

2024年度量子医科学研究所
重粒子線がん治療装置等
共同利用研究報告書
(発表会用暫定版)
I. 治療・診断、生物
2024 Annual Report of the
Research Project with Heavy Ions
at QST-HIMAC

2025年5月 May, 2025

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子医科学研究所 National Institute of Radiological Sciences National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology 9-1 Anagawa 4-chome, Inage-ku, Chiba 263-8555, JAPAN 2025年5月16日

重粒子線がん治療装置等共同利用研究報告書(発表会用暫定版)について

- これは重粒子線がん治療装置等共同利用研究報告書の草稿で、発表会の配布資料(ダウンロード版)をかねています。
- 掲載順序は、まず班毎に分け、次にプログラムの発表順に並べています。但し、掲載 されたプログラム(右上に日付あり)以降の変更は反映されていません。
- 都合により開催後日発表になった課題については最後に課題番号順に掲載しています。
- 第一分冊が治療・診断と生物、第二分冊が物理・工学です。
- 各分冊の初めに目次があり、ページ数が掲載されています。目次のタイトルは、課題のタイトルのままですので、報告のタイトルと違っている場合もあります。課題番号は一致しています。
- 課題番号から掲載ページ数を調べるには、各分冊の最後にある索引をご利用下さい。

研究報告書最終版について

- 研究成果は、暫定版では課題毎に掲載されていますが、最終版では巻末にまとめて表示します。
- 送付いただいた原稿の一部で、
 電子ファイル大幅に乱れておりプリントと一致しない、
 - ▶ 課題番号等の記載が間違っている、
 - ▶ 図が表示できない、

といった問題点がありました。訂正可能な間違いはこちらで修正いたしました。今回の 草稿で修正ミスが発見された場合、6月27日(金)までにご連絡いただければ、最終 版で訂正を行います。ただし、原稿の全面的な差し替えは、原則、お断りします。

2025/5/16

「2024年度HIMAC共同利用研究成果発表会日程表(案)」 日時:2025年5月26日(月)~5月27日(火) 開催方式 Web開催

日付	5月26日(月曜日)	5月27日(火曜日)
時間	治療·診断	物理・工学
10:00		
11:00		休憩 B 放射線と化学反応 10:40 - 11:10 休憩 休憩
12:00		C 加速器ビーム利用の新展開 11:20 - 12:10 昼休み
13:00	課題番号 L126-L139	D 様々な検出器の開発 13:10 – 13:50 休憩 F 字定細測の為の測定器
14:00	13:00 - 14:10	14:00 - 15:00 F原子核の研究と検出器の開発
15:00		15:10 — 16:00
16:00		
17:00		

日付	5月26日(月曜日)
時間	生物
10.00	挨拶、9:50-10:00
10.00	課題番号 001-147
11.00	10:00 - 10:40
11:00	休想
	課題番号 148-156
19.00	11:00 — 11:50
12:00	昼休み
	11:50 - 12:50
13:00	課題番号 204-347
	12:50 - 13:40
	コーヒーブレイク
	課題番号 413-444
14:00	14:10 - 14:50
	休想
	課題番号 446-472
15:00	15:00 - 15:40
	休憩
	課題番号 501-507
	16:00 - 16:40
16:00	

•

2025/5/16

「2024年度HIM	AC共同利用研究成果発表会プログラム(案)、治療・診断班」
口哇。	$9095 $ 年 月 96 日 (月) 19 年 00 八 $_{2}$ 14 年 10 八

日時:	2025年5月26日(月)13時00分~14時10分
場所:	Web開催

口頭発表 報告書

			口與元衣	ページ
5月26日(月)				ý
13:00 - 13:10			セッション準備	
13:10 - 13:20	24L126	篠藤誠	LET最適化法を用いた膵癌炭素イオン線治療法の新 規治療開発	3
			Development of a Novel Carbon-ion	
13:20 - 13:30	23L134	今井礼子	Radiotherapy 骨軟部腫瘍に対するマルチイオン照射法によるLET 制御重粒子線治療法の開発	7
			Development of LET-optimized multi-ion	
13:30 - 13:40	24L135	磯﨑哲朗	radiotherapy for bone and soft tissue sarcoma 心臓MRIを用いた食道癌に対する重粒子線治療後の 心機能障害計測と新規照射技術開発	9
			Measuring cardiac dysfunction after carbon-	
			ion radiotherapy for esophageal cancer using cardiac MRI and developing new irradiation	
13:40 - 13:50	24L137	黒崎宏貴	陸福に対する重粒子線治療における予後予測因子の解明	11
			Prognostic factors in carbon ion radiotherapy	
			for pancreatic cancer	
13:50 - 14:00	24L138	岡東篤	前立腺肥大症手術歴のある前立腺癌	14
			に対する 重粒 子線 治療の 効果と 安全性の 検討	

 14:00 - 14:10
 24L139
 村田和俊
 LET Adaptive Therapy開発のためのインターフラクショ
 17

 ナルエラーの検討

※一課題の発表時間は7分、討議3分を予定

開催期間中に発表できない課題 成果発表会後日に録画発表

24L136山口有輝大腸癌術後のオリゴ転移に対するQST病院における21子重粒子線治療の成績

2025/5/16

「2024年度HIMAC共同利用研究成果発表会プログラム(案)、生物班」

日時: 2025年5月26日(月)9時50分~16時50分 場所: Web会議

5月26日(月) May 26 (Mon)

9:50-10:00 開会の挨拶

報告書 口頭発表 ページ 課題番号 001-147 10:00 - 10:10セッション準備(座長:) 新規重粒子線治療の実現に向けた臨床前動物実験 10:10 - 10:20 22 1001 稲庭拓 25Preclinical in-vivo experiments for developments of novel heavy-ion radiotherapy 10:20 - 10:30 22 1114 高橋豊 光子線抵抗性細胞株移植マウスモデルを用いた免疫 29 チェックポイント阻害剤と重粒子併用時のアブスコパ ル効果とその作用機序の検討 Investigation of the Abscopal Effect and Its Mechanism in a Photon-Beam-Resistant Tumor-Bearing Mouse Model Treated with Combined Heavy Ion Irradiation and Immune Checkpoint Inhibition LET粒子線による放射線抵抗性脳腫瘍の治療を目指し 10:30 - 10:40 24J147 下川卓志 33 た基礎研究 High-LET Radiation for Radioresistant Glioma Therapy: A Basic Research Investigation 10:40-10:50 24 J148 舟山知夫 三次元培養した伴侶動物がん細胞の放射線感受性解析 37 Radiation Sensitivity Analysis of 3D Cultured Cancer Cells from Companion Animals

休憩

課題番号 148-156		
11:00 - 11:10	セッション準備(座長:)	
11:10 -11:20 23J152 佐井星	難治性癌に対する重粒子線照射と薬剤併用による基礎 研究	40
11:20 -11:30 23J153 佐藤香枝	Basic research on heavy ion beam irradiation and drug combination for refractory cancer 次元培養による重粒子線評価システムの検討 Investigation of heavy particle radiation evaluation system using three-dimensional	43
11:30 — 11:40 23J154 中島菜花 子	culture ロテアソーム阻害剤の炭素線増感効果 Analysis of the Carbon ion irradiation	46
11:40 -11:50 24J156 武島嗣英	sensitizing Effect of Proteasome Inhibitors 光子線と重粒子線の抗腫瘍免疫応答の比較 Comparison of Antitumor Immune Responses Induced by Photon and Carbon Ion Radiotherapy	48

11:50 - 12:50

10:50 - 11:00

昼休み

課題番号 204-347		
12:50 - 13:00	セッション準備(座長:)	
13:00 -13:10 24J206 石川仁	重粒子線による高精度量子メス治療(マイクロサー	51
	ジェリー)技術開発と適応拡大に関する研究	
	Research for development of microsurgery by	
	high-precision carbon-ion radiotherapy	

13:10 -13:20 24J315 平山亮一 13:20 -13:30 23J327 森田明典	高LET粒子線による腫瘍再酸素化の機序解明 Elucidation of the Mechanism of Tumor Reoxygenation by high-LET particle beams 細胞死制御剤による粒子線防護効果のマウス個体レベ ルでの検討	54 57
13:30 -13:40 24J347 間宮大晴 13:40 -13:50 23J204 網野真理	Evaluation of cell death regulatory agents for protecting particle beam-irradiated mice 重イオントラック構造依存的な細胞致死効果の解明 Cell killing effect of heavy ion track structure 重粒子線を用いた根治的不整脈治療の開発	60 63
13:50 - 14:10	コーヒーブレイク	
課題番号 413-444		
14:10 - 14:20 14:20 - 14:30 24J413 余語克紀	セッション準備(座長:) 重粒子線誘発のDNA損傷を指標としたアミノ酸および アミノ酸誘導体の放射線防護剤の探索 Study of DNA damage induced by heavy ion heam	68
14:30 -14:40 22J433 中野敏彰	for searching radioprotector candidates 重粒子線誘発DNA損傷構造の特徴と飛跡末端構造に関 する研究	71
14:40 -14:50 22J444 島田幹男	Study on the structure of DNA damage induced by heavy ion beam and the structure of track ends 重粒子線による幹細胞のゲノム安定性への影響 Effect of heavy ion beam exposure to the genome stability in stem cells	75
14:50 - 15:00	休憩	
課題番号 446-472 15:00 - 15:10 15:10 - 15:20 23 1446 Takata	セッション準備(座長:) 高LFT放射線昭射によって刻まれるDNA変異	78
15:20 — 15:20 24 J447 给太班辦	Mutational signatures induced by high LET radiation 重粒子線照射がと細胞と非照射細胞間のバイスタン	82
10.20 10.00 24J447 wp/k4#4#	^{単位} 」 旅航初初初期 との構成での構成です。 ダー効果を介した生物効果誘導解明 Biological effects through bystander effects between heavy-ion irradiated tumor and unirradiated normal cells	02
15:30 -15:40 24J468 平山亮一	慢性低酸素細胞に関する粒子線基礎生物研究 Basic biological research on chronically hypoxic	85
15:40 - 15:50 24J472 松尾陽一郎	Certis using particle beams 5 粒子線によるDNA損傷と突然変異誘発機構の分子レベ ルでの解析 Malagular anglusis of ion beam induced DNA	88
	damage and mutations	
15:50 - 16:00	休憩	
課題番号 501-507		
16:00 -16:10 16:10 -16:20 24J501 下川卓志	セッション準備(座長:) イオンビームによる微生物・植物への変異導入を利用 した基礎研究プラットフォームの構築 Development of a Fundamental Research Platform	91
16:20 -16:30 23J503 松山知樹	Based on Ion Beam Mutagenesis 重粒子線による植物品種識別と突然変異育種に関する 研究	95
	Development of cultivar identification method and plant breeding using heavily ion-beams	

16:40 - 16:50 24J507 下川卓志 実用化を目指した有用微生物の単離・育種

101

※一課題の発表時間は7分、討議3分を予定

開催期間中に発表できない課題 成果発表会後日に録画発表

22J137	KIM Jong Ki	Investigation of heavy ion stimulated Colomb nanoradiator on amyloid protein-magnetite	107
22J150	関原和正	aggregation in neurodegenerative disease 悪性腫瘍(放射線、抗がん剤に抵抗性を示す難治がん 含む)に対する重粒子線の有用性および分子機構の解 明	110
		Investigation of the efficacy and molecular	
		tumors including refractory cancers resistant to	
		radiation and anticancer drugs	
23J155	Ebner	Advanced multiomic analysis of DNA Damage,	113
	Daniel	Metabolic, and Immunotherapeutic Inhibitors with	
	Keith	Heavy-Ion Radiotherapy	
24J207	Angela	Heavy ion minibeam radiation therapy: safety and	116
	Corvino	efficacy studies	
22J307	Eun Ho	The identification of miRNA-17 and miR-214 as	119
	Kim	Carbon-ion radiosensitizer on osteosarcoma	
23J348	Di Cuixia	Molecular mechanism of heavy ions overcoming	123
99 T9 40	ling Si	The Europianal Pole and Underlying Mechanism of	197
201049	JING SI	Heavy Ions in Overcoming the Radioresistance of	121
		Quiescent Cancer Cells	
23J350	Sun Chao	Mechanism study on much efficient induction of	130
		tumor cell death by heavy ion irradiation: the	
		role of NADPH oxidase-mediated mitochondrial	
		vicious cycle	
24J428	PORCEL	Radioamplification effect of nanoparticles study	133
	Erika	on 3D cell models	
24J146	Safavi	Evaluation of a Prototype System for Prompt	
	Naeini	Gamma Detection and Neutron Capture	
	Mitra	Discrimination in NCEPT	

「 2024年度HIM 日時: 場所:	(AC共同利用)	2025/5/16 研究成果発表会プログラム(案)、物理・工学班」 2025年5月27日(火)9時50分~16時10分 Web開催	
5月27日(火) Ma	v 27 (Thu)		
9:50 - 10:00	, _ · (· ,	開会の挨拶	報告書
		口頭発表	~~~
10:00 - 10:30	セッションA	治療 (座長:) ヤッション準備	
22H005	坂間誠	重粒子線治療照射法に関する総合的研究 General Study on Heavy Charged Particle	139
23H285	寅松千枝	Irradiation System for HIMAC Clinical Trial 重粒子線照射野イメージングのためのOpenPET装置開発 に関する研究	142
		Development of OpenPET for Irradiation Field Imaging in Carbon Ion Therapy	
10:30 - 10:40		休憩	
10:40 - 11:10	セッションB	放射線と化学反応 (座長:)	
22H467	小林正規	セッション準備 超音波エコーを利用した水中における重粒子線飛跡可 祖化の研究	147
22H426	上野恵美	Visualization of Heavy Ion Particle Trails in Water Using Ultrasonic Echoes 炭素線照射した脂質中に生成するフリーラジカルの検 出とその反応解析 Detection of lipid free radicals induced by carbon-ion beam irradiation to oil/lipid	150
11:10 -11:20		休息	
11:20 -12:10	セッションC	加速器ビーム利用の新展開 (座長:)	
24H262	為ヶ井強	セッション準備 粒子線照射による新規超伝導体における臨界電流増強 と超伝導対称性の同定 Enhancement of Critical Current and Identification of Symmetry of Superconductivity in New Superconductors by means of Particle	153
22H409	牧野高紘	炭化ケイ素パワー半導体のイオン誘起過渡応答測定 Single Event Transient Pulse Measurement on SiC	156
24H492	小林和淑	Tower Devices 放射線による劣化現象TIDを考慮した宇宙機向け耐ソフト エラー回路の開発	157
23H487	北村徳隆	Development of Soft Error Tolerant Circuits for Spacecraft Considering Total Ionizing Dose シリコンカーバイド検出器の重イオンビームに対する 応答	159

12:10 - 13:10

昼休み

13:10 - 13:50	セッションD	様々な検出器の開発 (座長:)	
23H138	山内知也	セッション準備 高感度飛跡検出器に相応しい新しい検出閾値概念と エッチングモデルの確立	161
24H212	中竜大	Toward a new concept for detection threshold and etching-models suited to track detectors with high registration sensitivity 超微粒子原子核乾板によるナノスケール高電荷分離放 射線飛跡検出器の展開 Study for the super-fine grained nuclear emulsion	164
23H473	廣瀬重信	as hano-scale tracking detector with high-charge discrimination エネルギー分解能を持つ白雲母固体飛跡検出器の開発 Development of Mica Solid State Track Detector with Energy Resolution	167
13:50 - 14:00		休息	
14:00 -15:00	セッションE	宇宙観測の為の測定器 (座長:)	
24H095	新藤浩之	セッション準備 化合物半導体への重イオンの影響に関する研究 Study of single event effects on compound	170
23H189	寺沢和洋	semiconductor devices 位置有感比例計数管の重イオンに対する応答 Response of a position-sensitive tissue-	173
24H437	James Vebredaluu	equivalent proportional chamber to heavy ions In-Field and Out-of-Field Dose Profile from Thereprutic Hadron Thereprese	177
22H414	Hajdas	Tests of Particle Telescopes for JUICE and other	183
22H465	wojciech 高橋忠幸	iuture missions of ESA ガンマ線衛星搭載検出器の重イオン応答の研究 Study of heavy ion response of gamma-ray satellite onboard detectors	186
15:00 - 15:10		休憩	
15:10 -16:00	セッションF	原子核の研究と検出器の開発 (座長:)	
24H445	大田晋輔	ガスアクティブ標的による核物質の物性研究	189

Study of matter property of the nucleonic system

Study on Charge Changing Interactions of Heavy

対称重イオン核融合反応の断面積評価と新同位体探索

Study of the near-symmetric fusion cross section

高放射線耐性を持つ新素材半導体検出器の研究

195

198

201

using gaseous active target 不安定原子核の荷電変化反応の研究

and search for new isotopes

Ions

24H443 山口貴之

24H455 外川学

22H466 今井伸明

開催期間中に発表できない課題 成果発表会後日に録画発表

	Stuart P		_ , ,
23H377	Ploc Ondrej	Novel Space Dosimetry System for the Czech	210
23H387	福田祐仁	レーザー加速イオン特性評価のための高精度エネル ギースペクトロメータの開発	213
24H446	楠本多聞	Development of the energy spectrometer for characterization of laser-accelerated ions 放射線化学実験で解き明かす生物効果の線量率依存性 メカニズムの解明 Clarification of the mechanism of the dose rate offset of biological offsetiveness	221
22H461	Benton Eric R	Atmospheric Ionizing Radiation Detector Development	224
23H474	Berger Thomas	Human Space Exploration - The Radiation risks and novel new detector developments	227
23H476	Dong Hai Zhang	Cross sections for charge pickup reaction of heavy jons On elemental targets at HIMAC energies	231
23H479	大島武	民生部品の宇宙利用拡大に向けた高信頼車載デバイスの 放射線損傷メカニズム解明	234
		Radiation damage mechanism for highly reliable onboard devices for the expansion of consumer components into space applications	
24H488	García Alía Rubén	SRAM and Diode Irradiation with Xe and Kr Heavy Ions at HIMAC	237

22H462	Safavi-	Evaluation	of	a proto	type	system	for	prompt	gamma
	Naeini	detection	and	neutron	capt	ure di	scrin	mination	in
	Mitra	NCEPT							

治療 · 診断班 Clinical study and Diagnosis

LET 最適化法を用いた膵癌炭素イオン線治療法の新規治療開発

Development of a Novel Carbon-ion Radiotherapy

for Pancreatic Cancer Using LET Optimization

(24L126)

篠藤 誠^a、山田 滋^a、瀧山博年^a

M. Shinoto, S. Yamada, H. Takiyama

Abstract

The aim of this study is to determine the maximum tolerated dose of carbon-ion radiotherapy (C-ion RT) using the linear energy transfer (LET) optimization and simultaneous integrated boost (SIB) methods for pancreatic cancer. In this study, the dose levels were escalated in four steps from 55.2 to 67.2 Gy (RBE) in 12 fractions. The incidence of adverse events and the dose to the stomach and

duodenum were evaluated when increasing the dose with a dose averaged LET of 44 or higher. This year, two patients were treated. After C-ion RT there was no grade 2 or more toxicity. In both cases, the stomach and duodenum doses within were constraints. Further dose escalation will be performed in the future to verify the safety of this treatment method.

1. 研究の目的とバックグラウンド 膵癌は年々増加傾向にあり、また膵癌 患者の多くは高齢者である。切除不能 な進行例、あるいは高齢、合併症によ る手術非適応例に対して、より強力か つ、侵襲の少ない治療を行い、手術と 同等あるいはそれ以上の局所制御効 果を示す治療法を開発することが急 務である。現在、切除不能膵癌に対す る 重 粒 子 線 治 療 で は 55.2 Gy (RBE)/12 分割という線量分割法が用 いられている。これまでの線量増加試 験を含む膵癌重粒子線治療の臨床研 究において、線量を増加し局所制御率 を向上することにより(2年局所制御 率 30%→63%)、生存成績の向上が得 られることが示されてきた(2年生存 率 35%→53%)。さらなる治療成績向

上のためには安全性を維持したまま 局所の治療強度を向上させる必要が ある。すなわち、消化管など放射線感 受性の高い周囲正常組織への影響を 少なくしたまま腫瘍への治療強度を 向上させるには、①物理特性を活かし た新たな照射法の開発、②重粒子線の 持つ生物特性を最大限取り出す工夫 が必要と考える。これまで、治療計画 画像を用いた基礎的研究を通して、タ ーゲト内の線量強度を変調させ、腫瘍 部分に限局して安全に線量増加が可 能であることを示してきた。また、本 来炭素イオン線は高 LET 線であるが、 臨床で用いられる場合には、必ずしも 腫瘍内部が高 LET 成分のみで構成さ れるわけではないこと、臨床線量が同 じであっても腫瘍内部の LET が低く

なると再発率が上昇することなどが 明らかとなってきた。この結果は、照 射線量つまり「量」のコントロールの みならず、「質」のコントロールも重要 であることを示唆している。治療強度 増強の手段として、腫瘍内部の線量を 増加させるだけでなく LET 分布の最 適化を行うことにより高 LET 成分を 腫瘍内に集中することができれば、高 LET 線としての炭素イオン線の本来 の効果を最大限発揮する治療が実現 可能となると考えられる。 本研究の目的は、膵癌に対する炭素イ オン線治療において、LET 最適化法お よび強度変調技術を用いて腫瘍内部 の LET および線量を増加させること により治療効果の最大化を目指すこ

のコントロールのみならず、「質」(線 (質)のコントロールを行う新たな治療 計画法を開発し、治療の安全性を評価 することを目的とする。

2. 昨年度までに得られている結果 2021 年度より登録を開始し、線量レ ベル1から3まで3例ずつ及び、線量 レベル4において2例の治療を施行し た。全症例において、規定の線量制約 を満たし、予定通りの治療を完遂した。 Grade3 以上の重篤な有害事象を認め なかった。

3. 今年度の研究内容 昨年に引き続き、表1のごとく投与線 量を設定し、各レベル3-6名を対象と とである。すなわち「量」(照射線量) して、線量増加試験を行う。従来の線 量制約(消化管 $V_{10} \ge 102 \operatorname{cc}, V_{20} \ge 24 \operatorname{cc},$ $V_{30} \ge 6 \operatorname{cc}, D_2 \ge 46 \operatorname{Gy}(\operatorname{RBE})$)に加えて、 腫瘍内部の最小平均 LET を $44 \operatorname{keV} / \mu$ m 以上とするよう治療計画を行う。主 要評価項目は正常組織の有害反応で あり、CTCAEv5.0 を用いて評価を行 う。

4. 今年度の研究成果と解析結果
今年度は線量レベル4にて1例を追加
し、問題なく治療を完遂した。本症例
の登録を持って、予定症例数計 12 例
の登録が終了した。線量レベル4にお
いても、線量制限毒性を認めず、67.2
Gy/12 分割が推奨線量と決定された。
過去の症例も含めて Grade3 以上の重
篤な有害事象を認めなかった。全症例
の1年局所制御率および1年生存率は
それぞれ 83%および 86%であった。

今後、本試験の推奨線量を用いた多施

設第 II 相試験を施行予定である。

a. QST 病院/QST Hospital

表1

線量レベル	総線量 Gy (RBE)	1回線量 Gy (RBE)	最小平均LET keV/μm
レベル1	55.2	4.6	≥44
レベル2	60.0	5.0	≥44
レベル3	64.8	5.4	≥44
レベル4	67.2	5.6	≥44

·研究成果一覧

(学会発表)

Shinoto M. et al. A phase I dose escalation study of carbon-ion radiotherapy for inoperable pancreatic cancer, APA/JPS/CAP/IAP 2024, USA 2024, 12, 9-12

骨軟部腫瘍に対するマルチイオン照射法による LET 制御重粒子線治療法の開発 Development of LET-optimized multi-ion radiotherapy for bone and soft tissue sarcoma (23L134)

今井 礼子 "

Reiko Imai

Abstract

Background and purpose

Previous analyses have shown that the local control rate was lower in large-volume sarcomas exceeding 500 cm³ treated with carbon ion radiotherapy (1-3). While increasing the total irradiation dose may improve outcomes, dose-escalation trials in 2000 revealed that doses beyond the standard 70.4 Gy (RBE: Relative Biological Effectiveness) led to more adverse events in normal tissues. To enhance antitumor efficacy without increasing the dose, we explored alternative strategies. Matsumoto et al. reported that in radiation-resistant sarcomas, particularly chondrosarcomas, cases with a minimum average Linear Energy Transfer (LET) of 40 keV/µm or higher showed better local control than those with lower LET values (4). These findings highlight the potential for improving local control not by increasing radiation dose in Gy, but by enhancing radiation quality, measured in keV/µm.

Material and Methods:

A total of 52 patients with bone and soft tissue tumors were treated in FY2024.

Result and conclusion

None were enrolled in the study due to various reasons. Among the 52 patients, 23 had chordomas and 7 were re-irradiation cases, both outside the inclusion criteria. Six patients had tumor volumes below 400 cm³, and five were excluded due to large irradiation fields. Notably, these five cases involved high-grade sarcomas. which would otherwise be considered ideal candidates. All data are summarized in the table. As anticipated in the previous fiscal year, the 14 cm gantry size limitation in Treatment Room G has become a significant clinical constraint. To address this, we developed the LET patch irradiation method, reviewed by the QA/QC Committee in FY2024 and approved for clinical use. From FY2025, we plan to accumulate clinical cases using this method. As the technique is not yet published, details are withheld in this manuscript.

1,研究目的とバックグラウンド

切除不能骨軟部肉腫の重粒子線治療では 腫瘍体積が 500cm3 を超えるような大き な肉腫の局所制御率が低いことが分かっ ている(1-3)。「線量」ではない何かで

抗腫瘍効果を高められないか、と考え た。 Matsumoto らは放射線抵抗性肉腫の 代表である軟骨肉腫症例では最小平均 LET (LET: Linear Energy Transfer)ガ 40keV/μm以上の群はそれ未満の群に比 べ局所制御率が高いことを記した(4)。 本試験は LET 最適化マルチイオン照射法 の安全性を検討するための重粒子線治療 装置 CI-1000S および治療計画装置の安 全性試験でもある。量子科学技術研究開 発機構の臨床研究審査委員会において 2023年1月27日臨床研究法(特定)と しL22-008、認定番号 CRB3180004 にて承 認 2023 年 2 月 6 日に jRCTs に登録し た。装置の再整備や安全性の再確認が行 われ、2023年11月マルチイオン臨床試 験は実質的に開始され1例目が終了し た。

2, 今年度の研究内容

今年度の登録は0であった。今年度の骨 軟部腫瘍患者は52例で、以下に登録で きなかった理由は以下である。

登録できなかった理由	数
脊索腫	23
再照射	7
<400 cm 3	6
照射野が大きい	5
通院希望	3
パッチ照射	2
腫瘍局在	3
自由診療	1

G1の軟部肉腫	1
その他	1

合計	52

脊索腫や再照射例は明確な適応外である が、照射サイズの問題となった5例はい ずれも高悪性度肉腫で(骨肉腫2例、 UPS2例、NOS1例)にて、いずれも適応 としたい組織型であった。前年度に予測 されていたG室ガントリーのサイズ制限 (14cm)が臨床的に問題となっている。

3, 考察およびまとめ

そこでLET パッチ照射法を開発し2024年 度の QA/QC 委員会にて審議を受け実用化 の運びとなった。2025 年度からはLET パ ッチ照射法も用いて症例を蓄積していく 予定である。LET パッチ照射法に関しては、 未発表のため本稿に詳細を記すことは控 える。

4, 文献

 Imai, R. (2016). International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 95(1), 322–327.

2.Imai, R (2017).Anticancer Research, 37(12), 6959–6964.

3.Imai, R.Cancer Medicine, 7(9), 4308–4314.4.Matsumoto, S. (2020).Anticancer Research, 40,

6429-6435.

心臓 MRI を用いた食道癌に対する重粒子線治療後の心機能障害計測と新規照射技術開発 Measuring cardiac dysfunction after carbon-ion radiotherapy for esophageal cancer using cardiac MRI and

developing new irradiation techniques

(24L135)

磯崎哲朗、石川仁、真鍋徳子、岸本理和、小畠隆行、佐野ひろみ、山田滋、篠藤誠、瀧山博年

Tetsuro Isozaki, Hitoshi Ishikawa, Noriko Manabe, Riwa Kishimoto, Takayuki Obata, Hiromi Sano, Shigeru Yamada, Makoto Shinoto, Hirotoshi Takiyama

Abstract

With recent advances in cancer treatment, damage to the heart caused by cancer treatment has become a problem. In carbon-ion radiotherapy for esophageal cancer, there have been no short-term adverse events of cardiac dysfunction, but this is based on patients' self-reports and measurements taken when symptoms occur. There are very few reports focusing on the effects of carbon-ion radiotherapy on the heart. In this study, we will use cardiac MRI to evaluate damage to the heart objectively. In this way, we believe that it will be possible to observe changes in the heart in response to the dose of carbon-ion beams by comparing the results of cardiac MRI with the dose distribution map of the carbon-ion beam. Based on this knowledge, we believe that it will be possible to establish an irradiation method that avoids damage to the heart. This year, we established a research team, obtained approval from the ethics committee, and enrolled two patients. We will continue to accumulate cases and continue our investigations.

1)研究の目的とバックグラウンド

本研究の目的は重粒子線治療における心臓への影響 を明らかにすることである。

重粒子線治療施設は世界に 16 か所、うち日本では 7 か所で行われている。我々の施設は重粒子線治療の 開発・発展に黎明期から関わってきており、重粒子線 治療に関連する多くのエビデンスを発表してきた。 少なくとも国内では食道癌に対する重粒子線治療の 症例数は最も多く、治療経験は豊富である。ところで、 食道は心臓のすぐ背側に位置しており食道に放射線 治療を行う場合は心臓に対する影響は避けられない。 実際の治療では照射の方向や線量を工夫することに

より心臓への線量をなるべく抑えるように治療計画 を立てている。我々のチームが報告した食道癌に対 する根治治療の PhaseI/II 試験の結果では心臓に対す る Grade3 以上の有害事象は認めなかった。だが、近 年がんサバイバーが増えており、その結果がん治療 後の循環器障害が問題となっている。Cardio-Oncology という学問も提唱され、日本でも腫瘍循環 器学会が設立され研究が行われている。本研究では より精密に他覚的に心臓機能評価を行う方法として 心臓 MRI を予定している。心臓 MRI は心筋の形態、 壁運動および組織変化を非侵襲的に評価することが 可能な検査である。障害の評価に画像検査を用いる ことにより、障害の程度を患者の自己申告ではなく、 他覚的に評価ができるようになる。心臓 MRI 検査で は①T1・T2 マッピングによる心筋細胞障害及び周 囲間質浮腫の評価、②ストレインによる局所壁運動 障害、③遅延造影による心筋線維化といった評価項 目が定量指標として示すことができる。さらに重粒 子線の線量分布図と照らし合わせ線量体積分布を計 算し、重粒子線の照射線量に関する各種パラメータ ーを算出することにより、心臓の各領域の重粒子線 の照射線量と心臓 MRI の各指標の相関を検討し心機 能障害について評価することが可能となる。重粒子 線治療×心臓 MRI 検査は本研究ならではと言える。 また、実際に治療を行うチームが本研究を行うこと により、障害を回避する手法を検討し、その結果を治 療計画に反映することが容易になると考える。これ により、照射技術の進歩につながると考えている。本 研究により重粒子線治療の線量と心臓へのリスクの 相関関係が確立できれば、重粒子線治療による心臓 のリスクを最小限にし、より安全な治療を行うこと

<u>が期待できる。</u>

2) 昨年度までに得られている結果

開始初年度の報告であり、過去の結果はなし。

3) 今年度の研究内容

倫理委員会による審査を受け、食道癌治療における 患者の心臓 MRI 検査を行っている。2025 年 3 月時点

<u>で2名の患者登録</u>を行った。

4) 今年度の研究成果と解析結果

研究を遂行するにあたり、心機能評価のために循環 器内科の協力が必要と判断し、<u>東海大学 循環器内科</u> の吉野教授のチームに共同研究者として協力をお願 いした。心機能評価に関して、専門家の協力が得られ、 より専門的な解析が可能となったと考えている。 現在は研究によるデータ集積を行っている段階であ り、解析結果と得られていない。研究にあたり患者の 流れやチーム内でのやり取りを行い<u>スムーズな研究</u> 遂行が可能な状態が整えられた</u>と考えている。

5) 参考文献

なし

膵癌に対する重粒子線治療における予後予測因子の解明 Prognostic factors in carbon ion radiotherapy for pancreatic cancer (24L137)

黑崎 宏貴[•], 篠藤 誠[•], 磯崎 哲朗[•], 瀧山 博年[•], 山口 有輝子[•], 山田 滋[•] H. Kurosaki[•], S. Makoto[•], I. Tetsuro[•], H. Takiyama[•], Y. Yamaguchi[•], S. Yamada[•]

Abstract

Carbon-ion radiotherapy (CIRT) offers superior dose concentration and cytotoxic effects compared to conventional X-ray radiotherapy, enabling effective local control with minimal damage to surrounding tissues. Since April 2022, CIRT has been covered by insurance in Japan for locally advanced pancreatic cancer based on its demonstrated survival benefit. This study retrospectively analyzed 72 patients with pathologically confirmed, unresectable, locally advanced pancreatic cancer treated with CIRT (55.2 Gy/12 fractions) at our institution between April 2022 and March 2024. Outcomes assessed were overall survival (OS), local control (LC), and progression-free survival (PFS), from the start of CIRT. The median age was 71 years; 37 were male, and 35 female. Tumor location was the pancreatic head in 22 cases and body/tail in 50. All patients completed treatment as planned. Chemotherapy was administered before CIRT in 97.2% of cases. One-year OS, LC, and PFS rates were 90.7%, 79.6%, and 53.8%, respectively. Grade 3 gastrointestinal toxicity occurred in 2.8%, with no Grade 4 or higher nonhematologic toxicity. CIRT remains a safe and effective option for locally advanced pancreatic cancer, demonstrating comparable outcomes to previous reports even after the initiation of insurance coverage.

1. 研究の目的とバックグラウンド

膵癌に対する長期生存、根治が期待でき る唯一の治療は手術療法とされている。し かし、手術単独での5年生存率は20%に満 たず、最も予後不良な癌の一つである。さ らに、膵臓周囲には重要臓器が近接し、特 に主要動脈に容易に浸潤することから多く は切除不能として発見される。重粒子線治 療は動脈に対する影響が少ないことから、 切除不能膵癌に対する根治治療として治療 開発が行われてきた。2007年から2012年 まで切除不能膵癌に対するゲムシタビン併 用重粒子線治療の線量増加試験が行われ、 従来のX線治療では投与不可能であった大 線量(55.2 Gy/12 分割)を安全に投与できる ようになった¹⁻³⁾。これにより良好な治療成 績が示され、2022 年4月より局所進行性膵 癌に対する重粒子線治療が保険収載された。 しかし、この線量強度での2 年局所制御率 は63%に留まり、さらなる改善が求められ ている。現在、強度変調治療やLET(linear energy transfer)最適化、マルチイオン照射 などの新技術の開発により、さらなる安全 な線量増加が可能となり、QST病院での臨 床試験が進行中である。

一方、膵癌が予後不良であるもう一つの 理由は、遠隔転移のリスクが非常に高いこ とである。局所治療により局所制御が達成 されても、治療前から潜在する微視的な遠 隔転移が治療後早期に顕在化する問題があ る。既に遠隔転移が潜在する多くの患者に とって、予後を決定するのは遠隔転移であ り、いかに局所を制御しても生命予後への 寄与は限定的である。これらの微視的転移 は既存の画像診断やバイオマーカーなどで は発見できず、治療開始前にこれらを予測 する術はない。従って、微視的遠隔転移を 早期から制御するため、全身化学療法を先 行させた後に手術や放射線治療を行う集学 的治療を行うことが現在の治療戦略となっ ている。しかし、どのような対象にどのく らいの期間化学療法を行うべきかについて の基準は存在しない。化学療法がすべての 患者に有効であるわけではなく、化学療法 の無増悪生存期間も6ヶ月程度と短く、有 効期間を過ぎてしまうと重粒子線治療の機 会を逸するリスクが増加する。化学療法を 長期間継続してしまうことによって遠隔転 移のリスクを排除できないまま、局所治療 が予後延長に貢献しにくい対象に対して重 粒子線治療を行わざるを得ないという問題 を抱えているのが現状である。全身療法と 局所療法の最適なバランスを導き出すため に、新たな予後予測、治療方針決定システ ムの開発が急務である。

そこで、本研究では膵癌治療例のデータ を後方視的に解析し、重粒子線治療後の予 後延長の因子および最適な治療法、治療の タイミングを解明することを目的とする。 本研究を実施することにより、重粒子線治 療を行うべき対象および適切な治療のタイ ミングの解明が期待される。

2. 今年度の研究内容

本研究の開始前にあたり、国立研究開発 法人量子科学技術研究開発機構において一 括審査で 2024 年 10 月臨床試験審査委員会 による承認を得た。また、UMIN-CTR に登 録を行った。

切除不能膵癌に対する重粒子線治療 55.2 Gy/12分割が2022年4月より保険収載され、 保険収載後の症例数増加においても、これ までと同等の質を担保し、最適な医療を提 供することが求められている。膵癌に対す る重粒子線治療における予後予測因子の解 析を行うにあたり、まずはじめに国立研究 開発法人量子科学技術研究開発機構 QST 病 院における、局所進行性膵癌に対する重粒 子線治療の保険適用後の治療成績について 解析を行った。

2022年4月から2024年3月までに当院 で組織診断の得られた切除不能局所進行膵 癌に対して重粒子線治療を施行した72例 を後方視的に解析した。原発巣については、 膵癌診療を専門とする医師により構成され るキャンサーボードにて切除不能であるこ とを確認した。重粒子線治療は総線量 55.2Gy/12分割で施行した。評価項目は全生 存率、局所制御率、無再発生存率とし、重粒 子線治療開始日を起算日とした。また、有 害事象の評価にはCTCAE v5.0を使用した。

3. 今年度の研究成果と解析結果

年齢中央値は 71 歳(48-87 歳)、男性/女性: 37/35 例、腫瘍部位は頭部/体尾部: 22/50 例であった。全例で予定通りの治療を完遂した。観察期間中央値は 16.4 か月(6.3-32.3 か月)であった。重粒子線治療開始前に 70

例(97.2%)で化学療法が開始されていた。 1年全生存率、1年局所制御率、1年無再発 生存率はそれぞれ90.7%、79.6%、53.8%で あった(Fig. 1)。Grade3以上の非血液毒性に ついては、Grade3消化管潰瘍・出血を2例 (2.8%)、Grade3 椎体圧迫骨折を2例(2.8%) に認めた。Grade4以上の非血液毒性は認め なかった。切除不能局所進行膵癌に対する 重粒子線治療は、保険収載後も既報と比較 して遜色ない結果であった。

今後、引き続きデータ収集を行うととも に予後予測因子についての解析を行い、学 会発表、論文投稿を予定している。



Fig.1. Kaplan–Meier Estimates of Overall Survival

参考文献

1) Kawashiro S, Yamada S, Okamoto M, Ohno T, Nakano T, Shinoto M, et al. Multi-institutional Study of carbon-ion radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: japan carbon-ion radiation oncology study group (J-CROS) study 1403 pancreas. Int J Radiat Oncol Biol Phys. (2018) 101:1212–21.

2) Shinoto M, Yamada S, Terashima K, et al. Carbon ion radiation therapy with concurrent gemcitabine for patients with locally advanced pancreatic cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. (2016) 95: 498-504

3) Liermann J, Shinoto M, Syed M, Debus J, Herfarth K, Naumann P. Carbon ion radiotherapy in pancreatic cancer: A review of clinical data. Radiother Oncol. 2020; 147:145–50.

a. 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 QST 病院

研究成果一覧

課題名: 膵癌に対する重粒子線治療における予後予測因子の解明 課題整理番号: 24L137 課題申請者: 黒崎 宏貴

研究成果

該当なし

前立腺肥大症の手術歴を有する前立腺癌に 対する重粒子線治療の安全性と効果についての検証 Carbon Ion Radiotherapy for Prostate Cancer in Patients with a History of Surgery for Benign Prostatic Hyperplasia (24L138)

岡東 篤^a、小林 加奈^a、石川 仁^b A. Okato^a, K. Kobayashi^a and H. Ishikawa^b

Abstract

Carbon-ion radiotherapy (CIRT) offers excellent dose distribution and biological effectiveness for localized prostate cancer, but its safety in patients with prior benign prostatic hyperplasia (BPH) surgery remains unclear. This retrospective study evaluated 74 patients who underwent CIRT after BPH surgery between 2007 and 2023. Acute Grade ≥ 2 genitourinary (GU) adverse events occurred in 5.4% of patients. Late GU adverse events of Grade ≥ 2 were observed in 8.2% of patients, primarily presenting as hematuria. The median time from surgery to CIRT was 8 years. Multivariate analysis did not identify any statistically significant risk factors for late Grade ≥ 2 hematuria, although diabetes mellitus showed a trend toward increased risk. The 5vear biochemical recurrence-free survival (bRFS) was 100% for low- and intermediaterisk, and 88.6% for high-risk patients. These findings suggest that CIRT is well tolerated even in patients with surgically altered anatomy. However, as the risk of severe GU adverse events may be slightly increased, patients should be adequately informed before treatment.

1. 研究の目的とバックグラウンド

前立腺癌は日本において男性のがん罹患 数で最も多い悪性腫瘍であり、PSA 検査の 普及、食生活の欧米化、そして高齢化によ り、今後も患者数の増加が見込まれている。 限局性前立腺癌に対する根治治療として、 前立腺全摘除術や放射線治療が選択される。 なかでも、炭素イオン線治療(CIRT)は、 X線に比べて高い線量集中性と生物学的効 果を有し、副作用を抑えつつ高い治療効果 が得られる放射線治療法である。

QST 病院では 1994 年より限局性前立腺癌 に対する CIRT を導入し、照射回数を段階

的に短縮しながらも、すべてのリスク群で 約90%の高い5年無再発率を維持している。 さらにスキャニング法や小型回転ガントリ ーの導入により、線量分布の最適化と正常 組織への影響の低減が進み、安全性も向上 している。こうした技術進展により蓄積し た治療実績の中には、前立腺肥大症(BPH) に対する手術歴を有する前立腺癌症例への CIRT も含まれている。BPH 手術後は前立腺 周囲に解剖学的変化や癒着が生じるため、 尿路有害事象の頻度や手術の難易度が上昇 することが懸念される。実際、BPH 手術歴 のある症例において、合併症リスクが高い ことから根治治療の適応外する施設も少な くない。BPH 手術歴のある前立腺癌に対す るX線治療やロボット支援下手術を行なっ たとする報告はわずかにある一方で、CIRT の安全性・有効性についての報告はこれま で存在していない。

本研究では、BPH の手術歴を有する前立 腺癌患者を対象に、CIRT の晩期尿路有害事 象および治療成績(無再発生存率)を後ろ 向きに検討し、その安全性と有効性を明ら かにすることを目的とする。本研究は当機 構臨床研究審査委員会により承認されてい る(N24-022)。

2. 昨年度までに得られている結果

新規課題であるため該当せず

3. 今年度の研究内容

臨床試験概要

【試験デザイン】後ろ向き観察研究

【研究対象者】2007年9月から2023年5月 までに当院で前立腺癌に対して重粒子線治療 を行なった患者のうち、前立腺肥大症に対する 前立腺手術歴を有する患者

<選択基準>BPHの手術として、開腹被膜 下前立腺摘除術、経尿道的前立腺切除術 (TURP, TUEB, HoLEP, PVP)を含めることとする。前立腺手術の施行回数は問わない。
TURP:経尿道的前立腺切除術
TUEB:経尿道的前立腺核出術
HoLEP:経尿道的ホルミウム前立腺核出術

PVP:経尿道的光選択的前立腺レーザー蒸散術 【研究の方法】

研究対象者について、下記の臨床情報を診 療録より取得する。

①臨床所見(年齢、全身状態、自覚症状、既 往症、前立腺肥大症手術術式、前立腺肥大 症手術時年齢、前立腺癌診断方法、病理学 的所見、臨床病期、ホルモン療法施行期間) の血液所具(血法 PSA 値)

②血液所見(血清 PSA 值)

③治療(重粒子線治療照射線量、照射回数)

④治療反応性(血清 PSA 値推移、有害事象) 【評価項目】

安全性の評価

・主要評価項目:副次評価項目:急性期、晩 期有害事象の評価

有害事象は、正常組織の治療に伴う反応を、 急性期(照射開始後90日以内)と晩期(照 射開始後91日以降)に分けて評価する。評 価には Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 5.0 を用いる。 有効性の評価

・主要評価項目:5年生化学的無再発生存率 統計解析の方法

・単変量、多変量解析にはロジスティック
 回帰、生存曲線の推定には Kaplan-Meier 法
 を用いる。

4. 今年度の研究成果と解析結果

2007 年から 2023 年の間に、前立腺癌患 者 3,848 名に対して CIRT を行い、そのうち 74 名 (1.9%) は BPH の手術歴があった。 BPH 手術時の中央値年齢は 67 歳、CIRT 開 始時の中央値年齢は 75.5 歳で、BPH 手術か ら CIRT 開始までの中央値の期間は 8 年で あった。手術方法は TURP が 66.2%、次い で HoLEP が 20.3%であった。

安全性について

急性期における Grade 2 の尿路有害事象は 5.4%に認められ、そのうち頻尿症状が 4.1% であった。Grade 3 以上の急性有害事象は発 生しなかった。晩期有害事象では、Grade 2 の血尿が 4.1%、頻尿および尿道狭窄がそれ ぞれ 1.4%で発生した。また、Grade 3 の血尿 は 1.4%の患者に見られた(Table 1)。

血尿のリスク因子: G2 以上の血尿を認めた 症例が少なかったため G1 以上の血尿で解 析を行なった。TURP は HoLEP と比較して Grade 1 以上の血尿リスクを有意に高めて おり(オッズ比 [OR]=8.6; p=0.044)、BPH 手術から CIRT 開始までの期間が短いほど 血尿リスクが増加することが示された(OR = 0.87 per year; p = 0.028)。その他、抗血栓 薬の使用や糖尿病の有無、放射線量、CIRT 時年齢は統計的に有意な関連を示さなかっ た(Table 2)。

消化器系有害事象:早期および晩期ともに 1.4%と少なかった。

有効性について:

低・中リスク群では、5年の生化学的再発な し生存率(bRFS)が100%であり、再発は認 められなかった。高リスク群では、5年の bRFSは88.6%であり、再発の発生はこれま での報告と同等であった(Figure 1)。

Table 1. Frequency of Early/Late GU AE

GU AE	grade 2	grade 3
Early	5.4%	0%
Late	6.8%	1.4%

Table 2. Risk Factors for \geq G1 Hematuria

Variable	OR	p-value
Interval BPH surgery to CIRT	0.872	0.028
Surgery (TURP vs. HoLEP)	8.664	0.044

Fig.1 5-year biochemical RFS



a. QST 病院治療診断部泌尿生殖器腫瘍課

b. QST 病院長

成果一覧

(学会及び研究会口頭発表等)

- ・岡東 篤:前立腺肥大症手術歴のある前立腺癌に対する重粒子線治療の長期的な効果と安全性の 検討 第37回日本放射線腫瘍学会 横浜 2024 年11月
- Atsushi O.: Carbon Ion Radiotherapy for Prostate Cancer in Patients with a History of Surgery for Benign Prostatic Hyperplasia. 第 112 回日本泌尿器科学会総会 博多 2025 年 4 月

HIMAC 共同利用研究報告書

Consideration of inter-fractional errors for the development of LET Adaptive Therapy (24L139)

村田 和俊 a

K.Murata^a

Abstract

This study aims to develop next-generation image-guided carbon-ion radiotherapy (IG-CIRT) with Adaptive Therapy by optimizing linear energy transfer (LET) distribution. Carbon-ion beams offer superior precision compared to other modalities, and IG-CIRT using CT-based verification enables further improvement in targeting accuracy. Daily anatomical variations necessitate Adaptive Therapy, where dose distributions are evaluated and replanned when needed. Moreover, the unique dynamic LET distribution in carbon-ion therapy has not been fully elucidated in terms of clinical impact.

We retrospectively analyzed patients with bone and soft tissue tumors and cervical cancer treated at QST Hospital, focusing on dose and LET distribution changes when assuming bonebased alignment only. In bone and soft tissue tumors, no significant changes in target coverage or rectal dose were observed, though individual variations were noted. Similarly, in cervical cancer patients, no significant differences were found in target coverage, mean doses, or LET parameters across GTV, rectum, bladder, and sigmoid colon. However, some cases showed notable variations, including a maximum rectal LET increase of 17 keV/µm. These results suggest that while overall variations are limited, individual risks of target underdosage or increased dose to organs-at-risk exist. underscoring the necessity for personalized Adaptive Therapy strategies in carbon-ion radiotherapy.

1. 研究の目的とバックグラウンド

本研究はLET 分布の最適化を含めた最先端の Adaptive Therapy 対応画像誘導重粒子 線治療の開発を目的とする。

炭素イオン線治療は臨床で現在使用されている放射線治療の中で最高精度を誇り、X線画像に基づく骨構造を基準とした位置決

めに比べ、CT 画像により内臓や腫瘍の位置 を確認したうえで治療を行う「画像誘導重 粒子線治療」により、さらなる位置精度の 向上が可能となる。さらに、日々の臓器位 置変動に応じて線量分布を評価し、不適切 な場合には即時に治療計画を再作成する

「Adaptive Therapy」の導入が、高精度治療の実現に不可欠である。特に炭素イオン線では、標的内外でのダイナミックな LET 分布の変化が X 線や陽子線にはない特徴であり、この特性が治療効果や安全性にどのように寄与するかは十分に解明されていない。

本研究では、LET 分布の臨床的意義を明 らかにし、最適な LET 分布を設計すること で、Adaptive Therapy に対応した次世代画像 誘導重粒子線治療の開発と治療成績の向上 を目指す。

2. 昨年度までに得られている結果

QST 病院で過去に重粒子線治療を行った 骨軟部腫瘍の患者の中で、治療期間内に複 数回治療計画 CT を撮影した患者を対象に、 従来の骨照合のみで位置照合を行った場合 を想定して治療分布を再計算した。治療タ ーゲットの線量評価と、リスク臓器(直腸-S 状結腸)の線量評価の変化を評価した。対 象はスキャニングビームによる重粒子線治 療の使用を開始した 2008 年以降の症例を 遡及的に解析した。

元来治療計画のために撮影した CT をプ ランニング CT (PCT)、治療期間中に再度撮 影した CT を再計算 CT (QACT) とする。 QACT と PCT を放射線治療医監修の元に骨 照合で rigid fusion を行った。もともと PCT 上に計算されていた治療計画を QACT 上に 照射した場合の線量分布を Xio-N 上で再計 算した。

骨軟部腫瘍患者については、一回線量 4.3 Gy(RBE)を基準に、PTV の 90%カバレッジ (PTVD90) および直腸 D2cc の線量変化を 比較した。PCT と QACT 間で有意差は認め られなかったが、直腸線量について症例ご とにばらつきが見られた。

同様に子宮頸癌患者に対しても、19.2 Gy(RBE)を基準とした治療ターゲット

(CTV)の線量およびリスク臓器(直腸、膀胱)の評価を実施した。CTV中心の移動量 平均は4.07±2.08mmであり、PTVD90や最 低線量においても有意な差は認められなか った。しかし、一部症例でCTV最低線量が 大きく低下するケースが確認された。リス ク臓器に関しても、膀胱体積、膀胱および 直腸の mean dose に有意差は認められなか った。

これまでの検討では、全体としては大きな 線量変動は見られなかったものの、個々の 症例における線量低下やリスク臓器線量増 加のリスクが示唆された。

3. 今年度の研究内容

実治療患者の治療計画 CT を用いた子宮 頸癌のインターフラクショナルエラーの遡 及的解析

QST 病院で過去に重粒子線治療を行った 子宮頸癌患者の中で、治療期間内に複数回 治療計画 CT を撮影した患者を対象に、従 来の骨照合のみで位置照合を行った場合を 想定して治療分布を通常の臨床線量での再 計算と LET d 分布での再計算を行った。そ のうえで、GTV、直腸、膀胱、S 状結腸の最 大線量、最小線量、平均線量それぞれにつ いての DVH パラメータの変化を評価した。 対象はスキャニングビームによる重粒子線 治療の使用を開始した 2008 年以降の症例 を対象とし、治療前の処置(膀胱注入量や 膣内のパッキング量)が同様と判断できる 症例を選択し遡及的に解析した。

4. 今年度の研究成果と解析結果

子宮頸癌の重粒子線治療において、子宮 を主な治療対象とする拡大局所照射4回の 線量分布を比較対象とした。線量は19.2 Gy (RBE)を基準として比較した。子宮は元来移 動量を計算に入れてPTVを設計しているた めGTVの線量を比較した。



臨床線量分布における、GTV、直腸、膀胱、 S状結腸の平均線量、最小線量、最大線量は 下記の表1に示す。結果として全てにおいて 有意差を認めなかった。

圭	1
X	T

Structure	名称	PCT平均值	PCT標準偏差	QACT平均值	QACT標準偏差	p-value
GTV	最大線量 Gy(RBE)	19.4	0.04	19.5	0.10	0.194
GTV	最小線量 Gy(RBE)	19.0	0.13	18.9	0.18	0.314
GTV	平均線量 Gy(RBE)	19.3	0.03	19.3	0.04	0.815
直腸	最大線量 Gy(RBE)	19.8	0.25	19.8	0.38	0.893
直腸	最小線量 Gy(RBE)	0.0	0.02	0.0	0.02	0.374
直腸	平均線量 Gy(RBE)	7.8	1.91	8.0	2.21	0.530
膀胱	最大線量 Gy(RBE)	19.8	0.27	19.7	0.17	0.257
膀胱	最小線量 Gy(RBE)	2.3	1.89	2.2	1.85	0.276
膀胱	平均線量 Gy(RBE)	10.4	1.88	10.2	1.73	0.162
S状結腸	最大線量 Gy(RBE)	19.7	0.17	19.8	0.28	0.602
S状結腸	最小線量 Gy(RBE)	0.4	0.41	0.4	0.45	0.234
S状結腸	平均線量 Gy(RBE)	10.3	3.97	10.5	4.14	0.601

次にLET d 分布で再計算を行い、LET d 分 布における、GTV、直腸、膀胱、S状結腸の平 均LET、最小LET、最大LETは下記の表2に示 す。こちらも全てにおいて有意差を認めな かった。

表 2

Structure	名称	PCT平均值	PCT標準偏差	QACT平均值	QACT標準偏差	p-value
GTV	最大LET KeV/µm	0.60	0.04	0.59	0.05	0.508
GTV	最小LET KeV/µm	0.36	0.02	0.36	0.03	1.000
GTV	平均LET KeV/µm	0.43	0.02	0.42	0.03	0.468
直腸	最大LET KeV/µm	0.93	0.04	0.94	0.10	0.798
直腸	最小LET KeV/µm	0.00	0.00	0.00	0.00	
直腸	平均LET KeV/µm	0.43	0.06	0.46	0.07	0.141
膀胱	最大LET KeV/µm	0.61	0.05	0.66	0.12	0.359
膀胱	最小LET KeV/µm	0.13	0.07	0.14	0.06	0.374
膀胱	平均LET KeV/µm	0.27	0.01	0.27	0.01	0.621
S状結腸	最大LET KeV/µm	1.01	0.13	1.00	0.08	0.654
S状結腸	最小LET KeV/µm	0.05	0.08	0.06	0.08	0.099
S状結腸	平均LET KeV/µm	0.45	0.12	0.45	0.13	1.000

ただし、症例によっては直腸の最大LETに おいて17kev/ μ mの変化を認めるなどLETの 変化が懸念されるケースが認められた。

a. 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 QST 病院

発表会開催日に発表ができない課題

発表会開催後日に録画発表

Outcome of Carbon ion radiotherapy for pulmonary oligometastases from colorectal cancer at QST Hospital

(24L136)

山口 有輝子 ª Yukiko Yamaguchi

Abstract

The presence of recurrence after colorectal cancer surgery is an important factor that determines the prognosis. Currently, Carbon Iron Radiotherapy (CIRT) is being used as an advanced medical treatment for lung metastases from various cancers. It is expected to be effective even for lung metastases of colorectal cancer, which are generally considered to be radiation resistant. In this study, we evaluated the outcomes of 55 cases of postoperative colorectal cancer with lung metastases who underwent CIRT as advanced medical treatment at our facility from May 1997 to October 2022. The median observation period was 29.5 months, and the treatment outcomes were a 2-year survival rate of 67.4% and a 2year local control rate of 74.7%. In general, the most frequent adverse event (AE) in lung radiation therapy is radiation pneumonitis, but in our cases, no AEs related to pneumonia of Grade 3 or higher in CTCAE (Version 5.0) were observed, and good safety results were obtained. These results are comparable to those of several previous reports on stereotactic radiotherapy (SBRT). CIRT can be performed safely and has relatively good therapeutic outcomes. It is a minimally invasive local treatment option for inoperable pulmonary metastases.

1. 研究の目的とバックグラウンド

大腸癌術後の再発の有無は予後を規定する重要な 因子である。従来は、フォローアップ中に遠隔転移 が確認された時点で、画像検査で視認できる病巣以 外にも微視的な病変が存在することが必然と考えら れ、systemic chemotherapy を行うことが一般的であ った。しかし、「がんが全身に転移する前に、少数 個の転移のみが存在する状態」という、いわゆる 「オリゴ転移」の概念が提唱された。オリゴ転移巣 に対する適切な局所療法を加えることにより予後が 改善するとの報告があり、2020年には転移性腫瘍 に対する定位放射線治療が保険収載された。重粒子 線治療は先進医療として様々ながんの肺転移につい ても治療が行われているが、一般に放射線抵抗性と される大腸癌の肺転移においても有効性が期待され る。そこで、当院における大腸癌術後の肺転移に対 する重粒子線治療の成績を後方視的に解析した。

前年度までの結果
 なし

3. 今年度の研究内容と成果

今回 1997 年 5 月から 2022 年 10 月まで当施設で 先進医療として重粒子線治療を行った大腸癌術後 肺転移を有する 55 症例について成績を評価し た。重粒子線治療の適応としては肺転移 3 病変ま で、かつ手術不能例(患者拒否を含む)としてお り、遠隔転移に対する根治治療の既往の有無は問 わない。観察期間の中央値は 29.5 カ月で、治療成 績は 2 年生存率 67.4%、2 年局所制御率 74.7%と の結果であった。一般に肺への放射線治療におい て最も頻出な有害事象(AE)は放射線性肺臓炎 (Radiation pneumonitis)であるが、我々の症例では CTCAE (Version5.0) における Grade3 以上の肺炎 に関する AE は認めず、安全性についても良好な 結果が得られた。

実際の重粒子線治療方法



治療線量	症例数(例 <u>)</u>
<u>68.4Gy*/12fr</u>	<u>1</u>
<u>60Gy/4fr</u>	<u>51</u>
<u>57.6Gy/16fr</u>	<u>1</u>
<u>52.8Gy/4fr</u>	<u>2</u>
<u>48Gy/8fr</u>	<u>1</u>

≪生存率≫



≪局所制御率≫



≪有害事象≫

Gr3 以上の有害事象を認めなかった。

≪他治療法の既報と成績の比較≫

報告者年	試験	治療方法	症例数(人)	原発巣	生存率(%)) 局所制御率(%)	G3以上有害事象(%)
Okumura 1996	後ろ向き 単施設	手術	159	大腸癌	5Y 40.5	_	-
Okumura 2017	後ろ向き 多施設	手術	785	大腸癌	5Y 37.1	-	-
Cao 2017	後ろ向き 単施設	手術	88	大腸癌	5Y 35.7	-	-
<u>Nanii</u> 2018	後ろ向き 多施設	手術	420	大腸癌	5Y 40	-	-
QST Hospital	後ろ向き 単施設	重粒子線	56	大腸癌	5Y 33.6	5Y 70	なし

≪結論≫

大腸癌肺転移に対する重粒子線治療は安全に施行可 能で、比較的良好な治療成績であった。手術不能の 肺転移に対する低侵襲な局所治療の選択肢となると 考えられた。

論文執筆準備中

1年間の研究期間を通して、55 症例の大腸癌術後 肺転移に対する重粒子線治療の成績を解析した。 転移性肺腫瘍に対する他の治療法との成績の比較 することなどをテーマに論文執筆の準備を行なっ ている。

成果発表

・山口有輝子、瀧山博年、中嶋美緒:大腸癌術後の
 肺転移に対する QST 病院における重粒子線治療の
 成績、大腸肛門病学会学術集会、神奈川、2024.11.
 口演

・山口有輝子:当院における局所再発大腸癌の治療
 戦略、千葉大学医学部先端応用外科学例会、

2024.12.口演

所属 —

 a. 量子科学技術研究開発機構 QST 病院(National Institutes for Quantum Science and Technology QST Hospital)

生物 班 Biology
新規重粒子線治療の実現に向けた臨床前動物実験 Preclinical in-vivo experiments for developments of novel heavy-ion radiotherapy (22J001)

稲庭拓、下川卓志、日浦剛基、水島康太、田中創大、増田孝充、笠松幸生、武居秀行、鈴木沙彩、 佐野太陽、石川仁、岩田佳之、白井敏之

T. Inaniwa, T. Shimokawa, K. Hiura, K. Mizushima, S. Tanaka, T. Masuda, K. Kasamatsu, H. Takei, S. Suzuki, T. Sano, H. Ishikawa, Y. Iwata, T. Shirai

Abstract

At the National Institute for Quantum Science and Technology (OST), heavy-ion therapy with carbon ions (CiRT) has been applied for various tumor sites, and promising clinical results have been obtained for many of these tumor sites. Besides these clinical treatments, many technological developments have been achieved such as a respiratory gating, pencil beam scanning, and superconducting rotating gantry. For further developments of heavy-ion therapy, a multi-ion therapy (MIT) has been investigated as part of a "Ouantum Scalpel" research project. In the MIT, two or more ion species of He, C, O, and Ne ions will be delivered in one treatment session. In addition to the MIT, some new treatment methods with heavy ions have been proposed, such as FLASH, micro surgery (MS), spatially fractionated radiotherapy (SFRT), and ARC therapy. Before the clinical implementation of these methods, in-vivo animal experiments are essential to investigate their clinical efficacy and safety. In this study, preclinical in-vivo experiments of new treatment methods will be conducted using an actual treatment machine.

1 研究の目的とバックグラウンド

QST では、中期計画課題である量子メス研究開 発プロジェクトの一環としてマルチイオン治療 法の開発が進められている。そこでは炭素線以 外に、ヘリウム線、酸素線、ネオン線などこれ までに経験のない新たな核種を治療用ビームと して用いる計画である。また、それ以外にも、 FLASH 重粒子線治療法、重粒子線マイクロサー ジェリー、重粒子線グリッド照射、重粒子線ア ーク照射など、重粒子線を用いた新たな高精度 治療法の研究開発が進められている。本研究課 題では、新たな高精度重粒子線治療の実現に向 けて、非臨床試験として、マウス・ラット等の 小型の実験動物に対する臨床機を用いた重粒子 線照射実験を実施し、それらの治療法の有効性 と安全性などの評価を行うことを目的とする。

2 昨年度までに得られている結果

本研究は、2022 年度からの研究課題である。 2022 年度は、ヘリウム線、炭素線、酸素線、ネ オン線を用いた動物実験に向けて、照射システ

ム・機器の開発、治療計画ソフトウェアの開発 [1]、臨床 RBE モデルの考案、線源データ測定、 照射野の作成、線量分布検証等を行った。2023 年度は、マルチイオン治療法の有効性を確認す るべく、下肢にマウス由来の扁平上皮癌(SCCVII) を移植したマウスに対してヘリウム線、炭素線、 酸素線、ネオン線 (7.5, 15, 22.5 Gy (RBE)) を局所照射し、腫瘍増殖抑制効果 (tumor growth delay)を観測した。各照射条件での腫瘍サイズ の変化を照射日からの経過日数の関数として調 べた (図1(a))。図1(b)には、照射による腫瘍 体積変化が最も顕著に表れた照射後7日目の腫 瘍体積を臨床線量の関数として示した。ヘリウ ム線 15 Gy (RBE)の照射効果がやや低いものの、 炭素線、酸素線、ネオン線については臨床線量 に対する照射効果がおおよそ一致した。このこ とから、考案した臨床 RBE モデルがマルチイオ ン線の腫瘍制御効果を表す指標として機能する ことが示された。また、全ての核種について、 22.5 Gy (RBE) を照射することで腫瘍が制御され ていることから、マルチイオン治療に用いる全 ての核種について有効性が示された。



図 1 ヘリウム線、炭素線、酸素線、ネオン線の 拡大照射野をマウス下肢に移植したがん細胞に対 して照射したときの(a)腫瘍体積の経時変化、(b) 照射後7日目の腫瘍体積。

3 今年度の研究成果

今年度は、ヘリウム線、炭素線、酸素線、ネ オン線を用いたマルチイオン治療法の安全性を 確認するべく、マウスの腹部(腸管死)および 下肢(皮膚障害)に対して4つの核種を照射す る実験を行った。また、重粒子線 FLASH 治療に ついて、その障害軽減効果を確認するためマウ スの腹部に対する超高線量率炭素線照射実験を 行った。更に、重粒子線グリッド照射について も、障害軽減効果を確認するための照射実験を 行った。なお、全ての動物照射実験は、保健所 やQST病院各所との協議に基づき、新治療研究 棟治療室E内iso-center付近の一部領域(2×4 m²)を臨時の動物実験室とし、手順書に従って 実施した。

3.1 マルチイオン照射(腸管死)

マルチイオン治療法の安全性を確認するため、 ヘリウム線、炭素線、酸素線、ネオン線(16~ 32.5 Gy (RBE))の拡大照射野を健常マウスの腹 部に照射し、腸管死を確認する照射実験を実施し た。照射後40日目までのマウスの生存日数(照 射日からの経過日数)を照射線量の関数として 調べた(図2)。照射線量が増えるとある線量を 境に急激にマウスの生存日数が低下することが 分かる。炭素線、酸素線、ネオン線の半致死線 量 (LD50) は 28 ± 1.5 Gv (RBE) で一致した。 一方で、ヘリウム線のLD50は23 Gv (RBE)程度 であり、他の3核種に比べて低い値となった。 炭素線、酸素線、ネオン線に対して、考案した 臨床 RBE モデルがマルチイオン線の腸管死をエ ンドポイントとする正常組織障害を表す指標と して機能することが示された。一方で、ヘリウ ム線では正常組織障害を過小評価することが明 らかになった。



図 2 ヘリウム線、炭素線、酸素線、ネオン線の 拡大照射野をマウスの腹部に照射したときの、40 日目までのマウスの生残に数(照射日からの経過 日数)。

3.2 重粒子線 FLASH

陽子線や電子線を用いた超高線量率照射における正常組織防護効果がマウスを用いた実験で報告されている。今年度は引き続きマウスを用いて腸管に対する炭素線超高線量率照射を実施し、生存率解析のほか、照射後マウスの腸管の病理解析を行った。照射は400 MeV/uの炭素線のエントランス部分で実施し、線量率は照射野平均でFLASHが96 Gy/s,通常線量率(CONV)が0.3 Gy/sであった。図3(左)に昨年度の結果と合わせて照射後マウスの30日後における生存率を示す。サンプル数が昨年度から増えても、FLASH効果は見られなかった。追加で実施した病理解析(図3(右))では、アポトーシスやクリプトの再生を指標とした評価を実施したが、ここでも防護効果は確認できなかった。来年度は

異なるエンドポイントでの実験を通して FLASH 重粒子線治療の将来性を検討する。



図3(左)生存率の比較。横軸は炭素線の物理線 量。(右)病理解析のため染色した腸管の例。

3.3 重粒子線グリッド照射

空間的に不均一な照射(GRID 照射)は正常組織の温存と局所的な高線量投与を両立する。高線量照射は免疫系を活性化し、強い抗腫瘍効果を誘導することが報告されている。本年度は炭素線430 MeV/uのスキャニングビームを用いてGRID 照射野を作成し、直列臓器である腸管に対する温存効果を評価した。腸管死をエンドポイントとした場合は局所的に高線量(LD50 はピーク線量で47.1 Gy)を投与できるが、照射後の体重推移から組織の機能低下が示唆された(図 4)。 来年度は GRID 照射における抗腫瘍効果についても評価する。



図 4 (左) GRID 照射と矩形(CONV)照射の線量-生 存率曲線、(右) GRID 照射後(ピーク線量 14, 47 Gy)と CONV 照射(14 Gy)後の体重推移。

4 まとめ

本年度は、マルチイオン治療の有効性と安全 性を検証するため、ヘリウム線、炭素線、酸素 線、ネオン線を用いた動物実験を行った。また、 重粒子線 FLASH 治療法および重粒子線グリッド 照射法の有効性を検証するための動物実験を開 始した。来年度も、マルチイオン治療法を代表 とする新規重粒子線治療法の有効性と安全性を 確認するための動物実験を基本とした研究開発 を継続する計画である。

参考文献

[1] T. Inaniwa, et al., Phys. Med. Biol. 65 045005 2020.

a. QST

(原著論文等)

- Inaniwa T., Masuda T., Kanematsu N.: Effects of intra-fractional cellular heterogeneity of oxygen partial pressure on biological effectiveness of hydrogen-, helium-, carbon-, oxygen-, and neon-ion beams. Physics in Medicine and Biology 70 025008 (2025).
- Mizuno H., Nakaji T., Lee S. H., Sakata D., Aoki K., <u>Mizushima K.</u>, Tran T. H., Rosenfeld A., <u>Inaniwa T.*</u>: Verification of linear energy transfer optimized carbon-ion radiotherapy. Physics in Medicine and Biology 69 NT01 (2024).
- Tanaka S., <u>Inaniwa T.</u>: Method for fabricating a mesh ripple filter for charged-particle therapy. Physics in Medicine and Biology **69** 145009 (2024).
- Nakaji T., Shinoto M., Yamada S., <u>Inaniwa T.</u>: In silico study of simultaneous integrated boost carbon-ion radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. Anticancer Research 44 3821-28 (2024).
- <u>Inaniwa T.</u>, Kanematsu N., Koto M.: Biological dose optimization incorporating intratumoral cellular radiosesitivity heterogeneity in ion-beam therapy treatment planning. Physics in Medicine and Biology 69 115017 (2024).
- Inaniwa T., Kanematsu N., Nakajima M.: Modeling of the resensitization effect on carbon-ion radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer. Physics in Medicine and Biology 69 105015 (2024).

(Proceedings 等)

(学会及び研究会口頭発表等)

- ・<u>稲庭拓</u>:マルチイオン照射の研究開発,第4回日本量子医科学会学術大会,日本量子医科学会,2024-12-07.(招待講演)
- <u>稲庭拓</u>: Multi-Ion Therapy: A future direction of heavy-ion therapy, 2024Medical Particle Radiation Therapy joint Workshop, Korean Society of Medical Physics, 2024-02-23. (招待講演)
- ・<u>稲庭拓</u>: 粒子線 FLASH の実現に向けた技術開発の現状,第 52 回放射線による制 癌シンポジウム,日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会,2024-05-18.(招待 講演)
- T. Inaniwa : PT Translational Research and Future Directions (Physics), PTCOG62,

PTCOG, 2024-06-11. (Invited lecture)

- <u>T. Inaniwa</u> : Potential of LET optimization in proton therapy, Mayo Clinic, PTCOG62, PTCOG, 2024-06-13. (Invited lecture)
- <u>T. Inaniwa</u> : Japanese experiences toward upright CIRT A future direction of heavyion therapy, ESTRO Physics Workshop 2024, ESTRO, 2024-10-18. (Invited lecture)
- <u>T. Inaniwa</u> : Japanese experiences toward upright CIRT A future direction of heavyion therapy, ESTRO Physics Workshop 2024, ESTRO, 2024-10-18. (Invited lecture)
- <u>T. Inaniwa</u>: What is the future of carbon-ion radiotherapy?, the 55th Anniversary Symposium of Yonsei Cancer Center & 29th International Symposium of Yonsei Song-Dang Institute for Cancer Research, Yonsei University, 2024-11-08. (Invited lecture)
- <u>T. Inaniwa</u> : Quantum Scalpel Research Project at QST, MMND & ITRO 2025, University of Wollongong, 2025-02-18. (Invited lecture)

(その他)

(学位論文)

光子線抵抗性細胞株移植マウスモデルを用いた免疫チェックポイント阻害剤と重粒子併用時のア ブスコパル効果とその作用機序の検討

Investigation of the Abscopal Effect and Its Mechanism in a Photon-Beam-Resistant Tumor-Bearing Mouse Model Treated with Combined Heavy Ion Irradiation and Immune Checkpoint Inhibition (22J114)

> 高橋 豊^a、勝木翔平^a、奥内絢香^a、津田珠琳^a、皆巳和賢^a、 武島嗣英^b、村上智哉^c、小川和彦^c、小泉雅彦^a

Y. Takahashi^a, Katsuki^a, .A Okuuchi^a, Shuri Tsuda^a, K. Minami^a, T Murakami^b, T Takeshima^c, K. Ogawa^b, M. Koizumi^a

Abstract

Abscopal effects have attracted attention as a promising strategy to elicit systemic antitumor immune responses. We previously demonstrated that combining radiation therapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs), particularly anti-CTLA-4 antibodies (C4), can induce abscopal effects even in ICI-resistant osteosarcoma and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) mouse models.

In this study, we further investigated the underlying mechanisms of carbon ion (C-ion) irradiation combined with C4 in PDAC-bearing mice, with a particular focus on changes in the tumor immune microenvironment. Flow cytometric analysis revealed increased infiltration of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and an elevated CTL/Treg ratio in unirradiated tumors, maintained for up to 19 days after treatment with high-dose C-ion (8.2 Gy single fraction or 4.1 Gy \times 3 fractions) plus C4, regardless of fractionation. However, CTL infiltration was enhanced only in the fractionated C-ion group. RNA sequencing of unirradiated tumors from the 2.1 Gy x 3 + C4 group revealed differential expression of several gene sets compared with the 2.1 Gy \times 3 group, including upregulation of cytotoxicity-related genes, suggesting a correlation with the observed abscopal responses.

Moreover, preliminary results from colony formation assays using photon-resistant tumor cell lines indicate that carbon ions may also encounter resistance in these models, highlighting the need for additional therapeutic strategies. Further studies are ongoing to identify key gene signatures and immune modulatory mechanisms in both wild-type and resistant tumor models.

1. 研究の目的とバックグラウンド

私たちはこれまでに照射野外の腫瘍の縮退(ア ブスコパル効果)に着目し、放射線による遠隔転 移制御の可能性を検討してきた。特に、本来、過 剰な免疫応答を抑制する機能を担う分子である PD-L1 や CTLA-4 などの免疫チェックポイント分 子を阻害する免疫チェックポイント阻害剤(ICI) と放射線の併用により、アブスコパル効果が高率 に誘発されることが報告されている。私たちも ICI の効果が希薄である骨肉腫を両足皮下に移植し、 片方のみに光子線又は炭素線照射する実験系でア ブスコパル効果が誘導されること、腫瘍内免疫微 小環境が抗腫瘍性に変化していること、高線量放 射線照射では Type-I interferon が高度に誘導され、 自然免疫の活性化が惹起されていることを示唆す る知見を報告してきた (Takahashi Y, et al. *PLoS One*, 2017, Takahashi Y et al. *Oncotarget*, 2019, Takenaka W, Takahashi Y, et al. *Cancers*. 2020)。

最近はICI不応の膵管癌マウスモデルに注目し、高線量光子線照射により著明な局所、特に寡分割照射によりアブスコパル効果が得られ、細胞傷害性T細胞(CTL)除去により効果が減弱すること、放射線単独では腫瘍抑制性、促進性療法の免疫細胞が集積し、CTLA-4抗体(C4)を加えることにより、腫瘍抑制性の免疫CTLは維持され、腫瘍免疫を陽性する制御性T細胞(Treg)も減少し、腫瘍免疫に有利な微小環境への変化が生じていることを報告した

(Yamamoto J, Takahashi Y., et al. *Cancers*. 2022)_o

その後、私たちは同じ膵管癌マウスモデルで炭素 線を用いた検討を始めた。具体的には、コロニーア ッセイの結果から算出した光子線16 Gy 単回照射に 相当する 8.2 Gy の炭素線単回照射及び 8 Gy x 3 回の 光子線照射に相当する 4.1 Gy x 3 回の炭素線照射及 び C4 を併用した場合の局所及びアブスコパル効果 を解析した。その結果、X 線と同様に局所効果及び アブスコパル効果が得られることが明らかになった。 また、炭素線単独では CTL、Treg ともに集積が局所 及びアブスコパル腫瘍で増加するが、C4 を併用する ことにより、CTL は維持され、Treg を選択的に除去 することが明らかになった。また、興味深いことに、 コロニーアッセイで同等の生存率を与える線量にお いても、光子線より、炭素線のほうがより生存を延 長する可能性が示される結果が得られている(図 1)。



図 1. これまで得られている膵管癌皮下移植モデ ルにおけるマウスの生存解析。

そこで、全年度までに、炭素線では線量をさらに 下げた中線量でも C4 との併用で強い抗腫瘍効果が 得られるか検討した。その結果、2.1 Gy x 3 回の炭素 線照射と C4 の併用で依然と強い局所効果とアブス コパル効果が得られたのに、それと等価な単回照射 (5.1 Gy + C4)では有意な差は得られなかった。

そこで、本年度は、以下の3点の検討を行った。 ①これまで得られた高線量(8.2 Gy 単回又は4.1 Gy x 3回)及び中線量(5.1 Gy 単回又は2.1 Gy x 3 回)と C4 の併用における腫瘍内免疫微小環境のデータを さらに強固にするためのフローサイトメトリーによ る解析

②RNA シーケンスによるアブスコパル効果が得られた 2.1 Gy x 3 回+C4 の非照射腫瘍の網羅的遺伝子解析

さらに、現在私たちが現在行っている光子線抵抗 性を獲得した腫瘍細胞株 (Res) に対する腫瘍免疫応 答を炭素線で解析するための予備実験として、コロ ニーアッセイを行い、炭素線でも野生株 (WT) に 比べ Res で抵抗性を示すかを評価した。

2. 今年度の照射実験

前期は細胞実験を行い、WT と Res のコロニーア ッセイを行った。後期は3日連続の照射の機会をい ただき、膵管癌細胞(PanO2)を C57BL/6 マウスの 両足皮下に移植し、片足に照射するモデルを用いた 3日連続の高線量の単回(8.2 Gy 単回)及び寡分割 照射(4.1 Gy x 3 回)、並びに中線量の単回(5.1 Gy 単回)及び寡分割照射(2.1 Gy x 3 回)実験を行った。 C4 併用群は、これまでと同様に C4 を初回照射時に 最初の投与を行い、以降3日おきに合計3回投与し た。

いずれも 290 MeV 炭素線を用い、SOBP 中心にマ ウスの腫瘍前面を配置して照射した。

また、各線量分割群における照射腫瘍及び非照射 腫瘍の治療後早期(最終治療から5日後)及び後期 (最終治療から19日後)における腫瘍内免疫細胞分 布を解析した。また、RNAシーケンスにより照射後 早期の照射腫瘍、非照射腫瘍における各治療ごとの 網羅的遺伝子発現解析を行った。

3. 今年度の研究成果と解析結果

今年度の実験では、これまで行ってきた照射腫瘍 及び非照射腫瘍における腫瘍内免疫微小環境の解析 のサンプル数を増やし、より強固なデータを取得す ることを目的に実験を行い、以下のような知見を得 た(表1)。

(1) 高線量と C4 の併用では、治療 5 日後の非照 射腫瘍において単回照射、寡分割照射に関わらず、 C4 群に比べて CTL の上昇又は CTL/Treg の上昇が みられ、抗腫瘍性の免疫環境が誘導されていた。 また、治療 19 日後でも同様の腫瘍免疫環境の持続 がみられた。

(2)治療5日後の2.1 Gy x 3回+C4 群において、
 非照射腫瘍でC4 群に比べCTL及びCTL/Treg比の
 増加傾向がみられた。一方で、5.1 Gy+C4 では変化

がなかった。これらの結果は、観察されたアブスコ パル効果との相関を示唆していると考えられた。し かし、治療19日後ではC4群と比べて有意な変化は なかった。

(3) RNA シーケンスの結果、アブスコパル効果が 観察された 2.1 Gy x 3 回 + C4 群では、アブスコパル 効果が得られなかった 2.1 Gy x 3 回群では、様々な 遺伝子群に変化がみられた。その1つとして、細胞 傷害性に関与する遺伝子群の発現が増加していた。

今後、さらに RNA シーケンスの結果を解析し、 具体的にアブスコパル効果に関与する候補遺伝子を 探索するとともにそれらを阻害する実験を進める。 また、統計的有意差を得るための免疫微小環境の実 験を続ける予定である。

一方、これまで私たちが樹立した光子線抵抗性腫瘍に対し、炭素線照射のいても抵抗性であることを コロニーアッセイで確認し、同様に抵抗性を呈する ことを示す結果を得た(図2)。

表 1. これまでに得られている膵管癌マウスモデル における局所及びアブスコパル効果の解析結果並び に非照射腫瘍における免疫微小環境の解析概要

	治療群	局所 効果	アブス コパル 効果	非照射腫瘍内 免疫環境
炭素線	C4			基準
	4.1 Gy x 3 回 + C4	0	0	CTL: ↑↑ CTL/Treg: ↑
	8.2 Gy + C4	0	0	$\begin{array}{c} \text{CTL:} \rightarrow \\ \text{CTL/Treg:} \uparrow \uparrow \end{array}$
	2.1 Gy x 3 回 + C4	0	0	CTL: ↑ CTL/Treg: ↑
	5.1 Gy + C4	0	\bigtriangleup	$\begin{array}{c} \text{CTL:} \rightarrow \\ \text{CTL/Treg:} \rightarrow \end{array}$

略語; C4:抗 CTLA-4 抗体、CTL:細胞傷害性 T 細胞、 Treg: 制御性 T 細胞



図 2. 野生株(WT)及び光子線抵抗性(Res)骨肉 腫細胞の炭素線照射時の細胞生存曲線。

- ^a. 大阪大学大学院医学系研究科 生体物理工学講座
- ^b. 放医研 重粒子線治療研究部
- 。. 大阪大学大学院医学系研究科 放射線治療学教室

(学会及び研究会口頭又はポスター発表等)

1. Ayaka Okuuchi, Shohei Katsuki, Shuri Tsuda, Tomoya Murakami, Wataru Takenaka, Kazumasa Minami, Masahiko Koizumi, Kazuhiko Ogawa, Yutaka Takahashi, Fractionated medium-dose carbon ion beams with anti-CTLA-4 antibody induces the abscopal effect in murine pancreatic cancer model. Q-basis 2024, Nov. 13, 2024 (Osaka) (ポスター発表)

2. Tomoya Murakami, Shotaro Tatekawa, Shohei Katsuki, Ayaka Okuuchi, Wataru Takenaka, Shuri Tsuda, Kazumasa Minami, Keisuke Tamari, Masahiko Koizumi, Yutaka Takahashi, Kazuhiko Ogawa、Investigation of the mechanism of radiotherapy resistance in tumors by cellular senescence、Q-basis 2024. Q-basis 2024, Nov. 13,2024 (Osaka) (ポスター発表)

3. Shuri Tsuda, Shohei Katsuki, Shotaro Tatekawa, Keisuke Tamari, Kazumasa Minami, Wataru Takenaka, Ayaka Okuuchi, Tomoya Murakami, Kentaro Doi, Masahiko Koizumi, Yutaka Takahashi, Kazuhiko Ogawa、Elucidation of the mechanisms of radioresistance acquisition in TNBC that has acquired radioresistance. Q-basis 2024, Nov. 13, 2024 (Osaka) (ポスター発表)

4. Ayaka Okuuchi, Shohei Katsuki, Kazumasa Minami, Shuri Tsuda, Tomoya Murakami, Wataru Takenaka, Shotaro Tatekawa, Keisuke Tamari, Masahiko Koizumi, Kazuhiko Ogawa, Yutaka Takahashi, Abscopal Effect in Pancreatic Cancer: Combined Immune Checkpoint Inhibitor and Fractionated Carbon Ion Irradiation Therapy, Osaka Hamburg Symposium on Quantum Sciences 2025. Feb. 18, 2025 (Humberg) (Oral presentation)

5. 村上智哉,勝木翔平,立川章太郎,奥内絢香,武中渉,皆巳和賢,玉利慶介, 小泉雅彦,高橋豊,小川和彦、細胞老化による放射線治療抵抗性獲得機序の解 明、第37回日本放射線腫瘍学会、横浜、令和6年11月21日(口頭発表) 6. 津田朱琳,勝木翔平,立川章太郎,玉利慶介,皆巳和賢,武中渉,奥内絢香, 村上智哉,土井健太郎,小泉雅彦,高橋豊,小川和彦、放射線抵抗性を獲得し たトリプルネガティブ乳がんの放射線耐性機序の解明、第37回日本放射線腫瘍 学会、横浜、令和6年11月23日(口頭発表)

7. 村上智哉, 立川章太郎, 勝木翔平, 奥内絢香, 武中渉, 津田朱琳, 中山和駿, 皆巳和賢, 玉利慶介, 小泉雅彦, 高橋豊, 小川和彦、細胞老化による放射線抵 抗性獲得機序の解明、第2回がんプロ研究シンポジウム、大阪、令和7年2月1 日(ポスター発表) 8. 津田朱琳, 勝木翔平, 立川章太郎, 玉利慶介, 皆巳和賢, 武中渉, 奥内絢香, 村上智哉, 土井健太郎, 小泉雅彦, 高橋豊, 小川和彦、放射線抵抗性を獲得し たトリプルネガティブ乳がんの放射線耐性機序の解明、第2回がんプロ研究シ ンポジウム、大阪、令和7年2月1日(ロ頭発表)

9. 奥内絢香,勝木翔平,武中渉,皆巳和賢,玉利慶介,立川章太郎,小泉雅彦, 小川和彦,高橋豊、膵癌における複合的物理療法と免疫チェックポイント阻害 剤の併用による局所及びアブスコパル効果の検討、第2回がんプロ研究シンポ ジウム、大阪、令和7年2月1日(ポスター発表)

(その他:総説)

高橋豊,勝木翔平,奥内絢香,武中渉、放射線で免役を活性化し、がんの遠隔転移の制御を目指す研究、生産と技術 76(4),71-76,2024

(学位論文)

津田朱琳. 放射線抵抗性を獲得したトリプルネガティブ乳がんの放射線耐性機 序の解明. 修士論文, 大阪大学大学院医学系研究科, 2025

LET 粒子線による放射線抵抗性脳腫瘍の治療を目指した基礎研究

High-LET Radiation for Radioresistant Glioma Therapy: A Basic Research Investigation (24J147)

下川卓志^{1,4}、鈴木沙彩¹、佐野太陽¹住吉晃²、森岡孝満³、謝琳⁴、飯山恵²、 T. Shimokawa¹, S. Suzuki¹, T. Sano¹, A. Sumiyoshi², T. Morioka³, L. Xie⁴, M. Iiyama²

Abstract

Currently, irradiation methods are rapidly developing due to advances in the technology. To provide safe treatments, it is essential to acquire biological data corresponding to the new irradiation methods. Particularly, biological verification of the high-LET region near or above 100 keV/µm, which will be actively used in the future by LET painting irradiation, is an urgent task.

In this study of biological basic research for the Quantum scalpel including LET painting irradiation, we will 1) verify the molecular mechanisms of antitumor effects by high LET (> $80keV/\mu m$) irradiation and 2) investigate the treatment of refractory cancer by high LET (> $80keV/\mu m$) irradiation. This year, we compared dose and quality effects between 2D and 3D cultures of radioresistant glioma cells. In addition, we have observed the long-term effects of irradiation on the normal brain.

1. 研究の目的とバックグラウンド

QSTが目指す「がん死ゼロ」のためには、次世代 に向けた「量子がん治療」技術の開発と実現が急務

となっており、機器の開発を含め多様なアプローチ が現在進められている。その中で、治療成績の向上 に向けた改良計画の一つとして、局所制御率のさら なる向上と正常組織障害の低減を目的とした、マル チイオン照射などによるlinear energy transfer (LET)分布の改善が検討されている。現在の治療に おいては照射標的内の線量分布を軸に計算されてい るが、量研機構稲庭らを中心にIMPACT (Intensity Modulated composite PArtiCle Therapy, LET分布 を考慮した照射方法)が研究されており、すでに臨床 試験も始まっている。このIMPACTでは、腫瘍内の LETが50keV/umから100keV/µmに上昇すると計算 されおり、今以上の治療効果が期待できる。しかし、 従来の治療および生物実験でのマウスモデルでの照 射で用いられているSOBP中心のLETは50keV/µm 程度であり、in vitroの実験でも70-80keV/μmが主 流である。そのLETではRBEはまだ最高値ではなく、 OERも下がっていない。一方で、IMPACTでのLET 100keV/um照射ではRBEはほぼピーク値となり、 OERも2程度まで下がるため、これまでと同じ生物 応答とはならない可能性が考えられる。LET分布を 向上させた条件における生物学的効果(抗腫瘍効果、 正常組織への影響)や、LETの高低による生体内で

の抗腫瘍免疫応答の差異に関する研究は、生物照射 室の技術的な制限や、実臨床では対象とされない高 いLETであったことから、非常に限定的である。加 えて、over kill effectが認められる200keV/um以上 ではラジカルの発生様式も変わることが報告されて おり、そのような物理・化学的な反応の変化は生物 応答へも影響すると予想される。今後、より効果的 な治療が見込まれるこの領域のLETでの照射が増え ることが予想されることから、効果的かつ安全に臨 床応用するために、この高LET粒子線特有の生物応 答とその利用法を明らかにしていくことは喫緊の課 題である。

本研究では、LET paintingの実用化に関する生 物基盤研究として、1)高LET(>80keV/µm)照射によ る 抗 腫 瘍 効 果 の 分 子 機 構 の 検 証 、 2) 高 LET(>80keV/µm)照射による難治がん治療につい て検討を行う。特にグリオーマ特有の放射線に対す る高い抵抗性のメカニズム解明および正常脳への高 LET粒子線の影響について解析を進める。

2. 昨年度までに得られている結果

脳腫瘍モデルとして使用するがん細胞株U87MG, 9L,GS9L,CT2AについてLETと放射線感受性の検討 を行い、これらのがん細胞が低LET放射線に対して 非常に放射線抵抗性であることを示した。さらに3D モデルではさらに抵抗性になること、同一がん細胞 の下肢移植モデルと同所(脳)移植モデルで比較し た場合では同所移植において顕著に抵抗性になるこ とを確認した。またin vivo評価技術として、腫瘍内 細動脈・細静脈の透過性を50ミクロン以下の空間分 解能で評価する技術を開発し報告している(Sci Rep. 2018 Jan 23;8(1):1458., Nanomedicine. 2018 Jun;14(4):1315-1324.)。加えて、MRI解析で生着し た腫瘍の消失を9LおよびCT-2Aで確認した。また照 射後1ヶ月の段階で正常脳にMRI解析でも、行動でも 異常が認められないことを確認した。

3.照射対象物の種類と数、照射ビームの種類

前期 1 回(Fe 500MeV/u 1 回)、後期 2 回(Fe 500MeV/u, C 290MeV/u 各 1 回)の照射時間を配 分された。脳腫瘍由来の培養細胞に対しては LET を 変えて照射を行った。さらに、同所移植脳腫瘍に対 しては、移植部位を含む 4x4mm の領域に照射を行 った。

4. 今年度の解析結果のまとめ

結果1: in vitro 照射による評価

昨年に引き続き、Glioma 細胞株 U87MG(ヒト由
来), 9L, GS-9L(ラット由来)、CT-2A(マウス由来)を
2D 培養または 3D(spheroid)培養し、X 線または重
粒子線を線量と線質(LET)を変えて照射し、増殖抑
制を指標とした影響を評価した。測定した全ての細
胞は 2D 培養においては線量ならびに線質依存的に
増殖が抑制された。一方で、3D(spheroid)培養した
Glioma はX線での増殖抑制はほとんど認められず、
また 2D に比べ弱い線質効果しか認められなかった。

結果2:がん細胞同所移植モデルによる評価

寛解マウスの長期観察において、異常行動や死亡例 が認められなかったため、C57BL/6J マウスの正常 脳に Fe 50Gy 照射し、長期影響について検討を行っ た。昨年 Ar50Gy 照射したマウスは半年で異常行動 を起こし死亡したが、Fe 照射マウスは一過性の体重 減少などが認められたが、その後体重は回復し、行 動異常などは認められなかった。 あった 9L 細胞の遺伝子発現を 2D, 3D, *in vivo* 環境 下で Fe 5Gy 照射前後で比較した。環境による遺伝 子発現の変化は、照射による発現変動より大きいこ とが示された。現在、DNA 損傷応答遺伝子群を中心 に詳細な解析を進めている。

結果3:培養環境間の比較

グリオーマ細胞の高 LET 粒子線に対する応答が 培養環境により大きく異なることがこの課題の研究 により示唆されている。そこで最も放射線抵抗性で

- 1. 量研機構・量医研・物理工学部
- 2. 量研機構・量医研・分子イメージング診断治療 研究部
- 3. 量研機構・放医研・放射線影響研究部
- 4. 量研機構・量医研・先進核医学基盤研究部

24J147 研究成果一覧

<u>論文:</u>

なし

招待発表:

- 1. 下川 卓志. **重粒子線の医学利用と それを支える基盤研究.** 第11回(令和6年度)東邦大学 理学部ホームカミングデー,東邦大学理学部,2024年11月
- 2. Shimokawa Takashi. Basic research activities in collaboration at HIMAC-QST. HADRONTHERAPY FOR LIFE, Caen 大学, 2025 年 03 月

学会及び研究会発表:

- Shimokawa Takashi, Suzuki Saaya, Sumiyoshi Akira, Morioka Takamitsu, Aoki Ichio, Masuda Takamitsu, Kasamatsu Koki, Inaniwa Taku. Effects of High-LET Radiotherapy on Orthotopic Glioma Mouse Model. 62nd Annual PTCOG conference, Particle Therapy Co-Operative Group, 2024年06月
- 下川卓志,鈴木沙彩,住吉晃,森岡孝満,飯山恵,小川真里,岡部まゆみ,佐野太陽,小林亜利 紗,謝琳,青木伊知男.環境依存的に高い放射線抵抗性を示すグリオーマへの高LET 重粒子線治療 の検討.第4回 日本量子医科学会 学術大会,日本量子医科学会,2024-12-06
- 3. 鈴木沙彩, 笠松幸生, 増田孝充, 住吉晃, 森岡孝満, 中島菜花子, 飯山恵, 謝琳, 青木伊知男, 下 川卓志. Glioma 細胞株に対する治療効果へのLET と培養環境の影響. 第 61 回日本放射線腫瘍学 会生物部会学術大会, 日本放射線腫瘍学会生物部会, 2024 年 05 月

三次元培養した伴侶動物がん細胞の放射線感受性解析 Radiation Sensitivity Analysis of 3D Cultured Cancer Cells from Companion Animals (24J148)

舟山知夫^a、鈴木芳代^a、平山亮一^b T. Funayama^a, M. Suzuki^a, R. Hirayama^b

Abstract

We have previously performed experiments to measure the radiation sensitivity of cultured canine cancer cells using carbon beams of HIMAC. However, there are significant differences in the microenvironment conditions in which the cells are placed between actual cancer tissue and two-dimensional culture using a culture flask. Therefore, it is necessary to evaluate the sensitivity of heavy ion radiation under culture conditions that more closely resemble in vivo conditions for clinical application. For this reason, we initiated a study to evaluate the sensitivity of cells grown in three dimensions to heavy ion radiation. In the experiment, canine fibrosarcoma cells were embedded in alginate gels and cultured as a sample whose culture conditions were closer to in vivo conditions. The samples were irradiated with carbon beams and the effects of irradiation were measured by colony formation assay. We will continue to conduct experiments to measure the sensitivity of three-dimensional cultured samples using other canine cancer cell lines.

1. 研究の目的とバックグラウンド

伴侶動物のがん放射線治療は、比較的規 模の大きな動物病院を中心に、直線加速器 (リニアック)のX線による高精度定位放 射線治療(SRT、IMRT など)や常用電圧 X 線(オルソボルテージ)装置で行われてい る。一方で、伴侶動物では、人と異なり早期 発見を目的とした検査の普及が不充分なた め、早期に発見し治療すれば完治させられ るがんでも、手遅れになってから見つかる 例も多い。放射線治療がそのような外科治 療や化学療法での対処が既に不可能な症例 に対して、疼痛緩和を主目的とする姑息的 治療として適用されることもあり、伴侶動 物では放射線治療ではがん根治が望めない ものと誤解されることが少なからずある。

HIMAC が世界で初めて実現した重粒子

線がん治療は、人のがん治療において有効 な治療法として普及する一方で、その伴侶 動物がんへの臨床応用は世界的にも未だ例 がない。さらには、伴侶動物の培養細胞を 用いた放射線感受性解析研究も、現状では 極めて限定的である。

私たちは、かつてイヌ由来の線維肉腫細 胞株を QST 高崎研・TIARA の炭素イオン ビームで照射し、その放射線感受性を調べ る研究を実施した [1]。しかし、TIARA が 提供できる炭素イオンビームのエネルギー 範囲が限られていたため、臨床で用いられ る高エネルギー領域を含む広いエネルギー 範囲での線質依存性を明らかにするには至 らなかった。そこで、高いエネルギーで臨 床に適用できる HIMAC の炭素線を用いて 放射線感受性を測定する実験を行い、培養 細胞レベルにおけるイヌがん細胞の放射線 感受性を定量的に明らかにする研究を 2021 年から行ってきた(論文執筆準備中)。

この研究では、犬に比較的多く観られる がんのうち、既に培養細胞株が樹立されて いる、線維肉腫、肝がん、肺がんの細胞に HIMACの重粒子線を照射し、その生存率を コロニー形成法で測定することで評価した。 しかし、実際のがん組織と、培養フラスコ を用いた二次元培養では、細胞の置かれた 微小環境の条件に大きな違いがあるため、 臨床適用に向けてより in vivo に近い培養条 件での重粒子線感受性の評価が必要となる。 そこで、三次元培養した細胞を対象に重粒 子線感受性を評価する研究を 2024 年度か ら開始した。

2. 昨年度までに得られている結果

2021~2023 年度の3 年間で、3 種類のイ ヌ培養がん細胞株の二次元培養試料を用い た炭素線感受性の評価実験を行い、SOBP ビ ームを含めた炭素線照射効果の定量的なデ ータを取得することに成功した。その結果、 炭素線感受性を評価したイヌ細胞の10%生 存線量で、肺がん細胞と肝がん細胞が線維 肉腫細胞よりも高い値を示したことから、 肺がん細胞と肝がん細胞が線維肉腫細胞よ り高い放射線抵抗性を示すことが明らかに なった。一方で、ガンマ線を基準放射線と した SOBP ビームにおける RBE の値は、い ずれの細胞でも約2からそれ以上の値を示 した。同様の実験で評価されたヒトの培養 がん細胞に対する殺細胞効果を評価した研 究[2]では、RBE の値が約2より低い値を 示しており、これらの3種類の細胞株では、 炭素線照射が、ヒトがん細胞よりも、効果 的に細胞致死に働く可能性を示唆した。

3. 今年度の研究内容

2024 年度は、より in vivo に近い培養条件 として、イヌ線維肉腫細胞 cFS をアルギン 酸ゲルに包埋することで三次元培養した試 料に炭素線モノビーム(290 MeV/u)及び SOBP 中心条件ビームを照射し、その照射効 果をコロニー形成法で測定した。

実験では、対数増殖期の cFS 細胞をトリ プシン処理後、1×10⁷/mL の濃度で 2%アル ギン酸/PBS 溶液に懸濁した。この懸濁液を ~10 µL のドロップとして塩化カルシウム溶 液に滴下することでゲル化し、細胞をアル ギン酸ゲル中に包埋した。包埋した細胞は 10%血清含有 MEM 培地で7日間培養し、 照射実験に供した。照射は、アルギン酸包 埋培養試料をマイクロチューブに入れ、 HIMAC 生物照射ビームラインで炭素線

(290 MeV/u MONO ビーム、および、6cm-SOBP 中央位置)を照射した。照射後、アル ギン酸ゲルをクエン酸含有 PBS 溶液で処理 すること融解し、懸濁液として回収した細 胞を希釈/播種してコロニー形成を行った。 14 日間培養して形成したコロニーを、固定 してクリスタルバイオレットで染色するこ とで計数し、炭素線に対する三次元培養し た cFS 細胞の生存率を得た。

4. 今年度の研究成果と解析結果

得られた生存率の値から LQ 近似曲線を 算出し、それを基に線種ごとの 10%生存線 量値(D₁₀)、及び、D₁₀における生物学的効 果比(RBE)を求めた。RBEの算出では、 QST・高崎研・⁶⁰Coガンマ線照射施設の⁶⁰Co ガンマ線を基準放射線とし、当該施設での 実験で取得したアルギン酸包埋培養した cFS 細胞の生存曲線より算出した D₁₀ 値を 用いた。2021 年度の研究で取得した二次元 培養細胞との比較を表 1 及び表 2 に示す。

表 1. アルギン酸包埋培養した cFS 細胞の D10 値

線種	二次元培養	アルギン酸包埋培養				
⁶⁰ Co gamma-rays	5.81 Gy	6.38 Gy				
C Mono 14 keV/µm	4.30 Gy	5.83 Gy				
C SOBP Center	2.91 Gy	3.95 Gy				

表 2. アルギ	ン酸包埋培養	した cFS	細胞の RBE	
----------	--------	--------	---------	--

線種	二次元培養	アルギン酸包埋培養
⁶⁰ Co gamma-rays	1.00	1.00
C Mono 14 keV/µm	1.35	1.09
C SOBP Center	2.00	1.62

アルギン酸包埋培養した cFS 細胞の D₁₀ の値はいずれの線種でも高くなった。この 結果は、包埋培養が細胞周期及び細胞環境 における酸素分圧に影響する可能性を示し ている。また、RBE 値は二次元培養細胞と 比較して低い値を示した。

2024 年度の実験では、三次元培養したイ ヌ線維肉腫細胞の HIMAC 炭素線に対する 放射線感受性を定量できた。次年度の実験 では、イヌの他のがん細胞株を用いた三次 元培養試料の感受性測定実験を行い、伴侶 動物への重粒子線がん治療実現に繋がる基 盤的データを取得していく。

参考文献

[1] S. Wada, T. V. Khoa, Y. Kobayashi, T. Funayama, K. Ogihara, S. Ueno and N. Ito, Prediction of cellular radiosensitivity from DNA damage induced by γ -rays and carbon ion irradiation in canine tumor cells, *J. Vet. Med. Sci.*, **2005**, *67*, 1091-1097

[2] Kanai, T., Endo, M., Minohara, S., Miyahara, N., Koyama-ito, H., Tomura, H., Matsufuji, N., Futami, Y., Fukumura, A., Hiraoka, T., Furusawa, Y., Ando, K., Suzuki, M., Soga, F. & Kawachi, K., Biophysical characteristics of HIMAC clinical irradiation system for heavy-ion radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1999**, *44*, 201-210.

a. QST 高崎研 量子バイオ基盤研究部

b. QST QST 病院 重粒子線治療研究部

研究成果一覧 24J148 舟山知夫

なし

難治性癌に対する重粒子線照射と薬剤併用による基礎研究(23J152)

Basic research on heavy ion beam irradiation and drug combination for refractory cancer

Sei Sai^{1*}, Hyun-Cheol Kang, Yu-Mei Kang, Eun-Ho Kim², Masao Suzuki

研究目的とバックグラウンド

重粒子線治療効果のさらなる向上や適応拡 大を実現するために、新たな薬剤併用療法 の橋渡し研究がとても重要である。微小管 の働きを阻害して細胞分裂を停止させるこ とで癌細胞を死滅させる抗癌剤 Paclitaxel は進行肺癌や膵癌に有効とされているが、 重粒子線との併用効果は不明である。また、 膵癌、肺癌などにおいては KRAS 変異が高い 頻度で観察され、特に膵癌では、90%以上の 患者で KRAS 変異が確認されており、その進 行と治療抵抗性に関わっているが、近年、 KRAS 変異を標的とした分子標的薬が開発さ れ、治療の選択肢が増えている。重粒子線 治療効果をもっと精密に上げるため、遺伝 子変異の有無も考慮した、その変異型に特 異的に有効な分子標的薬との併用治療の研 究開発が強く望まれる。本研究では、各種 KRAS 変異癌細胞株を用いて、炭素線、X線 照射単独或いは抗癌剤((Paclitaxel, Nab-Paclitaxel等) や新規分子標的薬

(Sotorasib) との併用処置を行い、細胞実 験では、apoptosis や autophagy 等の細胞 死誘導、DNA 損傷修復能、癌細胞浸潤能、 転移能への影響について分子生物学的手法 を用いて解析し、また動物実験では免疫欠 損 SCID マウスを用いた移植腫瘍モデルに て、腫瘍増殖抑制、さらに分子病理学的変 化について検討し、より有効に癌細胞を殺 傷する分子メカニズムを解明することを目 的とする。

今年度の研究内容

炭素線照射と抗癌剤 Paclitaxel や KRAS 変 異分子標的薬との併用による難治性肺癌、 膵癌細胞への細胞死誘発メカニズムとして、 apoptosis, autophagy や angiogenesis 関 連遺伝子発現レベルを調べた。

今年度の研究成果と解析結果

1) 難治性膵癌細胞 PANC1, MiaPaCa2 に対 して、炭素線照射単独或いは抗癌剤 Paclitaxel との併用処置後、細胞死誘発分 子メカニズムとして、apoptosis 関連蛋白 cleaved-caspase 3, cleaved-PARP R angiogenesis 関連遺伝子 HIF1a や VEGF 発 現レベルを western blotting 法及び real-time PCR 法を用いて検討した。その 結果、PANC1 細胞では炭素線照射単独によ る cleaved-caspase 3, cleaved-PARP 発現 誘導は認められないが、PTX や Nab-PTX と の併用により誘導が認められた。一方 MiaPaCa2 細胞では、炭素線照射単独による cleaved-caspase 3, cleaved-PARP 発現誘 導は認められたが、PTX や Nab-PTX との併 用による増強は見られなかった(Fig.1)。



KRAS 変異難治性肺癌細胞 A549(KRAS G12S mutant), LU65(KRAS G12C mutant に対して、蛋白レベルで炭素線照射とKRAS G12C 変異細胞を特異的に攻撃できる Sotorasib(SOTO)との併用処置後、western blotting アッセイを行った結果、LU65 細胞において、炭素線照射単独に比べ cleaved-PARP 発現誘導が、Sotorasib との併用で さらに増強させた。一方、A549 細胞(KRAS G12S 変異)は炭素線照射と Sotorasib との併用後の顕著な増加作用は認められなかった (Fig. 4)。 今後、細胞増殖シグナル経路の変化やDNA 損傷修復



angiogenesis 関連遺伝子発現変化について、 real-time PCR 解析を行った結果、炭素線と PTX の併用処理により、PANC1 細胞における HIF1a の発現変化が見られないものの、VEGF 発現を有 意に減少させた (Fig.2 #, p<0.05 compared to Control)。そして、cell transwell invasion ア ッセイ法で浸潤能を検討したところ、炭素線と PTX/Nab-PTX の併用処理により、PANC1 細胞にお ける浸潤能が顕著に抑制された (Fig.3)。



への影響も調べる予定である。

まとめ

PTX/Nab-PTX と組み合わせた炭素線照射は apoptosis 誘導を伴う膵癌細胞死を効果的に増強 し、浸潤能を低下させた。炭素線照射と sotorasib の併用はKRAS G12C 変異肺癌細胞 apoptosis を有 意に誘発した。

 1, 量研・重粒子 2, Seoul Nat Univ., Korea
 3, Taipei Veterans General Hospital 4, Daegu Catholic University, Korea [口頭発表]

- 1. 佐井 星, 康 賢哲, Kim Eun Ho, 鈴木 雅雄, 石川 仁, 山田 滋 炭素線照射とPaclitaxel/Nab-Paclitaxel との併用による膵癌細胞に対する殺傷効果 第61回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会, 群馬大学重粒子センター, 2024-05-17
- Sai Sei, Yumei Kang, Hyuncheol Kang, Suzuki Masao, Yamada Shigeru, Ishikawa Hitoshi Superior effects of multi-ion beam irradiation in combination with KRAS inhibitors on KRAS mutant lung cancer cells
 第 83 回日本癌学会学術総会,九州大学医学部 第一内科, 2024-09-19

[ポスター発表]

- 鈴木 雅雄, 舟山 知夫, 鈴木 芳代, 佐井 星
 P53-independent bystander cellular effects through secreted factor(s) between carbon-ion irradiated tumor and non-irradiated normal cells
 日本放射線影響学会第 67 回大会, 一般社団法人日本放射線影響学会, 2024-09-25
- 鈴木 雅雄, 舟山 知夫, 鈴木 芳代, 佐井 星 Bystander effects via cell-to-cell communication between carbon-ion irradiated tumor and unirradiated normal cells 第83回日本癌学会学術総会, 一般社団法人日本癌学会, 2024-09-21
- 3. 鈴木 雅雄, 舟山 知夫, 鈴木 芳代, 佐井 星 炭素イオン照射がん細胞と非照射正常細胞間のギャップジャンクションを介した細胞間情 報伝達による P53 非依存的バイスタンダー効果誘導
 第 61 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会,公益財団法人日本放射線腫瘍学会, 2024-05-17

三次元培養による重粒子線評価システムの検討

Investigation of heavy particle radiation evaluation system using three-dimensional culture (23J153)

佐藤香枝^a、井川和代^b、桐林乃々香^a、下川卓志^c、濱野毅^c K. Sato^a , K. Igawa^b ,N. Kiribayashi^a, T. Shimokawa^c and T. Hamano^c

Abstract

We developed a gelatin device with cell culture wells in the center and medium supply wells on both sides. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in the gelatin device, and a three-layer oral cancer model was fabricated by layering a collagen-fibrin gel containing human dermal fibroblasts (NHDF) and HUVEC, followed by layering human oral squamous cell carcinoma cells (HSC4). Last year, the biological effects of heavy ion irradiation on this 3D oral cancer model were evaluated histomorphologically several days after irradiation. In this year, we evaluated the early biological effects of heavy ion irradiation on the 3D oral cancer model using DNA damage. The number of yH2AX foci in the nucleus, a marker of DNA damage, increased with increasing dose in all three cell types 1 hour after heavy ion irradiation. In addition, it was shown that HSC4 cells in the 3D co-culture model had less DNA damage than in the case of monolayer culture. In the future, we will evaluate the changes in the culture supernatant of heavy ion irradiation in the 3D oral cancer culture model.

1. 研究の目的とバックグラウンド

ヒト臨床においてヒトでの生物試験が理 想であるが倫理的な問題がある。現状、非 臨床試験として実験動物や培養細胞を用い た実験が一般的であるが、第3相臨床試験 の段階で開発に失敗することも多い。そこ で、実験動物における動物愛護の問題、単 一種の培養細胞における体内環境の再現が 困難といった問題を解決するために、ヒト の生理学的環境を再現した三次元ヒト細胞 培養モデルを開発してきた。非臨床試験に おいて、高い臨床予測性を実現するために 体内環境を模倣した血管網、正常細胞、口 腔がん細胞の共培養による口腔がん三次元 モデルに対する重粒子線照射による評価シ ステムを構築することを目的とする。

2. 昨年度までに得られている結果

口腔がん三次元培養モデルに対する HIMAC の生物学的影響評価として以下を 検討した。

- ゼラチンデバイスの作製:ゼラチンデバ イスの中央に細胞培養用ウェル、両サイ ドに培地供給用ウェルを配置したゼラ チンデバイスを作製した。
- ② 口腔がん三次元培養モデルの作製:ゼラ チンデバイスにヒト臍帯静脈血管内皮 細胞(HUVEC)を導入して接着させ、そ の上にヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)と HUVECを含むコラーゲンとフィブリン の混合ゲルを積層させ、さらにヒトロ腔 扁平上皮がん細胞(HSC3またはHSC4) を積層させ3層構造の口腔がん三次元 モデルを作製した。
- ③ 口腔がん三次元モデルに対する重粒子 線照射:三次元培養モデルに対して、重 粒子線(加速粒子:C、ビームコース: Bio)を低線量(5 Gy)、中線量(10 Gy)、 高線量(30 Gy)を照射した(各線量 N=13)。
- ④ 口腔がん三次元培養モデルに対する重 粒子線の評価:病理組織学的評価のため 3、7日目にモデルを4%パラホルムアル デヒド溶液で固定し、HE 染色、SOX9の 免疫染色によって病理組織学的に観察 し、共焦点蛍光顕微鏡により評価した。

3. 今年度の研究内容

昨年度から引き続き口腔がん三次元培養モ デルに対する HIMAC の生物学的影響評価 を行った。

 ⑤ 口腔がん三次元モデルに対する重粒子 線照射:三次元培養モデルに対して、重 粒子線(加速粒子:C、ビームコース: Bio)を低線量(5 Gy)、中線量(10 Gy)、 高線量(30 Gy)を照射した(各線量 N=13)。照射時間は、2024年7月、9月 にそれぞれ1時間、合計2時間であった。 ⑥ 口腔がん三次元培養モデルに対する重 粒子線の評価:照射1時間後に、DNA損 傷の評価としてリン酸化γH2AXの免疫 染色し、共焦点蛍光顕微鏡により評価した(図1)。

4. 今年度の研究成果と解析結果

HUVEC・NHDF・HSC4の三次元培養した モデルを構築し、2024年9月に照射条件は 0 Gv、5 Gv、10 Gy、30 Gy の線量で重粒子 照射実験を実施し、昨年度実施できなかっ た DNA 損傷について評価した。図2のグ ラフは、横軸は照射量、縦軸は一細胞あた りの DNA 損傷のマーカーである核内の γ H2AX の顆粒数を示す。重粒子線照射1時 間後おいて、0 Gy では γ H2AX の顆粒が見 られなかったが、線量の増加に伴って顆粒 数が増加した。また、三次元共培養モデル 内の HSC4 においては、単層培養の場合よ りも DNA 損傷が少ないことが示された。さ らに、三次元共培養モデル内の HUVEC お よび NHDF においても、単層培養の HSC4 と比較して DNA 損傷が少ないことが示さ れた (図3)。

5. 今後の方針

当初の計画であった培養上清の ELISA について実施しなかった。今後の検討としたい。また、DNA 損傷の評価については、X線の結果との比較も行いたい。



yH2A foci Nuclei

図1 HSC4における重粒子線照射1時間後 の y H2AX 免疫染色による評価 (30 Gy)



図 2 HSC4 における重粒子線照射 1 時間後 の DNA 損傷の評価(縦軸は核内の γ H2AX の顆粒数)



図 3 三次元共培養モデル内 HUVEC および NHDF における重粒子線照射 1 時間後の DNA 損傷の評価

- a. 日本女子大学
- b. 岡山大学 中性子医療研究センター
- C. 量子医科学研究所

今年度の研究成果

佐藤香枝

マイクロ細胞培養デバイスを用いた血管モデルの構築

第51回日本毒性学会学術年会 次世代研究セミナー、福岡国際会議場 2024年7月4日(招待講演)

プロテアソーム阻害剤の炭素線増感効果

Analysis of the Carbon ion irradiation sensitizing Effect of Proteasome Inhibitors (23J154)

中島 菜花子 °、馬 立秋 ^b、鈴木 紗彩 ^b、長谷川 純崇 ^e、下川 卓志 ^b NI. NAKAJIMA, L. Ma, S. SUZUKI, T. HASEGAWA, T. SHIMOKAWA,

1. Abstract

This study investigated the sensitizing effect of bortezomib, a proteasome inhibitor, on carbon-ion irradiation. We found that bortezomib inhibited DNA damage repair, decreased cell repopulation rates after carbon-ion irradiation in human osteosarcoma U2OS cells, and enhanced the carbon-ion irradiation sensitivity of U2OS cells. In vivo experiments using C3H/He mice transplanted with LM8 cells demonstrated significant tumor growth suppression with combined bortezomib and carbon-ion irradiation treatment. The study also observed a trend towards reduced lung metastasis in the combination-treated group. These findings suggest that combining carbon beam therapy with proteasome inhibitors may enhance therapeutic efficacy in osteosarcoma treatment.

2. 研究の目的とバックグラウンド

細胞増殖を休止している休止期がん細胞は、放射線 照射後は細胞分裂期の細胞死を回避し、ゆっくりし た DNA 修復が可能であるため放射線抵抗性であり、 がん再発の一因となっている。我々はこれまでに、 血清飢餓によって休止期にした肺がん細胞を用いて、 高 LET 炭素線とX線に対する生物応答を解析して きた。休止期がん細胞を放射線照射直後にコロニー 形成法にて再培養した細胞(Immediately plating)で は、増殖期の細胞と比較して放射線抵抗性に変化は なかった。照射後96時間血清飢餓条件下で培養し、 DNA 損傷シグナルが観察されなくなった後に再培 養した休止期がん細胞(Delayed plating)は、X線・ 炭素線共に増殖期の細胞と比較して放射線抵抗性を 示したものの、炭素線は休止期のがん細胞に対して も 2~3倍の高い生物効果があった。また、炭素線

照射による DNA 損傷は、ATM とユビキチンリガー ゼ RNF8 依存性の経路で修復され、ATM 阻害剤お よび RNF8 発現阻害(siRNF8)は、炭素線照射におい て高い増感効果が認められた(NI Nakajima et al., DNA Repair 2020)。ユビキチンリガーゼ RNF8 は、 DNA 損傷領域のヒストンタンパクをユビキチン化 し、DNA 修復因子 53BP1 を DNA 損傷部位にリク ルートする分子機能を持つ。このユビキチンリガー ゼ RNF8の機能を阻害する低分子化合物としてプロ テアソーム阻害剤が報告されている。プロテアソー ム阻害剤は、プロテアソームによるユビキチン化タ ンパクの分解を阻害することで細胞内のユビキチン を枯渇させ、53BP1のDNA損傷部位への集積が阻 害される。炭素線による DNA 損傷の修復において も 53BP1 依存性に修復される。DNA 修復経路レポ ーターアッセイを用いて Bortezomibの細胞の DNA 修復への影響を解析すると、Bortezomib 処理により、 細胞の NHEI 効率が有意に低下した。これらのこと からプロテアソーム阻害剤 Bortezomib の炭素線増 感効果が期待されるため、細胞実験と動物実験によ り検証した。

2. 昨年度までに得られている結果

マウス由来骨肉腫細胞 LM8 に対する Bortezomib の炭素線増感効果を細胞実験および動物実験によっ て確認した。

<u>照射対象物の種類と数、照射ビームの種類</u> 細胞照射

ヒト由来骨肉腫細胞 U2OS を 24 時間プロテオソ ーム阻害剤 Borteozomib と共に培養し、LET13~ 70 kev/μmの炭素線(290 Mev/n)を 0.5Gy~4 Gy 照射し、細胞周期、初期細胞死、免疫蛍光染色によ る DNA 損傷マーカー検出、MTT アッセイおよび コロニー形成法による生存率を解析した。

動物照射

マウス由来骨肉腫細胞 LM8 を C3H/He マウス の片後肢皮下に移植した。移植 5 日後、照射 24 時 間前と 30 分前に Borteozomib を腹腔内投与し、腫 瘍部に 1, 2, 5Gy の炭素線(290 Mev/n, SOBP 中心) を照射した。照射後は 2 日毎に腫瘍径を計測し、 Bortezomib と炭素線の腫瘍増殖抑制効果を評価し た。また照射 3 週間後にマウスを安楽死させ、肺へ の腫瘍転移を計測した。

今年度の研究成果と解析結果

70 kev/µm 2 Gy の炭素線を照射した U2OS を照射 8時間、24時間後に固定し PI 染色によって細胞周 期を解析した。Bortezomib 処理による細胞周期の変 化は認められなかった。AnnexinV 検出による初期 細胞死解析では、0.5Gy 炭素線照射による照射 12 時 間後のアポトーシスが Bortezomib 処理によって有 意に増加した。DNA 二重鎖切断領域 (γ H2AX focus) への 53BP1 集積を免疫蛍光染色法によって観察す ると、2 Gy 炭素線照射で誘導される γ H2AX focus への 53BP1 focus の両局在率が Bortezomib 処理 によって有意に減少した。γH2AX focus は照射後の 時間経過によって DNA 修復され消失するが、 Bortezomib 処理下では残存した γ H2AX focus 数 が有意に高くなった。すなわち、炭素線による DNA 損傷の修復が、Bortezomib によって阻害された。ス フェロイド状の U2OS に炭素線を照射し、再培養後 に MTT アッセイにより再増殖率を測定すると、13, 30, 70 kev/um いずれの LET においても、 Bortezomib によって再増殖率が低下した。コロニー 形成法による炭素線照射後の生存率測定によっても、 Bortezomib による炭素線増感効果が認められた。

C3H/He マウスにマウス由来骨肉腫細胞 LM8 を 皮下移植した担癌モデルマウス実験において、1Gy の炭素線照射と Bortezomib 併用マウスにおいて、 Bortezomib 非投与群と比較して腫瘍増殖が有意に 抑制された。照射3週間後、マウス体重および生存 率に差は認められなかった。一方で、LM8の肺への 転移が併用処置群では低下する傾向があった。

これらの細胞実験および動物実験の結果から

Bortezomib の骨肉腫に対する炭素線増感効果が確認された。炭素線とプロテアソーム阻害剤併用治療は炭素線の治療効果を高めると期待される。

所属

a: QST 病院

b: QST 量子医科学研究所

光子線と重粒子線の抗腫瘍免疫応答の比較 Comparison of Antitumor Immune Responses Induced by Photon and Carbon Ion Radiotherapy

(24J156) 武島 嗣英

T. Takeshima

Abstract

Radiotherapy reduces tumor size not only by inducing DNA damage and cell death but also by stimulating antitumor immune responses. While such effects have been well studied following conventional X-ray irradiation, little is known about immune activation after carbon-ion (C-ion) irradiation. This study aimed to compare the contribution of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) to tumor control between X-ray and C-ion treatments. Using B16-OVA tumor-bearing C57BL/6 mice, we irradiated tumors with X-rays (10-20 Gy) or Cions (5-10 Gy), with or without anti-CD8 antibody to deplete CTLs. Tumor growth curves showed faster progression in CD8-depleted mice, indicating CTL involvement in both modalities. Regression analysis comparing radiation dose and tumor growth delay revealed a greater CTL-dependent effect in C-ion-treated mice than in X-ray-treated mice. These results were reproducible in independent experiments. Our findings suggest that carbon-ion radiotherapy induces stronger CTL-mediated tumor suppression than X-ray therapy. This information could guide the development of optimized combinatorial immunotherapies tailored to each radiation modality.

A) 研究の目的とバックグラウンド

放射線治療によって腫瘍が縮小する主な理由 は、放射線が腫瘍細胞の DNA を損傷し、細胞死を 誘導するためである。しかし近年の基礎および臨床 研究により、放射線で死滅した細胞やその構成成分 が免疫応答を誘導し、腫瘍排除に寄与することも明 らかになってきた。

炭素イオン線治療(C-ion)は通常のX線治療と

比べて強力な殺細胞効果を有するが、その後に生体 内で誘導される免疫応答については、十分に検討さ れていない。特に、X線と同等の生物学的効果を持 つ線量の C-ion を照射した場合、誘導される免疫応 答の種類、強度、発現タイミングなどが X 線と異 なるかどうかは明らかでない。

もし両者に違いが認められれば、それぞれの放 射線治療に最適な併用免疫療法の開発に繋がる可能 性がある。本研究では担癌マウスを用いて、C-ion 照射によって誘導されるがん特異的な細胞性免疫応 答を測定し、X線照射後の免疫応答と比較すること で、放射線種ごとの免疫応答の特性を明らかにする ことを目的とする。

B) <u>昨年度までに得られている結果</u>

前年度のJ134 課題では、B16-OVA 担癌マウス を用いた実験により、C-ion 治療はX線治療と比較 して免疫応答により強く依存して治療効果を示すこ とを示唆するデータが得られた。

本年度はこの結果の再現性を確認するため、同様の B16-OVA 担癌マウスモデルを用いて再実験を 行った。

C) 照射対象物の種類と数、照射ビームの種類

照射対象は、C57BL/6 マウスに移植したマウス 肺がん細胞株 B16-OVA 由来の腫瘍塊である。この 細胞株はモデル抗原である卵白アルブミン(OVA) を発現しており、がん特異的免疫応答の解析に適し ている。照射には 290 MeV/n の炭素イオン線 (SOBP6cm)を使用した。

D) <u>今年度の研究成果と解析結果</u>

C57BL/6 マウスの右脚に B16-OVA 腫瘍を移植
 後、X 線または C-ion を照射し、腫瘍増殖曲線を作
 成した。並行して別のマウス群では、CD8 陽性 T
 細胞(CTL)を除去するために抗 CD8 抗体

(αCD8)を投与し、CTL 欠損状態で照射(X線:10、15、20 Gy、C-ion: 5、8、10 Gy)を行った。

図1に示す通り、X線・C-ion いずれの照射条件 でも、CTLを除去した群ではCTLが存在する対照 群に比べて腫瘍の増大が早く進行した。これは両放 射線治療ともにCTLが腫瘍制御に関与しているこ とを示す。 次に、治療効果における CTL の関与の度合いを 比較するため、各放射線治療後の吸収線量(Gy) と、腫瘍が 1000 mm³に達するまでの日数の関係か ら回帰直線を求めた(図 2)。X線群とX線+αCD8 群の傾きはそれぞれ 2.24 と 1.38(比 1.62)、一方 Cion 群と C-ion+αCD8 群の傾きは 2.96 と 1.18(比 2.51)であり、C-ion 群のほうが免疫依存性が高い 傾向が見られた。これは C-ion 治療が X線よりも強 く CTL を介した腫瘍制御に依存していることを示 唆する。

この結果は前年度の実験結果と同様であり、再現性が確認された。

来年度は、別の腫瘍モデル(例:3LL-OVA)に おいても同様の傾向が認められるかを検討し、放射 線種ごとの免疫応答の違いをより広く比較する予定 である。



図 1. B16-OVA 担癌マウスに X 線、炭素イオン線照射したときの腫瘍増殖曲線



図 2. C-ion は X-ray よりも細胞傷害性 T 細胞(CD8+細胞)を使って腫瘍を小さくする

研究成果一覧

24J156 武島嗣英

(原著論文等)

- Tsuguhide Takeshima, Ryoichi Hirayama, Sumitaka Hasegawa. Experimental evidence that carbon-ion radiotherapy utilizes cytotoxic T lymphocyte-mediated anti-tumor immunity for shrinking tumors compared to X-ray therapy. Biochem Biophys Res Commun 2024 Jul 23:718:150058.
- (学会及び研究会口頭発表等)
 - ・武島嗣英: X 線治療と重粒子線治療、どちらがより免疫を使って治療をするのか?
 第 16 回 Quantum Medicine 研究会、水戸、2025.2.
 - ・武島嗣英:X線 vs 重粒子線:抗腫瘍免疫をより使う治療法はどちらか?(招待講演)第25回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム、相模原、2025.2.
 - 武島嗣英: Creating New Therapy Models by Animal experiments: Utilizing Anti-Tumor Immune ResponsesInduced by Radiation Therapy (招待講演) 第 83 回日本癌学会総会、 福岡、2024.9.

重粒子線による高精度量子メス治療(マイクロサージェリー)技術開発と適応拡大に関す る研究

Research for development of microsurgery by high-precision carbon-ion radiotherapy (24J206)

石川 仁^a、若月 優^a、篠藤 誠^a、樋口真人^a、南本敬史^a、佐原成彦^a、南久松丈晴^a、 山谷泰賀^a、田島英朗^a、Han Gyu Kang^a、寅松千枝^a、白井敏之^a、兼松伸幸^a、 米内俊介^a、武居秀行^a、下川卓志^a、平山亮一^a、坂間 誠^a、村田和俊^a、林 基弘^b

Hitoshi Ishikawa, Masaru Wakatsuki, Makoto Shinoto, Masato Higuchi, Takafumi Minamimoto,

Naruhiko Sahara, Takeharu Minamihisamatsu, Taiga Yamaya, Hideaki Tashima, Han Gyu Kang, Chie Toramatsu, Toshiyuki Shirai, Nobuyuki Kanematsu, Shunsuke Yonai, Hideyuki Takei, Takashi

Shimokawa, Ryoichi Hirayama, Makoto Sakama, Kazutoshi Murata, Motohiro Hayashi

Abstract

Purpose: To establish microsurgery techniques for treating benign and malignant diseases with microbeams using carbon-ions.

Methods: Dose-volume analysis for comparison of γ knife and carbon-ion RT (CIRT) for thalamus and pituitary gland were performed. An accuracy of irradiation doses using a 2-mm collimator were also evaluated physically and biologically. Furthermore, we tried to a new irradiation technique to improve a doserate by a 2mm collimator.

Results:

 The dose distributions were measured using 1 mm and 2-mm collimator. The dose was not sufficiently delivered at the peak depth with 1 mm collimator.

2) Offline PET measurement following irradiation of a rat using the 2-mm collimator showed a clear trajectory of the beam irradiated from the right-hand side and stopped at the center of the brain.

3) The irradiation area was successfully visualized using DSB markers. DSB markers could be clearly observed even one week after irradiation.

Conclusion:

CIRT can be a useful radiotherapy for brain diseases such as tremor and thalamic pain. Further experiments can be performed in vivo to establish the microsurgery by carbon-ions.

1.研究の目的とバックグラウンド

炭素イオン線治療は、X線よりも線量集中性、生物効果が高く、安全性、有効性の高いがん放射線治療として開発されてきた。2003年から先進医療制度として研究が行われ、これまでに8疾患が保険収載されているが、統一治療方針に定められた適応以外の疾患に対する適応拡大は見込まれないため、更なる基礎・臨床研究が必要である。

近年、非腫瘍性疾患である脳機能性疾患に対する X線やγ線を用いた定位放射線治療による破壊術が 臨床応用されている。これらの治療では、がん疾患 と比べて長期予後が期待されることと同時に高線量 の照射が必要なことから、安全性と有効性の両面で 炭素イオン線を用いる意義は高いと考えられる。ま た、微小な標的に対する炭素イオン線の定位照射技 術が確立すれば、脳機能性疾患の原因を探索する新 たな手段にもなり得る。

本研究は、炭素イオン線によるマイクロサージェ リー技術を開発し、以下の研究を主なテーマとして 進めている。1)線量シミュレーションによるイン シリコ研究、2)高精度照合,線量測定の技術開発 と生物試料を用いた検証実験、3)てんかん発生モ デルを用いた基礎実験と最新の核医学画像による効 果判定、を行うことで本研究の有効性を明確化させ る.

2.昨年度までに得られている結果

①照射ポート設計、線量評価:微小照射野の深部線量分布及び側方線量分布を測定する手法を開発すると共に、ラット照射で使用する2mmコリメータを用いた照射場の開発を行った。また、照射方法の検討を行うことにより線量率を2-4 Gy/分から80 Gy/分に改善し、高線量照射実験を実現させた。

②線量評価:最適な小照射野炭素イオン線の作成条件を探るため、1mmコリメータを作成し線量分布 測定を行った。2mmコリメータを使用した場合と 比較して線量率が30%ほど低下し、ビームのエン トランスに対するピーク位置の線量比は20%ほど 低下した。1mmコリメータでは十分な線量確保が 難しく、2mmコリメータが小照射野の形成に最適 であることが分かった。また、生物実験において線 量設定のために必要な情報として、2mmコリメー タ使用時のminiBFの厚さと線量率の関係を調べた (図1)。



図1 1 mm および2 mm コリメータを使用したと きの深部線量分布

③PET 装置の改良:従来型の5リングを6リング にすることで中心感度を20%向上することを達成 した。空間分解能についても DOI 情報により2.2 mm ロッドの弁別を可能にした。

3.今年度の研究内容と成果

1) Dual energy CT の臨床研究として、頭頚部腫瘍 に対する重粒子線治療時の治療計画に関して、10 例が登録された。通常の CT と Dual energy CT によ る治療計画を比較したところ、線量で 1.4%から 1.8%の差が生じることが示された。特に IMPT で 差が大きくなることが示された。

2) PET 撮像:前年度に引き続きラットの脳へ2 mm 径にコリメートした炭素イオン線を150 Gy 照 射したのち、ラットを PET 装置のベッドへ移動し て 30 分間オフライン PET 測定を実施した。照射ビ ームの軌跡に陽電子放出核種が生成されている様子 を描出することに成功した。また、生体内で生成さ れた陽電子放出核種は洗い出し効果によって全身の 血管をめぐり広がるため、ラットの全身像が薄く描 出されることから、別途撮影した CT や MRI 画像 との位置合わせを容易に行うことができた。その結 果、計画通り脳の中心位置でビームが停止している ことを確認した。

3) 細胞照射:前年度に引き続き、ヒト皮膚線維芽 細胞を一様に培養したスライドチェンバーの円内に 150,300 Gy を照射し、DSB マーカーの発現を経時 的に測定した。照射領域内では DSB マーカーの発 現が観察され、照射1週間後でも細胞死は観察され ず、DSB マーカーの発現は維持されていた。また 照射された細胞が大きく移動することは確認されな かった(図 2)。



図 2 炭素イオン線マイクロサージェリー照射にお ける DSB 誘発

4) ラット照射:1月にラット3匹を照射し、現在 観察中である。

a. QST

b. 東京女子医科大学

研究成果一覧

24J206 石川仁

(招待口演)

1. 若月 優: 重粒子線による高精度量子メス治療(マイクロサージェリー)技術開発と適応拡大に関する研究. 第14回国際放射線神経生物学会大会、千葉、2025.02.08

高 LET 粒子線による腫瘍再酸素化の機序解明 Elucidation of the Mechanism of Tumor Reoxygenation by high-LET particle beams (24J315)

· 鵜澤玲子 ^a、岡部凜 ^a、今泉晶子 ^{a,b}、長谷川純崇 ^a、小畠隆行 ^a、平山亮一 ^a Akiko Uzawa ^a, Rin Okabe ^a, Akiko Imaizumi ^{a,b}, Sumitaka Hasegawa ^a, Takayuki Obata ^a, Ryoichi Hirayama ^a

Abstract

We investigated the change of hypoxic fraction in tumor after neon ions. SCCVII cells were transplanted into the right hind legs of syngeneic C3H/He male mice. Neon-ions were accelerated by the HIMAC up to 400 MeV/n. Irradiation position was the center of a 6 cm SOBP beams. The dose-averaged LET of Neon-ions was approximately 93 keV/um. Neon-ions were delivered to the tumors about 5-mm diameter. After 30 hours of both X-ray and Neon-ion irradiations, tumor reoxygenation was observed. Tumor reoxygenation was re-evaluated using MRI (magnetic resonance imaging) techniques. As a result, MRI results showed that reoxygenation occurred 30 hours after X-ray and Neon-ion irradiations. To explain this mechanism from the perspective of oxygen consumption rate, we investigated an experimental system using cultured SCCVII cells. As a result, we found that the oxygen consumption rate decreased immediately after irradiation with neon-ions. It was suggested that neon-ion beams may have induced a decrease in the oxygen consumption rate of SCCVII cells, thereby recovering the hypoxic state within the tumor.

1. 研究の目的とバックグラウンド

放射線治療にとって腫瘍内に存在する低酸素細胞 は、治療抵抗性の一因になっており、解決しなけれ ばならない課題である。重粒子線は低酸素細胞に対 し、有効な放射線の一つであることは我々の研究で も明らかになっている(Hirayama et al., Mutat. Res. 2013)。また、重粒子線の一つである炭素線は腫瘍再 酸素化を加速し、X線やガンマ線などの光子放射線 よりも早く再酸素化が誘導されることが報告されて いる(Ando K et al., Int. J. Radiat. Biol. 1999; Oya N et al., J. Radiat. Res. 2001)。

このように光子放射線と比べ、重粒子線では低酸 素細胞に対する放射線感受性や腫瘍再酸素化現象が 明らかに異なり、重粒子線特異的な生物効果が存在 する。低酸素細胞に対する炭素線の有効性は DNA 損傷生成ならびにその修復機構によって説明されて いるが(Hirayama R, et al., J. Radiat. Res. 2005)、再酸 素化に対する重粒子線の作用機序は炭素線の物理・ 化学的作用だけでは十分説明できず、むしろ重粒子 線照射後の腫瘍内における細胞応答が腫瘍再酸素化 に深く関わっていると推測できる。そこで、腫瘍内 低酸素分画の割合と低酸素、血管新生ならびに細胞 致死を反映するバイオマーカー発現の経時的変化を 観察することで、X線とは異なると思われる高LET 重粒子線による再酸素化の機構を放射線生物学なら びに放射線腫瘍学の観点から解明することが重要と 思われる。

本課題は前課題である 21J315 で明らかになった ネオン線の再酸素化の現象をもとに、重粒子線によ るマウスがん細胞の腫瘍内微小環境変化を引き続き 調べ、腫瘍再酸素化の機構解明をさらに進める。具 体的にはネオン線照射後の腫瘍内微小環境変化の指 標として、腫瘍細胞の代謝活性、酸素消費量および 腫瘍内血流量の変化に絞り関連性を明らかにする。

2. 昨年度までに得られている結果

本課題では高LETネオン線照射より再酸素化がX 線照射に比べ、加速されるのか否かを調べた。まず、 放射線生物学的な手法として、X線に対する腫瘍内 の低酸素細胞が引き起こす放射線抵抗性の割合を生 存率曲線から求める paired survival assay を用いた。 また MRI を行い血流動態や細胞間隙の割合から低 酸素分画を求める手法も開発し、この異なる2つの 解析手法により、SCCVII 腫瘍内低酸素領域の再酸素 化に高LETネオン線は明らかにX線よりも有効で あることを報告した(参考文献1)。また、メカニズ ム解析においては、腫瘍内血管の数、血管構造の破 綻に伴う血流の拡散、アポトーシスの関与を調べた が、これらの関与を強く示唆する結果は得られなか った。

3. 今年度の研究内容

In vitro の SCCVII 細胞を用いて、照射後の細胞の 酸素消費量の経時的変化をリン光法(酸素消費速度 測定キット)を用いて、経時的に腫瘍細胞の酸素消 費速度を測定した。

4. 今年度の研究成果と解析結果

X線と高LETネオン線の酸素消費速度を調べると、 照射直後ではX線では線量の増加と共に酸素消費速 度が早くなることが示されたが、高LETネオン線で は線量の増加と共に酸素消費速度が遅くなる傾向を 示した。また、照射30時間後の時点では、X線では 線量の増加と共に酸素消費速度が遅くなることが示 され、高LETネオン線では線量の増加と共に酸素消 費速度が早くなる傾向を示した。X線と高LETネオ ン線では酸素消費速度の線量効果関係が全く逆であ り、測定するタイミングが変わることで、さらに両 者の酸素消費速度における線量効果関係が逆転する 傾向を示した。

細胞の酸素消費において、線質、線量ならびに測

定時のタイミングが複雑に関連していることがわかった。

参考文献

1) Akiko Imaizumi, Ryoichi Hirayama, Yoko Ikoma, Nobuhiro Nitta, Takayuki Obata, Sumitaka Hasegawa: Neon ion (²⁰Ne¹⁰⁺) charged particle beams manipulate rapid tumor reoxygenation in syngeneic mouse models. Cancer Science, 115, 227-236, 2024

^{b.} 東京科学大学(Science Tokyo)

^{a.} 量子科学技術研究開発機構(QST)

研究成果一覧

24J315 平山亮一

(学位論文)

1. 岡部 凛 東邦大学理学部生物分子科学科:「放射線照射後の ATP 量に対する線質および酸素環境の影響」学士号 第 20862

細胞死制御剤による粒子線防護効果のマウス個体レベルでの検討 Evaluation of cell death regulatory agents for protecting particle beam-irradiated mice (23J327)

森田明典 a、王冰 b、勝部孝則 b、村上正弘 b、下川卓志 b、丸山耕一 b、西山祐一 a Akinori Morita^a, Bing Wang^b, Takanori Katsube^b, Masahiro Murakami^b, Takashi Shimokawa^b, Kouichi Maruyama^b, Yuichi Nishiyama^a

^aTokushima University, ^bNational Institutes for Quantum Science and Technology

Abstract

We have discovered a new anti-inflammatory compound, STA (pseudonym due to nondisclosure agreements), with the aim of expanding the repertoire of radioprotective agents. STA demonstrated a superior protective effect against X-ray-induced intestinal death in a mouse caudal half-body irradiation (CHBI) study. Furthermore, STA showed no protective effect in the CHBI study in mice lacking Casp1/4, which is necessary to produce inflammatory cytokines. This finding suggests that the radioprotective effect of STA is Caspase-1/-4 dependent. In the CHBI study, X-rays were delivered using a lead-shielded fixing apparatus to target the mouse pelvic region. For the carbon beam irradiation study, we adjusted the slit width to create an irradiation field similar to the CHBI setup. Under the irradiation conditions at the present slit width, the STA-administered group was more sensitized to carbon particle beams than the solvent-administered group. Therefore, the slit width in CHBI was investigated to identify the irradiation setting at which acute rectal injury is induced.

1. 研究の目的とバックグラウンド

粒子線治療を始めとする高精度放射線療法の進展は目覚ましく、線量集中性の向上によって高い 治療効果が得られるようになった。しかしながら、 高精度放射線治療が普及しつつある現在も依然 として正常組織障害が処方線量の限界、すなわち 耐容線量を決めている。

研究代表者らは、p53 標的創薬研究を推進し、 p53 活性を制御することで正常組織の耐容線量を 高めるいくつかの放射線防護剤を発見した。粒子 線細胞死については、85 keV/µm 以上の高 LET 放射線では p53 依存性を示さないことが固形腫 瘍由来培養細胞を用いて明らかにされているが、 急性応答において感受性組織となる骨髄や腸管 の放射線高感受性を再現できる適切な培養細胞 系はなく、マウス個体の生存率および組織解析が 最も適切な防護活性評価方法となる。また、放射 線による骨髄死では p53 は細胞死促進因子とし て、腸死では p53 は細胞死抵抗性因子として機能 することが知られていた(*Science* 327, 593-596, 2010)。 本研究では、骨髄死に有効な「p53 阻害剤」と してオルトバナジン酸ナトリウム(バナデート) を、また、腸死に有効な「p53 調節剤」として放 射線抵抗性に関わる p53 標的遺伝子を上方制御 する 5-クロロ-8-キノリノール(5CHQ)を主たる 検討化合物として用い、粒子線に対するこれらの 化合物の有効性を検討する(参考文献 1, 2)。また、 研究の過程で新たに発見された抗炎症化合物に ついても放射線防護活性の活性評価を進める。

2. これまでに得られている結果

これまでに、炭素線(14 keV/µm)および鉄線 (189 keV/µm)全身照射実験において、バナデ ート投与群において有意に骨髄死を防ぐ効果を 示す結果が得られ、鉄線のような 85 keV/µm を 超える高 LET 放射線でも細胞死制御剤による防 護が有効であると結論した。一方、5CHQ 投与群 は図1に示したように炭素線腸障害に対して有効 性を示したが、鉄線腸障害に対する防護効果は認 められなかった(参考文献 3)。



図15CHQによる炭素線腹部照射マウス防護効果 8週齢の野生型 ICR マウスを用いた(括弧内は 匹数)。5CHQは、照射1時間前に60 mg/kg 腹腔 内投与した。腸死相当線量の炭素線として16.5 Gy を腹部照射したマウスでは、溶媒投与群で 44%、5CHQ 投与群で70%生存し、5CHQ 投与マ ウスの方が溶媒投与群より有意に高い生存率を 示した(p<0.02)。

研究代表者らは、放射線防護効果を得るための 標的レパートリーを増やすことを目的として、新 たに腸管の炎症反応を抑制する防護剤開発に取 り組んだ。発見した新規抗炎症化合物 STA(化合 物提供元との秘密保持契約のため仮名)は、マウ ス後半身照射 (caudal half-body irradiation; CHBI) 試験において放射線性腸炎に対する優れ た防護効果を示した(図2A)。さらに腸幹細胞マ ーカー遺伝子の発現変化を qPCR で解析したとこ ろ、STAの放射線防護効果は照射直後の急性応答 ではなく、その後の炎症反応過程を抑制していた。 そこで炎症性サイトカインの産生に必要な Casp1/4 欠損マウスへの CHBI 試験を実施したと ころ、STA は防護効果を示さなかったことから、 STA による放射線防護効果は Caspase-1/-4 依存 的であることが明らかとなった(図2B)。

徳島大学で実施した CHBI 試験では、マウス骨 盤領域に X 線が当たるよう鉛遮蔽固定具で調節 した。炭素線照射試験(290 MeV/u, mono-beam, LET 14 keV/µm)では、徳島大学の CHBI 試験 の照射野に近づけるためスリット幅を1 cm とし て STA の粒子線防護活性評価試験を実施した。

昨年度は、スリット幅をマウス肛門から尾頭方 向に1 cm と定め、I 期に 16-23 Gy を照射した。 溶媒投与群では致死効果が観察されなかったが 最大線量 23 Gy 照射群の結果を図 2C に示す。今 回のスリット幅1 cm の照射条件下において、STA 投与群は溶媒投与群より炭素線に対して増感効 果を示した。これらの結果は、X 線による腸障害 と炭素線による腸障害のメカニズムの差異によ るものと考えられた。

3. 今年度の研究結果と解析結果

急性直腸障害が誘導される照射条件を見出すた め、高線量炭素線腹部照射におけるスリット幅の 検討を行った。

I期スリット幅1 cm 設定にて、23, 24.5, 26 Gy を照射した結果、30 日生存率はそれぞれ 5/6, 6/6, 6/6 匹生存とほとんど致死的効果を示さなかった。

Ⅱ期ではスリット幅 1.5 cm 設定にて、線量をさらに増強して 26, 29, 32 Gy を照射した結果、30日生存率はそれぞれ 6/6, 6/6, 4/6 匹生存と、32Gy-炭素線腹部照射でも十分な急性直腸障害を誘導することができなかった。

マウス骨盤領域に X 線が当たるよう鉛遮蔽固定 具で調節した徳島大学で実施した CHBI 試験で は、Lgr5 陽性直腸上皮幹細胞クラスター構造破 壊のしきい線量は 18 Gy、LD₁₀₀線量は 29-30 Gy である(*Int. J. Mol. Sci.* 25, 11252, 2024.)。

照射条件が異なるので線量だけで判断すること は難しいが、炭素線腹部照射試験ではX線-CHBI 試験で誘導される急性直腸障害の再現に至って いない。



図2C57BL/6Nマウスに対するSTAの放射線防護 活性および Caspase-1/-4 依存性

 (A) X線 26 Gy-CHBIマウスを用いた防護活性 評価。溶媒投与群では全てのマウスが死亡したの に対し、10 mg/kg STA 投与群では 100%生存し た(PBS vs 10 mg/kg STA; p < 0.01)。

(B) 28 Gy-CHBI *Casp1/4*⁺マウスを用いた STA 防護活性の Caspase-1/-4 依存性の検証。STA は、 野生型マウスでは防護効果を示すが、*Casp1/4*⁺ マウスでは防護効果を示さない。

(C) 23 Gy-炭素線腹部照射(スリット幅1 cm)
 マウスを用いた防護活性評価。STA は増感効果を示した(p<0.05)。

参考文献

- A. Morita, et al. Cancer Res. 70, 257-265, 2010.
- 2. A. Morita, *et al. Mol. Cancer Ther.* 17, 432-442, 2018.
- 3. A. Morita, *et al. Front. Public Health* 8, 601124, 2020.

a. 徳島大学

b. 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

研究成果一覧

細胞死制御剤による粒子線防護効果のマウス個体レベルでの検討 Evaluation of cell death regulatory agents for protecting particle beam-irradiated mice (23J327) 森田明典^a、王冰^b、勝部孝則^b、村上正弘^b、下川卓志^b、丸山耕一^b、西山祐一^a Akinori Morita^a, Bing Wang^b, Takanori Katsube^b, Masahiro Murakami^b, Takashi Shimokawa^b, Kouichi Maruyama^b, Yuichi Nishiyama^a ^aTokushima University, ^bNational Institutes for Quantum Science and Technology

学術論文: 2024 年度の発表なし

国際学会発表: 2024 年度の発表なし

国内学会発表: 2024 年度の発表なし

重イオントラック構造依存的な細胞致死効果の解明 Cell killing effect of heavy ion track structure.

(24J347)

間宮大晴^{a,b}、Tengku Ahbrizal Tengku Ahmad^e、Narongchai Autsavapromporn^d 楠本多聞^e、平山亮一^f、小平聡^e、栗田和好^b、小西輝昭^a

T. Mamiya^{a, b}, TA. Tengku Ahmad^c, N. Autsavapromporn^d,

T. Kusumoto^e, R. Hirayama^f, S. Kodaira^e, K. Kurita^b, T. Konishi^a

Abstract

Cell inactivation induced by heavy ions near the Bragg peak is mainly caused by DNA damage, resulting from ions and secondary electrons. The spatial distribution of energy deposition formed by ions and secondary electrons is known as the ion track structure. Therefore, our study aimed is to clarify the correlation between ion track structure and cell inactivation using HIMAC-MEXP beam course. MIA PaCa-2 cells were exposed to either helium ions (1.2 MeV/u, 1.7 MeV/u), carbon ions (1.8 MeV/u) or neon ions (1.8 MeV/u). Initially, to determine the number of DSB induction, R, we quantified the amount of DNA fragmentation using pulse-field gel electrophoresis. Next, to determine the inactivation cross section, σ , we measured the survival rate using colony formation assay. Finally, we compared the ion track structure parameter z^{*2}/β^2 with R and σ , respectively. We found that R was proportional to z^{*2}/β^2 , but σ was not. These results indicate that while DSB induction by heavy ion near the Bragg peak is proportional to the ion track structure parameter z^{*2}/β^2 , cell inactivation does not solely depend on z^{*2}/β^2 .

1. 研究の目的とバックグラウンド

ブラッグピーク近傍の重粒子イオンが誘発す る細胞致死は、イオンとイオンによって生成さ れる二次電子による DNA 損傷が主因である。イ オンと二次電子が形成する空間的なエネルギー 付与分布は、イオントラック構造と呼ばれる。 ブラッグピーク近傍の重粒子イオンを照射する 際、高エネルギーの重粒子イオンを減速材でエ ネルギー損失させると、核破砕反応によって多 くの軽二次粒子が生成される。軽二次粒子が混 在したビームでは、イオントラック構造に対す る細胞致死効果の解析には適さない。そこで、 軽二次粒子の混在が非常に少ないブラッグピー ク近傍の重粒子イオンが照射可能な HIMAC 中 エネルギービーム (MEXP) コースに構築されて いる生物照射システムを用いることで、イオン トラック構造依存的な細胞致死効果を測定でき ると考えた[1]。

以上より、本研究では、HIMAC-MEXP コース に導入されるブラッグピーク近傍の重粒子イオ ンを用いて、イオントラック構造と細胞致死効 果の関係を明らかにすることを目的とする。

2. 前年度までに得られている結果

前年度は、MEXP コースに導入される6 MeV/u の He イオン、C イオン、Ne イオン、BIO コー スに導入される 500 MeV/u の Fe イオンのビー ムタイムを配分していただいた。HIMAC-MEXP では、ビーム取り出し窓と細胞容器との間の空 気層を吸収体としてエネルギー損失させ、5.5 MeV/u He イオン、4.3 MeV/u C イオン、3.1 MeV/u Ne イオンに調整した。これらのイオンをヒトす い臓がん MIA PaCa-2 細胞に照射した。

イオントラックあたりに誘発される DSB 数を 算出するため、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)法でイオンによって断片化された DNA のサイズとその量を測定した。また、イオ ントラックあたりの細胞致死効果の指標となる 致死の作用断面積 σ を算出するため、コロニー 形成法を用いて、生存率曲線を取得した。
3. 今年度の研究内容

今年度は、MEXP コースに導入される 6 MeV/u のHeイオン、Cイオン、Neイオンのビームタ イムを配分していただいた。ビーム取り出し窓 と細胞容器との間の空気層を吸収体としてエネ ルギー損失させ、1.2 MeV/u と 1.7 MeV/u He イ オン、1.8 MeV/u C イオン、1.8 MeV/u Ne イオン に調整した。これらのイオンを MIA PaCa-2 細胞 に照射した。PFGE 法を用いて、断片化 DNA サ イズとその量を測定した。取得した照射フルエ ンスに対する断片化 DNA 量に Random Breakage モデルを適用することで、1イオンあたりのDSB 誘発数 R を算出した。また、コロニー形成法を 用いて、生存率曲線を取得した。取得した生存 率曲線に対して、細胞生存率を SF、照射フルエ ンスをFとし、 $SF = \exp(-\sigma F)$ でフィッティング することで、致死の作用断面積 σ を算出した。 イオントラック構造の形成には、イオンが物質 中を移動する際の価数 z*とイオンの光との相対 速度 β の関数 z^{*2}/β^2 が深く関わるため、取得した $R と \sigma をそれぞれ z^{*2}/\beta^2$ で比較した。

4. 今年度の研究成果と解析結果

DSB 誘発数 *R* を z^{*2}/β^2 に対してプロットし、 図 1 に示した。ブラッグピーク近傍での *R* は z^{*2}/β^2 に比例した (図 1)。また、致死の作用断面 積 σ を z^{*2}/β^2 に対してプロットし、図 2 に示し た。ブラッグピーク近傍での σ は、 z^{*2}/β^2 に比例 せず、イオン種ごとに独立した比例関係を示し た (図 2)。これらの結果より、ブラッグピーク 近傍での DSB はイオントラック構造のパラメー タである z^{*2}/β^2 に比例して誘発される一方、細胞 致死は z^{*2}/β^2 のみに依存していないことを示し た。

来年度も継続して HJ303 で実験を行い、イオ ントラック構造と細胞致死効果の関係をより詳 細に明らかにする。





参考文献

[1] T Konishi et al., Rev. of Sci. Instr. 76(11):114302.2005.

- a. QST ・ 体内除染研究グループ (Internal Decoporation Research Group, QST)
- b. 立教大学大学院・理学研究科 (Graduate School of Science, Rikkyo University)
- c. マレーシア原子力庁 (Malaysian Nuclear Agency)
- d. チェンマイ大学・医学部 (Department of Radiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University)
- e. QST · 放射線計測グループ (Radiation Measurement Group, QST)
- f. QST・生物物理研究グループ(Biophysics Group, QST)

重イオントラック構造依存的な細胞致死効果の解明 Cell killing effect of heavy ion track structure. (24J347) 研究成果一覧

(学会及び研究会口頭発表等)

- 1. **優秀発表賞**:**間宮大晴**、ブラッグピーク近傍の重粒子イオントラック構造による細胞致死効果の 解析、2024年度物理学専攻修士論文発表会、立教大学、2025-02-17
- <u>T. Mamiya</u>, I. Qona'atun, CB. Chen, TA. Tengku Ahmad, N. Autsavapromporn, T. Kusumoto, R. Hirayama, S. Kodaira, K. Kurita, T. Konishi, DSB induction and lethal effect of heavy ion near the Bragg peak, The 67th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society, 2024-9-25.
 (学位論文)
- 1. **間宮大晴**:ブラッグピーク近傍の重粒子イオントラック構造による細胞致死誘発要因の解明、修 士論文、立教大学大学院、2025-03-25

「重粒子線を用いた根治的不整脈治療の開発」 — 心臓放射線照射による心不全の新規治療開発に向けた基礎的研究 -

Basic research for the development of new treatment of heart failure by cardiac irradiation

(23J204)

網野真理^{1,2}, 下川卓志³, 中林涉¹, 河邊昇⁴, 田中幸恵⁴, 吉岡公一郎¹

Mari Amino^{1.2}, Takashi Shimokawa³, Wataru Nakabashi¹, Noboru Kawabe⁴, Sachie Tanaka⁴, Kiocihiro Yoshioka¹

Abstract

Previously, we demonstrated that suppression of sympathetic nerve sprouting using heavy ion irradiation reduced the inducibility of ventricular tachycardia/ventricular fibrillation (VT/VF) and atrial fibrillation (AF) in aged, cholesterol-rich rabbits prone to arrhythmias (Amino M, Shimokawa T, Yoshioka K, et al. Circ J. 2023;87:1016-1026). This finding suggests that the sympathetic denervation effects of heavy ion beams may improve not only arrhythmias but also overall cardiac function.

Objective: This study aims to explore whether low-dose heavy ion beams can induce myocardial reprogramming, thereby contributing to cardiac functional recovery.

1.We will evaluate the cardioprotective effect of heavy ion beams in an Adriamycin (ADR)-induced heart failure model by analyzing changes in myocardial escape enzyme levels, myocardial electrical delay potentials, and cardiac function. Cardiac function will be assessed through echocardiographic evaluation of left ventricular contractility and diastolic performance.

2. To investigate underlying molecular mechanisms, we will analyze gene expression profiles and histological changes in myocardial tissue post-irradiation. These analyses will clarify the cellular and molecular biological responses to low-dose heavy ion exposure and their potential role in cardiac recovery.

1. 研究の目的とバックグラウンド

【背景】これまで我々は高齢(3 歳)のコレステロー ルウサギ(不整脈易誘発モデル)を用いて、重粒 子線照射から 2 週間後に交感神経発芽の抑制に よって VT/VF および心房細動(AF)の誘発性が軽 減することを明らかにした(Amino M, Shimokawa T, Yoshioka K, et al. Circ J. 2023 23;87:1016-1026.)。 そこで、こうした重粒子による交感神経除神経効 果は、不整脈のみならず心機能の改善をもたらす のではないかとの着想を得た。 【目的】低線量重粒子線が心筋のリプログラミング (心機能回復)をもたらす可能性を明らかにするた めに以下を検討課題とする。

- 心筋障害の軽減効果の検証として、アドリアマ イシン(ADR)による心不全モデルにおける心 筋逸脱酵素の変動、心筋電気的遅延電およ び心機能の改善を通じて、重粒子線が心筋障 害をどの程度抑制するかを確認する。心機能 への影響は心臓超音波検査を通じて、低線量 重粒子線が左室の収縮能・拡張能の修復に 寄与するかを検証する。
- ② 分子生物学的変化の解明として、遺伝子解析 や組織染色を通じて、放射線照射後の心筋組 織における遺伝子発現や細胞レベルの変化 を明らかにする。

2. 昨年度までに得られている結果

今回は本研究(3年間)の2年目にあたる。 マシンタイムの実施終了は以下である。

	対象		
	(ウサギ)		
対照群Ⅰ	健常	4	
	済) 2023 年度に実施		
対照群II	病態	6	
	済) 2023 年度に実施		
対照群 III	健常+X線15Gy	2	
	済) 2024 年度に実施		
処置群I	健常+重粒子 15Gy	4	
	済)2匹のみ2024年		
	度に実施		
処置群Ⅱ	病態+重粒子 15Gy	6	
	済)2023~2024 年度		
	に実施		
処置群 III	健常+重粒子 30Gy	4	
	2025年度前期に2匹 予定		
	上市村子 200	4	
処 直 矸 IV	· 内 態 + 里 粒 + 30Gy	4	

済)2匹のみ2024年度	
に実施	
2 匹を 2025 年度前期	
に予定	

3. 今年度の研究内容

昨年に引き続き同一内容。

対象モデル:体重 3.0-3.5 kg,3か月齢の NZW ウサギ(雄)

(1)病態モデルウサギは ADR の静脈注射 0.15mg/kgを週に1回,連続5週投与し、 心不全モデルを作成する(北山ラベス)。 この病態モデル8匹のうち4匹を重粒子 線棟に搬入し、6日間順化させる。この間 毎日観察し体重測定を一度行う。

(2 セボフルランを吸引させて沈静化し、重粒子線照射(THIR)終了までその状態を維持する。

(3) 固定台に包帯で仰臥位固定し、照射台 にセットアップする。(10~20分)

(4)炭素線 15Gy(5Gy/min)で胸部から心臓局所に照射する。照射部位以外は真鍮製のコリメーターで遮蔽する。

(5)照射後ケージにて安静側臥位とする。(6)照射数日後、東海大へ搬出する。

(7)同時期に病態モデルウサギの非照射群(ADR群)4匹を東海大学へ直接搬入。
 【解析項目】

- 血液検査、心電図、心臓超音波、の経時的評価(照射前、照射後7日,1か月,3か月,4か月)。
- 4 か月後の時点で心臓サクリファイスし、免疫染色として、シリウスレッドによる線維化の定量、コネキシン 40/43(Cx40、Cx43)および交感神経マーカー(growth-associated protein-43: GAP43, tyrosine hydroxylase: TH)を施行する。
- 心筋組織を用いた RNA 解析を実施し、 放射線特異的な心筋遺伝子の変化を 同定する。

4. 今年度の研究成果と解析結果

これまでの研究では心筋リプログラミングという 新しい治療概念を、放射線照射を通じて心筋の電 気生理学および分子生物学的変化に焦点を当て 検討した。使用動物として NZW ウサギを用いた ADR 投与による病態モデルの作成は、臨床的な 心筋障害の再現性が高く、妥当な選択であった。 得られた結果は以下の5点である。

- (1)血液検査にて:非照射群の血液所見 Troponin-T, CPK, GOT, LDH が照射群に比し て有意に高値であり、心筋逸脱酵素の上昇 すなわち心筋障害を示唆する所見であった。 照射群ではこれらの値が回復する傾向にあ った。いっぽう BNP は両群で有意差がなく心 不全傾向は見られなかった。ACE, Fe, フェリ チンなどにも差異は見られなかった。 Troponin-T, CPK, GOT, LDH の値が照射群 で有意に低下した事実は、重粒子線が心筋 障害を軽減する可能性を示唆する。低線量 放射線が心筋障害を誘発する懸念を緩和し、 長期的な心機能回復の基盤となる。一方で、 BNP(心不全の指標)に有意差がないことは、 重粒子線が急性期の心不全病態に直接的な 影響を与えるわけではない可能性を示す。
- (2) 心電図検査:非照射群に比し、照射群では RMS40ms に反映される左室遅延電位が高 値で、伝導障害の改善を示唆した。いっぽう fPD, RMS20ms に反映される心房伝導遅延 は2 群間で有意差は生じなかった。照射群で は RMS40ms の上昇が観察され、心筋内の 電気的伝導特性が回復している可能性を示 す。
- (3) 心臓超音波検査:非照射群に比し、照射群では EF(左室駆出率)、FS(左室短縮率)に反映される左室収縮能が高値であった。いっぽうE/A, DT: Decelerating time に反映される左室拡張能は2群間で有意差は生じなかった。照射群では EF(左室駆出率)、FS(左室短縮率)が有意に向上したことから、重粒子線による心筋組織の構造的・機能的修復の可能性を示唆する。一方、拡張能(E/A, DT)に有意差がない点から、放射線治療は主に収縮期の補正に効果を発揮すると考えられる。
- (4) 遺伝子解析: ADR 群, ADR+THIR 群に加えて、健常ウサギの心筋サンプルを追加した。発現比相関解析では477遺伝子のなかで、各群の傾向を読み取りことが可能であった。網羅的遺伝子発現解析では、健常群とADR+THIR 群のクラスターが同一群で、いっぽうADR 群が異なるクラスターに属することが明らかとなった。P53発現の亢進に加え、SPRY4, FGF2遺伝子も変動を呈しており、リモデリング心筋におけるERK1/2カスケードを介した細胞分裂の調節が示唆される。本結果は放射線による細胞分裂周期への影響を初めて明らかにしたものであり、病態心筋のリモデリング構築過程における放射線治療の可能性を示した。

(5) 組織解析:SR 染色:膠原線維の定量では ADR 群, ADR+THIR 群は同程度であった。Cx43 染色:ギャップ結合蛋白である Cx43 は ADR 群に比して ADR+THIR 群で増加傾向が見られた。GAP43 染色: 幼若交感神経マーカーは ADR 群に比して ADR+THIR 群で抑制傾向が見られた。TH 染色:成熟交感神経マーカーは ADR 群に比して ADR+THIR 群で抑制傾向が見られた。以上より分子生物学要因として Cx43 の回復が伝導回復に寄与し、GAP43 および TH の抑制が交感神経活動の鎮静化に 関与している可能性がある。

今後の予定

3年目は予定されたモデル動物の実験を終了し、 解析結果の学会発表と論文作成を行う。

- 1) 東海大学循環器内科
- 2) QST 重粒子線治療研究部
- 3) QST 物理工学部・粒子線照射効果研究グループ
- 4) 東海大学生命科学統合支援センター

業績

【学会発表】 ① 第8回 BunkyoArrhythmiaConference 「体外放射線照射を用いた不整脈治療~心室頻拍と心房細動~」 網野真理 2024年4月25日

 ② 第63回日本生体医工学会大会 企画セッション「心臓・循環器 制御の最前線」不整脈放射線治療の精度向上にむけて心臓画像検査が 果たす役割 網野真理
2024 年5月24日

③ 第 272 回関東甲信越地方会
 会長企画セッション「難治性心室頻拍への挑戦」難治性心室頻拍に対する体外放射線治療の現状と課題
 網野真理
 2024 年 6 月 1 日

④ JCR ミッドサマーセミナー2024

Expand your horizons beyond the legacy 『難治性心室頻拍に対する Cardiac-SBRT の展望』 網野真理 2024.7.14

⑤ 第 69 回日本不整脈心電学会
 教育講演8「心電図診断を極める 不整脈編」~ セグメントマップを利用した VT ターゲットの予測~
 吉岡公一郎
 2024 年 7 月 18 日

⑥ 第 69 回日本不整脈心電学会
 AF Diagnosis1 Electrocardiographic changes before and after radiotherapy for thoracic tumors
 Mari Amino
 2024 年 7 月 18 日

⑦ 第 64 回日本核医学会学術総会/第 44 回日本核医学技術学会総会学術大会 セッション:5 学会ジョイントシンポジウム「重症不整脈に対する放射線治療」心臓定位放射線治療実現 までの長い道のりを振り返る 吉岡公一郎 2024 年 11 月 9 日

 ⑧ 第 64 回日本核医学会学術総会/第 44 回日本核医学技術学会総会学術大会 セッション:5 学会ジョイントシンポジウム 重症不整脈に対する放射線治療「治療計画と効果判定におけ る核医学検査の重要な役割」
 網野真理
 2024 年 11 月 9 日

⑨ The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Radiation Oncology.
 The ESTRO-JASTRO symposium Radioablation of ventricular tachycardia: From Basics to Clinical Practice and Future Challenges "New developments in arrhythmia radiotherapy revealed by basic experiments "Mari Amino
 2024 年 11 月 22 日

① 日本量子医科学会第4回学術大会
 シンポジウム1(生物)基礎生物研究から新たな治療法へ向けて「重粒子線の心臓治療応用までの道のりを振り返って」
 網野真理
 2024 年 12 月 6 日(金)

① 第89回日本循環器学会シンポジウム

New Technologies for Arrhythmia Treatment "Lessons Learned from Stereotactic Cardiac Radiotherapy for Ventricular Tachycardia with Contraindications to Catheter Access" Mari Amino 2025 年 3 月 30 日(日)

重粒子線誘発の DNA 損傷を指標とした アミノ酸およびアミノ酸誘導体の放射線防護剤の探索

Study of DNA damage induced by heavy ion beam for searching radioprotector candidates

(24J413)

余語克紀^a、松本謙一郎^b、平山亮一^b Katsunori Yogo^a, Ken-ichiro Matsumoto^b, Ryoichi Hirayama^b

Abstract

D-methionine (D-Met), a dextrorotatory isoform of the amino acid L-methionine (L-Met), can prevent oral mucositis and salivary hypofunction in mice exposed to radiation. With the aim of finding the effective radioprotector in addition to methionine, the authors have investigated the effects of selected amino acids and amino acid derivatives which might have radioprotective functions against therapeutic carbon ions. In the present study, we employed reagents A (unpublished data). Radiation is known to cause injury to normal tissue by triggering DNA damage in cells. Thus, this study investigated whether reagents А affects radiation-induced events at the DNA level. We selected plasmid DNA assays to examine this effect in vitro, as these assays are highly sensitive and allow easy detection of DNA damage. Samples of supercoiled pBR322 plasmid DNA mixed with NPs were prepared and irradiated with a Bragg peak beam of carbon ions (~290 MeV/u) with a 6 cm spread. DNA strand breaks were detected by the change in the form of the plasmid and were subsequently quantified by agarose gel electrophoresis. We obtained preliminary results that reagents A showed protective effects on carbon-ion-induced DNA damage. These findings imply that reagents A have good potentials as radioprotectors preventing DNA damages in normal tissues in carbon ion therapy.

1. 研究の目的とバックグラウンド

放射線治療は、高齢化が進むわが国のがん治 療で有効であり、照射技術の高精度化とともに高 線量を投与できるようになった。しかし、腫瘍への 投与線量は、いぜん正常組織への障害が限界と なり、治療効果は必ずしも十分でなく、臨床使用に 耐えうる正常組織の放射線防護剤の開発が待た れる。我々は副作用の少ない放射線防護剤として アミノ酸が有用ではないかと考えた。

とくに D-メチオニンは低 LET 放射線照射または 白金含有抗癌剤による治療の過程で正常組織に 生じる粘膜炎・聴器障害などの予防または軽減効 果が報告されている。さらに、D-メチオニンが重粒 子線照射によって発症するマウスの口腔粘膜・唾 液腺障害に対して有効な放射線防護効果を示す との報告がある。しかし、放射線防護効果の作用 機序は不明であり、先行研究(18J413 課題)では、 重粒子線誘発の DNA 損傷に対する D-メチオ ニンの保護効果の検討を行った。本研究では、 さらに研究を発展させ、重粒子線誘発の DNA 損傷に対する保護効果を一つの指標として、 D-メチオニン以外にも有望なアミノ酸、およ びアミノ酸誘導体がないかどうか探索するこ とを目的とする。

2. 昨年度までに得られている結果

昨年度から、メチオニンの誘導体であるセレノメ チオニン(SeMet)に加え、アミノ酸誘導体の薬剤 A (未発表のため)が放射線保護効果を示すのかどう か、予備実験を始めた。

放射線保護効果を、重粒子線による DNA 分子の 切断能力の違いとして定量化し、比較した。プラス ミド DNA と薬剤 A を混合した PBS 溶液を 0.5ml エ ッペンチューブに封入して重粒子線照射を行った。 効果判定は、放射線によるプラスミド DNA の form 変化を DNA 電気泳動により分離し定量化して行っ た。 DNA 二本鎖切断 (DSB) は直線状、一本鎖切 断 (SSB) は開いた環状、切断なしは超らせん状 DNA のバンドとなるため、照射前後のそれぞれの 割合を算出した。

重粒子線を照射したプラスミド DNA の電気泳動 パターンは、薬剤 A の添加あり/なしで変化した。 線量増加とともに超らせん状 DNA の割合が減り、 DNA 一本鎖損傷が増加したが、薬剤 A の添加で 抑えられた。また、線量増加とともに直線状 DNA の割合が増え、DNA 二本鎖損傷が増加したが、 薬剤 A の添加で同様に抑えられた。

DSB および SSB に対する protection factor の結果から、薬剤 A は、アミノ酸より効果的な放射線防 護効果を示した。薬剤 A は、重粒子線誘発の DNA 損傷に対して、有望な放射線防護剤の候補と考え られる。

3. 今年度の研究内容

本年度は、SeMet が放射線保護効果を示すのか どうか、重粒子線とy線照射の結果を比較し、再 現性を確認するための実験を行った。

照射条件は、HIMAC: 290MeV/u, 6cm-SOBP Middle, LET 50kev/ μ m で実施した。 γ 線は、 60 Co γ線;1.17, 1.33 Mevを用いた。バッファー溶液は、 リン酸緩衝溶液(PBS, pH 7.5)を用いた。SeMet 濃 度は、PBSの場合;0.17, 0.017 mM とした。

照射線量に対して、超らせん状 DNA の割合の 変化、および直線状 DNA の割合の変化のグラフを 作成した。

4. 今年度の研究成果と解析結果

本年度は、SeMet が放射線保護効果を示すのか どうか、重粒子線とy線照射の結果を比較するた めの実験を行った。

重粒子線の線量増加とともに超らせん状 DNA の 割合が減り、DNA 一本鎖損傷が増加したが、 SeMet の添加で抑えられた(Fig.1 上)。また、線 量増加とともに直線状 DNA の割合が増え、DNA 二本鎖損傷が増加したが、SeMet の添加で同様 に抑えられた(Fig. 1 下)。重粒子線誘発のDNA損



Figure 1. Damage yields for plasmid DNA irradiated with carbon ion in the presence of selenomethionine (SeMet) in PBS buffer. Upper panel: Loss of supercoiled plasmid as a function of radiation dose. Lower panel: Increase in linear plasmid as a function of

傷に対して、セレノメチオニンの保護効果はメチオ ニンよりも小さいものの、有望な放射線防護剤の候 補と考えられる。

同様の結果は、y線照射でも得られた(Fig.2)。 y線誘発の DNA 損傷に対して、セレノメチオニン の保護効果はメチオニン同程度であり、重粒子線 照射のときよりも保護効果が大きいことを示唆する データが得られた。線種の違いにより、保護効果に 違いがあるのか、今後は再現性の確認を行う予定 である。

5. まとめ

今年度は、SeMet の放射線保護効果に対して、 重粒子線とy線照射の結果を比較するための実 験を行った。重粒子線とy線誘発の DNA 損傷に 対して、SeMet が保護効果を示す程度は異なるも のの、保護効果を示唆するデータを得ることができ、 有望な放射線防護剤の候補と考えられる。



Figure 2. Damage yields for plasmid DNA irradiated with gamma rays in the presence of selenomethionine (SeMet) in PBS buffer. Upper panel: Loss of supercoiled plasmid as a function of radiation dose. Lower panel: Increase in linear plasmid as a function of

a. 名古屋大学大学院医学系研究科

b. 量子科学技術研究開発機構(QST)

研究成果一覧

重粒子線誘発の DNA 損傷を指標としたアミノ酸およびアミノ酸誘導体の放射線防護 剤の探索

(21J413, 余語克紀)

なし

Study on the structure of DNA damage induced by heavy ion beam and the structure of track ends

(22J433)

中野敏彰^a, 赤松憲^a, 鹿園直哉^a, 香崎正宙^b, 廣本武史^c, 平山亮一^d

Toshiaki Nakano^a, Ken Akamatsu^a, Naoya Shikazono^a, Masaoki Kohzaki^b, Takeshi Hiromoto^c,

Ryoichi Hirayama^d

Abstracts

Ionizing radiation induces clustered DNA damage, which is challenging to repair. This study investigated the repair pathways of X-ray (low-LET) and Fe-ion (high-LET) radiation-induced clustered DNA damage in human TK6 cells using atomic force microscopy (AFM) visualization. We categorized lesions into simple base damage clusters (BDCs), complex BDCs, and complex double-strand breaks (DSBs). AFM imaging revealed that base excision repair (BER) is essential for repairing simple BDCs, while nucleotide excision repair (NER) also contributes to complex BDC removal. Notably, NER-deficient cells accumulated complex BDCs, underscoring its critical role in processing these lesions. Complex DSBs, strongly associated with radiation lethality, were primarily repaired by homologous recombination (HR), with minimal contribution from nonhomologous end joining (NHEJ). While X-ray-induced complex DSBs were repaired within 18 hours, Fe-ion-induced complex DSBs persisted, highlighting the difficulty of repairing densely clustered lesions. A transient increase in complex DSBs at 1 hour post-irradiation suggests that some BDCs are converted into DSBs by DNA glycosylases. Clonogenic survival assays showed that HR- and NHEJ-deficient cells were highly sensitive to Fe-ion radiation. Interestingly, BER single-knockout exhibited greater cells radiosensitivity than wild-type cells, while BER doubleknockout cells showed a similar survival rate to wild-type, suggesting the accumulation of toxic repair intermediates. These findings provide insights into clustered DNA damage repair mechanisms, emphasizing the therapeutic potential and risks of high-LET radiation. Understanding repair pathway modulation could aid in optimizing radiation therapy strategies.

Background and objectives of the experiment

Heavy-ion therapy, a type of radiation cancer treatment using carbon ions and other heavy particles, is recognized as an advanced and highly effective approach due to its superior physical and biological properties. Unlike conventional X-ray or proton therapy, heavy-ion radiation delivers a highly localized dose to the tumor, enabling precise targeting of cancer cells while minimizing damage to surrounding healthy tissues. Additionally, it exhibits a higher relative biological effectiveness (RBE) compared to photon-based radiotherapy, inducing more complex and difficult-to-repair DNA damage, which enhances cancer cell lethality. Previous studies indicate that heavy-ion irradiation generates clustered DNA damage, including single-strand breaks (SSBs), double-strand breaks (DSBs), and base modifications. These lesions are significantly more challenging for cellular repair systems than those caused by conventional low-linear energy transfer (LET) radiation. Among them, DSBs are considered the most severe, as their improper repair can lead to chromosomal aberrations, mutations, and ultimately cell death. When cancer cells sustain irreparable DSBs, they undergo apoptosis, mitotic catastrophe, or necrosis, leading to therapeutic success. However, despite its effectiveness, heavy-ion therapy does not always achieve complete tumor eradication, as some cancer cells exhibit resistance to radiation-induced cell death. This resistance may stem from the repair of specific DNA lesions, particularly complex DSBs with additional base modifications at their ends. If successfully repaired by endogenous DNA repair mechanisms, these lesions may reduce the overall efficacy of the treatment. While multiple pathways, including nonhomologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR), contribute to DSB repair, the mechanisms governing the processing of complex DSBs with additional base damage remain poorly understood.

Summary of the previous year

Established of Direct observation of individual DNA damages

To elucidate these mechanisms in detail, it is essential to analyze individual DNA lesions separately. Therefore, we established a method for the direct observation of DNA damage. In this approach, DNA was extracted from irradiated human lymphoblastoid (TK6) cells and treated with DNA glycosylases (hOGG1, hNTH1) to cleave sites containing damaged bases. To specifically label abasic sites (AP sites) where bases had been excised, we used an aldehyde-reactive probe (ARP). The DNA samples were then digested with restriction enzymes to obtain fragments suitable for atomic force microscopy (AFM) observation. This process generated both damaged and undamaged DNA fragments. To selectively isolate the damaged DNA fragments, we employed magnetic beads coated with avidin, which strongly binds to ARP-labeled sites. This allowed the enrichment of DNA fragments containing

lesions. Finally, the purified DNA fragments were visualized using AFM. By quantitatively comparing these results, we successfully identified different types of radiation-induced DNA damage. Using this method under various experimental conditions, we examined which types of DNA lesions are repaired by specific repair pathways, enabling the molecular-level analysis of individual DNA damage events (1-3).

Clustered DNA Damage Induced by X-rays and Fe-ion Beams.

Atomic force microscopy (AFM) analysis revealed that Fe-ion beams induced a higher proportion of complex DNA lesions compared to X-rays. Complex base damage clusters (BDCs) and complex double-strand breaks (DSBs) were significantly more frequent in Fe-ion-irradiated cells, indicating that high-LET radiation generates structurally challenging damage. Although the total number of lesions per base pair was lower for Fe-ion beams than X-rays, the proportion of complex damage was higher, suggesting a greater biological impact (4).

Activities and results in FY 2024

Repair Kinetics of Clustered DNA Damage

To identify the repair pathways responsible for processing complex DSBs, genetically modified human TK6 cell lines deficient in either NHEJ or HR-the two primary DSB repair pathways-were employed. The repair kinetics of high-complexity DSBs in these mutant cells were analyzed, revealing that DSBs containing base damage were significantly more difficult to repair than simple DSBs. Furthermore, in NHEJ-deficient mutant cells (Figure 1, red line), the repair rate of complex DSBs was comparable to that observed in wild-type cells (Figure 1, black line), indicating that NHEJ does not play a major role in repairing these lesions. In contrast, in HR-deficient mutant cells (Figure 1, blue line), the repair process was markedly delayed, demonstrating that high-complexity DSBs containing base damage are predominantly repaired via homologous recombination (HR). These findings provide direct evidence that repair resistant DSBs are defined by the presence of base damage at the DNA termini and that these DSBs cannot be efficiently processed by NHEJ but require the more complex HR pathway for repair. This study represents a significant advancement in the understanding of the mechanisms governing the repair of severe DNA damage. By elucidating the repair dynamics of complex DSBs at the nanoscale level, novel insights into how heavy-ion radiation induces cellular damage and ultimately leads to cell death are provided. Furthermore, this knowledge is highly relevant for optimizing heavy-ion cancer therapy, as it highlights the potential for therapeutic intervention by targeting the repair of lethal DNA damage. The finding that HR primarily repairs repair resistant complex DSBs has significant implications for cancer therapy. In heavy-ion radiation therapy, targeted radiation induces DNA damage in cancer cells, ultimately leading to their elimination. By developing HR inhibitors and combining them with heavy-ion therapy, it may be possible

to suppress the DNA repair capacity of cancer cells, thereby increasing the number of cancer cells undergoing cell death and further enhancing the treatment's efficacy. This represents a novel approach to improving cancer treatment outcomes by specifically targeting cancer cell survival mechanisms. Moving forward, this technology is expected to have broader applications in the medical field, contributing to the development of safer and more effective heavy-ion radiation therapy (5).



Figure 1 Fraction of Complex DSB remaining in DNA repairdeficient TK6 cells post incubation with Fe-ion beams.

Contribution of Different DNA Repair Pathways

Using DNA repair-deficient cell lines, we identified the key pathways involved in clustered DNA damage repair (5):

BER-deficient cells (hOGG1^{-/-}, hNTH1^{-/-}): Delayed repair of isolated BD and simple BDCs, with a lower conversion rate to DSBs, suggesting that BER prevents DSB formation.

NER-deficient cells (XPA^{-/-}): Accumulated unrepaired simple and complex BDCs, indicating a role in processing clustered base damage, but no effect on DSB repair.

HR-deficient cells (MRE11^{-/-}): Showed delayed repair of complex DSBs, with 76% of Fe-ion-induced complex DSBs remaining unrepaired after 18 hours, confirming that HR is the primary repair pathway.

NHEJ-deficient cells (DNA-PKcs^{-/-}): No significant impact on complex DSB repair, suggesting that HR, rather than NHEJ, repairs these lesions.

References

- [1] T. Nakano, et al., Free Radic Biol Med 107, 136-145 (2017).
- [2] X, Xu, et al, Nucleic Acids Res,48(3), e18 (2020)
- [3] Y. Matsuya, et al., Int J Mol Sci., 21(5), 1701 (2020)
- [4] T. Nakano, et al, PNAS, 119, e2119132119 (2022)
- [5] T. Nakano, et al, Nucleic Acids Res, 53. (2024)

affiliation: a QST 関西研, b 産業医科大学, c QST 量子生命, d QST 病院

原著論文

 Deciphering repair pathways of clusterd DNA Damage in human TK6 cells: insights from atomic force microscopy direct visualization, Toshiaki Nakano^{*}, Ken Akamatsu, Masaoki Kohzaki, Masataka Tsuda, Ryoichi Hirayama, Akira Sassa, Manabu Yasui, Mahmoud I. Shoulkamy, Takeshi Hiromoto, Taro Tamada, Hiroshi Ide, Naoya Shikazono^{*}, *Nucleic Acids Research*, 2024, 53, gkae1077

学会発表

招待公演

- Visualization and Biological Iufluences of High-Density DNA Cluster Damage and DNAprotein crosslink damages
 Toshiaki Nakano, Ken Akamatsu, Naoya Shikazono, 福岡 小倉 国際会議場
 第 12 回日本放射線事故・災害医学会年次学術集会 (京大放生研シンポジウム)
 2024 年 9 月 29 日
- 2. 放射線で生じる高密度 DNA 損傷及び DNA 付加体損傷の可視化とその生物影響 中野 敏彰,慶應義塾大学薬学部,共立キャンパス 中講堂
 2024 年度(令和6年度)日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム
 2024 年 6 月 1 日

ポスター発表

1. Visualization and Biological Iufluences of High-Density DNA Cluster Damage and DNA-protein crosslink damages

Toshiaki Nakano, Ken Akamatsu, Naoya Shikazono The 7th QST International Symposium (第 7 回 QST 国際シンポジウム) G MESSE GUNMA 2024/7/24-26

メディア報道

 細胞死を引き起こす DNA の重篤な傷の修復方法を特定~効果的な重粒子線がん治療の 確立につながる可能性~ 量子科学技術研究開発機構 (QST) プレス発表 中野敏彰,赤松憲, 鹿園直哉 https://www.qst.go.jp/site/press/20241220.html 2024 年 12 月

- 重粒子線耐えるがん、DNAの傷修復で残存量研機構 日本経済新聞
 https://www.nikkei.com/article/DGXZQOSG183U50Y4A211C2000000/ 中野敏彰,赤松憲,鹿園直哉
 2024年12月31日
- DNA の傷修復量研機構が解明 重粒子線がん治療効率化 日刊工業新聞 https://www.nikkan.co.jp/articles/view/00735058 中野敏彰,赤松憲,鹿園直哉 2024 年 12 月 23 日

重粒子線による幹細胞のゲノム安定性への影響 Effect of heavy ion beam exposure to the genome stability in stem cells (22J444)

島田幹男^a、平山亮一^b M. Shimada^a, and R. Hirayama^b

Abstract

Stem cells and pluripotent stem cells have unique molecular mechanisms to maintain undifferentiated state. Although, it is thought that genome maintenance systems such as DNA repair, and chromosome segregation are regulated to prevent chromosome aberrations in stem cells, details of its's molecular mechanisms remain unclear. In this study, we aimed to identify the difference of radiation response between high LET irradiation and low LET irradiation in stem cells.

1. 研究の目的とバックグラウンド

組織幹細胞および多能性幹細胞は未分化な状態を 維持するために分化細胞とは異なる分子制御機構が 働いている。特に DNA 修復、染色体分配をはじめ とするゲノム安定性維持機構は染色体異常が生じな いように幹細胞では厳密に制御されていることが予 想されるが、その分子メカニズムに関しては不明な 点が多い。研究代表者はこれまで幹細胞のモデルと してヒト iPS 細胞を用いて放射線応答機構の解明に 従事してきた。iPS 細胞は再生医療のために宇宙空 間で培養し、組織オルガノイドを作成する計画が宇 宙航空研究開発機構 (JAXA) で進んでいるが、宇宙 空間におけるバックグラウンドレベルの放射線被曝 は地球上よりはるかに高い。そこで、本研究では、 がん細胞株などで報告されているラジカルスカベン ジャーによる放射線防護効果が iPS 細胞でもみられ るかどうかの検討を行った。

2. 昨年度までに得られている結果

昨年度まで2年継続して研究を実施しており、今 年度は最終年の3年目にあたる。昨年度までに DMSOを用いた放射線防護効果の検討を iPS 細胞に おける炭素線照射後の影響を中心体過剰複製と多極 性細胞分裂を指標として評価した。その結果、DMSO は iPS 細胞では分化細胞と比較して優位に中心体過 剰複製と多極性細胞分裂の頻度が増加することを確 認した(図1)。

3. 今年度の研究内容

昨年度までの結果として DMSO はガンマ線ある

いは炭素線照射後に中心体の過剰複製を指標として 放射線防護効果を持つことを示していた。今年度は それらに加えて DNA 損傷を指標として iPS 細胞に おける DMSO の放射線防護効果の検討を行った。

4. 今年度の研究成果と解析結果

U2OS、iPSCs (C2)、iPSCs から分化誘導した神経 前駆細胞に炭素線 2Gy を照射後、30 分間培養し免 疫染色を行った。炭素線照射 30 分前に DMSO 0.1M を培地に加え、DMSO の放射線防護作用を検証した。 放射線作用の指標として DNA 二本鎖切断のマーカ ーであるγH2AX 抗体を用い、細胞核を DAPI で染色 した。ガンマ線照射後、細胞あたりのγH2AX の DNA 損傷フォーカスの数は増加したが、DMSO 処理をし た細胞ではいずれの細胞でもフォーカス数が少なか った。さらに炭素線照射においてもガンマ線と同様 の効果が見られ、DMSO 処理をした細胞は炭素線単 独よりもγH2AX のフォーカス数が抑制されたこと から放射線防護作用が確認された。

図 1 U2OS、iPSCs、NPCs におけるガンマ線照射後



の DNA 損傷の増加と DMSO による抑制効果

(A) 放射線照射および放射線照射と DMSO 処理後 30 分に細胞を固定し、γH2AX 抗体を用いて免疫染色を 行った。(B) 細胞核一つあたりのγH2AX フォーカスの数 を計測しグラフ化した。



図 2 U2OS、iPSCs、NPCs における炭素線照射後の DNA 損傷の増加と DMSO による抑制効果

(A) 放射線照射および放射線照射と DMSO 処理後 30 分に細胞を固定し、γH2AX 抗体を用いて免疫染色を 行った。(B) 細胞核一つあたりのγH2AX フォーカスの数 を計測しグラフ化した。 今年度は DNA 損傷を指標として DMSO の放射線 防護作用が iPS 細胞においても認められることが明 らかとなった。昨年度実施した中心体を指標とした 放射線防護効果と本年度の結果は論文としてまとめ Radiation Research 誌に掲載された。

参考文献

Dimethyl sulfoxide attenuates ionizing radiation-induced centrosome overduplication and multipolar cell division in human-induced pluripotent stem cells <u>Mikio Shimada (責任著者)</u>, Ryoichi Hirayama, and Yoshihisa Matsumoto Radiation Research, 2024, Oct 1;202(4):719-725. doi: 10.1667/RADE-24-00069.1.

a. 東京科学大・総合研究院・ゼロカーボン研

b. 量子科学技術研究開発機構 QST 病院

重粒子線による幹細胞のゲノム安定性への影響 (22J444) 島田幹男

(学会及び研究会口頭発表等)

学会発表

〇印が発表者

70th Annual Meeting of Radiation Research Society (米国放射線影響学会) アリゾナ州ツーソン 2024 年 9 月

 $\label{eq:analysis} $$ Analysis of DNA damage response after ionizing radiation exposure in cerebral organoid derived from hiPSCs $$ Interval of the second secon$

O<u>Mikio Shimada</u>, and Yoshihisa Matsumoto

第61回 アイソトープ・放射線研究発表会 2024年7月
 「ヒト iPS 細胞における中心体異常を指標とした DMSO による放射線防護効果の評価」
 ○<u>島田 幹男</u>、平山 亮一、松本 義久

論文発表

Dimethyl sulfoxide attenuates ionizing radiation-induced centrosome overduplication and multipolar cell division in human-induced pluripotent stem cells

Mikio Shimada(責任著者), Ryoichi Hirayama, and Yoshihisa Matsumoto

Radiation Research (米国放射線影響学会誌), 2024, Oct 1;202(4):719-725. doi: 10.1667/RADE-24-00069.1.

量研機構医学生命学部門(千葉)との共同研究、プレスリリース済み

高 LET 放射線照射によって刻まれる DNA 変異 Mutational signatures induced by high LET radiation (23J446) 高田慶一 ^{ab}、佐井星^o、イ グニル ^{ab}、サン ユービン^a Kei-ichi Takata ^{ab}, Sei Sai ^c, Geunil Yi ^{ab}, Yubin Sung^a

Abstract

Radiotherapy with high linear energy transfer (LET) radiation (e.g. carbon ions) is more lethal than corresponding doses of low LET radiation types (e.g. x-rays). However, it is not clearly understood how DNA double-strand breaks (DSBs) caused by high LET radiation are processed in mammalian cells. Elucidating how radiotherapy-induced DSBs are processed in human cells would help improve therapeutic approaches. Cells sometimes repair DNA damage at the expense of DNA mutation accumulation. We aim to monitor DNA repair pathways that cope with radiotherapy-induced DSBs by determining unique DNA mutation signatures enriched after low and high LET irradiation.

1. Research objectives and background

DNA polymerase θ (POLQ) is a key factor for thetamediated end-joining (TMEJ) and is a distinctive DNA polymerase characterized by two unique activities. POLQ is capable of performing translesion DNA synthesis (TLS) across AP sites and Tg, and microhomology-mediated endjoining (MMEJ) (**Fig. 1**). These two activities are suitable for the end-joining of complex DSBs, POLQ is able to bypass the DNA damage of complex DSBs while performing MMEJ (1). Indeed, POLQ^{-/-} human cells were hypersensitive to high LET radiation, which can cause complex DSBs (1).

In addition to TMEJ, cells utilize other pathways for DSB repair, including non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). Since base damage near DSBs of complex DSBs inhibits end-joining, most complex DSBs are likely to be repaired after removing DSB-proximal DNA damage by DNA end resection (2-5). This explains why the effect of HR deficiency in the repair of high LET-induced DSBs was greater than that observed for low LET-induced DSBs (6, 7). However, the differential contribution of the TMEJ, NHEJ and HR pathways to the repair of high LET-induced DSBs remains to be determined.

Given the unique role of POLQ in repairing complex DSBs, it could be a promising target to increase the radiosensitivity of cancer cells in high LET therapy. This therapeutic approach could be particularly effective for cancers that rely on POLQ activity to process high LET- induced DSBs. Since POLQ introduces mutations during end-joining (δ), we hypothesize that POLQ activity could be monitored by detecting specific mutation patterns or signatures generated by POLQ following high LET irradiation. Identifying these mutation patterns or signatures may serve as a valuable diagnostic tool for pinpointing cancers that are highly responsive to high LET



microhomology-mediated end-joining (MMEJ).

radiation therapy upon POLQ inhibition.

2. Previous research results

Contribution of different DSB repair pathways in defense against low and high LET-induced DNA damage

To compare the role of TMEJ with other DSB repair pathways in response to low and high LET-induced DNA damage, we used CRISPR/Cas9 to knock out the essential non-homologous end joining (NHEJ) gene LIG4 and RNA interference (RNAi) to knock down the essential homologous recombination (HR) gene BRCA2. The calculation of RBE values confirmed that cells deficient in TMEJ or HR were more sensitive to higher LET radiation (Fe-ion > C-ion > x-ray), while NHEJ-deficient cells exhibited similar sensitivity to both low and high LET radiation (note: This is an initial observation supported by one or two biological replicates.).

Library preparation and whole-genome sequencing (WGS)

Human osteosarcoma U2OS cell lines deficient in NHEJ, TMEJ, or HR were irradiated by 1 or 2 Gy of x-rays, carbon ions or iron ions. Irradiated cells were harvested and plated at a density of 100-10,000 cells/ 150 mm dish. After at least 14 days incubation, at least 3 colonies were isolated with glass cloning cylinders and transferred to 6-well plates for further expansion. Genomic DNA were extracted and library preparation were performed with MGIEasy FS DNA library prep kit (MGI) according to the manufacturer's instructions. The DNA library was



Figure 2. Whole genome sequence analysis of low and high LET-irradiated cells. Graphical scheme of sample preparation for whole genome sequencing.

sequenced using DNBSEQ-T7. Sequence depths were approximately 40x for all samples (Fig. 2).

Patterns of low and high LET radiation-induced mutations in human cells deficient in different DSB repair pathways



Figure 3. Whole genome sequence analysis of x-ray or carbon ion irradiated cells. Numbers of mutation with indicated deletion and microhomology length, colored with their proportion except 1 or 2 bp deletions shown in bold numbers. The results for x-rays are shown above in red, while those for C-ions are shown below in blue.

We irradiated the WT and DSB repair-deficient cells, isolating at least 3 colonies per cell line for WGS analysis. Our initial observations of all deletions induced by x-ray or C-ion irradiation revealed that 1-2 bp deletions constitute the predominant population among all deletions. Since the loss of a few base pairs can result from various processes such as replication stress or base excision repair, no significant difference was observed in the 1-2 bp deletions between POLQ-/- and LIG4-/- cells (**Fig. 3**).

We next analyzed the deletions from each sample based on deletion size and microhomology length. Two distinct groups of deletions emerged: short deletions (<50 bp) and long deletions (>150 bp). Notably, long deletions associated with 3-6 bp microhomology were prominent in C-ion-irradiated LIG4^{-/-} cells, where TMEJ is active (**Fig. 3**). In contrast, short deletions overlapping with 1-2 bp microhomology were enriched in C-ion-irradiated POLQ^{-/-} cells (**Fig. 3**). Identifying these mutation patterns may serve as a valuable diagnostic tool for pinpointing cancers that are highly responsive to high LET radiation therapy upon TMEJ or NHEJ inhibition.

3. Research plans for this year

We obtained preliminary data from the 2024 experiments. However, isolating cell lines following high LET irradiation proved challenging. While colonies did form after irradiation, some ceased growing shortly thereafter, making it difficult to isolate a single colony for WGS. To improve this process, we plan to modify our methodology. For example, by using an induction medium to stabilize the cell culture post-irradiation or by reducing the irradiation dose to increase the likelihood of establishing viable cell lines for WGS. In addition, the results described here represent an initial observation based on one or two biological replicates. We plan to conduct at least three independent experiments to validate and confirm these findings.

4. Research results and discussion

WGS analysis revealed that high LET radiation induces long deletions (>150 bp) overlapping with 3-6 bp microhomology more in LIG4^{-/-} cells, and short deletions (<50 bp) with shorter microhomology more in POLQ^{-/-} cells, which could serve as diagnostic tools for monitoring end-joining activity and detecting cancers dependent on TMEJ or NHEJ for survival.

References

- G. Yi *et al.*, DNA polymerase theta-mediated repair of high LET radiation-induced complex DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 51, 2257-2269 (2023).
- N. B. Averbeck *et al.*, DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells. *Cell cycle* 13, 2509-2516 (2014).
- A. Shibata *et al.*, Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J* 30, 1079-1092 (2011).
 O. Barton *et al.*, Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-
- Barton *et al.*, Poto-fike kinase 5 regulates Cirr during DiA dublestrand break repair in G1. *J Cell Biol* 206, 877-894 (2014).
 R Biehs *et al.* DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-
- homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol Cell* **65**, 671-684 e675 (2017).
- H. Yajima *et al.*, The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. *DNA Repair (Amst)* 12, 936-946 (2013).
- H. Wang, X. Wang, P. Zhang, Y. Wang, The Ku-dependent nonhomologous end-joining but not other repair pathway is inhibited by high linear energy transfer ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)* 7, 725-733 (2008).
- T. Hwang *et al.*, Defining the mutation signatures of DNA polymerase theta in cancer genomes. *NAR Cancer* 2, zcaa017 (2020).

^{a.} Center for Genomic Integrity, Institute for Basic Science (IBS)

^{b.} Department of Biological Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology (UNIST)
 ^{c.} National Institute of Radiological Sciences

Research achievements for 2024 year

(1) Publications

- 1. Detection of Chromatid Break and Micronucleus Formation Induced by Low- and High-LET Irradiation. <u>Geunil Yi</u>, <u>Takata K</u>. Methods Molecular Biology, 2025, *in press*.
- 2. Measurement of DNA Polymerase and Microhomology-Mediated End-Joining Activities by Gel Electrophoresis and smFRET Techniques. <u>Yubin Sung</u>, Chanwoo Kim, Hajin Kim, <u>Kei-ichi Takata</u>. Methods Molecular Biology, 2025, *in press*.

(2) Proceedings

N/A

(3) Meetings

- 1. <u>Kei-ichi Takata</u>. The tolerance of DNA damage by human mus308 homologs, POLQ and HELQ, 7th DNA polymerases meeting, Warsaw, Poland 8/2024 (oral presentation)
- 2. <u>Kei-ichi Takata.</u> DNA repair mechanisms affecting sensitivity to high-LET radiation, 2nd Radiation Medical Science Future Innovation Symposium, DIRAMS, Kijan, South Korea 3/2025 (invited)
- 3. <u>Kei-ichi Takata.</u> DNA helicase HELQ facilitates fork reversal in response to leading strand gaps, DNA Replication Gaps, Cancer and Disease, Daejeon, South Korea, 4/2025 (oral presentation)

(4) Others

- <u>Kei-ichi Takata.</u> Understanding Cancer Resistance Mechanisms to High-LET Radiation Therapy, Seoul National University Cancer Research Institute Tuesday Seminar, Seoul, South Korea 4/2025 (Seminar)
- 2. Dunbayev Y, Chen YJ, Lee EA, Mukherjee A, Vasquez KM, Chi P, <u>Takata K</u>. HELQ-mediated fork reversal is triggered by DNA replication blockage on leading-strands and causes MRE11-dependent DNA degradation in the absence of BRCA2 or FANCD2. Nucleic Acids Res., *in revision*.

(5) MS/PhD thesis

- 1. **Dulguun Baasan**. Quantitative fluorescent assay system to monitor DNA polymerase theta (Pol θ)-mediated end-joining, 5/2024 (MS thesis, Advisor: Kei-ichi Takata)
- 2. **Valencia Trisna Kim Fortuna**. Investigation of the Molecular Mechanism of DNA Polymerase Theta through Protein-Protein Interactions, 5/2024 (MS thesis, Advisor: Kei-ichi Takata)

重粒子線照射がん細胞と非照射細胞間のバイスタンダー効果を介した生物効果誘導解明

Biological effects through bystander effects between heavy-ion irradiated tumor and unirradiated normal cells.

(24J447)

鈴木雅雄、崔星

M. Suzuki, S.Sai

We have been studying cellular effects using normal/tumor cells irradiated with different ion species, such as helium, carbon, oxygen, and neon ions, and LETs for the quantum scalpel of the QST project. Our final goal is to find radio-biological effects of multi-ion irradiations for realizing efficient irradiation conditions both maximum kill against tumor cells and minimum side effects, such as secondary carcinogenesis, against normal tissue to identify the best way for multi-ion radiotherapy.

Communication of signaling events between heavyion irradiated tumor and unirradiated normal cells is one of the major concerns for radiotherapy. Human lung adenocarcinoma cells and human glioblastoma cells were irradiated with heavy ions. Then unirradiated normal human fibroblasts were co-cultured with the irradiated tumor cells in presence or absence of a gap-junction inhibitor using the transwell permeable support system. Cell death, which was detected a colony-forming assay, and gene mutation at hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) locus were observed in unirradiated co-cultured normal cells in absence of the inhibitor. However, no biological effects were induced in presence of the inhibitor. The preliminary results suggested that the bystander cellular effects were induced in the unirradiated cells through gap-junction-mediated cell-to-cell communication.

1. 研究の目的とバックグラウンド

重粒子線等の高LET 粒子放射線の生物効果がX線 等の低LET 電磁波放射線と比べて高いことは多数の 研究より明確になっているが、そのメカニズムに関 しては不明な点が未だに残っている。その原因解明 として克服しないとならない課題の一つは、イオン ビームが直接照射された細胞と非照射細胞が共存し た微少環境で観察される"放射線照射を受けた細胞 の近傍に存在する非照射細胞にも生物効果が誘導さ れる"として定義される非直接的照射効果(バイス タンダー効果)の関与が挙げられる。

重粒子線がん治療は、イオンビームの物理学的特性 から標的とする腫瘍組織に集中してエネルギーを与 え、同時に周囲の正常組織へのエネルギー付与を極 力抑えることが出来る QOL の高い治療法の一つであ る。しかしながら、バイスタンダー効果によるイオ ンビームを照射されたがん細胞の近傍に存在してい る非照射正常細胞又はがん細胞への影響は、ほとん ど研究されておらず、がん治療に直結する(1)照射が ん細胞の近傍に存在する非照射正常細胞への晩発影 響(二次発がんなど)、(2)照射線量が不十分または 当て損なったがん細胞へのバイスタンダー効果による二次的な致死効果誘導による増感効果、に関して は明確な回答を与える研究は乏しく、重粒子線治療 の高度化には今後明らかにする必要のある重要な研 究課題であると考える。

本研究で計画したトランズウエルを用いた実験方 法では、上層の細胞と下層の細胞の組み合わせを異 種の細胞の組み合わせとして実験することが可能と なり、異種細胞間のバイスタンダー効果解析が可能 となる。重粒子線治療では、高LETイオンビーム本 体を腫瘍組織から離れた正常組織に意図的に照射す ることはなく、照射されたがん細胞とその周囲に存 在する非直接照射細胞間のバイスタンダー効果によ る生物効果誘導は、重粒子線治療における生物学的 基礎研究として重要と考え、非照射正常細胞に誘導 される致死効果と非致死効果(遺伝子突然変異)の 誘導に関して、ギャップジャンクションを介した細 胞間情報伝達経路に焦点を絞り、重粒子線治療にお ける異種細胞間の二次的な生物効果の関与を明らか にすることを目的として計画した。

2. 前年度までに得られている結果のまとめ

課題初年の2024年度は、炭素イオンのマシンタイムを2回、ネオンイオンのマシンタイムを2回の配分を受けた。(うち炭素イオン1回はマシントラブルのため実験出来ず。)照射実験の回数が少ないため現段階で実験結果の結論を導くことは出来ないが、それぞれのデータを以下に示す。

本研究には、重粒子線を照射するヒト由来がん細胞 として野生型 P53 遺伝子を保持したヒト肺がん由来 がん細胞株(A549)と変異型 P53 遺伝子を保持した ヒトグリオブラストーマ由来がん細胞株(T986)を 用いた。また非照射正常細胞として野生型 P53 遺伝 子を保持したヒト皮膚由来正常線維芽細胞(NB1RGB) を用いた。非照射正常細胞の致死効果としてコロニ 一形成法による細胞増殖死を検出した。また非致死 効果としてヒトX染色体上にマップされるヒポキサ ンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(*HPRT*)遺 伝子座を標的として、6チオグアニン耐性コロニー の出現頻度より遺伝子突然変異を計数し突然変異誘 発頻度を評価した。

がん細胞への炭素イオン照射は、バイナリーフィル ター 144.53mm で LET が 56keV/µm のビームを用い た。がん細胞へは 0.1Gy の照射を行った。非照射正 常細胞へのバイスタンダー致死効果は、炭素イオン を照射したがん細胞との co-culture で明らかな誘 導が観察された。その効果は、ギャップジャンクシ ョン阻害剤を併用することで消失した(図1)。バイ スタンダー突然変異誘発効果も致死効果同様、コン トロールに対して高い頻度を示し、ギャップジャン クション阻害剤を併用することによってコントロー ルレベルに復帰した(図1)。照射がん細胞の P53 遺 伝子ステータスは、A549 が野生型で、T986 が変異型 であるが、今回得られた結果から照射されたがん細 胞の P53 遺伝子ステータスは、非照射正常細胞への バイスタンダー効果誘導には影響しないことが示唆 された。

ネオンイオン照射は、バイナリーフィルター 0.00mm でLET が 30keV/µm のビームを用いた。がん 細胞へは 0.1Gy の照射を行った。非照射正常細胞へ のバイスタンダー致死効果は、ネオンイオンを照射 した細胞との co-culture で僅かではあるが誘導さ れる傾向にあり、その効果はギャップジャンクショ ン阻害剤を併用することで消失した(図2;4/30/24 のマシンタイム結果、図3;3/5/25のマシンタイム 結果)。一方、バイスタンダー突然変異誘発効果は、 何れの照射がん細胞との co-culture においても、コ ントロールに対して高い頻度を示し、ギャップジャ ンクション阻害剤を併用することによって効果は減 少した(図2;4/30/24のマシンタイム結果、図3; 3/5/25のマシンタイム結果)。

2024 年初年度で得られた実験結果は独立した照射 実験回数が少ないため現段階で結論を導くことは出来 ないが、プレリミナリーなデータとして、重粒子線照射さ れたがん細胞からギャップジャンクションを介した細胞 間情報伝達機構が関与したバイスタンダー効果によっ て非照射正常細胞にも生物効果が誘導されることが示 唆された。





図1. 炭素イオン(10/9/2024 マシンタイム) 照射がん細胞と非照射正常細胞をトランズウエルを用いて co-culture した時のギャ ップジャンクション経由細胞間情報伝達機構を介した非照射正常細胞へのバイスタンダー効果誘導(それぞれの細胞の左図が致死、 右図が突然変異)。横軸は、(1) 0Gy、(2) 0.1Gy、(3) 0Gy + ギャップジャンクション阻害剤、(4) 0.1Gy + ギャップジャンクショ ン阻害剤を示す。







図3. ネオンイオン(3/5/2025 マシンタイム) 照射がん細胞と非照射正常細胞をトランズウエルを用いて co-culture した時のギャ ップジャンクション経由細胞間情報伝達機構を介した非照射正常細胞へのバイスタンダー効果誘導。横軸は、図1と同じ。 研究成果一覧(24J447)

(原著論文)

なし

(国際研究集会などの Proceedings) なし

(学会及び研究会口頭発表、ポスター発表等)

- 鈴木雅雄、舟山知夫、鈴木芳代、佐井星:炭素イオン照射がん細胞と非照射正常細胞間のギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達による P53 非依存的バイスタンダー効果誘導。第61回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、前橋市、2024.5.17。
- 2) 鈴木雅雄、佐井星: Bystander effects via cell-to-cell communication between carbon-ion irradiated tumor and unirradiated normal cells. 第83回日本癌学会学術総会、福岡市、2024.9.19-21。
- 3) 鈴木雅雄、舟山知夫、鈴木芳代、佐井星: *P53*-independent bystander cellular effects through secreted factor(s) between carbon-ion irradiated tumor and non-irradiated normal cells. 日本放射線 影響学会第 67 回学術大会、北九州市、2024.9.25-28。

<u>(その他)</u> なし

<u>(学位論文)</u> なし

慢性低酸素細胞に関する粒子線基礎生物研究

Basic biological research on chronically hypoxic cells using particle beams (24J468)

平山亮一^a、小泉凱也^{a,b}、間宮大晴^a、實川佳那^{a,b}、岡部凜^a、劉 翠華^a、鵜澤玲子^a、吉田茂生 ^b、伊藤敦^b、小西輝昭^a、長谷川純崇^a

Ryoichi Hirayama^a, Gaiya Koizumi^{a,b}, Taisei Mamiya^a, Kana Jitsukawa^a, Rin Okabe^a, Cuihua Liu^a, Akiko Uzawa^a, Shigeo Yoshida^b, Atsushi Ito^b, Teruaki Konishi^a, Sumitaka Hasegawa^a

Abstract

We have analyzed the biological effects of heavy ion beams in mammalian cultured cells under oxygen and anoxic conditions, classified by radiation actions (direct and indirect actions), and clarified the mechanism of the large RBE (relative biological effectiveness) and small OER (oxygen enhancement ratio) of heavy ion beams from the perspectives of radiation chemistry and biology, using DNA repair-deficient cells. CHO cells were cultured in 1% hypoxia for two days prior to irradiation, irradiated with carbon-ion beams (14 keV/ μ m) under 1% hypoxic condition, and then cultured under 1% hypoxic condition.

The effect of hypoxia during colony formation did not have a significant impact on cell survival.

1. 研究の目的とバックグラウンド

研究代表者は今まで有・無酸素状態の哺乳動物培 養細胞における重粒子線生物効果を放射線作用別 (直接作用と間接作用)に解析し、DNA 修復欠損細胞 を用いて重粒子線の大きい RBE(生物学的効果比)や 小さいOER(酸素増感比)のメカニズムを放射線化学な らびに生物学的に明らかにしてきた。生物効果は LET に依存して変化するが、同一LET 値において粒子種の 違いによる生物効果の違いも報告され、解析を進めて いる。そこで前課題では取り組んでいなかった新たな低 酸素課題について研究を進める予定である。

2. 昨年度までに得られている結果

前課題までは低酸素ガスを使った急性低酸素下 (0%酸素濃度)での重粒子線照射における CHO 細胞 での初期 DSB 量、修復 5 時間後の残存 DSB 量、微小 核形成頻度を調べてきた。

3. 今年度の研究内容

今年度(1年目)はこれまでの実験と同様に CHO 細胞を用いて、48時間1%酸素濃度の長期間低酸素環境 下で培養した後に、1%酸素濃度のまま重粒子線照射 を行い、照射後も1%酸素濃度のままコロニー形成法を 行い、2週間後の細胞生存率を測定した。対照実験とし て、長期間低酸素環境下で培養した CHO 細胞を照射 の直前で 21%酸素濃度環境下(大気下)に戻し、重粒 子線照射を行い、大気環境下でコロニー形成法を行う。 また、上述のように低酸素下照射-低酸素下培養(これ を H-H 実験とする)や大気下照射-大気下培養(これを O-O 実験とする)に加え、低酸素下照射-大気下培養 (H-O 実験)の 3 つの低酸素実験を整理することで、1) 照射時の慢性低酸素細胞の影響と2)低酸素環境下での放射線障害からの回復を明らかにした。

4. 今年度の研究成果と解析結果

慢性低酸素の重粒子線生物応を明らかにするため、 1%酸素濃度での照射2日前から培養を開始し、1%酸 素濃度の状態で重粒子線照射容器にサンプルを封入 し、その状態で炭素線照射(14 keV/µm)を行った(図1)。 照射後、1%酸素濃度環境下でサンプルを取り出し、コ ロニー形成法を行い、2週間1%酸素濃度で培養しコロ ニー数を計測した。



図 1. 炭素線(14 keV/μm)照射スケジュール。大気下 照射-大気下修復(H-O)、低酸素下照射-大気下修 復(H-O)と低酸素下照射-低酸素下修復(H-H)。

O-O と H-H の生存率曲線から、10%生存率での線 量比から求めた OER は 1.3 であった。X 線では 2.0 で あったため、炭素線では酸素効果が小さくなることを確 認した。また、H-O と H-H での 10%生存率での線量比 は 0.99 であり、照射後の酸素濃度の違いは細胞生存 率に大きな影響を与えないことが確認された。今後は 中・高 LET 領域でも同様の傾向を示すのか否かを明ら かにする予定である。



図 2. 炭素線(14 keV/µm)照射での、大気下照射-大気下修復(H-O)、低酸素下照射-大気下修復 (H-O)と低酸素下照射-低酸素下修復(H-H)条件で の細胞生存率曲線。(n>4)

a.量子科学技術研究開発機構(QST) b.東海大学(Tokai Univ.)

研究成果一覧

243468 平山亮一

(口頭発表)

- 1. Gaiya Koizumi, Ryoichi Hirayama, Haruka Sawada, Kouki Morita, Atsushi Ito, Shigeru Yoshida: Analysis of radiobiological response to hypoxic DNA repair-deficient cells. 日本放射線影響学会第 67 回大会、福岡、2024.09.25
- 小泉凱也、平山亮一、澤田陽加、森田光紀、伊藤敦、吉田茂生: 低酸素下培養における放 射線誘発微小核形成に対する 放射線線質効果に関する研究、第 61 回アイソトープ・放射線 研究発表会、東京、2024.07.03

(講師)

- 第 3 回放射線防護のための生命科学コース「重粒子線の生物影響」、講師、QST 内、 2025.02.25
- 原子力・放射線概論(2024 年ウインターセッション) 重粒子線生物学の基礎、講師、東海大学(オンライン)、2025.02.12
- 原子力・放射線概論(2024 年サマーセッション) 重粒子線生物学の基礎、講師、東海大学 (オンライン)、2024.07.30

(学位)

1. 小泉 凱也 東海大学大学院工学研究科:「低酸素環境下における染色体を指標とした放射 線影響研究」修士号

粒子線による DNA 損傷と突然変異誘発機構の分子レベルでの解析 Molecular analysis of ion beam-induced DNA damage and mutations.

(24J472) 松尾陽一郎 ª、泉佳伸 ^b、清水喜久雄 ^b、下川卓志 [。] Y. Matuo^a, Y. Izumi^b, K. Shimizu^b, T. Shimokawa[°]

Abstract

Our research group has been studying ion beam-induced mutation of the budding yeast, S288c (RAD^+) , as a model of eukaryote cells. Yeast cells were grown in a YPD medium and irradiated with carbon ion beams (290 MeV/u, LET: 13 keV/ μ m) with doses of 50 - 200 Gy at HIMAC-QST, Japan. We examined the survival rate and mutagenesis rate of $ku70^-$ strain, which are nonhomologous end joining repair (NHEJ) deficient by irradiation with carbon ion beams. The survival rate of yeast lacking NHEJ was similar to that of the wild strain. This result indicates that NHEJ is not important for yeast cell survival. In contrast, our results suggest that NHEJ suppresses mutagenesis caused by particle ion beam irradiation.

In a 2024 study, the can1- mutants are isolated from the L-Canavanine plates were cultured, and chromosomal DNA was isolated. The sequence of the entire CANI gene region (1773 bp) was examined for base alterations in RAD^+ and $ku70^-$ (NHEJ-inactive) strains. Carbon ion beams induced deletion mutations in the RAD^+ strain, whereas substitution mutations in the $Ku70^{\circ}$ strain. This is thought to be related to the fact that the $Ku70^{-}$ strain uses homologous recombination repair rather than nonhomologous end-joining repair to repair DNA double-strand breaks. "Hot spots" where mutations likely occur at the same position were identified in the RAD^+ strain. There is not enough data on sequence analysis of the Ku70 strain, so we plan to continue experiments in the future.

1. 研究の目的とバックグラウンド

がん治療をはじめとする医療応用や遺伝子資 源の開発などの分野において、ガンマ線と比較

して重粒子線の優位性が明らかになっている。 細胞の生死および突然変異誘発にとって重要と なる DNA の損傷が、重粒子線照射の場合、特 異的な構造や空間分布を持つことが推測される ¹⁾。21J472 課題では、出芽酵母(S. cerevisiae) S288c株の細胞やDNA を対象として、重粒子 線照射による生体効果の研究、特に細胞致死お よび突然変異生成に関するメカニズムの解明の ために、炭素線照射による酵母細胞の URA3 遺伝子座および CAN1 遺伝子座での突然変異 の頻度および変異スペクトルを分析した。また、 修復遺伝子不活性株を用いて生存率、突然変異 誘発頻度を評価した。さらに、リアルタイム PCR 法により、炭素線照射による DNA 鎖の損 傷量を評価した(紙面の都合上、本報告書では割 愛した)。

2. 昨年度までに得られている結果

Ku70 不活性株(*ku70*:非相同末端結合修復 不活性株)および *RAD52* 不活性株(*rad52*:相 同組換修復不活性株)に炭素線 (LET:13.3keV/ μm)を照射した場合の生存率および、*URA3* 遺 伝子での突然変異誘発頻度を解析した。

Ku70 不活性株の感受性は RAD⁺株と類似した。また、Ku70 不活性株は、RAD⁺株と比較して 170 倍の自然突然変異が誘発した。さらにku70 株の突然変異誘発頻度は、吸収線量の増加に伴って上昇した。一方で、RAD52 不活性株の 突然変異誘発頻度は吸収線量の上昇に伴って上昇せず一定となった。

炭素線(290 MeV, LET:13 keV/µm, 100 Gy)を 修復遺伝子の活性が失われていない RAD⁺株に 照射した場合の ura3 変異体に対し、URA3 領域 を含む塩基配列を増幅し、シーケンス解析を行 った。誘発された突然変異の位置と変異の種類 を特定した結果、G:C→T:A、A:T→T:A の置換 変異、および塩基の挿入及び、欠失変異はガン マ線照射の場合¹⁾よりも炭素線照射において誘 発されやすい傾向であることが示された。

3. 今年度に得られた結果

これまで解析対象としてきた遺伝子である URA3¹⁾と比較して、近傍に重要な遺伝子を持 たないため大きな領域が欠失した場合でも検出 が可能であると推測される CAN1 遺伝子(原形 質膜でのアルギニン透過酵素活性に関与)に対 するシーケンス解析を行い、炭素線を照射した 場合の突然変異スペクトルについて評価した。 サンプルは修復遺伝子の活性が失われていない RAD⁴株、および Ku70 不活性株(ku70:非相 同末端結合修復不活性株)である。

シーケンス解析の結果を表1に示す。RAD 株では欠失変異が主に誘発しているが、Ku70 株では置換変異が主に誘発していることが示さ れた。これはKu70-株ではDNA二本鎖切断の 修復の際に非相同末端結合修復ではなく 相同組換修復が用いられていることが関係し ていると考えられる。つまり、非相同末端結合 修復の際に生じる損傷領域の欠損が、*RAD*株 での塩基の欠失として現れたものと考えられる。 また、*CANI*遺伝子上での変異した位置につい て図1に示す。同じ位置で変異が局在化した" ホットスポット"は、*RAD**株では確認できた。 このホットスポットはガンマ線では見られない ことが分かっている¹⁾。*Ku70*株での変異位置 の局在については、*Ku70*株でのシーケンス解 析に関するデータの蓄積が少なく、今後 HJ408 課題として実験を継続して明らかにする計画で ある。

参考文献

[1] Y. Matuo, *et al.*, *Mutation Research*, 810, 45-51 (2018).

- a. 福井大学 学術研究院工学系部門 原子力 安全工学講座
- b. 福井大学 附属国際原子力工学研究所
- c. 量子科学技術研究開発機構 量子医科学研究所 物理工学部 粒子線照射効果研究グループ

		RAD +		Ku70 -	
Ту	pe of mutation	Number	Percentage(%)	Number	Percentage(%)
В	Base substitution				
	Transversions				
	G:C to T:A	2	6.3	0	0.0
	G:C to C:G	1	3.1	1	14.3
	A:T to C:G	1	3.1	0	0.0
	A:T to T:A	1	3.1	3	42.9
	Transitions				
	G:C to A:T	0	0.0	2	28.6
	A:T to G:C	3	9.4	0	0.0
	Deletions	18	56.3	2	28.6
	Insertions	6	18.8	0	0.0
	Total	32	100.0	7	100.0



図1 炭素線照射による RAD+株および ku70-株での CAN1 遺伝子上での変異位置

(学位論文)

・安藤寛之: 放射線による突然変異誘発に対する LET 効果に関する研究、修士論文、福井 大学大学院工学研究科 (2023). イオンビームによる微生物・植物への変異導入を利用した 基礎研究プラットフォームの構築

Development of a Fundamental Research Platform Based on Ion Beam Mutagenesis 24J501

下川卓志 ª, 西原昌宏 ʰ, 富永晃好 º, 坂本裕一 ª, 櫻井健二 º, 中村郁子 ^f, 宮原平 ª,田中義行 ʰ,戸井田一磨 ⁱ, 長谷純宏 ⁱ, 田地野英宏 ʰ, 水田大輝 ^l,加藤麗奈 ʰ, 杉本貢一 ʰ

T. Shimokawa^a, M. Nishihara^b, A. Tominaga^c, Y. Sakamoto^d, K.Sakurai^e, A. Nakamura^f,

T. Miyahara^g, Y. Tanaka^h, K. Toidaⁱ, Y. Hase^j, H. Tajino^k, D. Mizuta^l, R. Kato^m, K. Sugimotofⁿ

Abstract

Radiation is a known mutagen and has long been used in the field of breeding. As a result, it has succeeded in producing valuable breeds from different organisms and species. Ion beam is expected to become more effective tool for the breeding, because it has unique biological characters such as induction of mutations with wide spectrum. However, the use of ion beam for breeding is still limited.

The principle aim of this project is developing ionbeam breeding to become a commonly-accepted method. We organized a collaborative system with breeding researchers to share the basic results of biological effects of heavy ion beams. This year, ten collaborative groups have joined this project and we have irradiated 47 samples including seeds, pollen, grafts and microbes.

1. 研究目的とバックグランド

高 LET の重イオンビームを用いた育種は、低 LET の光子線やUV、化学物質などの変異原を用 いた従来の突然変異育種技法に比べて変異誘導 頻度の高さと誘導される変異の多様さが特に際 立っており、有用な手技として認識されている。 この分野を牽引してきた理研や旧原研高崎研で は、イオンビームを利用した新品種を多数樹立し、 そのうちいくつかを市場に出すことに成功して いるが、照射施設が限られていることもあり、そ の数は未だ限定的である。さらに、光子線育種品 種を含めて、身近にある多くの品種が放射線を用 いて樹立されたことは一般社会だけでなく研究 者の間でもあまり知られていない。そのため、大 きな利点を持ちながらも、育種研究において重イ オンビームを含む放射線利用は主流ではない。

我々が行っている HIMAC 共同利用研究におい ても、他施設と同様にイオンビームが変異導入に おいて効果的であることが示されているととも に、HIMAC 特有の深い照射野が育種研究に高い 利便性と照射対象の多様化という利点を有する ことが確認されている。しかし、成果が得られる までに長い年月かかる育種研究は他の研究とは 事情が大きく異なり、実施上の問題がいくつか存 在する。様々な生物材料に応じた照射法を確立し、 再現性のある実験系とすることがサイエンスと して重要である。加えて、育種系実験で得られる 多種多様な生物への照射影響データの共有化も 研究推進には必要である。

そこで、これらの問題について検討を進めつつ、 育種目的でのHIMAC利用を効率的に推進する目 的で、本課題を実施している。

2. 昨年度までに得られている結果

J501 として第一期 (15J501)では、本課題での 実験体制を構築し、9 グループが参加し、合計 56 サンプルに対して~400Gy で照射を行った。第二 期(18J501)では、13 グループが参加し、合計 190 サンプルに対し、照射線量を最大 600Gy まで増加 させて照射した。第三期(21J501)の初年度は7 グ ループが参加して 60 サンプルに対して照射を、2 年目は 8 グループが参加して 66 サンプルに対し て、3 年目は 12 グループ 69 サンプルに対して ~600Gy で照射を行った。

3. 今年度の研究内容

前期2回(Fe 500MeV/u x1, C 290MeV/u x1)、後期2回(Ar500MeV/u x1, C 290MeV/u x1)、計5回の利用時間の配分を受けた。

10名の課題分担者(共著者)より送られてきた 48サンプル(種子類19、花粉2、花2、苗・培養 物5、穂木6、菌・細菌類14)に対し、BF=0で1-600Gyを照射し、返送後、各分担先でその影響に ついて発芽率などを指標に測定、それぞれで目標 とする変異株の取得にむけたスクリーニングを 行った。

4. 今年度の研究成果と解析結果

照射室が1室になった影響もあり、本年度も昨 年に続きマシンタイムの配分が例年の半分以下 となり、その影響が大きかった。そのため、使用 する核種を制限し、各参加者より送られてくるサ ンプルの形状を再検討し、照射野の最大限の利用 や大型で時間のかかるサンプルの参加制限など を行う対応をした。一方で、園芸学会などでの広 報活動や FNCA (アジア原子力協力フォーラム) への協力により、今年度は初の海外を含む新規2 グループの参加があった。

植物を対象とした照射実験は、7 グループによ り行われた。(株) CULTA 中村からはイチゴ苗、 京都大 田中からはトウガラシ種子とケイトウ 種子、秋田県大 櫻井からはラッカセイ種子、岩 手生工研/福井県大 西原からはリンドウ、ピーマ ン種子とコムギ種子、静岡大 富永からはストッ ク種子、千葉大 宮原からはニンジン種子、FNCA 長谷からはコムギについて照射後の作業状況や 放射線感受性評価の結果などの中間報告がされ た。静岡大 富永からはナシの穂木への照射実験 の成果として個体識別マーカー取得の報告もさ れている。

微生物を対象とした照射実験は、今年度3グル ープにより行われた。早稲田大 戸井田からはシ アノバクテリア、岩手生工研 坂本からはシイタ ケとウシグソヒトヨタケ、北興化学工業 田地野 からは放線菌の感受性に関する報告があった。

さらに R05 年度以前に照射したサンプルにつ いては、日本大 水田からはトルコギキョウ,高知 工技セ 加藤からは酵母、筑波大 杉本からはト マトのスクリーニング状況や変異株取得とその 解析の進捗について報告があった。

a. 量研機構 量医研 物理工学部

- b. 岩手生物工学研究センター 園芸資源研究部/福井県立大 生物 資源学部
- c. 静岡大学 農学部 地域フィールド科学教育研究センター
- d. 岩手生物工学研究センター 生物資源研究部
- e. 秋田県立大学 生物資源科学部
- f. 株式会社 CULTA
- g. 千葉大学大学院 園芸学研究院
- h. 京都大学 農学研究科 蔬菜花卉園芸学
- i. 早稲田大学 先進理工学部
- j. 北興化学工業株式会社
- k. QST 高崎量子技術基盤研究所/FNCA
- 1. 日本大学 生物資源科学部
- m. 高知県工業技術センター
- n. 筑波大学 つくば機能植物イノベーションセンター

24J501 研究成果一覧

<u>原著論文:</u>

 高橋理緒,八幡昌紀,下川卓志,中塚貴司,富永晃好.イオンビーム照射における元素種および吸収線 量がストック (*Matthiola incana* (L.) R.Br.)の生存率および変異誘発効率に及ぼす影響.園芸 学研究,23(4),251 - 259,2025

<u>記事:</u>

 下川卓志. FNCA 2024 Workshop on Mutation Breeding Project 印象記. アイソトープニュース, 797, 38 - 39, 2025

<u>招待講演:</u>

1. 下川 卓志. Heavy Ion Breeding Research at a Medical Irradiation Facility, HIMAC-QST.FNCA 2024 Workshop on Mutation Breeding Project, FNCA(アジア原子力協力フォーラム), モンゴル, 2024 年 07 月

<u>学会·研究会:</u>

- 1. 志賀由絃, 下川卓志, 富永晃好., キャピラリーゲル電気泳動を用いたニホンナシの AFLP マーカー 検出技術の開発., 日本 DNA 多型学会第 33 回学術集会. 2024 年 11 月, 日本 DNA 多型学会若手研究 賞 受賞
- 2. 望月夏海,下川卓志,富永晃好,イオンビームのオーバーキリング現象がストックに及ぼす影響.令 和6年園芸学会秋季大会 2024年11月
- 3. 島田理暉,下川卓志,磯部祥子,平川英樹,中塚貴司,富永晃好,イオンビーム照射によって得ら れたガーベラ雄性不稔変異体の特徴解析.令和6年園芸学会秋季大会 2024年11月
- 志賀由絃,下川卓志,富永晃好,元素別イオンビーム照射がニホンナシに及ぼす影響.,令和6年園 芸学会秋季大会2024年11月
- 5. 藤田知也,下川卓志,磯部祥子,平川英樹,中塚貴司,富永晃好.,ストックにおける花弁細状化変 異体の分子メカニズム解析.,令和6年園芸学会秋季大会 2024年11月
- 6. 杉本貢一,下川卓志,菊池伯夫,スイートメイ,江面浩.重イオンビーム照射及び速中性子線照射による新規トマト変異体の収集と遺伝的要因の探索.日本育種学会春季大会(第147回講演会),日本育種学会,2025年3月
- 7. 杉本貢一, 菊池伯夫, 下川卓志, スイートメイ, 江面浩. 新たな NBRP トマト変異体リソース・ 速中性子線照射系統/重イオンビーム照射系統の収集. 第66回日本植物生理学会年会,日本植物生 理学会,2025年3月
- 8. 杉本貢一, 菊池伯夫, 下川卓志, 江面浩速中性子線照射および重イオンビーム照射によるトマト 変異体リソース整備.日本農芸化学会 2025 年度札幌大会,日本農芸化学会,2025 年 3 月

9. 西原昌宏,根本圭一郎,リンドウにおける分子育種技術の開発と品種育成. 令和6年園芸学会秋季大会シンポジウム 2024年11月

<u>学位論文:</u>

修士論文:

- 藤田知也:ストックにおける花弁細状化変異体の作出および分子メカニズムの解析」静岡大学農学部 生物資源科学科,2024年度
- 2. 服部太郎:マリモ状ガーベラの作出およびメカニズムの解析」静岡大学農学部生物資源科学科, 2024 年度

卒業論文:

- 永作直也:重イオンビームを照射した紫ニンジンのフラボノイド水酸化酵素遺伝子欠損体の選抜方 法の検討.千葉大学園芸学部応用生命化学科,2024年度
- 2. 奥山大:重粒子線照射を用いた Leptolyngbya boryana の新規運動関連因子の探索,早稲田大学先進理 工学部電気・情報生命工学科, 2024 年度
- 3. 平沢一鉄: Fe イオンビーム照射がトルコギキョウの発育に及ぼす影響.日本大学生物資源科学部生 命農学科, 2024 年度

重粒子線による植物品種識別と突然変異育種に関する研究

Development of cultivar identification method and plant breeding using heavily

ion-beams. (23J503)

松山知樹 [®]、小田切正人 [®]、古川浩二 ^b、下川卓志 [°] T. Matsuyama^a, M. Otagiri^a, K. Furukawa^b and T. Shimokawa^c

Abstract

Mutation induction by ion-beam irradiation is a general-purpose technique used for plant breeding because it has a high LET. On the other hand, some of irradiated plants are phenotypically indistinguishable but have the mutations in their genomic DNA. We will use them and demonstrate the development of 'DNA marks' for cultivar identification, especially in vegetative crops. The following steps allow for mutated cultivar identification and may apply to cultivar identification of various crops after ion-beam irradiation: 1) The and investigation selection of stable morphological characteristics. 2) Detection of DNA mutations by modified random arbitrary primed PCR in non-cording regions; repeated for example, sequences or retrotransposons. In the present study, we have applied to citrus for cultivar identification and mutation breeding.

1. 研究の目的とバックグラウンド

農林水産物の安全・安心に係る信頼確保の ための品種識別については、環境要因に左 右されない DNA マーカーによる取組が有 効である。しかし、栄養繁殖作物では、枝 変わりのような小さな変異でも品種とな るため、原品種と区別できる DNA マーカー 作出は非常に難しい。この状況を打開する ために、イオンビーム照射後、ゲノム DNA の非遺伝子領域からの変異検出を行って 来た。これまでに、キクでは、我々が報告 した変異検出法により、イオンビーム照射 で育成された品種群の識別を実現した¹⁾。 サトイモの多芽体、シンビジウムのPLB(プロトコーム様体 Protocorm like body)でもHIMACでのイオンビーム照射後、育成された植物体群に、キメラ/モザイクのない再生体があり、同じ手法による変異検出事例を報告した²⁾³⁾。これらのDNA多型パターンは、「DNAマーク」として品種内識別レベルの変異検出を実現しており、最初から地域ごとに違う系統を配布することで産地判別も行える。この一連の研究フローを「DNAマーキング」とした。

ここでは、花卉、蔬菜に続き木本作物の カンキツを供試し、変異体の選抜とDNA 多 型検出によるDNA マークを作成した。

2. 昨年度までに得られている結果

本研究では、多胚性かつ四季成り性のシキ キツを供試した。まず、白色胚や翼葉形質 が顕性となるバンペイユを人為交配し、雑 種胚を除いたシキキツ珠心胚由来のクロ ーン実生を照射に供した。根のダメージを 避けるため、シャーレの照射野に向けて芽 を伸ばし、一方で、コリメータを調整し照 射野を遮断した領域に根を張らした試料 を調整した。結果、炭素イオンビーム(290 MeV/u、LET13-20 kev/µm) 50Gy 照射区から 矮性傾向の強い2つの変異体系統を得た。 さらに葉形が丸型・肉厚・濃緑のものをD1、 披針形・凹型の葉形のものを D2 とし、カ ラタチを台木とした接ぎ木増殖を行い、 DNA 多型解析や倍数性解析を進めてきた。 これまでに、D1 ではフローサイトメータ 一分析により、DNA 量の増加が判明し、D2 では、地上部のみにキメラ性のない DNA 多 型パターンが検出されている。

3. 今年度の研究内容

昨年度、静岡大学藤枝フィールドにおいて 得られた D2 果実から種子を採取し、実生 の育成を進め、形態・形質調査と DNA 多 型解析を行った。また、シンビジウムにつ いて 2 回の開花と PLB 経由した DNA マー クの維持、キメラ性、品種内識別事例につ いて報告した³⁾。

4. 今年度の研究成果と解析結果

D2 では果実形成があり、種子の稔性も認 められている。このうち、母系すなわち D2 の珠心胚である緑色胚と交雑胚である白 色胚が得られ、各3系統の植物体まで育成 した。前者は、 D2 を選抜した際の形態と 同様に矮性、倒披針形・凹形葉となり(図 1A)、後者は、同じ温室で開花していたバ ンペイユの放任受粉によると考えられ、大 型で翼葉を有する葉形が観察された(図1 B)。さらに、本研究で DNA 多型検出に用い た 15mer-RAPD を行なったところ、白色胚 3系統全てでバンペイユ特有のパターン を検出した(図1C)。これらの交雑体は育 種素材に供する。また、品種登録による権 利化を見据え、D1 と共に静岡大学静岡キ ャンパス圃場においての栽培も開始した。

これまでに示してきたように、一度の照 射による地上部の倍加や DNA 多型の付与 は、一細胞由来の突然変異誘発を示唆して おり、本実験系は、変異育種のみならず、 DNA 組換えやゲノム編集の際のキメラ/モ ザイク回避の標的ステージになり得る。

参考文献

- Shirao T, Ueno K, Abe T and Matsuyama T, Development of DNA markers for identifying chrysanthemum cultivars generated by ion-beam irradiation. Molecular Breeding31: 729 - 735, 2013
- 2) Matsuyama T, Watanabe M, Murota Y,

Nakata N, Kitamura H, Shimokawa T, Ebisuzaki T, Wada S, Sato S, Tabata S, Efficient mutation induction using heavyion beam irradiation and simple genomic screening with random primers in taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). Scientia Holticulturae 272: 109568, 2020

- Furukawa K, Ono Y, Shimokawa T, Kitamura H, Abe T, Ebisuzaki T, Saito N, Wada S, Sato S, Tabata S and Matsuyama T, Intracultivar DNA identification in *Cymbidium* using DNA polymorphisms generated using simple genome scanning with random primers and heavy-ion beam irradiation. Scientia Horticulturae 337: 113598, 2024.
- a. 理化学研究所
- b. 株式会社 向山蘭園
- c. 量研機構量医研



図1シキキツ変異体後代の形態・形質調査と DNA 多型解析(15merRAPD) A 緑色胚由来植物、B 白色胚由来植物体、 C DNA 多型解1:シキキツ2:D2、3・4・8:白色 胚由来、5・6・7:緑色胚由来9:バンペイユ
(原著論文 等)

• Furukawa K, Ono Y, Shimokawa T, Kitamura H, Abe T, Ebisuzaki T, Saito N, Wada S, Sato S, Tabata S and Matsuyama T, Intracultivar DNA identification in Cymbidium using DNA polymorphisms generated using simple genome scanning with random primers and heavy-ion beam irradiation. Scientia Horticulturae 337: 113598, 2024.

重イオンビーム照射による栄養ストレス耐性植物の作出 Generation of Mutants Tolerant to Nutrient-stress with Heavy Ions (24J505)

羽石歩美 °、下川卓志 ^b、高橋美智子 ^e H. Haneishi^a, T. Shimokawa^b and M. Takahashi^a

Abstract

Many important mechanism of plant has been elucidated using transgenic plants and mutants in the research area of plant nutrition. We also have produced the transgenic plants tolerant to Fe-deficiency or Ni-excess. However, mutants are more useful because they are applicable to the cultivation in the field soon. In addition, more useful mutants are required to clarify the detailed mechanism of plant as for plant nutrition.

To further enhance iron deficiency tolerance in a previously isolated rice mutant line derived from seeds irradiated with Ne400 300 Gy, we conducted a second round of mutagenesis using both seed and seedling irradiation on the iron deficiency-tolerant mutant. Seeds from the next generation were harvested, and iron deficiency tolerance was evaluated. As a result, we identified mutant lines derived from seed irradiation that exhibited higher tolerance to iron deficiency than the original mutant line.

1. 研究の目的とバックグラウンド

我々はこれまでに、遺伝子導入技術により鉄欠乏 耐性植物やニッケル過剰耐性植物を作出してきた (Takahashi et al. 2001, Kim et al. 2005)。また、種子照 射や突然変異誘発化合物による変異体の解析により、 植物栄養学分野において重要なメカニズムの多くが 解明されてきた。近年、放医研の共同利用研究によ りシュークロース濃度を高めた培地によりアントシ アニン合成を誘導した状態で重イオンビームを照射 することで、これまでにない花色の変異体を高い効 率で得ることができるという新手法が報告された (Hase et al. 2010)。これはアントシアニン合成系の 遺伝子発現系が働いている条件下で照射することで、 アントシアニン合成に関連した遺伝子の発現系に効 率よく変異導入が行われたことを示唆した。

本研究ではこの方法を植物栄養学分野に応用し、 栄養過剰ストレスまたは栄養欠乏ストレス条件下で 各栄養ストレスに応答する遺伝子群の発現系に高い 効率で変異を導入する。これにより各栄養ストレス 耐性に寄与する遺伝子の発現が強化された植物を作 出する。

2. 昨年度までに得られている結果

(1)シロイヌナズナ実生への Ne400 照射

以前採択された研究課題において、シロイヌナズ ナ実生への Ne400 照射では 30 から 60 Gy で生育度 が半減することが分かり 30~60Gy が適線量と考えら れた。Ni 過剰条件下と通常条件下において Ne60Gy を照射した実生の照射後の生育度に有意差は見られ なかった。また、以前の研究課題において得られた ニッケル過剰耐性変異体は全て、ニッケル過剰培地 で生育させた実生に Ne400 を 60Gy 照射した区のみ から選抜された。そこで、2018 II 期の照射実験以降、 ニッケル過剰条件に関しての照射条件をNe400 60Gy に絞り、新たな変異系統群を作成と選抜を行ってき た。

2019 II 期の照射実験で得た変異体 347 系統を 2020 年度ニッケル過剰条件で選抜し、新たな耐性系統を 3系統、感受性系統2系統得た。耐性系統 60Gy-2 は control においても生育が 0Gy を上回ったが、Ni 過 剰条件において有意に耐性を示した。また、地下部 のNi 濃度が有意に高かった。

照射前、照射中、照射後の栄養ストレス処理が栄養 ストレス耐性変異体の出現率に影響するのかを検証 する実験を行った。材料は2021II期(2回)に通常 培地とニッケル過剰培地で発芽させたシロイヌナズ ナの実生へのNe60Gy照射を行い、作成した変異体 群である。作成した2種(2連)の変異体群をニッ ケル過剰培地で選抜した。耐性系統と感受性系統の 出現率を照射時の培地の条件で比較すると、耐性系 統はニッケル過剰培地で照射した時に出現率が高く、 通常培地の約5倍であった。感受性系統については 照射時の培地の条件と相関が見られなかった。

(2) イネ実生への Ne400 照射

2018 II 期の照射実験において鉄欠乏条件下におけるイネ実生(日本晴)へのNe400 照射条件を検討した。その結果、草丈に基づく生育度からは鉄欠乏条件下のイネ実生へのNe400の照射適線量は25~40Gyであることが示唆された。しかしながら、収穫後の穂重からは鉄欠乏条件下のイネ実生へのNe400の照射適線量は15~30Gyであることが示唆された。

2018 II 期の照射実験で得た日本晴変異系統群について鉄欠乏耐性系統の選抜を行うために行った予備 実験で、コシヒカリの方が日本晴より鉄欠乏に耐性 であることが示唆された。このためコシヒカリを用 いることにより、より美味しく、より鉄欠乏に強い イネの作出が期待される。そこで2019 年度の照射実 験において、コシヒカリを用いて照射適線量の再検 討を行った。その結果、鉄欠乏ストレス条件下(-Fe) で照射した実生と通常条件下(control)で照射した実 生の生育(草丈)に差は見られず、20Gy~30Gy が適 線量と考えられた。現在、作出した変異系統群を用 いてアルカリ土壌による鉄欠乏耐性系統の選抜を行 なっている。その結果、これまでに日本晴とコシヒ カリの両品種で複数の耐性系統が選抜されている。

鉄欠乏条件下でNe400を15Gy、20Gy、25Gy、30Gy の各線量照射したコシヒカリ実生から採取した M2 種子をアルカリ土壌を用いた鉄欠乏条件下で選抜 (1次選抜)し、鉄欠乏耐性を示した系統から採取 した M3 種子を用いて再度選抜を行った(2次選抜)。 その結果、25Gy 照射した場合に最も鉄欠乏耐性系統 の出現率が高く、6.5%であった。これはコシヒカリ 完熟種子にNe400を照射した場合の耐性系統出現率 約0.8%と比較すると顕著に高かった。また、鉄欠乏 条件下でNe400を25Gy 照射したコシヒカリ実生729 系統をアルカリ土壌で1次選抜し、75系統の耐性候 補系統を得た。

(3) イネ種子への Ne400、Fe500 照射

以前の研究課題においてイネ種子(日本晴)への 照射条件はすでに検討しており、Fe500では40-60Gy、 Ne400では300Gy前後が適線量と推察された。しか しながら、2019年度の照射実験において、日本晴と コシヒカリの2品種を用いて再度種子照射の検討を 行った。Fe500では、20Gy以上でコシヒカリが日本 晴より生育度が高く、コシヒカリでは30~50Gy、日 本晴では10~30Gyが適線量であることがわかった。 Ne400では200Gy以上でコシヒカリが日本晴より生 育度が高く、コシヒカリでは200~300Gy、日本晴で は200Gy前後が適線量であることがわかった。

2019年度までにNe400を照射したコシヒカリ種子 を用いて作成した変異体群を2020年度選抜し、2021 年度鉄欠乏耐性を検定した。またNe400を照射した 日本晴種子を用いて2020年度に変異体群を作成し た。両方の品種において、pHの高いアルカリ土壌を 用いた鉄欠乏条件においても良好な生育を示す鉄欠 乏耐性系統が選抜された。Ne400を300Gy照射した コシヒカリ種子から得られた変異体群(434系統) から3系統、Ne400を250Gy照射したコシヒカリ種 子から得られた変異体群(1202系統)から11系統、 Ne400を200Gy照射した日本晴種子から得られた変 異体群(500系統)から1系統の鉄欠乏耐性イネが 選抜された。

コシヒカリ完熟種子に Ne400 を 300Gy 照射して得 られた鉄欠乏耐性系統の M4 種子を用いて、水田と同 様の湛水条件で鉄欠乏耐性検定を行った。その結果、 鉄欠乏条件における鉄欠乏耐性変異体の草丈と葉色 は有意に高く良好な生育を示した。また、鉄欠乏条 件下における変異体の穂重は野生型の 2.1 倍であっ た。さらに、変異体の玄米の鉄濃度は野生型の 5.7 倍であった。

3. 今年度の研究内容

今年度は2024II 期に1回照射実験を行った。Fe500 (MONOΦ10)を照射した。HIMAC 生物照射室で、 コムギ完熟種子を材料に Fe500 を照射した。

4. 今年度の研究成果と解析結果

Ne400 をコシヒカリ完熟種子に 300Gy 照射して得

られた鉄欠乏耐性イネ変異体の鉄欠乏耐性をさらに 増強するため、鉄欠乏耐性変異体への種子照射と実 生照射を行い(2回照射)、次世代種子を採取した。 今年度、鉄欠乏耐性変異体を選抜し、鉄欠乏耐性検 定した。その結果、変異体への種子照射により得ら れた変異体が元の変異体より鉄欠乏耐性が高い変異 体であることがわかった。

参考文献

Takahashi M. et al. Nature Biotech. 19, 466-469 (2001) Kim S. et al. Plant Cell Physiol. 46, 1809-1818 (2005) Hase, Y. et.al. Plant Biothechnol. 27, 99-103 (2010)

^{a.} 宇都宮大学農学部; Utsunomiya University, Fac. of Agriculture

b. 量研機構 放射線医学総合研究所; NIRS, QST

研究成果一覧

1) Ne イオンビーム照射による鉄欠乏耐性イネの作出(2024) 羽石歩美 修士論文

2)Ni過剰条件下におけるNeイオンビーム照射のNi関連変異体作出効率への影響(2024) 山野美希 卒業論文

3) Ni 過剰条件下における Ne イオンビーム照射の Ni 過剰耐性変異体作出効率への影響 (2023) 田代彩夏 卒業論文

4)重イオンビーム照射実生を用いた鉄欠乏耐性イネの作出(2023)金子英里香 卒業論文

5)重イオンビーム照射種子を用いた鉄欠乏耐性イネの作出(2022)羽石歩美 卒業論文

6) Ne イオンビーム照射種子を用いた鉄欠乏耐性イネの作出(2021) 尾澤陽 卒業論文

7) Ne イオンビーム照射による Ni 過剰耐性および Ni 過剰感受性系統シロイヌナズナの作 出(2021) 飯野友実 卒業論文

8) 重イオンビーム照射による Ni 過剰耐性シロイヌナズナの作出(2020) 三柴瞳 卒業論 文

9) 重イオンビーム照射による Ni 過剰耐性変異体の作出(2019) 清水菜月 修士論文

10)重イオンビーム照射による変異体作成と変異体の解析(2014)黒田理恵 卒業論文

実用化を目指した有用微生物の単離・育種 Isolation of Useful Microorganisms Combined with Heavy Ion Beam Mutagenesis 24J507

下川卓志^a,加川雄介^{a,b}, 鈴木沙彩^a,佐野太陽^a,小林亜利紗^a

T. Shimokawa^a, Y. Kagawa ^{a,b}, S. Suzuki^a, T.Sano^a, A. Kobayashi^a

<u>Abstract</u>

High LET particle beams are known to cause complex double-strand breaks and induce mutations such as deletions at high frequency. Because of these properties, heavy particle beams are expected to be utilized in mutagenesis and breeding research. We have demonstrated the effectiveness of the use of heavy particle beams in breeding over the past 10 years as part of the J501 project.

Currently, environmental pollution and resource depletion caused by plastics and other materials are getting worse. Thus, in 10 to 20 years, human life will not be possible without low-cost, low-impact recycling of such pollutants. Therefore, this project aims to isolate useful functional microorganisms living in nature and breed them using heavy particle beams, with the ultimate goal to create functional microorganisms that can be used at the industrial level.

The project started in the latter half of FY 2024, and one irradiation was conducted in the previous fiscal year. Cultivation is currently ongoing.

1. 研究目的とバックグランド

世界規模の環境破壊は拡大の一歩をたどり、そ の我々の生活への悪影響も年々増加している。こ れまで根本的な解決策が確立されたとは言い難 く、生活できる地球環境を次世代に残すための多 くの課題に対して我々に残された猶予は少ない。 中でも、とりわけプラスチックに代表される廃棄 物による環境負荷は近年で非常に大きな問題の1 つである。その中で廃プラスチックは、すでに1.5 億トンのごみが海水中に蓄積しており、年間500 ~1300万トンのゴミが新たに流出している。一方 で、リサイクルする手法は限られており、i)焼却 して、熱エネルギーとする"サーマルリサイクル"、 ii)再度プラスチックの原料とする"マテリアルリ サイクル"、iii)化学分解し原料として利用する"ケ ミカルリサイクル"の3種類に大きく分けられる。 しかし、これらのリサイクルに適用される処理方 法は、高温、高圧、強アルカリ性や強酸性条件下 など、環境に高負荷をかける方法である場合が多 い。このような環境負荷の懸念があるにも関わら ず、現在の生活はプラスチックなどの工業製品と 密接な関係にあるため、今後もプラスチックに代 表される加工品の消費・廃棄に伴う環境負担が続 くことが予測される。逆にいえば、10年後、20年 後にも人類がこの地球上で文明を維持して生活 していくには、環境負荷の少ないリサイクルシス テムの構築が早急に必須である。

本申請では、自然界が本来有する環境浄化能 力を更に人工的に効率化することで、この環境問 題の解決を図る。例えば、自然界に存在するプラ スチック分解微生物に着目し、育種により分解能 を実用レベルまでに向上させる。そして、その微 生物とプラスチック素材を生産する微生物など のシステムと融合させることで環境低負荷なリ サイクルシステムの構築を目的とする。 自然界にはプラスチックなどの有害な物質を 分解し炭素源として利用する機能を持つ微生物 がすでに存在している。ゴミ集積場などから採取 されたプラスチック分解細菌の報告がすでに複 数存在するが、有する分解能は非常に弱く、今世 代中での環境問題の解決や実際に工業利用等が 可能なレベルではない。これらの微生物は非常に 過酷な環境で生活できる一方で、増殖性・代謝能 力においては著しく劣る。そこで、重粒子線を用 いてこのプラスチック分解微生物を、実用性のあ る変異株へと育成することで、環境浄化に実質的 に貢献できるシステムの構築を目指す。

2. 昨年度までに得られている結果

初年度のため非該当

<u>3. 今年度の研究内容</u>

後期1回(Fe 500MeV/u x1)、計1回の利用時間 の配分を受け、照射実験を行った。

4. 今年度の研究成果と解析結果

1月に初回照射を行い、現在培養中であるため、 現時点での報告事項はありません。

a. 量研機構 量医研 物理工学部

b. 東レ株式会社

<u>原著論文:</u>

なし

<u>学会·研究会·招待講演:</u>

なし

発表会開催日に発表ができない課題

発表会開催後日に録画発表

Annual Report for "Investigation of heavy ion stimulated Colomb nanoradiator on amyloid protein-magnetite aggregation in neurodegenerative disease " (22J137) Jong-Ki Kim,Toshiaki Kokubo, Alexander Zaboronik and Tsuyoshi Hamano

Abstract

Insoluble iron deposits often exist as iron oxide nanoparticles in protein aggregates, impaired ferritin, or activated microglia and have been implicated as major causes of neuroinflammation in Alzheimer's disease. However, no crucial evidence has been reported to support the therapeutic effects of current iron chelators on the deposition of various molecular forms of insoluble iron. We investigated the therapeutic effect of carbon ion stimulation (CIS) via a transmission beam on insoluble iron deposits, iron inclusion bodies, and the associated biological response in 5xFAD AD mouse brains. Compared with no treatment, CIS dose-dependently induced a 33-60% reduction in the amount of ferrouscontaining iron species and amyloid plaque and activated iron-laden microglia as associated inclusion bodies in the brains of AD mice. CIS induced considerable neuroinflammation downregulation and, conversely, antiinflammatory upregulation, which was associated with improved memory and enhanced hippocampal neurogenesis. In conclusion, our results suggest that the effective degradation of insoluble iron deposits in combination with pathogenic inclusion bodies promotes AD-modifying properties and offers a potential CIS treatment option for AD.

1. Background and objectives

Protein binding renders magnetite in a redox-active reduced state, which produces toxicity to iron depositprotein aggregates. The interaction of the AB protein with ferritin induces the release of ferrous magnetite from ferritin and the formation of pathogenic ferritin, which contains ferrous magnetite-amyloidferritin aggregates. Microglial activation is triggered by direct glial uptake of pathogenic ferritin or AB plaque infiltrating microglia, which can contain ferrous magnetite. An inflammatory cascade catalyzes microglial ferroptosis, ferroptosis-mediated neuronal or astrocyte loss, and the induction of neurotoxic reactive astrocytes. This subsequently stimulates multiple signaling pathways to induce tauopathy and generate additional reactive oxygen species (ROS) and cytokines, resulting in the spread of oxidative damage in Alzheimer's disease (AD). The significance of nanoparticles for insoluble iron deposition in terms of potential therapeutic application has not been well recognized in the medical field. We propose that redox-active iron oxide deposits, involved in the neuroinflammatory response and can exist in the form of insoluble protein aggregates, pathogenic ferritin aggregates, or iron-laden microglia. Furthermore, if not eliminated, redox-active iron deposits are continuously neurotoxic further neuronal damage. The present study explored whether disrupting redox-toxic iron deposits and

protein aggregates by carbon beam transmission influenced the neuroinflammatory response in an AD mouse model via neuroinflammation induction.

2. Methods

2.1 Animals and study design

Animal study was designed following ARRIVE guidelines. Two mouse cohorts of different ages were created at the time of irradiation. The first cohort of mice (4 months cohort, nWT = 5, n5xFAD = 15, and irradiated at the age of 4 months) was used to evaluate the disruption of iron deposits and inclusion bodies after CIS as a potential preventative treatment for early-stage of AD. The second cohort of mice (10 months cohort, nWT = 10, n5xFAD = 11) was irradiated at the age of 10 months and sacrificed before the behavioral task at the age of 11months, one month after CIS to evaluate the immunohistology and inflammatory response while curing pathological burdens and improving cognitive function for relatively late stage of AD.

2.2 CIS treatment

CIS was performed at HIMAC (Chiba, Japan). Mice were anesthetized prior to CIS treatment by an intraperitoneal injection of 10 mL/kg of a ketamine + xylazine mixture (100 mg/kg and 10 mg/kg in saline, respectively), placed on a sample holder for whole-brain irradiation, and irradiated with a transmitted beam of pristine carbon with a collimator. The control group was not treated. The whole brain was irradiated via carbon beam transmission with a pristine Bragg peak behind the head, as shown in Fig. 1. The irradiation energy was 400 MeV, sufficiently high to transmit through the mouse head.



Figure 1. Schematic diagram of carbon ion stimulation treatment with a pristine Bragg peak behind the brain of a carbon transmission beam; the Bragg peak was placed outside the brain by a high-energy carbon beam compared with the depth of the mouse head (left panel). Low-energy electron (LEE) emission occurs as a dose enhancement factor from CIS-treated magnetite (Fe3O4) in AD protein aggregates or activated microglia via Auger cascades and the interatomic Coulomb decay path.

2.3 Histological analysis

Disruption of iron deposition and the $A\beta$ plaque burden in

the CIS-treated mice were determined via histochemical analysis of four different tissue sections, with Turnbull staining for ferrous cations (Fe2+) or with modified Highman's Congo Red staining for amyloid plaques.

2.4 Behavioral task

The NOR test was performed 3 days prior to CIS and 1 month after treatment. The amount of time spent exploring the new object was used as an index of memory recognition and was calculated as the difference in the ability of the mouse to distinguish between objects.

2.5 Western blot analysis and immunohistochemistry

Neuroinflammatory response and neurogenesis were examined by Western blot and DCX immunohistochemistry analysis, respectively.

Results

3.1 CIS-depleted iron deposition and inclusion bodies Turnbull staining analysis demonstrated various features of iron deposition in 5xFAD mice, suggesting the presence of intraplaque iron foci, ferritin, and microglial iron, as indicated in Fig. 2A. A dose-dependent reduction in iron deposition was detected in CIS-treated 5xFAD mice compared with untreated control mice, as shown in Fig. 2A and B.



Fig 2. Results of Turnbull (A,B) and Congo red (C,D) staining of CIS-treated AD mice showing a reduction in the number and size of Turnbull-positive iron deposits (amyloid plaque + ferritin + microglia) and A β plaques in a dose-dependent manner.

3.2 CIS-induced neuroinflammation downregulation

CIS may also alleviate neuroinflammation (decreased Iba-GFAP, in Fig. 4.) by directly affecting 1. pathophysiological mechanisms at the stage of activated microglia by targeting microglial iron. We evaluated the impact of CIS on the microglia-driven inflammatory response to determine the role of iron deposition in neuroinflammation in AD. The levels of TNF- α and IL-1 β , cytokines typically released from proinflammatory microglia (with the M1 phenotype), were greater in untreated AD mice than in WT control mice and were greatly lower (p < 0.01) in CIS-treated AD mice, as shown in Fig. 5. Furthermore, the cytokine TGF- β , which is typically released from anti-inflammatory microglia (with the M2 phenotype), was increased 1 month later in treated AD mice compared with untreated AD mice (p < 0.05).

4. Discussions

Brain inflammation occurs before neurodegeneration during AD pathogenesis, and targeting inflammatory



Fig. 3. Results of electrophoretic running (A) and Western blot analyses for hAPP (B) and β -secretase (C); GFAP for reactive astrocytes (D); lba-1 for activated microglia (E). All the decreases in inflammatory response factors (D,E) correlated with the reduction in amyloid pathology (B,C) after CIS treatment, suggesting CIS-driven depletion of iron deposition and associated inclusion bodies, such as amyloid plaques



Fig. 4. Results of Neurogenesis and Ferroptosis According to the Western blot (A: electrophoretic examination, B: GPX4, C: DCX) and IHC (D: DCX + cell counting, E: IHC microscopic view) analyses for the various groups. DCX, a marker of adult neurogenesis, was markedly lower in 5xFAD AD mice than in WT control mice and was restored in CIS-treated mice (p < 0.05).

mechanisms may reverse the process of disease progression. CIS treatment reversed neurotoxic insoluble iron deposition and the iron-bound plaque matrix of AB plaques or pathogenic ferritin. WB data of Iba-1 depletion at 4 Gy suggest implicit disruption of microglial iron deposition. Moreover, Turnbull counting analysis contains intraplaque iron plus microglial iron deposition foci, suggesting dose-dependent depletion of iron deposition. For a given dose, the amount of iron deposition may determine the CIS-driven microglial fate, in either potential alteration of inflammatory phenotype as a still viable cell or depletion. Inflammatory response cascades are activated upon iron deposition in pathogenic lesions, as evidenced by the correlated increase in the expression of lba-1, GPX4, and GFAP shown in Fig. 3, and microgliadriven neuroinflammation has been regarded as a major cause or a bridge for the spread of neuronal damage and cognitive impairment. CIS treatment depleted these molecular forms of protein-bound iron, as shown in Figs. 2 and 3. Thus, its therapeutic effects potentially occur at multiple stages of neuroinflammatory cascades. The enhanced hippocampal neurogenesis and correlated NOR task-based memory improvements indicated a neurogenic effect of CIS treatment, which may be ascribed either to crosstalk between neurogenic signals and downregulated Aβ-related deposition39 or to CIS-driven induction of the anti-inflammatory effect. In conclusion, CIS treatment promoted memory improvement through the modulation of neuroinflammation, a noninvasive, disease-modifying, and nonpharmacologic option for treating AD.

List of Publications

(1) Publications

Won-Seok Lee, Younshick Choi, Toshiaki Kokubo, Tsuyoshi Hamano, Alexander Zaboronik, Takasaki Ishikawa, Oh Dae Kwon, EunHo Kim, Jong-Ki Kim. Carbon beam transmission therapy reverses iron deposits and microglia-driven neuroinflammation and induces cognitive improvement in an Alzheimer's disease mouse model. Sci Rep 15, 7938 (2025). (2) Oral presentation

Won-Seok Lee, Toshiaki Kokubo, Alexander Zaboronik, Younshick Choi, Won-Seok Chang, EunHo Kim, Jong-Ki Kim, and Tsuyoshi Hamano. HEAVY ION STIMULATION THERAPY TARGETING INTRAPLAQUE MAGNETITE REDUCES INSOLUBLE AB-PLAQUE AND IRON REDOX TOXICITY IN AN ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL, FPRT 2022 Barcelona.

悪性腫瘍(放射線、抗がん剤に抵抗性を示す難治がん含む)に対する重粒子線の有用性および 分子機構の解明

Investigation of the efficacy and molecular mechanisms of heavy ion beams for malignant tumors including refractory cancers resistant to radiation and anticancer drugs. (22J150)

関原和正^{a,b}、氷室秀知^c、平山亮一^d、笹田哲朗^c、星野大輔^a K. Sekihara^{a,b}, H. Himuro^c, R. Hirayama^d, T. Sasada^c, D. Hoshino^a

Abstract

In this study, we evaluate the efficacy of carbon ion radiotherapy (CIRT) against radiation- and drug-resistant cancers such as cervical adenocarcinoma and anaplastic thyroid cancer (ATC). In both two- and three-dimensional models, carbon ion (C-ion) irradiation shows significant anti-tumor effects compared to conventional X-ray and cisplatin treatments, possibly due to its ability to overcome hypoxia. In addition, C-ion irradiation is shown to be highly effective against ATC, inducing cell cycle arrest and apoptosis, and inhibiting cell migration and invasion more effectively than X-ray. The research also explores the novel relationship between the gut microbiome and CIRT, suggesting that modifying gut bacteria in mouse models may enhance the antitumor effects of the therapy. These findings provide insights into improving cancer treatment strategies, potentially paving the way for improved clinical outcomes through a deeper understanding of the mechanisms of CIRT and its interaction with the gut microbiome.

1. 研究の目的とバックグラウンド

1-1. これまでに、悪性腫瘍に対する放射線治療と分子標的治療薬を含む抗がん剤との併用による放射線 増感効果の研究に取り組んできた。しかし子宮頸部 腺がんや甲状腺未分化がん等は化学放射線療法に抵 抗性を示し、治療困難とされている。その原因とし て、治療抵抗性を有するがん幹細胞の関与や低酸素 などの腫瘍微小環境の影響が考えられる。重粒子線 は光子線に抵抗性を示すがん幹細胞や低酸素条件下 にあるがん細胞に対しても有効であるとの報告がな されている。そこで本課題では、現在治療困難とさ れている放射線および抗がん剤に抵抗性を示すがん に対する重粒子線治療の有用性を検証し、各種薬物 療法との増感作用を検討するとともに、X線照射と 比較することでそれらのがんの放射線耐性分子機構 を解明することを目的とした。

1-2. 腸内細菌叢は、各種疾患に関連し、また様々な がん治療の効果に関与していることが判明してきて いる。特に、抗腫瘍免疫との関連が示唆されている。 重粒子線治療は、腫瘍抗原の放出を促すことによる 抗腫瘍免疫の賦活化に関与することが推測されるが、 こと腸内細菌叢との関連については、未だ解明され ていない。我々は、これまでに、X線治療と腸内細 菌叢との関連について検討をすすめている。今回、 腸内細菌叢改変動物モデルを用い、重粒子線治療効 果について検討を行うことで、重粒子線治療の効果 を高める菌叢の同定など、臨床へとつながる基礎的 知見を得る事を目的とした。

2. 昨年度までに得られている結果

2-1.1年目では、X線、炭素線、抗がん剤(CDDP) の効果について、従来から用いられている2次元培 養(2D)および3次元培養(3D)において、ヒト子 宮頸部腺がん細胞株 (HeLa, HCA-1) を用いて評価し た。2D 培養では X 線、炭素線、CDDP ともに線量・ 用量依存的に細胞生存率を減少させたが、3D スフェ ロイド培養すると X 線と CDDP は効果が減弱した が炭素線は 2D と同等の抗腫瘍効果を示した。また 興味深いことに炭素線は CDDP と X 線の併用より も高いということも見出した(参考文献1および業 績)。3D 培養ではスフェロイド内部が低酸素になる ため、X線照射と炭素線照射の効果の違いが生じた のが主な要因であると考察した。2年目である昨年 度では、非常に稀ながんであるが、全悪性腫瘍の中 でも膵がんと並び極めて悪性度の高い悪性腫瘍のひ とつである甲状腺未分化がんに対するX線および炭 素線の効果を評価した。ヒト甲状腺未分化細胞株 6 種 (TTA1, TTA2, KTA1, 8305c, OCUT2, OCUT4) を用 いて炭素線および比較対象としてX線の抗腫瘍効果 を評価した。コロニー形成能アッセイを行ったとこ ろ、炭素線はX線の約3倍の抗腫瘍効果を発揮する ことがわかった。また放射線照射により、G2 arrest お よびアポトーシス(特にTTA2およびOCUT4)の誘 導、細胞遊走および浸潤抑制が抑制された。これら の効果はX線と比較して炭素線照射で有意に大きか った。これらから、甲状腺未分化がんに対する治療 において重粒子線が効果的で有益な可能性があるこ とを示唆された(業績)。

2-2. 腫瘍移植モデルとして用いる細胞株 (Lewis lung carcinoma; LLC) に関して、colony formation assay を用い RBE が約 1.8 であると算出した。抗生剤 (vancomycin, metronidazole)を用いた腸内細菌改変 マウスモデルを作成した。糞便より細菌 DNA を精製し、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法を用い、腸内細菌叢の解析を実施した。抗生剤投与群において、非投与群と比較し、腸内細菌が欠失し、腸内細菌のパターンが優位に異なっていることを確認した。よって、腸内細菌の影響を比較検討するモデルとして適当であることが確認された。腸内細菌改変モデルおよび非改変モデル

それぞれにおいて、粒子線 7Gy 照射・15Gy 照射を 実施し、非照射群と併せて計6群(非照射・7Gy 照 射・15Gy 照射群・腸内細菌改変のみ・腸内細菌改変 +7Gy 照射・腸内細菌改変+15Gy 照射群)で抗腫瘍 効果を比較検討した。腫瘍体積の推移を比較したと ころ、腸内細菌改変モデルにおいて抗腫瘍効果の増 強を認めた。

3. 今年度の研究内容

3-1. In vitro 実験で得られた結果が in vivo マウスモ デルでも再現できるかどうかを評価した。BRAF 野 生株である TTA1 および BRAF V600E 変異株である 8305c および OCUT4 細胞を BALB/c nu/nu マウスの 下肢大腿部皮下に移植に移植し、担がんマウスを準 備した。形成された腫瘍に対し、炭素線 5 Gy を照射 し、治療効果を評価した。

3-2. 腸内細菌改変モデルにおける、重粒子線の抗 腫瘍効果の増強について、再現性の確認を行った。 また、腸内細菌叢をより強く改変するため、抗生剤 として、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の双方に 広く作用するように、vancomycin と metronidazole を 併用した結果として、抗腫瘍効果の増強を認めてい る。そのため、どの薬剤による腸内細菌への影響が より抗腫瘍効果の増強に寄与するかを評価するため、 vancomycin 単独、metronidazole 単独時、両薬剤併用 時を比較検討した。

4. 今年度の研究成果と解析結果

4-1. 最初に、BRAF 野生株として TTA1 細胞を、BRAF V600E 変異株として 8305c を選択し、BALB/c nu/nu マウスの下肢大腿部皮下に移植し、担がんマウスを 作製した。形成された腫瘍に対し、非照射群、分子 標的薬(BRAF 阻害剤 Dabrafenib 30 mg/kg + MEK 阻 害剤 Trametinib 0.6 mg/kg) 群、X 線 10 Gy 照射群、 X 線+分子標的薬併用群、炭素線 5 Gy 照射群、炭素 線+分子標的薬併用群の計 6 群を設定し、抗腫瘍効 果を比較検討した。TTA1 担がんマウスにおいて腫 瘍体積の推移を比較した結果、X線10Gy、分子標 的薬群は非照射群と比較して有意差は認められなか った。X線+分子標的薬併用群では若干腫瘍増殖を抑 制する結果となった。炭素線照射群および炭素線+ 分子標的薬併用群はほぼ同等の効果を示し、有意に 腫瘍増殖を抑制した。一方、8305c担がんマウスにお いて腫瘍体積の推移を比較したところ、X 線照射単 独でも腫瘍増殖を抑制した。また、分子標的薬群お よびX線+分子標的薬併用群では治療開始28日目ま ではほとんど腫瘍増殖を認めなかったが、その後 徐々に腫瘍体積が増加してきた。これは薬剤抵抗性 の出現を示唆している可能性がある。また、炭素線 照射群および炭素線+分子標的薬併用群においては、 より強い抗腫瘍効果が観察された。BRAF 変異の有 無が炭素線の抗腫瘍効果と関連があるかどうかを調 査するため、OCUT4 担がんマウスにおいても同様の

実験を行った。現在解析中である。

4-2.

腸内細菌改変モデルにおける、重粒子線の抗腫瘍効 果の増強について、再現性の確認を実施し、改変群 において抗腫瘍効果の増強傾向を得た。また、 vancomycinとmetronidazolをそれぞれ単剤にて使用 した際と比較して、併用した群が最も、抗腫瘍効果 をみとめた。このことより、グラム陰性菌または陽 性菌のどちらかが主要に関与するのではなく、双方 を改変することで、より抗腫瘍効果の増強を認める ことが示唆された。抗腫瘍免疫を含めた、メカニズ ム解析をさらにすすめる予定である。

参考文献

1. Sekihara K et al. Cancer Cell Int. 2022;22(1):391.

^a·神がんセ臨床研がん生物 ^b宮崎大医薬理 ○神がんセ臨床研がん免疫 ^d量研機構 QST 病院

研究成果一覧 22J150 関原和正

なし

Advanced multiomic analysis of DNA Damage, Metabolic, and Immunotherapeutic Inhibitors with Heavy-Ion Radiotherapy (23J155) DK Ebner^a and T Shimokawa^b

Abstract

Previously, a robust analysis of hTERT-RPE1 (normal tissue) and U2OS (human osteosarcoma) response to CIRT dose, LET, and combinatorial treatment with DNA repair inhibition was performed. We hypothesized that DDRi would synergize with high LET. Uniquely, though at moderate LET (20-50 keV/um) some synergy was noted, at high LET (70+ keV/um), no synergy was seen. We thus hypothesized that high LET radiotherapy independently overcomes homologous recombination. Our subsequent efforts involved different methods and evaluating targets for knockdown/inhibition of the homologous recombination pathway in vitro to begin mechanistic understanding.

Simultaneously, previous data demonstrated that murine osteosarcoma, when treated with high LET radiotherapy, demonstrated a systemic, anti-metastatic response. This was hypothesized to be due to DNA repair overwhelm with subsequent immunologic response. Local, regional, and distant tissue samples were taken from mice and are undergoing transcriptomic analysis.

Lastly, prior data has demonstrated that immune response generation may be tied to metabolic signals (such as mitochondrial DNA) in addition to nuclear effect. Preliminary data with XRT demonstrated significant metabolic adaptation *in vivo*. We aim to expand our scope of multiomic research to study cellular response to high LET radiotherapy more broadly, with these experiments incorporated into our April 2025 beamtime.

Background / Objectives / Activities

Briefly, we initially endeavored to understand the response of stromally dense tumors and corresponding high epithelial to mesenchymal transition patterns in response to CIRT, with a hypothesis that EMT underlay tumoral radioresistance and that this may be overcome in an LET-dependent manner. Our laboratory at Mayo Clinic collaborates with Dr Robert Mutter, who specializes in novel DNA repair inhibitors for synergistic clinical treatment. Data from our laboratory suggests that high-LET radiotherapy particularly stresses homologous recombination (HR), and consequently we hypothesize that HR inhibitors may represent a key opportunity for synergistic treatment response. This was included as one potential avenue to generate treatment synergy and overcome mesenchymal radioresistance. Dr Shimokawa has previously used murine osteosarcoma as a model of treatment resistance and metastasis (LM8), and in concert with this prior work, osteosarcoma was chosen as our model of study in concert with hTERT-RPE1, a normal tissue model. Our prior work at Mayo Clinic has suggested that these synergistic experiments potentiate enhanced systemic response to tumor and given prior

work from QST (ie. Dr Hagiwara's study of clinical pancreas cancer and suggestion of a threshold effect in local disease control above approximately 50 keV/um), we anticipated that these synergistic treatments would be maximized using high-LET CIRT.

Our initial experiment generated over 400 samples for multiomic analysis at Mayo Clinic, including treated cell pellet and media. Our prior data submitted hTERT-RPE1 samples exposed to XRT, entrance and Bragg Peak proton, and 20 keV/um CIRT (Brookhaven) samples to phosphoproteomic analysis. Consequently, we submitted an initial cohort of these high-LET hTERT-RPE1 samples to phosphoproteomic analysis. Multiple pathways of interest emerged, principal of which is that key actors in homologous recombination (ATM, ATR, a high-fidelity DNA repair pathway) appeared enriched in an LET-dependent manner. Subsequently, we aimed to study these in hTERT-RPE1 and osteosarcoma cell lines with their corresponding inhibitors to explore synergistic treatment.



Curiously, this was not the case. Figure A (U2OS, a well-studied human osteosarcoma) and Figure B (LM8, highly metastatic murine osteosarcoma) both demonstrate cell lines treated *in vitro* with low and high LET CIRT with cotreatment with ATM (not shown) or ATR inhibitors. Minimal synergistic response was seen. However, olaparib, a PARP inhibitor, demonstrated significant treatment amplification at both low and high levels of LET.

Notably, clinical osteosarcoma is unique in that up to 50% of clinical samples have been demonstrated to show aberrations within the homologous recombination pathway, suggesting a potential biomarker for synergistic treatment. With subsequent beamtimes the above effect was validated using B01 (a RAD51 inhibitor, a key effector of HR), siRNA inhibition of RAD51, and U2OS BRCA1-/- cell lines, all of which demonstrated similar effects with high LET CIRT.

As such, our current hypothesis is that this effect is replicable *in vivo*, wherein high-LET radiotherapy is independently saturating HR and creating a targetable phenotype which some have described as a "BRCAness" phenotype. Much like BRCA-mutated breast cancer, we anticipate that high-LET radiotherapy induces a sensitivity to alternative DNA repair targeting, offering an opportunity for therapeutic synergy and enhanced tumor control. To better understand this, we will expand these evaluations in vivo. We are establishing an LM8 RAD51-/- model to use as "HR-deficient" osteosarcoma model phenotype. Our aim is to identify the sensitivity of this HR-deficient models to differing forms of radiotherapy, and then evaluate whether high-LET radiotherapy can induce this HR-deficient phenotype independently in HR-proficient cells. We hypothesize that 70+ keV/um can achieve this therapeutic conversion. the resulting phenotype is targetable using olaparib, and that collectively this will yield improved immune signaling and systemic disease response in a way amplifiable using immune checkpoint inhibition. This experiment is ongoing.

Dr Shimokawa's prior data and publications have demonstrated that LM8 murine osteosarcoma demonstrates an apparent antimetastatic effect when treated with CIRT. Incorporating this into our preliminary data above, we hypothesize that this induced aberration in DNA repair may potentiate enhanced immune response. To establish a foundation for further understanding of this, we employed OST's well-established abscopal model, inoculating LM8 into bilateral mouse flanks. One flank tumor was irradiated, and the mice monitored for 3 weeks for subsequent tumor metastatic development in comparison with unirradiated control animals. After sacrifice, unirradiated tumor, irradiated tumor, and associated lymph node and lung metastasis samples were collected and submitted for transcriptomic analysis; we are awaiting these results. We hypothesize this will provide a framework for understanding the cellular changes developing within osteosarcoma as it acquires metastatic potential, and how modifies this to galvanize the observed CIRT antimetastatic effect. This will further inform subsequent planned experiments employing the aforementioned LM8 RAD51-/- model in comparison with wild-type, with and without DNA repair inhibition, and with and without immune checkpoint inhibition, as we develop a translational model for synergistic induction of systemic treatment response to local radiotherapy in this treatment resistant disease. This work has been funded by the Particle Therapy Cooperative Group (PTCOG) as well as Sarcoma Foundation of America. We are further in discussions with QST Hospital to assist in clinical trial sample analysis with eye toward translating these findings to patients at QST and other CIRT centers.

Finally, increased interest in the literature has been looking at the radiotherapeutic effects not only on nuclear DNA, but more broadly at cellular metabolism (see: UPenn's work evaluating metabolic response to radiotherapy, works identifying FLASH recent mitochondrial immunogenic signals tied to function/DNA, etc.). An advantage of the multiomic approach is that our broad capture of data provides opportunity for metabolic analysis as well. Reanalysis of this data has demonstrated key metabolic pathway alterations: phospholipid and inositol phosphate metabolism is uniquely shifted in CIRT compared to XRT and PBT, suggesting membrane signaling and structure disruption; meanwhile selenoamino acid metabolism is modified in CIRT, suggesting a unique pattern of oxidative stress response. Interestingly, glucose metabolism is downregulated in both CIRT and XRT, though not proton radiotherapy. Dr Ebner has partnered with Taro Hitosugi PhD (formerly UTokyo, now Associate Professor Mayo Clinic), a world expert in cancer cell metabolism and developer of an auto-eluting radiolabeled metabolic implant method for mice, to better understand the broad metabolic effects seen with radiotherapy. Preliminary analysis of XRT samples in April 2025 have demonstrated significant shifts in systemic metabolic patterns; we intend to explore these in proton and carbon-ion as well, hypothesizing that metabolic shifts may serve as unique signals serviceable as biomarkers for anticipated therapeutic effect, novel avenues of synergistic treatment, or that metabolic changes hidden from nuclear-DNA-focused analyses may represent the mechanistic "missing link" between the observed immune response in CIRT,

We were honored to be further awarded upcoming beamtime in April 2025 and are committed to continuing to build our collaborative translational research portfolio between Mayo Clinic ant QST. We eagerly await the advancement of these preliminary data and look forward to verifying and completing these findings for subsequent manuscript submission in the 2025-2026 cycle.

^aMayo Clinic, previously QST, ^bQST

Manuscripts describing the above are forthcoming. These data are scheduled to be initially presented at: - Particle Therapy Cooperative Group 2025 Annual Meeting

The following organizations have provided grant support to this project:
Particle Therapy Cooperative Group
Sarcoma Foundation of America

Heavy ion minibeam radiation therapy: safety and efficacy studies

(24J207)

Angela Corvino¹, Ryoichi Hirayama², Akiko Uzawa², Cristele Gilbert¹, Takashi Shimokawa², and Yolanda Prezado¹

Abstract

Heavy ions, such as neon, hold great promise for treating hypoxic tumors but their clinical use was discontinued due to important side effects. We have evaluated the safety of NeMBRT in abdominal irradiations, using mouse gut crypt survival as the endpoint. Moreover, we investigated the impact of NeMBRT on hematopoiesis.

1. Background

Heavy ions, such as neon, hold great promise for treating hypoxic tumors due to their beneficial oxygen enhancement ratio. However, their clinical use was discontinued due to important side effects 1. Combining neon with minibeam radiotherapy (NeMBRT) significantly reduces skin toxicity 2 while maintaining tumor selective damage 3. NeMBRT has not yet been tested on deeply seated organs, which may be affected by respiratory motion, such as the intestine. We evaluated the safety of NeMBRT in abdominal irradiations, using mouse gut crypt survival as the endpoint. Moreover, we investigated the impact of NeMBRT on hematopoiesis.

2. Methods

Concerning abdominal response experiment, The whole abdominal region of 8-week-old female C3H/He mice was irradiated with either broad NeMBRT or neon beam (BB) radiotherapy at the same average dose of 10 Gy. We irradiated 10 animals per group. A custommade brass collimator was used to deliver a single array of planar mini-beams (MB) with lateral dimensions of 1 mm × 25 mm and a center-to-center distance of 4 mm in the intestinal region. This resulted in peak doses of \sim 36 Gy and valley doses of \sim 0.9 Gy. Three days after irradiation, the jejunums of the mice were fixed in formalin harvested and zinc. Morphological changes were investigated using hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining. Chromogenic IHC expression of Ki-67 in the jejunums was also evaluated for all the studied groups. For bone marrow response, the hind limb of 8-week-old female C3H/He mice was irradiated with either NeMBRT or neon broad beam (BB) radiotherapy at the same average dose of 10 Gy. We irradiated 10 animals per group. The dose was prescribed at the center of the limb, which corresponded to \sim 38 mm depth in water.

The NeMBRT dose distributions was characterized by peak doses of \sim 36 Gy and valley doses of \sim 1 Gy.

3. Results

3.1. Abdominal irradiations

The NeMBRT-induced intestinal changes were regional and less severe compared to those observed in the BB group (see Figure 1). HES staining showed that the BB group had significantly higher crypt death than the MB group. In the CTL group, all crypts exhibited Ki-67 positivity, indicating normal proliferation (see Fig 2). In the MB group, crypts directly traversed by the minibeams lacked Ki-67 staining, whereas adjacent crypts retained proliferative activity, suggesting regionalized crypt damage with preserved proliferation in non-irradiated areas. In contrast, the broad beam (BB) group exhibited a complete loss of Ki-67 signal, indicating widespread crypt damage and a severe impairment of intestinal proliferation. These findings suggest that NeMBRT induces highly localized crypt injury while sparing surrounding tissue, potentially promoting better intestinal repair compared to BB irradiation.



Fig 1. Mice jejunum histology in HES staining. Representative transverse sections of the jejunum are shown for the control (CTL), BB, and MB groups. The scale bar represents $200 \mu m$.



Fig 2. Bone Marrow Cell Viability Assay. The graph displays the percentage of bone marrow cell viability, with data normalized to the control group. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Institut Curie, Université PSL, CNRS UMR3347,
 Inserm U1021, Signalisation Radiobiologie et
 Cancer, 91400 Orsay, France.
 National Institutes for Quantum Science and

Technology (QST), Chiba, Japan.

研究成果一覧

24J207 Yolanda Prezado

(口頭発表)

- 1. Corvino et al. Safety of NeMBRT. PMBRT2025 workshop
- 2. Corvino et al. NeMBRT. PTCOG 2025

"The identification of miRNA-17 and miR-214 as Carbon-ion

radiosensitizer on osteosarcoma"

(22J307)

EUN HO KIM¹, WONSUCK LEE¹, AKIKO UZAWA², SEI SAI²

Abstract

Osteosarcoma (OS), a common primary bone tumor, poses challenges in treatment efficacy due to radiation resistance. This study explores the potential of microRNA-205 (miR-205) in influencing OS radiosensitivity. The research shows that miR-205 suppression decreases radiation-induced growth arrest, while its overexpression enhances radiosensitivity, reducing cell viability and inhibiting proliferation. Combining miR-205 with high linear energy transfer (LET) carbon ion beam irradiation significantly decreases OS cell viability, induces apoptosis, and activates DNA damage, suggesting a promising therapeutic approach. The study also delves into the impact of miR-205 on OS cell migration and invasion, revealing its synergistic effect with carbon ion beam in blocking the progress of tumor. It is noteworthy that these findings suggest on miR-205's crucial role in modulating OS response to carbon ion beam, thus showing possibilities for targeted therapies and emphasizing the potential of combining microRNA manipulation with advanced carbon ion beam modalities in order to improve OS treatment outcomes.

Background and objectives of the experiment

Osteosarcoma (OS), primarily affecting adolescents and young adults, is among the most frequently occurring primary bone tumors. It arises from primitive transformed cells that exhibit osteoblastic differentiation and produce malignant osteoid tissue. Genetic changes as well as dysfunction of oncogenes or tumor suppressors have been demonstrated to be tightly associated with the development and progression.

Therefore, understanding the molecular mechanisms in OS would benefit for the development of novel therapeutic targets or candidates for OS. Although the therapeutic option of OS is determined by the appearance of the tumor, the location, stage and many other factors, radiotherapy(RT) is still one of the main choices in the treatment for OS alone or in combination with surgery and/or chemotherapy.

MicroRNAs (miRs), a class of 18–25 nucleotides in length non-coding RNAs, can suppress gene expression via directly binding to the 3'-untranslational region (UTR) of their target mRNAs, thus leading to mRNA degradation and translation repression. Through negative mediation of their target genes, miRs play a key role in a variety of cellular biological processes, including cell survival, proliferation, differentiation, apoptosis, autophagy, metabolism, and motility. Moreover, as many oncogenes or tumor suppressors are also targets of miRs, various miRs have been implicated in tumorigenesis and malignant progression of human cancers including OS. For instance, miR-143 inhibits OS metastasis by targeting matrix metalloprotease-13 expression. miR-199a-3p is downregulated in human OS and has suppressive effects on OS cell proliferation and migration. miR-205 generally acts as a tumor suppressor in a variety of human cancers. It is downregulated in prostate carcinoma and inhibits key oncogenic pathways including mitogen-activated protein kinase (MAPK) and androgen receptor (AR) signaling pathways. miR-205 is downregulated in renal cell carcinoma, and inhibits proliferation, migration, and invasion, and induces apoptosis of renal cell carcinoma cells. However, the expression profile and regulatory mechanism of miR-205 in OS still remains to be fully uncovered. So we investigated the effectiveness of this miR-205 in OS and its effect on radiation sensitivity when combined with high LET carbon ion beam.

Summary of previous year

After confirming the radiosensitization efficacy of C-ion and miR214, the effect of miR214 was minimal. Therefore, we conducted research on another target, miR 205, based on references. miR-205 enhances the response of OS cells to radiation therapy, particularly carbon ion beam irradiation. It shows that miR214 increases cell sensitivity to C-ion, reduces cell viability and proliferation, and promotes apoptosis. And miR-205 combined C-ion treatment activates autophagy and DNA Damage in OS cells.

Activities and results in FY2024

Carbon ion beam in combination with miR-205 mimic decreases OS cell viability and migration.

The investigation of miR-205 effects on osteosarcoma (OS) cell radiosensitivity included cell viability tests performed according to the Methods section. After 24-hour exposure to the miR-205 mimic, the OS cells received carbon ion beam irradiation, X-ray treatment, or both sequential treatments. The pretreatment of cells with miR-205 resulted in important diminished cell proliferation rates after 72 hours of radiation exposure (Figure 1A,B) and showed the potential of miR-205 to increase OS cell radiosensitivity.

We then analyzed the migratory behaviours of OS cells under single or combined X-ray and carbon ion beam exposure with miR-205. Cell migration toward wound sites showed inhibition when cells had irradiation treatment independently or when cells had treatment with miR-205 exclusively (Figure2). When irradiation was combined with miR-205, it produced an enhanced effect in preventing cell migration. X-rays, together with carbon ion beams, decreased the migratory properties of cells with migration asssay. The inhibition of tumour cell migration reached its peak when miR-205 treatment was combined with irradiation therapy through 50 keV/ μ m carbon ion beam exposures because of their synergistic interaction.



Fig1. Effect of carbon ion beam irradiation plus miR-205 mimic on OS cell proliferation. (A, B) U2OS and MG63 cells were exposed to miR-205 for 24 h or 48 h and/or indicated dose of pretreated carbon ion beam for cell counting (A), the MTT assay (B). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. (C) 3D colony cultures of OS cells treated as indicated. (D) The sensitivity of U2OS and MG63 cells treated with carbon ion beam irradiation plus miR-205 was measured via a colony formation assay. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.



Fig2. Effect of combinatorial treatment with carbon ion beam irradiation plus miR-205 on the migration of OS cells. A, B. Tumor cell migration was assessed using a Transwell chamber assay. *P < 0.05, **P < 0.01,

***P < 0.001, bar = 500 μm

miR-205 combined C-ion treatment activates autophagy and DNA Damage in OS cells

Western blot analysis assessed autophagy-related markers as a means to study the tumour-suppressing connection between combined miR-205 and carbon ion beam treatment. The results showed that autophagy markers LC3-II and Atg7 showed elevated expression following combined treatment when compared to the control group, as shown in Figure 4A. To elucidate the involvement of DNA damage in miR-205 -induced radiosensitization, we analyzed the formation of yH2AX. miR-205 treatment alone only slightly increased yH2AX expression, but markedly increased the effects of γ -rays and carbon ion beams on yH2AX. Notably, yH2AX foci formation by 2 GyE carbon ion irradiation was greater than, that caused by 2 Gy X-ray irradiation either with or without miR-205 treatment. The data shows that miR-205 treatment with carbon ion irradiation activates autophagy at higher levels than either therapy used separately, which supports a possible therapeutic mechanism.



Fig3. OS cells were treated with carbon ion beam irradiation plus miR-205 mimic and western blotting was performed using the antibodies indicated for different timepoints.

Our study provides comprehensive evidence of the significant role of miR-205 in modulating the radiosensitivity of OS cells, particularly when combined with high LET carbon ion beam irradiation. The observed effects on cell viability, apoptosis induction, DNA damage, and migration underscore the potential of miR-205 as a therapeutic target to improve the outcomes of Cion beam therapy in osteosarcoma. Further elucidation of the specific molecular pathways influenced by miR-205 in these processes is crucial for the development of targeted therapeutic strategies in OS treatment. As we advance our understanding of the molecular intricacies involved, the translational potential of miR-205 modulation in enhancing the efficacy of Cion beam radiation therapy holds promise for improving clinical outcomes in osteosarcoma patients.

¹Department of Biochemistry, School of Medicine, Daegu Catholic University, 33 17-gil, Duryugongwon-ro, Nam-gu, Daegu 42472, Korea. ²Department of Charged Particle Therapy Research,

OST Hospital, OST

List of Publications

(1) Publications

Won-Seok Lee, Toshiaki Kokubo, Younshick Choi, Tsuyoshi Hamano, Alexander Zaboronok, Takaaki Ishikawa, Oh-Dae Kwon, <u>EunHo Kim</u> & Jong-Ki Kim Carbon ion stimulation therapy reverses iron deposits and microglia driven neuroinflammation and induces cognitive improvement in an Alzheimer's disease mouse model. scientific reports 2025
 Younshick Choi, Won-Seok Lee, Jaemeun Lee, Sun-Hyun Park, Sunwoung

Kim, Ki-Hong Kim, Sua Park, <u>EunHo Kim</u> *, Jong-Ki KIM * Capacitive-electrode based Electric field treatments on redox-toxic iron deposits in transgenic AD mouse models: The electroceutical targeting of

Alzheimer's disease feasibility study International Journal of Molecular Sciences 2023 24(11), 9552 31 May 2023

3. Haiyu Song †, <u>Eun Ho Kim</u>†, Jihee Hong†, Dasom Gwon, Jee Won Kim, Gyu-Un Bae *, and Chang-Young Jang *Hornerin mediates phosphorylation of the polo-box domain in Plk1 by Chk1 to 2 induce death in mitosis Cell Death& differentiation 2023 (impact factor 12.4) cofirst 2023 Sep;30(9):2151-2166.

4. Jeong-Yub Kim, Chan-Woong Jung, Won Seok Lee, Hyeon-Jeong Jeong, Myung-Jin Park, Won II Jang, Eun Ho Kim. Emodin coupled with high LET neutron beam-a novel approach to treat on glioblastoma. J Radiat Res. 2022 Dec 6;63(6):817-827.

 Jeong-Yub Kim, Chan-Woong Jung, Won Seok Lee, Hee-Jin Kim, Hyeon-Jeong Jeong, Myung-Jin Park, Won II Jang, <u>Eun Ho Kim</u>. Interaction of curcumin with glioblastoma cells via high and low linear energy transfer radiation therapy inducing radiosensitization effects. J Radiat Res. 2022 May 18;63(3):342-353.

 Jeong-Yub Kim, Won Seok Lee, Seung-Jun Seo, Chan-Woong Jung, Eun Ho Kim. Effects of gold nanoparticles on normal hepatocytes in radiation therapy. Transl Cancer Res. 2022 Aug;11(8):2572-2581

7. <u>Eun Ho Kim</u>, <u>Won Seok Lee</u>, <u>Hoon-Kyu Oh</u>. Tumor-treating fields in combination with sorafenib curtails the growth of colorectal carcinoma by inactivating AKT/STAT3 signaling. Transl Cancer Res. 2022 Aug;11(8):2553-2561.

8. <u>Won Seok Lee</u>, <u>Eun Ho Kim</u>. Combination therapy of Doxorubicin with TTFields and radiation: newer approaches to combat lung cancer. Am J Cancer Res. 2022 Jun 15;12(6):2673-2685

9. <u>Seungjun Seo</u>, <u>Eun Ho Kim</u>, <u>Won-Seok Chang</u>, <u>Won-Seok Lee</u>, <u>Ki-Hwan Kim</u>, and <u>Jong-Ki Kim</u>. Enhanced proton treatment with a LDLR-ligand peptide-conjugated gold nanoparticles targeting the tumor microenvironment in an infiltrative brain tumor model. <u>Am J Cancer Res.</u> 2022; 12(1): 198–209.

10. <u>Sei Sai</u>, <u>Eun Ho Kim</u>, <u>Woong Sub Koom</u>, <u>Guillaume Vares</u>, <u>Masao Suzuki</u>, <u>Shigeru Yamada</u>, <u>Mitsuhiro Hayashi</u>. Carbon-Ion Beam Irradiation and the miR-200c Mimic Effectively Eradicate Pancreatic Cancer Stem Cells Under in vitro and in vivo Conditions. Onco Targets Ther. 2021 Sep 16:14:4749-4760.

11. <u>Won Seok Lee, Seung-Jun Seo, Hye Kyung Chung, Jang Woo Park, Jong-Ki Kim</u>, <u>Eun Ho Kim</u>. Tumor-treating fields as a proton beam-sensitizer for glioblastoma therapy. Am J Cancer Res. 2021 Sep 15;11(9):4582-4594

12. Jeong-Yub Kim, Hee-Jin Kim, Chan-Woong Jung, Tae Sup Lee, Eun Ho Kim, Myung-Jin Park. CXCR4 uses STAT3-mediated slug expression to maintain radioresistance of non-small cell lung cancer cells: emerges as a potential prognostic biomarker for lung cancer. Cell Death Dis. 2021 Jan 7;12(1):48.

13. Eun Ho Kim, Jeong Yub Kim, Mi-Sook Kim, Guillaume Vares, Tatsuya Ohno, Akihisa Takahashi, Akiko Uzawa, Seung-Jun Seo, Sei Sai. Molecular mechanisms underlying the enhancement of carbon ion beam radiosensitivity of osteosarcoma cells by miR-29b. Am J Cancer Res. 2020 Dec 1;10(12):4357-4371.

14. Sei Sai, Eun Ho Kim, Guillaume Vares, Masao Suzuki, Dong Yu, Yoshiya Horimoto, Mitsuhiro Hayashi. Combination of carbon-ion beam and dual tyrosine kinase inhibitor, lapatinib, effectively destroys HER2 positive breast cancer stem-like cells. Am J Cancer Res. 2020 Aug 1;10(8):2371-2386.

15. Eun Ho Kim, Jeong Yub Kim, Mi-Sook Kim, Guillaume Vares4, Tatsuya Ohno, Akihisa Takahashi, Akiko Uzawa, Seung-Jun Seo1, Sei Sai. Molecular mechanisms underlying the enhancement of carbon ion beam radiosensitivity of osteosarcoma cells by miR-29b. Am J Cancer Res 2020;10(12):4357-4371.

16. <u>Eun Ho Kim</u>, <u>Mi-Sook Kim</u>, <u>Akihisa Takahashi</u>, <u>Masao Suzuki</u>, <u>Guillaume Vares</u>, <u>Akiko Uzawa</u>, <u>Akira Fujimori</u>, <u>Tatsuya Ohno</u>, <u>Sei Sai</u>. Carbon-Ion Beam Irradiation Alone or in Combination with Zoledronic acid Effectively Kills Osteosarcoma Cells.

17. <u>Eun Ho Kim</u>, Yunhui Jo, Sei Sai, Mung-Jin Park, Jeong-Yub Kim, Jin Su Kim, Yeon-Joo Lee, Jae-Min Cho, Seo-Young Kwak, Jeong-Hwa Baek, Youn Kyoung Jeong, Jie-Young Song, Myonggeun Yoon, Sang-Gu Hwang. Tumor-treating fields induce autophagy by blocking the Akt2/miR29b axis in glioblastoma cells. Oncogene 2019 Sep;38(39):6630-6646

Proceedings

EunHo Kim et. al..: preparing a manuscript. Oncotarget and therapy (plan to submit by the late of April)

Title: miRNA-17 inhibitor enhances Carbon ion- radiosensitivity in osteosarcoma

Molecular mechanism of heavy ions overcoming radiation resistance of p53 mutant cancer cells(23J348)

C-X. Di^a, Q. Li^a, B. Wang^b, T. Katsube^b

Abstract

With the rapid development of p53-targeted therapy in the field of tumor radiosensitization, the regulatory role of p53 mutation status in radiation sensitivity has been widely demonstrated. However, research on the synergistic effects of high-LET carbon ion irradiation combined with p53-targeting drug APR-246 remains relatively scarce. In this study, we found that carbon ion irradiation significantly enhanced the radiosensitivity of p53 wild-type cells, while p53-mutant cells exhibited marked resistance. Through combination treatment with APR-246, we observed significantly enhanced proliferation inhibition, more pronounced DNA synthesis blockade, and higher levels of apoptosis in p53-mutant cervical cancer C33A cells. Notably, the combined treatment markedly increased y-H2AX foci formation, suggesting that APR-246 may enhance radiosensitivity by restoring the transcriptional regulatory function of mutant p53 and interfering with the DNA damage repair system. This study is the first to reveal the synergistic mechanism between high-LET carbon ions and p53-targeted drugs, providing new theoretical foundations for optimizing p53 status-based precision radiotherapy strategies. These findings may open new avenues for improving radiotherapy efficacy in p53-mutant tumors.

1 Background and objectives

Since Marie Curie discovered radium and the application of X-ray in medicine in 1898, radiation has been used to directly kill cancer cells or cause DNA damage leading to the death of tumor cells [1, 2]. It has been reported that almost 70% of cancer patients require radiotherapy currently [3]. Despite the innovation and improvement of radiotherapy technology, including accuracy, treatment quality and survival rate, many patients still develop radioresistance [4]. Several studies have identified mutated genes in tumor cells, which may be associated with the development of radioresistance. Among these genes, mutation of TP53 is the main driver of increased

resistance to radiotherapy [5]. As an important tumor suppressor gene in human body, the protein encoded by TP53 is a transcription factor, which controls cell cycle, DNA replication and uncontrolled cell division during tumor growth [6]. However, when p53 is mutated, it loses its ability to suppress tumors, promotes tumorigenesis, and affects tumor sensitivity to radiation during radiotherapy [7, 8]. Unfortenately, mutation of TP53 is found in over 50% of cancers (Fig. 1) [9]. Many studies have reported that p53 gene mutant cancer cells are more resistant to radiation, which is one of the primary reasons for the failure of conventional radiotherapy. While the radiation resistance of cancer cells increases due to dysregulation of the apoptotic mechanism resulting from p53 deficiency for low LET radiation, high LET heavy ion radiation can still induce apoptosis of p53-deficient cells, indicating an unknown activation of p53-independent apoptosis mechanism.

Considering the radiation resistance of cancer tissue, which leads to the failure of conventional radiotherapy, this study aims to build on the existing research into heavy ion beam cancer therapy. It will precisely calculate the radioresistance of p53 gene mutations in cancer cells with different biological characteristics, taking advantage of the physical properties of heavy ions and the biophysics of their interactions with organisms. This study will also elucidate the apoptosis and molecular mechanism of radiation resistance independent of p53, clarify the regularity and biological significance of DNA damage and repair of p53 mutant cancer cells induced by heavy ion irradiation, and provide a scientific basis for researching scheme or measures to improve the curative effect of heavy ion beam therapy,. The findings will be applied to the clinical trial and treatment of heavy ion beam therapy and serve the whole society.

References:

- Jean-Claude, R. and F. Nüsslin, Marie Curie's contribution to Medical Physics. Phys Med, 2013. 29(5): p. 423-5.
- (2) Wang, B., et al., Flexible perovskite scintillators and

detectors for X-ray detection. iScience, 2022. 25(12): p. 105593.

- (3) Taunk, N., The role of proton therapy in gynecological radiation oncology. Int J Gynecol Cancer, 2022. 32(3): p. 414-420.
- (4) Chen, X., et al., Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. Cell Death Dis, 2022. 13(11): p. 974.
- (5) Werbrouck, C., et al., TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). Clin Cancer Res, 2019. 25(22): p. 6788-6800.
- (6) Luo, Q., et al., Dynamics of p53: A Master Decider of Cell Fate. Genes (Basel), 2017. 8(2).
- (7) Strigari, L., et al., Abscopal effect of radiation therapy: Interplay between radiation dose and p53 status. Int J Radiat Biol, 2014. 90(3): p. 248-55.
- (8) Yue, X., et al., Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gainof-Function, and Therapy. J Mol Biol, 2017. 429(11): p. 1595-1606.
- (9) Chen X, Zhang T, Su W, Dou Z, Zhao D, Jin X, Lei H, Wang J, Xie X, Cheng B, Li Q, Zhang H, Di C (Corresponding author). Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. Cell Death Dis. 2022 Nov 18;13(11):974.

2 Activities and results

This study investigated the effects of carbon ion irradiation on cellular radiosensitivity based on p53 status. The results demonstrated that p53-mutant cells exhibited significant radiation resistance, whereas p53 wild-type cells were more sensitive to radiation (Fig 1). These findings are consistent with previous studies, confirming the crucial role of p53 as a key tumor suppressor in regulating DNA damage response induced by radiation. To enhance the therapeutic efficacy against p53-mutant tumor cells, we explored a combined strategy of carbon ion irradiation with the targeted therapeutic drug APR-246. APR-246 is a small-molecule compound that specifically binds to mutant p53 protein and restores its wild-type conformation and function. Experimental results showed that the combination of carbon ion irradiation and APR-246 significantly enhanced the inhibitory effect on the proliferation of p53-mutant cervical cancer cells (C33A) compared to irradiation alone (Fig

2). EdU incorporation assays further confirmed that the combined treatment more effectively blocked DNA synthesis than irradiation alone (Fig 3), suggesting that APR-246 may enhance cellular sensitivity to radiationinduced replication stress by restoring p53 function. Flow cytometry analysis revealed that the combination therapy induced a significantly higher apoptosis rate than irradiation alone (Fig 4), indicating a synergistic pro-apoptotic effect between the two treatment modalities. Notably, immunofluorescence staining demonstrated a marked increase in y-H2AX foci formation in the combination treatment group (Fig 5). As a biomarker of DNA double-strand breaks, the elevated expression of γ -H2AX not only confirmed that carbon ion irradiation induces more complex DNA damage but also suggested that APR-246 may enhance radiosensitivity through the following mechanisms: (1) restoring the transcriptional regulatory function of mutant p53, thereby promoting pro-apoptotic gene expression, and (2) interfering with the normal operation of the DNA damage repair system. This study is the first to demonstrate the synergistic anti-tumor effect of carbon ion radiotherapy combined with a p53targeting drug in p53-mutant cervical cancer cells, providing important experimental evidence for clinical translation.

^a Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, China ^b National Institutes for Quantum Science and Technology, Japan



Fig.1 Cancer cells with p53 gene mutations more resistant to radiation.C33A cells: harbor p53 mutations;HeLa cells: exhibit low p53 expression due to HPV-18 positivity; SiHa cells: possess wild-type p53.



Fig.2 Heavy ion irradiation combined with APR-246, a drug that targets p53 mutations can inhibit C33A cell growth.



Fig.3 Compared to heavy ion irradiation alone, irradiation of combined APR-246 inhibited DNA synthesis in C33A cells.



Fig.4 Heavy ion irradiation combined with APR-246 induced more apoptosis than irradiation alone in C33A cells.



Fig.5 Heavy ion irradiation combined with APR-246 induces more damage than irradiation alone.

Molecular mechanism of heavy ions overcoming radiation resistance of p53 mutant cancer cells(23J348)

C-X. Di^a, Q. Li^a, B. Wang^b, T. Katsube^b

^a Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, China

^b National Institutes for Quantum Science and Technology, Japan

成果一覧

記載事項なし

The Functional Role and Underlying Mechanism of Heavy Ions in Overcoming

the Radioresistance of Quiescent Cancer Cells (23J349)

J. Si^a, J-H. Zhang^a, L. Gan^a, C. Sun^a, C-X. Di^a, H. Zhang^a, B. Wang^b, T. Katsube^b

Abstract

Radio-resistance is a major contributor to radiotherapy failure and poor prognosis in cancer patients. Quiescent cells are considered a major cause of cancer radioresistance. As a novel strategy for cancer therapy, heavyion radiotherapy has drawn more and more attention. However, the potential molecular mechanisms to overcome the radio-resistance of quiescent tumor cells using carbon-ion beams are not fully understood. We found that that quiescent MCF-7 cells have strong radioresistance. Carbon ion irradiation induced a number of 53BP1 and v-H2AX foci, increasing the expression of apoptotic genes, indicating that carbon-ion radiation efficiently eradicate quiescent MCF-7 cells by inducing complex DNA damage. This study provides support of basic data and reasonable molecular mechanism explanation for technical measures to further improve the effect of radiotherapy for breast cancer, which is conducive to the further promotion and development of carbon ion beam radiotherapy technology and benefits human health.

1 Background and objectives

Quiescent cells are considered as a major cause of cancer radio-resistance due to their larger hypoxic fraction and greater repair ability. Cellular quiescence refers to a dormant but reversible state in which cell cycle entry and proliferation are prevented. Three distinct treatment strategies to target quiescent cancer cells have been suggested: (i) to keep quiescent cancer cells permanently "asleep", (ii) reactivate quiescent cancer cells and increase their sensitivity to chemotherapy and RT, and (iii) directly eradicate quiescent cancer cells. However, current researches mainly focus on the use of pharmacological agents to maintain, awaken or kill quiescent cancer cells, with extremely limited therapeutic effects.

Heavy-ion RT has become an increasingly valid treatment

option due to its advantageous dose profile and radiobiologic effects compared with conventional RT. Unlike low-linear energy transfer (LET) ionizing radiation (IR), which induces less complex DNA damage, high-LET IR causes more extensive damage, and often has fatal biological consequences. However, the functional role and potential molecular mechanisms of overcoming radioresistance of quiescent tumor cells using carbon-ion beams are currently not fully understood.

Given little previous research on this question, in this study, we researched on the DNA damage and apoptotic of proliferating and quiescent breast cancer cells exposed to carbon ion irradiation, aiming to investigate the biological function and underlying molecular mechanisms of heavy ions in overcoming radio-resistance of quiescent cancer cells.

2 Activities and results

The principal biological effect of RT is to rapidly erase tumour cells by inducing DNA damage beyond the cellular capacity to repair. Data from agarose gel electrophoresis showed that DNA damage in proliferating cells increased to maximum within 0.5 h after carbon ion irradiation, with an approximate 2.62-fold increase in carbon ions compared to the control group. Moreover, the DNA damage reached peak levels at 1 h post irradiation in quiescent cells, specifically, ~2.09-fold higher, relative to the control group (Fig. 1).

Next, we monitored the formation of phosphorylated H2AX at Ser 139 (γ -H2AX) foci and p53-binding protein 1 (53BP1) foci up to 24 h after exposure to carbon ion irradiation (Fig. 2). With application of carbon-ion beams, peak levels of γ -H2AX foci in proliferating and quiescent cells were observed at 0.5 h and 1 h, respectively. Similarly, peak levels of 53BP1 foci in proliferating and quiescent cells were observed at 1 h and 4 h, respectively. The foci induced by carbon ions was still present 24 h after irradiation. These results further proved that quiescent

MCF-7 cells have stronger radio-resistance compared to proliferating MCF-7 cells, high-LET carbon-ion radiation causes more serious DNA damage with slower repair kinetics in quiescent cells.

To confirm the underlying mechanism of IR-induced apoptosis, the expression of apoptosis-related proteins were investigated. In quiescent cells, carbon ions irradiation increased the expression levels of P53, PUMA, and the BAX/BCL-2 ratio. Our observations suggest that carbon ion exposure eradicates dormant cells through activating the mitochondrial-dependent apoptosis pathway (Fig. 3), thus improving the radio-sensitivity of quiescent cancer cells.

^a Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, China





Fig.1 Analysis of intensity of DNA dispersion from the origin over time. The density of DNA dispersion observed in non-treated cells was set to a ratio of 1. CTR: control; CIR: carbon ion.

CIR/proliferationDAPI 7-H2AX53BP1MergeCTRImage: Image: Ima

CIR/quiescence



Fig.2 Confocal microscopy views of MCF-7 cells with γ -H2AX and 53BP1 foci formation after carbon-ion irradiation over the respective time-courses. CTR: control; CIR: carbon ion.



Fig.3 Effects of carbon-ion irradiation on expression levels of apoptosis-relative regulators in proliferating and quiescent MCF-7 cells. Actin was used as a loading control. P: proliferation; Q: quiescence; CIR: carbon ion.

The Functional Role and Underlying Mechanism of Heavy Ions in Overcoming the Radioresistance of Quiescent Cancer Cells (23J349)

J. Si^a, J-H. Zhang^a, L. Gan^a, C. Sun^a, C-X. Di^a, H. Zhang^a, B. Wang^b, T. Katsube^b

^a Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, China

^b National Institutes for Quantum Science and Technology, Japan

成果一覧

記載事項なし

Mechanism study on much efficient induction of tumor cell death by heavy ion

irradiation: the role of NADPH oxidase-mediated mitochondrial vicious cycle

(23J350)

C. Sun^a, X-X. Liu^a, Q. Li^a, Jing. Si^a, C-X Di^a, B. Wang^b, T. Katsube^b

Abstract

Mitochondria are a major source of reactive oxygen species (ROS) and are also the target of cellular ROS. Our data showed that after 4 Gy of carbon ion radiation of HepG2 cells, the NADPH oxidase membrane subunit gp91 was not involved in enzyme activation through increased expression; however, the subunit p47 was involved in activation by being translocated to the membrane. Carbon ion radiation decreased the mitochondrial membrane potential (MMP) of HepG2 cells, increasing mitochondrial DNA damage and inducing cell death. Pretreatment with APO (an NADPH oxidase inhibitor) effectively prevented the MMP decrease, mitochondrial DNA damage, and cell death induced by radiation. However, these protective effects were not observed with APO treatment after irradiation exposure. These data demonstrated that NADPH oxidase activation was an initiator in mitochondrial damage. Once mitochondria entered the feed-forward cvcle, cell fate was no longer controlled by NADPH oxidase. Only antioxidants that targeted mitochondria such as MitoQ could break the cycle and release cells from death. Activated NADPH oxidase might induce the feed-forward cycle of mitochondria and this is a possible mechanism for cancer cell death induced by heavy ion irradiation.

1 Background and objectives

Mitochondrial dysfunction is characterized by high ROS production and breakdown of the membrane potential, and is often associated with mitochondrial DNA (mtDNA) damage. A recent hypothesis about the relationship between ROS and mtDNA damage called the vicious cycle hypothesis. The location of mtDNA is close to the site of ROS production, making it highly vulnerable to oxidative damage. The accumulation of mutations induced by oxidative damage is a possible contributor to mitochondrial dysfunction. Dysfunctional mitochondria produce more ROS, establishing a feed-forward loop in which ROS-mediated oxidative damage to mitochondria results in more ROS generation. Therefore, mitochondria can be as a therapeutic target in cancer.

The catalytic center of NADPH oxidase is the integral membrane protein gp91. During activation in response to agonists, the cytoplasmic subunit p47 of NADPH oxidase ranslocate to the membrane and associate with gp91. This translocation process results in oxidase activation, catalyzing the transfer of electrons from NADPH to molecular oxygen, generating O_2^{-} . In this study, we researched on the killing effects of carbon ion beams on cancer cells from mitochondrial damage induced by NADPH oxidase.

2 Activities and results

NADPH oxidase activity increased significantly 30 min after 4 Gy carbon ion radiation of HepG2 cells (Fig. 1A). We used immunofluorescence staining of membrane proteins and flow cytometry to find a distinct accumulation of p47 on the membrane compared with control (Fig. 1B). These results indicated that radiation induced NADPH oxidase activation by p47 translocation. Pretreatment with 100 mM APO for 30 min followed by 4Gy carbon ion exposure might block p47 translocation to inhibit NADPH oxidase activation. PCR was used to quantify carbon ion radiation-induced mtDNA damage of HepG2 cells. ROS was estimated fluorimetrically. Fig. 2A-B showed mtDNA damage and ROS level were both increased at 20 min postirradiation. Pretreatment with APO effectively prevented mtDNA damage and the sharp increase in ROS induced by radiation. However, the protective effects were not observed after treatment

with APO at 20 min postirradiation. These data demonstrated that NADPH oxidase activation was an initiator in mitochondrial damage. Confocal was used to visualize the intracellular colocalization of MitoSOX and MitoTracker. As seen in Fig. 3A, 4 Gy carbon ion radiation resulted in enhanced mitochondrial superoxide generation compared to untreated controls. The signal intensity of 8-OHdG positive cells increased 24 h after reperfusion, with most immunoreactivity in the perinuclear region of the cytoplasm (Fig. 3B). The 8-OHdG content was higher in the mitochondrial than the nuclear fraction. Thus, mitochondria were the major source of ROS after radiation in HepG2 cells.

^a Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, China





Fig.1 Effects of carbon ion radiation on NADPH oxidase activity in HepG2 cells.





Fig.2 Effects of carbon ion radiation on mtDNA and endogenous ROS.





Fig.3 Effects of carbon ion radiation on mitochondrial superoxide generation and oxidative damage.

Mechanism study on much efficient induction of tumor cell death by heavy ion irradiation: the role of NADPH oxidase-mediated mitochondrial vicious cycle (23J350)

C. Sun^a, X-X. Liu^a, Q. Li^a, Jing. Si^a, C-X Di^a, B. Wang^b, T. Katsube^b

^a Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, China

^b National Institutes for Quantum Science and Technology, Japan

成果一覧

記載事項なし
Radioamplification effect of nanoparticles study on 3D cell models (24J428) E. Porcel^a, F. Feghali^a, R. Hirayama^b, and S. Lacombe^a Report 2024

1. Abstract

Increase of radiation effect in tumor whilst preserving healthy tissue located at the entrance of the track is an important challenge in particle therapy. Nanoparticles (NPs) are good candidates to achieve this goal, thanks to their preferential accumulation in cancer cells and their electronic emission.

However, the presence of hypoxic cells in the tumor is a main cause of radioresistance which can lead to relapse, metastasis and treatment failure.

2. Introduction – objectives

During the last decade, the efficiency of the treatment protocol based on the combination of nanoparticles (NPs) with radiations has been demonstrated. Clinical trials have proved the efficiency of this approach using nanoagents such as gold, hafnium dioxide and gadolinium based nanoagents developed by companies (Nanobiotix, France for NBTXR3; NH-Theraguix, France for AGuIX). They have shown that the treatment by NPs using IT injection (for NBTXR3) or IV injection (for AGuiX) amplifies the effects of radiations. These professionals have demonstrated that the addition of these NPs improves the conventional radiotherapy but so far, very little has been done using particle beams as incident radiation.

The team develops multimodal NPs which, amplify radiation effects at the tumour and are also able to improve medical imaging diagnostic. This strategy aims at developing image-guided particle therapy at term.

In collaboration with R. Hirayama, the group studied the impact of platinum NPs using carbon ions beams (SOBP mode) on 3D models. The spheroid models made with tumoral cells (HeLa) were optimized in France. A protocol has been developed to be able to build survival curves after irradiating the models in presence of NPs. We found that platinum NPs penetrate the spheroid cells and localize in the cytoplasm. They are very efficient to enhance the radiation effect in normoxic conditions.

3. Methodology

3.1 Nanoparticles (NPs)

Platinum containing NPs were synthesized in

France with a radiolytic method patented by the team. The basic composition of the NPs consists of a platinum core covered by a PolyEthylenGlycol shell. The biocompatible coating is used to stabilize and functionalize the NPs. Some NPs are functionalized with a fluorescent dye (rhodamine) to perform confocal microscopy in order to monitor the internalization NPs in the spheroids

3.2 Cell culture and incubation

HeLa (human cervical cancer) were used. A cell solution is dispensed into each well of a 96-well conical-bottom plate, treated with a coating to prevent cell adhesion (Corning, microplates system). This encourages cell aggregation, resulting in the formation of a three-dimensional spheroid whose diameter increases with the time the cells are cultured in the well. Spheroids were maintained in 5% CO_2 incubator at 37°C. For 12h before irradiation, spheroids were treated with NPs. The combined effect of radiation and NPs on cells was quantified by clonogenic, γ H2AX and Ki67 assays.

3.3 Irradiation

Irradiations by C^{6+} ions (E=290 MeV uma⁻¹, Spread Out Bragg Peak=6cm) were performed at QST (Chiba, Japan). The doses ranged from 0 up to 5Gy.

3.4 Analysis

To characterize the type of lesions amplified by the NPs, the survival fraction (SF) curves were simulated with a linear quadratic law:

SF (D) = exp $-(\alpha D + \beta D^2)$

D is the dose of irradiation.

For γH2AX and Ki67 assays, spheroids were fixed and transported to France for staining and analysis.

3.5 Imaging

Localisation experiments of NP in spheroids were performed using confocal imaging These experiments were performed in France.

4. Results and discussions

The survival curves of NPs-free Hela spheroids (control) and Hela spheroids loaded with NPs (incubation time of 12h) irradiated by carbon ions are presented in Figure I.

The cell survival fraction decreases exponentially

with the increase of the radiation dose. We found that the NPs can enhance the radiation effect. It confirms previous results obtained in France with X-rays.

We observed a significant radioamplifying effet of these NPs. The Sensitizing Enhancement Ratio (SER) is about 30 % at 2 Gy.



Figure I : Survival fractions of Hela spheroids irradiated with carbon with (red) or without (black) platinum NPs.

The γ H2AX staining images of Hela spheroids (+/-NPs) at different time points (0 to 16h) after an irradiation of 3 Gy with carbon ions are shown in Figure II. The preliminary analysis showed no impact in DNA damage induction.



Figure II : γH2AX staining images of Hela spheroids (+/- NPs) at different time points (0 to 16h) after an irradiation of 3 Gy with carbon ions.

The γ H2AX staining images of Hela spheroids (+/-NPs) at different time points (0 to 72h) after an irradiation of 3 Gy with carbon ions are shown in Figure III. The analysis is still in progress.



Figure III : Ki67 staining images of Hela spheroids (+/- NPs) at different time points (0 to 16h) after an irradiation of 3 Gy with carbon ions.



Figure IV: localization of platinum NP in tumoral cells using confocal imaging

NPs are capable to penetrate the spheroid and to locate in the cytoplasm, far from the nucleus (see Figure IV).

5. Conclusions and Perspectives

We have shown that platinum NPs are able to amplify the effect of carbon ions. The NPs are internalize by the tumoral cells inside the spheroid. They are clearly localized in the cytoplasm confirming the action site of these NPs. Indeed, no significant effect in DNA damage was found. This result is very important to predict the effect of NPs in tumors.

The next step is to use different types and quality radiations such as helium ions.

 ^a Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), CNRS, Univ. Paris-Saclay, F-91405 Orsay (France),
 ^b Department of Charged Particle Therapy Research, National Institutes for Quantum Science and Technology, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba (Japan)

Radioamplification effect of nanoparticles study on 3D cell models (24J428) E. Porcel List of Publications

1. Synergistic effect of Gemcitabin-loaded metal organic frameworks nanoparticles with particle therapy. Pauline Maury, Ryoichi Hirayama, Xue Li, Pierre Mahou, Marie-Claire Schanne-Klein, Sandrine Lacombe, Ruxandra Gref, Erika Porcel.

International Journal of Pharmaceutics, 124721 (2024).

2. *Human Serum Albumin in the presence of Small Platinum Nanoparticles*. Xiaomin Yang, Erika Porcel, Laurent Marichal, Cesar Gonzalez-Vargas, Amine Khitous, Daniela Salado-Leza, Xue Li, Jean-Philippe Renault, Serge Pin, Hynd Remita, Frank Wien, Sandrine Lacombe.

Journal of Pharmaceutical Sciences 113 (6), 1645-1652 (2024).

3. Theragnostic Gadolinium-Based Nanoparticles Safely Augment X-ray Radiation Effects in Patients with Cervical Cancer. Cyrus Chargari, Pauline Maury, Matthieu Texier, Catherine Genestie, Philippe Morice, Sophie Bockel, Sébastien Gouy, Mouhamadou Ba, Samir Achkar, François Lux, Olivier Tillement, Sandrine Dufort, Géraldine LE Duc, Olivier Debeaumont, Christophe Massard, Amandine Maulard, Erika Porcel, Ratislav Bahleda, Samy Ammari, Daphné Morel, Sophie Espenel, Patricia Pautier, Charlotte Robert, Eric Deutsch. ACS nano 18 (26), 16516-16529 (2024)

4. Tumor-Targeted Perfluorinated Micelles as Efficient Theranostic Agents Combining Positron Emission Tomography and Radiosensitization. Sophia Godel-Pastre, Erika Porcel, Guillaume Pinna, Marie Vandamme, Caroline Denis, Claire Leterrier, Eric Doris, Charles Truillet, Edmond Gravel. ACS Applied Materials & Interfaces 16 (17), 21557-21570 (2024)

			2025 05 1
2024 年度 HI	MAC 共同利用	目研究課題	
整理番号	申請者	課題名	報告書ページ
24L126	篠藤誠	LET 最適化法を用いた膵癌炭素イオン線治療法の新規治療開発	3
23L134	今井礼子	骨軟部腫瘍に対するマルチイオン照射法による LET 制御重粒子	7
		線治療法の開発	
24L135	磯﨑哲朗	心臓 MRI を用いた食道癌に対する重粒子線治療後の心機能障害	9
		計測と新規照射技術開発	
24L136	山口有輝	大腸癌術後のオリゴ転移に対する QST 病院における重粒子線治	21
	子	療の成績	
24L137	黒崎宏貴	膵癌に対する重粒子線治療における予後予測因子の解明	11
24L138	岡東篤	"前立腺肥大症手術歴のある前立腺癌	14
24L139	村田和俊	に対する重粒子線治療の効果と安全性の検討"	17

(7 課題)

2024 年度 H	IIMAC 共同利用	日研究課題一覧	2025-05-1
整理番号	申請者	課題名	報告書ページ
22J001	稻庭拓	新規重粒子線治療の実現に向けた臨床前動物実験	25
22J114	高橋豊	光子線抵抗性細胞株移植マウスモデルを用いた免疫チェックポイン ト阻害剤と重粒子併用時のアブスコパル効果とその作用機序の検討	29
22J137	KIM Jong	Investigation of Carbon Ion Stimulation (CIS) treatment on iron	107
	Ki	deposit in Alzheimer tau cell and synuclein Lewy Bodies in Parkinson Disease model	
24 T146	Safavi-	Fvaluation of a Prototype System for Prompt Gamma Detection	
	Naeini, Mitra	and Neutron Capture Discrimination in NCEPT	
24J147	下川卓志	高 LET 粒子線による放射線抵抗性脳腫瘍の治療を目指した基礎研究 伴侶動物がし細胞の故射線感受性解析"	33
24J140 22T150	川山加大 関百和正	中回動物が心神心の成別秘密支は時例 亜州睡疸(毎射線 岩が)刻に低岩州な子子離沿が)合む)に対する	110
22J100) 所 们 正	重粒子線の有用性および分子機構の解明	110
23J152	佐井星	難治性癌に対する重粒子線照射と薬剤併用による基礎研究	40
23J153	井川和代	三次元培養による重粒子線評価システムの検討	43
23J154	中島菜花 子	プロテアソーム阻害剤の炭素線増感効果	46
23J155	Ebner	Advanced multiomic analysis of DNA Damage and Immunotherapeutic	113
	Daniel Keith	Inhibitors with Heavy-Ion Radiotherapy	
24J156	武島嗣英	光子線と重粒子線の抗腫瘍免疫応答の比較	48
23J204	吉岡公一郎	重粒子線を用いた根治的不整脈治療の開発	63
24J206	石川仁	重粒子線による高精度量子メス治療(マイクロサージェリー)技術開 発と適応拡大に関する研究	51
24J207	Prezado Yolanda	Heavy ion minibeam radiation therapy: safety and efficacy studies	116
22J307	Eun Ho	The identification of miRNA-17 and miR-214 as Carbon-ion	119
94T215	NIⅢ 亚山直→	radioselisitizer oli osteosarcolla 声 I ET 粒乙須に上る睡頂再融表化の燃度密明	54
24J313 99T297	十山元 本田田曲	同LLI松丁隊による運燭行政米山の城庁府の 細防死制御剤に上る粒子須防難効果のマウス個体レベルでの検針	54
20J027 24 T345	林田切 興 Li Oiang	和他先的御舟による社 」称的後効本のそうべ 個体レージレ (の) (Ref)	マシンタ
24,1040	LI QIANG	carbon ions in human hepatocellular carcinoma cells	イム無の本 発表
24J347	小西輝昭	ブラッグピーク近傍の重粒子イオンを用いたイオン特的な細	杨水儿衣
		胞致死効果の研究 Langenarie Line Line Contained Line time time time time time time time tim	
		Ion specific biological effect on cell inactivation of	
		heavy ion near the Bragg peak	
23J348	Di Cuixia	Molecular mechanism of heavy ions overcoming radiation resistance of p53 mutant cancer cells	123
23J349	Jing Si	The Functional Role and Underlying Mechanism of Heavy Ions in Overcoming the Radioresistance of Quiescent Cancer Cells	127
23J350	Sun Chao	Mechanism study on much efficient induction of tumor cell death by heavy ion irradiation: the role of NADPH oxidase-mediated mitochondrial vicious cycle	130
24J413	余語克紀	重粒子線誘発の DNA 損傷を指標としたアミノ酸およびアミノ酸誘導 体の放射線防護剤の探索	68
24J428	PORCEL	Radioamplification effect of nanoparticles study on 3D cell models	133
22J433	中野敏彰	重粒子線誘発により生じる高複雑性 DNA 損傷の修復機構の解明と癌 治療。向けた内田研究	71
22 TAAA	自田酔里	1078、10101に心田型1九 重粒子線に上る酔細昀のゲノト安定性への影響	75
22J444 23TAA6	四山杆刀 Takata	玉虹」 mmによるサイMHUEマノノノム女化IIT、マノ影音 Mutational signatures induced by high IFT rediction	70 79
201440	Kei-ichi	matational Signatures induced by high LEI faulation	10

2024 年度 HIMAC 共同利用研究課題一覧

整理番号	申請者	課題名	報告書ページ
24J447	鈴木雅雄	重粒子線照射がん細胞と非照射細胞間のバイスタンダー効果を介し	82
		た生物効果誘導解明	
24J468	平山亮一	重粒子線照射後における低酸素生物に関する基礎研究	85
24J472	松尾陽一	重粒子線による DNA 損傷と突然変異誘発機構の分子レベルでの解析	88
	郎		
24J501	下川卓志	イオンビームによる微生物・植物への変異導入を利用した基礎研究プ	91
		ラットフォームの構築	
23J503	松山知樹	重粒子線による植物品種識別と突然変異育種に関する研究	95
24J505	高橋美智	重イオンビーム照射による栄養ストレス耐性植物の作出	98
	子		
24J507	下川卓志	実用化を目指した有用微生物の単離・育種	101

(42 課題)

24 年度 H	IMAC 共同利用	研究課題一覧	
理番号	申請者	課題名	報告書ページ
22H005	坂間誠	重粒子線治療照射法に関する総合的研究	139
24H095	新藤浩之	化合物半導体への重イオンの影響に関する研究	170
23H138	山内知也	"高感度飛跡検出器に相応しい新しい検出閾値概念とエッチングモデルの確立	161
23H189	寺沢和洋	Toward a new concept for detection threshold and etching-models suited to track detectors with high registration sensitivity"	173
24H212	中竜大	位置有感比例計数管の重イオンに対する応答	164
23H248	George	超微粒子原子核乾板によるナノスケール高電荷分離放射線飛跡検出	207
	Stuart P	器の展開	
24H262	為ヶ井強	Measurement of Isotopic Light Ion Cross Sections with a Nuclear Fragment Spectrometer	153
23H285	山谷泰賀	粒子線照射による新規超伝導体における臨界電流増強と超伝導対称性の同定	142
22H358	RAFFY	重粒子線照射野イメージングのための OpenPET 装置開発に関する研	マシンタ
	Quentin	究	イム無の 為未発表
23H377	Ploc Ondrej	Dose-rate effects with accelerated ions: Experimental investigation and Simulation of water and biomolecules radiolysis	210
24H380	百田佐多 生	Novel Space Dosimetry System for the Czech Satellite in the Cislunar Environment	マシンタ イム無の 英本政主
23H387	福田祐仁	中間エネルギーにおけろ破砕反応メカニズムの研究	一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一
2H409	牧野高紘	レーザー加速イオン特性評価のための高精度エネルギースペクトロ	156
2H414	Hajdas Wojciech	SiC MOSFET のシングルイベント過渡応答の直接測定	183
22H426	上野恵美	Tests of Heavy Ion Telescopes for JUICE and other future missions of ESA	150
24H437	Rosenfeld Anatoly B	炭素線照射した脂質中に生成するフリーラジカルの検出とその反応 解析	177
24H443	山口貴之	In-Field and Out-of-Field Dose Profile from Therapeutic Hadron Therapy Beams	195
24H445	大田晋輔	不安定原子核の荷雷変化反応の研究	189
24H446	楠本多聞	ガスアクティブ標的による核物質の物性研究	221
24H455	外川学	放射線化学実験で解き明かす生物効果の線量率依存性メカニズムの 解明	198
22H461	Benton Eric R	高放射線耐性を持つ新素材半導体検出器の研究	224
22H462	Safavi Naeini Mitra	Atmospheric Ionizing Radiation Detector Development	
22H465	高橋忠幸	Evaluation of a prototype system for prompt gamma detection and neutron capture discrimination in NCEPT	186
22H466	今井伸明	ガンマ線衛星搭載検出器の重イオン応答の研究	201
22H467	小林正規	対称重イオン核融合反応の断面積評価と新同位体探索	147
23H473	唐 涵 臿 信	招音波エコーを利用した水中における重約子線飛跡可相化の研空	167
23H474	Berger	エネルギー分解能を持つ白雲母固体飛跡検出器の開発	227
2311/75	Davis	Human Space Exploration - The Radiation risks and nevel new	在险
2011470	Pavis	detector developments	光
23H476	Dong Hai	Radiation Effects Testing Electronic Components for Space	231
23H479	大島武	Cross sections for charge pickup reaction of heavy ions on	234

2025-05-16	5
------------	---

2024 年度 HIMAC 共同利用研究課題一覧			
申請者	課題名	報告書ページ	
	elemental targets at Himac energies		
北村徳隆	"民生部品の宇宙利用拡大に向けた高信頼車載デバイスの	159	
García	放射線損傷メカニズム解明"	237	
Alía			
Rubén			
Kim	シリコンカーバイド検出器の重イオンビームに対する応答	免除	
Sunghwan			
М			
仲田光一	High-energy heavy ions and their interaction with matter for	免除	
	enhanced radiation effects testing of space and accelerator		
	electronics		
Sihver	Calibrations of Advanced Particle dosimeter and Spectrometer	免除	
Lembit	for Heavy Ions in Space Radiation		
小林和淑	"半導体部品の宇宙機器への適用に向けた	157	
	MAC 共同利 申請者 北村徳隆 García Alía Rubén Kim Sunghwan M 仲田光一 Sihver Lembit 小林和淑	 MAC 共同利用研究課題一覧 申請者 課題名 elemental targets at Himac energies 北村徳隆 『民生部品の宇宙利用拡大に向けた高信頼車載デバイスのGarcía 放射線損傷メカニズム解明" Alía Rubén Kim シリコンカーバイド検出器の重イオンビームに対する応答 M 仲田光一 High-energy heavy ions and their interaction with matter for enhanced radiation effects testing of space and accelerator electronics Sihver Calibrations of Advanced Particle dosimeter and Spectrometer Lembit for Heavy Ions in Space Radiation 小林和淑 "半導体部品の宇宙機器への適用に向けた 	

(36 課題)