


(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

岡野 奈緒子 

(学位論文のタイトル)

*In vitro* determination of the relative biological effectiveness of carbon-ion beam irradiation in cells derived from human normal lung tissues.

(ヒト正常肺由来細胞の重粒子線照射における生物学的効果比の同定)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

## 【目的】

炭素イオン線治療は良好な線量分布と高い殺細胞効果により、従来の放射線治療と比べ高い抗腫瘍効果と有害事象の軽減が期待される治療である。

肺癌等に対する胸部照射では、放射線肺障害は致死の有害事象ともなり得るため、炭素イオン線治療といえども治療計画上配慮が必要である。炭素イオン線治療における放射線肺障害のリスク評価は不十分であり、安全で効果的な炭素イオン線治療を遂行するためには、炭素イオン線による生物学的効果を解析することが必要である。

X線と炭素イオン線の生物学的効果を比較検討する際、生物学的効果比 (Relative biological effectiveness; RBE) という指標を用いるが、現在の炭素イオン線治療においては、唾液腺腫瘍細胞株HSGを用いたコロニー形成法のデータによるRBEが使用されているのみである (Kanai *et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006)。RBEは組織により異なることが知られており、肺癌の炭素イオン線治療の最適化のためには、肺組織特有のRBEを算出し使用することが望ましい。しかし、正常肺組織由来の細胞株が培養細胞実験系においてコロニー形成能を欠くため、コロニー形成法の施行が困難でありこれまで正常肺組織のRBEは未解明であった。

以上から、本研究は、培養細胞実験系においてコロニー形成能を欠くヒト肺組織由来正常細胞のRBEを算出することを目的とした。コロニー形成法の代替手法としてコロニー形成を必要としないcrystal violet staining assay (CVS assay) の有効性を確認した後、CVS assayによりヒト肺正常組織由来細胞株のRBEの算出を試みた。

## 【方法】

ヒト肺腺癌細胞株A549、不死化ヒト気管支上皮細胞iSAECおよびヒト胎児線維芽細胞株HFL-Iを用いた。X線照射にはFaxitron RX-650を用いた。炭素イオン線照射は群馬大学重粒子線医学研究センターにて、実臨床で使用されているものと同じ6 cmの拡大ブラッグピークビーム (290 MeV/nucleon、平均LET 50 keV/ $\mu$ m) を用いておこなった。

コロニー形成法は以下の方法でおこなった。細胞を播種、培養後、X線または炭素イオン線を照射した。さらに培養した後、メタノールで固定し、crystal violetで染色した。顕微鏡観察下に50個以上の細胞からなるコロニー数を計測した。CVS assayはGuzziらによる既報 (Guzzi *et al. Oncogene* 2002) に微修正を加え、以下の方法で行った。コロニー形成法と同様に細胞を照射、培養、固定、染色し、10%酢酸で固定細胞を溶解し、分光光度計で吸光度を測定した。コロニー形成法により算出された細胞生残率およびCVS assayにより検出された溶解液の吸光度割合linear-quadratic model (LQ model) に近似し、細胞生残曲線を作成した。細胞生残曲線から細胞生残率50%および10%を与える線量であるD50およびD10を算出した。

## 【結果・考察】

X線照射されたA549の同一サンプルで0-8 Gyまでの線量域でコロニー形成法とCVS assayにより求められる細胞生残曲線の相関を解析したところ、コロニー形成法によるコロニー数とCVS assayによる吸光度には強い相関が認められた (Pearson's correlation coefficient:  $R = 0.905$ ,  $P < 0.01$ )。この結果から、CVS assayがコロニー形成法の代替手法となりうることが示唆された。

次に、iSAECとHFL-Iに対してX線または炭素イオン線を照射し、CVS assayにより細胞生残率を求めた。iSAECでは、X線のD50は8.3 Gy、炭素イオン線のD50は2.6 Gyであり、D50におけるRBEは3.2であった。X線のD10は24 Gy、炭素イオン線のD10は10 Gyであり、D10におけるRBEは2.4であった。一方、HFL-Iでは、X線のD50は3.3 Gy、炭素イオン線のD50は1.5 Gyであり、D50におけるRBEは2.2であった。X線のD10は7.2 Gy、炭素イオン線のD10は4.8 Gyであり、D10におけるRBEは1.5であった。

iSAEC、HFL-I両者において、X線および炭素イオン線を高線量 (iSAECでは炭素イオン線で10-14 Gy、HFL-IではX線で6-8 Gy、炭素イオン線で3-6 Gy) 照射されたサンプルの細胞生残率は、LQモデルから推定される細胞生残率を大きく上回った。これらの高線量照射細胞を顕微鏡観察したところ、細胞増殖能を失った、膨化した外見を呈する細胞分画の割合が、照射後経時的に増加することが判明し、senescenceの状態にあると考えられた。Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) stainingを用いて評価した結果、高線量被照射細胞 (iSAEC: X線 14 Gy、炭素イオン線 7 Gy; HFL-I: X線 6 Gy、炭素イオン線 3 Gy) はいずれも90%以上senescence陽性であった。がん細胞では照射後に大部分がapoptosisやmitotic catastropheなどを来たして培養dishから浮遊、消失する (Oike *et al. Radiother Oncol* 2014)。一方、正常肺組織由来細胞では高線量領域において、被照射細胞にsenescenceが誘導され細胞が培養dishへ接着した状態で膨化した。このため、染色強度と吸光度が上昇し、CVS assayによる細胞生残率が、コロニー形成法による真の細胞生残率よりも見かけ上高く算出された可能性があると考えられた。HFL-IのD10はこの高線量領域にあるため、CVS assayのデータの信頼性はないと判断した。本知見および本研究結果から、吸光度法により細胞生残率を算出する際には、がん細胞と正常肺組織由来細胞における照射後の細胞死形態の違いを考慮する必要性が示唆された。

本研究から、CVS assayはX線 6 Gy、炭素イオン線 3 Gy未満の線量領域における細胞生残率算出については、コロニー形成法の代替手法となりうることが示唆された。D50における炭素イオン線のRBEはiSAECで3.2、HFL-Iで2.2であった。また、これらのヒト正常肺組織においては、X線および炭素イオン線の高線量照射によりsenescenceが強く誘導されることが示唆された。