



Title	固形腫瘍の放射線照射によるアポトーシス発現頻度と放射線治療成績についての考察-アポトーシスと放射線感受性-
Author(s)	三浦, 雅彦
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 2002, 62(10), p. 545-548
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15741
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

固体腫瘍の放射線照射によるアポトーシス発現頻度と 放射線治療成績についての考察 －アポトーシスと放射線感受性－

三浦 雅彦

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子診断・治療学分野

Special Lecture

Relationship between Apoptotic Activity and Radiosensitivity in Solid Tumors: Does apoptosis always bring good clinical results?

Masahiko Miura

Apoptosis has recently been considered to be a predictor of tumor response or outcome following chemotherapy or radiotherapy. Although apoptosis clearly occurs in the very early stages following such treatments, it is unclear whether its frequency correlates with the likelihood of tumor cure following radiotherapy, especially in solid tumors, where the major mode of cell death is necrosis. This review discusses the relationship between apoptotic activity and radiosensitivity or tumor response from various points of view, including experimental systems and clinical conditions.

Research Code No.: 400

Key words: アポトーシス, 放射線感受性, 固体腫瘍,
分割照射, 再酸素化

Received August 26, 2002

Molecular Diagnosis and Therapeutics, Department of Oral Restitution
Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

本論文は、日本医学放射線学会誌編集委員会が企画し、執筆依頼した。

別刷請求先
〒113-8549 東京都文京区湯島 1-5-45
東京医科歯科大学歯学部分子診断治療
三浦 雅彦

抄 錄

アポトーシスは、ネクローシスとは異なる能動的自殺過程で、さまざまな刺激によって引き起こされることが知られている。代表的な癌の治療法である化学療法や放射線療法においても誘導され、したがって、アポトーシス頻度の上昇は、即高い治療効果、治療成績に直結するという考え方が最近なされている。本稿では、固体腫瘍の放射線治療におけるこの概念の妥当性について、さまざまな観点から議論する。

緒 言

アポトーシスは、能動的自殺過程として知られ、カスパーゼの活性化やDNA fragmentationなど、特徴的な生化学的、生物学的現象を伴う^{1),2)}。アポトーシスは、さまざまな刺激によって誘導され³⁾⁻⁶⁾、代表的な癌の治療法である化学療法や放射線療法でもアポトーシスが引き起こされる^{7),8)}。したがって、アポトーシスが少しでも多く引き起こされるならば、治療効果が改善されるとも考えることができる。しかしながら、この考え方には、リンパ系、造血系の細胞のようにその細胞死様式のほとんどがアポトーシスである場合に受け入れられるが、主要な細胞死がネクローシスで、アポトーシス頻度が非常に低い固体腫瘍の場合には、無条件に成立するわけではない。固体腫瘍の場合、最終的に治癒を決定するのはネクローシスであると考えられるので、アポトーシスの発現頻度がネクローシス頻度と相関する前提が必要である。アポトーシスは、放射線照射後短時間で引き起こされるため、先行指標として期待されているが、十分な検討を要することは以上の単純な議論からも明らかである。本総説では、*in vitro*, *in vivo*での実験条件、さらに実際の臨床で行われる放射線治療での条件を踏まえ、アポトーシスが放射線感受性や治療成績と相関しうるのかについて、さまざまな視点から考察する。

in vitro*における実験条件in vitro*の実験系において、照射後のアポトーシス発生頻

度が放射線感受性と相関するかどうかを最も簡単に検証する実験的 методは、細胞死様式に影響を受けないコロニー法⁹⁾による放射線感受性を指標として、アポトーシス活性と相関が認められるかを調べることである。同じ組織型の固形腫瘍から得られた複数の細胞株や、単一の遺伝子のstatusのみが異なるような細胞株を用い、コロニー法による放射線感受性がアポトーシス活性とよく相関するという報告が見受けられる^{10), 11)}。しかしながら、アポトーシス頻度の上昇がコロニー法による放射線感受性に生物学的に反映する必然性は証明されていない。一方、BrownとWoutersらは、ヒト大腸癌細胞のp21/Waf1が野生型のものとノックアウトした細胞を用いて、放射線によるアポトーシス頻度を調べると、後者が有意に高い値を示したのに対し、コロニー法では逆に抵抗性を示したことを報告している¹²⁾。またわれわれは、細胞増殖能の亢進やアポトーシスを抑制することで知られるI型インスリン様増殖因子受容体(IGF-IR)遺伝子をノックアウトしたマウス胎児由来細胞(R-)に、ヒトIGF-IRを過剰発現させると、放射線によるアポトーシスを抑制できる細胞株とできない細胞株が存在することを明らかにした¹³⁾。IGF-IRの発現レベルや、主要な下流シグナル伝達経路の活性化において両者は全く同等であった。興味深いことに、コロニー法ではいずれの細胞も同程度に、R-細胞に比べ有意に放射線抵抗性になることが示された¹³⁾。これらの結果は、IGF-IRの発現が、細胞死様式にかかわらず真に生存する腫瘍幹細胞の割合を増加させることができることを示唆するとともに、アポトーシス活性と放射線感受性は必ずしも相關しないことを明確に示している。以上の結果をまとめると、アポトーシス頻度は、放射線感受性と相関する報告もあるが、全く相関しない例もあり、in vitroでの実験レベルでさえ、明確な結論は出せないことがわかる。固形腫瘍を形成した場合、内因性因子のみならず、外因性因子も考慮する必要があり、この点を含め、次にin vivoでの状況において考察を加える。

in vivoにおける実験条件

in vivoにおける腫瘍の放射線による効果を考えるとき、“反応性”と“感受性”を明確に分ける必要がある。前者は、照射後の単位時間あたりの細胞死とその排除の割合を反映し、後者は、時間に依存しない、最終的な細胞死の程度を反映する。これらの2つの異なる概念を理解するのによい例がBrownとWoutersらによって報告されている¹²⁾。Fig. 1は、その結果を単純化して表わしたものである。p53遺伝子ノックアウトマウス由来細胞(p53-/-)と野生型p53を有する細胞(p53+/+)をE1AとRasでトランスフォームしたものをscidマウスに移植すると、腫瘍が形成され、ほぼ同様な増殖曲線が得られた。腫瘍の直径が5~7mmのところで、15Gy照射すると、p53(+/+)は著しく体積が縮小し、照射後5~6日で最小となり、その後再増殖が起こった。この時、腫瘍内に多くのアポトーシスが認められている。一方、p53

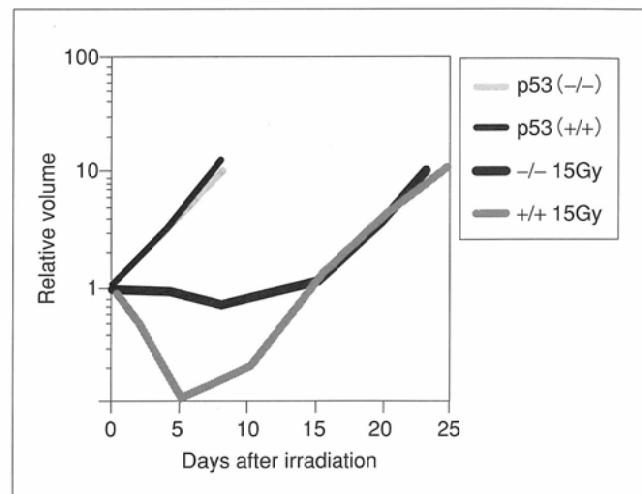


Fig. 1 p53(+/+)並びにp53(-/-)線維肉腫における放射線照射による再増殖曲線(文献12より改変)
scidマウスの皮下に移植された腫瘍が直径5~7mmに達した時点で15Gy照射され、照射後の日数と腫瘍体積の比率との関係がプロットされた。

(-/-)細胞では、ほとんど体積の縮小やアポトーシスは認められなかつたが、照射後、15日目頃から再増殖し、興味深いことに、p53(+/+)細胞の再増殖曲線と全く一致していた。これらの結果は、p53(+/+)細胞はp53(-/-)細胞に比べ“反応性”が高いが、生存幹腫瘍細胞の再増殖動態から判断して“感受性”は同じであると解釈できる。また、アポトーシスは“反応性”と相関するが、必ずしも“感受性”と相関しないことを表わしている。しかしながら、アポトーシス頻度と感受性が相関していると思われる報告も多く認められることも事実である¹⁴⁾⁻¹⁵⁾。

ここで、腫瘍が治癒するとは何かを考えてみると、最後の1個の腫瘍幹細胞まで殺せるかどうかで決定され、その治癒率はポアソン分布に従うことが概念的に示されている¹⁶⁾。しかし、実際の臨床では免疫効果が加味されるので、必ずしも最後の1個の腫瘍幹細胞まで殺す必要はないと思われるが、少なくとも極少数の幹細胞しか生存しないレベルまで細胞死を引き起こされなければならない。したがって、時間にかかわらず最終的にどれだけ多くの幹細胞を殺せるか、すなわち“感受性”が治癒にとって重要であり、再増殖実験から真に臨床的意義を見い出そうとするならば、反応性ではなく感受性をそこから読み取る必要がある。

in vivoでは、in vitroでは考慮する必要のなかった重要な因子、酸素効果と血管新生についても考慮しなければならない。腫瘍内では、血管から約180μm以上離れると、低酸素、低栄養状態となり、こうした細胞は、増殖は停止しているが生存しており、著しく放射線抵抗性になることはいうまでもない¹⁷⁾。また、低酸素状態では、HIF-1αの蓄積がおこり、VEGFの転写が活性化され、血管新生がおこる¹⁸⁾。低酸素状態に対する腫瘍細胞の感受性やVEGFの産生能は、個々の腫瘍によって大きく異なることが考えられ、したがって、1回照射の条件下では、こうした微少環境、それ

は増殖による低酸素状態の生成と血管新生による酸素供給との動的平衡環境と考えられるが、これが放射線感受性に大きく影響を及ぼすことが予想される。腫瘍内の酸素分圧と放射線感受性、治癒率が逆相関するという報告は¹⁹⁾、このことを支持している。つまり、*in vivo*では、腫瘍構築による微少環境がアポトーシスにもネクローシスにも影響を及ぼすと考えられる。

臨床における条件

これまでの実験系では、単純化するために1回照射の場合のみを考慮してきた。臨床で行われているように、腫瘍が分割照射された場合、1回照射とどのような違いがおこるのであろうか？Yukiら²⁰⁾によって報告された臨床データは非常に興味深い。Stage IIIbの子宮頸癌の放射線治療において、分割照射の初期段階でのアポトーシスインデックス(AI)が高い群では、低い群に比べ有意に予後がよいというものである。驚くべきことに、AI値は、高い群の平均が2.1%、低い群の平均は1.1%とわずかな差であった。さらに、生存率の高い群では、アポトーシス促進因子であるBaxやcaspase-1, -3の高い発現を伴っていた。ほとんどの腫瘍細胞はネクローシスで死んでいるはずであり、しかるに、このわずかなAI値の上昇が、なぜ有意な予後の改善に結びついているのであろうか。腫瘍が照射されると、腫瘍の縮小により再酸素化が起こることはよく知られている¹⁷⁾。BrownとWoutersら¹²⁾の報告のように、アポトーシスの頻度が高いと、腫瘍の縮小率が大きくなり、効果的な再酸素化が生じ、その結果、次に照射される際に効率のよい放射線増感が起こることが理論的には十分に考えられる。もう1つの臨床例は、早期舌癌(Stage I, II)に対する低線量率小線源治療の結果で、本学放射線科で得られたものである。舌癌は、肉眼的に外向型、浸潤型にわけることができる。前者の5年局所制御率は75%で、後者の45%に比べ有意に高かった²¹⁾。臨床経験上、前者は反応性が高く、約1週間の刺入後、抜去時には腫瘍部が平らになっていることも珍しくない。逆に後者は、長い間硬結が残存していることが多い。実際に組織のアポトーシスを観察しておらず、推測の域をでないが、Fig. 1で議論したことから考えると、外向

型ではアポトーシスが起こりやすく、そのため腫瘍の縮小率が大きくなり、より効率的な再酸素化が起こっているのかも知れない。外向型では血管新性能が高く、したがって低酸素分画が小さいのではないかとの推測も可能である。

一方、子宮頸癌の放射線治療において、放射線治療初期のAIは、治療成績と相關しないが、照射前のspontaneous AIが高い場合、予後が悪いという報告がある²²⁾。また、この照射前のspontaneous AIに関しても、予後と相關しないという報告²³⁾や、低いspontaneous AIでは予後が高かったという報告²⁴⁾もある。こうした矛盾した結果の理由は明らかではない。

結 論

本稿では、*in vitro*, *in vivo*, 臨床のそれぞれの条件においてアポトーシスと放射線感受性との関係について検討してきた。いずれの場合においても、アポトーシス頻度が放射線感受性に相關する報告としない報告の両方があり、一概に結論できないことがわかる。固体腫瘍においては、はじめに述べたように、アポトーシスとネクローシスの相關性を考える必要があり、*in vivo*で分割照射を行うもっとも複雑な臨床的条件下では、アポトーシスのみならずさまざまな因子が複雑にネクローシス頻度に影響を及ぼすと考えられる。したがって、アポトーシスという因子も、多くの感受性決定因子のうちの1つに過ぎず、この因子のみで固体腫瘍の放射線感受性を説明することには無理があると解釈される。

これまで、さまざまな因子が試され同じ道を辿ってきた訳であるが、最近のアプローチとして一度に数千～一万種類程の遺伝子発現を同時に網羅的に解析し、予後や感受性との相関を得ようとする試みがなされている。現在われわれも、放医研放射線感受性遺伝子プロジェクトとの共同研究で、舌癌の遺伝子発現パターンと感受性、予後、転移等との相関についての研究が進行中であり、今後は、単一因子にのみ着目した解析ではなく、網羅的な解析から、関連する因子をパターンによって解析する手法が放射線感受性の予測を可能にし、ひいてはテラーメード医療を可能にしていくものと期待される。

文 献

- 1) Salvesen GS and Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443-446, 1997.
- 2) Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, et al : Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142: 67-77, 1984.
- 3) Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980.
- 4) Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, et al: Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 272: 18518-18521, 1997.
- 5) Butterfield L, Storey B, Maas et al: c-Jun NH2-terminal kinase regulation of apoptotic response of small cell lung cancer cells to ultraviolet radiation. *J Biol Chem* 272: 10110-10116, 1997.
- 6) Chen YR, Meyer C and Tan T H: Persistent activation of c-jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gradation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:631-634, 1996.
- 7) Chen YR, Wang X, Templeton D, et al: The role of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and g radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271: 31929-31936, 1996.
- 8) Chen Z, Seimiya H, Naito M, et al: ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18:173-180, 1999.
- 9) Hall E J: Cell survival curves. (In) Hall E J ed: Radiobiology for the Radiologist. 5th ed. 32-50, 2000, J.B.Lippincott, Philadelphia
- 10) Russell J, Wheldon T E, Stanton P: A radioresistant variant derived from a human neuroblastoma cell line is less prone to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 55: 4915-4921, 1995.
- 11) Ohnishi K, Ota I, Takahashi A, et al: Glycerol restores p53-dependent radiosensitivity of human head and neck cancer cells bearing mutant p53. *Br J Cancer*, 83: 1735-1739, 2000.
- 12) Brown J M, Wouters BG: Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 59: 1391-1399, 1999.
- 13) Tezuka M, Watanabe H, Nakamura S, et al: Antiapoptotic activity is dispensable for insulin-like growth factor I receptor-mediated clonogenic radioresistance after γ -irradiation. *Clin Cancer Res* 7: 3206-3214, 2001.
- 14) Chun Y J, Park I C Park M J, et al: Enhancement of radiation response in human cervical cancer cells in vitro and in vivo by arsenic trioxide (As203). *FEBS Lett* 519: 195-200, 2002.
- 15) Masunaga S, Ono K, Takahashi A, et al: Radiobiological characteristics of solid tumours depending on the p53 status of the tumour cells, with emphasis on the response of intratumour quiescent cells. *Eur J Cancer* 38: 718-727, 2002.
- 16) Johns H E and Cunningham J R : Radiobiology. (In) Johns H E and Cunningham J R ed: The Physics of Radiology, 4ed ed. 670-718, 1983, C.C.Thomas Publisher, Springfield
- 17) Hall E J: The oxygen effect and reoxygenation. (In) Hall E J ed: Radiobiology for the Radiologist. 5th ed. 91-111, 2000, J.B.Lippincott, Philadelphia
- 18) Maxwell PH, Tatcliffe P J : Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev*, 13:29-37, 2002.
- 19) Thomas C D, Chavaudra N, Martin L, et al: Correlation between radiosensitivity, percentage hypoxic cells and pO2 measurements in one rodent and two human tumor xenografts. *Radiat Res* 139: 1-8, 1994.
- 20) Yuki H, Fujiwara M, Yamakawa Y, et al: Detection of apoptosis and expression of apoptosis-associated proteins as early predictors of prognosis after irradiation therapy in stage IIIb uterine cervical cancer. *Jpn J Cancer Res* 91: 127-134, 2000.
- 21) Shibuya H, Hoshina M, Takeda M, et al: Brachytherapy for stage I and II oral tongue cancer: an analysis of past cases focusing on control and complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 26: 51-58, 1993.
- 22) Kim J Y, Cho H Y, Lee K C, et al: Tumor apoptosis in cervical cancer: its role as a prognostic factor in 42 radiotherapy patients. *Int J Cancer*, 96: 305-312, 2001.
- 23) Wheeler J A, Stephens L C, Tornos C, et al: ASTRO Research Fellowship: apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 1487-1493, 1995.
- 24) Levine E L, Davidson S E, Roberts S A, et al: Apoptosis as predictor of response to radiotherapy in cervical carcinoma. *Lancet* 344: 472-473, 1994.