HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	スポットスキャニング照射における陽子線生物学的効果の評価とエチニルシチジンによる陽子線増感効果に関する研究
Author(s)	前田, 憲一郎
Description	配架番号：2255
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12357号
Issue Date	2016-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12357
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63708
Type	doctoral thesis
File Information	Kenichiro_Maeda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

スポットスキャニング照射における陽子線生物学的効果の評価と
エチニルシチジンによる陽子線増感効果に関する研究

(Evaluation of the biological effect of spot-scanning proton irradiation and studies on the sensitizing effect of 1-(3-C-Ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine for proton beam)

2016 年 6 月

北　海　道　大　学

前　田　憲　一　郎

学　位　論　文

スポットスキャニング照射における陽子線生物学的効果の評価と
エチニルシチジンによる陽子線増感効果に関する研究

(Evaluation of the biological effect of spot-scanning proton irradiation and studies on the sensitizing effect of 1-(3-C-Ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine for proton beam)

2016 年 6 月

北　海　道　大　学

前　田　憲　一　郎

目　次

発表論文目録および学会発表目録　1 頁
緒言　3 頁
略語表　5 頁

第一章　陽子線の生物学的効果の評価
1.1 緒言　6 頁
1.2 実験方法　9 頁
1.3 結果　13 頁
1.4 考察　17 頁
1.5 小括　20 頁

第二章　エチニルシチジンによる陽子線生物学的効果へ増感効果の評価及び陽子線増感治療の実現に向けた基礎検討
2.1 緒言　21 頁
2.2 実験方法　23 頁
2.3 結果　28 頁
2.4 考察　34 頁
2.5 総括および結論　37 頁

謝辞　39 頁

引用文献　40 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. 前田　憲一郎、 安井　博宣、 松浦　妙子、 山盛　徹、 鈴木　基史、 永根　大幹、 Nam Jin-Min、 稲波　修、 白土　博樹

   Evaluation of the relative biological effectiveness of spot-scanning proton irradiation in vitro.

   Journal of Radiation Research (2016)

2. 前田　憲一郎、 安井　博宣、 山盛　徹、 松浦　妙子、 高尾　聖心、 鈴木　基史、 松田　彰、 稲波　修、 白土　博樹

   A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd), induces depth-dependent enhancement of tumor cell death in SOBP of proton beam

   PLOS ONE（投稿中）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 前田　憲一郎、 安井　博宣、 山盛　徹、 松浦　妙子、 高尾　聖心、 鈴木　基史、 松田　彰、 稲波　修、 白土　博樹

   A feasibility study for establishment of proton therapy combined with 1-(3-C-Ethynyl-β-D-ribo- pentofuranosyl) cytosine (ECyd)

   15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015), 2015 年 5 月 25 日～29 日　京都

2. 前田　憲一郎、安井　博宣、山盛　徹、松浦　妙子、高尾　聖心、鈴木　基史、松田　彰、稲波　修、白土　博樹

1-(3-C-Ethynyl-β-D-ribo- pentofuranosyl) cytosine (ECyd) 併用による陽子線増感治療の実現に向けた基礎検討

放射線ワークショップ（第 1 回）-未来に繋ぐ放射線研究- 2015 年 10 月 16 日～17 日　富山

3. 前田　憲一郎、 安井　博宣、 山盛　徹、 松浦　妙子、 高尾　聖心、 鈴木　基史、 松田　彰、 稲波　修、 白土　博樹

A study for establishment of proton therapy combined with 1-(3-C-Ethynyl -β-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd)
3rd GI-CoRE Medical Science and Engineering Symposium 2016 年 3 月 3～4 日　札幌

緒言

放射線治療は外科療法や化学療法と並びがん治療の一つである。放射線治療の特徴として、手術が困難な部位の治療が可能、比較的苦痛が少ない、患者の生活の質の向上といった点があり、国内外を問わず放射線治療を受ける患者数は著しく増加している。しかし、その一方で、皮膚、粘膜、造血組織に対する急性障害、あるいは組織の萎縮、繊維化、潰瘍などの晩発性の障害、放射線による二次発がんなども起こり得る。そこで、これらの副作用を最小限にするため、これまでに光子線治療において、強度変調放射線治療あるいは回転型強度変調放射線治療などの新しい技術が開発されてきた[1,2]。これら新規照射技術によって、正常組織への被ばくを出来る限り低減しつつ、高線量を腫瘍に照射する事が可能となっている。さらに今日、放射線の一種である粒子線がその優れた線量分布から注目を集めており、今後のがん治療において大きな役割を担うと考えられている。近年では、粒子線治療の一つである陽子線治療の施設が国内外を問わず増加しており、また、陽子線治療を受ける患者の数も増加傾向にある[3]。

陽子線が物質に入射すると、陽子線が持つエネルギーに対応した深さ（飛程）まで進行し、飛程の終端付近で急激に物質に対してエネルギー付与する。この特徴的な深部線量分布はブラッグカーブ、最大線量はブラッグピークと呼ばれる。この特性を利用して実際の治療においては､陽子線のエネルギーを適切に選択し、患者の体内にある腫瘍全体を覆うようにブラッグピークを拡大して spread-out Bragg peak (以下 SOBP)を形成する事で照射を行う。従来の光子線治療と比べて腫瘍への線量集中性が良く、正常組織への線量をより低減させる事が可能である[4]。

本学では、2014 年 3 月に北海道大学病院陽子線治療センターにて陽子線治療を開始した。本センターには日本学術振興会による最先端研究開発支援プログラム（FIRST プログラム）の一環として開発されたスポットスキャニング式照射装置が導入されている。スポットスキャニング照射法は、陽子線の細いペンシルビームを深さ方向にはエネルギーを変えて、ビームと水平方向には磁場を偏向して走査する手法である。

陽子線治療は非常に優れた物理線量分布を持つが、近年の研究において実際の生物線量分布は SOBP 内で均一ではない事が明らかになってきている。また、陽子

線は炭素やネオンの様なヘリウムより重い原子番号を持つ原子の原子核を利用する重粒子線と比較して生物学的効果比(relative biological effectiveness：以下RBE)の値は小さい事が知られている　。そこで、本研究では、第1章で陽子線スポットスキャニング照射法における SOBP 内の RBE の不均一性について評価を行った。次に第2章では、RBE の不均一性の改善と RBE の値の上昇を目的として、陽子線と制がん剤を併用した場合の生物学的効果の変化について評価した。

略語法

本文中及び図中で使用した略語表は以下の通りである。

・CTP：cytosine 5’-triphosphate
・DAPI：4’,6-diaminodine-2’-phenylindole dihydrochloride
・DNA：deoxyribonucleic acid
・ECyd：1-(3-C-Ethynyl-β-D-ribo- pentofuranosyl) cytosine
・ETCP：1-(3-C-Ethynyl-β-D-ribo- pentofuranosyl) cytosine triphosphate
・LET：liner energy transfer
・PBS：phosphate-buffered saline
・QOL：quality of life
・RBE：relative biological effectiveness
・RNA：ribonucleic acid
・SOBP：spread out of Bragg peak
・UCK：uridine/cytidine kinase

第一章　陽子線の生物学的効果の評価

1.1 緒言

陽子線治療は、腫瘍周辺に存在する正常組織への線量を低減しつつ腫瘍へ高線量を照射する事が可能な高精度放射線治療である[4]。近年、国内外を問わず陽子線治療が選択される数は増加している[3]。患者の多くは、金属板の散乱体を使用してビームを拡大する散乱体法照射による陽子線治療を受けている。しかし、この散乱体法と比較してより自由度が高く線量のコンフォミティーが良いスポットスキャニング照射を採用している陽子線施設も増加してきている[5,6]。

北海道大学陽子線治療センターでは、2014 年 3 月に陽子線の細いペンシルビームを用いたスポットスキャニング陽子線治療を開始した[7]。スポットスキャニング照射では、単一に近いエネルギー分布を持つ小さな陽子線ビームを、数百～数千個用いて腫瘍へと線量を与える。加速エネルギーを変える事で深さ方向のスポットの位置を調整し、横方向のスポットの位置は 2 つの偏向磁石を用いて走査する(図 1)。スポットスキャニング照射では、コリメータやコンペンセーター、金属の散乱体やリッジフィルタを用いる必要が無いために、これらと陽子線が反応する事で生じる中性子の混入を低減する事が可能である[8]。

陽子線の持つ生物効果は、RBE を用いて表される。RBE は、放射線の種類によって生物学効果の大きさが異なることを表すための指標であり、ある生物学的効果を与えるのに必要な基準放射線（通常 ^{60}Co γ 線または 250 kV X 線）の線量を、対象となる放射線が同じ生物効果を示すのに必要とする線量で割った値である。一般的に、臨床において治療計画を行う際には、陽子線の RBE を全ての位置において 1.1 と固定の値を用いている（ICRU78)。ICRU78 レポートに則して、これまでの RBE の決定には散乱体照射法が用いられており、SOBP の起始部から平坦領域の中間部分までの RBE の値は 1.1~1.2 と報告されている[9,10]。しかし、近年の研究によると、SOBP の終端では RBE が 1.5~2.程度に増加する事が報告されている[11,12]。よって、SOBP の終端に放射線感受性組織が近接する場合には、それらに対する生物線量が低く見積もられてしまう可能性があるので RBE の値を 1.1 と固定するのは危険である[13-15]。一般的に、RBE は SOBP の distal 領域に向かって線エネルギー付与(linear energy transfer：以下 LET)の上昇と共に増加する傾向にあり[16,17]、Paganetti はこの RBE の特性について総合的に論評して

いる[18]。しかし、散乱体法で得られたRBEをそのままスポットスキャニング法に適応して良いのかは明らかではない。なぜなら、照射野および照射野中の問題とする位置を特徴付ける量（SOBP、飛程、照射野サイズ、残余飛程など）が同じでも、スポットスポットスキャニング法における陽子線のエネルギースペクトル、フルエンスまたはLETが従来の散乱体法と異なる可能性があり、結果として生物学的効果も異なる恐れがあるからである[19]。

Geuletteらは、Paul Scherrer Instituteにおいて、マウスの腸陰窩再生細胞を用いて3箇所の位置でスポットスキャニング照射法のRBEを測定した。彼らの測定結果は、ビームが入射してから浅いプラトー領域では1.11、SOBPの中間では1.16、SOBPのdistal領域では1.21であった[20]。しかし、これらの測定では、SOBPのdistal fall-offの様な線量勾配が大きい領域での測定は行われていなく、また、*in vivo*での実験であり照射位置の精度も悪い。さらに、チャイニーズハムスターV79細胞を用いたコロニー形成法による報告では、散乱体法においてSOBPのdistal領域におけるRBEは1.38まで達するという報告もある[21]。よって、SOBPのdistal領域を中心としたRBEの測定は、臨床において患者への予期せぬ副作用を起こさないためにも非常に重要である。

そこで、本研究では、まずSOBPのdistal fall-offを含む6点の位置において、スポットスキャニング照射におけるRBEについて評価した。また、RBEの位置依存のメカニズムについて検討するために、陽子線によるDNA二本鎖切断の数の変化についても評価した。

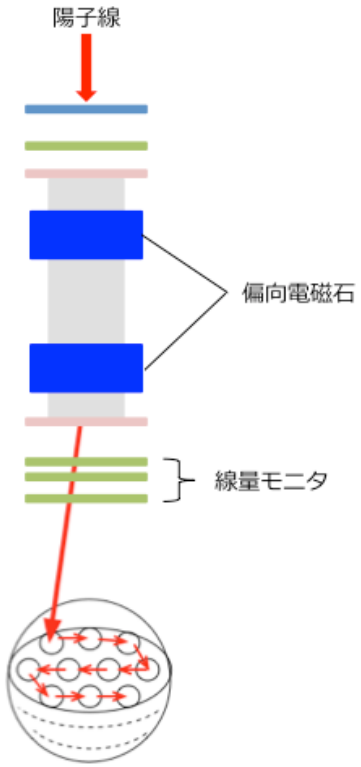


図 1.スポットスキャニング照射法の概念図

単一に近いエネルギー分布を持つ小さな陽子線ペンシルビームを、数百～数千個用いて絵を描くように腫瘍へと線量を与える。加速エネルギーを変える事で深さ方向のスポットの位置を調整し、横方向のスポットの位置は2つの偏向磁石を用いて操作する。スポットスキャニング照射法では、従来の散乱体法と異なり、ボーラスやコリメータを用いる必要はない。

1.2 実験方法

細胞培養

本研究では、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞である V79 を用いた。V79 は、これまでに多くの陽子線の RBE 測定に用いられている細胞であり、RBE の比較において基準となる細胞と考えられている[22]。本研究では、理化学研究所細胞バンクより V79 を購入し、10% のウシ胎児血清(BioWest, Nuaillé, France)を添加した α-MEM (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を用いて 37℃、5% CO_2 条件下で培養、維持した。

試薬

抗 p53 binding protein 1 (53BP1)抗体は Abcam (Cambridge, MA)から購入した。Alexa Fluor 488 抗マウス IgG は Thermo Fisher Scientific Inc.から購入した。特に表記の無い一般試薬については和光純薬(大阪)から購入した。

X 線照射

RBE 測定の基準放射線となる X 線照射には、北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室の X-RAD iR225(Precision X-ray, North Branford, CT)を用いて行った。照射条件を 250 kV、1 mm Al フィルタ、0.91 Gy/min とした(図 2A)。

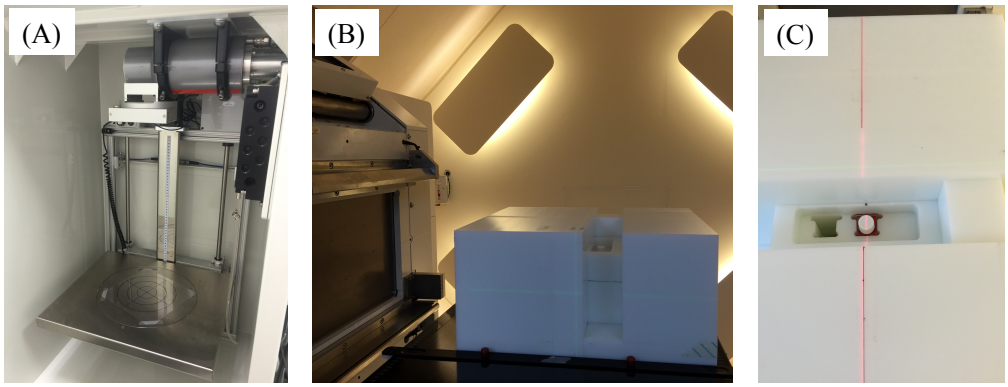


図 2. X 線照射装置と陽子線照射に用いたポリエチレンファントム

(A)北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室の X 線照射装置。X-RAD iR225 (Precision X-ray, North Branford, CT)。(B)ポリエチレンファントムの全体像。様々な深さで RBE を測定出来る様に水等価の高密度のポリエチレンを用いてファントムを設計した。(C)スライドフラスコを挿入した時の上からの図。照射に使用しない穴については水を入れた。

陽子線照射

陽子線照射は、北海道大学病院陽子線治療センターのスポットスキャニング式照射装置 ProBeat RT (日立製作所、東京)を用いて行った。照射野を 10×10 cm、スポット間隔を 5 mm、照射エネルギーを 156.7–182.8 MeV とし、SOBP 幅を 6 cm とした。アイソセンターと SOBP 中心を一致させた。線量測定には、PTW Markus Chamber (Type 34045; PTW, Freiburg, Germany) と電位計(Type 10021; PTW)を用いた。SOBP の深さ方向の平坦度は±2.5 %であり、照射野の平坦度は±0.72 %、線量率の平均は、2.68 Gy/min であった。陽子線照射には、照射位置を変える事が可能な水透過のポリエチレンファントム(水透過厚比 = 1.03、密度 ρ = 0.98 g/cm^3)を用いた(図 2B, C)。細胞前面に位置するブロックを変更する事で照射位置を変える事が可能である。照射位置は、(A)入射面から 5mm 深さ、(B)SOBP 中心と比較して proximal 側の物理線量が 95%の点、(C)SOBP 中心、(D) SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 95%の点（以下、distal edge)、(E) SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 73%の点、(F) SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 33%の点の 6 箇所とした(図 3)。

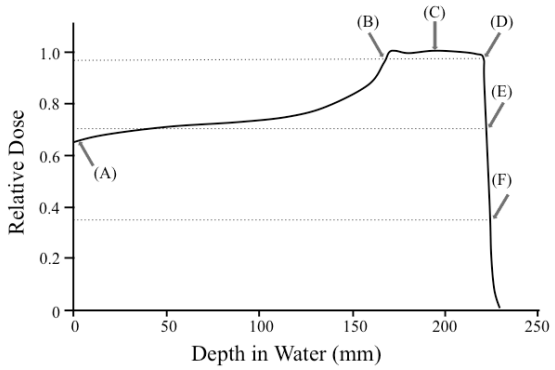


図 3.深部線量曲線と細胞照射位置

測定された線量は SOBP 中心で標準化された。深さは水等価深で表されている(水等価比[1.03] × ポリエチレンファントム表面からの深さ[mm])。RBE 測定のための細胞照射は以下の 6 箇所で行われた。(A)入射面から 5mm 深、 (B)SOBP 中心と比較して proximal 側の物理線量が 95%の位置、(C) SOBP 中心、(D) SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 95%の位置(distal edge) (E) SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 73%の位置、 (F) SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 33%の位置。

コロニー形成法

照射の 6 時間前に、スライドチャンバーフラスコ(Lab-Tek™ SlideFlask 170920, Nunc/Thermo Fisher Scientific)に 1.6×10^6 個となるように細胞を播種し、照射の直前に α-MEM でフラスコ内を満たした。陽子線照射は、SOBP 領域が 0~15 Gy となるように、X 線照射は細胞面が 0~15Gy となる様に行われた。照射後、フラスコ内の細胞は 37℃、5%CO_2 内で 3 分間 0.125%トリプシン処理された。剥がれた細胞を回収し 4℃,1,000 rpm で遠心分離機にかけ沈殿させた。上清をアスピレートし 5ml の α-MEM でサスペンションした後、カウントした。それぞれの線量に応じて、100 から 50,000 個の細胞を 6 cm のディッシュ 3 枚に播種し、37℃、5%CO_2 条件下で 7 日間培養した。コロニーは 95%メタノールで固定した後、5%ギムザ溶液で染色した。50 個以上の細胞からなるコロニーをカウントし、生存細胞として記録した。それぞれの線量における生存率は、照射されていないコントロールのプレーティング効率に対する比として計算され、物理線量に対してプロットされた。生存曲線は、以下の直線–二次曲線モデルの式に従ってフィッティングした。

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (1)$$

ここで、 SF は生存率、D は物理線量を表す。

RBE_{10} と RBE_{37} の算出には、生存率を 10%あるいは 37%までに減少させる線量である D_{10} と D_{37} をそれぞれ用いた。RBE の算出には以下の式を用いた。

$$RBE = \frac{D_{陽子線}}{D_{X線}} \quad (2)$$

また、本研究で基準放射線とした X 線を 4 Gy あるいは 2 Gy 照射した場合の生存率と等しい生存率となる陽子線の線量を(D_{4Gy}, D_{2Gy})用いた RBE_{4Gy} と RBE_{2Gy} についてもそれぞれ算出した。

53BP1 foci 形成法

照射前日に、スライドチャンバーフラスコに 4.0×10^5 個となるように細胞を播種した。37℃、5%CO_2 条件下で一晩接着させた後、照射の直前に α-MEM でフラスコ内を満たした。1.5 Gy の陽子線照射後、培地を 10 ml 程度捨て 37℃、5%CO_2 条件下で培養した。照射から 30 分、60 分、180 分、並びに 360 分後にフラスコ内に残っている培地全てをアスピレートし、4%パラホルムアルデヒドを含む

PBS(-)5ml をフラスコ内に入れて室温で 30 分細胞を固定した。PBS(-)で 2 回洗浄後、0.5% Triton X-100 含む PBS(-)を 5ml フラスコ内に入れ、4℃、5 分間、透過処理を行った。続いて PBS(-)で 2 回洗浄後、スライドフラスコの底面を剥がし、イムノペンでブロッキングする領域を囲み、6%抗ヤギ血清含む PBS(-)300ml で 30 分ブロッキングを行った。その後、3%抗ヤギ血清抗を含む PBS(-)で 1,000 倍に希釈した抗 53BP1 抗体にて 4℃で一晩処理した。PBS(-)で洗浄後、PBS(-)で 1,000 倍に希釈した Alexa Fluor 488 標識抗マウス抗体もしくは抗ウサギ抗体を室温で 1.5 時間処理した。PBS(-)で洗浄後、300 nM 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc.) を室温で 5 分処理したのち、再度 PBS(-)で 2 回洗浄を行い、カバースリップを Prolong Gold antifade (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いてスライドフラスコの底面上にマウントした。蛍光顕微鏡観察には、Olympus BX50 顕微鏡(東京)を用いた。53BP1 foci のカウントは Image J を用いて行った。また、低 LET 放射線に対するリファレンスとして、X 線(200kV, 2 mA, 0.91 Gy)照射(1.5 Gy)を用いて同様の実験を行った。

統計解析

統計的有意差は、マンホイットニーU 検定により検定した。データは、それぞれ独立した 3 回の実験から得られた値の平均値±標準偏差(SD)で表示し、$p<0.05$ の時にその差が有意であると判断した。

1.3 結果

生存曲線

図 4 にコロニー形成法によって得られた V79 の生存曲線を示した。図 3 に示してある様に、陽子線の照射位置は 6 箇所とした。全ての位置において、陽子線における生存曲線は X 線の生存曲線の下側に位置し、同線量において陽子線の高い増殖抑制効果を示していた。(B)と(D)は共に SOBP 中心の物理線量と比較して 95%の線量位置であるが、(D)での生存曲線は(B)よりも直線に近い形状とり、高い細胞殺傷効果を示した。

Relative biological effectiveness

得られた生存曲線より RBE を算出した(表 1)。RBE の値は全ての位置において 1.1 よりも大きくなった。SOBP 中心での RBE_{10} と RBE_{37} の値はそれぞれ 1.15 と 1.21 であり、これまでに報告されている散乱法における V79 を用いて得られた RBE の値と近い値となった。本研究では、(D) distal edge において RBE の値が最大となり、その値は RBE_{10} が 1.5 であり RBE_{37} が 1.85 であった。これらの値は、(C)SOBP 中心で得られた値の 1.3 倍以上であった。さらに、distal fall-off 領域の(E)と(F)での RBE の値も(C)の SOBP 中心で得られた値よりも大きい値を示した。Wouters らは、V79 の様に α/ß の値が小さい細胞では、RBE の値は低線量域において上昇すると報告している [12]。そこで、本研究においても、それぞれの照射位置において RBE_{4Gy} と RBE_{2Gy} についても算出した(表 1)。RBE_{4Gy} は SOBP 内において 1.33 以上の値を示し、全ての位置において RBE_{10} と RBE_{37} の値よりも大きい値となった。RBE_{2Gy} では、RBE の値はさらに大きく上昇し、特に(D) distal edge での値は 2.52 と非常に大きい値を示した。

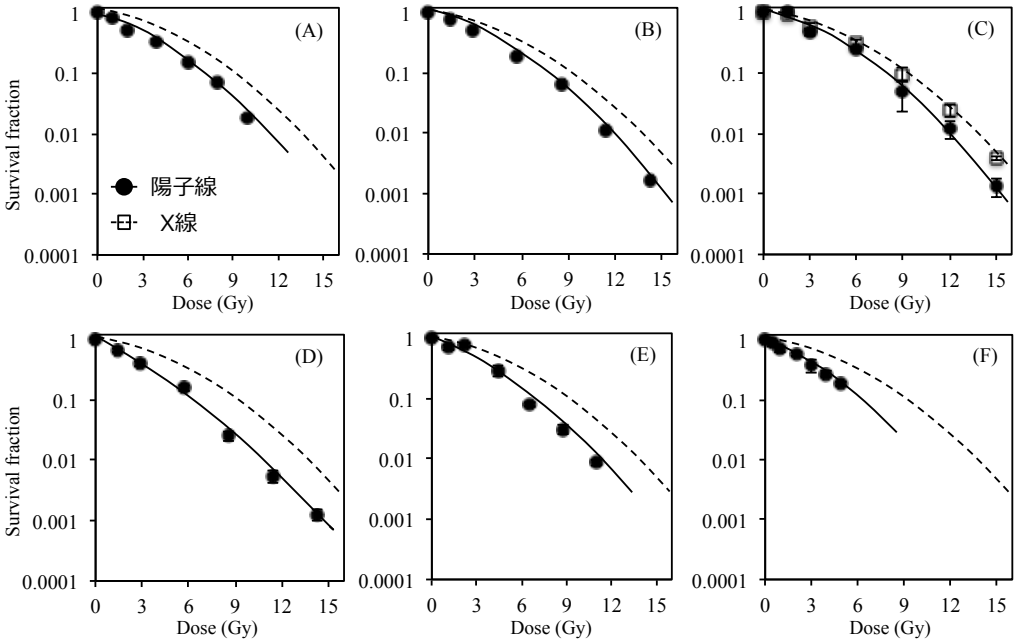


図 4. X 線照射あるいは異なる深さでの陽子線照射を行った V79 の生存曲線

コロニー形成法で得られた結果より、X 線の生存曲線(□と点線)とそれぞれの位置(表 1 参照)において照射された陽子線の生存曲線(●と実線)を示した。7 日間の培養後、生存コロニーを染色し数えた。実験方法に記載記されている直線–二次曲線モデルに従い、生存曲線をフィッティングした。陽子線が照射されたそれぞれの位置における線量誤差は 0.5%未満であった。

表 1.生存曲線より得られた RBE 及び生物学的パラメーター

position	Dose fraction	Depth(mm)	$\alpha(Gy^{-1})$	$\beta\ (Gy^{-2})$	α/β (Gy)	D_{10} (Gy)	RBE_{10}	D_{37} (Gy)	RBE_{37}	RBE_{2Gy}	RBE_{4Gy}
A	0.66	5	0.18	0.0191	9.42	7.19	1.24	3.87	1.35	1.44	1.32
B	0.95	165	0.16	0.0203	7.88	7.42	1.2	4.09	1.28	1.54	1.37
C	1	190	0.14	0.0200	7.00	7.73	1.15	4.32	1.21	1.46	1.33
D	0.95	220	0.32	0.0117	27.35	5.94	1.5	2.83	1.85	2.52	2.04
E	0.73	222.5	0.24	0.0191	12.57	6.42	1.39	3.32	1.58	1.96	1.68
F	0.33	224	0.22	0.0209	10.53	6.15	1.45	3.3	1.58	1.86	1.65
X-rays	-		0.09	0.0185	4.86	8.91	-	5.23	-	-	-

生物学的パラメーター

生存曲線より生物学的パラメーターであるα、β及びα/βの値を算出した(表 1)。α は 1 本の放射線によって 2 本の DNA 切断が起きる確率（飛跡内事象）を、β

は 2 本の放射線によって 2 本の DNA 切断が起きる確率（飛跡間事象）をそれぞれ表す。α の値は 0.14 から 0.32 までの値となった。また、全ての位置において X 線の結果よりも大きい値となり、(D) distal edge において最大となった。これに対して β の値は、線質あるいは照射位置に関わらず大きい変化を示さなかった (0.019 ± 0.0045)。α/β は α の値と同様の傾向を示し、(D)distal edge で最大となり 27.35 となり(C) SOBP 中心の約 4 倍の値となった。

照射位置による DNA 二本鎖切断数の評価

表 1 に示した様に RBE の値は位置依存的に変化し、SOBP の distal 領域で上昇傾向を示した。特に、SOBP の(D)distal edge において RBE の値は最大となり、(C)SOBP 中心と比較して、RBE_{10} の値は約 1.3 倍以上、α の値は約 2.5 倍以上となった (表 1)。そこで、RBE の値が上昇するメカニズムを評価するために、 (C) SOBP 中心と RBE の値が最大となった(D) distal edge の 2 箇所において、53BP1 foci 形成法による DNA 二本鎖切断の数について評価した(図 5)。図 5(A)は、(C)SOBP 中心において照射後 30 分の DAPI と 53BP1 foci の写真である。照射後それぞれの時間において、細胞あたりの foci の数を数える事によって、DNA 二本鎖切断の修復能について評価した。図 5(B)に示された様に、(C)SOBP 中心と(D)distal edge において照射された細胞の foci の数は、照射後 30 分に置いて最大となった (約 8 foci)。その後、(C)SOBP 中心では(D)distal edge と比較して foci の数の減少率は早かった。これらの結果は、(C)SOBP 中心における DNA 二本鎖切断は、(D)distal edge での切断と比較して修復しやすい事を示唆している。また、(C)SOBP 中心における DNA 二本鎖切断の修復能は、X 線が引き起こす DNA 二本鎖切断の修復能と近い結果となった。

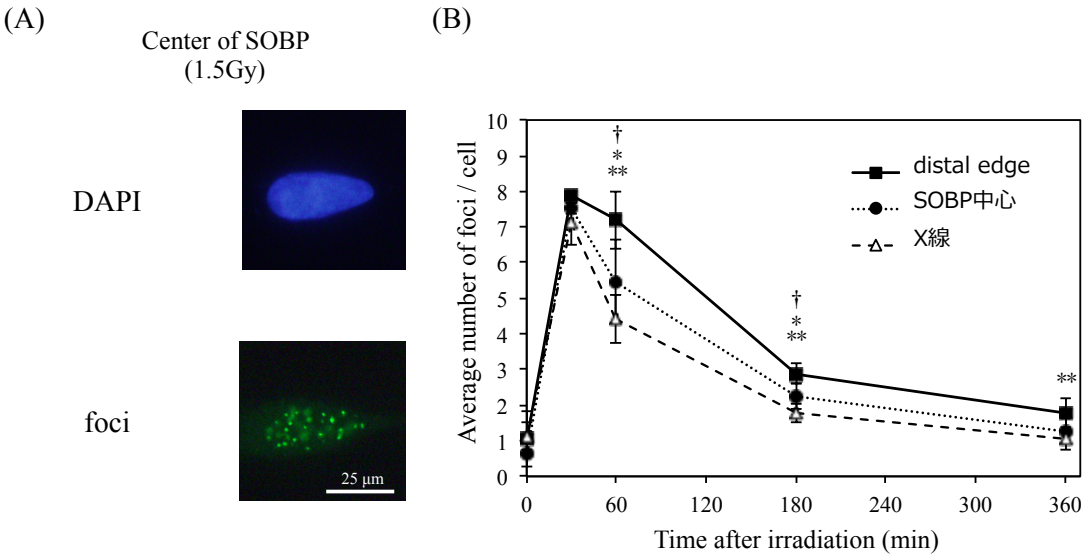


図 5. 53BP1 foci 形成法で得られた V79 における二本鎖切断の数の変化

(A) SOBP 中心における陽子線照射後 30 分の写真。 DAPI で染色した核と foci の画像。(B) X 線照射(△と点線)及び SOBP 中心(●と破線)、distal edge(■と実線)において陽子線照射後 30 分、60 分、180 分、360 分において二本鎖切断の数 を測定した。少なくとも 50 個の細胞を数え、foci の数を記録した。照射後 30 分では foci の数には有意差は見られなかったが、その後 DNA 修復能に違いが見られた。データは平均値±SD で示されており、それぞれ 3 回の実験を行った。統計的有意差は、X 線照射に対して SOBP 中心は*:p< 0.05、distal edge は**:p<0.05、SOBP 中心に対して distal edge は†:p<0.05 で示した。

1.4 考察

本研究において、スポットスキャニング照射法における V79 の RBE の値は、(C)SOBP 中心において RBE_{10} の値が 1.15、RBE_{37} の値が 1.21 となった。これらの値は、これまでに他施設で散乱体法において測定された V79 の RBE の値とほぼ等しい値となった[23,24]。よって、照射法の違いによらず RBE は同様の値を示す事が示唆された。一般的に、スポットスキャニング照射ではコリメータやアパーチャー、散乱体が存在しないので、散乱体法と比較して中性子の混入が少ない。さらに、スポットスキャニング照射では、細い陽子線ペンシルビームを用いて腫瘍全体を照射していくので、照射野内での線量率が均一ではない。しかし、今回得られた結果では、それらの要因は RBE に影響を与えない事が示唆された。

SOBP の distal region ((D), (E), (F))では RBE の値は上昇傾向を示し、(D)distal edge において RBE の値は最大となった。表 1 の生物学的パラメーターを見ると、陽子線照射における α の値は、RBE の値と同様に distal region において上昇傾向を示し、0.14 から 0.32 までの値を示した。しかし、β の値は全ての位置においてほとんど変化しなかった(0.019±0.01)。

表 1 に示された様に、(C)SOBP 中心と比較して(D)distal edge において RBE の値は有意に増加した。そこで、53BP1 foci 形成法を用いて、(C)SOBP 中心と(D)distal edge における陽子線による DNA 二本鎖切断の修復能について評価した。図 5 に示した様に、照射後 30 分における 53BP1 foci の数は、(C)SOBP 中心と(D)distal edge において差は見られなく、 初期の(D)distal edge における DNA 二本鎖切断の量は (C)SOBP 中心と同程度であると考えらえる。しかし、(D)distal edge における 53BP1 foci の減少率は(C)SOBP 中心よりも小さく、修復しがたい DNA 損傷の割合が増加した事が示唆される。

(D)distal edge におけるクラスターDNA 損傷の量は(C)SOBP 中心よりも多い事が示唆された。Scholz と Kraft は、シミュレーションを用いた研究において細胞死滅効果の LET 依存性は重粒子線だけではなく、陽子線においても見られると報告している[25]。Friedrich らは、シミュレーションによる解析により、LET が 10 keV/μm の陽子線における二本鎖切断の数はそれよりも低い LET における場合と比較して、約 1.1 倍程度と僅かではあるが増加すると報告している[26]。また、ヒト線維芽細胞 AG01522 を用いたコロニー形成法において、陽子線の細胞死滅効果の LET 依存性は、LET が 1~20 keV/μm の範囲で生じると報告されており[27]、Chaudhary らは、陽子線の SOBP 内において RBE と LET は直線の関係に

あると報告している[28]。Ward とGoodhead は、LET が上昇するにつれて、細胞による修復を困難にするクラスターDNA 損傷が増加すると報告している[29,30]。このクラスターDNA 損傷は、nm 程度の狭い領域に生じた２つあるいはそれ以上の損傷と定義されている[31]。よって、この distal edge における RBE の上昇は LET に依存的なクラスターDNA 損傷の形成によるかもしれない。LET の違いは、DNA 二本鎖切断の数への影響は小さいが、その後の細胞による修復効率には影響し、その結果として RBE の増加につながったと考えられる。

また、臨床の治療計画では、生物線量(物理線量×RBE)は非常に重要である。本研究で得られた RBE_{10} の値より生物線量の値を計算すると、それぞれ(A)0.81、(B)1.2、(C)1.15、(D)1.15、(E)1.4、(F)0.52 であった(図 6)。生物線量は(D)distal edge において非常に大きくなり、生物学的な陽子線の飛程(生物線量の 90%位置)は物理学的飛程と比較して約 2.2 mm 伸長した。この結果は、Wilkens らのモンテカルロシュミレーションによる計算や Matsumoto らが散乱体法で行った報告と同様の傾向を示した[11,32]。また、Wouters らは、V79 の様な α/β が小さい細胞では、低線量域、特に 4 Gy 以下において RBE の値は急激に上昇し、4 Gy における RBE の値が１回の治療あたりの RBE を評価する上で適切な値を示すと報告している[12]。本研究においてもそれぞれの照射位置での RBE_{2Gy} の値は RBE_{4Gy} と比較して大きく上昇し、Wouters らの結果と同様の傾向を示した(表 1)。そこで、(D) distal edge での RBE_{4Gy} の値を評価すると、2.04 と治療計画値である 1.1 の 2 倍近い値を示した。*In vitro* において評価された RBE が直接、臨床の結果に繋がるかはまだ明らかにはなっていないが、実際に治療を行う際には、生物線量分布の伸長及び RBE の上昇について十分に考慮しなければならないと考えられる[33,34]。また、同じ SOBP 内においても治療効果が異なる可能性もあり、より慎重に患者の副作用や治療効果を管理していかなければならない。RBE の変化を組み込んで治療計画を行うといった生物学的な最適化が今後必要であると考えられる[35]。

本研究の問題点として、まず、評価に用いた細胞が 1 種類だけであった点があげられる。細胞種が異なると放射線感受性が異なり、RBE の値は変化する事が考えられるため、今後、他の細胞株を用いて評価する事が必要である。さらに、本研究では *in vitro* による評価のみである。臨床により近い体系の構築や *in vivo* での評価が今後必要である。また、スポットスキャニング法では散乱体法と異なり、照射野や SOBP 幅によって線量率が異なる。よって、臨床での条件を想定し

様々なSOBPにおける評価も必要である。さらに、本研究では53BP1 foci形成法によって、SOBP内でDNA損傷の修復に差がある事が示されたが、細胞死の形態への影響は不明のままである。よって、DNA損傷の修復の差がアポトーシスや分裂期崩壊などに与える影響についても評価する必要がある。

しかしながら、スポットスキャニング陽子線照射において、*in vitro*でSOBPのdistal-fall offの評価を正確に行った報告は本研究が最初である。また、陽子線においてRBEの評価だけではなく、RBEを決定づける生物効果に関する報告は数少ない。今後、スポットスキャニング照射の普及に伴い臨床への影響を考慮する上で、本研究における結果は非常に重要であると考えられる。

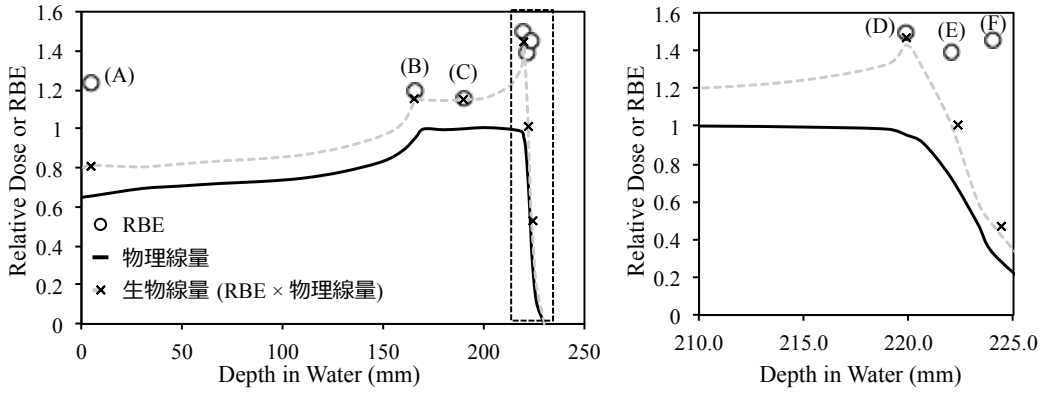


図 6. V79 における RBE 及び生物線量分布

相対物理線量分布（黒い実線)、RBE_{10} (◯)、それぞれの照射位置における RBE_{10} × 物理線量 (×)を示した。物理線量はSOBP中心で標準化された。

1.5 小括

本章では、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞である V79 を用いて陽子線スポットスキャニング照射における陽子線の生物学的効果を評価した。RBE の測定にはコロニー形成法を、DNA 二本鎖切断の数の評価については 53BP1 foci 形成法を行った。得られた RBE の値は散乱体法においてこれまで報告されている RBE と同様の値を示し、SOBP 中心において RBE_{10} の値は 1.15、RBE_{37} の値は 1.21 とであった。SOBP の distal 領域では、生物学的パラメーターである α の値と共に RBE の値は増加し、distal edge において最大となり RBE_{10} の値は 1.5、RBE_{37} の値は 1.85 となった。53BP1 foci 形成法では、foci の最大値に変化は見られなかったが、distal edge において DNA 二本鎖切断の回復に遅延が見られた。一般的に SOBP の distal 領域では LET が高く、電離密度が大きい。これによって、クラスター損傷の様な修復し難い DNA 損傷が増加し、その結果 RBE の値の上昇につながったと考えられる。

また、RBE の上昇に伴い生物線量も増加した。生物線量の飛程は、物理線量と比較して 2.2 mm 程度伸長した。Wouters らに従って評価を行った RBE_{4Gy} では、distal edge において 2.04 となった。よって、SOBP のすぐ後方に放射線感受性の高い臓器がある場合などには、十分に注意を払わなければならない。

第二章　エチニルシチジンによる陽子線への増感効果の評価及び陽子線増感治療の実現に向けた基礎研究

2.1 緒言

第 1 章では、スポットスキャニング照射における陽子線の RBE 及び生物学的効果について評価した。SOBP の distal 領域では RBE は上昇し、SOBP 中心と比較して distal edge では最大で 1.5 倍程度大きい値となった。SOBP の終端と放射線感受性臓器が隣接している様な場合には、注意深く治療計画を作成し、患者の治療計画を観察すべきである。また、この RBE の上昇を引き起こす原因として、distal edge ではクラスターDNA 損傷の様な修復し難い損傷が増加している事が示唆された。よって、同一の SOBP 内に標的となる腫瘍を設定してもその位置によって治療効果が異なる可能性がある。しかし、臨床では RBE の値は 1.1 と固定されたまま治療計画及び陽子線照射が行われており、この RBE の変化に対する解決策が今後の課題として考えられる。

一方で、近年、陽子線の SOBP における RBE を増強させるために、非小細胞肺癌やステージⅢ～ⅣB の舌がんに対し、シスプラチンの様な抗がん剤と陽子線を同時併用する化学放射線療法が行われている [36,37]。これらの臨床的な試みは、併用療法による毒性は許容範囲でありながら患者の生存期間を延長させたと報告している。さらに、金のナノ粒子は、ヒト前立腺がん細胞 DU-145 [38]、マウス乳腺細胞 EMT-6、マウス大腸癌細胞 CT26 [39] において陽子線による細胞殺傷効果を増強させた。これらの結果は、化学薬剤と金ナノ粒子は陽子線の RBE を増強した事を示している。しかしながら、化学薬剤による陽子線への放射線増感効果について、陽子線の SOBP の複数の位置において詳細な増感効果の評価は行われていない。化学薬剤と陽子線治療の併用療法のプロトコルを確立するために、陽子線 SOBP の複数の位置において化学薬剤が陽子線 RBE あるいは生物線量に与える影響について評価する事が重要である。

本研究では、RNA 合成阻害という作用機序を持つ新規制がん剤エチニルシチジン(1-[3-C-Ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl] cytosine;ECyd)に着目した [40,41]。

ECyd は、北海道大学大学院薬学研究院松田彰教授のグループが開発したヌクレオシド系制がん剤である(図 7)。シチジンと類似した化学構造を持ち、細胞に取り込まれた後、ウリジン/シチジンキナーゼ(UCK)によって三リン酸化される。三リン酸体(ECTP)はシチジン三リン酸体(CTP)と競合して RNA 合成を阻害する[40,42,43]。一般的に、UCK は腫瘍組織において高く発現しており、ECyd は腫瘍に優先的に蓄積されていく[40,44,45]。これまでに、X 線において ECyd はマウス大腸腺がん細胞[46]、ヒト胃腺がん細胞[47]、ヒト肺腺がん細胞など様々な腫瘍細胞に対して増感効果を示す事が報告されてきた。また、*in vivo* においても MKN45 移植腫瘍に対して、X 線と ECyd の併用によりで腫瘍の成長が効果的に抑制された[47]。興味深い事に、*in vitro* のコロニー形成法における細胞生存率曲線では、直線-二次モデルの β ではなく α 項が強く増感された[48]。もし、ECyd が陽子線においても増感効果を示せば、陽子線の RBE は上昇し、さらい生物線量分布も変化する可能性がある。そこで、本研究では第 1 章で用いた V79 とヒト肺腺がん由来細胞の A549 の 2 種類の細胞を用いて ECyd による陽子線に対する増感効果について評価した。まず、コロニー形成法において ECyd の陽子線への増感効果について評価した。次に、53BP1 foci 形成法を用いて、ECyd の DNA 二本鎖切断への影響について評価し、ECyd の細胞死の形態の評価として細胞老化について評価した。また、得られた RBE より生物線量を算出し生物線量の変化及び臨床への影響について検討を行った。

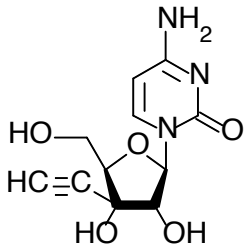


図 7. エチニルシチジン(1-[3-C-Ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl] cytosine)の構造式

2.2 実験方法

細胞培養

チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞 V79 の培養は前章で示した様に行った。

ヒト肺腺がん細胞 A549 は理化学研究所細胞バンクより購入した。10% のウシ胎児血清(BioWest, Nuaillé, France)を添加した RPMI 1640 (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を用いて 37℃、5% の二酸化炭素下で培養・維持した。

試薬

ECyd は、北海道大学薬学研究院松田彰教授により合成され供与された。抗 p53 binding protein 1 (53BP1)抗体及び Alexa Fluor 488 抗マウス IgG は前章と同様の試薬を用いた。β-Gal は、Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)より購入した Senescence β-Galactosidase Staining Kit に同封されている試薬を使用した。

薬剤処理

ECyd の処理濃度は、A549 では 0.1 μM、V79 では 0.4 μM とした。これらの濃度は、後述のコロニー形成法で 60%生存率となる量である（図 8)。それぞれの細胞において、照射の 1 時間前に薬剤を添加した通常培地と交換することで細胞に処理した。また、照射後に 23 時間処理した後、PBS で 2 回洗浄し通常培地と交換した。

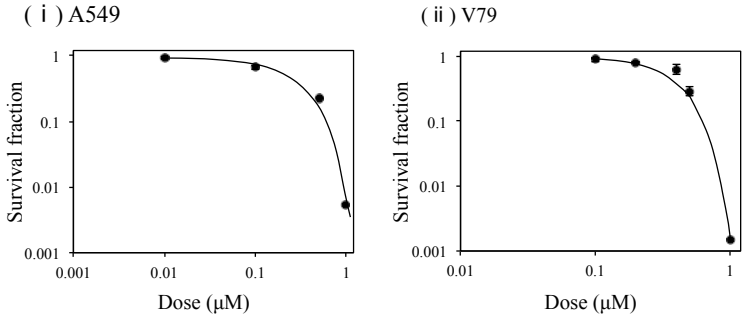


図 8. コロニー形成法による ECyd の細胞への毒性評価

それぞれの濃度において ECyd を 24 時間処理し、PBS で 2 回洗浄後、ECyd を含まない通常培地で培養した。コロニーを形成させる期間は A549 では 10 日間、V79 では 7 日間とした。

陽子線照射

陽子線の照射は、前述の北海道大学病院陽子線治療センターのスポットスキャニング式照射装置 ProBeat RT を用いて同じ条件で行った。前章と同様に、陽子線照射には水透過のポリエチレンファントムを用いた。照射位置は、(A)入射面から 5 mm 深さ、(B)SOBP 中心と比較して proximal 側の物理線量が 95%の点、(C)SOBP 中心、(D)SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 95%の点（以下、distal edge）の 4 箇所とした(図 9)。

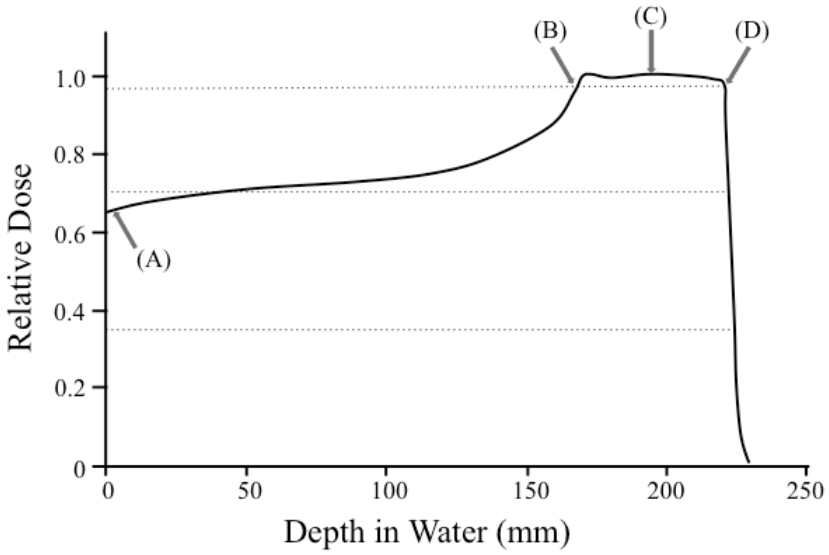


図 9．照射位置

測定された線量は SOBP 中心で標準化された。深さは水等価深で表されている(水等価比[1.03] × ポリエチレンファントム表面からの深さ[mm])。照射位置の場所のよる ECyd の増感効果の比較のために、細胞照射を以下の 4 箇所で行った。(A)入射面から 5mm 深、(B)SOBP 中心と比較して proximal 側の物理線量が 95%の位置、(C)SOBP 中心、(D)SOBP 中心と比較して distal 側の物理線量が 95%の位置(distal edge)。

コロニー形成法

コロニー形成法は前章に示した方法で行った。照射の 1 時間前に ECyd を添加した培地でスライドフラスコ内を満たした。また、細胞の希釈には ECyd を添加した培地を用いた。照射から 23 時間後に PBS で 2 回洗浄後、ECyd を含まない培地 5 ml で培養した。コロニーを形成させる期間は A549 では 10 日間、V79 で

は 7 日間とした。生存曲線は、前章に示した直線-二次式モデルを用いてフィッティングした。

RBE_{10} と増感比(SER：sensitizing effectiveness ratio)の算出には、生存率を 10%をまでに減少させる線量である D_{10} を用いた。

53BP1 foci 形成法

照射の 1 時間前に ECyd を添加した培地でスライドフラスコ内を満たし薬剤処理を行った。その後、前章で示した方法と同様に 53BP1 foci 形成法を行った。

Senescence-associated ß-ガラクトシダーゼアッセイ

照射前日に 4.0×10^4 個の細胞をスライドフラスコに播種し、37℃、5%CO_2 条件下で一晩接着させた。照射の 1 時間前に ECyd を添加した培地、または ECyd を含まない培地でフラスコ内を満たし 37℃、5%CO_2 条件下に置いた。(C)SOBP 中心と(D)distal edge において、それぞれ 9 Gy の陽子線照射後、細胞を PBS で洗浄し 3%ホルムアルデヒドを用いて室温で 15 分固定した。PBS で 2 回洗浄後、SA-ß-Gal 染色液(1 mg/ml X-gal(20 mg/ml) / 40 mM クエン酸/リン酸ナトリウム、pH 6.0 / 5 mM フェロシアン化カリウム / 5 mM フェリシアン化カリウム / 150mM Nacl / 2 mM $MgCl_2$)を加えて 37℃で 12 時間培養し染色させた。BZ-9000(KEYENCE、大阪、日本)を用いて染色された細胞を数えた。結果を 1 サンプルにつき 200 個の細胞中の染色されている細胞の割合で示した。

線量平均 LET の計算

線量平均 LET (LET_d)は、生物学的効果の重要な指標として、RBE の計算にこれまで多くの研究に用いられている [32,49,50]。本研究では、Wilkens らが用いた以下の理論式に従って LET_d を算出した [51]。

$$LET_d = \frac{\int_0^\infty \varphi_r(x)S^2(r)dr}{\int_0^\infty \varphi_r(x)S(r)dr} \quad (3)$$

ここで、$\varphi_r(x)$はある位置 x おける陽子線の局所エネルギースペクトル、S(r)は陽子線の阻止能、r は残余飛程をそれぞれ示す。それぞれのエネルギーあるいは位置における S(r)と$\varphi_r(x)$を算出するために、Bortfeld が用いた理論式に従っ

た[52]。まず、ある単一エネルギーのペンシルビームに対するS(r)を算出するために、以下の式を用いた。使用したパラメーターは表2に示した。

$$S(r) = \frac{1}{p\alpha^{1/p}}(R_0 - r)^{1/p-1} \quad (4)$$

表 2. 陽子線阻止能の算出に使用したパラメーター

	Description	Value	Unit
p	Exponent of range-energy relation	1.77	1
α	Proportionality fantor	0.0022	cm MeV^{-p}
R_0	Range	$\alpha E^p{}_0$	cm
β	Slope parameter of fluence reduction rrelation	0.012	cm^{-1}
γ	Fraction of locally absorbed energy released in nonelastic nuclear interactions	0.6	1
σ_{mono}	Width of Gaussian range straggling	$0.012R^{0.935}{}_0$	cm

次に、$\varphi_r(x)$を算出するために以下の式を用いた。

$$\varphi(r) = \varphi_0 \frac{1+\beta(R_0-r)}{1+\beta R_0} \quad (5)$$

入射陽子線フルエンスφ_0を算出するために、ある単一エネルギーの陽子線の深部線量分布を以下の式を用いてφ_0をパラメーターとしてフィットした。

$$D(x) = \varphi_0 \frac{e^{-\zeta^2/4}\,\sigma^{1/p}\,\Gamma(1/p)}{\sqrt{2\pi}\varrho p\alpha^{1/p}(1+\beta R_0)} \times \left[\frac{1}{\sigma}\delta_{-1/p}(-\zeta) + (\frac{\beta}{p} + \gamma\beta)\delta_{-p/1-1}(-\zeta)\right] \quad (6)$$

$$\zeta = \frac{R_0 - x}{\sigma_{mono}} \quad (7)$$

ここで$\Gamma(x)$はガンマ関数を、$\delta_y(x)$はパラボリックシリンダー関数を表し、σ_{mono}は単一エネルギーの陽子線の初期エネルギーに依存する。

(6)式を用いた計算の一例として、180.4 MeVにおける結果を図10に示した。

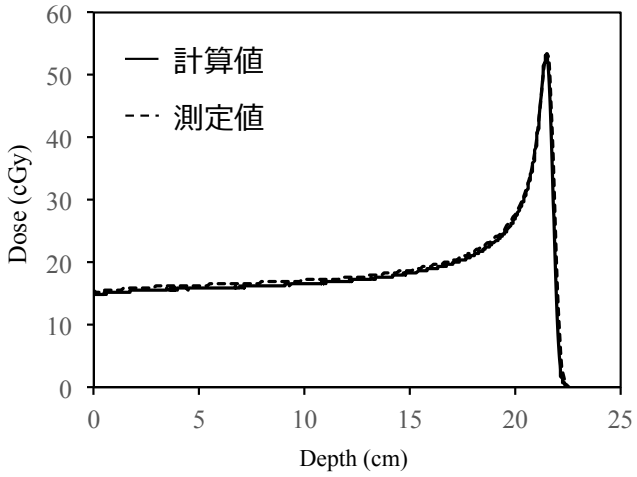


図 10. 入射エネルギーが 180.4 MeV における計算値と測定された深部線量の比較

Bortfeld が用いた理論式に従い 180.4 MeV における線量を算出し、測定値と比較した。照射に用いたそれぞれのエネルギーの理論値と測定値の比較を行った。

(3)~(7)式より、本研究で陽子線照射を行ったそれぞれの位置において LET_d を算出した。

統計解析

統計的有意差は、マンホイットニーU 検定により検定した。データは平均値±標準偏差(SD)で表示し、$p<0.05$ の時にその差が有意であると判断した。

2.3 結果

陽子線への増感効果

コロニー形成法より得られた生存曲線を図 11 に示した。A549 と V79 のどちらの細胞においても、(A)~(C)では ECyd による増感効果が観察された。(D)distal edge における生存曲線の形は ECyd の存在、非存在に関わらず直線状に近い形状となり、陽子線単独による高い細胞殺傷効果を示したが、ECyd 併用による増感効果は観察されなかった。

RBE、SER 及び生物学的パラメーター

コロニー形成法で得られた生存曲線より RBE、SER 及び生物学的パラメーターを算出した(表 3)。それぞれの位置において、ECyd 非存在下または ECyd 存在下での A549 の RBE の値は V79 よりも大きい値を示した。A549 では、(A)~(C)において D_{10} で評価した SER は 1.176～1.240 と増感効果を示したが、(D)distal edge での値は 1.077 とそれら 3 つより小さい値となり増感効果は僅かであった。同様に V79 においても、(A)~(C)では増感効果が見られたが、(D)における SER は(A)~(C)よりも小さい値となり、増感効果は示さなかった。(D) distal edge における ECyd 非存在下での RBE の値は、A549 では 1.649、V79 では 1.415 であり、(C) SOBP 中心と比較して、それぞれ 1.36 倍と 1.14 倍と上昇した。しかし、ECyd によって RBE の値は A549 では 1.776、V79 では 1.416 となり、ECyd 存在下の(C) SOBP 中心における RBE の値と比較して、それぞれ 1.17 倍と 0.97 倍となりその差は減少した。

また、増感効果が得られた(A)~(C)では ECyd によって α の値は上昇し、細胞種によらず SER_{α} は 1.5 以上となり、α/β の値も上昇した。しかし、β の値には細胞種、照射位置に依らず顕著な増感効果は見られなかった。

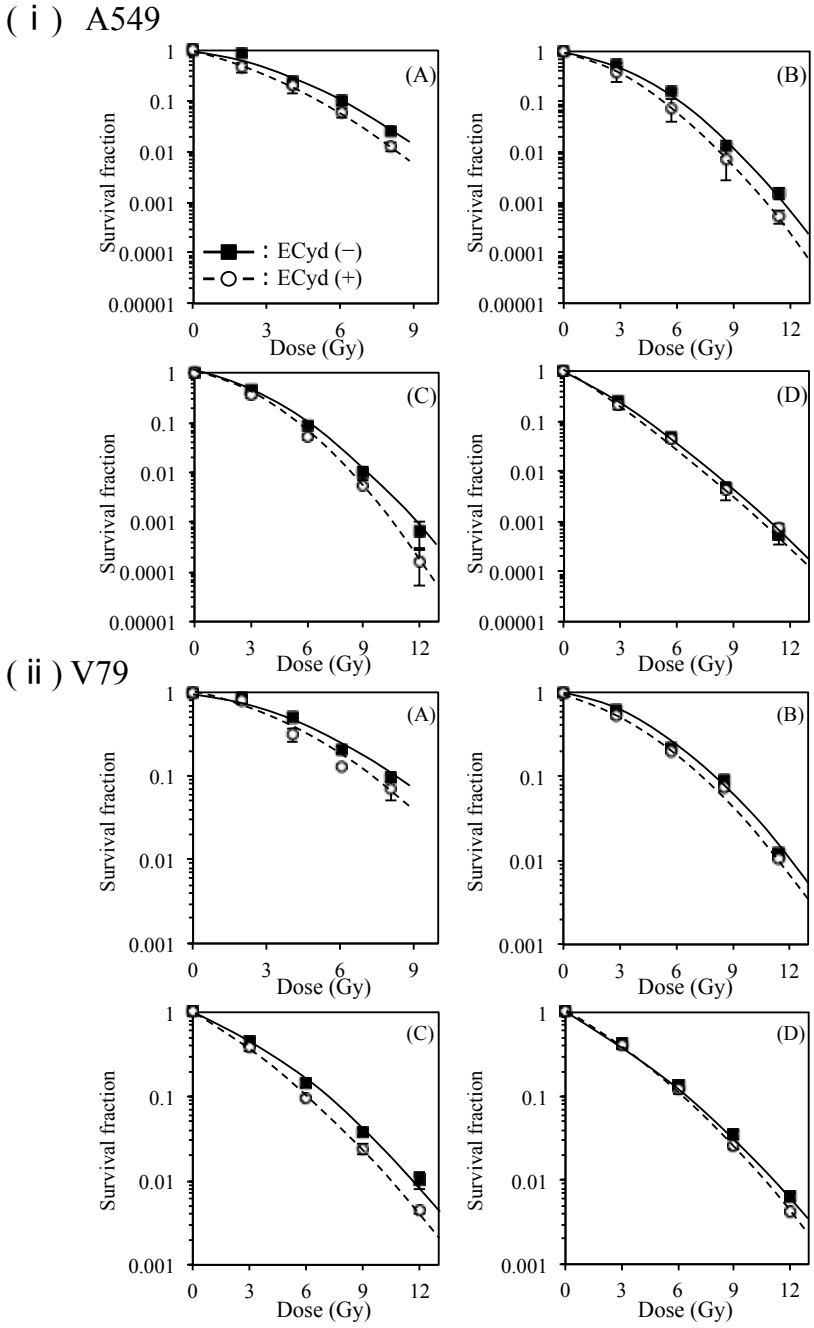


図 11. ECyd 存在下、非存在下における生存曲線

コロニー形成法で得られた結果よりそれぞれの位置(図 7 参照)において照射された陽子線単独の生存曲線(■と実線) と ECyd 存在下において陽子線照射を行って得られた生存曲線(○と点線)を示した。(i)は A549 の結果を示し、(ii)は V79 の結果を示す。ECyd の濃度は、A549 に対しては 0.1 μM、V79 に対しては 0.4 μM とし、照射前に 1 時間、照射後に 23 時間処理を行った。陽子線が照射されたそれぞれの位置における線量誤差は 0.45%未満であった。

表 3.生存曲線のパラメーター

Cell line	Positon	Depth (mm)	LET_d (keV/μm)	ECyd	α (Gy^{-1})	SER_α	β (Gy^{-2})	SER_β	α /β (Gy)	D_{10} (Gy)	SER	RBE
A549	A	5	0.857	-	0.137	-	0.038	-	3.605	6.188	-	1.177
				+	0.271	1.978	0.033	0.868	8.212	5.202	1.190	1.400
	B	165	2.847	-	0.152	-	0.038	-	4.000	6.037	-	1.207
				+	0.269	1.770	0.035	0.921	7.686	5.132	1.176	1.419
	C	190	3.695	-	0.157	-	0.038	-	4.132	5.988	-	1.216
				+	0.308	1.962	0.035	0.921	8.800	4.828	1.240	1.509
	D	220	9.457	-	0.433	-	0.020	-	21.650	4.417	-	1.649
				+	0.508	1.173	0.013	0.65	39.077	4.102	1.077	1.776
V79	A	5	0.857	-	0.081	-	0.028	-	2.893	7.737	-	1.152
				+	0.123	1.519	0.027	0.964	4.556	7.234	1.070	1.232
	B	165	2.847	-	0.088	-	0.025	-	3.520	7.997	-	1.114
				+	0.132	1.500	0.024	0.960	5.500	7.424	1.077	1.200
	C	190	3.695	-	0.198	-	0.017	-	11.647	7.190	-	1.239
				+	0.300	1.515	0.013	0.765	23.077	6.076	1.183	1.467
	D	220	9.457	-	0.262	-	0.014	-	18.714	6.518	-	1.367
				+	0.265	1.011	0.016	1.143	16.563	6.296	1.035	1.415

RBE 及び SER は生存率を 10%まで減少させる線量である D_{10} を用いて算出した。A549 における X 線での D_{10} の値は 9.8 Gy であり、V79 においては 8.91 Gy であった。

LET_d と RBE

(3)式を用いてそれぞれの照射位置における LET_d を算出した(表 2)。図 11 は、LET_d と ECyd 存在下、あるいは非存在下での RBE の関係を示す。照射位置が深くなるにつれて LET_d の値は増加した。特に(D)distal edge における LET_d は非常に大きな値を示し、(C)SOBP 中心の値と比較して 2 倍以上であった。図 11 及び表 3 で示された結果と同様に、(A)~(C)においては ECyd による増感効果が見られ、RBE の値は増加した。しかし、(D)では顕著な増感効果は得られなかった。

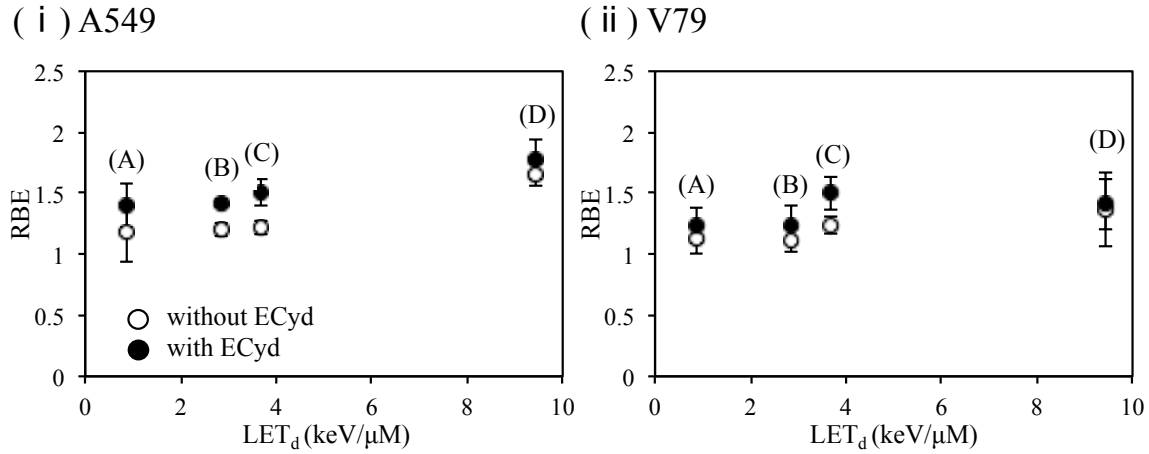


図 12. RBE と LET_d の関係

RBE は生存率を 10%まで減少させる線量である D10 を用いて算出した。(□) A549、(□)V79 の結果。○は ECyd 非存在下、●は ECyd 存在下の RBE の値を示す。

ECyd による DNA 二本鎖切断への影響

図 11 に示された様に示された様に、ECyd は位置依存的に陽子線の細胞致死効果を増強した。そこで、ECyd によるメカニズムを明らかにするために、53BP1 foci 形成法を用いて(C)SOBP 中心と(D)distal edge において DNA 二本鎖切断の数について評価を行った(図 13)。A549 と V79 の両方の細胞において、照射後 30 分で foci の数は最大となり、最大値に有意差は見られなかった。また、第 1 章の図 5 で示された様に、ECyd 非存在下において(C)SOBP 中心と(D)distal edge を比較すると、(D)distal edge において二本鎖切断の修復に遅延が見られた。

(D)distal edge では、ECyd による影響は小さく、53BP1 foci の数の減少に有意差は見られなかった。しかし、(C) SOBP 中心では、ECyd によって 53BP1 foci の数の減少に遅延が見られた。

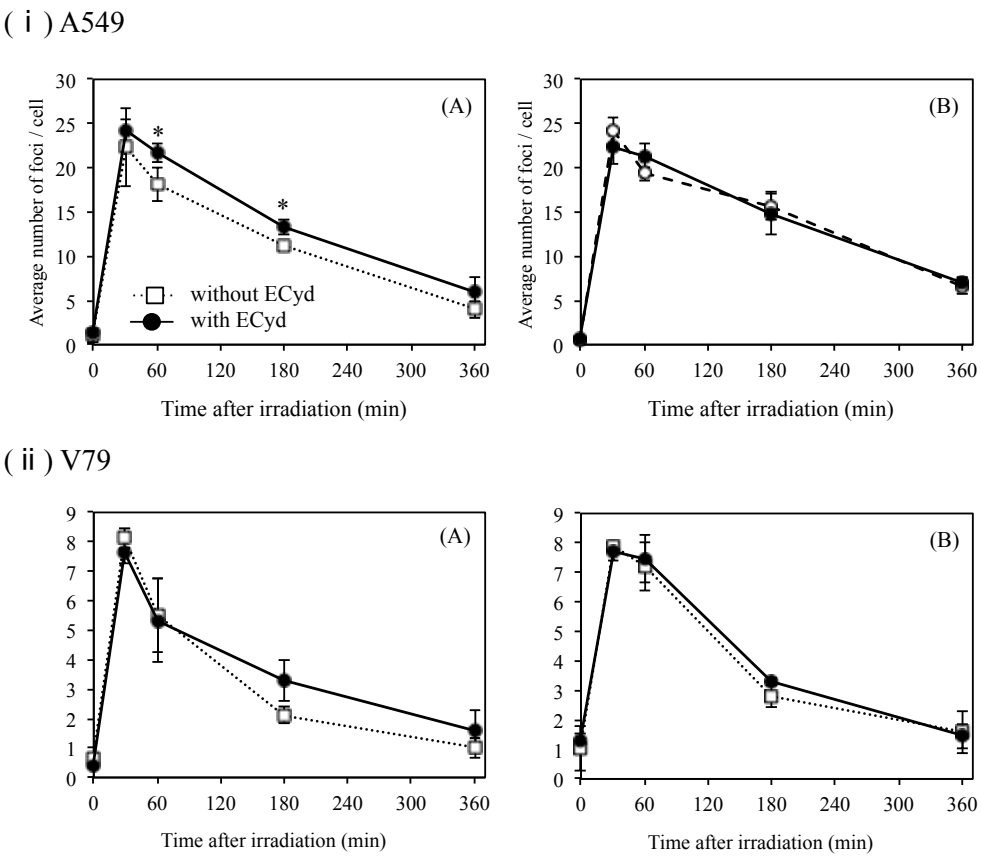


図 13. ECyd による 53BP1 foci の数の変化

(C)SOBP 中心と(D)distal edge における 53BP1 foci 形成法を用いた DNA 二本鎖切断の数の評価。(ⅰ) A549 における測定値。(A) SOBP 中心、(B) distal edge。(ⅱ) V79 における測定値。(A) SOBP 中心、(B) distal edge。ECyd 存在下(●)と ECyd 非存在下(□)。SOBP 中心と distal edge において、それぞれ 1.5Gy 照射した後、指定された時間で処理された。少なくとも 50 個の細胞を数え、foci の数を記録した。A549 及び V79 の distal edge では、ECyd 存在下と非存在下において有意差は生じなかった。データは平均値±S.D.で示されており、それぞれ 3 回の実験を行った。統計的有意差は*:$p < 0.05$ で示した。

ECyd による細胞老化への影響

図 11 で示したコロニー形成法の結果より、ECyd は陽子線による増殖死を増強した。放射線や酸化ストレスによる細胞死の様式として、アポトーシス、ネクローシス、分裂期崩壊、オートファジー、老化細胞様が挙げられる。そこで、本研究では ECyd による増感効果に細胞老化による細胞致死が関与するかを評価するために、A549 において SA-β-ガラクトシダーゼアッセイを行った(図 14)。(C) SOBP 中心では、ECyd によって照射後 48 時間後より老化細胞の割合が優位に増加した。特に照射後 96 時間では、ECyd 非存在下と比べて ECyd 存在下での老化細胞の割合は約 1.3 倍となった。しかし、(D) distal edge では、ECyd による影響は小さく有意差は見られなかった。

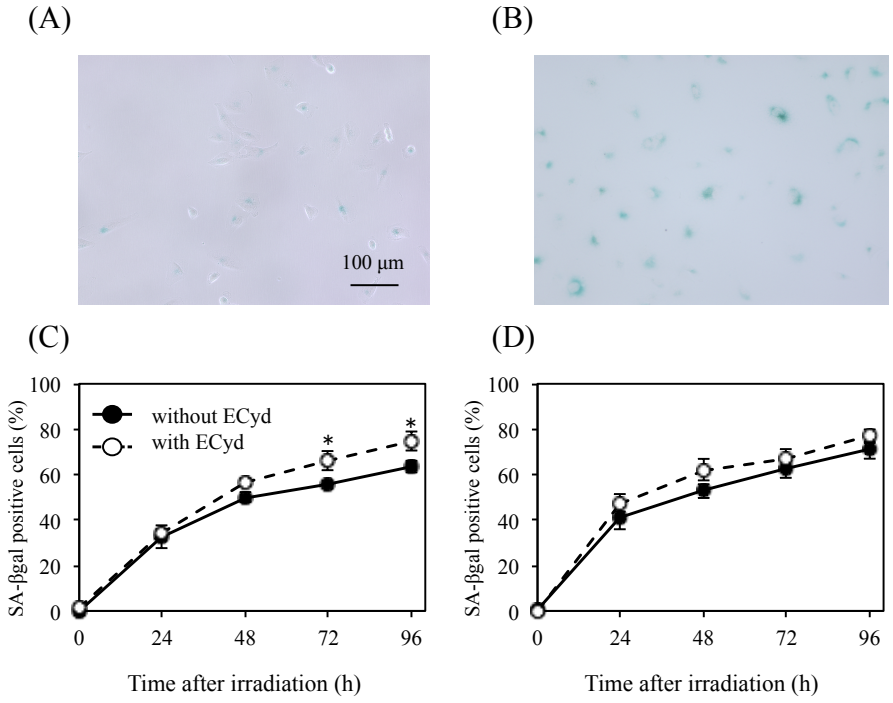


図 14. A549 における ECyd による老化細胞の割合の変化

(A,B) SOBP 中心において SA-β-ガラクトシダーゼ陽性の A549 細胞。(A)ECyd 非存在下における照射 24 時間後の画像。(B) ECyd 非存在下における照射 96 時間後の画像。 (C, D)老化細胞の割合の評価。9 Gy 照射後、細胞はそれぞれの時間で処理された。少なくとも 200 個の細胞が数えられ、染色されている細胞を記録した。データは平均値±S.D.で示されており、それぞれ 3 回の実験を行った。(C)SOBP 中心。(D)distal edge。統計的有意差は*:$p < 0.05$ で示した。

2.4 考察

本研究では、図 11 及び表 3 において示した様に ECyd は陽子線 SOBP において、位置依存的に増感効果を示し、(D)distal edge における増感効果は(A)～(C)と比較して小さくなった。照射位置と LET_d を関係づけたのが図 12 である。(D)distal edge での LET_d は、(A)~(C)と比較して 2 倍以上の値となったが、ECyd による増感効果は非常に小さくなった。よって、ECyd による陽子線に対する増感効果は LET に依存する事が示唆された。

また、表 2 より ECyd は、Meike らの X 線における報告と同様に [48]、(A)~(C)の位置において β の値ではなく α の値を増強した事がわかる。一般的に、LET が高い領域では 1 本の放射線による二本鎖切断の割合が大きくなるために、α の値が大きくなる事が知られている [53]。本研究では、ECyd による増感効果は LET の低い領域の方が α の値に依存した。しかしながら、図 13 の照射直後の二本鎖切断の指標である 53BP1 には ECyd による影響はなかった。

さらに図 13 に置いて示された様に、(C)SOBP 中心では ECyd によって DNA 二本鎖切断の修復に遅延が見られたが、(D)distal edge では ECyd による影響は観察されなかった。Meike らは、X 線照射後の Western blotting による解析から ECyd は Rad51 の様な二本鎖切断の修復に関するタンパク質を阻害すると報告している [48]。これらの結果より、(C)SOBP 中心において ECyd は二本鎖切断の数及びダメージの質に影響を与えるのではなく、DNA の修復を阻害する事で増感効果を示したと考えられる。

また、図 14 より(C)SOBP 中心では ECyd によって老化細胞の割合は有意に増加した。一方で、(D)distal edge では変化が見られなかった。これは、(C)SOBP 中心で見られる様な ECyd による細胞致死の増強作用には、老化細胞の増加が一部関与している事を示唆している。これまでに、X 線において ECyd は放射線誘発アポトーシスを増強する事が報告されているが [54]、本研究の実験系では ECyd によるアポトーシスに有意な増加は得られなかった。一般的に、電離放射線は様々なシグナル伝達経路を活性化する。よって、細胞が細胞死としてアポトーシス、分裂期崩壊、オートファジー、老化を決定する反応と調整機構についてまだ完全には解明されてはいない。現段階では、X 線と陽子線の細胞の死に方の違いについて、放射線の線質あるいは細胞種の違いに起因すると説明する事が出来るかもしれないが、細胞死のシグナル経路の選別のメカニズムの解明についてさらなる研究が必要である。

図 11 と表 3 に示された様に、ECyd は A549 と V79 において(D) distal edge と SOBP 内の他の位置((B)と(C))の RBE の差を小さくし、結果として SOBP の RBE を平坦化した。そこで、臨床への影響を検討するために、それぞれの照射位置における RBE を用いて生物線量を算出した(図 15)。ECyd は SOBP 中の(B)と(C)の位置における生物線量を優位に増加させたが、(D)の位置ではほとんど影響を与えなかった。その結果、SOBP 内の生物線量の差は減少した。一般的に臨床において、陽子線の治療計画の際には RBE の値には 1.1 を用いられており、LET に依存的な SOBP 内の RBE の不均一性については考慮されていない場合が多い。それゆえ、distal 領域においては、実際には SOBP の治療計画時の処方線量よりも高い生物線量が照射され、予期せぬ副作用が引き起こされる可能性がある。ECyd と陽子線の併用療法は、この RBE の不均一性に対する有効な解決策の一つになるかもしれない。また、(D)より後方の領域では LET はさらに高くなるので、増感効果はより小さくなると予想される。これにより、SOBP 内の生物線量はより平坦化するので、炭素線などの様に SOBP 後方にテールを持たない陽子線の物理線量特性を生かしつつ、より良い生物線量分布を持った陽子線増感治療が期待される。

α/β の値もまた、臨床に置いて重要な指標の一つである。A549 における α/β の値は、ECyd によって(a)~(d)において約 2 倍程度、V79 では(a)~(c)において ECyd により α/β の値が約 2 倍程度まで増加した。臨床で行われている分割照射は、腫瘍と正常組織の α/β の値の違いを利用している。ECyd は腫瘍内で UCK によってリン酸下され優先的に蓄積する [40,44,45]。よって、腫瘍の α/β の値が ECyd によって上昇し、通常の分割照射よりもさらに大きい治療効果が期待される。

本研究の欠点は、2 種類の細胞だけを用いて、4 箇所の ECyd による増感効果について評価した点である。今後は、他の細胞種を用いた評価及び、SOBP のその他の場所についても評価しなければならない。これまでに光子線においては、*in vitro* のみならず *in vivo* においても ECyd の増感効果に関する研究が行われている。本研究では *in vitro* のみによる評価だけであり、陽子線においても *in vivo* における評価が必要である。また、本研究では、制がん剤として用いた薬剤は ECyd の 1 種類のみだけであった。これまでに、増感効果があると報告されているシスプラチンやその他の制がん剤に関する増感効果を評価する必要があり、また、陽子線だけでなく他の粒子線に対する ECyd の増感効果の評価及び比較が重要である。本研究で照射に用いた SOBP は 1 条件のみであった。今後、SOBP 幅

や照射野、エネルギーレンジの条件を変化させての検討が必要である。さらに、臨床での応用を目指し、ECyd の濃度や処理時間等の検討も今後必要であると考えられる。

今日、粒子線に対して効果的に増感効果を示す要因については、未だあまり知られてはいない[55]。本研究では、ECyd は陽子線に対して LET 依存的に増感作用を持ち、SOBP 内の生物線量の差を小さくする事を示した。本研究は、陽子線増感治療に向けては基礎段階ではあるが、今後の粒子線に対する増感効果の研究に対して非常に重要な研究であると考えられる。

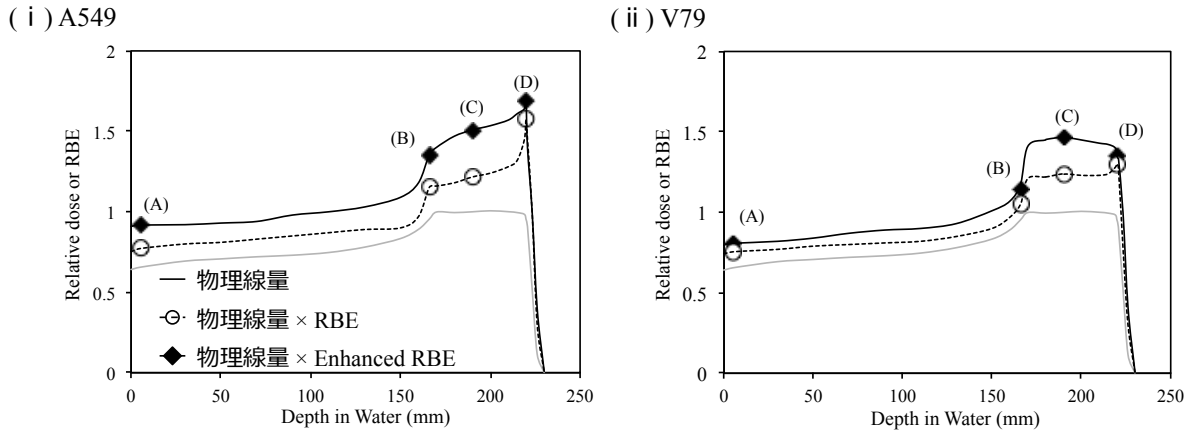


図 15. ECyd による RBE 及び生物線量分布の変化

相対物理線量分布（灰色の実線)、ECyd 非存在下でのそれぞれの照射位置における RBE10 × 物理線量(◯と点線)、 ECyd 存在下でのそれぞれの照射位置における RBE10 × 物理線量（◆と実線）を示した。 物理線量は SOBP 中心で標準化された。(ⅰ)は A549、(ⅱ)は V79 における結果をそれぞれ示す。

2.5 総括及び結論

①本研究全体から得られた新知見について

・陽子線スポットスキャニング照射方式においても従来の散乱法と同様に RBE の値は SOBP の終端で上昇した。

・RBE 上昇の原因の一つとして、DNA クラスター損傷の様な修復し難い DNA 損傷が関与していた。

・ECyd は陽子線による細胞致死効果を増強した。

・ECyd による増感効果は SOBP 内で位置（LET）依存的であり、SOBP の distal edge ではほとんど増感効果は観察されなかった。

・SOBP 中心で見られた様な増感効果のメカニズムとして、ECyd による DNA 二本鎖切断の修復阻害が関与していた。

②新知見の意義について

陽子線治療は、従来の X 線治療と比較して優れた物理線量分布を持つ事が知られている。現在の臨床において陽子線スポットスキャニング照射の治療計画を行う際には、全ての位置において RBE を 1.1 として計算を行っている。しかし、RBE を 1.1 と固定して治療計画を行うと、SOBP の終端に放射線感受性組織がある場合には、計画線量以上の線量が照射される可能性が強く示唆された。また、この RBE の上昇を引き起こす要因の一つとして、SOBP の終端において、修復し難い DNA 損傷が増加している事が明らかにされた。

ECyd は SOBP 内で位置依存的に陽子線の細胞致死効果を増強した。これにより、SOBP 内の RBE の差は小さくなり、ECyd 存在下では SOBP の生物学的線量はより平坦化する事が明らかとなった。SOBP 内の RBE の不均一性の解決法の一つの方法として、ECyd との併用は有効である事が示された。また、陽子線に対する有効な増感剤の報告はこれまでに無い。しかし、本研究成果は、ECyd が陽子線に対して効果的な増感剤の一つであると期待出来るものである。

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

本研究で RBE 測定に用いた細胞は、V79 の一種類のみであった。しかし、がん細胞や正常組織毎に放射線感受性は異なる。よって、様々な細胞種を用いた RBE 測定を行い、得られた結果を反映させた治療計画機の開発が考えられる。また、ECyd の臨床応用を目指し、処理時間や処理濃度の条件を変え毒性の評価を

行っていく事が必要であり、*in vivo* において ECyd の投与方法及び増感効果を評価が今後の展開として考えられる。また、現在行われている化学療法も陽子線 RBE へ影響を与える恐れがあり、その影響に関する評価も今後の研究として考えられる。

④今後の課題

・RBE 測定

本研究では陽子線の distal 方向の RBE を精査した。しかし、SOBP の横方向においても線量勾配が急峻な領域が存在し、RBE の測定が必要である。また、臨床治療により正確な RBE 値を還元するために *in vivo* における RBE 測定も必要である。本研究では SOBP の条件は一つであった。今後は SOBP のサイズやエネルギーを変えた測定が必要であり、強度変調陽子線治療の様な複雑な照射野における測定も必要である。

・ECyd の増感効果の評価

本研究では、ECyd の増感効果に用いた細胞種は 2 種類だけであり、今後、様々な細胞種を用いて毒性、増感効果について評価していく必要がある。また、*in vivo* での増感効果についても評価しなければならない。本研究で用いた ECyd は、陽子線による DNA 二本鎖切断の修復を阻害し増感効果を示した。本薬剤以外にも DNA 修復阻害の働きを持つ制がん剤はあり、今後、陽子線のさらなる治療効果の上昇に向けて他の制がん剤による増感効果の評価が必要である。

謝辞

本研究の機会を与えて下さり、また、本論文作成にあたり多大なご指導を賜りました、北海道大学大学院医学研究科放射線医学分野　白土博樹教授に深く御礼申し上げます。

本研究のデータ解析及び論文作成にあたり、多大な助言を頂き、常日頃より熱心なご指導を頂いた、北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室　稲波　修教授、山盛　徹准教授、安井　博宣助教に心より感謝いたします。

常日頃よりご指導を頂いた、北海道大学保健科学研究院　石川　正純教授に深く御礼申し上げます。

論文作成にあたり多大な助言を頂いた、北海道大学工学院　松浦妙子特任准教授に心より感謝いたします。

日頃から研究技法や論文作成に関する助言を与えてくださいました、北海道大学大学院獣医学研究科　放射線学教室、北海道大学大学院医学研究科先端医学講座　分子追跡医学分野、放射線医学分野ならびに北海道大学病院陽子線治療センターの皆様に心より感謝申し上げます。

引用

1 Zelefsky, M. J. *et al.* Clinical experience with intensity modulated radiation therapy (IMRT) in prostate cancer. *Radiother. Oncol.* **55**, 241-249 (2000).

2 Droge, L. H. *et al.* Reduced toxicity in the treatment of locally advanced rectal cancer: a comparison of volumetric modulated arc therapy and 3D conformal radiotherapy. *BMC Cancer.* **15**, 750, (2015).

3 Ratko, T. A. *et al. Radiotherapy Treatments for Head and Neck Cancer Update AHRQ Comparative Effectiveness Reviews.* (2014).

4 van de Water, T. A. *et al.* The potential benefit of radiotherapy with protons in head and neck cancer with respect to normal tissue sparing: a systematic review of literature. *Oncologist.* **16**, 366-377 (2011).

5 Pedroni, E. *et al.* The 200-MeV proton therapy project at the Paul Scherrer Institute: conceptual design and practical realization. *Med. Phys.* **22**, 37-53 (1995).

6 Gillin, M. T. *et al.* Commissioning of the discrete spot scanning proton beam delivery system at the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Proton Therapy Center, Houston. *Med. Phys.* **37**, 154-163 (2010).

7 Shimizu, S. *et al.* A proton beam therapy system dedicated to spot-scanning increases accuracy with moving tumors by real-time imaging and gating and reduces equipment size. *PLoS One* **9**, e94971 (2014).

8 Schneider, U., Agosteo, S., Pedroni, E. & Besserer, J. Secondary neutron dose during proton therapy using spot scanning. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **53**, 244-251 (2002).

9 Gerweck, L. E. & Kozin, S. V. Relative biological effectiveness of proton beams in clinical therapy. *Radiother. Oncol.* **50**, 135-142 (1999).

10 Aoki-Nakano, M. *et al.* Relative biological effectiveness of therapeutic proton beams for HSG cells at Japanese proton therapy facilities. *J.*

Radiat. Res. **55**, 812-815 (2014).

11 Matsumoto, Y. *et al.* Enhanced radiobiological effects at the distal end of a clinical proton beam: in vitro study. *J. Radiat. Res.* **55**, 816-822 (2014).

12 Wouters, B. G. *et al.* Radiobiological intercomparison of the 160 MeV and 230 MeV proton therapy beams at the Harvard Cyclotron Laboratory and at Massachusetts General Hospital. *Radiat. Res.* **183**, 174-187 (2015).

13 Tilly, N. *et al.* The influence of RBE variations in a clinical proton treatment plan for a hypopharynx cancer. *Phys. Med. Biol.* **50**, 2765-2777. (2005).

14 Jones, B., Underwood, T. S. & Dale, R. G. The potential impact of relative biological effectiveness uncertainty on charged particle treatment prescriptions. *Br. J. Radiol.* **84 Spec No 1**, S61-69 (2011).

15 Gensheimer, M. F. *et al.* In vivo proton beam range verification using spine MRI changes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **78**, 268-275 (2010).

16 Baek, H. J. *et al.* Radiobiological characterization of proton beam at the National Cancer Center in Korea. *J Radiat Res* **49**, 509-515 (2008).

17 Paganetti, H. *et al.* Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **53**, 407-421 (2002).

18 Paganetti, H. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. Variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer. *Phys. Med. Biol.* **59**, R419-472 (2014).

19 Paganetti, H. & Schmitz, T. The influence of the beam modulation technique on dose and RBE in proton radiation therapy. *Phys. Med. Biol.* **41**, 1649-1663 (1996).

20 Gueulette, J. *et al.* Relative biologic effectiveness determination in mouse intestine for scanning proton beam at Paul Scherrer Institute, Switzerland. Influence of motion. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**, 838-845 (2005).

21 Wouters, B. G. *et al.* Measurements of relative biological effectiveness of the 70 MeV proton beam at TRIUMF using Chinese hamster V79 cells and the high-precision cell sorter assay. *Radiat. Res.* **146**, 159-170 (1996).

22 Belli, M. *et al.* RBE-LET relationships for cell inactivation and mutation induced by low energy protons in V79 cells: further results at the LNL facility. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 501-509 (1998).

23 Robertson, J. B. *et al.* Relative biological effectiveness and microdosimetry of a mixed energy field of protons up to 200 MeV. *Adv. Space. Res.* **14**, 271-275 (1994).

24 Britten, R. A. *et al.* Variations in the RBE for cell killing along the depth-dose profile of a modulated proton therapy beam. *Radiat. Res.* **179** (2013).

25 Scholz, M. & Kraft, G. Track structure and the calculation of biological effects of heavy charged particles. *Adv. Space Res.* **18**, 5-14 (1996).

26 Friedrich, T., Durante, M. & Scholz, M. Simulation of DSB yield for high LET radiation. *Radiat. Prot. Dosimetry* **166**, 61-65 (2015).

27 Ballarini, F. *et al.* The role of DNA cluster damage and chromosome aberrations in radiation-induced cell killing: a theoretical approach. *Radiat. Prot. Dosimetry* **166**, 75-79 (2015).

28 Chaudhary, P. *et al.* Relative biological effectiveness variation along monoenergetic and modulated Bragg peaks of a 62-MeV therapeutic proton beam: a preclinical assessment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **90**, 27-35 (2014).

29 Ward, J. F. Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals. *Radiat. Res.* **86**, 185-195 (1981).

30 Goodhead, D. T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 7-17 (1994).

31 Shikazono, N., Pearson, C., O'Neill, P. & Thacker, J. The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of

clustered DNA base damage. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3722-3730 (2006).

32 Wilkens, J. J. & Oelfke, U. A phenomenological model for the relative biological effectiveness in therapeutic proton beams. *Phys. Med. Biol.* **49**, 2811-2825 (2004).

33 Sethi, R. V. *et al.* Patterns of failure after proton therapy in medulloblastoma; linear energy transfer distributions and relative biological effectiveness associations for relapses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 655-663 (2014).

34 Jones, B. The case for particle therapy. *Br. J. Radiol.* **79**, 24-31 (2006).

35 Wilkens, J. J. & Oelfke, U. Optimization of radiobiological effects in intensity modulated proton therapy. *Med. Phys.* **32**, 455-465 (2005).

36 Takayama, K. *et al.* Treatment results of alternating chemoradiotherapy followed by proton beam therapy boost combined with intra-arterial infusion chemotherapy for stage III-IVB tongue cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 659-667 (2016).

37 Oshiro, Y. *et al.* High-dose concurrent chemo-proton therapy for Stage III NSCLC: preliminary results of a Phase II study. *J. Radiat. Res.* **55**, 959-965 (2014).

38 Polf, J. C. *et al.* Enhanced relative biological effectiveness of proton radiotherapy in tumor cells with internalized gold nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **98** (2011).

39 Liu, C. J. *et al.* Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys. Med. Biol.* **55**, 931-945 (2010).

40 Matsuda, A. & Sasaki, T. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Sci.* **95**, 105-111 (2004).

41 Hattori, H. *et al.* Nucleosides and nucleotides. 158. 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)uracil, and their nucleobase analogues as new potential multifunctional antitumor nucleosides with a broad spectrum of activity. *J. Med. Chem.* **39**, 5005-5011 (1996).

42 Shimamoto, Y. *et al.* Sensitivity of human cancer cells to the new anticancer ribo-nucleoside TAS-106 is correlated with expression of

uridine-cytidine kinase 2. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 825-833 (2002).

43 Matsuda, A., Fukushima, M., Wataya, Y. & Sasaki, T. A new antitumor nucleoside, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), is a potent inhibitor of RNA synthesis. *Nucleosides Nucleotides.* **18**, 811-814 (1999).

44 Maehara, Y. *et al.* Activities of various enzymes of pyrimidine nucleotide and DNA syntheses in normal and neoplastic human tissues. *Gan.* **73**, 289-298 (1982).

45 Koizumi, K. *et al.* Cloning and expression of uridine/cytidine kinase cDNA from human fibrosarcoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **8**, 273-278 (2001).

46 Yasui, H. *et al.* Treatment combining X-irradiation and a ribonucleoside anticancer drug, TAS106, effectively suppresses the growth of tumor cells transplanted in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68**, 218-228 (2007).

47 Yasui, H. *et al.* Inhibition of HIF-1alpha by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* **99**, 1442-1452 (2008).

48 Meike, S. *et al.* A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (TAS106), sensitizes cells to radiation by suppressing BRCA2 expression. *Mol. Cancer* **10**, 92 (2011).

49 Kantemiris, I., Karaiskos, P., Papagiannis, P. & Angelopoulos, A. Dose and dose averaged LET comparison of 1H, 4He, 6Li, 8Be, 10B, 12C, 14N, and 16O ion beams forming a spread-out Bragg peak. *Med. Phys.* **38**, 6585-6591 (2011).

50 Belli, M. *et al.* Effectiveness of monoenergetic and spread-out bragg peak carbon-ions for inactivation of various normal and tumour human cell lines. *J. Radiat. Res.* **49**, 597-607 (2008).

51 Wilkens, J. J. & Oelfke, U. Analytical linear energy transfer calculations for proton therapy. *Med. Phys.* **30**, 806-815 (2003).

52 Bortfeld, T. An analytical approximation of the Bragg curve for

therapeutic proton beams. *Med. Phys.* **24**, 2024-2033 (1997).

53 Tracy, B. L., Stevens, D. L., Goodhead, D. T. & Hill, M. A. Variation in RBE for Survival of V79-4 Cells as a Function of Alpha-Particle (Helium Ion) Energy. *Radiat. Res.* **184** (2015).

54 Iizuka, D. *et al.* X irradiation induces the proapoptotic state independent of the loss of clonogenic ability in Chinese hamster V79 cells. *Radiat. Res.* **164**, 36-44 (2005).

55 Hirai, T. *et al.* Radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high liner energy transfer radiation. *Cancer Sci.* **103**, 1045-1050 (2012).