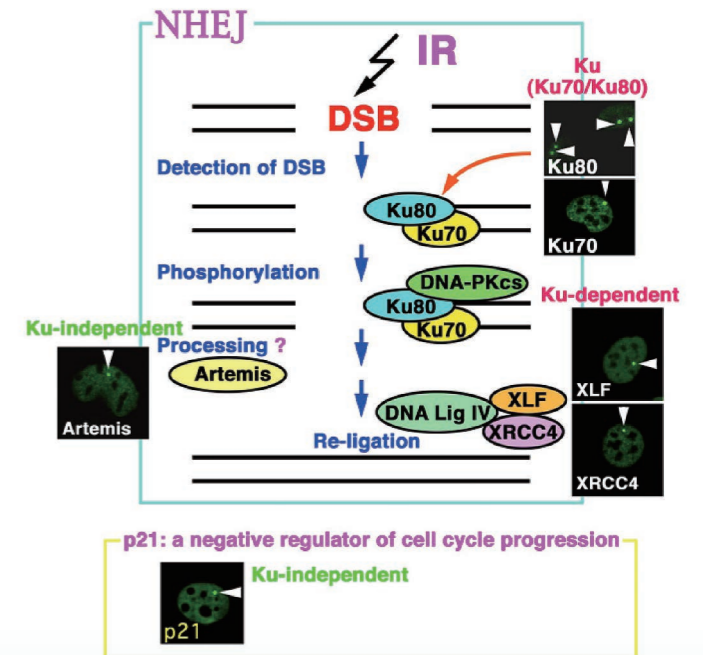


図2: 非相同末端結合(NHEJ)の典型的な分子機構
放射線で生成されたDNA2本鎖切断(DSB)は、まずKu70とKu80の二量体によって認識され、最終的にDNA Ligase IVで再結合される。挿入された細胞のイメージは、NHEJ因子がレーザーで生成されたDSB部位に集積していることを示している。(図中の写真の一部は文献1、文献4および文献8より転載)

世界的に見て、肺がんはヒトの主要な死因の一つですが、最近NHEJ経路に関わる遺伝子の多型が肺がんの感受性や予後の良否と密接に関連することが報告されました。そこで私たちは、NHEJ経路で機能する因子Ku70を欠損しているマウスの肺から上皮細胞(MLE)の培養系を構築し、その性質を調べました¹⁻³⁾。NHEJ経路は、まずKu70とKu80の二量体がDSBのDNA末端に結合することから

始まるとされています(図2)。予想通りKu70の2つの対立遺伝子の両方が欠損した(Ku70^{-/-})MLE細胞は、片方のみが欠損した(Ku70^{+/-})MLE細胞に比べて0.125~2GyのX線に対して顕著に感受性が高いことが分かりました(図3)。このKu70^{-/-}MLE細胞に蛍光タンパク質で可視化するとともにアミノ酸変異を入れたKu70を発現させることにより、放射線感受性を修飾する(個人差要因となる)タンパク質マーカーの評価システムを構築しました。Ku70のDSB部位への集積は、NHEJ活性を左右する重要なメカニズムです。私たちは、細胞核の一部に細く絞ったレーザーを極局所照射することによってDSBを生成し、そこへ蛍光タンパク質EGFPで標識されたKu70およびそのアミノ酸変異体が集積する効率を指標として、NHEJ活性に及ぼす影響を評価しました(生細胞イメージング技術)。図4Bに示す通り、アミノ酸変異を入れていないEGFP-Ku70は、レーザー照射後直ちに照射部位に集積することが観察できた一方、アミノ酸変異(375番目から481番目のアミノ酸を欠失)を導入したKu70(EGFP-Ku70(Δ375-481))は集積できませんでした。375番目から481番目のアミノ酸はKu70がKu80に結合するために必要な領域にほぼ相当しています(図4A)。次に、Ku70におけるアミノ酸1個の変異がNHEJ活性に及ぼす影響を調べました。その結果、Ku70の385番目のアミノ酸1個が変異(EGFP-Ku70(L385R))することによ

て、Ku80と相互作用することができなくなり、またDSBへの集積能も消失することがわかりました(図4C)。これらの結果から、放射線感受性の指標となる(個人差要因となり得る)タンパク質マーカーの候補の一つとして385番目のアミノ酸変異体を同定できたと結論できます。この方法を用いることにより、Ku70に限らず、放射線感受性を修飾するDSB集積性の遺伝因子におけるアミノ酸変異を同定することが可能と考えられます(図4D)。

本研究で樹立したKu70^{-/-}MLE細胞等を用い、私たちはさらにKu70と他のNHEJ因子の機能的な関連を調べました^{1, 4)}。そしてKu70は照射後早期にXRCC4とXLFがDSBに集積するために必須であるものの、ゲノム損傷の発生に際し細胞増殖を止めるために働くp21と同様にArtemisのDSBへの集積には必ずしも必要ではないことを明らかにしました(図2)。すなわちMLE細胞においては、core-NHEJ因子であるXRCC4とXLFの集積はKu依存적입니다。ArtemisのようにNHEJと相同組換え修復(Homologous Recombination:HR、動物が有するもう一つの主要なDSB修復機構)の両方で機能している因子の集積はKu非依存的事であることを示唆しています。これらのことは、Ku70遺伝子におけるSNPsがKu70のDSBへの集積能を修飾するだけでなく、他のNHEJ因子の機能的関連を介してNHEJ活性を修飾する可能性を示唆しており、更なるタンパク質マーカーを探索する上で有用な情報となります。

Ku70欠損マウス由来細胞の樹立と解析

■ Ku70欠損 ヘテロマウス肺由来細胞
□ Ku70欠損 ホモマウス肺由来細胞

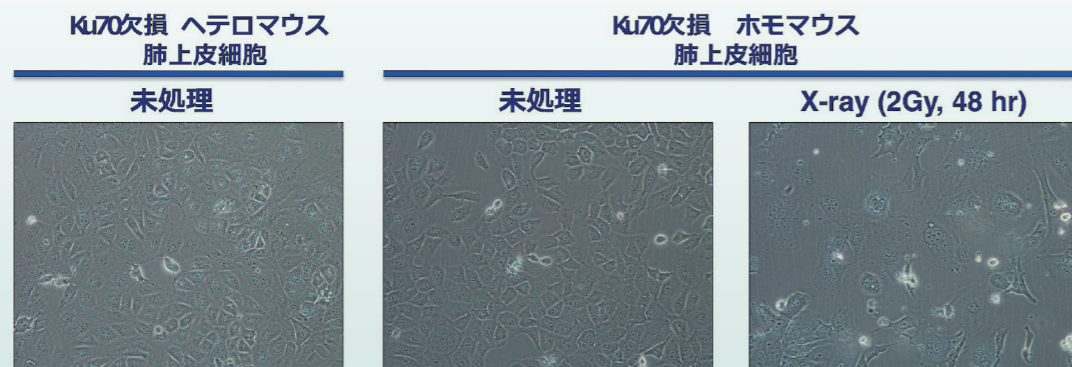
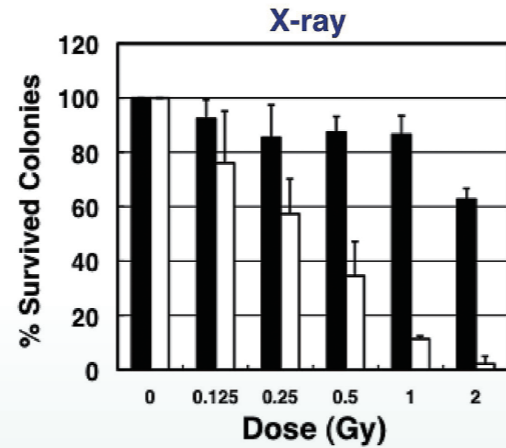


図3: NHEJで機能する因子Ku70を欠損するマウスの肺由来上皮細胞株の樹立と放射線感受性試験

NHEJ活性を修飾するアミノ酸変異を同定するための方法を用い、私たちはさらにKu80の中央およびC末端近傍のアミノ酸領域の機的重要性を明らかにしてきました⁵⁻⁷⁾。今後、これらの領域内のアミノ酸が変異した遺伝子産物が放射線感受性を示すタンパク質マーカーになりうるか解析を行う予定です。

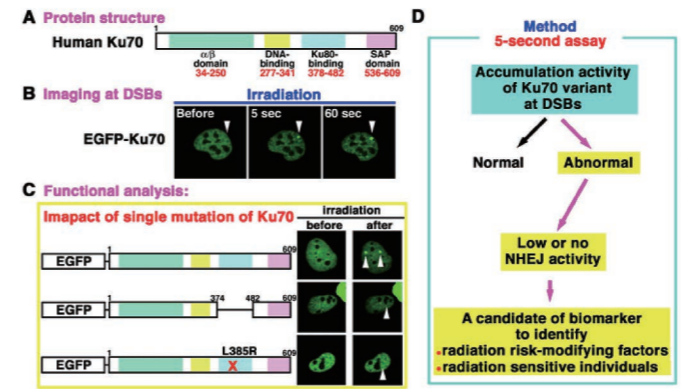


図4: レーザーによる極微小領域照射技術とライブセルイメージング技術を組合せた、放射線感受性を修飾する遺伝的因子の解析方法(図中A-Cの各図は文献1より転載)

私たちは、Kuタンパク質以外にEGFP標識したXRCC4の発現系の構築も行い、解析を進めています⁸⁾(図5)。これらの細胞は、XRCC4に依存したNHEJ修復経路を介する放射線抵抗性の分子メカニズムを研究する上で役に立つとともに、放射線感受性の個人差要因となり得るXRCC4上のアミノ酸変異(タンパク質マーカー)を同定するために役立つと期待されています。

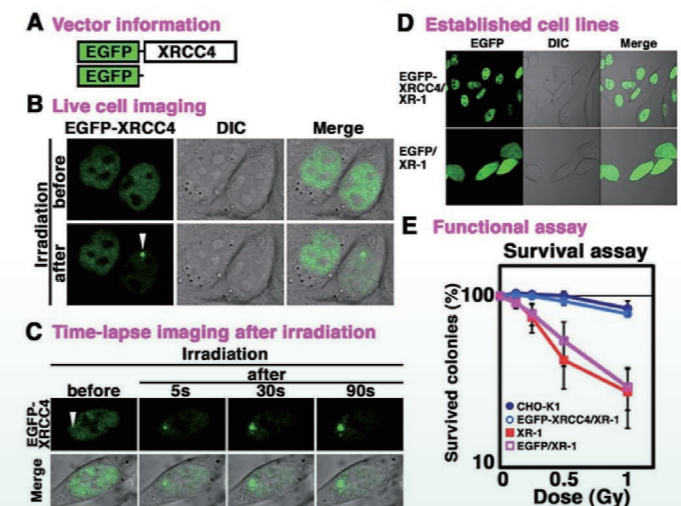


図5: レーザーによる極微小領域照射技術とライブセルイメージング技術によるXRCC4を介する放射線感受性修飾の解析(図中の各図は文献8より転載)

一部のヒト集団はDNA修復遺伝子のアミノ酸変異を有し、そのため放射線を被ばくした際に、正常な遺伝子を持つヒトに比べてより深刻なダメージを負ってしまうことがあるかもしれません。これまでのところ、私たちはその

ようなアミノ酸変異(バイオマーカー)の候補としてKuの変異を見出しており、現在XRCC4の変異についても解析しているところです。タンパク質のアミノ酸変異は遺伝子突然変異以外にSNPsによってももたらされることから、あらゆるNHEJ関連遺伝子に存在する膨大な数のSNPsの性質(SNPsが個体に与える影響等)を調べることは、放射線リスク評価の貴重な情報源になると考えられ、究極的にはSNPs型によるリスクのコンピューター予想を可能にすると思われます。このような戦略により、近い将来私たちはより多くの放射線リスクを修飾する遺伝因子の候補を見付けることができ、これにより一人ひとりの放射線リスク評価を可能にするとともに、よりきめの細かい規制の枠組みを構築することができると考えています。

参考文献

- 1) Koike, M., Yutoku, Y., Koike, A.: Accumulation of Ku70 at DNA double-strand breaks in living epithelial cells, *Exp. Cell. Res.*, 317, 2429-2437, 2011
- 2) Koike, M., Yutoku, Y., Koike, A.: Establishment of Ku70-deficient lung epithelial cell lines and their hypersensitivity to low-dose X-irradiation, *J. Vet. Med. Sci.*, 73, 549-554, 2011
- 3) Koike, M., Yutoku, Y., Koike, A.: The defect of Ku70 affects sensitivity to X-ray and radiation-induced caspase-dependent apoptosis in lung cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 75, 415-420, 2013
- 4) Koike, M., Yutoku, Y., Koike, A.: Accumulation of p21 proteins at DNA damage sites independent of p53 and core NHEJ factors following irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 412, 39-43, 2011
- 5) Koike, M., Koike, A.: Accumulation of Ku80 proteins at DNA double-strand breaks in living cells, *Exp. Cell. Res.*, 314, 1061-1070, 2008
- 6) Koike, M., Yutoku, Y., Koike, A.: KARP-1 works as a heterodimer with Ku70, but the function of KARP-1 cannot perfectly replace that of Ku80 in DSB repair. *Exp. Cell Res.*, 317, 2267-2275, 2011
- 7) Koike, M., Yutoku, Y., Koike, A.: Ku80 attenuates cytotoxicity induced by green fluorescent protein transduction independently of non-homologous end joining. *FEBS Open Bio.*, 3, 46-50, 2013
- 8) Koike, M., Yutoku, Y., Koike, A.: Establishment of hamster cell lines with EGFP-tagged human XRCC4 and protection from low-dose X-ray radiation. *J. Vet. Med. Sci.*, 74, 1269-1275, 2012

2. DNA修復関連因子を介する放射線感受性制御

第二期中期計画で私たちは、ヒト由来HCT116細胞から遺伝子破壊法で作製されたNHEJ関連遺伝子(Artemis, XRCC4, MDC1)欠損細胞株について、染色体の切断や細胞増殖能(生残率)を指標に放射線感受性を調べてきました¹⁾。調べた限りどの細胞株も親株(HCT116)に比べて高い放射線感受性を示すことを観察しました(図6)。

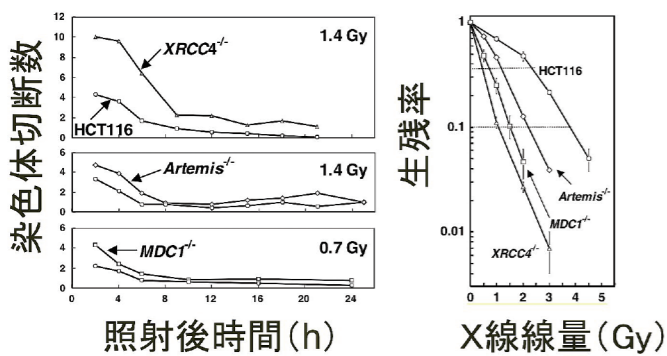
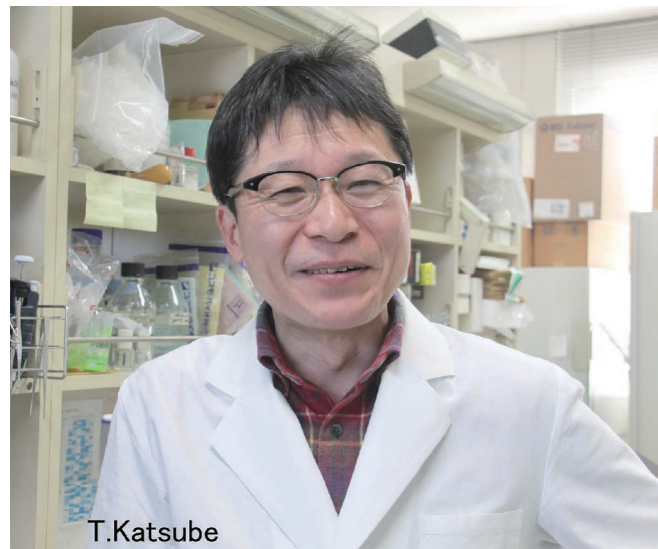


図6: XRCC4やArtemisおよびMDC1等、NHEJ遺伝子を欠損する細胞株では、染色体の切断やコロニー形成能(生残率)を指標とした放射線感受性が親株(HCT116)に比べて高い。

一方、突然変異を考えた時、NHEJは突然変異を引き起こし得る修復経路であることから、放射線による突然変異誘発の頻度については、NHEJ関連遺伝子の欠損細胞株で減少する可能性があります。放射線照射後のヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)という遺伝子の突然変異を調べたところ、プレリミナリーな結果ではありますが、HCT116では照射線量に依存して突然変異が増大するのに対して、Artemis欠損細胞では調べた範囲の線量で照射後の増大は観察されませんでした。ArtemisはDNAを分解する酵素活性

(exonucleaseおよびendonuclease)をもっており、DSBのDNA切断末端を削る作用があります(図7)。これは、DNAの2本鎖に大きなエネルギーが集中して、切断された時などに形成される、化学的に複雑な構造のDNA切断末端をDNA連結酵素(DNA Ligase)の基質とするために必要なプロセスです。一般に、複雑なDSBの修復は困難で、完了までに時間を要します。一方、単純なDSBのNHEJによる修復は、ArtemisのDNA分解活性を必要とせず、数時間で完了します。以上のことから、Artemisを必要とする複雑な構造のDSBの修復では、単純なDSBの修復に比べ、高頻度で塩基の欠失など突然変異を引き起こすのではないかと考えられます。つまり、Artemis欠損細胞では、突然変異を起こしやすい複雑なDSBの修復効率が低いために染色体切断や致死に対して高感受性であると同時に、生き残った細胞集団での突然変異頻度は親株に比べ低いレベルに抑えられていると考えられます。従って、何らかの人為的方法によりArtemis活性を低下させることができれば、複雑な構造のDNA切断を有する細胞はDSBが修復されないまま死んでしまい、結果的に生細胞中の突然変異頻度が低下するかもしれません。今後、人為的にArtemis活性を抑制するための手法を検討する計画です。本研究の成果は、究極的に放射線発がん感受性の低減に結びつくものと期待されます。

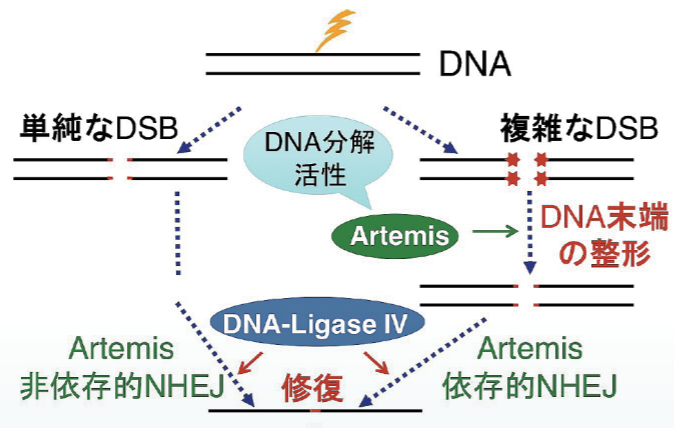


図7: NHEJにおけるArtemisの機能
大きなエネルギーが集中すると、DNAが切断され、化学的に複雑な構造のDNA切断末端が形成される。Artemisは、このようなDNA切断末端が、DNA Ligase IVの基質として結合されるよう整形する。

参考文献

1) Katsube, T., Mori, M., Tsuji, H., Shiomi, T., Shiomi, N., Onoda, M.: Differences in sensitivity to DNA-damaging agents between XRCC4- and Artemis-deficient human cells, J. Radiat. Res., 52, 415-424, 2011.

放射線感受性を修飾する非遺伝的要因の解明と制御

中島 徹夫・王 冰・石井 洋子・二宮 康晴・田中 薫・Guillaume Vares

1. 放射線感受性を修飾する生活習慣

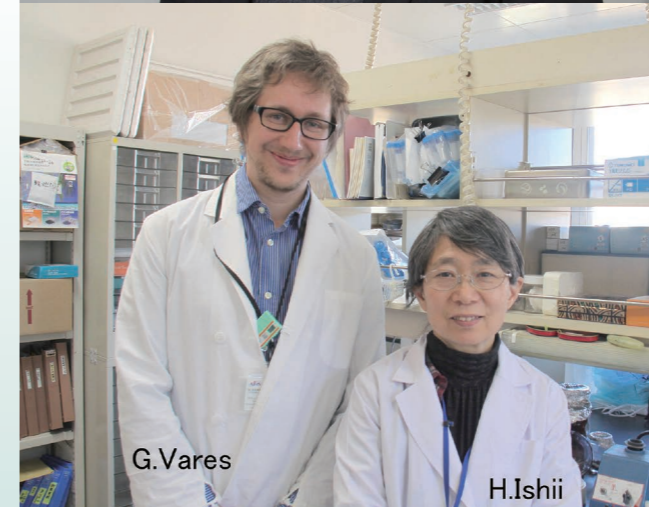
放射線感受性の個人差をもたらす非遺伝的要因として、私たちはまず多くの日本人に関わる生活習慣である高カロリー摂取に着目しました。高カロリーの摂取と放射線影響の関係について、これまでいくつかの報告はありますが¹⁾、発がんリスク評価に結び付く知見は極めて乏しい状況です。私たちは、C57BLマウスおよびC3Hマウスに通常の6倍のカロリーを含む高脂肪餌を4~5週齢から与え、17週齢で1日0.75Gyずつ4日間、合計3Gy照射しました。そして4回目の照射の翌日に解剖し、臓器秤量後、骨髄や肝臓でゲノム損傷、酸化ストレス、アポトーシス、DNAメチル化、マイクロRNA発現変動を調べました(図8)。C57BLとC3Hの本研究に関わる特徴は、表1に示す通りです。図9は飼育中のC57BLマウスの典型的な体重変化を示します。解剖時には一部のマウスに脂肪肝の傾向が示唆される程度の肥満でした。図10は、臓器重量の変化を示します。胸腺と脾臓では照射後の重量低下の仕方に摂取カロリーの影響は観察されませんでした。肝臓については高カロリー摂取マウスだけで照射後の有意な重量低下が観察されました。



図8: 高カロリー摂取による放射線感受性修飾に関する実験系

表1: マウス系統の特徴

- ・C57BL: 高脂肪餌摂取により肥満、高血糖、インシュリン抵抗性を示す。
- ・C3H: 肝臓を自然発症する。



次に肝臓細胞において、ゲノム防御に働く遺伝子p16、MGMT、DAPKのプロモーター領域(遺伝子近傍で遺伝子発現の活性を制御している領域)におけるDNAのメチル化を見たところ、高カロリー摂取マウスにおいてメチル化が引き起こされていることが分かりました。p16はがん抑制遺伝子であり、プロモーター領域に存在するCG配列に富んだ領域(CpGアイランド)の異常なメチル化がしばしばがん組織で観察されています。MGMTはメチル化したグアニンを修復するDNA修復遺伝子です。DAPKはDNA損傷に起因するアポトーシスに関与していますが、やはり発がん初期のメチル化が報告されています。メチル化により、これらゲノム防御遺伝子の発現が抑制され、放射線のゲノム損傷作用を増強することが示唆されました。興味深いことにEP300というがん抑制遺伝子のプロモーターが、高脂肪食マウスでメチル化している一方で、高脂肪食マウスにさらに放射線照射すると逆にメチル化が低下することが分かりました。このことは、高カロリー摂取によってEP300遺伝子の発現が抑制され、これにより高まった発がんリスクを放射線が緩和し得ることを示唆しています。

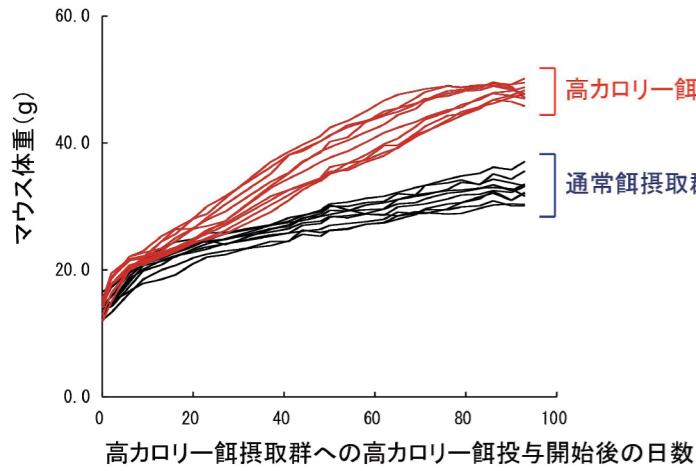


図9: 飼育中のマウスの体重変化

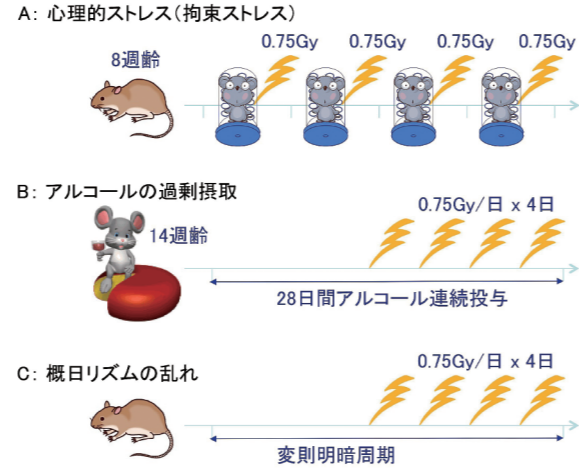


図11: 個人の放射線感受性を修飾する生活習慣要因を同定するために今後計画している実験

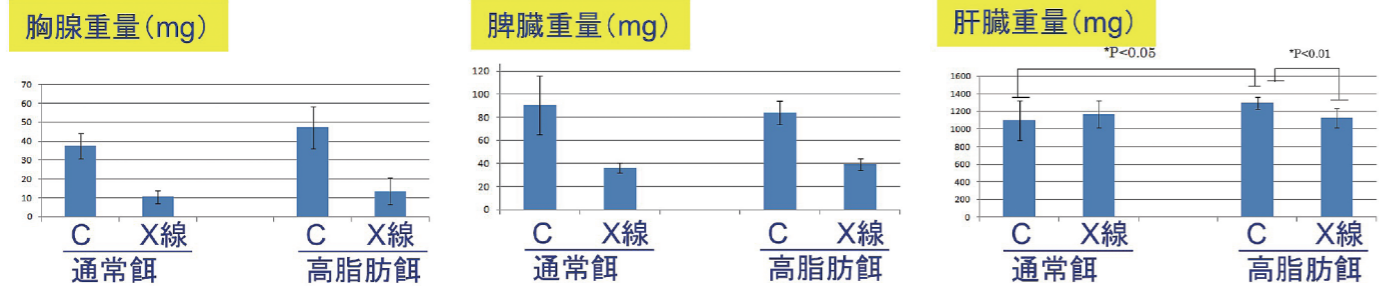


図10: 解剖時の胸腺、脾臓および肝臓の重量

肝臓において、マイクロRNAと呼ばれるタンパク質をコードしない小さなRNA分子群の変動をマイクロアレイを用いて調べました。その結果、通常食マウスに放射線を照射すると、TGF- β という増殖因子が関連する情報伝達やMAPキナーゼと呼ばれるリン酸化酵素が関連する情報伝達、あるいはアポトーシス関連経路等、放射線応答としてよく知られた経路の変動が観察された一方で、高カロリー摂取マウスでは不飽和脂肪酸の生合成などの経路が変動していることがわかりました。そして興味深いことに高カロリー摂取マウスを照射しても、通常食マウスで照射後観察されるアポトーシスや情報伝達等の変動は見られず、不飽和脂肪酸の生合成など高カロリー摂取マウスで見られた特徴のみが観察されました。

以上、高カロリー摂取実験から得られた知見を整理しますと、ゲノム損傷を指標として骨髄の放射線感受性を評価した時に、高カロリー摂取の影響は観察されなかったものの、DNAメチル化とマイクロRNAの解析から、肝臓において高カロリー摂取が放射線応答を修飾している可能性が示唆されました。私たちは、今後さらに他の非遺伝的要因の解析を行う計画です。一つは心理的ストレスの影響を調べるために、マウスを6時間多孔チューブに拘束した後照

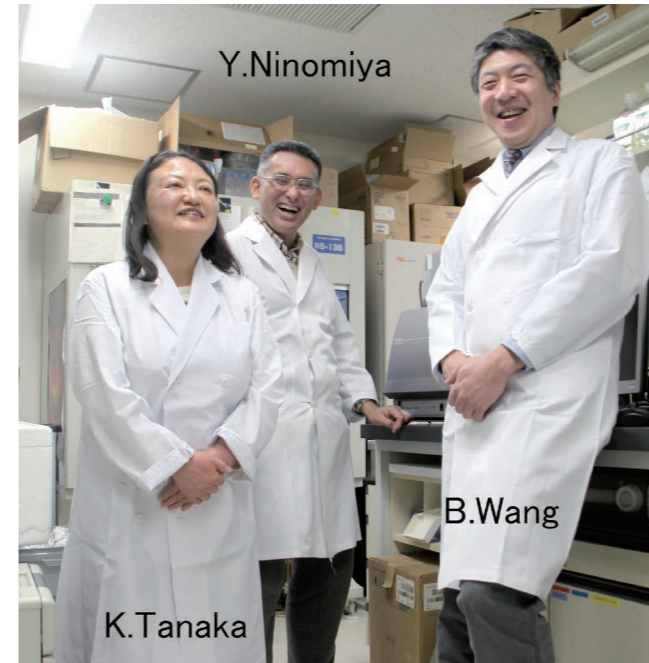
射する実験であり(図11A)、もう一つはアルコールの過剰摂取の影響を調べるために28日間アルコールを連続投与した後照射する実験です(図11B)。さらに、概日リズムの乱れの影響を調べるために、変則的な明暗周期を与える実験も計画しています(図11C)。これらは、原子炉事故等に伴い、長期汚染地域の住民の多くが経験する可能性のある生活習慣に関連しています。

参考文献

- 1) Tribble, D.L., Barcellos-Hoff, M.H., Chu, B.M., Gong, E.L.: Ionizing radiation accelerates aortic lesion formation in fat-fed mice via SOD-inhibitable processes. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 1387-1392, 1999.

2. 放射線適応応答による放射線感受性制御

放射線適応応答とは、予め低線量放射線 (priming dose) を照射することにより、その後の高線量放射線 (challenge dose) に対する抵抗性が誘導される現象を指します¹⁾。放射線発がんを指標にした放射線適応応答は実験動物を用いて既に報告されており、予めの低線量放射線照射を、個人の放射線感受性を修飾する非遺伝的要因の一つと見ることができます。



放射線適応応答の研究は、現象の発見以来30年の歴史があり、培養細胞のみならず実験動物個体を用いた多様な実験系で確認されてきました。その機構解明は低線量放射線のリスク評価と放射線防護のための科学的基礎を提供すると期待されており、公衆衛生と基礎科学の両面で大きな意義をもっています。個体レベルの放射線影響を指標にした実験系で確認された放射線適応応答の中で、「米澤効果」と呼ばれるマウスモデルは、半致死線量よりも少し高い線量の放射線を照射した際、照射後30日目までの致死効果が、予め低い線量の放射線を照射しておくことにより低減される現象で、元々はpriming doseとchallenge doseの両方にX線が用いられていました²⁾。X線は電磁波放射線で、粒子線に比べて空間的に密度の低い電離事象をもたらすことが特徴です (linear energy transfer (LET) が低い)。半致死線量よりも少し高い線量の放射線照射による30日目までの致死は、造血機能の不全によることが知られているので、米澤効果のメカニズムは、造血組織における放射線抵抗性の誘導であるといえます。本研究では、まずC57BL/6J系統のマウスを用いて米澤効果の再現性を確認しました。その際、priming doseとして6週齢のマウスに0.5GyのX線照射を行い、2週間後のchallenge doseとしてはX線だけでなく、加速器から得られる粒子線も用いました。粒子線は、空間的に密度の高い電離事象をもたらす(高LET)放射線であり、私たちはこれをchallenge doseとして用いても放射線適応応答が誘導されることを既に示しています^{3,4)}。本研究で私たちは致死だけでなく、30日以降まで生き残ったマウスの造血組織に残存する損傷についても調べました。すなわち、priming doseとchallenge doseの両方を照射されたマウスと、challenge doseのみ照射

されたマウスの造血組織において残存する損傷を比べることにより、米澤効果を誘導するために用いられたpriming doseの条件で、急性でない放射線障害(晩発影響)も低減できるかどうか調べました。

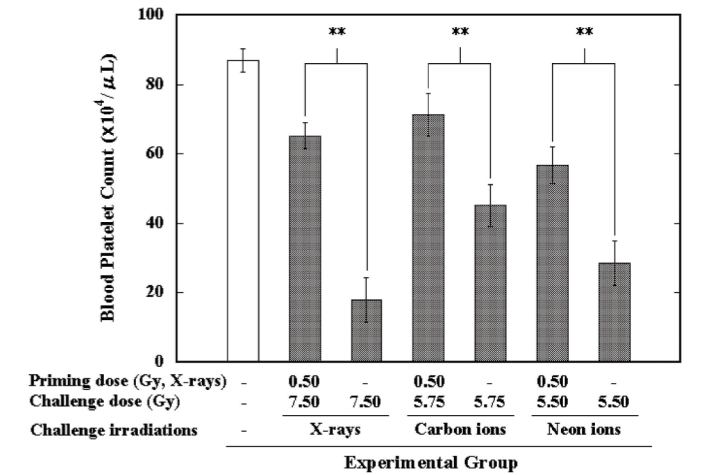


図12: 末梢血中の血小板数 priming doseがX線であり、粒子線(炭素線、ネオン線)であり、challenge dose後の血小板数の低下は有意に抑制されていることがわかる。

実験にはC57BL/6J系統のメスマウスを用い、challenge doseとしてX線の他、HIMACから得られる単色の炭素線およびネオン線を用いました。造血組織に残存する損傷は、challenge dose照射後30日目の生存が確認されたマウスについて、照射後31日目に末梢血液像(血球の種類ごとの数や形など)を調べることによって評価しました。その結果、X線のpriming doseにより、造血系におけるchallenge doseの有害影響は低減することがわかりました。すなわち、priming doseはX線であり粒子線でありchallenge doseによる末梢血中血小板数の低下を有意に抑制していました(図12)。骨髄の損傷は、この放射線適応応答マウスモデルで観察している主要な死因であることから、challenge dose照射後30日目で生き残ったマウスの31日目における骨髄に残存する損傷を測定しました。X線、炭素線およびネオン線によるchallenge doseを照射したマウスにおいて、分化が進んだ正染色赤血球(NCE)数と、より未分化な多染色赤血球(PCE)数の和に対するPCE数の比(骨髄細胞におけるゲノム毒性の指標)はX線によるpriming doseにより改善されていることがわかりました(図13)。そして放射線発がん感受性の観点から最も重要なゲノム損傷については、PCEにおいて小核を有する細胞の割合(図14A)もNCEにおいて小核を有する細胞の割合(図14B)も、どちらもX線によるpriming doseにより顕著に減少していることがわかりました。

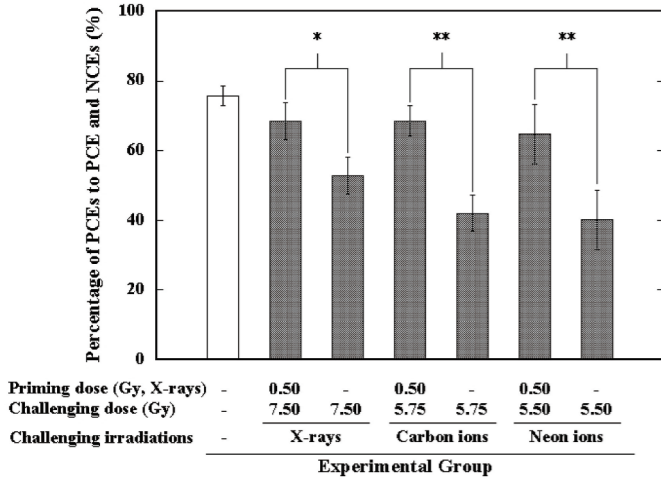


図13: 正染性赤血球 (NCE) 数と多染性赤血球 (PCE) 数の和に対するPCE数の比
priming doseがX線であれ、粒子線(炭素線、ネオン線)であれ、challenge dose後の未分化赤血球細胞の増殖阻害が有意に抑制されていることがわかる。

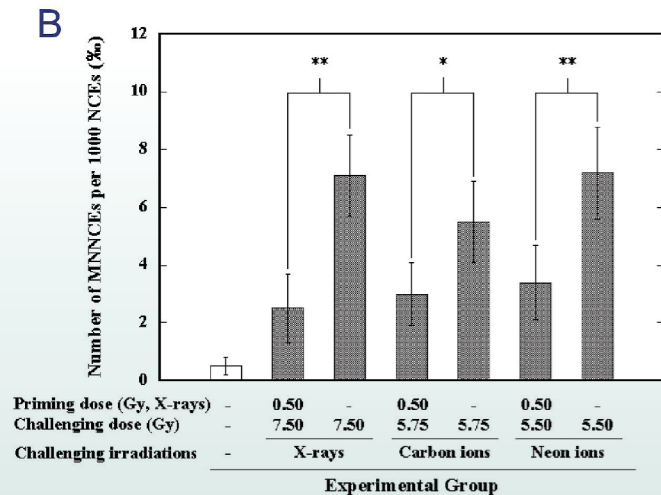
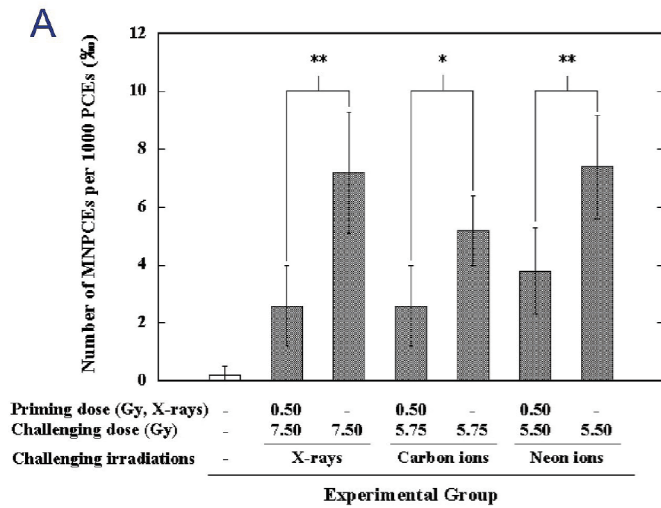


図14: PCEにおいて小核を有する細胞の割合 (A) およびNCEにおいて小核を有する細胞の割合 (B)
priming doseがX線であれ、粒子線(炭素線、ネオン線)であれ、どちらもchallenge dose後の小核頻度が顕著に減少していることがわかる。

低い線量の放射線は、細胞の抗酸化能の亢進やDNAの2本鎖切断(放射線が生物作用をもたらす上で最も重要と考えられている)の修復能の増強を通して、細胞死や染色体異常、突然変異、がん化等の放射線障害を低減し、個体レベルの放射線適応応答を引き起こしているのではないかと推測されています。放射線適応応答は進化的によく保存されており、生命にとって欠かすことのできない基本的な機能であるかもしれません。放射線適応応答を造血能の低下や遅延的ゲノム損傷など、造血組織における残存損傷と晩期有害影響を指標として調べることは、放射線防護の観点から重要です。

以上をまとめると、低い線量の放射線は、骨髓細胞における高線量の低LET放射線および高LET粒子線による致死効果、および造血能の低下や、発がん等遅延的ゲノム損傷を含む有害な晩期影響を低減できることがわかりました⁵⁾。このことは、放射線適応応答を利用して高線量放射線により引き起こされるゲノム不安定性を抑制できる可能性を示唆しています。

以上のように、米澤効果の条件下で、致死のみならずゲノム損傷を指標としても放射線適応応答が誘導されていることが示されたことから、私たちは、この放射線適応応答を摂取カロリーの調節を通してさらに最適化できるかどうか調べました。マウスを高脂肪食で飼育し、6週齢で0.5Gy照射した後8週齢で高線量照射して骨髓細胞のゲノム損傷および造血死を指標とした放射線適応応答を評価したところ、放射線適応応答は観察されませんでした(図15A)。逆に普通食の摂取量を25%制限すると、造血死でも骨髓ゲノム損傷でも放射線適応応答が観察されるとともに(図15B,C)、普通食の無制限摂取マウスに比べて照射後の骨髓ゲノム損傷が全体として若干低下することがわかりました。このことから、普通食の制限と放射線適応応答を組み合わせることにより、放射線感受性をさらに低減できることが示唆されました。

参考文献

- 1) Vares, G., Wang, B., Takana, K., et al.: Radiation-induced adaptive response with reference to evidence and significance: A review. *Indian J. Radiat. Res.*, 3, 16-34, 2006
- 2) Yonezawa, M., Misonoh, J., Hosokawa, Y.: Acquired radioresistance after small dose X-irradiation in mice. *J. Radiat. Res.*, 31, 256-262, 1990.
- 3) Wang, B., Tanaka, K., Vares, G., Shang, Y., et al.: X-rays-induced radioresistance against high LET irradiations from accelerated heavy ions in mice, *Radiat. Res.*, 174, 532-536, 2010.
- 4) Wang, B., Tanaka, K., Ninomiya, Y., Maruyama, K., et

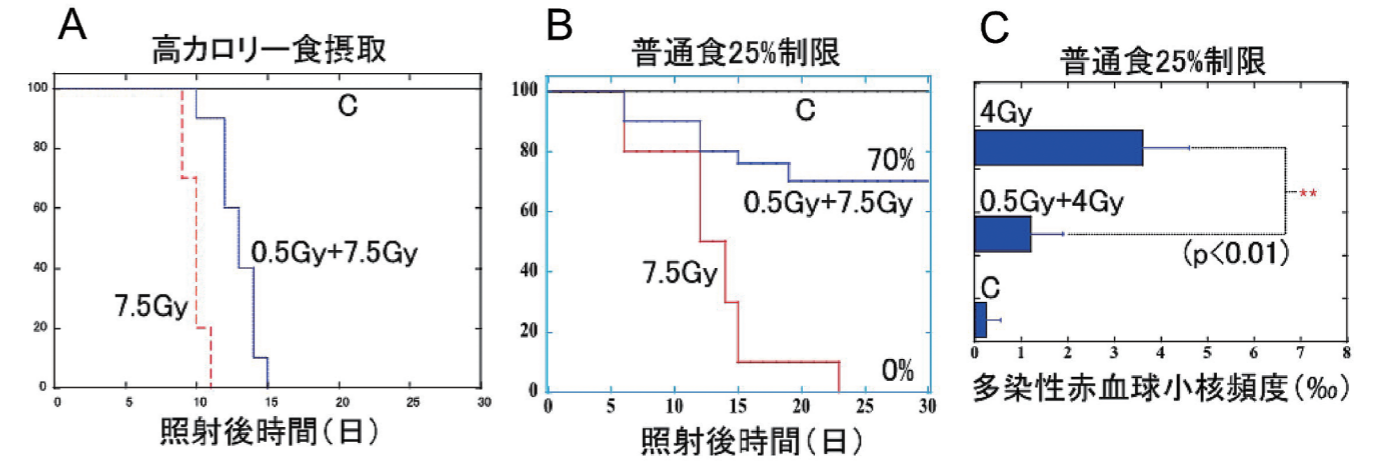


図15: 高カロリー摂取 (A) あるいは普通食の25%制限摂取 (B,C) 条件下における、致死 (A,B) および多染性赤血球 (PCS) における小核形成 (C) を指標にした放射線適応応答の評価

al.: X-ray-induced radioresistance against high-LET radiations from accelerated neon-ion beams in mice. In: Neno M (ed). *Current Topics in Ionizing Radiation Research*. Rijeka: Intech-Open Access Publisher, pp199-214, 2012.

- 5) Wang, B., Tanaka, K., Ninomiya, Y., Maruyama, K., et al.: Relieved residual damage in the hematopoietic system of mice rescued by radiation-induced adaptive response (Yonezawa Effect), *J. Radiat. Res.*, 54, 45-51, 2013.

3. ステロイドホルモンによる放射線感受性の修飾

乳がんは女性に発症するがんの16%を占め、すべてのがん死亡の13.7%に達しています(表2)。乳がん以外のがんの治療のために胸部に中線量ないし高線量の放射線を受けた女性は、乳がんについて2.1~4.0の相対リスクを負うとされています。低線量の放射線でも高いリスクを示すデータが最近明らかにされています¹⁾。エストロゲンやプロゲステロン等の女性に特有なステロイドホルモンは、増殖や分化およびアポトーシスの制御を通して、乳がんの発生と恒常性維持に不可欠な役割を果たしています。最近20~30年の研究成果は、ホルモン補充療法を受けた閉経後女性のように、ステロイドホルモンを長期間暴露することも乳がんリスクの要因であるとの考えを支持しています²⁾。ステロイドホルモンによるリスクと放射線によるリスクが、互いに影響し合っていることが報告されています。例えば私たちは、プロゲステロンが培養された乳がん細胞の放射線誘発アポトーシスを阻害し、染色体異常を保持しつつ増殖する細胞の数を増大させることを示しました³⁾。このことから、正常な乳がんの放射線に対する反応、特に低線量放射線に対する反応にステロイドホルモンがどのように影響するかについて、強い関心が投げかけられています。



表2: 乳がん、および放射線やステロイドホルモンとの関連

- 女性が発症するがんの16%、すべてのがん死亡の13.7%を占める。
- 放射線によりリスクが増大する。
- ホルモン補充療法等によるステロイドホルモンの長期暴露によりリスクが増大する。
- ステロイドホルモンが乳がんの放射線応答に影響を及ぼす。
 - プロゲステロンは放射線誘発アポトーシスを阻害し、染色体異常を保持したまま増殖する細胞数を増大させる。

悪性腫瘍細胞のごく一部が、腫瘍の維持と再発を引き起こしていると考えられています。このようないわゆるがん幹細胞は、自己複製能(即ち腫瘍形成能)を持っており、また腫瘍を構成する様々ながん細胞系列を生成する能力があります。乳がん幹細胞は、Al Hajira⁴⁾によって初めて観察されました。最近の研究から、乳がん由来の細胞株は乳がん幹細胞を含んでいることが明らかになりました。乳がん幹細胞は正常な組織幹細胞から派生するのか、あるいは組織幹細胞から分化した未成熟な細胞(前駆細胞)が自己複製能を獲得した結果生まれるのか、その由来は目下議論的となっています。今のところ乳がん幹細胞の正確な定義はまだ無く、これを選

別するためにいくつかのマーカーの組み合わせが用いられています。アルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase: ALDH) の発現は幹細胞や前駆細胞のよいマーカーであり、細胞群中の乳がん幹細胞を同定するために用いることができます。

乳がん幹細胞は放射線抵抗性であり、特有な分子的特徴を示すと考えられています。増殖因子TGF- β によって上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT、上皮性のがん細胞が、運動性の高い間葉系細胞の表現型を獲得し、転移を起こしやすくなった状態) が誘導されると、幹細胞とがん細胞の性質をもつ細胞が生ずることが最近示されました。放射線はEMTの開始とがん幹細胞ポピュレーションの増幅に機能していることが報告されています⁵⁾。しかし、今日までにステロイドホルモンが放射線によって引き起こされるEMTに関与しているかは明らかにされていません。正常な乳腺において、幹細胞や前駆細胞はプロゲステロンの受容体もエストロゲンの受容体も発現していませんが、受容体を発現している内腔細胞からホルモンの傍分泌シグナルを受ける機構が知られています。プロゲステロンもエストロゲンも幹細胞や前駆細胞に強い増殖効果をもたらします。これまでの研究から、プロゲステロンは幹細胞の制御に関わるNotch経路と呼ばれる分化に関連した情報伝達因子群を制御していることが示されています。エストロゲンは、増殖因子FGFに関連した情報伝達系を介してがん幹細胞の増幅を刺激していることが最近報告されました。以上の通り、ステロイドホルモンが幹細胞やがん幹細胞に影響をもたらすことを示す証拠が得られています。

私たちは、個人の放射線感受性を修飾する非遺伝的要因として、ステロイドホルモンががん幹細胞の性質を制御することにより放射線による乳がんリスクを修飾するか調べることを計画し、そのために、照射された乳房でステロイドホルモンが乳がん幹細胞の増幅を刺激するという作業仮説を立てました。ヒト正常乳腺由来の培養細胞MCF-10A (表3) に含まれるがん幹細胞の割合を調べたところ、照射しなければプロゲステロンで処理してもエストロゲンで処理してもがん幹細胞は有意に観察されなかった一方、プロゲステロン存在下で10Gy照射することによりがん幹細胞の顕著な生成・濃縮が観察されました。プロゲステロン受容体の拮抗剤ミフェプリストンで処理してもがん幹細胞の生成・濃縮は観察されたことから、これが受容体に依存していないことが分かりました。この実験において、ALDHを指標としてがん幹細胞を評価しましたが、ALDHを発現した細胞ではマンモスフェアとい

う細胞塊を形成する能力が顕著に高かったことから、これががん幹細胞のよいマーカーになっていたことが確認できました。

表3: MCF10A細胞の性質

- ヒトの正常乳腺由来細胞 (線維嚢胞病患者から単離)
- プロゲステロン受容体もエストロゲン受容体も発現していない。
 - プロゲステロンに対し増殖応答する。
 - プロゲステロンに反応してFASを介するアポトーシスが阻害される。
- 考えられるプロゲステロンの受容体
 - mPR (G protein-coupled membrane receptor)
 - PR-M (mitochondrial)

ステロイドホルモンの標的となりうる遺伝子がいくつか同定されているものの、ステロイドホルモンが正常乳腺や乳がんに作用する分子機構は複雑で未だによく分かっていません。最近マイクロRNA制御の分野の研究が精力的に推進されています。マイクロRNAはタンパク質をコードしない小さなRNA分子であり、様々な生体機能に関わっています。放射線照射後あるいはステロイドホルモン処理後のマイクロRNAの量的変動は、様々な実験系で観察されています。諸々のがん、あるいは幹細胞の自己複製や分化におけるマイクロRNAの役割を報告した研究は数多くあり、がん幹細胞の増殖、分化および自己複製にも関与していることを示す最近の報告もたくさんあります。例えばlet-7の発現は乳がん幹細胞で低下しています。しかし今日までのところ、ステロイドホルモンや放射線で誘導された乳がん幹細胞の増幅にマイクロRNAが関与していることを示すデータはありません。

プロゲステロン存在下で放射線による乳がん幹細胞の生成・濃縮が起こるメカニズムを調べるためにマイクロRNAの発現変動を調べたところ、細胞老化の誘導とがん抑制に関わる分子種等の抑制やアポトーシス阻害に関わる分子種の過剰発現が観察され、これらのメカニズムの関与が示唆されました。がん幹細胞は放射線に抵抗性であり、これまでがんの放射線治療の分野で注目されてきましたが、今回の結果により、放射線リスクの研究においてもその重要性が明らかになったと考えられます。

参考文献

- 1) John, E.M., Phipps, A.I., Knight, J.A., Milne, R.L.: Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the Breast Cancer Family Registry. *Int. J. Cancer*, 121, 386-394, 2007.
- 2) Hankinson, S.E., Colditz, G.A., Willett, W.C.: Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res.*, 6, 213-218, 2004.
- 3) Vares, G., Ory, K., Lectard, B., Levalois, C., et al.: Progesterone prevents radiation-induced apoptosis in

- breast cancer cells. *Oncogene.*, 23, 4603-4613, 2004.
- 4) Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., et al.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100, 3983-3988, 2003.
- 5) Andarawewa, K.L., Erickson, A.C., Chou, W.S., Costes, S.V., et al.: Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res.*, 67, 8662-8670, 2007.

まとめ 根井 充

結び

以上、本研究プログラムの目標と、これまでに得られている成果の一部を抜粋し紹介しました。引き続き、放射線感受性の個人差要因の解明とその人為的制御を通じた積極的な放射線リスク低減化 (積極的防護) 方策の提案に向けて技術開発および基礎データの取得を行い、さらに本研究プログラムが目指す先にある、放射線発がん遺伝的影響を指標とした放射線感受性の個人差を補正するための「個人加重係数」の導入、そして、特に医療被ばくの分野で放射線感受性を修飾する諸因子を人為的に制御するための積極的方策の実用化に向けて、研究を推進、展開していく予定です。

謝辞

本研究プログラムに関係し著者らの研究に携って下さった関係各位のご協力に心より感謝申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金により行いました。

特集2 個人の放射線治療効果予測のための基礎研究

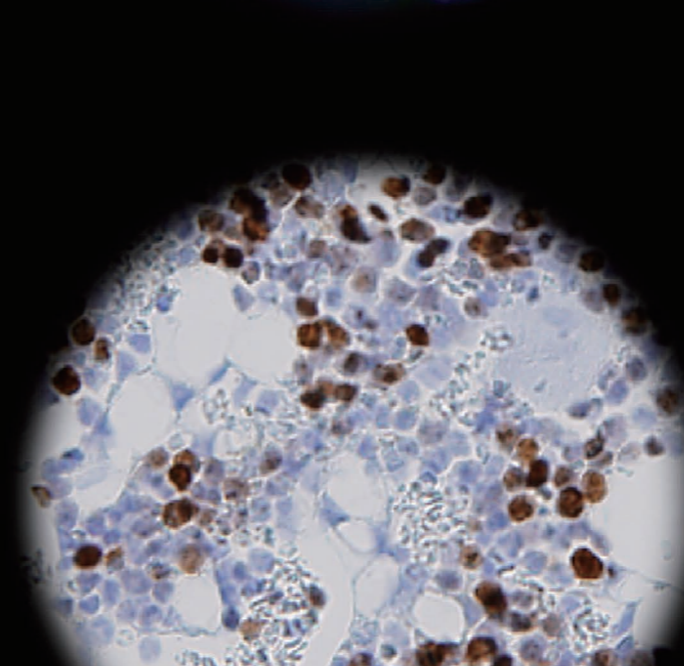
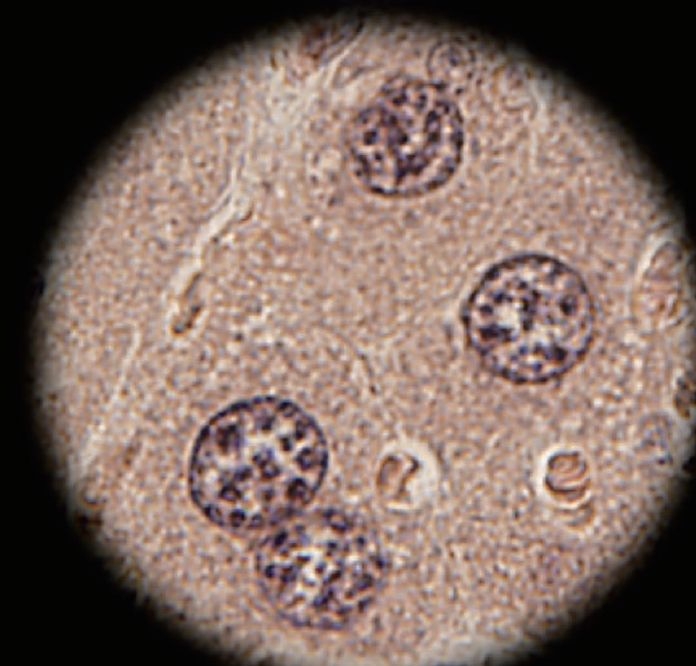
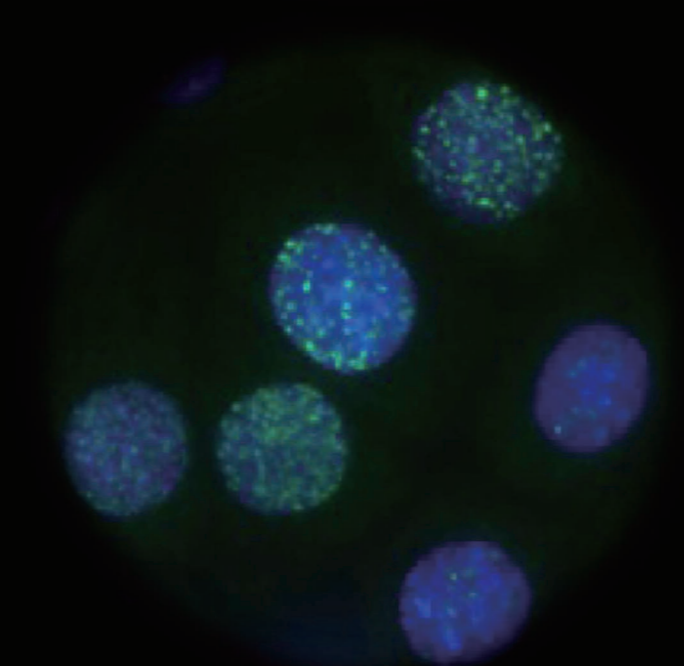
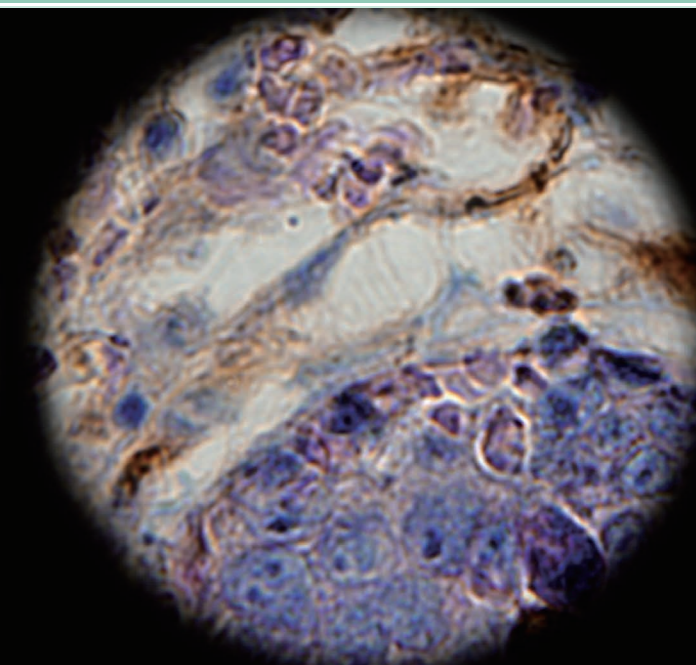
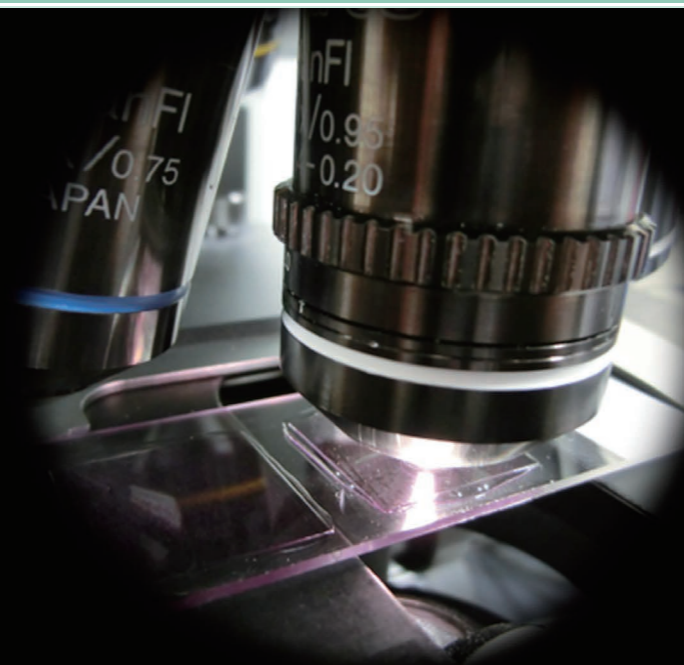
治療効果の異なる腫瘍や転移がんの生物学的特徴を基にした、
重粒子がん治療の適用条件を明らかにするための基礎研究



重粒子医科学センター

先端粒子線生物研究プログラム

今井 高志・下川 卓志・松本 謙一郎・中山 文明・中西 郁夫・石川 顕一・藤田 真由美・佐藤 克俊・
馬 立秋・上野 恵美・石川 敦子・菅 智・今留 香織・中渡 美也子・荘司 好美・大塚 裕美



先端粒子線生物研究プログラム概要

プログラムリーダー 今井 高志

がん治療における放射線療法の適用は拡大し、重要性が高くなってきています。しかし、がんの種類によっては放射線の効果が低い場合があります。また、転移のため治療が難しくなることもあります。

先端粒子線生物研究プログラムでは、放射線治療の効果が比較的低い腫瘍や治療後に出現する転移がんに焦点をあて、これらのゲノム構造や機能の特徴を解析しています。また、放射線を受けた細胞の活性酸素生成とその応答機構について解析しています。

重粒子線治療による最先端の放射線治療は、高い治療効果が認められ、先進医療に承認されています。しかしながら現時点では限られた施設でしか治療が行えないことから、全てのがん患者さんに重粒子線治療を適用することはできません。このプログラムでは、様々な遺伝的背景を持つがん細胞株やモデルマウスの重粒子線応答反応を最新のテクノロジーを用いて解析し、重粒子線治療の適用条件を生物学の側面から明らかにすることを目的とした基礎研究を行っています。

先端粒子線生物研究プログラムでは、第I期、II期中期計画中に、重粒子医学センター病院、大学病院、がんセンター等との間に放射線感受性遺伝子研究に関する協力施設ネットワークを構築し、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に則り、がん患者と一般健康人から3,000例以上の血液試料、腫瘍試料、診療情報を収集し、データベース化してきました。これらの試料からDNA、RNA、タンパク質を抽出し、全ゲノムを対象とした網羅的解析を行い、診療情報の各因子を統計学的に考慮した上で、副作用や治療効果と関連した遺伝子多型・分子マーカーを報告しています。

第III期においては、さらに臨床試料の収集、フォローアップを続けると共に蓄積したデータを基盤として、再発・転移に関わる分子機構の解析に焦点を充てた研究を進めています。

一方このような多数の臨床試料を用いたゲノム解析は、1施設で実施することは難しく、ヨーロッパ、アメリカのグループが中心となってRadiogenomics Consortiumが作られています。これらは白人試料を中心とした研究ですが、遺伝情報には民族差があることが報告されており、私達は放射線感受性遺伝子多型に関して日本(アジア)人と白人に違いがあるのか調べるためにRadiogenomics Consortiumとの共同研究を実施しています。また、臨床研究と協力することで、大変質の高い症例が収集可能なことから、JCOG(日本臨床研究グループ)との共同研究も理事長調整費の支援を受けて実施しています。この研究では声門がん放射線治療の有害反応と遺伝子多型との関連を解析しています。

最近、私達は細胞運動・浸潤能に対して炭素イオン線が抑制的に作用する細胞株と促進的に作用する細胞株を見出したので、これら細胞株間での粒子線応答メカニズムの比較解析を行っています。さらにこれらの細胞株では遺伝的(先天的)な性質に加え、エピジェネティック(後天的)なゲノム修飾についても異なったパターンが見られたことから、次世代ゲノムシーケンサ解析等最先端の手法を導入し炭素イオン線照射と細胞の運動・浸潤能に関わるメカニズムの解析を実施しています。

マウス腫瘍モデルを用いた研究では、これまでに、系統間での遺伝的背景の違いと放射線急性障害の現れ方の違いに関連した分子を報告しており、第III期においては重粒子線の晩期影響についても研究を行っています。また、第II期において提案した炭素イオン線・免疫併用療法の改良、治療法適用判断に必要な基礎研究を実施しています。

さらに第III期では、重粒子線によって発生する活性酸素やフリーラジカルを検出し、これらを還元する化合物の検索、in vivo、特に、マウス腫瘍モデルでの有効性についても研究を進めています。

粒子線システム生物学研究チーム研究概要

チームリーダー(併任) 今井 高志

炭素イオン線照射に対する腫瘍と宿主の多層的な生物学的データを統合し、治療抵抗性腫瘍や転移がんの特徴

を解析しています。2011-2012年度の主な研究成果を紹介いたします。

放射線誘導浸潤能を持つがん細胞株の解析

藤田 真由美・今留 香織・荏司 好美・今井 高志

重粒子線によるがん治療効果の向上させる上で、再発や転移を抑制することは重要な課題です。放射線照射によるがん細胞株の浸潤能変化とその機序を解析することは、放射線との併用で治療効果の向上が期待できる阻害剤の探索にも役に立つものと考えられます。私達はこれまでに、ヒト膵がん由来細胞株2種(MIAPaCa-2及びPANC-1)を比較した実験で、X線照射後の浸潤能は両細胞株で上昇する一方で、炭素イオン線照射後の浸潤能の応答は2つの細胞株間で異なることを見いだしました^{1,2)}。このような細胞株による応答差には、照射後のプロテアーゼの発現・活性の変化や、細胞運動で重要な因子であるsmall GTPaseの活性変化が関与している事を明らかにしました。また、照射後の浸潤能の抑制には、プロテアーゼの阻害とともに、small GTPaseの1つであるRho-ROCKの活性阻害が重要であることを確認しています。これは特定の細胞株でのみ見られる現象か、あるいは他のがん細胞株でも見られる現象なのか、現在、さらに多くのがん細胞株を用い、照射後のがん細胞株の応答差に特徴的な性質を明らかにするための研究を進めています。

参考文献

- 1) Fujita M, Otsuka Y, Yamada S, et al. X-ray irradiation and Rho-kinase inhibitor additively induce invasiveness of the cells of the pancreatic cancer line, MIAPaCa-2, which exhibits mesenchymal and amoeboid motility. *Cancer Sci*, 102:792-8 (2011).
- 2) Fujita M, Otsuka Y, Imadome K, et al. Carbon-ion radiation enhances migration ability and invasiveness of the pancreatic cancer cell, PANC-1, in vitro. *Cancer Sci*, 103:677-83 (2012).

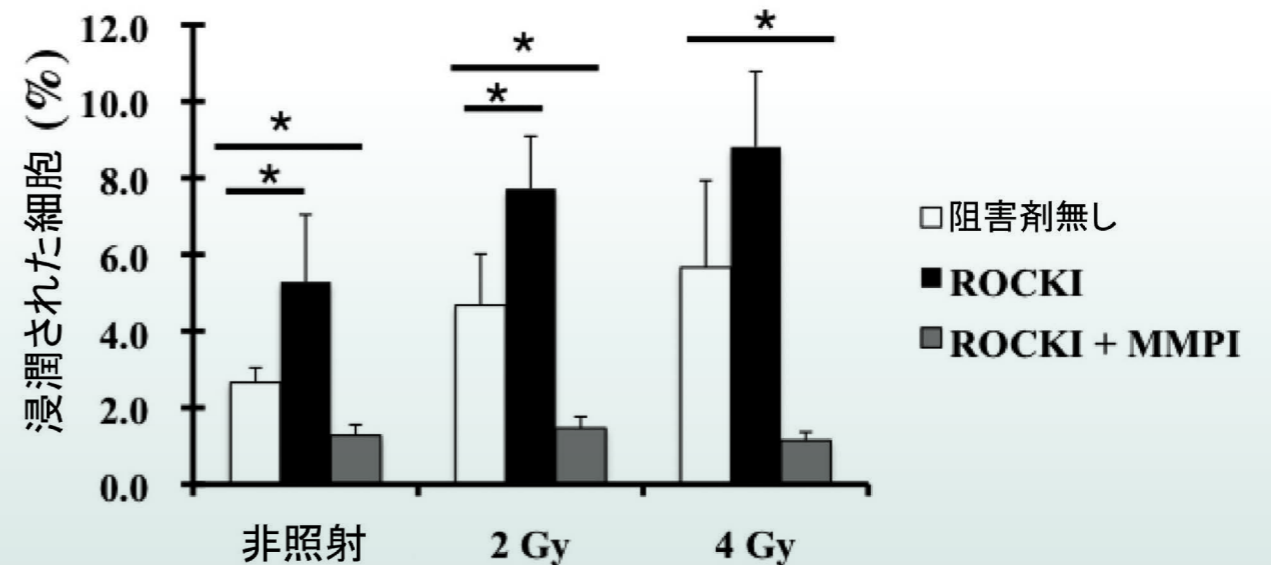


図1: X線照射後のMIAPaCa-2の浸潤能に対するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤(MMPI)及びROCK阻害剤(ROCKI)の効果

炭素イオン線特異的転写応答メカニズムの解析

石川 顕一・石川 敦子・今井 高志

細胞の放射線応答は、遺伝子発現変化とそれに続くタンパク質の活性や相互作用の変化により導かれます。細胞の放射線応答を理解するためには、放射線照射細胞の中で起こる遺伝子の発現誘導や発現抑制のメカニズム(転写制御)を解明することが重要です。

私達はヒト膵がん細胞PANC-1の炭素イオン線応答に特異的な転写制御を解明するため、炭素イオン線(2Gy、80keV/μm、Mono peak)照射48時間後の細胞における遺伝子発現を網羅的に調べ、X線照射細胞(4Gy、照射

48時間後)や非照射細胞の遺伝子発現と比較しました。この解析により放射線応答遺伝子で構成される遺伝子間相互作用のネットワークを見出し(図2)、更にネットワーク上の、炭素イオン線特異的な発現誘導遺伝子群と発現抑制遺伝子群それぞれに特徴的なゲノム構造(転写因子結合配列)を発見しました(図3)。この炭素イオン線応答特異的なゲノム構造は、子宮頸がん炭素イオン線治療症例の解析でも確認されました。現在、このゲノム構造の機能検証を進めています。

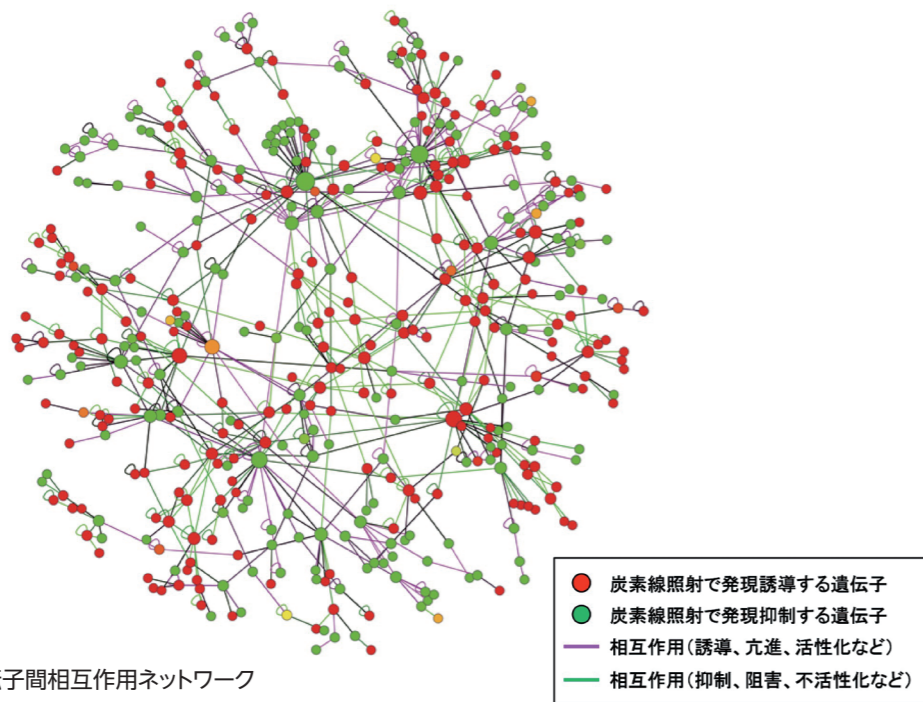


図2: 放射線応答遺伝子間相互作用ネットワーク

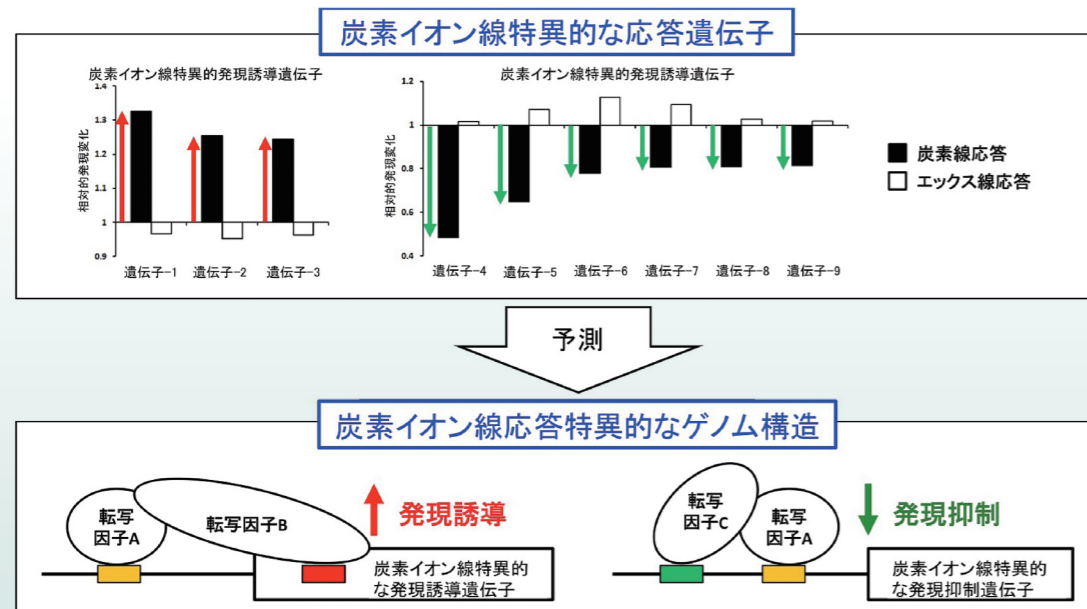


図3: 炭素イオン線応答特異的なゲノム構造

FGF創薬の試み

中山 文明・梅田 禎子・今井 高志

線維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor、FGF)は、放射線障害治療に有効であることが知られています。特に、受容体の特異性から、FGF受容体全てに対して反応性をもつFGF1が上皮系組織を対象とした障害治療薬として有望視されてきました。ところが、FGF1の構造上の不安定性が創薬上の欠点とも考えられていたため、私達はFGF1を、別の種類の因子FGF2と一部融合させて安定化を図り、構造的にFGF1よりも安定したFGFC(FGF1とFGF2の最適化キメラ分子)を作成しました。このFGFCは、FGF1と同じ受容体特異性を持つだけでなく、その効果はFGF1よりも高いものになりました。さらに、FGFCは被ばく後のマウスに投与しても防護効果を発揮できたことから、放射線事故の治療薬としても大きな可能性を示しました¹⁾。

FGF1を安定化させることが、単なる創薬上の利点だけでなく、その効果にも違いが認められたため、FGF1をさらに構造的に安定化させて効果の検討を続けました。現在最も安定なFGF1の1つは、Q40P/S47I/H93Gの3か所にアミノ酸変異を加えたFGF1変異体です。これは、さまざまなアッセイで防護効果が最も高いだけでなく、実際に投与されたマウスにおいて、腸管死を起こす照射条件にも関わらず、食欲が維持され外見上も活発に活動し、ついに腸管死を回避することができました²⁾。

変異体によるこれらの効果は、単純に野生型FGF1の投与量を増やしたり、FGF1の作用を安定的に発揮させるヘパリンを使用したりするだけでは再現できないものです。最近、我々はFGFの作用機序に関して、新しい知見を発表しましたが³⁾、FGFにはまだまだ不明なことが存在します。基礎研究の成果を通じて、放射線がん療法に有用な創薬をめざしています。

参考文献

- 1) Nakayama F, Hagiwara A, Umeda S, et al. Post-treatment with an FGF chimeric growth factor enhances epithelial cell proliferation to improve recovery from radiation-induced intestinal damage. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 78: 860-7 (2010).
- 2) Nakayama F, Umeda S, Yasuda T, et al. Structural stability of human fibroblast growth factor-1 is essential for protective effects against radiation-induced intestinal damage. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 85: 477-83 (2013).
- 3) Nakayama F, Yasuda T, Umeda S, et al. Fibroblast Growth Factor-12 Translocation into Intestinal Epithelial Cells is Dependent on a Novel Cell-Penetrating Peptide Domain: Involvement of Internalization in the in Vivo Role of Exogenous FGF12. *J Biol Chem*, 286: 25823-34 (2011).

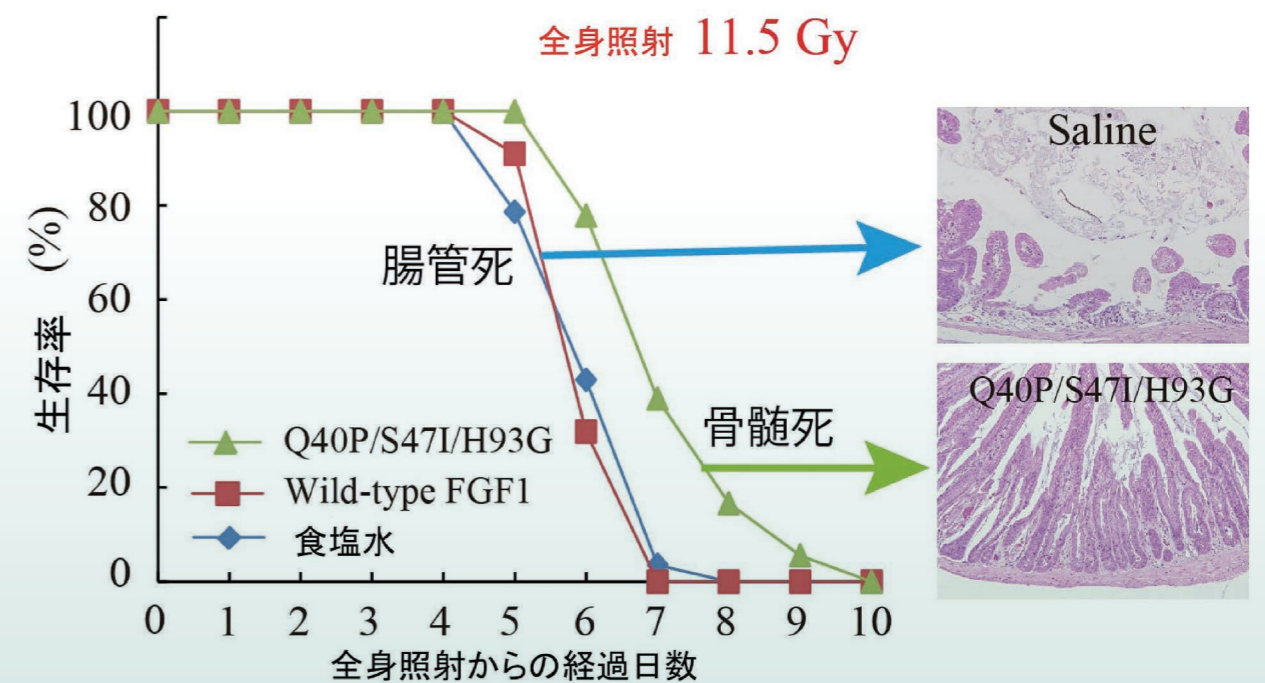


図4: マウス生存曲線
BALB/cマウスに各FGF1を100μg腹腔注射し、24時間後にγ線を11.6Gy全身照射しました。6日目の小腸の組織像を示します。

放射線感受性候補遺伝子の大量SNPタイピングシステム構築

菅智・荘司好美・石川敦子・小川圭子・今井高志

私達は、がんの放射線治療を受けた患者さん2700人の血液検体を収集し、放射線感受性候補遺伝子160種類の領域にある1600SNPsの解析を進めています。遺伝子の型を決定する、このタイピングには膨大な数の酵素反応やヌクレオチドの精製過程が必要であり、大量サンプルを扱う機器や実験工程の管理が重要となっています。

塩基配列中に一塩基が変異した多様性が見られることを一塩基多型 (SNP) と呼びますが、この型を決定するSNPタイピングには質量分析装置を用いており、目的とするSNP配列特異的に設計した分子量の異なるDNA断片を検出することで対立遺伝子の型、アレルタイプを決定しています。現在、一度の実験で、約400検体について最大30SNPのアレルを同時に決定することができます。多サンプルかつ数マイクロリットルの微量サンプルを扱うため、自動分注ロボットを取り入れました。また、検出までには5段階の工程があるため、サンプルの取り違えやロボット操作ミスを防ぐため

に、バーコードによるサンプル管理と分注ロボットの自動制御を行う独自のシステムを開発しました。このシステムにDNAサンプルとSNP配列をあらかじめ登録し、組み合わせを選択すると実験ごとの作業指示書が自動作成されます。サンプル、実験プレート、作業指示書をそれぞれバーコードで管理し、全てのバーコードを読み込むことでシステムがロボットを作動させ、次の工程へ進む事ができるようにしました。自動化が難しく人の作業が入る部分は、作業指示書にチェックシート形式を取り、また試薬のロットや使用機器の番号を記入する欄を設け、トラブル時にフィードバックが可能な構成にしました。さらにミスを防ぐ工夫として、DNAサンプルプレート毎にネガティブコントロールの配置を変え、何重にも取り違えを防いでいます (図5)。

このような半自動SNPタイピングシステムを構築したことで、これまでに約2,500,000タイピングデータを蓄積しています。

一方、膨大な診療情報を匿名化の下に扱うため、ネットワークと切り離し独立した臨床情報リレーショナルデータベースを構築しました (図6)。臨床情報データベースは、研究施設との関連情報を管理するデータベース、臨床検体の受け取り状況を管理するデータベース、臨床検体に関する基本情報や臨床情報を管理するデータベースの3つで構成されており、専門のスタッフが臨床情報の入力やデータベースの全体の運用、管理を行っています。

最初に述べた個々のSNPデータと臨床情報データベースから抽出したデータを匿名化番号によって連結し、放射線治療の副作用や治療効果について統計解析を行っています。現在、データベースには2700症例を超える臨床情報が格納されています。

これらのデータを用いた解析により、放射線治療後の皮膚障害と25SNPsとの関連を見出しました¹⁾。また、泌尿器障害と関連する14 SNPs²⁾、腸管障害と関連する7 SNPs³⁾を明らかにしています。

参考文献

- 1) Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al. Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:685-93 (2007).
- 2) Suga T, Iwakawa M, Tsuji H, et al. Influence of multiple genetic polymorphisms on genitourinary morbidity after carbon ion radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72:808-13 (2008)
- 3) Ishikawa A, Suga T, Shoji Y, et al. Genetic variants of NPAT-ATM and AURKA are associated with an early adverse reaction in the gastrointestinal tract of patients with cervical cancer treated with pelvic radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81:1144-52 (2011)



図5: 質量分析計を用いたヌクレオチドタイピングシステム

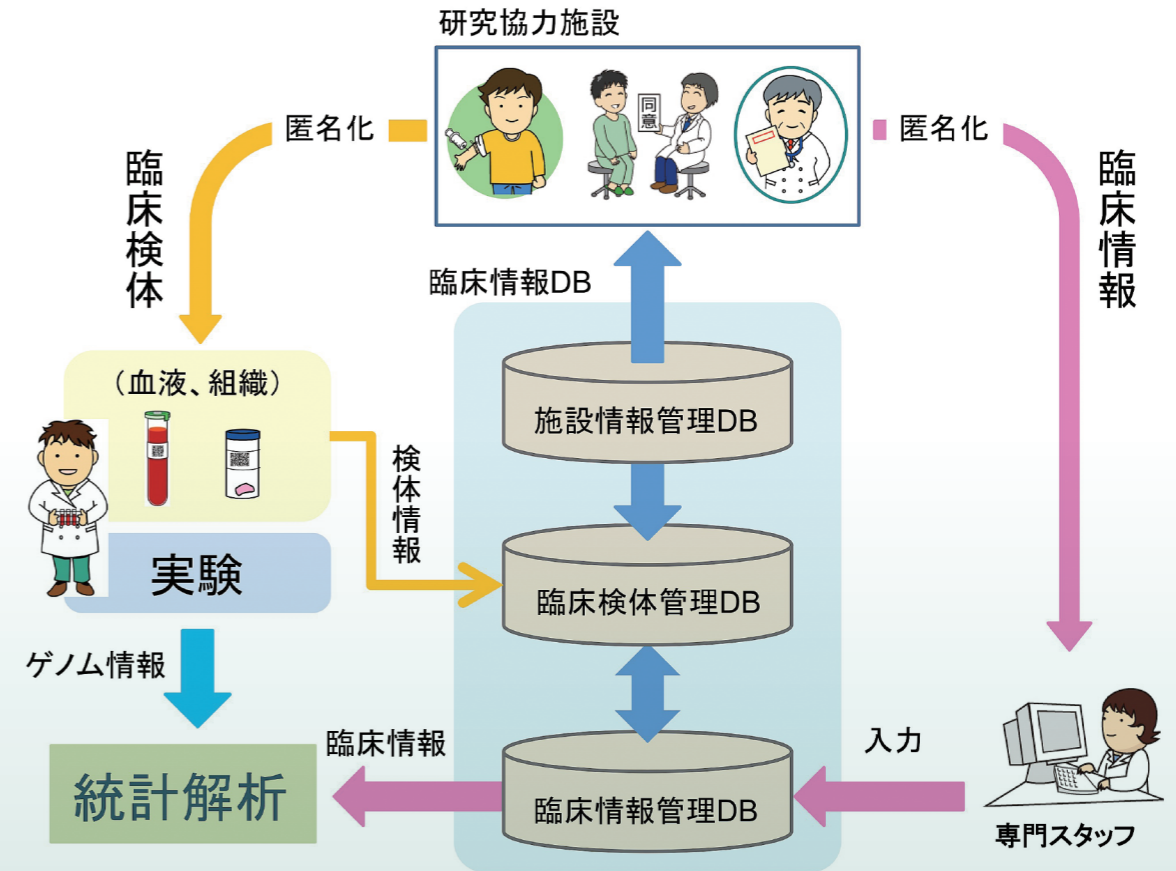


図6: 臨床情報データベース

レドックス応答制御研究チーム

チームリーダー 松本 謙一郎
中西 郁夫・上野 恵美

はじめに

放射線の生物作用には大きく分けて2つの作用が知られています。直接作用と間接作用です(図7)。直接作用とは、DNAやタンパク質や脂質など生体を構成し、また何らかの機能を持つ重要な分子を放射線が直接電離することによって、そこに化学反応が生じて、最終的に分子の持つ機能を失わせたり変えてしまったりすることをいいます。これに対して間接作用とは、先ず放射線が我々の体の70~80%を占める水を電離あるいは励起して分解し幾つかの活性種を生じ、これらの活性種が生体分子と化学反応することによって、分子の機能を障害することをいいます。放射線自体は相互作用(電離や励起)をする相手を選ばないので、たまたま通過するところに存在していた分子と相互作用を起こすわけです。生体内を考えるとボリュームの多い水と相互作用する確率が高く、放射線の主な作用は間接作用によるものといえます。放射線の影響のうち、機能分子を直接傷つける直接作用を避けることは困難ですが、間接作用の場合は反応が機能分子まで進む前に化学的に食い止めることが可能と考えられます。言い換えれば、放射線の生物影響

の70~80%は化学的に制御することが可能といえます。

放射線による水の分解で生じる活性種には、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、水素ラジカル($\cdot\text{H}$)、や水和電子などがあります。更に体内の酸素分子との反応でスーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)や過酸化水素(H_2O_2)などが生じます。これらの活性酸素種やフリーラジカル種が生体分子と反応し、最終的にその機能を障害します。「活性酸素」という言葉と「フリーラジカル」という言葉は時々混同して用いられますが、それは活性酸素種の中にフリーラジカル種であるものとそうでないものがあるからと思われる。活性酸素とは、狭義には $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 、一重項酸素($^1\text{O}_2$)の4つの分子種を指します。広義には、活性酸素種が生体の成分と反応して生じたヒドロペルオキシラジカル($\text{HOO}\cdot$)や脂質ペルオキシラジカル($\text{LOO}\cdot$)、 $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{NO}$ との反応で生じるペルオキシナイトライドなど、酸素を含む様々な活性種を活性酸素と呼ぶこともあります。一方フリーラジカルとは、分子上の不対電子のこと、あるいは不対電子を持つ分子のことをいいます。狭義の活性酸素種の中では、 $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{O}_2^-$ は分子中に不対電子を持っておりフリーラジ

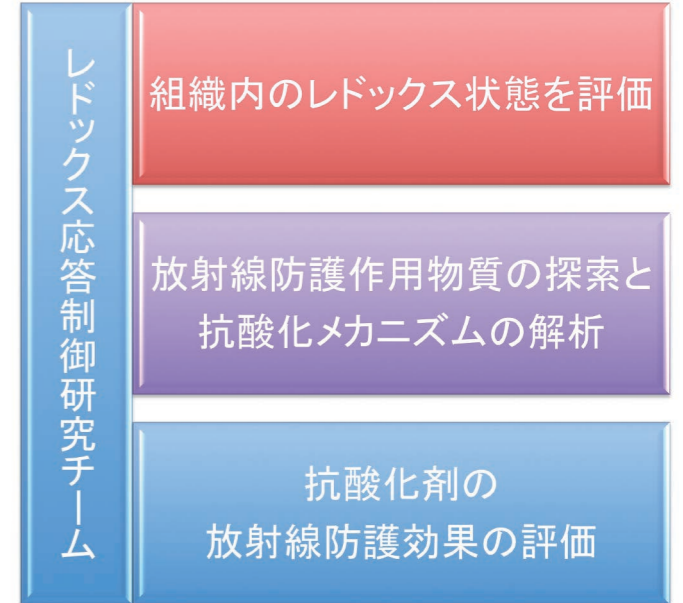
カルです。しかし H_2O_2 と $^1\text{O}_2$ は不対電子を持たないのでフリーラジカルではありません。

レドックス応答制御研究チームでは、放射線によって生体内の水が分解されて生じた活性酸素種やフリーラジカルが引き金となって起こるレドックス反応を解析し、これを制御するための研究を行っています。レドックス(RedOx)とは、Reduction(還元)とOxidation(酸化)を合わせた言葉で、日本語では「酸化還元」といっています。酸化とは分子から電子が引き抜かれる反応で、還元とは電子を受け取る反応です。すなわち2つの分子が反応する際、片方が還元されればもう片方は酸化されます。放射線により生じた活性種と生体分子との間の電子のやり取りでは、主に生体分子が酸化される(電子を引き抜かれる)反応が起こります。この時に、生体分子とは別の電子をより引き抜かれやすい物質を使って生体分子の酸化を抑制することができます。また一度酸化された生体分子に電子を渡して(還元して)元に戻す働きがある物質、例えばビタミンCのように電子を渡しやすい物質を使って結果的に酸化を抑制することも可能です。このような物質の酸化を抑制する働きがある物質を抗酸化剤(アンチオキシダント)と呼びます。

レドックス応答制御研究チームは主に3つのセクションに分かれ、1.放射線により生体内で生成する活性酸素・フリーラジカルを、あるいはそれらによる生成物、更にはそれらの生じやすさの目安としての組織内レドックス状態を評価するセクション、2.抗酸化作用に基づく放射線防護作用を持つ物質を探索しその抗酸化メカニズムを解析するセクション、3.放射線照射による生体影響を測定・数値化し、抗酸化剤の放射線防護効果を評価するセクションがあります。それぞれのセクションが互いに情報をフィードバックし合いながら研究を進めています(図8)。

最近の進歩、国内と世界的動向

放射線防護剤の開発目的には大きく二つあり、放射線がん治療などに際して正常な組織を保護する目的、原発事故や核兵器テロなどによる被ばくに対応する目的です。放射線防護効果を持つといわれる物質の多くは抗酸化作用も有していることが多く、抗酸化物質を使用して放射線の生物影響を修飾しようとする研究は古くから盛んに行われてきました。ただし抗酸化作用に基づく放射線防護作用は放射線の照射中に生成する活性酸素・フリーラジカル種への対処ですので、そのためには照射前に予め放射線防護剤を投与する必要があります。放射線がん治療等による計画的な放射線照射に対しては抗酸化剤を予め投与できるので有効といえますが、事故などによる予期せぬ被ばくに対しては必ずしも有効とはいえません。その場合には放射線緩和剤や治療剤といった生体の応答



Radio-Redox-Response Research Team

図8:レドックス応答制御研究チームの概要とロゴマーク
図8の下にあるのはレドックス応答制御研究チームのロゴマークです。福島県会津地方の郷土玩具である「赤べこ」は、厄病除けのお守りとしても大切にされていることから、放射線障害も含めて活性酸素やフリーラジカルに起因する病気から我々を護るということの意味しています。また赤べこの頭は胴体内に差し込まれる首の部分と振り子のようにぶら下がっており、そのバランスが独特のユーモラスな動きを作り出しているわけですが、この絶妙なバランスは生体内の酸化と還元とのバランスにも通じています。加えて、奇しくも新チームの立ち上げが東日本大震災のすぐ後だったこともあり、東北地方の復興を科学の力で支援していく意味も含めて「赤べこ」をロゴマークとしました。更に、「赤い牛」を英語にするとRed Oxとなることから我々にピッタリなロゴマークです。

を抑制して症状を緩和する薬剤や、あるいは既に出た症状を治療するための薬剤が必要となります。最近になって、予期せぬ被ばくに対しての心配が高まり始めていますが、緩和剤や治療剤の研究はまだまだ始まったばかりです。

我々のチームの研究目的は「放射線がん治療に際して正常な組織を保護すること」ですが、その場合には正常な組織のみを保護し、がん組織は保護しないことが必要です。これまで主に放射線治療に用いられてきたX線やγ線の作用は、活性酸素の原料となる酸素分子が多いと増強され、少ないと弱められること(酸素効果と呼ばれます)から

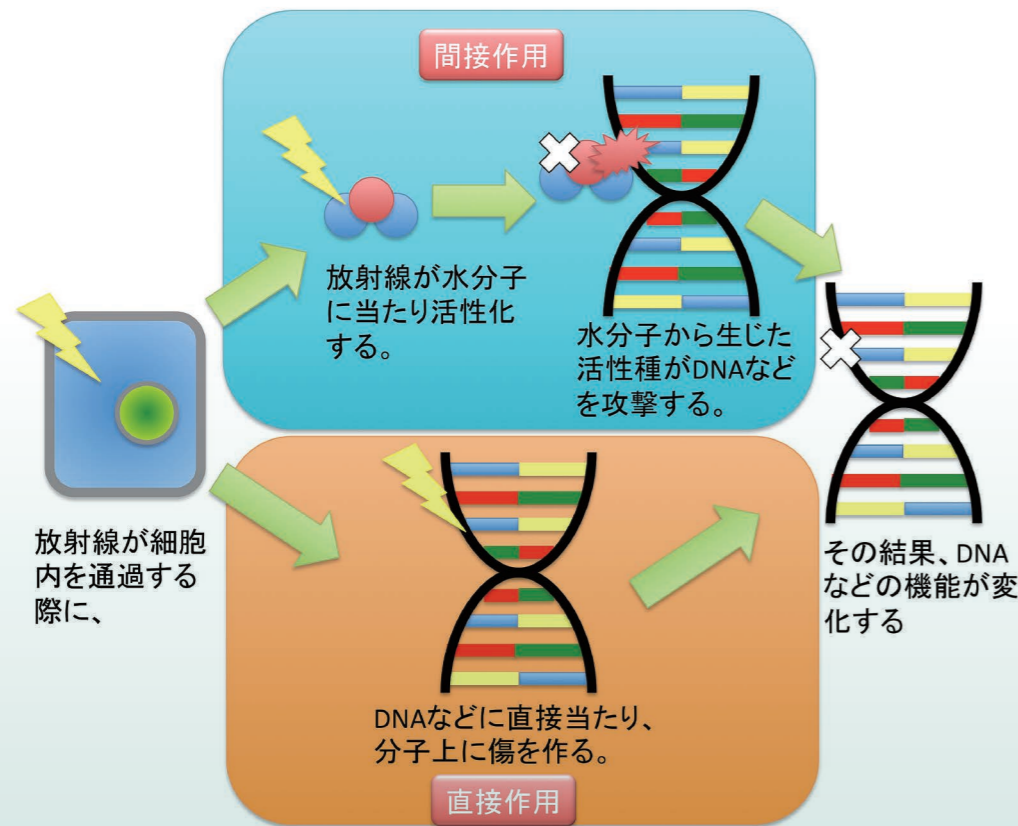


図7:直接作用と間接作用

も分かるように、活性酸素の発生によるところが大きいと考えられます。多くの腫瘍組織は低酸素の状態にあることが知られており、そのような低酸素の腫瘍組織に対する放射線の殺傷効果は弱められ、むしろそれよりも酸素濃度の高い正常組織への副作用が問題となってきました。これを抗酸化剤で制御するには大きな問題があり、まずは如何に放射線防護剤を正常組織だけに届けるかという問題、次に、放射線によるがん組織の殺傷効果も正常組織の副作用もそれぞれ活性酸素の発生が基となって起こるため区別して制御することが難しいという問題です。

4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL) はスーパーオキシドジスミューテース (SOD) 様の活性を持つ安定なニトロキシルラジカルです (図9)。頸頭部がんの治療に際してTEMPOLを含むジェルを頭部に塗布すると、放射線性脱毛が抑制されることが報告¹⁾され、現在米国で第二相臨床試験が行われています。このTEMPOLは正常組織に特異的な放射線防護剤として注目を集めています。ニトロキシルラジカル体には防護作用がありますが、これが一電子還元を受けたヒドロキシルアミン体には防護作用が見られません。腫瘍組織は低酸素状態であること、pHが低いこと、またGSHが豊富であることなどが知られており、TEMPOLを還元しやすい条件がそろっています。そのため腫瘍組織ではラジカル体がほとんど無くなりますが、正常な酸素濃度の組織ではヒドロキシルアミン体の再酸化が起こるのでラジカル体の濃度がしばらく保たれています。このような組織のレドックス状態の差がTEMPOLの正常組織特異的防護効果をもたらします。

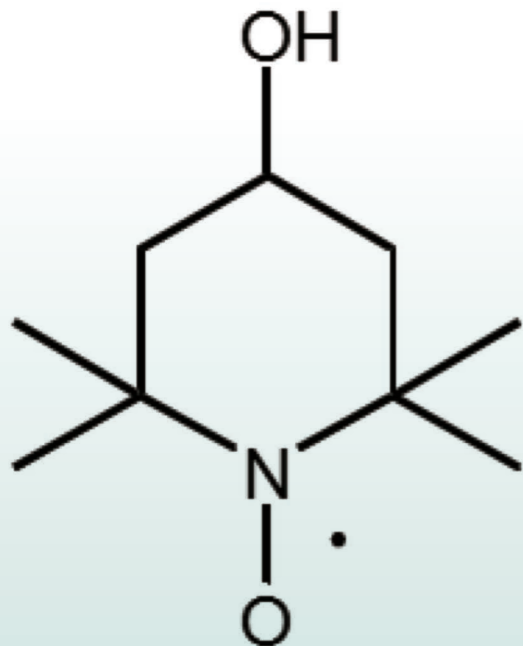


図9: TEMPOLの構造

組織の酸素濃度やレドックス状態は、放射線がん治療の効果に影響を及ぼす因子といえます。我々は、そのような情報を前もって測定し、それを治療に活かそうという研究を行っています。組織のレドックス状態は、組織の酸素濃度、pH、また還元型グルタチオン (GSH) やビタミンCなどの抗酸化物質の濃度によって変化します。そのためそのような情報を非侵襲的に測定する方法が必要とされています。

現状、生体内で生成する活性酸素種を直接とらえる方法はありますが、それに代わる情報として生体内のレドックス状態 (組織内が還元されやすい状態か) を評価する方法が電子常磁性共鳴 (EPR) イメージングやMRIなどの磁気共鳴イメージングの手法を用いて開発されています²⁾。我々はこの手法をレドックスイメージング法と呼んでいます。放医研分子イメージング研究センターでもこのレドックスイメージング法の開発に力を入れており、最近、レドックスイメージングを応用した診断法を提案しプレスリリースを行っています³⁾。

同様に組織内の酸素濃度を非侵襲的に測定し画像化する方法の開発も進んでいます。米国立がん研究所・放射線生物学研究部のMurali C Krishnaらのチームは、パルスEPRやOMRI (Overhauser MRI) を用いて生体内の酸素濃度を非侵襲的に3次元で画像化する手法の開発に力を入れています⁴⁾。これらは常磁性酸素分子プローブ (安定フリーラジカル) のEPR線幅が酸素分子との衝突で広幅化することを利用する方法で、マウスに植え付けた腫瘍組織内の酸素濃度変化を3次元で継続的に測定できるまでになっています。腫瘍内の低酸素部位は常に移動しており、すなわち組織の中で酸素濃度が比較的早い時間で変化している場所が在ることが分かってきました⁵⁾。

現在の課題と研究の方向性

TEMPOLなどのニトロキシルラジカルは水溶液中に単独で存在する場合には非常に安定に存在できますが、ビタミンCなどで容易に一電子還元されます。また $\cdot\text{OH}$ や $\cdot\text{O}_2^-$ によって容易に酸化されオキソアンモニウムカチオン体になり、そこにNAD (P) HやGSHと一緒に存在するとオキソアンモニウムカチオンへ水素が渡され、オキソアンモニウムカチオンは二電子還元されてヒドロキシルアミン体となり、ニトロキシルラジカルから考えると見かけ上は一電子還元されたこととなります。生体内では主に後者の二段階の反応が酵素的に起こっています。 $\cdot\text{OH}$ や $\cdot\text{O}_2^-$ によってヒドロキシルアミンからニトロキシルラジカルへの再酸化も起こりますが、この速度はオキソアンモニウムカチオンを介する見かけの一電子還元反応よりも

十分に遅いため、正常な組織の状態ではニトロキシルラジカルが主に一電子還元を受けて一定の速度で消失します。しかし組織に異常が生じて組織のレドックスバランスが崩れるとニトロキシルラジカルの消失速度が変化し、これを組織のレドックス状態の変化としてとらえることができます。

例えばラットを用いた胃潰瘍モデルなどではニトロキシルラジカルの消失が速くなることが報告⁶⁾されており、これは $\cdot\text{O}_2^-$ が大量に発生することによりニトロキシルラジカルからオキソアンモニウムカチオンへの酸化が促進され、その結果、見かけの一電子還元が速くなるものと考えられます。一方、同じく活性酸素でもセレン欠乏動物では体内の H_2O_2 濃度が高いことが報告されており、この場合にはニトロキシルラジカルの消失速度が遅くなります。これはヒドロキシルラジカルからニトロキシルラジカルへの再酸化が増加するためと考えられます^{7,8)}。逆に低酸素腫瘍組織などでは還元的な状態になりニトロキシルラジカル消失速度が速くなります²⁾。このようにニトロキシルラジカルをレドックス感受性造影剤として用い、組織のレドックス状態とそこへの放射線照射の影響を関連づけたり、あるいは放射線照射の影響を診断したりするための方法として開発を行っています。

放医研では、大型医療用加速器、通称HIMAC (Heavy-Ion Medical Accelerator in Chiba) を使って炭素イオンを加速したビーム (重粒子線) を作り、これをがん照射して治療する重粒子線がん治療が行われています。重粒子線がん治療の特徴として、低酸素

腫瘍にもよく効くとされてきました。これは従来のX線や γ 線と異なり、そもそも生成する活性酸素量が少なく考えられ、活性酸素の原料となる酸素の有無にかかわらず有効であると考えられます。しかし全く活性酸素を生成しないわけではなく、今後の重粒子線がん治療の高度化に伴って、一回治療時の照射線量が大きくなれば、重粒子線による活性酸素生成も無視できないものになってくると予想されます。そこで重粒子線で生成する活性酸素種の生成量や分布の解析を行ったところ、活性酸素種 ($\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{O}_2^-$ を区別せず) の生成の分布が試料の表面からビームの終わりまで比較的フラットに起こっていることを明らかにしました⁹⁾。また H_2O_2 も同様の分布で生じており、この時に試料内の酸素の消費が起こる事を明らかにしました¹⁰⁾。更に重粒子線照射の場合はX線と同程度の疎な $\cdot\text{OH}$ の生成が生じているのと同時に、X線に比べて非常に高密度な $\cdot\text{OH}$ の生成しているところがあることを確認しました¹¹⁾。そのような高密度な $\cdot\text{OH}$ の生成に対して抗酸化剤がどの程度効果を示すかを調べていく必要があります。

その場合、生体に投与できる抗酸化剤の濃度では高密度な $\cdot\text{OH}$ の除去に充分ではないので、その次にできるであろう $\cdot\text{O}_2^-$ を除去することを考えるか、あるいはそれらを除去するスピードを十分に速くすることによって、対処していくことが必要と考えられます。そこで従来、抗酸化物質として知られているカテキンなどの活性酸素消去メカニズムを解析し、その情報に基づいて分子に化学修飾を施し、より速く活性酸素・フリーラジカル種を消去する新規物質の探索を開始しています (図10)¹²⁾。

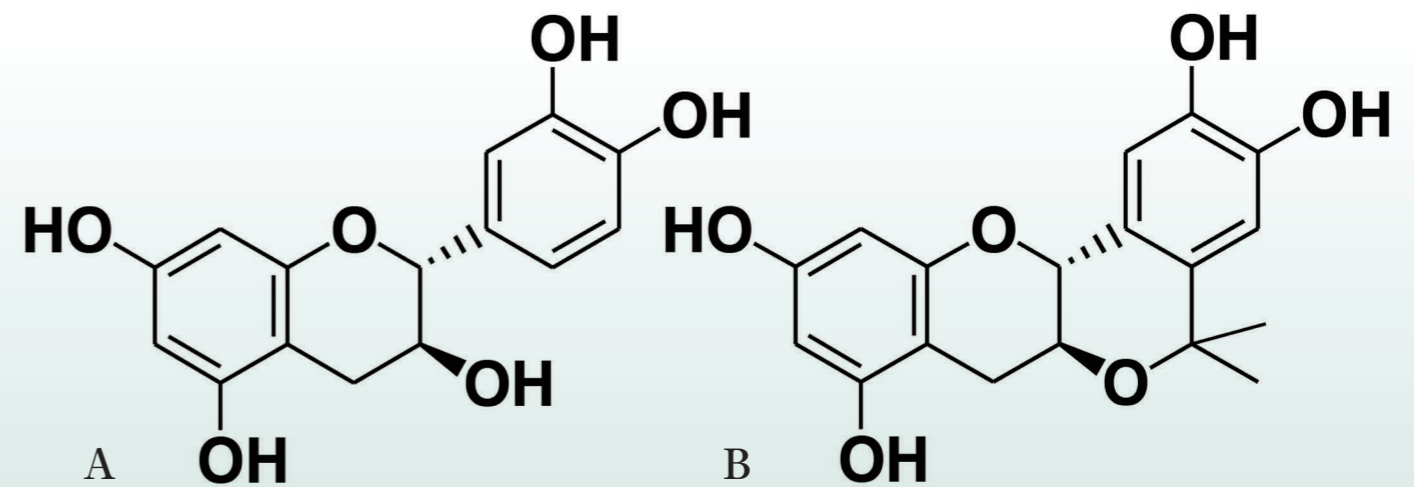


図10: カテキン (A) と平面型カテキン (B) の構造
平面型カテキンはカテキンの約6倍の速さでフリーラジカルを消去できる。

目指すもの

本文でも述べましたが、重粒子線がん治療を効率よく安全に行えるようにし、患者さんの負担を少しでも軽減するのが我々の目的です。その中でレドックス応答制御チームが行えるのは、正常組織の保護に伴う治療の効率化であろうと考えます。分割照射の回数を減らすことは患者さんの拘束時間を減らし負担を軽減すると考えられますが、そのためには1回の照射線量を増加する必要があります。正常組織だけをしっかり保護することができればそれも可能となり、患者さんのQOLの向上につながると考えています。

これまでは活性酸素種に関連するレドックス反応を考えてきました。それは活性酸素種が水への放射線照射に伴って極めて早い段階で生成する活性種で、この段階で後に続く反応を抑制しようと考えてきたからです。しかし放射線照射後の生体応答の中では、一酸化窒素(NO)すなわち活性窒素が生成し、これが癌の転移に関係しているだろうこともだんだん分かりつつあります。したがって早い段階での活性酸素種の制御と同時に、後に続く活性酸素種の制御を考えてやることも今後必要になると思われる。そうすることによって癌の転移をも制御することができるようになれば、患者さんのQOLも更に向上すると思われれます。

参考文献

- 1) Metz JM, Smith D, Mick R, et al. A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy. Clin Cancer Res, 10:6411-17 (2004).
- 2) Matsumoto K, Hyodo F, Matsumoto A, et al. High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. Clin Cancer Res, 12:2455-62 (2006).
- 3) フリーラジカルを消去する能力を可視化 ～病気になりやすい体を見つけるイメージングへ～, 放射線医学総合研究所プレスリリース, 2012年12月21日.
- 4) Matsumoto K, Subramanian S, Devasahayam N, et al. Electron paramagnetic resonance imaging of tumor hypoxia: enhanced spatial and temporal resolution for in vivo pO2 determination. Magn Reson Med, 55:1157-63 (2006).
- 5) Matsumoto S, Saito K, Yasui H, et al. EPR oxygen imaging and hyperpolarized (13) C MRI of pyruvate metabolism as noninvasive biomarkers of tumor treat-

ment response to a glycolysis inhibitor 3-bromopyruvate. Magn Reson Med, in press.

- 6) Yasukawa K, Kasazaki K, Hyodo F, et al. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in rats with water immersion restraint-induced gastric lesions using in vivo electron spin resonance spectroscopy. Free Radic Res, 38:147-55 (2004).
- 7) Matsumoto K, Endo K, Utsumi H. In vivo electron spin resonance assessment of decay constant of nitroxyl radical in selenium-deficient rat. Biol Pharm Bull, 23:641-44 (2000).
- 8) Ui I, Okajo A, Endo K, et al. Effect of hydrogen peroxide in redox status estimation using nitroxyl spin probe. Free Radic Biol Med, 37:2012-17 (2004).
- 9) Matsumoto K, Nagata K, Yamamoto H, et al. Visualization of free radical reactions in an aqueous sample irradiated by 290 MeV carbon beam. Magn Reson Med, 61:1033-39 (2009).
- 10) Matsumoto K, Aoki I, Nakanishi I, et al. Distribution of hydrogen peroxide-dependent reaction in a gelatin sample irradiated by carbon ion beam. Magn Reson Med Sci, 9:131-40 (2010).
- 11) Matsumoto K, Nakanishi I, Ueno M, et al. Density of hydroxyl radical generated in an aqueous solution irradiated by carbon ion beam. Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting, London, Sep.6-9, (2012).
- 12) Fukuhara K, Nakanishi I, Ohkubo K, et al. Intramolecular base-accelerated radical-scavenging reaction of a planar catechin derivative bearing a lysine moiety. Chem Commun, 6180-82 (2009).

転移機構解析研究チーム研究概要

チームリーダー 下川 卓志

佐藤 克俊・馬 立秋・中渡 美也子・中村 悦子・大塚 裕美・森竹 浩之

はじめに

放射線治療は、技術的進歩により体幹部定位放射線療法や粒子線療法といった新しい治療法へと広がってきています。これらの療法は、より多くの線量を腫瘍部に、より正常組織に少ないダメージで治療することができます。しかしこのように技術が進歩してきた今日でも、がんを完全には克服できておりません。



図11: チームのマウス実験による研究課題

そこで、我々は炭素イオン線(重粒子線)を含む放射線治療全般において克服すべき課題である、がん転移・放射線/薬剤抵抗性・有害事象(副作用)について、主に動物モデルを用いて研究を行っています。照射された生体内の領域には、様々な細胞がお互いに関係しあって存在しており、放射線による治療の効果に影響します。

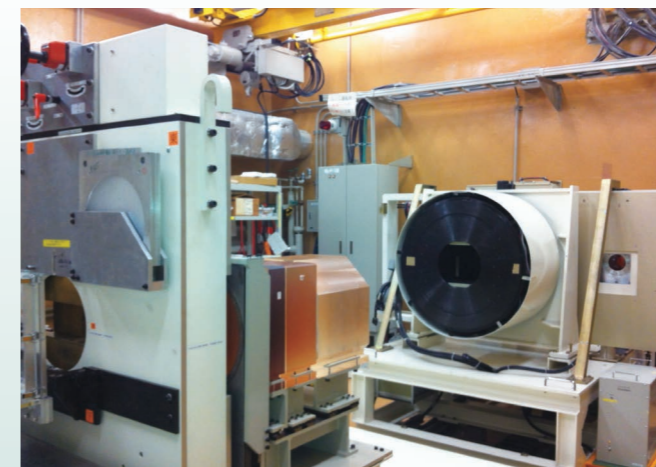


図12: HIMAC生物照射室

我々のチームはそのような生体応答を、最終的に分子レベルで説明し、治療効果の発展に寄与したいと考えて研究を行っています。

がん転移制御研究

炭素イオン線や陽子線といった粒子線治療はその物理・生物学的特性から腫瘍部分に効果的に線量を集中できるため、従来の放射線治療に抵抗性の腫瘍に対しても有効であり、これまで良好な治療成績が得られています。一方で、外科的手術などのがん治療法と同様に、症例によっては局所腫瘍が制御できても遠隔転移によって予後不良となる事があります。そのため、転移抑制は炭素線を含む粒子線治療においても重要な課題の一つであります。我々はこれまで医師並びに患者さんにご協力いただいた臨床検体を解析して、FGF2やVillin1などの放射線治療の予後予測マーカーを同定してきました^{1,2)}。このような予後予測マーカーは、個々の症例に合った治療方針を決定していく上で有効です。今後、このような予後予測マーカーが増えることにより、がんの特徴を詳細に捉え、より正確に予後を予測できるようになっていくと期待されます。この予測により転移のリスクが高いと診断された患者さんにどのような治療を施していくか、特に治療中における転移のリスク低減や微小転移の増殖抑制なども今後さらに重要となってきます。

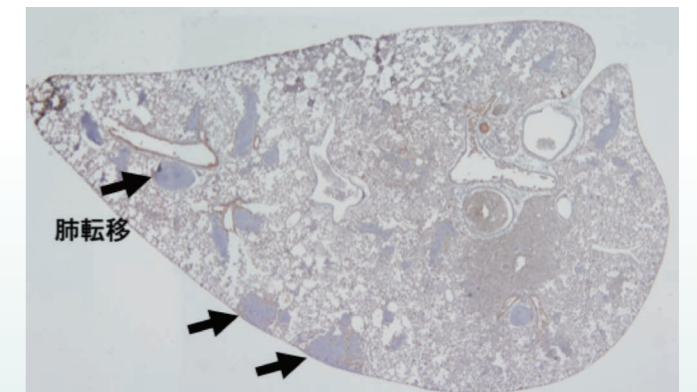


図13: マウス肺にできた転移巣

そこで我々は炭素イオン線照射と他の治療法との「併用療法」による転移制御の可能性について検討を行って来ました。その中でも、画像診断に映らないような微小転移や体内を循環・浸潤しているがん細胞に対処できる可能性がある免疫応答を利用したがん転移抑制に着目して

います。我々が利用しているのは骨髄から単離された未成熟な樹状細胞です。樹状細胞は取り込んだ病原体やがん細胞の抗原をT細胞に提示して活性化する役割を持つ細胞です。2011年には、Ralph M. Steinman教授が樹状細胞とその獲得免疫における役割の発見によりノーベル賞を受賞されています*。

NR-S1マウス扁平上皮癌細胞株をC3H/Heマウスに移植した肺転移モデルでは、移植後3週間目で100個近い肺へのがん転移が観察されます。この移植した腫瘍部分に、あえて移植腫瘍の増殖に影響の無い線量の炭素イ

オン線を照射し、その1.5日後に未成熟な樹状細胞を移植すると各々単独での治療に比べ顕著な転移抑制が認められました(図14)³⁾。この併用効果は炭素イオン線では低い線量から認められ、この2つの治療法のコンビネーションが転移抑制に非常に効果的であることが分かりました。

現在、樹状細胞療法との併用効果における重粒子線照射の寄与について、その分子機構解明を進めています。

*http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2011/

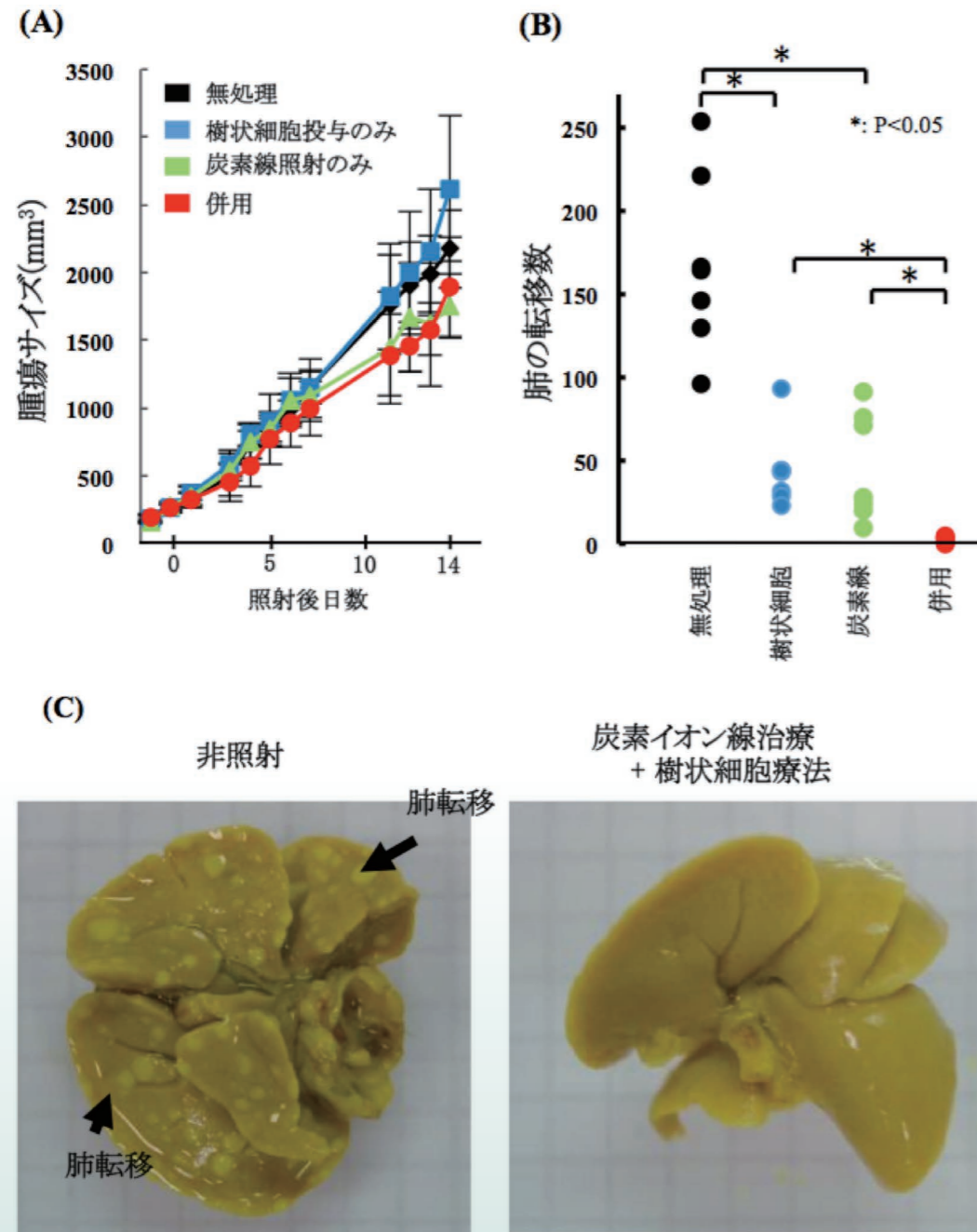


図14: 樹状細胞療法との併用による転移抑制

放射線抵抗性腫瘍研究

炭素イオン線治療は従来のX線治療に比べて局所制御率が良いことが知られていますが、症例の中には重粒子線が効きにくいがん種や症例があることも報告されています。またX線照射後に再発してきた腫瘍はX線抵抗性になることが古くから報告されています⁴⁾。

その原因として、がん細胞自体が放射線に対して抵抗性を獲得する場合や、腫瘍の微小環境による影響などが考えられます。この放射線抵抗性獲得に関わるメカニズムを明らかにすることは、早期診断による抵抗性腫瘍の検出のための特徴的なマーカーを同定や、効果的な併用療法の探索のために欠くことのできないものです。

そこで我々は、マウスがん細胞株(NRS1)にX線を繰り返し照射して炭素線を含む放射線に対して抵抗性を示す癌細胞株(NRS1-X60)の樹立を行いました。この細胞は、X線と炭素イオン線の両方に対して、同じ線量を照射しても元の親株より生き残ることが確認できています(図15 A, B)。

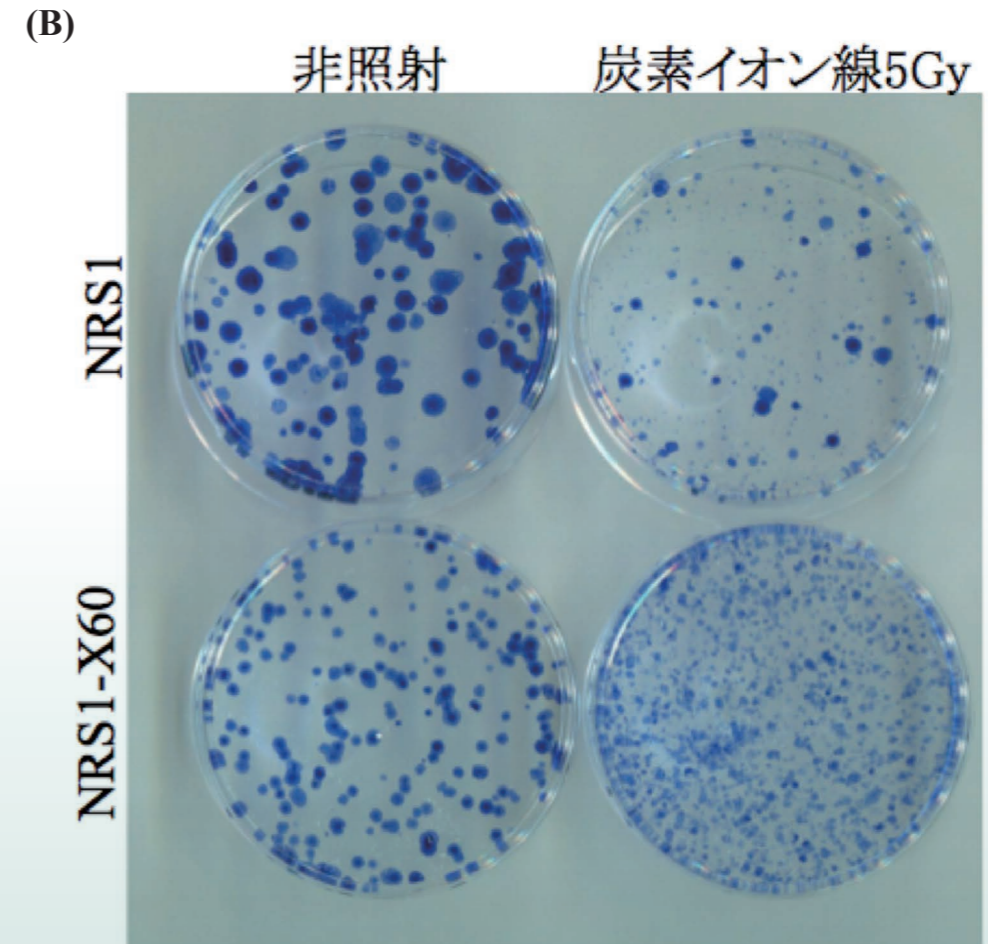
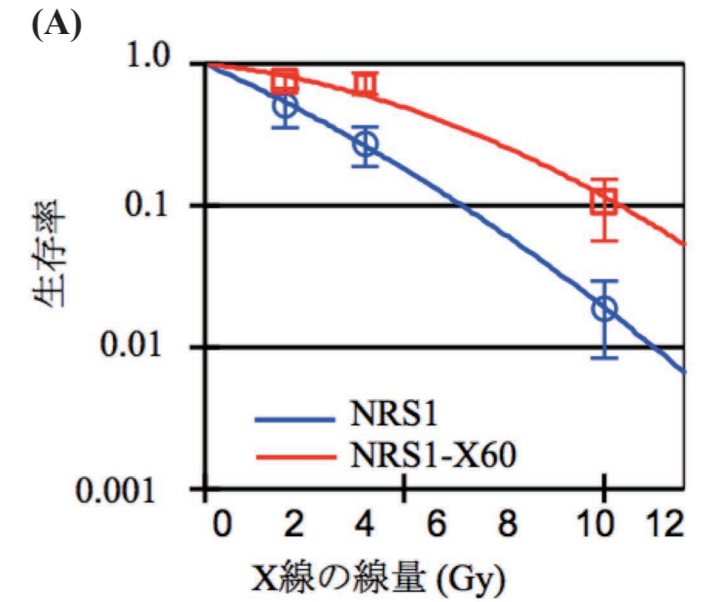


図15: 放射線抵抗性株の樹立

この放射線抵抗性癌細胞株を親株と比べ、何が変わったのかを明らかにすることにより、放射線が効きにくいがん自身のメカニズムの一端が明らかになると期待できます。

生体内で照射された腫瘍の中では、がん細胞だけでなく様々な細胞の応答が起こっています(図16)。死んでいくがん細胞、増殖が盛んになるがん細胞、種々の免疫細胞の浸潤など数多くの反応が放射線照射により誘導さ

れます(図17)。このような生体内腫瘍での細胞同士の関わりによる放射線応答についても、我々は解析を進めています。

このようにがん細胞自身、またはがん細胞を取り巻く微小環境による放射線抵抗性のメカニズムを明らかにすることにより、より少ない線量での局所制御など放射線治療の質の向上に貢献できると考えております。

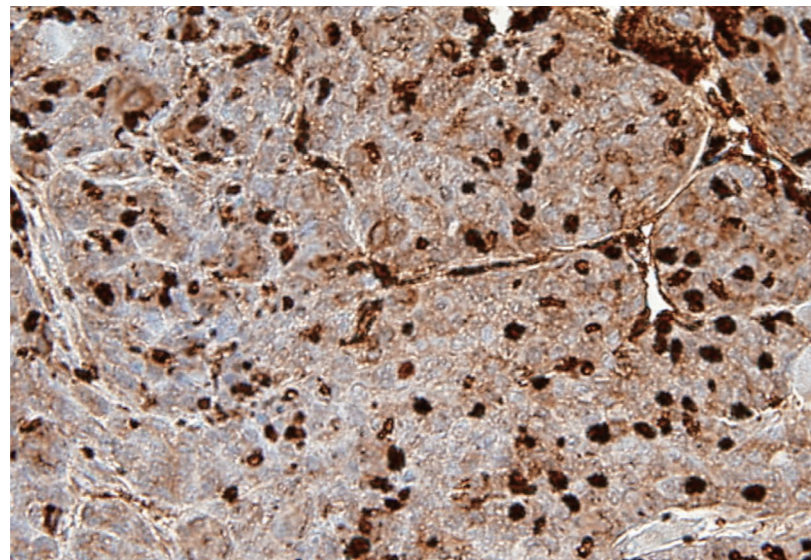


図16: マウス腫瘍中に存在する炎症性細胞(茶褐色に染色)

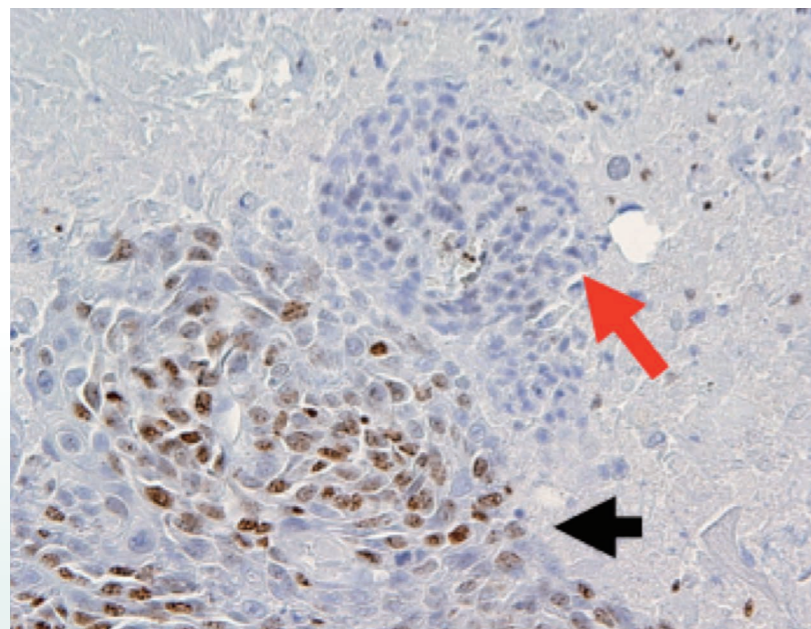


図17: 照射された腫瘍局所内で増殖するがん細胞盛んに増殖している細胞群(黒矢印)とほとんど増殖が認められない細胞群(赤矢印)。増殖中の細胞を茶褐色に染色。

有害事象の抑制

放射線治療や抗がん剤による治療においては、抗腫瘍効果だけでなく正常組織へのダメージ制御も重要です。正常組織へのダメージは腫瘍への照射線量の制限因子となり、さらに照射後時間を経て発症する有害事象につながりがん治療患者の治療後の生活の質に影響する重要な問題である。そのため、我々は腫瘍への放射線照射効果研究と並行して、正常組織への放射線の影響について研究を行っています。治療部位ごとの危惧される有害事象のうち、我々は肺がん治療に伴う胸部放射線照射後に起こる有害事象、特に長い時間が経過した後に現れる晩発障害である放射線肺炎・肺線維症の解析を進めています。

一般的な放射線治療では、肺がん治療患者の5~15%において照射後1~6ヶ月後に放射線肺炎が認められています。また肺炎が進行して肺の広範囲に広がると線維

化により死に至る場合があるなど、治療後のQOLを考える上で解決すべき課題の一つです。現在のところ、放射線肺炎やそれに続く線維化を予防する効果的な方法はなく、治療法も限られているため、その予防や治療に向けた研究は必要とされています。炭素イオン線治療では、腫瘍にダメージを集中し正常組織への線量を減らせることから、大きな問題となるグレード3以上の有害事象は定位放射線治療に比べ少なく、特に最新の報告では分割回数を減らした治療においては認められていません⁵⁾。しかし今後、重粒子線治療の適応を拡大し、より進行期症例の治療を行う際には、現在よりも広範囲を照射するような治療も必要になると予想されます。その場合には正常肺組織への線量も相対的に増加する事から、一般的な放射線治療と同様にその長期的影響や予防・治療法の検討が必要となります。

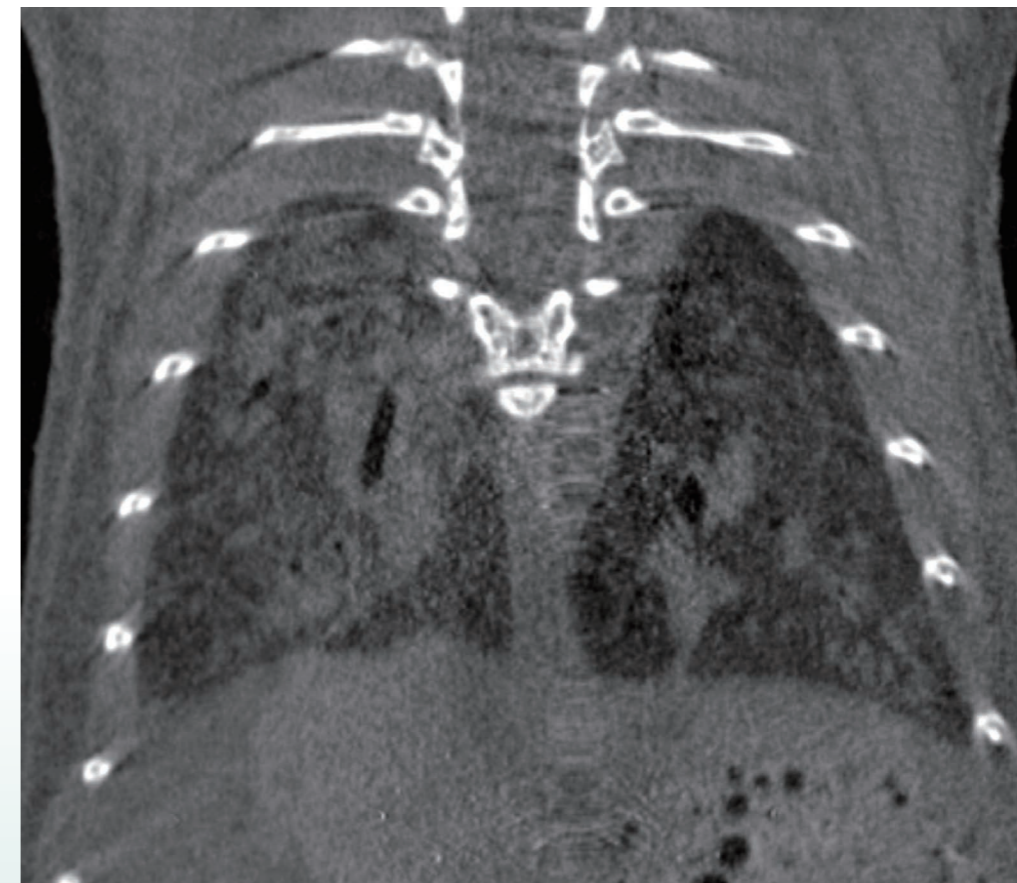
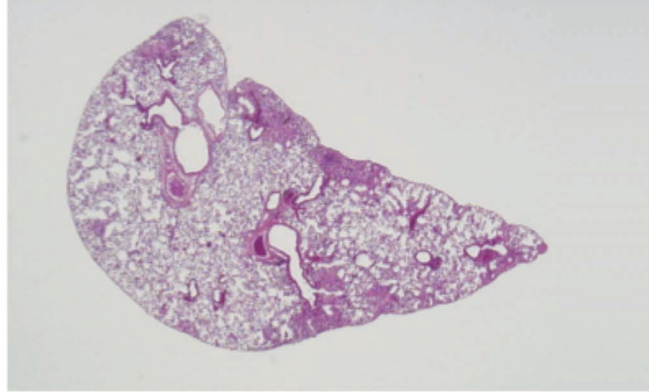


図18: マウス放射線肺炎のCT像
黒い三角状に写った肺のうち照射された左側の肺だけが肺炎により白く写っている。

障害を起こしやすいマウス (C57BL/6J)



障害を起こしにくいマウス (C3H/He)

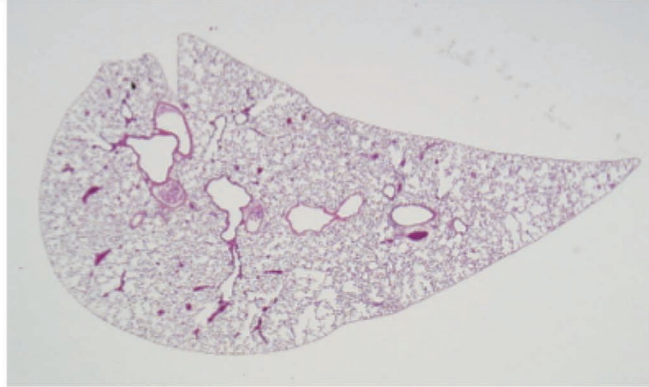


図19:照射半年後のマウスの肺

そこで我々は、マウス肺晩期障害実験モデルを用いて炭素イオン線治療後の有害事象発症メカニズムを明らかにし、その有効な治療・予防法の確立を最終的な目的としています。このマウスモデルでは、炭素イオン線やγ線の照射後、約半年後に放射線肺炎が認められますが、その発症の頻度や重篤度がマウスの系統によって大きく異なることを明らかにしてきました(図19)⁶⁾。この違いには免疫応答のマウス系統による違いが影響していることも分かってきています⁶⁻⁸⁾。このように放射線肺炎感受性の異なるマウス系統を比較解析することにより、放射線肺炎/線維化の発症機序や感受性の違いが明らかになると予想されます。

今後について

動物実験レベルでは、転移抑制や抵抗性腫瘍への有効な併用療法がいくつか見つかってきています。しかし、実際に患者さんたちにその成果を届けるにはまだまだ克服

すべき課題が多く残されています。我々は、放射線治療の発展に寄与できるような科学的エビデンスの蓄積を続け、治療を受ける患者さんにとって、さらに安全で効果的な治療となるように日々研究を進めています。

参考文献

- 1) Nakamura E, Satoh T, Iwakawa M, et al. Villin1, a diagnostic marker for endometrial adenocarcinoma with high grade nuclear atypia. *Cancer Biol Ther*, 12: 181-90 (2011).
- 2) Nakawatari M, Iwakawa M, Ohno T, et al. Change in fibroblast growth factor 2 expression as an early phase radiotherapy-responsive marker in sequential biopsy samples from patients with cervical cancer during fractionated radiotherapy. *Cancer* 116: 5082-92, (2010).
- 3) Ohkubo Y, Iwakawa M, Seino KI, et al. Combining carbon ion radiotherapy and local injection of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells inhibits lung metastases in an in vivo murine model. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 78: 1524-31, (2010).
- 4) Weichselbaum RR, Beckett MA, Schwartz JL, et al. Radioresistant tumor cells are present in head and neck carcinomas that recur after radiotherapy. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 15: 575-9, (1988).
- 5) Tsujii H & Kamada T. A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol*, 42: 670-85, (2012).
- 6) Moritake T, Fujita H, Yanagisawa M, et al. Strain-dependent damage in mouse lung after carbon ion irradiation. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 84: E95-E102, (2012).
- 7) Iwakawa M, Noda S, Ohta T, et al. Strain dependent differences in a histological study of CD44 and collagen fibers with an expression analysis of inflammatory response-related genes in irradiated murine lung. *J Radiat Res*, 45: 423-33, (2004).
- 8) Saito-Fujita T, Iwakawa M, Nakamura E, et al. Attenuated lung fibrosis in interleukin 6 knock-out mice after C-ion irradiation to lung. *J Radiat Res*, 52: 270-7, (2011).

最近の成果 放射線応答性ハイドロゲルの開発 ～薬剤送達システムを活用した新しい放射線治療技術へ～



分子イメージング研究センター
分子病態イメージング研究プログラム 城潤一郎・青木 伊知男・佐賀 恒夫

放射線治療の高度化のためには、(1)照射する放射線の線量および範囲の最適化、(2)治療効果の増強、および(3)放射線照射部位の迅速判定を可能とする仕組みが望まれます。我々は、薬剤送達システム(Drug delivery system (DDS)¹⁾)、と材料学を駆使し、放射線治療の高度化に貢献する材料の創製を行っています。

今回、我々は、放射線に反応して分解、薬剤を放出するハイドロゲルを開発しました(図1)。ハイドロゲル²⁾は、薬剤を内包するとともに、それを制御された速度で放出することができるDDS材料です。このハイドロゲルへ、刺激によって薬剤を放出できる性質(刺激応答性)を付与できれば、刺激を用いた体内の目的部位への特異性の高い薬剤放出が可能となります。これまでに、温度、pHなどの刺激によって薬剤の放出挙動を制御した研究は数多く行われてきました。しかしながら、放射線によって薬剤の放出を制御できるハイドロゲルの開発研究は、国内外通じてありませんでした。

我々は、放射線に反応する材料としてDNAに注目しま

した。DNAは、遺伝情報を次世代に伝えるという生物にとって重要な構成要素です。一方で、材料学的見地では、糖、塩基、およびリン酸基の1ユニットが整然とつながった高分子と捉えることもできます。放射線は、DNAの直接電離、あるいは水から産生されたラジカルを介した間接的作用によりDNAを損傷、切断します。これがまさに放射線治療のメカニズムですが、我々は、この現象を放射線に反応するハイドロゲルを作製するための仕組みとして活用できないかと考えました。

DNAは水溶性であるため、水溶液状態ではハイドロゲルを構築できません。そこで、DNAの塩基と化学反応し、DNAの鎖同士をつなぎ合わせることで試薬(架橋剤)を用いてDNAを架橋し、ハイドロゲル(DNAハイドロゲル)を構築しました。DNAの濃度および架橋剤の添加量を変化させることによって、硬さ(架橋度)の異なるDNAハイドロゲルを得ました。

放射線を照射したところ、これらのDNAハイドロゲルは

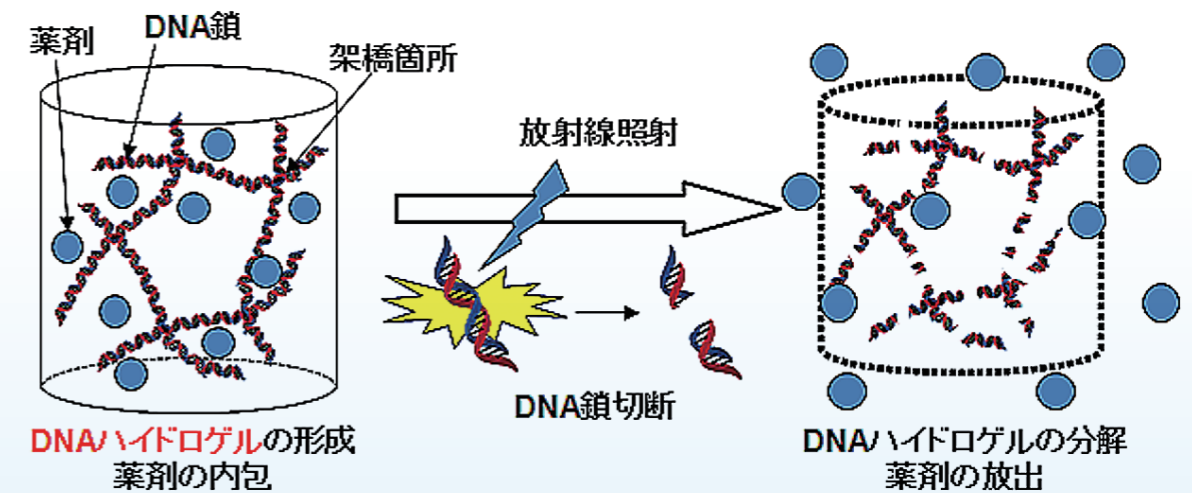


図1:開発したDNAハイドロゲルの作用機序

分解されました(図2)。分解の程度は、DNAハイドロゲルの架橋度、放射線の線量、および線質に依存しました。一方、ラジカルの動きを阻害するラジカルスカベンジャーであるスクロースの存在下で、DNAハイドロゲルの分解が劇的に抑制されました。このことから、水の放射線分解によって産生されるヒドロキシルラジカルがDNA鎖を切断し、その結果としてDNAハイドロゲルを分解したと考えられます。また、このDNAハイドロゲルへ抗がん剤、放射線増感剤、診断薬、ナノ粒子などの薬剤を内包でき、内包された薬剤が放射線照射によって放出されることも確認されつつあります。

放射線増感剤と抗がん剤を内包することにより、今回開発したDNAハイドロゲルは、治療効果の増強に寄与し、結果として治療効果を損なうことなく放射線照射の線量および範囲を最小化することができると期待されます。また、放出によってシグナルが変化する診断薬を内包することによって、生体イメージングによる放射線の照射部位の迅速判定が可能となり、放射線治療をアシストすることが期待されます。これまで、DDSを用いない放射線増感剤の開発が多く検討されてきましたが、増感効果に比し副作用が高いなどの原因により、その多くが実用化には至っていません。今回開発したDNAハイドロゲルと組み合わせることで活性を高く保持したまま増感剤の使用量を減らせるため、増感効果の増強とともに副作用の低減も可能と期待され、これらの薬剤が再び見直される可能性もあります。

今後は、これらの知見を基に、より高感度かつ、低い線

量で分解性の制御が可能な、操作性の良いハイドロゲルの作製に向けて改良を行います。

本研究は、放医研理事長裁量経費(萌芽的研究)の支援を得て、放医研重粒子線がん治療装置の共同利用の一環として行われました。本研究成果は、特許出願いたしました(特願2012-259393)。

用語解説

- 1) DDS (drug delivery system)

薬剤送達システム。薬剤あるいは外部刺激と組み合わせることによって、薬剤を必要なタイミングで必要な濃度で必要な部位で作用させ、結果としてその効果を最大限に発揮させる技術および方法論。(1) 薬剤の徐放化(徐々に放出させること)、(2) 薬剤の血中安定化および水可溶化、(3) 薬剤の生体内バリア(血管壁、組織間構築物、細胞膜など)の通過および吸収促進、および(4) 薬剤の標的部へのターゲティングの技術がある。薬剤は、治療薬だけでなく、予防薬、診断薬、生理活性物質などにも適用可能である。
- 2) ハイドロゲル

水溶性高分子の鎖同士を架橋することによって得られたゼリー状の3次元構造体。水を大量に含むことができる。DDSにおいて、薬剤の徐放化の目的に用いられる材料である。ハイドロゲルからの薬剤の放出速度は、ハイドロゲルの架橋度および分解性、ならびにハイドロゲルを構成する高分子と薬剤との相互作用の強さによって制御される。

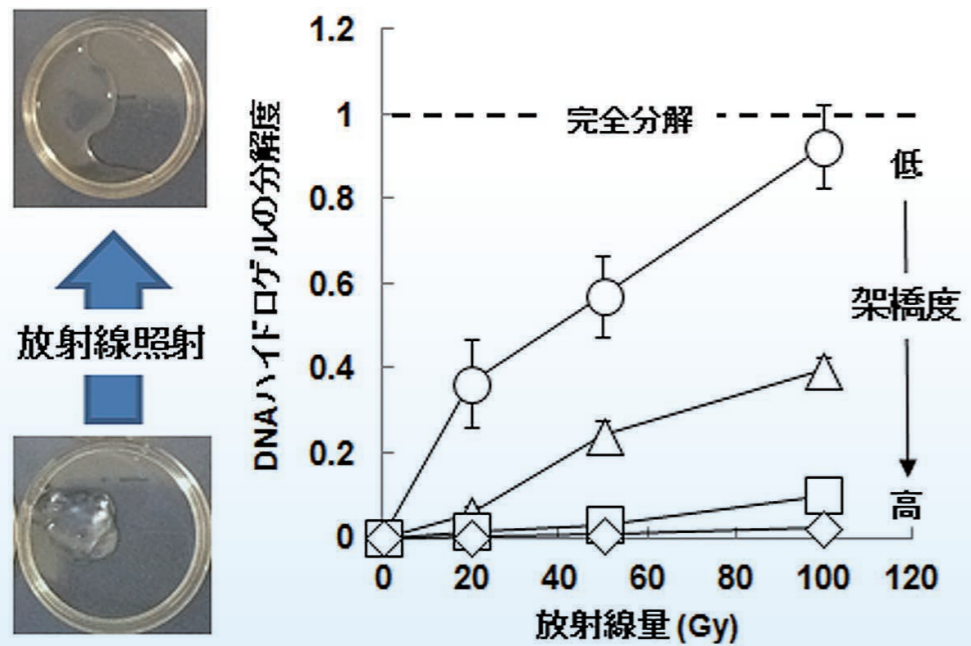


図2:放射線照射によるDNAハイドロゲルの分解 (左図)放射線照射により、ゼリー状のハイドロゲル(下)が分解し、液体状(上)に変化している。(右図)DNAハイドロゲルの分解度に与える放射線量およびDNAハイドロゲルの架橋度の影響。○印が最も架橋度が低く、△、□、◇の順で架橋度が高くなる。

連載 橋渡しと連携のための疫学



放射線医学総合研究所
研究倫理企画支援室 小橋 元

【その1】疫学の定義と方法について

1. はじめに

研究倫理企画支援室の体制が整い始めた2012年の秋より、様々な取り組みを開始しました。その一つが「小橋疫学・統計学勉強会」です。この勉強会では、おそらくは放医研の弱点の一つである疫学・統計学に関して、私がこの20年近くの間、大学・大学院の講義、セミナー、講演などでお話してきた内容を中心に参加者に提供しています。本シリーズでは、この勉強会の内容を含めて、疫学・統計学の基本的な情報を整理していきたいと思います。

2. 疫学、統計学、公衆衛生学とは

疫学と統計学の違いは何でしょう。疫学とは「人間集団を対象として、その健康および健康障害の頻度と分布を明らかにし、それらに関連する要因とその交絡状況を包括的に研究して、より良い社会、暮らしに還元する公衆衛生の基礎科学」であり、統計学は「直感や大まかな経験分析を超えて、より体系だった経験分析を提供する方法論」と定義されています^{1,2)}。換言すると、疫学は人を対象とする研究のデザイン、実践、解析までを含み、統計学は解析・分析が中心となります。疫学の必要条件は、デザインと実践である一方、統計学自体にはデザインや実践は含まませんが、逆に人以外を対象とする生物統計や物理統計という分野もあります。また、疫学研究のデザインには統計解析の知識が必須ですので、疫学は統計学抜きで成り立ちません(図1)。

疫学には「公衆衛生の基礎科学」というもう一つの側面があります。では、公衆衛生とは何でしょうか。

教科書^{3,4)}をみると、公衆衛生は、「組織された公衆団体・社会の活動を通じて、健康障害の社会的・医学的成因を解明して取り除き、かつ健康を保持するための科学であり技術である」と定義され、公衆衛生の大きなキーワードである「健康」は、1946年にWHO(世界保健機関)により「単に病気や虚弱でないというだけでなく、身体的、精神的そして社会的に完全に良好な状態(well-being)」であると定義されています。ここで示されるwell-beingは「安寧」と訳されることが多く、これは安全、安心、さらには幸福にも通じるものです。

したがって、「放射線科学を通じて、人々の健康と、安全で安心な社会づくりに貢献します」という放医研の理念は、「放射線科学を通じて、公衆衛生に貢献します」とほぼ同義といえます。公衆衛生に貢献するためには、その基礎科学である疫学が不可欠です。

3. 疫学の方法

疫学研究は、目標の設定から対策の樹立まで、複数の段階を経て行われます(表1)^{3,5)}。段階が進むにつれて要因と疾病との関連、因果関係の確からしさ(エビデンスレベル)が増します。自ら立てた仮説を、段階を踏んで検証し、人々の健康と、安全で安心な社会づくりに生かすところまで、成果を積み上げていければもちろん素晴らしい

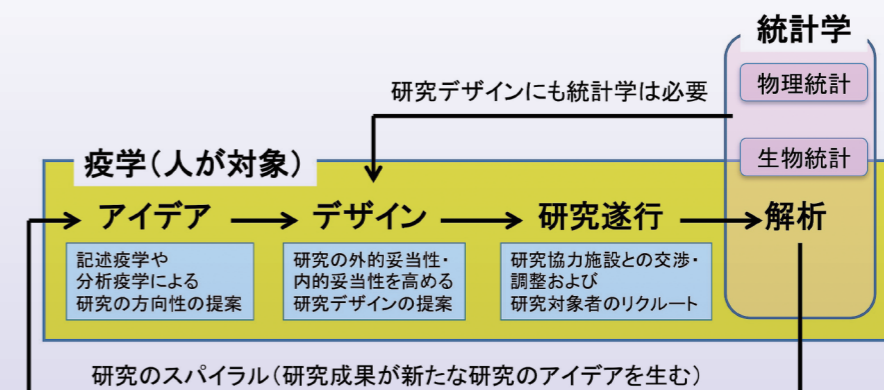


図1:疫学と統計学の関係

ことです。しかし、一人の研究者や同一研究グループが必ずしも全段階の研究を行う必要はありません。従来の研究成果を踏まえて、次の段階の研究を行い、社会全体としてエビデンスを積み上げていけばよいのです。基礎研究で得られた有望な知見を、通常の医薬品や医療機器の開発に要する試験物製造から臨床研究に至るまでの工程を一体的に捉えた戦略によって、実用化につなげる研究を橋渡し研究(トランスレーショナルリサーチ)といいます。このような戦略においても疫学研究の段階を考慮することは重要です。また、疫学研究の場合、先行研究と同じ段階、方法の研究を、異なる対照集団において行うことにも意味があります。

以下では、疫学研究の方法について詳しく見ていきます(表2)。

表1: 疫学研究の一般的な流れと方法

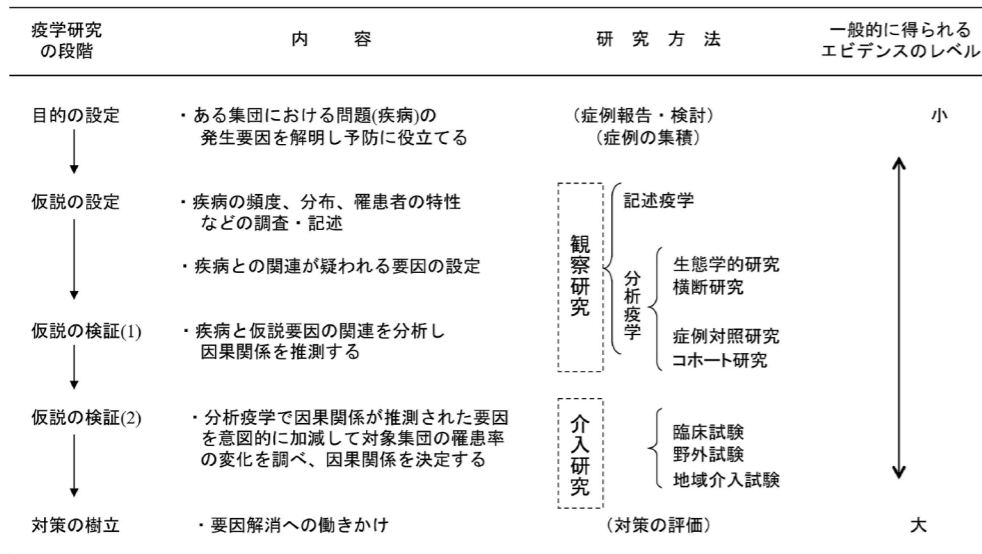


表2: 各研究の特徴

研究方法	記述疫学	分析疫学				介入研究
		生態学的研究	横断研究	症例対照研究	コホート研究	
内容	人間集団中の疾病の頻度と分布を観察	地域集団(国、都道府県、市町村など)を単位として、要因と疾病の関連を検討する	一時点において疾病の有無と要因曝露状況を同時に調査し、その関連を明らかにする	疾病等を発症した群(症例群)と発症していない群(対照群)の過去の要因曝露を調べてその保有頻度を比較する	要因に曝露した群と曝露していない群を将来にわたって追跡し、疾病の罹患率や死亡率などを比較する	疾病関連候補要因に対する積極的な介入を行う群と、介入を行わない群とを設定、追跡し、疾病の罹患率や死亡率などを比較する
長所	簡便に仮説を設定できる	資料収集が容易	研究期間が短く、費用や労力も少なく済むことが多い	比較的短い研究期間で、費用や労力をかけずに、複数の仮説要因から因果関係が推定されるものを絞り込むことができる	症例対照研究に比べてバイアスが少なく、相対危険と寄与危険を直接算出することができる	疾病への関連が明確になる
短所・注意点		入手できる情報の種類に限られる。発見された相関関係が個人のレベルでも成り立つとは限らない	関連が認められたとしても、その要因が疾病の原因であること(因果関係)を確定することはできない	バイアスが起りやすい。相対危険と寄与危険を算出することができない	費用と時間がかかる。稀な疾患の研究には適さない	一種の人体実験ですので、十分に質のよい研究で、その結果が医学の進歩や人類の福利に貢献するようものでなければならぬ

4. 観察研究

疫学の方法は、観察研究と介入研究に分けることができます。観察研究は、さらに記述疫学と分析疫学に分けることができます。

(1) 記述疫学

記述疫学は、人間集団中の疾病の頻度と分布を、人、場所、時間別に観察する研究方法です。①人に関する要因としては、性、年齢、人種、遺伝、両親の年齢、家族歴など、②場所に関する要因としては、疾病の地理的分布(国際比較、都道府県市町村別発症率など)、③時に関する要因としては、年次変化、長期変動、周期変動、時間集積性などがあります。記述疫学から得られた結果をもとに仮説が設定され、次段階の疫学研究に生かされます。仮説の設定にあたっては、①疾病発症集団に共通に認められる要因(逆

に疾病のない集団には認められない)、②疾病発症率と同時に変化する要因、③既知の疾病の発症時期、分布との類似性、などの検討が行われます。

(2) 分析疫学

1) 生態学的研究

生態学的研究は、個人ではなく地域集団(国、都道府県、市町村など)を単位として、要因と疾病の関連を検討する方法です。一般に、研究は既存資料をデータとして行われる場合が多いため、資料収集が容易である一方、入手できる情報の種類に限られます。生態学的研究は観察の単位が地域、国、都道府県、市町村などの集団であるため、集団のレベルでの相関しか検討できません。したがって、発見された相関関係が個人のレベルでも成り立っているとは限らないこと(生態学的誤謬、ecological fallacy)に注意が必要です。

2) 横断研究

横断研究は、一時点において疾病の有無と要因曝露状況を同時に調査し、その関連を明らかにする方法です。研究期間が短く、費用や労力も少なく済むことが多いのですが、たとえ関連が認められたとしても、その要因曝露と疾病発症との時間的な前後関係がはっきりしないため、その要因が疾病の原因であること(因果関係)を確定することはできません。

3) 症例対照研究

症例対照研究は、疾病の原因を過去にさかのぼって探す研究です。研究対象疾病の患者集団(症例群, case)とその疾病に罹患したことがない者の集団(対照群, control)とで、その過去の要因(記述疫学などにより設定された仮説要因)に曝露された者の割合を比較します。症例・対照研究は、まれな(発症頻度が低い)疾患の研究に適しており、比較的短い研究期間で、費用や労力をかけずに、複数の仮説要因から因果関係が推定されるものを絞り込むことができますが、その一方で、対象者の抽出過程や過去の要因曝露情報の収集時にバイアスが起りやすいことや、相対危険(曝露群と非曝露群における疾病の頻度を比で表現したもので曝露因子と疾病発生との関連の強さを示す指標になります)と寄与危険[坂内1](曝露群と非曝露群における疾病の頻度の差)を算出することができない(相対危険はオッズ比で代用)ことなどの問題があります。

4) コホート研究

コホート研究では、要因に曝露した群と曝露していない群を将来にわたって追跡し、疾病の罹患率や死亡率などを比較します。コホート研究を遂行するには、費用と時間がかかり、また、稀な疾患の研究には適しません。しかし、症

例対照研究に比べてバイアスが少なく、相対危険と寄与危険を直接算出することができるなどの利点もあります。

5. 介入研究

介入研究は、分析疫学によって疾病への関連が推測された要因に対する積極的な介入を行う群(介入群)と、介入を行わない群(対照群)とを設定、追跡し、疾病の罹患率や死亡率などを比較するものです。

介入研究には、臨床試験、野外試験、地域介入試験がありますが、研究実施にあたっては、参加者からのインフォームド・コンセントを得ること、参加者の介入群と対照群への割り付けは無作為に行われること(無作為割り付け)、どちらの群に割り付けられたかは参加者にも結果を観察する研究者にもわからないようにすること(二重ブラインド法)が必要です。介入研究はまさしく一種の人体実験ですので、十分に質のよい研究で、その結果が医学の進歩や人類の福利に貢献するようなものでなければ行うべきではありません。

「臨床試験」とは、臨床疫学研究の中で、対象集団を複数の群に分け、それぞれの群に異なった予防法、診断、治療等を与え、比較する研究のことで「臨床研究」の一つです。「臨床研究」には人由来の細胞や組織等を使った研究も含まれますが、人の集団を用いて行う場合は特に「臨床疫学研究」といいます。医薬品や治療法の場合、効果を認められてもらうために段階ごとに行うべき試験が決まっています。第I相試験は、健常人を対象に薬の安全性と薬物動態を検討します。抗癌剤など明らかに健常者に対して有害な薬では例外的に患者を対象とします。第II相試験では、患者を対象とし、薬物に効果があるかどうかを評価します。第III相試験は、無作為化と盲検法を用いて、試験薬が従来の薬より効果があるかどうかを調べるものであり、まさしくこれが介入研究の段階といえます。この段階においては、仮に結果として有意差がなかった場合でも、有意差がなかったことを示唆しうる検出力を持つ症例数を事前に設定します。また、有意差が出なかった研究が発表されずに埋もれてしまうこと(出版バイアス)を避けるために、試験実施を登録し、進捗状況を報告するなど、研究デザインと実施に綿密さが要求されます。基礎研究の成果や医薬品や医療機器であれ、観察疫学研究の成果であれ、臨床応用を目指すためには、第III相の臨床試験が必要となりますが、第I相、第II相試験は、第III相試験が実施可能かどうか、実施する価値があるかどうかを検証する準備段階の研究といえます。一方、臨床試験のうちでも、薬剤や医療機器として承認されるための手続きとしての研究を「治験」といいます(図2)。

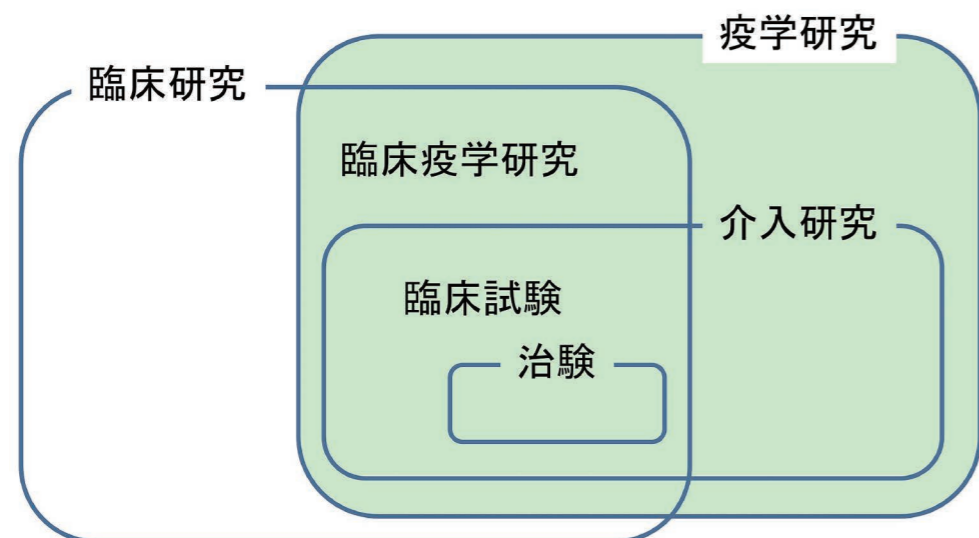


図2:疫学研究と臨床研究の関係

6. おわりに ～研究倫理審査委員会の存在意義～

人を対象とする研究は、参加者の時間と労力、そして気持ちがあって初めて成り立つものです。どんなに痛みを伴わない研究であっても、参加者への侵襲が完全にゼロになることはありません。したがって、意義が乏しかったり、目的が不明確だったり、デザインがお粗末な研究をそのまま遂行することは、倫理的ではありません⁶⁾。研究倫理審査委員会は、研究対象者、研究者、研究機関のすべてを守るために研究機関の長が設置しています。本シリーズが、皆さんの研究の質の向上、研究の連携、そして小さな橋渡しに役立てば幸いです。

参考文献

- 1) はじめて学ぶやさしい疫学 ―疫学への招待― (第2版). 田中平三、能勢 隆之 編. 南江堂, 2010
- 2) 小橋 元、岡本 悦司、兼板 佳孝、坂田 清美、佐藤 敏彦、吉池 信男 監修. subnote 保健医療論・公衆衛生学 2013. メディックメディア編・発行、2012
- 3) NEXT 公衆衛生学 (第3版). 村松 宰, 中山 健夫 編. 講談社サイエンティフィク, 2010
- 4) これからの公衆衛生学. 田中 平三 編. 南江堂 (印刷中)
- 5) 小橋 元. 疫学のはなし ―放射線医学との接点― (Ⅲ. 疫学研究方法). 放射線科学46:74-78, 2003
- 6) 小橋 元. 超基本!疫学研究のススメ (6) 疫学研究と倫理:誰もが納得できて誰も傷つかない研究を目指して!臨床栄養105:801, 2004

放射線科学 Radiological Sciences 第56巻 第02号

編集委員会

委員長……明石 真言
 委員……大町 康 加藤 悠子 兼松 伸幸 小久保 年章 下川 卓志
 数藤 由美子 田中 薫 野里 真澄 府馬 正一 山内 正剛
 事務局……坂内 忠明

2013年6月15日発行
 (編集・発行)独立行政法人 放射線医学総合研究所
 National Institute of Radiological Sciences
 〒263-8555 千葉市稲毛区穴川4-9-1 電話 043 (206) 3026 Fax.043 (206) 4062

本冊子はグリーン購入法に基づく基本方針の判断の基準を満たす紙を使用しています。
 This brochure uses paper that meets the policy standards based on the Green Purchasing Law.



<http://www.nirs.go.jp/>