

炭素イオン線の抗腫瘍効果に対する 5-アミノレブリン酸の
増感作用と機序の解明

2018 年 9 月

金子友子

目次

第1章 序論	1
1-1 炭素イオン線治療	1
1-2 ALA および代謝中間体 PpIX	5
1-3 ALA および PpIX の炭素イオン線増感剤としての可能性	7
第2章 実験方法	8
2-1 細胞の培養	8
2-1-1 細胞株	8
2-1-2 血清	8
2-1-3 培地	8
2-1-4 その他の溶液	8
2-2 細胞解凍	9
2-3 細胞継代	10
2-4 細胞の凍結保存	10
2-5 細胞内取り込み実験	10
2-6 WST-1 アッセイ	11
2-7 炭素イオン線増感活性の評価（コロニーアッセイ）	11
2-7-1 炭素イオン線増感活性の評価 （炭素イオン線照射:放射線医学総合研究所）	11
2-7-2 炭素イオン線増感活性の評価 （炭素イオン線照射:兵庫県立粒子線医療センター）	12
2-7-3 炭素イオン線増感活性の評価（ギムザ染色）	12
2-7-4 炭素イオン線増感活性の評価（コロニー形成率算出）	13
2-8 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価	13
2-8-1 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価（炭素イオン線照射）	13
2-8-2 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価（MitoSoX Red 試薬処理）	14

2-8-3	ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価 (蛍光顕微鏡による算出)	14
2-9	DNA2 本鎖切断能の評価	14
2-9-1	DNA2 本鎖切断能の評価 (炭素イオン線照射)	14
2-9-2	DNA2 本鎖切断能の評価 (ヒストン H2AX フォーカスアッセイ用試薬の調製)	15
2-9-3	DNA2 本鎖切断能の評価 (ヒストン H2AX フォーカスアッセイ)	15
2-9-4	DNA2 本鎖切断能の評価 (蛍光顕微鏡による定量)	16
2-10	細胞内 PpIX の局在観察	16
第 3 章	結果および考察	17
3-1	細胞内取り込み実験	17
3-2	WST-1 アッセイ	18
3-3	炭素イオン線増感活性の評価	19
3-3-1	炭素イオン線増感活性の評価 (放射線医学総合研究所)	19
3-3-2	炭素イオン線増感活性の評価 (兵庫県立粒子線医療センター)	19
3-4	ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価	20
3-5	DNA2 本鎖切断能の評価	21
3-6	細胞内 PpIX の局在観察	22
3-7	考察	25
第 4 章	結論	26
第 5 章	謝辞	26
第 6 章	参考文献	27

第 1 章 序論

1-1 炭素イオン線治療

炭素イオン線は現在の重粒子線治療で臨床使用されている放射線である。荷電粒子線である炭素イオン線は、物質内を進む際、深部で停止する直前に放出エネルギーが最大となる特有の物理特性を持つ。このエネルギーの最大部分は **Bragg peak** と呼ばれ、**Bragg peak** をターゲットとなる腫瘍の位置、大きさに合わせることで線量集中性の優れた治療が可能となり、短期照射を行うことによって、より腫瘍に対する効果の高い治療を行うことができる。また、炭素イオン線は、荷電粒子の飛跡に沿って単位長さあたりに与えられるエネルギー量である線エネルギー付与 (**linear energy transfer : LET**) が高い、高 **LET** 放射線に分類され、生物学的効果が高い。従来放射線治療に用いられてきた **X** 線は低 **LET** 放射線に分類される。放射線によって生物学的効果を生じさせる標的はデオキシリボ核酸 (**DNA**) であり、低 **LET** 放射線では、水分子を電離させることによって活性酸素種 (**reactive oxygen species : ROS**) を生じ、その活性酸素種が生体内にダメージを及ぼすことによって主に **DNA1** 本鎖切断を生じさせる (間接作用)。一方、高 **LET** 放射線である炭素イオン線は、生体高分子に直接的に損傷を与えることによって主に **DNA2** 本鎖切断を生じさせる (直接作用)。**DNA2** 本鎖切断は **DNA 1** 本鎖切断と比べ修復が困難であり致命的なダメージとなる。そのため、炭素イオン線の方がより大きな障害を細胞に与えることが可能であり、炭素イオン線の生物学的効果比 (**relative biological effectiveness : RBE**) は、**X** 線の 2~3 倍と言われており、また、**X** 線抵抗性の低酸素性細胞に対しても抵抗性を示さず、酸素増感比 (**oxygen enhancement ratio : OER**) が 1.0 に近づくことが知られている。

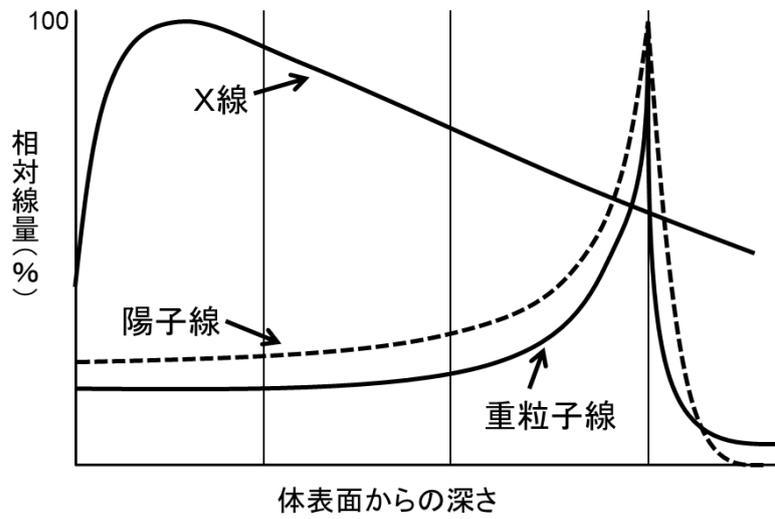


図 1. 重粒子線、陽子線、X 線の線量分布

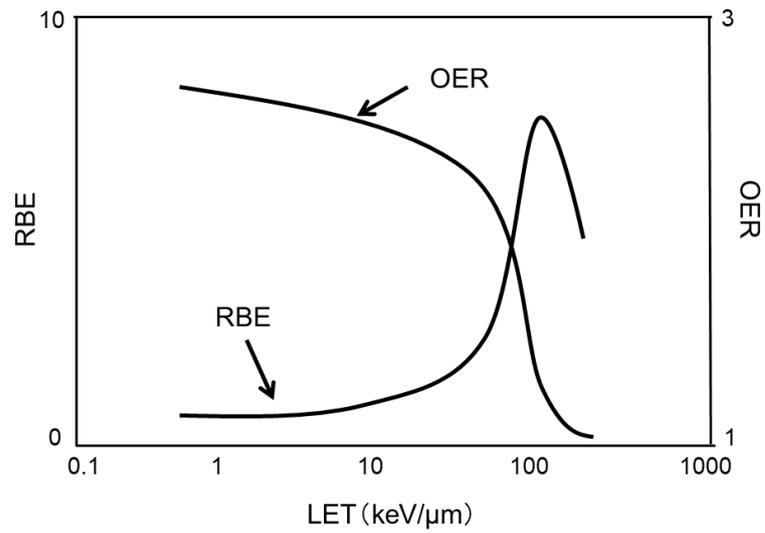


図 2. LET と RBE、OER の関係

炭素イオン線は、線量集中性に優れ、生物学的効果が高いことから X 線による放射線治療では治療困難であった骨軟部肉腫や頭頸部領域の悪性黒色腫、腺癌などの難治性がんの治療に対しても有効とされているが、必ずしも炭素イオン線による治療効果が十分であるとは限らず、炭素イオン線照射単独では完治が困難な腫瘍も存在する。また、線量集中性に優れた炭素イオン線であっても、危険臓器 (organ at risk : OAR) がターゲットとなる腫瘍に隣接し、治療計画における治療体積 (treated volume : TV) と計画的危険臓器体積 (planning organ at risk volume : PRV) がオーバーラップしている場合は、総照射線量を減らす、又は炭素イオン線治療適応とならない場合もある。そのため、治療効果をより高める薬剤の開発が期待されている。しかし、炭素線は炭素イオン自体の物理的な DNA 障害性が強く、活性酸素種 (ROS) の効果が小さいという作用機構のため、炭素線の抗腫瘍効果を増強する薬剤についてはあまり報告がされていない。そこで本研究では 5-アミノレブリン酸 (ALA) 及びその代謝中間体であるプロトポルフィリン IX (PpIX) について着目した。

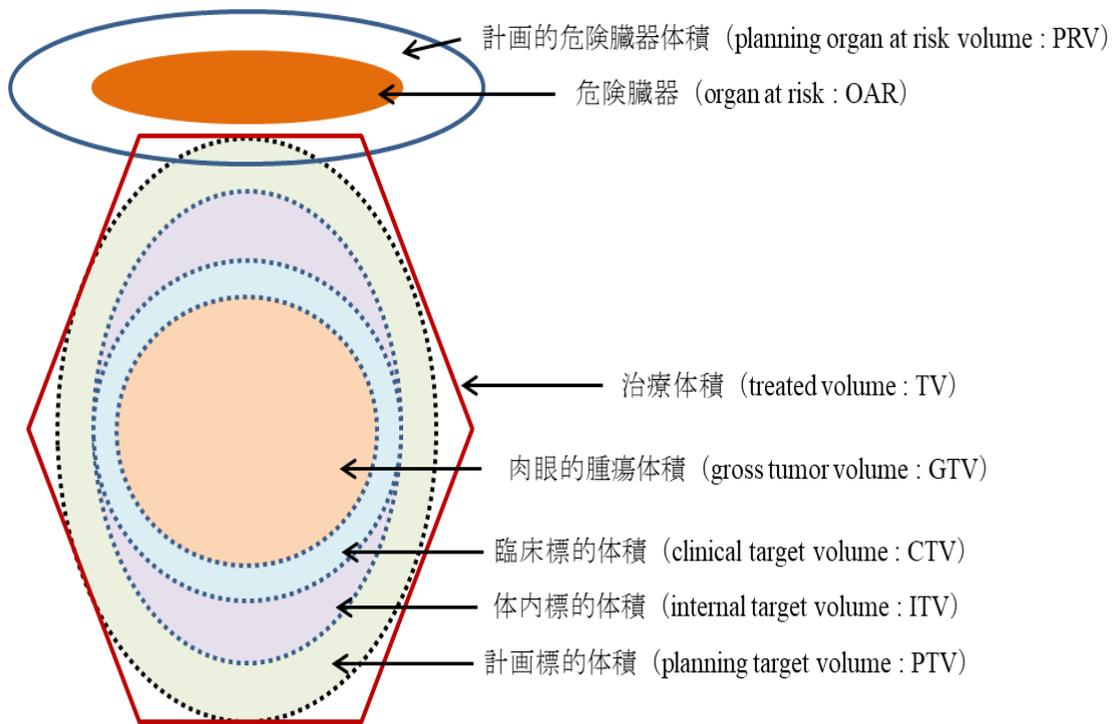


図 3. 放射線治療計画で用いる体積

1-2 ALA および代謝中間体 PpIX

ALA はヒトのヘム生合成経路における最初の代謝物であり、ALA からヘムに生合成される過程において PpIX に代謝される。以下に ALA の代謝経路を示す。

- (1) ALA が存在すると、細胞膜に存在するペプチドトランスポーター (PEPT) の働きによって細胞内に取り込まれる。
- (2) ALA デヒドロゲナーゼの働きにより、ALA 2 分子が縮合し、ポルホビリノーゲンが生じる。
- (3) ポルホビリノーゲンデアミナーゼの働きにより、ポルホビリノーゲン 4 分子から直鎖状のヒドロキシメチルピランが生じる。
- (4) ウロポルフィリノーゲンⅢシンターゼの働きによりポルフィリン環の原型が形成され、ウロポルフィリノーゲンⅢが生成する。この際、ウロポルフィリノーゲンⅢにおいて一つのピロール環が反転する。
- (5) ウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼの働きにより、4 分子の CO₂ がウロポルフィリノーゲンⅢより脱離し、コプロポルフィリノーゲンⅢが生じる。
- (6) ABCB6 の関与によってミトコンドリア内に移動が行われる。
- (7) コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼの働きにより、2 分子の CO₂ が脱離し、プロトポルフィリノーゲンが生じる。
- (8) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの働きにより、プロトポルフィリノーゲンが酸化され、PpIX が生じる。
- (9) 薬剤排出トランスポーターである ABCG2 の働きにより、細胞外へ排出されるか、ヘム・ビリルビンなどに代謝されてから ABCC の働きによって細胞外に排出される。

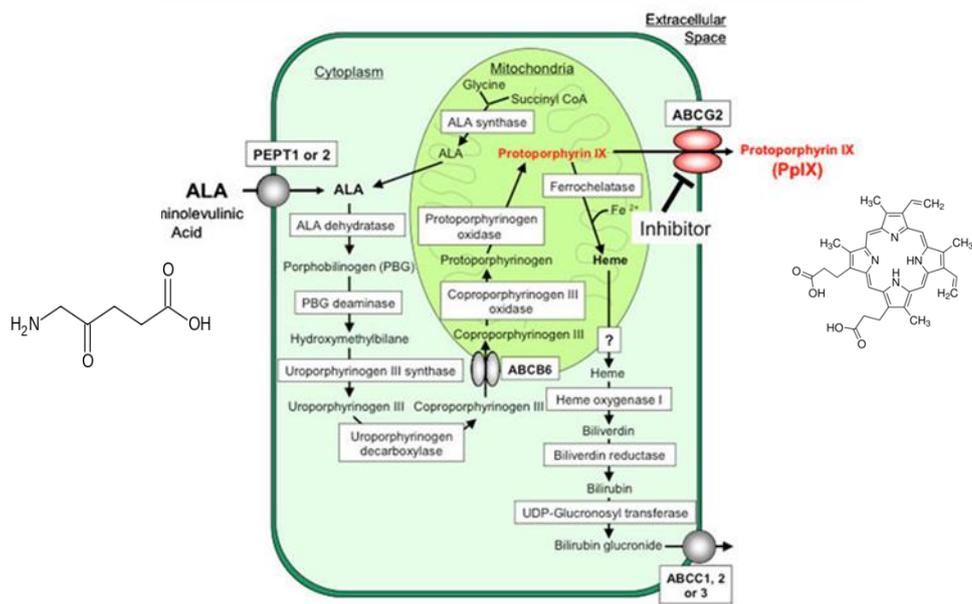


図4. 5-アミノレブリン酸（ALA）の代謝経路

腫瘍細胞では解糖系でのエネルギー生産が多く、ALAの代謝経路におけるPpIXからヘムへの代謝が低下し、PEPT1などのトランスポーターによるALAの取り込みが活性化していることが近年報告されている。よって、ALAの代謝中間体であるPpIXが腫瘍細胞に選択的に蓄積することから、ALAは既に光線力学診断／療法の薬剤として実用化されている。ALAの代謝中間体であるPpIXは光感受性物質であり、400～410 nmの青紫色光励起下で赤色蛍光を放出する特性を持ち、経口投与による光線力学診断（Photodynamic Diagnosis : PDD）薬として使用されている。光線力学療法（Photodynamic Therapy : PDT）では、635nm付近の光を照射することで、腫瘍細胞選択的に蓄積したPpIXの光励起によって発生する一重項酸素による抗腫瘍効果を活用することによって治療が試みられている。

1-3 ALA および PpIX の放射線増感剤としての可能性

近年 ALA は低 LET 放射線である X 線の増感剤としての研究が進められている。その結果、X 線の照射によって ROS 産生が増加し、X 線の効果を増強することが明らかとなってきた。高 LET 放射線である炭素イオン線による DNA 損傷は、その多くが ROS を介さないと言われている。しかし、最近の研究では、炭素イオン線による ROS 産生の報告がある。また、炭素イオン線治療施設の多くは、リッジフィルタによって深さ方向に線量分布を平坦化した拡大 Bragg peak (Spread-Out Bragg Peak : SOBP) を形成し、治療用ビームとして使用している。拡大 SOBP による照射では、炭素イオン線においても間接作用の寄与があるという報告がある。よって ALA は炭素イオン線においても ROS 産生を高め、炭素イオン線増感作用を発揮する可能性がある。そこで本研究では、ALA および PpIX が炭素イオン線増感剤として有効であるか、炭素イオン線増感効果とその作用機序の解明を目的として実験を行った。実験の内容としては、薬剤との併用における照射条件決定のため、ALA 由来 PpIX および PpIX の細胞内取り込みの評価、ALA および PpIX の細胞毒性の評価を行った。その後、炭素イオン線増感活性、ミトコンドリア内 ROS 産生能および DNA 2 本鎖切断能の評価を行った。さらに作用機序についてより深い考察を行うために、炭素イオン線照射時の細胞内 PpIX の局在について観察を行った。

第2章 実験方法

2-1 細胞の培養

2-1-1 細胞株

EMT6 細胞

マウス由来乳腺がん細胞株である EMT6 を用いた。

2-1-2 血清

ウシ胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum)

ウシ胎児血清を恒温槽中において、56℃、30 min の条件で振盪を行いながら加熱を行うことによって非働化を行った。その後室温まで冷ましてから 50 mL チューブに分注を行い、冷凍庫にて凍結保存を行った。使用する際は、37℃の恒温槽で溶かしてから用いた。

2-1-3 培地

EMEM 培地 (Eagle's minimum essential medium)

低温に保存されている 489.5 mL の EMEM に非働化を行ったウシ胎児血清 (30℃, 3000 rpm, 20 min にて遠心済み) の上清 55 ml 及びペニシリンストレプトマイシン 5.5 mL を加えることによって EMEM/10%FBS/1%P.S (以後 EMEM 培地または培地と記す) を作製し、低温保存した。

2-1-4 その他溶液

10×PBS

塩化ナトリウム (NaCl) 80 g、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (Na₂HPO₄・12 H₂O) 29 g、リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄) 2 g、塩化カリウム (KCl) 2 g を量り取ったのちに、これらを milliQ 水で溶解し、1000 mL にメスアップした。メスアップ後、medium 瓶に 500 mL ずつ分注を行い、121 °C、20 min の条件でオート

クレーブ殺菌を行った。その後、低温にて保存した。

1×PBS（細胞 wash 用）

滅菌を行った 10×PBS 50 mL を milliQ 水にて 500 mL にメスアップした。その後 medium 瓶に移し、121 °C、20 min オートクレーブ殺菌を行った。その後低温保存をした。

1×PBS（コロニー染色用）

滅菌を行った 10×PBS 50 mL を milliQ にて 500 mL にメスアップした。その後 medium 瓶に移した。その後低温保存をした。

0.05 % Trypsin-EDTA

0.5 % Trypsin-EDTA を 1×PBS にて 10 倍希釈することによって 0.05 % Trypsin-EDTA 液を調整した。

HEPES

HEPES 23.8g を約 80 ml の水に溶かした。溶解後、pH を測りながら 5N または 1N の水酸化ナトリウムによって調整し、pH7 にした。その後、100mL にメスアップし、121°C で 20 分間のオートクレーブ殺菌をしてから低温にて保存した。

2%トリトン

mQ 9.8 mL にトリトン 0.2 mL を入れ、ボルテックスで溶かした。

2-2 細胞解凍

事前準備として、EMEM 培地を 15 mL チューブに 4 mL、φ10 シャーレに 10 mL 分注した。分注後、液体窒素タンクより凍結された細胞が入っているセラムチューブを取り出し、37°C に設定した恒温槽内にて素早く解凍を行った。解凍後、セラムチューブの口元をアルコールで拭き、先ほどの 15 mL チューブにセラムチューブ内の細胞懸濁液全量を加えて懸濁した。その後 1 度セラムチューブを共洗いしてから、細胞懸濁液が入った 15 mL チューブを 30°C, 1000rpm, の条件で 3 分間遠心した。遠心後、上清を取り除き、培地 1 mL を加えてピペティングで懸濁した。懸濁後、全量を先ほど

準備した $\phi 10$ シャーレに播種し、上下左右に 5 回軽く揺らした。その後、細胞が存在することを確認してから 37°C の 5% CO_2 インキュベーター内で培養した。

2-3 細胞継代

事前準備として $\phi 10$ シャーレに 10 mL の EMEM 培地を入れた。顕微鏡で細胞が subconfluent に達していることを確認してから、古い培地をアスピレーターにて全量を取り除いた。そして 1 度 $1\times\text{PBS}$ 5 mL で細胞表面を洗浄してから、ピペットマンにて 0.05% Trypsin-EDTA 2 mL を加え、 37°C の 5% CO_2 インキュベーター内で 1 分 30 秒間インキュベートした。インキュベート後、物理的衝撃によって細胞を完全にはがし、顕微鏡ではがれていることを確認してから EME 培地を 3 mL 加えて全量を 5 mL とした。ピペッティングによって 5 mL を均一な細胞懸濁液にしてから、30 μL をマイクロチューブにとって細胞数カウント用にし、残りの細胞懸濁液は 30°C , 1000rpm, の条件で 3 分間遠心を行った。遠心後、上清を除去し、実験当日が subconfluent となるように細胞懸濁液を調製してから $\phi 10$ シャーレに播種した。播種後、上下左右に 5 回程度ゆすり、顕微鏡で細胞の播種および分散を確認してから 37°C の 5% CO_2 インキュベーター内で培養を行った。

2-4 細胞の凍結保存

細胞継代と同様の手順によって細胞をはがし、細胞数のカウントおよび遠心分離を行ってから適切な細胞数の細胞懸濁液を調製した。その後、それをセルバンカーにて懸濁し、1 mL ずつセラムチューブに分注した。分注後、 -80°C のバイセルに入れることによって 3 時間凍結させた。凍結後、液体窒素中に移動させて保存した。

2-5 細胞内取り込み実験

細胞継代と同様の要領で細胞懸濁液を作成し、 $\phi 6$ シャーレに 1×10^5 cells ずつ播種した。一晚培養させた後、化合物を添加して、1, 6, 12, 24h 後にシャーレの培地を抜い

て PBS で 2 回ウォッシュした。2% トリトン溶液をシャーレに 400 μ L ずつ入れ、棒でシャーレをこすって細胞を破碎した。その液をエッペンチューブに回収し、それを 15,000 rpm, 10 min 遠心して上清を別のエッペンチューブに移した。100 μ L ずつブラックプレートに入れて、excitation 410 nm、emission 630 nm で蛍光強度を測定した。

2-6 WST-1 アッセイ

細胞継代と同様の手順に従って細胞のはがしおよび細胞カウントを行い、後に遠心分離をした。その後 96 穴プレートに 5 well ずつ調製した細胞懸濁液 100 μ L を播種し、一晩インキュベートした。インキュベート後、well 内の培地を取り除き、ALA もしくは PpIX で調製した薬剤含有培地 (DMSO 濃度 0.1%) 100 μ L を入れることによって薬剤添加を行った。その後、ALA は 29 時間、PpIX は 48 時間インキュベートした。さらに、ALA については先ほどの 29 時間のインキュベート後、1 \times PBS で 2 回洗浄し、培地でさらに 24 時間インキュベートした。インキュベート後、濃度の薄い系列から 1 \times PBS で 1 度洗浄 (PpIX は 2 回) した。洗浄後、調製した WST-1 試薬を Back ground、からコントロール、薬剤濃度の薄い～濃い系列の順に 100 μ L ずつ添加し、コントロールの Absorbance が 0.8~1.0 になるくらいを目安に 450 nm (reference 600 nm) の吸光度を測定した。WST-1 試薬の調製については、WST-1 試薬 : 1-MethoxyPMS = 9 : 1 の比率で混合し、その混合試薬 : EMEM 培地 = 1 : 10 の比率で混合することによって調製した。

2-7 炭素イオン線増感活性の評価 (コロニーアッセイ)

2-7-1 炭素イオン線増感活性の評価 (炭素イオン線照射 : 放射線医学総合研究所)

EMT6 細胞をフラスコに 5×10^5 cells となるように播種をし、一晩培養した。翌日、照射 24 時間前にコントロール群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地 4 mL に、PpIX 併用群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した PpIX 濃度 1 μ M 培地 4 mL に交換することで薬剤を添加した。また照射当日の照射 4 時間前に ALA 併用群は、DMSO

濃度 0.1% EMEM 培地で調整した ALA 濃度 1 mM 培地 4 mL に交換することで薬剤を添加した。その後、細胞輸送用の保温ケースで温度を 37 °C に保ちながら、徳島大学から出発して約 12 時間後に、千葉県千葉市稲毛区の放射線医学総合研究所にて炭素イオン線照射をした。炭素イオン線 (290 MeV/nucleon, 85.1 keV/ μm) を 1, 2, 4 Gy 照射した。照射から約 10 時間後、徳島大学に到着して、 $\phi 6$ シャーレに播き直し、37 °C の 5%CO₂ インキュベーターで 7 日間培養を行った。

2-7-2 炭素イオン線増感活性の評価

(炭素イオン線照射：兵庫県立粒子線医療センター)

EMT6 細胞をフラスコに 1×10^5 cells となるように播種をし、一晚培養した。翌日、照射 24 時間前にコントロール群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地 4 mL に、PpIX 併用群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した PpIX 濃度 1 μM 培地 4 mL に交換することで薬剤を添加した。また照射当日の照射 5 時間前に ALA 併用群は、DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した ALA 濃度 1 mM 培地 4 mL に交換することで薬剤を添加した。その後、細胞輸送用の保温ケースで温度を 37 °C に保ちながら、徳島大学から出発して約 3 時間後に、兵庫県たつの市の兵庫県立粒子線医療センターにて炭素イオン線照射をした。炭素イオン線 (320 MeV/nucleon, 83.3 keV/ μm) を 1, 1.5 Gy 照射した。照射から約 3 時間で徳島大学に移動し、まき直すまで 5%CO₂ インキュベーターにて 37 °C で保存した。照射から 24 時間後、 $\phi 6$ シャーレにまき直し、37 °C の 5%CO₂ インキュベーターで 8 日間培養を行った。

2-7-3 炭素イオン線増感活性の評価 (ギムザ染色)

8 日間培養後、コロニーが形成されているかを確認してから、シャーレをインキュベーターより取り出して培地をデカンテーションで取り除いた。そして約 2 mL の 1 \times PBS で細胞表面を洗浄し、これについてもデカンテーションにて取り除いた。その後、約 2 mL のメタノールを加え、約 10 分間放置することによって細胞を固定してか

らデカンテーションでメタノールを除去した。次に、約 2 ml の 5% ギムザ液/PBS を加えて 1 時間以上放置することによってコロニー染色を行った。染色後、シャーレを流水で穏やかに洗浄してから乾燥させた。

2-7-4 炭素イオン線増感活性の評価（コロニー形成率算出）

十分に乾燥してからコロニー数を計測し、コントロール及び化合物を添加した系列より、コロニー形成率（PE）並びに生存率（SF）を以下の式によって算出した。

$$PE = \frac{\text{コロニー数 (N)}}{\text{播種した細胞数 (N}_0\text{)}}$$

$$SF = \frac{\text{炭素イオン線照射細胞 (各Gy) のPE}}{\text{炭素イオン線非照射細胞 (0Gy) の各PE (PE}_0\text{)}}$$

2-8 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価

2-8-1 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価（炭素イオン線照射）

EMT6 細胞をチャンバーに 1 ウェルあたり 1×10^3 cells となるように播種し、一晚培養した。翌日、照射 24 時間前にコントロール群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地 750 μ L に、PpIX 併用群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した PpIX 濃度 1 μ M 培地 750 μ L に交換することで薬剤を添加した。また照射当日の照射 5 時間前に ALA 併用群は、DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した ALA 濃度 1 mM 培地 750 μ L に交換することで薬剤を添加した。その後、未照射群のチャンバー（SARSTED : Lot No.#0703301）は大学の 5%CO₂ インキュベーターにて 37 °C で保存し、照射群のチャンバー（ワトソン : Lot No.5512）については細胞輸送用の保温ケースで温度を 37 °C に保ちながら、徳島大学から出発して約 3 時間後に、兵庫県たつの市の兵庫県立粒子線医療センターにて炭素イオン線照射をした。炭素イオン線（320 MeV/nucleon, 83.3 keV/ μ m）を 1 Gy 照射した。その後徳島大学に移動した。

2-8-2 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価 (MitoSoX Red 試薬処理)

照射から 3 時間後に、チャンバーの各ウェルを 1×PBS にて一度洗浄した。洗浄後、あらかじめ調製しておいた MitoSoX Red 試薬をチャンバーのウェル 1 つあたり 500 μ L 添加し、37 °C で 30 分間インキュベートした。MitoSoX Red 試薬の調製方法としては、MitoSOX Red 1 本 (50 μ g) に 13 μ L の DMSO を入れ混合し、5 mM MitoSOX Red 試薬溶液を調製した。その後、無血清培地で 1000 倍希釈することで 5 μ M MitoSOX Red 試薬溶液にしてから使用した。

2-8-3 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価 (蛍光顕微鏡による算出)

インキュベート後、チャンバーの各ウェルを 1×PBS で 2 度洗浄した。洗浄後、EMEM 培地 500 μ L を加えてから蛍光顕微鏡の BZ-X700 (KEYENCE)及び付属のソフトウェアによって蛍光強度の算出を行った。蛍光強度の撮影条件としては、励起波長：640 nm, 蛍光波長：660 nm, 露光時間：1/70 S にて行った。カウント条件は、閾値 3、画面の端削除、分離度 70 で行った。

2-9 DNA2 本鎖切断能の評価

2-9-1 DNA 2 本鎖切断能の評価 (炭素イオン線照射)

EMT6 細胞をチャンバー (ワトソン : Lot No.5512) に 1 ウェルあたり 1×10^4 cells と なるように播種し、一晚培養した。翌日、照射 24 時間前にコントロール群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地 750 μ L に、PpIX 併用群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した PpIX 濃度 1 μ M 培地 750 μ L に交換することで薬剤を添加した。また照射当日の照射 5 時間前に ALA 併用群は、DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した ALA 濃度 1 mM 培地 750 μ L に交換することで薬剤を添加した。その後、未照射群のチャンバーは大学の 5%CO₂ インキュベーターにて 37 °C で保存し、照射群のチャンバーについては細胞輸送用の保温ケースで温度を 37 °C に保ちながら、徳島大学から出発して約 3 時間後に、兵庫県たつの市の兵庫県立粒子線医療センターにて炭素イオン線照射

をした。炭素イオン線（320 MeV/nucleon, 83.3 keV/ μm ）を 1 Gy 照射した。そして徳島大学に移動した。

2-9-2 DNA 2 本鎖切断能の評価(ヒストン H2AX フォーカスアッセイ用試薬の調製)

実験操作を行う前に、事前に必要な試薬の調製を行った。まず 0.5% Triton 溶液については、Triton X-100 を 0.4 mL と 1×PBS 79.6 mL を混合することによって調製した。ブロッキング液については、Albumin, from Bovine Serum, Fatty Acid Free (BSA) 210 mg と 0.5% Triton 溶液 8.4 mL と 1×PBS 12.6 mL を混合することによって調製した。0.05% Triton 溶液については、BSA 220 mg と 0.5 % Triton 溶液 2.2 mL と 1×PBS 19.8 mL を混合することによって調製した。一次抗体希釈溶液については、0.05% Triton 溶液 12 mL と一次抗体 (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301) 24 μL を混合することによって 500 倍希釈して調製した。二次抗体希釈溶液については、0.05% Triton 溶液 8 mL と二次抗体 (DONKEY ANTI MOUSE IgG AFFINITY PURIFIED ; FLUORESCHEIN CONJUGATED ABSORBED FOR DUAL LABELING SECONDARY ANTIBODY) 8 μL を混合することによって 1000 倍希釈して調製した。DAPI 希釈溶液については、1×PBS 12 mL と DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride : $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_5$) 0.024 mL を混合することによって調製した。

2-9-3 DNA 2 本鎖切断能の評価 (ヒストン H2AX フォーカスアッセイ)

炭素イオン線照射から 3 時間および 24 時間後に次の手順に従って観察用スライドの作製を行った。まず 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 500 μL を用いて室温で 15 分間固定した。固定後、2 回 1×PBS で洗浄し、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件において 0.5% Triton 溶液 500 μL で 5 分間透過処理を行った。透過処理後、2 回 1×PBS で洗浄し、室温においてブロッキング液 500 μL で 30 分間ブロッキングした。ブロッキング後、室温において一次抗体希釈溶液 300 μL で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、振盪させながら 3 分毎に 0.5% Triton 溶液 300 μL で洗浄を合計 3 回行った。洗浄後、暗室・温

室において二次抗体希釈溶液 200 μ L で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、振盪させながら 3 分毎に 0.5% Triton 溶液 200 μ L で洗浄を合計 3 回行った。洗浄後、温室において DAPI 希釈溶液 300 μ L で 15 分間インキュベートした。インキュベート後、1 \times PBS で 3 回洗浄した。洗浄後、処理済みチャンバーからスライドを取り外し、スライドをドライヤーで乾燥させた。乾燥後、封入剤（マリノール）を用いてカバーガラスをし、観察まで暗室で冷蔵保存した。

2-9-4 DNA 2 本鎖切断能の評価（蛍光顕微鏡による定量）

スライドの作製後、蛍光顕微鏡の BZ-X700 (KEYENCE)にてスライドの写真撮影を行い、付属のソフトウェア（BZ-X アナライザー、ハイブリッドセルカウント、マクロセルカウント）によって γ H2AX フォーカスの定量を行った。撮影条件としては、[励起波長：490 nm，蛍光波長：525 nm (FITC)]、露光時間：1/7.5 S にて行った。定量条件は明るさ：127、コントラスト：132、ガンマ：137、ハイブリットセルカウント（閾値（輝度）：16、領域の除去：面積 0.1-） 、ブラックバランス：12、ヘイズリダクション（ボケ大きさ：8、明るさ 6.9、除去率：0.96）で行った。また炭素イオン線照射時にチャンバーを傾けたため、ウェルの半面は細胞の死滅等の影響が観察された。よってチャンバー傾斜の影響がなかった残り半面を 6 分割し、1 分割あたり 50 cells の DNA2 本鎖切断量を算出し、6 分割分の平均を計算した。

2-10 細胞内 PpIX の局在観察

ϕ 4 ガラスディッシュに EMT6 細胞を 5000 cells 播種した。一晚培養後、PpIX 添加群の培地は DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した PpIX 濃度 1 μ M 培地に交換することで薬剤を添加した。ALA 添加群は、DMSO 濃度 0.1% EMEM 培地で調整した ALA 濃度 1 mM 培地に交換することで薬剤を添加した。PpIX は 24 時間、ALA は 5 時間培養後、1 \times PBS で一度洗浄し、Mitotracker Green FM を終濃度 100 nM となるように調製した無血清 EMEM 培地 1.4mL で添加した。さらにそこに Hoechst 33342 (500 μ g/mL) を

4 μ L 添加した。そして 30 分間インキュベート後、2 回 1 \times PBS で洗浄し、無血清 EMEM 培地下で蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

第 3 章 結果および考察

3-1 細胞内取り込み実験

薬剤併用照射の条件検討を行うために、ALA 由来 PpIX および PpIX の細胞内取り込みを評価した。その結果 (図 5)、ALA は薬剤添加約 6 時間後に、PpIX は添加約 24 時間後に、細胞内 PpIX 濃度が最大となった。よって、炭素線照射前薬剤添加時間は ALA は照射 5 時間前、PpIX は照射 24 時間前に決定した。

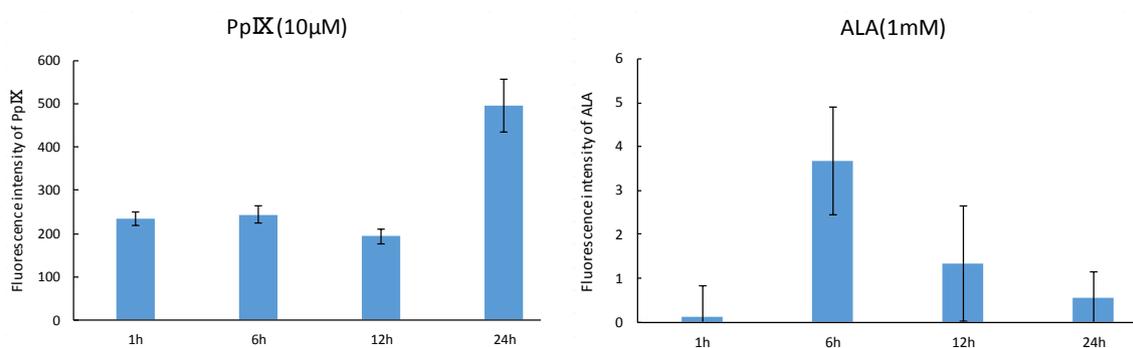


図 5. PpIX および ALA の細胞 (EMT6) 内取り込みの経時変化

PpIX は細胞に添加 24 時間後、ALA は細胞に添加 6 時間後に細胞内 PpIX が最大濃度となることを示した。

3-2 WST-1 アッセイ

薬剤併用照射の条件検討を行うために、ALA および PpIX の細胞毒性を WST-1 アッセイによって評価した。その結果（図 6）、PpIX（48 時間暴露）では 1 μ M の濃度までが SF(Surviving Fraction) 値 1 以上となり、PpIX の毒性による影響が見られなかった。1 μ M 以上の濃度においては、濃度が増加するにつれて SF 値が徐々に低下し、薬剤による毒性が観察された。ALA（29 時間暴露）については、5 mM の濃度まで ALA の薬剤毒性による影響が見られなかった。しかし 10 mM 以上においては SF 値が大幅に低下して大きな毒性が観察された。これは培地中の ALA（ALA 塩酸塩）の濃度が高濃度になったことによって pH が低下したためであると考えられる。また ALA は今回の WST-1 アッセイの 3 mM、5 mM の濃度において毒性は観察されなかったが、コロニー形成実験では毒性による影響が報告されている。よって炭素線照射実験に用いる薬剤濃度は PpIX 1 μ M、ALA 1 mM に決定した。

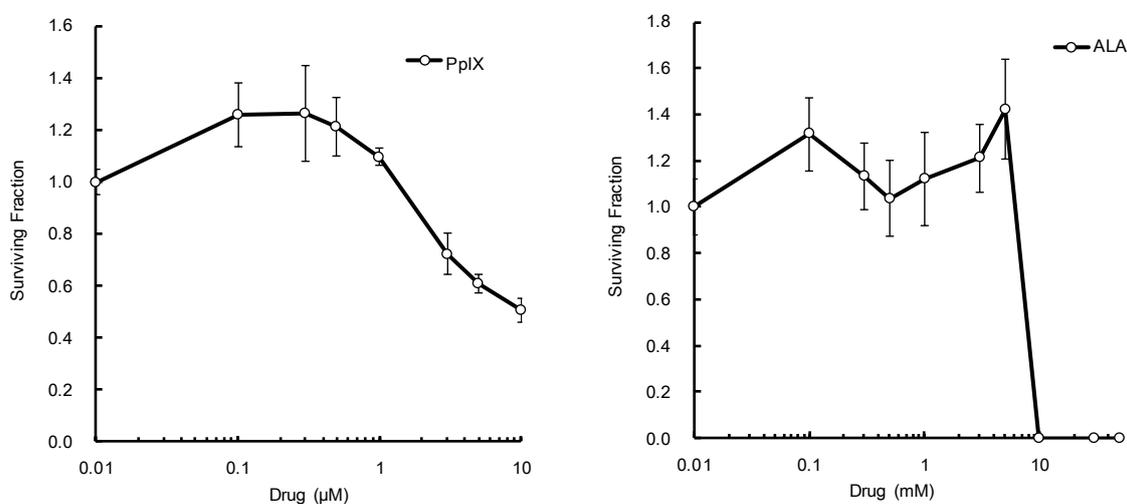


図 6. EMT6 細胞に対する PpIX および ALA の細胞毒性評価

PpIX は 1 μ M、ALA は 5mM まで毒性を示さなかった。

3-3 炭素イオン線増感活性の評価

3-3-1 炭素イオン線増感活性の評価（放射線医学研究所）

ALA および PpIX の炭素イオン線増感活性について評価するために、EMT6 細胞を用いてコロニー形成法を行った。その結果（図 7）、コントロール（SF = 0.196）と比較して PpIX 併用群は 2Gy にて炭素イオン線増感効果（SF = 0.071）を示した。

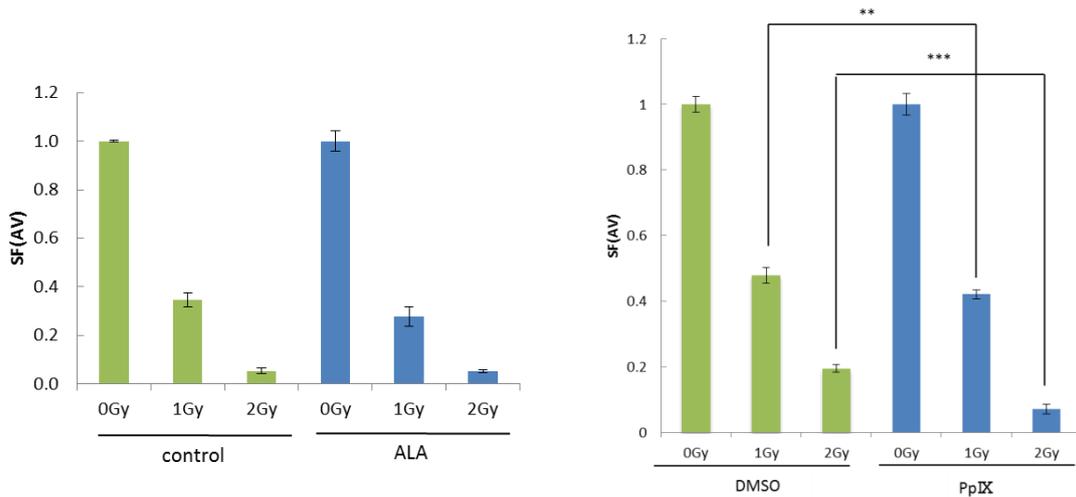


図 7. ALA または PpIX 併用による炭素イオン線増感活性の評価

PpIX は炭素イオン線との併用によって有意な殺細胞活性の増強を示し、

ALA では殺細胞活性の増強を示しめさなかった。

3-3-2 炭素イオン線増感活性の評価（兵庫県立粒子線医療センター）

ALA および PpIX の炭素イオン線増感活性について評価するために、EMT6 細胞を用いてコロニー形成法を行った。その結果（図 8）、コントロールと比較して ALA 併用群は 1Gy にて増感比 R = 約 1.16、1.5Gy にて R = 約 1.29 の有意な炭素イオン線増感効果を示した。PpIX 併用群については 1Gy にて R = 約 1.14 の有意な炭素イオン線増感効果を示し、1.5Gy においても R = 約 1.18 の炭素イオン線増感効果が観察された。

これらの結果より、ALA と比較して PpIX による炭素イオン線増感活性は小さく、ALA の方が PpIX より炭素イオン線増感活性が高いことが示唆された。ALA 併用群と PpIX 併用群の違いについては、薬剤添加後の細胞内における PpIX 局在の変化であると考えられ、この局在の変化によって炭素イオン線増感活性に差が生じている可能性がある。

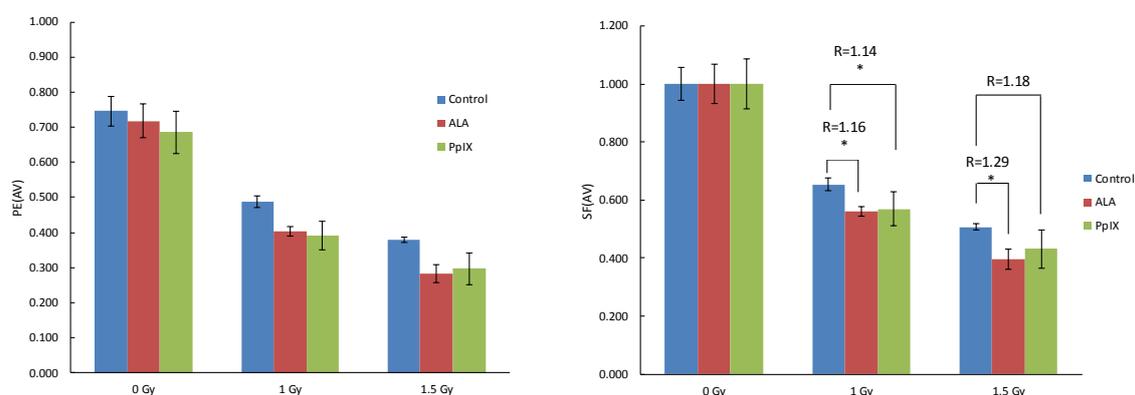


図 8. ALA または PpIX 併用による炭素イオン線増感活性の評価

ALA および PpIX は炭素イオン線との併用によって有意な殺細胞活性の増強を示した。

3-4 ミトコンドリア内 ROS 産生能の評価

次に作用機序の解明を目的に実験を行った。まずミトコンドリア内 ROS 産生能の評価結果（図 9）では、1Gy においてコントロールより ALA 併用群が約 1.46 倍、PpIX 併用群が約 1.26 倍の有意な ROS 産生量の増加を示した。また PpIX よりも ALA を添加した場合の方がミトコンドリア内 ROS の産生量が増加することが示唆された。この ALA 併用群と PpIX 併用群のミトコンドリア内 ROS 産生能の差についても添加後の細胞内 PpIX の局在変化が影響していると考えられる。

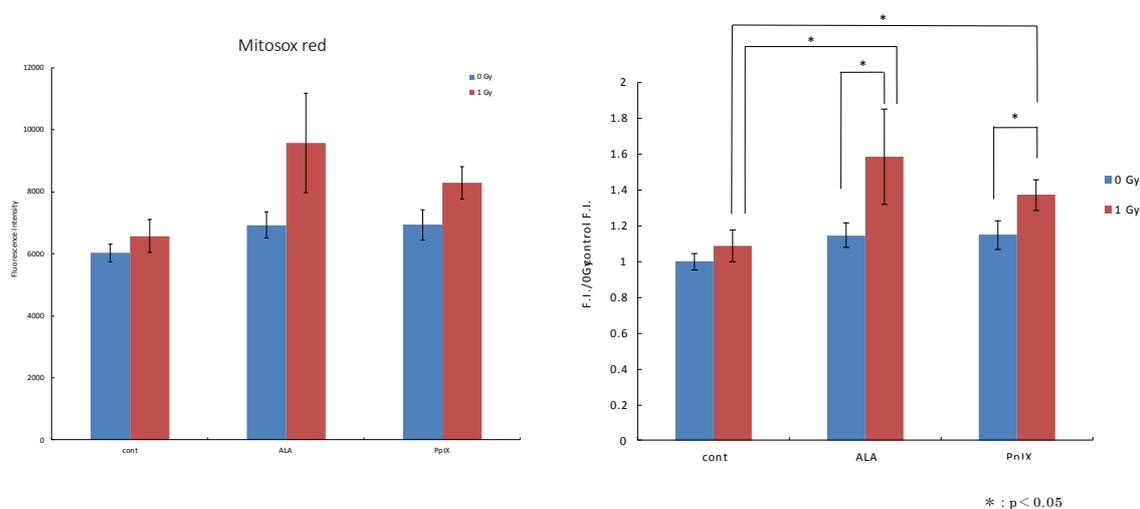


図 9. ALA または PpIX 併用によるミトコンドリア内 ROS 産生能の評価

ALA および PpIX は炭素イオン線との併用によって
ミトコンドリア内 ROS 産生量の有意な増加を示した。

3-5 DNA2 本鎖切断能の評価

DNA 2 本鎖切断能の評価結果 (図 10) については、照射 3 時間後の ALA 併用群において有意な γ H2AX フォーカス数 (DNA2 本鎖切断量) の増加 (約 1.16 倍) が示された。一方 PpIX 併用群では γ H2AX フォーカス数のわずかな増加傾向は見られたが、有意な増加は示されず、PpIX の効果は小さいことが示唆された。この ALA 併用群と PpIX 併用群における DNA2 本鎖切断能の違いについても、添加後の細胞内 PpIX の局在変化が影響していると考えられる。照射 24 時間後の結果については、PpIX 併用群において有意な増加が見られたが、ALA 併用群では観察されなかった。24 時間後の PpIX 併用群の有意な γ H2AX フォーカス数の増加については、0Gy の PpIX 併用群の γ H2AX フォーカス数についても 1Gy と有意差がないほどに増加しているのが観察された。よって 24 時間の PpIX 併用群では PpIX の細胞毒性が生じており、DNA2 本鎖

切断量が増加したことが考えられる。また ALA において有意差が見られなかった要因としては、コントロールとほとんど切断量が変わらないことから、照射から 24 時間経過したことによって切断がほとんど修復されたためであると考えられる。

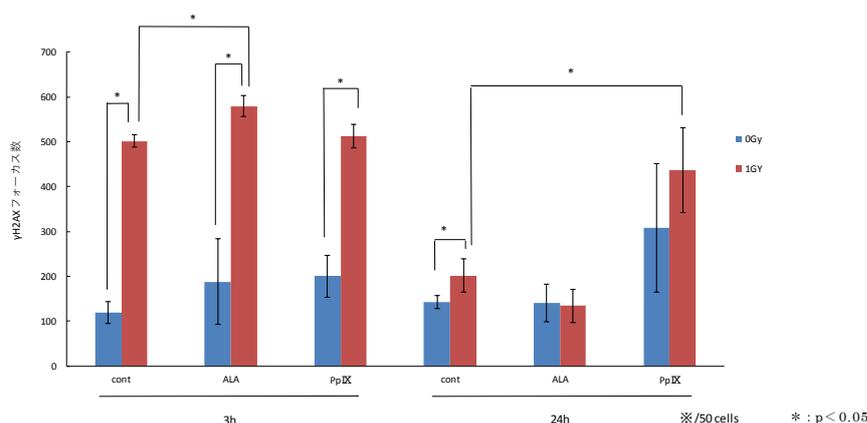


図 10. ALA または PpIX 併用による DNA2 本鎖切断能の評価

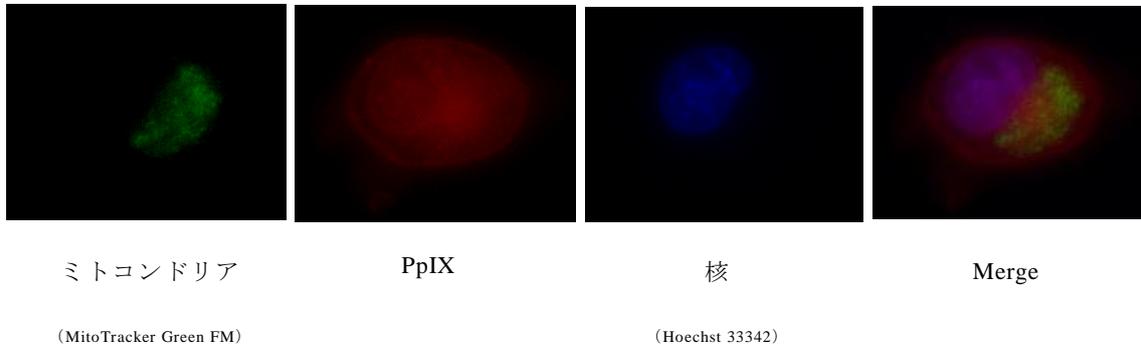
ALA は炭素イオン線との併用によって DNA2 本鎖切断量の有意な増加を示した。

3-6 細胞内 PpIX の局在観察

炭素イオン線増感活性、ミトコンドリア内 ROS 産生能、DNA2 本鎖切断能において、薬剤添加後の細胞内 PpIX の局在変化が各々の活性に影響を及ぼしていることが考えられたため、炭素イオン線照射前の薬剤添加時間での細胞内 PpIX の局在観察を行った。その結果 (図 11)、ALA 添加では主にミトコンドリアおよび細胞質に PpIX が存在し、わずかに核にも存在することが観察された。一方、PpIX 添加では主に核における存在が観察されたが、ALA 添加時に観察されたミトコンドリアおよび細胞質における PpIX の局在はあまり観察されなかった。近年、放射線照射中に生じる ROS による核 DNA への障害だけではなく、ミトコンドリアを中心とした遅発性 ROS 産生が腫瘍の放射線照射に対する生物学的反応として重要な役割を果たすことが考えられている。また ALA は放射線照射後に生じる遅発性 ROS 産生をミトコンドリア中心に増加させ

ることが報告されている。よって今回の実験における ALA 併用群では、ミトコンドリアおよび細胞質に PpIX が多く局在することによって炭素イオン線照射後ミトコンドリアを中心に影響を及ぼし、遅発性 ROS 産生を増加させたことが考えられる。一方 PpIX 併用群では、ミトコンドリアおよび細胞質への局在が少ないことから炭素イオン線照射後のミトコンドリアを中心とした影響が少なく、結果として遅発性 ROS の産生が ALA 併用群に比べて低くなったと考えられる。よってこの遅発性 ROS 産生量の違いが、今回の ALA 併用群および PpIX 併用群の炭素イオン線増感効果とその作用機序に効果の差や違いを生じさせた可能性が考えられる。これまでの結果から ALA および PpIX の炭素イオン線増感メカニズムを考察すると、ALA は主にミトコンドリアでの遅発性 ROS 産生と DNA2 本鎖切断を介して殺細胞活性を発揮し、PpIX では主に核 DNA の 2 本鎖切断を介して殺細胞活性を発揮している可能性が考えられる。

ALA 添加



PpIX 添加

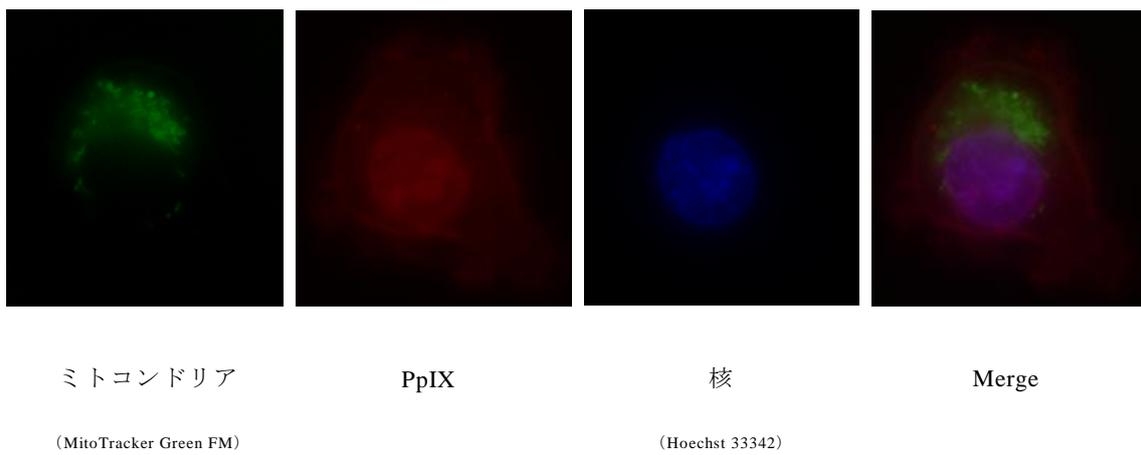


図 11. 細胞内 PpIX の局在観察

ALA 添加ではミトコンドリアおよび細胞質に局在し、
PpIX 添加では主に核に局在しているのが観察された。

3-7 考察

炭素イオン線と ALA または PpIX の併用群は、炭素イオン線単独群に比べて有意な殺細胞活性の増強を示し、ミトコンドリア内 ROS 産生能においても、炭素イオン線照射 3.5 時間後において有意な ROS 産生量の増加を示した。特に ALA 併用群は、炭素イオン線増感活性及びミトコンドリア内の ROS 産生能ともに PpIX 併用群よりも高かった。また、DNA 2 本鎖切断能においても、照射 3 時間後の ALA 併用群において有意な DNA 2 本鎖切断量の増加を示したが、PpIX 併用群では有意な差は示されず、PpIX の効果は小さいことが示唆された。これらの ALA 併用群と PpIX 併用群の差は、細胞内の PpIX 局在が関係していると考えられる。ALA を添加した場合、ALA から合成された PpIX は主にミトコンドリアおよび細胞質に局在し、一方、PpIX を添加した場合、主に核に局在し、ALA を添加した場合に見られた細胞質やミトコンドリア内の PpIX の局在はほとんど見られなかった。近年、ミトコンドリアを中心とした遅発性 ROS 産生が腫瘍の放射線照射に対する生物学的反応として重要な役割を果たすと考えられており、さらに、ALA は X 線照射後に生じる遅発性 ROS 産生をミトコンドリア中心に増加させることが報告されている。今回の結果より、ALA は炭素イオン線照射においても同様に、ミトコンドリアおよび細胞質に PpIX が多く局在することによって炭素イオン線照射後のミトコンドリア内の遅発性 ROS 産生を増加させ PpIX よりも高い炭素イオン線増感活性を発揮すると考えられる。

第4章 結論

- 炭素イオン線増感活性については、炭素イオン線単独群に比べて ALA 併用群は 1Gy にて増感比 $R =$ 約 1.16 倍、1.5Gy にて $R=$ 約 1.29 倍、PpIX 併用群は 1Gy にて $R=$ 約 1.14 倍の有意な殺細胞活性の増強を示した。
- ミトコンドリア内 ROS 産生能については、照射 3.5 時間後に ALA 併用群で約 1.46 倍、PpIX 併用群で約 1.26 倍の有意な ROS 産生量の増加を示した。
- DNA 2 本鎖切断能については、照射 3 時間後の ALA 併用群において約 1.16 倍の有意な DNA2 本鎖切断量の増加を示したが、PpIX 併用群では有意な差は示されず、PpIX の効果は小さいことが示唆された。
- ALA はミトコンドリア内の ROS 産生および DNA の 2 本鎖切断を介して、PpIX はミトコンドリア内の ROS 産生を介して炭素イオン線増感効果を発揮することが示された。

第5章 謝辞

本研究にあたり、研究の機会を提供して頂くとともに、ご教授くださいました徳島大学大学院社会産業理工学研究部教授 宇都 義浩 先生、徳島大学大学院医歯薬研究部講師 富永 正英 先生、徳島大学大学院社会産業理工学研究部教授 松木 均 先生、徳島大学大学院社会産業理工学研究部教授 中村 嘉利 先生に深く御礼申し上げます。

また、本研究の実験において多大なるお力添えを頂きました兵庫県立粒子線医療センター 沖本 智昭 様、山下 智弘 様、壽賀 正城 様、大学大学院社会産業理工学研究部講師 山田 久嗣 先生、徳島大学大学院 上崎 里砂 様、羽生 紋佳 様、徳島大学 上島 一輝 様に深く感謝申し上げます。

第 6 章 参考文献

- Kanai T, Furusawa Y, Fukutsu K, et al. Irradiation of mixed beam and design of spread-out Bragg peak for heavy-ion radiotherapy. *Rad Res.* 1997;147:78–85.
- Tsujii H, Kamada T. A review of update: clinical results of carbon ion radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2012;42:670–685.
- Mohamad O, Sishc J.B., Saha J, Pompos A, Rahimi A, Story D.M., Davis J.A., Kim N.D.W. Carbon ion radiotherapy: A review of clinical experiences and preclinical research, with an emphasis on DNA damage/repair. *Cancers.* 2017;9:66,
- Ohno T. Particle radiotherapy with carbon ion beams. *EPMA J.*2013;4(1):9.
- Daniel K. Ebner , Tadashi Kamada. The Emerging Role of Carbon-Ion Radiotherapy. *Front Oncol.* 2016;6:140
- Hall E.J, Giaccia A.J. Radiobiology for the Radiologist, 7th ed. WOLTERS KLUWER. 2012: 86–113
- 日本放射線腫瘍学会、日本放射線腫瘍学研究機構
「臨床放射線腫瘍学 最新知見に基づいた放射線治療の実践」
南江堂 2012
- 小澤美奈子 「現代化学 増刊 45 機能性アミノ酸 5-アミノレブリン酸の科学と医学応用 —がんの診断・治療を中心に—」東京化学同人 2015
- Asaithamby A, Hu B, Chen D.J. Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:8293–8298.
- Valdés PA, Jacobs V, Harris BT, Wilson BC, Leblond F, Paulsen KD, Roberts DW. Quantitative fluorescence using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX biomarker as a surgical adjunct in low-grade glioma surgery.

J Neurosurg. 2015;123(3):771-780.

- Kushibiki T, Noji T, Ebihara Y, Hontani K, Ono M, Kuwabara S, Nakamura T, Tsuchikawa T, Okamura K, Ishizuka M, Hirano S. 5-Aminolevulinic-acid-mediated Photodynamic Diagnosis Enhances the Detection of Peritoneal Metastases in Biliary Tract Cancer in Mice. *In Vivo*. 2017;31(5):905-908.
- Valdés PA, Roberts DW, Lu FK, Golby A. Optical technologies for intraoperative neurosurgical guidance. *Neurosurg Focus*. 2016;40(3):E8.
- Zhao B, HeYY. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(11):1797-1809.
- Yang X, Palasuberniam P, Kraus D, Chen B. Aminolevulinic acid-based tumor detection and therapy: molecular mechanisms and strategies for enhancement. *Int J Mol Sci*. 2015;16:25865–25880.
- Takahashi J, Misawa M, Murakami M, Mori T, Nomura K, Iwahashi H. 5-Aminolevulinic acid enhances cancer radiotherapy in a mouse tumor model. *Springerplus*. 2013;2:602.
- Yamamoto J, Ogura S, Tanaka T, Kitagawa T, Nakano Y, Saito T, Takahashi M, Akiba D, Nishizawa S. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in glioma cells in vitro. *Oncol Rep*. 2012;27(6):1748-1752.
- Yamamoto J, Ogura S, Shimajiri S, Nakano Y, Akiba D, Kitagawa T, Ueta K, Tanaka T, Nishizawa S. 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1813-1819.

- Kitagawa T, Yamamoto J, Tanaka T, Nakano Y, Akiba D, Ueta K, Nishizawa S. 5-Aminolevulinic acid strongly enhances delayed intracellular production of reactive oxygen species (ROS) generated by ionizing irradiation: quantitative analyses and visualization of intracellular ROS production in glioma cells in vitro. *Oncol Rep.* 2015;33(2):583-590.
- Ueta K, Yamamoto J, Tanaka T, Nakano Y, Kitagawa T, Nishizawa S. 5-Aminolevulinic acid enhances mitochondrial stress upon ionizing irradiation exposure and increases delayed production of reactive oxygen species and cell death in glioma cells. *Int J Med.* 2017;39(2):387-398.
- Matsumoto K, Aoki I, Nakanishi I, Matsumoto A, Nyui M, Endo K, Anzai K. Distribution of hydrogen peroxide-dependent reaction in a gelatin sample irradiated by carbon ion beam. *Magn Reson Med Sci.* 2010;9(3):131-140.
- Matsumoto K, Ueno M, Nakanishi I, Anzai K. Density of Hydroxyl Radicals Generated in an Aqueous Solution by Irradiating Carbon-Ion Beam. *Chem Pharm Bull.* 2015;63(3):195-199.
- Hirayama R, Matsumoto Y, Uzawa A, Kaneko Y, Koda K, Ozaki M, Yamashita K, Li H, Noguchi M, Shirai T, Furusawa Y. Indirect action to cell killing by SOBP carbon-ion beams. *J Radiat Res.* 2014;55(1):133-134.