

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	放射線によるがん治療の効果の向上を目指した放射性感受性因子の日内変動解析
作成者（著者）	足助, 一真
公開者	東邦大学
発行日	2024.03
掲載情報	東邦大学大学院理学研究科修士論文令和5年度.
資料種別	学位論文
内容記述	学位取得年月: 2024年3月 / 指導教員: 藤崎真吾
著者版フラグ	author
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28224495

2023 年度 修士論文

放射線によるがん治療の効果の向上を目指した

放射性感受性因子の日内変動解析

東邦大学大学院理学研究科生物分子科学専攻
分子生物学部門

6322001 足助一真

学内指導教員
藤崎 真吾

外研先指導教官
国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子医学部門
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
下川 卓志

【目次】

第1章 放射線がん治療効果の日内変動解析の検証	
諸論	2
材料・方法	4
結果	7
考察	12
第2章 放射線感受性因子の日内変動および放射線がん治療効果との相関性	
諸論	13
材料・方法	15
結果	21
考察	32
第3章 抗腫瘍免疫の日内変動および放射線がん治療効果との相関性	
諸論	34
材料・方法	16
結果	39
考察	47
総括	48
謝辞	49
業績	50
参考文献	53

第 1 章 放射線がん治療効果の日内変動解析の検証

【諸論】

1981 年以降、日本における死因の第 1 位は、がん(悪性新生物、腫瘍)である。がんによる死亡する人の割合は年々上昇しており、2019 年では、全ての死因の 27.3%を占める 37 万 6392 人まで増加している。そのため、がん治療やがん研究の発展は重要である(1)。

がんの主な治療法には、「外科療法」「化学療法」「放射線療法」「免疫療法」の 4 つがある。外科療法は、直接患部を取り除くため早期がんには効果的であるが、臓器を大きく切り取った際にその機能が失われる恐れがある。化学療法は、がんの増殖の抑制や転移・再発の制御し、全身のがんに効果的であるが、がん細胞だけでなく正常組織にもダメージを与えてしまうことで、倦怠感や吐き気、脱毛といった副作用の恐れがある。放射線療法は、患部に放射線を照射することでがんを死滅させるため、体を傷つけることなく治療できる(2)。そのため、低侵襲性である放射線療法は、通院での治療も可能である。

放射線を患部に照射するには、2 つの方法がある。外部照射は、体外から高エネルギー線を腫瘍部位に照射する方法であり、体の様々ながんにも用いられる(3)。内部照射は、放射性線源をカテーテル等に封入して体内から腫瘍部位に直接照射する方法であり、体の表面付近のがんにも用いられる(3)。

放射線治療には電離放射線が用いられ、その中でも X 線や γ 線などの光子線がよく用いられている。加速器によって得られた電離放射線が生体を通過する際に、組織の細胞に蓄積される。この沈着したエネルギーが細胞の DNA に損傷を与えることによって細胞死を引き起こしている。さらに光子線だけでなく、加速したイオン粒子を用いた治療も行われている。陽子線や重粒子線などの荷電粒子線は、加速した粒子が止まる直前の深さにおいて吸収線量が極大となる特性を有しており、腫瘍部位にのみより高い線量で照射することが可能になった(3)。特に重粒子線は、電子線や陽子線よりも高い生物学的効果と低酸素環境での増感効果を持つことから、放射線抵抗性の低いがんや体の深部にあるがんに対しても有効であり、正常組織への影響をさらに軽減させることが可能になる(3)。

重粒子線がん治療は、1994 年に日本の量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所が世界初の重粒子線がん治療装置 HIMAC(Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba)を用いて実運用に成功した技術である。この技術により重粒子線がん治療研究が大きく進歩し、難治がんを含む様々ながん治療に対する保険適用が認められた。さらに、治療普及のための装置の小型化や新たな照射法(呼吸同期 3 次元ビームスキヤニング照射法)開発を進めてきた(4)。現在では、

日本国内に 7 箇所の重粒子線がん治療装置が稼働し、約 4 万人が治療を受けており、重粒子線がん治療装置の小型・高性能化やがん以外の疾患の治療に向けた研究が行われている。

このように重粒子線がん治療は、放射線がん治療の向上に重要な役割を果たすことが期待できる。我々の研究室では、担がんマウスモデルを用いた炭素イオン線照射によるがん治療の生物学的基礎研究を行い、重粒子治療の成績向上に貢献してきた。炭素イオンは、陽子の 12 倍の質量を持っており、重粒子線として治療で用いられている。ところが、照射時刻によって炭素イオン線がん治療効果が異なることがマウスを用いた複数の実験結果から明らかになった。我々以外の放射線がん治療の研究においても変動が確認されているが、相反する結果が報告されている(5)(6)。そのため、重粒子線治療の成績向上のために明らかにすべき重要な課題であると考え、本研究では、重粒子線がん治療と X 線がん治療の照射時刻による治療効果の変動について検証を行い、治療効果の高い時刻を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

1.細胞培養

A) 調整培地(DMEM)

- DMEM (ダルベッコ変法イーグル培地)
(ナカライテスク、08459-64)
- ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum;FBS)
(Gibco、10270-106)
- Penicillin-Streptomycin 溶液
(ナカライテスク、09367-34)
- 100 mM ピルビン酸ナトリウム溶液
(ナカライテスク、06977-34)

B) 6 cm 細胞培養用ディッシュ

(FALCON、353002)

C) D-PBS (ダルベッコりん酸緩衝生理食塩水)

(ナカライテスク、14249-95)

D) Trypsin-EDTA 溶液

(ナカライテスク、35554-64)

マウス由来扁平上皮細胞株 SCCVII、調整培地 DMEM(High Glucose, FBS 10%,抗生物質 1%含有)を用い、37℃, 5%CO₂環境条件のインキュベーター下にて培養した。細胞の継代方法は以下の通りである。

• 細胞の利用、保存

細胞保存液中で-90℃で凍結保存された細胞保存液 1 ml 中に細胞 1×10⁶ 個入ったチューブに 37℃に温めておいた培地を加え、解凍させながら、調整培地が 10 ml 入った 15 ml チューブに細胞が含まれた細胞保存液 1 ml を加えた。その後、遠心分離(100 × g, 5 min)を行い、上清をアスピレーターで吸引除去した。再び調整培地を 10 ml 加え、チューブの底をタップして細胞を調整培地と混和させた。6 cm ディッシュを 2 枚用意し、5 ml ずつ加え、インキュベーターにて培養を行った。

• 継代

2~3 日前に細胞を撒いたディッシュをインキュベーターから取り出し、細胞の状態を光学顕微鏡で確認する。正常な増殖が確認できたら、培養皿から調整培地をアスピレーターで吸引除去する。D-PBS(-)で洗浄を行い、アスピレーターで吸引除去することで、死んだ細胞や調整培地等を洗い流した。その後、

Trypsin-EDTA を全体に広がるように加え、インキュベーターで 5~10 分間静置した。その後、インキュベーターから培養皿を取り出し、細胞が培養皿から剥がれたことを電子顕微鏡で確認した。確認後、調整培地を加えて、ピペッティングを行い、細胞を培養皿から完全に剥がした。そして、予め用意しておいた調整培地が入った新たな培養皿に 5~10 倍希釈(次の培養までの日数による)になるように加えた。これを上下左右に揺り動かすことで攪拌し、培養皿内の細胞の分布を均一にした。これを 80%コンフルエントになるまで培養した。

2. マウス飼育

A) マウス

・ C3H/He

(日本 SLC)

B) 飼料

(MB-1 フナバシファーム)

C) 水(酸性化水)

6 週齢のメスの C3H/He マウスを日本 SLC 社から購入し、飼育は 1 ケージあたり 3~6 匹で行った。量子科学技術研究開発機構 千葉地区、実験動物棟飼育室内(7 時点灯、19 時消灯、温度: 23 ± 3 °C、湿度: 50 ± 20 %、飼育環境 CV(コンベンショナル))で飼料と水は自由に摂取できる状態で飼育した。マウスは実験開始の 1 週間前に購入し、環境に順応させてから実験を行った。行ったすべての動物実験は同地区の動物実験委員会の承認を得て行い、同地区のガイドラインに基づき実験した。

3. マウスへのがん細胞移植

6 cm ディッシュ上で 80 %コンフルエントになった細胞を D-PBS(-)で洗浄後、トリプシン-EDTA を用いて細胞をはがした。トリプシンの 10 倍量の調整培地を加えてトリプシンを不活化させ、ピペッティングし細胞をチューブに回収した。細胞は、電子顕微鏡と血球計算盤を用いて計測し、遠心分離($100 \times g$; 5 min)を行い、アスピレーターにより培地を除去した。HBSS にて細胞を 1×10^6 個/ $10 \mu\text{l}$ になるように希釈した後、マウスの右下肢皮下にマイクロシリンジで $10 \mu\text{l}$ ずつ移植した。移植は、マウスを購入してから約 1 週間後に行った。

4.重粒子線照射

A)重粒子線がん治療装置

(HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba)、量研機構千葉地区)

照射は、マウスに SCCVII を移植して 7 日後の 4 時・16 時に行った。マウスをアイオナール 250ul (5mg/ml、生理食塩水で希釈) の腹腔内投与により、鎮静化させた。その後、1 枚の照射板にマウスの右足以外が照射野に入らないように注意しながら 3 匹ずつ固定した。その後、炭素イオン線 (エネルギー 290 MeV/n, LET 13 keV/μm, Φ10 cm MONO (Mono-energetic) ビーム) をマウスの右足に照射した。照射は室温下で行った。

5.X 線照射

A)高出力 X 線発生装置

(TITAN-320、島津製作所)

照射は、マウスに SCCVII を移植して 7 日後の 3 時・9 時・15 時・21 時に行った。照射 AE-1321M 型モニタ線量計を用いて、最大管電圧 200 kV、管電流 20 mA の X 線の線量率を測定し、線量ごとに照射時間を設定した。また、低エネルギー成分は負荷フィルターの 0.5 mm Al + 0.5 mm Cu を用いて遮蔽した。SCCVII を移植して 7 日後のマウスをアイオナール 250 μl の腹腔内投与により鎮静させた。その後、1 枚の照射板に 3 匹ずつ固定し、マウスの右足以外が照射野に入らないように鉛板で遮蔽した。その後、X 線をマウスの右足に照射した。照射は室温下で行った。

6.腫瘍径測定

マウスに SCCVII 細胞を移植後、1 週間後から測定を行った。測定は、約 1 ヶ月間または腫瘍の 1 辺の長さが 15 mm を超えるまで行った。腫瘍サイズは、ノギスを用いて高さ、幅、長さを測定し、以下の計算式を用いて体積を求めた。

$$\text{体積} = (\text{高さ}) \times (\text{幅}) \times (\text{長さ}) \times \pi/6$$

【結果】

照射時刻による炭素イオン線・X線がん治療効果の日内変動

放射線の照射時刻によって腫瘍体積に変動が生じるのかを調べるため、担がんマウスを用いて照射実験を行った。今回の実験では、免疫浸潤性が高ことで知られる SCCVII細胞を用いた。SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍に対し、炭素イオン線では移植7日後の4時または14時に1,3,6,9,10,12Gy照射し、X線では移植7日後の3時・9時・15時・21時に3,6Gy照射した。その後、ともに照射日を0日目として、腫瘍径の測定を行った。炭素イオン線について、照射7日後では、4時・14時どちらの時刻においても照射線量が大きいほど、腫瘍体積が減少した。さらに、4時に1,3,6Gy照射を行った方が14時に行った時よりも腫瘍体積が小さかった(図1)。一方、9,10Gy(高線量)の照射時には、炭素イオン線による治療効果が高いため、どちらの時刻でも腫瘍が確認できないほど、体積が小さくなっていった(図1)。この結果より、炭素イオン線の照射時刻によって治療効果は変動し、夜間に照射を行った方が高い治療効果を得られることが明らかになった。さらに、高線量での照射は照射時刻による治療効果への影響を受けないことが示唆された。つまり、炭素イオン線がん治療は、照射時刻の変化によって治療効果を向上させることで、より低線量での治療ができることを示唆している。X線について、照射7日後では、15時のみ照射線量が増えていくにつれて腫瘍体積が小さくなっていった(図2)。9時・21時では、照射による腫瘍体積の差はあまりみられなかった(図2)。3時では6Gy照射した方が未照射よりも腫瘍体積が大きかった(図2)。照射21日後では、3,6Gyともに全ての時刻で未照射よりも腫瘍体積が小さく、3Gyでは21時、6Gyでは15時に最も腫瘍体積が小さかった(図3)。よって、本実験の条件では、X線による治療効果が得られないことが明らかになった。また、X線照射による大きな体重変化はみられなかった(図4)。そのため、マウスの状態に大きな異常はみられないことが示唆された。

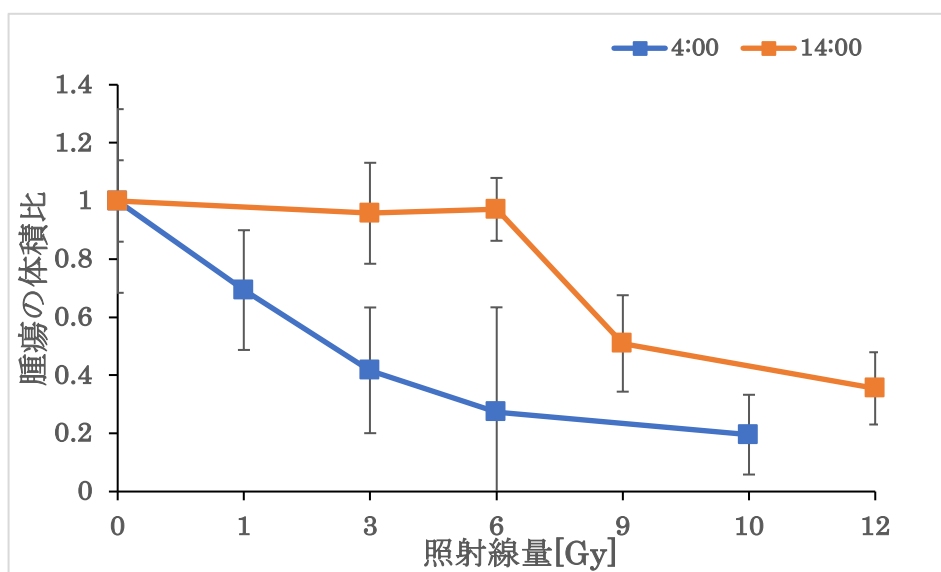


図 1. 炭素イオン線照射 6 日後のマウス腫瘍体積の日内変化 (n=5)
 マウスの右足に SCCVII細胞を移植し、炭素イオン線を移植 7 日後の 4 時に 1,3,6,10Gy、14 時に 1,3,6,9,12Gy 照射した。照射 7 日後にノギスで測定したマウス腫瘍の体積比を示している。
 縦軸は腫瘍の体積比、横軸は照射線量を示す。
 エラーバーは標準偏差を示す。

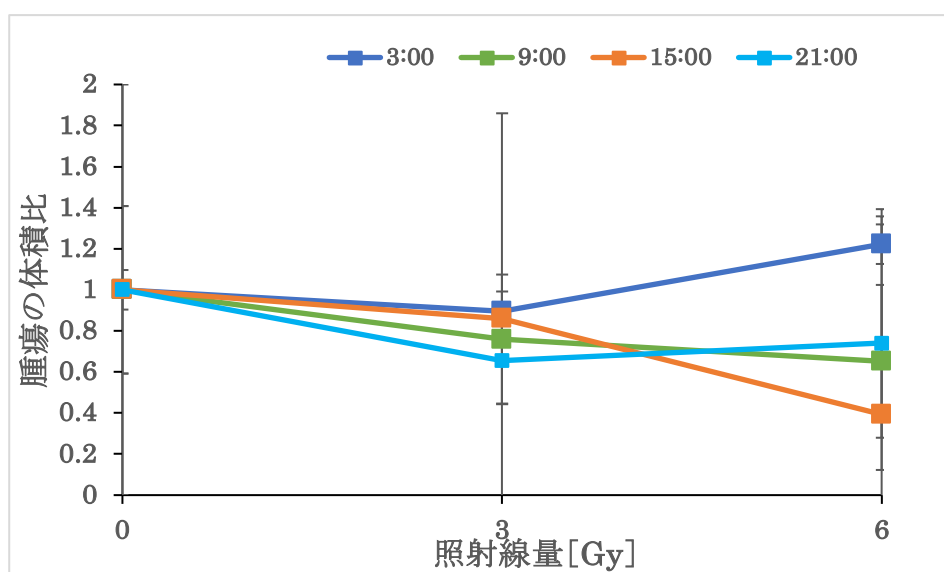


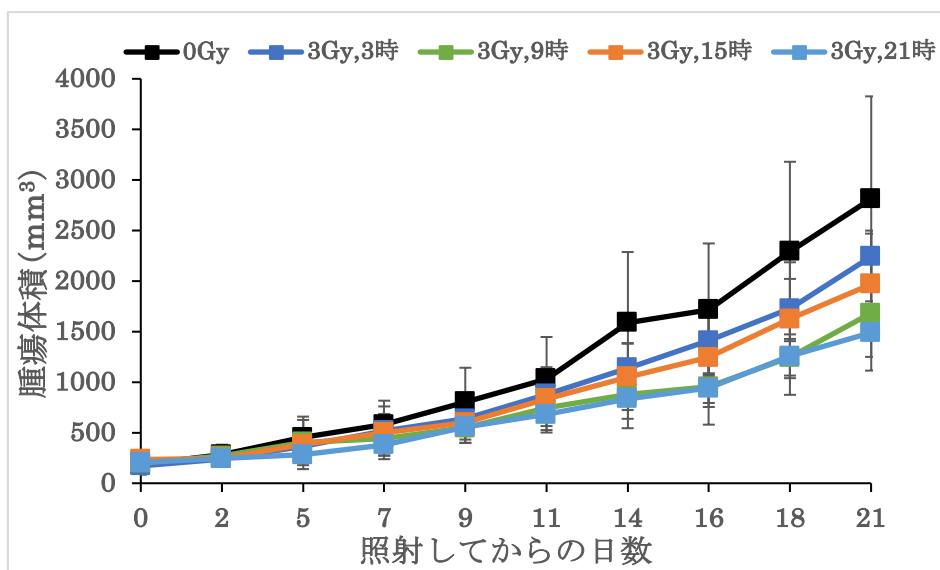
図 2. X 線照射 7 日後のマウス腫瘍体積の日内変化 (n=3)

マウスの右足に SCCVII細胞を移植し、7 日後に 4 つの時刻 (3 時,12 時,15 時,21 時) で X 線を 3,6Gy 照射した。照射 7 日後にノギスで測定したマウス腫瘍の体積比を示している。

縦軸は腫瘍の体積比、横軸は照射線量を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

(a)



(b)

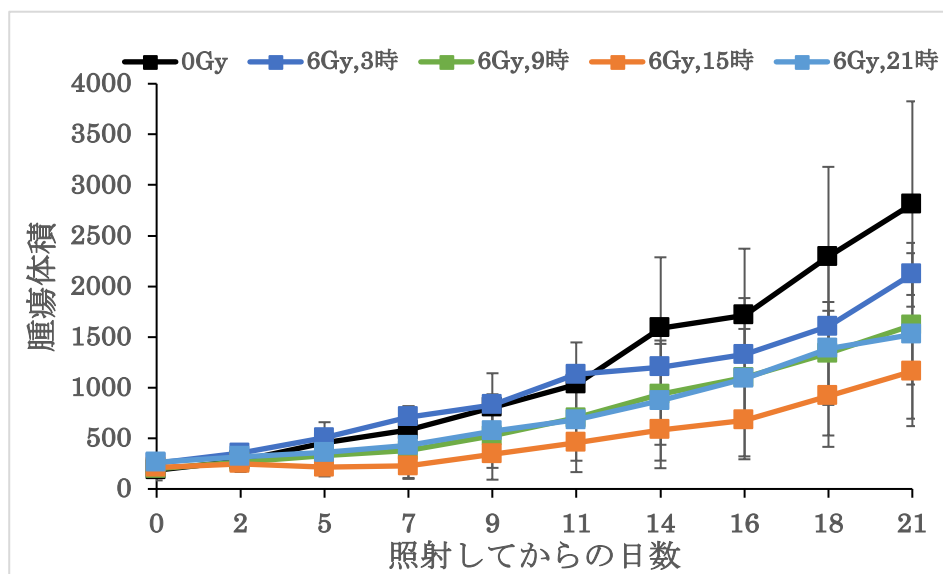


図 3. X 線照射後のマウス腫瘍体積の経時変化 (n=3)

マウスの右足に SCCVII 細胞を移植し、7 日後に 4 つの時刻 (3 時, 12 時, 15 時, 21 時) で X 線を 3, 6Gy 照射した。ノギスを用いて照射 0~21 日後まで測定したマウス腫瘍の体積を示している。

(a) は 3Gy、(b) は 6Gy 照射時の腫瘍体積を示す。

縦軸は腫瘍の体積比、横軸は照射してからの日数を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

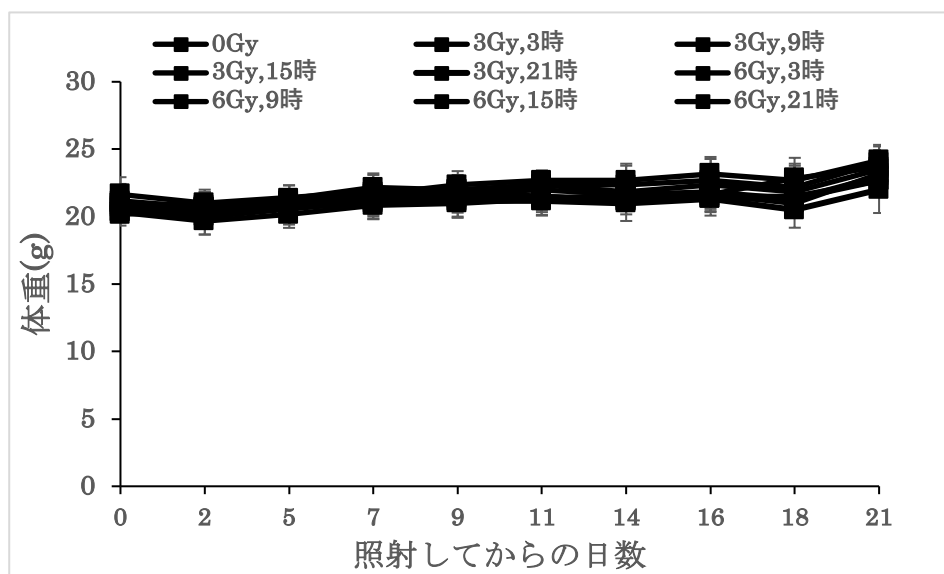


図 4. X 線照射後のマウス体重の経時変化 (n=3)

マウスの右足に SCCVII細胞を移植し、7 日後に 4 つの時刻 (3 時,12 時,15 時,21 時) で X 線を 3,6Gy 照射した。量りを用いて照射 0~21 日後まで測定したマウスの体重を示している。

縦軸はマウスの体重、横軸は照射してからの日数を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

【考察】

今回の実験結果から、炭素イオン線の照射時刻によって治療効果は変動し、夜間に照射を行った方が高い治療効果を得られることが明らかになった。治療時刻による治療効果の変動は、化学療法においてもすでに明らかになっている。マウスへの抗がん剤の経口投与においては、夜間に行った方が治療効果は高いことが報告されている(7)。この原因は、生体内の概日リズムによるものであると認められている。概日リズムとは、生体が外部環境に効率よく適応できるように、生体内で周期的に変化する仕組みであり、このリズムによって生体の恒常性を維持することができる(8)。さらに概日リズムは、昼夜および光刺激だけでなく、体内の時計遺伝子による影響によっても変化することが知られている。例えば、血管新生阻害薬は、血管新生に関わる VEGF や MetAP2 の概日リズムが関与しており、これらの遺伝子は時計遺伝子によって制御されていることが明らかになっている(9)。そこで、Per2 や Per1 など時計遺伝子を過剰発現させることで腫瘍の増殖を抑制させるなど、時計遺伝子を標的として抗腫瘍効果をもたらす試みも行われている(10)。さらに、概日リズムの変化を体内時計の分子機構から明らかにすることで、薬物活性マーカーを作成することも可能であると考えられている(8)。このように、化学療法では、生体内の細胞動態および薬物動態の概日リズムを考慮することにより、抗腫瘍薬の効果を増強し、副作用を軽減することを目的とした時間薬物療法として試みられている。

放射線がん治療においても、放射線と密接に関わっている因子と概日リズムの関係性が明らかになれば、最適な時刻で放射線による治療効果を最大限に発揮できるのではないかと考え、放射線感受性因子に着目し、それらの日内変動について解析を行うことにした。

第2章 放射線感受性因子の日内変動解析・放射線がん治療効果との相関性

【諸論】

細胞や組織によって、放射線による影響の受け方は異なる。これを放射線感受性と呼ぶ。細胞分裂が盛んで分化の程度が低い細胞では放射線感受性が高く、細胞分裂があまり行われず分化の程度が高い細胞では放射線感受性は低い。細胞では、造血幹細胞が放射線感受性が高いことが知られている(11)。また、組織では、骨髄・リンパ組織が放射線感受性が高く、神経組織が放射線感受性が低いことが知られている(11)。

放射線の感受性には、様々な因子が関わっている。

①細胞周期

1つの細胞が2つの細胞に分裂する過程を細胞周期と呼ぶ。細胞周期は、DNA合成の準備を行うG1期、DNA合成を行うS期、細胞分裂の準備を行うG2期、細胞分裂を行うM期の順に進行する。細胞周期の期間によって放射線感受性は異なり、G2/M期で放射線感受性が高く、G1期では放射線感受性が低く、S期後半では最も放射線感受性が低いことが知られている(12)、(13)。放射線が照射されると、細胞周期が停止または遅延を行う。その間、DNA損傷を受けた細胞が次の細胞周期の期間に移行する前に損傷がないかどうか確認し、修復を行う。これを細胞周期チェックポイントと呼び、G1期からS期への進行を抑制するG1期チェックポイント、DNA合成を停止するS期チェックポイント、G2期からM期の進行を抑制するG2/M期チェックポイントが存在する(14)。この機能を利用して、異なる周期で移行する細胞に細胞周期チェックポイント阻害薬を用いることで、細胞周期を同期させることが可能になった。

現在では、細胞周期の制御を担うCDK阻害薬の臨床応用が行われている(15)。

②抗酸化能

酸化ストレスから細胞を保護する能力を抗酸化能と呼ぶ。放射線に対しては、放射線によって作られる活性酸素(ROS)を消去し、DNA損傷を防ぐ細胞内の防御機構としての役割を持っている(16)。抗酸化システムには、主にスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)やグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)、パラオキシナーゼ(PON)、ペルオキシレドキシシン(PROX)などの抗酸化酵素が働く。さらに、グルタチオン(GSH)やチオレドキシシン(TRX)などの非抗酸化酵素も働く。放射線によって、ヒドロキシラジカル(OH[•])やスーパーオキシド(O₂^{•-})といった活性酸素が作られるが、スーパーオキシドはSODによって過酸化水素に分解され、過酸化水素はGPXによって水に分解される(16)。

現在、抗酸化剤の中でN-アセチルシステイン(NAC)の研究が最も進められてお

り、がん治療すでに利用されている(17)。NACは陰イオン交換膜を介して迅速に吸収され、脱アセチル化されてシステインが生成され、GSHを補充することができる。

本研究では、細胞周期と抗酸化能に着目し、それらの日内変動を明らかにするとともに、放射線がん治療効果との関連性について検討することを目的とした。

【材料・方法】

細胞培養、マウス飼育、マウスへのがん細胞移植は、第1章で記載した通りに行った。

1. マウスの解剖、採血

A) マウス

- ・担がんマウス(C3H、SCCVII移植)

B) ペントバルビタールナトリウム

(ナカライテスク、26427-72)

C) 生理食塩水

(大塚製薬、035132509)

解剖は、マウスに SCCVII を移植して 7~10 日後の 9 時・15 時・21 時・3 時(同日)に行った。マウスをペントバルビタール 1 ml (5 mg/ml、生理食塩水で希釈)の腹腔内投与により安楽死させた。その後、胸腹部を切開し、1 ml シリンジを用いて心臓の左心室から針を刺し、ゆっくりと血液を採取した。心臓の右心耳と呼ばれる場所に深さ 1 mm 程度の切り込みを入れた。出血確認後、左心室からシリンジを用いて生理食塩水 10 ml をゆっくり流し込みながら灌流を行った。灌流後、下肢部から腫瘍を摘出した。採取した血液は、遠心分離(1000 × g, 10 min)を行い、上清から血漿または血清を採取した(採血する際、血漿の場合はヘパリンを使用した)。

2. 細胞周期解析

A) マウス腫瘍(C3H、SCCVII移植)

B) 培地

- ・ HBSS
- ・ DMEM (10 % 血清、1 % 抗生物質含有)

C) アキュターゼ

(ナカライテスク、12679-54)

D) 組織分散装置

(gentleMACS Dissociator、MACS)

E) Percoll

(GE Healthcare、GE17-0891-01)

F) ナイロンメッシュ (40 μm、1000 μm)

G) D-PBS (-)

H) 血球計算盤

I) エタノール

(富士フィルム和光純薬、057-00451)

J) RNase 溶液 (TaKaRa、740505/.50)

K) 蛍光色素

- ・ PI (Propidium Iodide) (ナカライテスク、29037-34)
- ・ Hoechst (ナカライテスク、19172-51)

L) Gallios (BECKMAN COULTER)

- ・ マウス腫瘍のシングルセル化・細胞固定

5mm 角に切り取った腫瘍をハサミで細かく刻み、組織分散装置専用カートリッジのチューブに移し、HBSS 5 mL、アクターゼ 2 mL 加え、腫瘍分散用プログラムを実行した(プログラム名 37C-m-TDK-2 (42 min 48 s, 1240 回転, 硬さ: medium,tough))。大きなゴミを取り除くためにサンプルを 1000 μ m ナイロンメッシュに用いて 15 mL チューブに移し、DMEM 5 mL 加えて、遠心分離 (1000 rpm, 5 min) を行った。上清を取り除き、PBS を 5 mL 加え、小さなゴミを取り除くために 40 μ m ナイロンメッシュを用いて新しい 15 mL チューブに移した。その後、電子顕微鏡と血球計算盤を用いてセルカウントを行い、 1×10^6 個/mL に調整し、D-PBS (-) で洗浄した。そして、細胞 1×10^6 個あたり冷 70 % エタノール 1 mL を加えて細胞固定し、4°C で 2 時間以上静置後、凍結保存した。

- ・ 細胞周期測定

エタノール固定した細胞を D-PBS (-) で洗浄した。その後、RNA を取り除くために細胞 1×10^6 個あたり 5 μ g/mL RNase 溶液を 1 mL 加え、37 °C で 30 分間インキュベーションした。そして、細胞核を染色する蛍光色素 PI を最終濃度 25~50 μ g/mL になるように加え、4 °C で 30 分暗所に静置した。細胞塊や細かいゴミを取り除くためにサンプルを 40 μ m ナイロンメッシュに通し解析用チューブに移した。測定は Gallios を用いた。細胞周期を測定するために、細胞群を確認する散乱光 (FS,SS)、蛍光染色による蛍光 (FL3 (検出波長 620 nm)) を測定した。解析には、Kaluza for Gallios-Acquisition Software を用いた。測定したい SCC 細胞集団にゲートをかけ、その細胞集団の中から単一細胞のみをゲートをかけることで、細胞周期分布を作成した。

3. グルタチオン測定

A) マウス腫瘍 (C3H、SCCVII 移植)

B) SSA (5-スルホサリチル酸二水和物) (ナカライテスク、32512-52)

C) NanoDrop One/One^C (Thermo Fisher、ND-ONEC-W)

D) GSSG/GSH Quantification Kit (同仁化学、G257)

E) 96 ウェルマイクロプレート (WATOSON、195-96F)

F) ARVOX3 (Perkin Elmer)

・サンプル準備

100 mg に切り取った腫瘍を 2 mL チューブに移し、グルタチオン安定化のため 5% SSA 水溶液(純水で希釈) を 0.5 mL 加えた後、ホモジナイズした。その後、遠心分離(13,000 ×g; 5 min)を行い、上清を別の 2 mL チューブに移した。NanoDrop One/One^C を用いて DNA 濃度を測定後、サンプル調製の分だけ別のチューブに移し、残りは-80 °Cで保存した。

・サンプル調製

サリチル酸による吸光度測定への影響を防ぐため、サンプルの一部を希釈し、これを GSH(還元型)サンプルとした。さらにその一部を別のチューブに移してから Masking Solution を加えることで GSH をマスキングし、これを GSSG(酸化型)サンプルとした。

・試薬調製

GSSG standard solution (0,0.78,1.57,3.13 ,6.25,12.5,25 μmol/l)

事前に作製した 100 μmol/l GSSG standard solution と 0.5 % SSA 水溶液を 1 : 3 で混合し、25 μmol/l GSSG 溶液を調製した。そして、その溶液を 0.5 % SSA 水溶液を用いて順次希釈し、調製した。

GSH standard solution (0, 1.57, 3.13, 6.25,12.5, 25, 50 μmol/l)

事前に作製した 200 μmol/l GSH standard solution と 0.5 %SSA 水溶液を 1 : 3 で混合し、50 μmol/l GSSG 溶液を調製した。そして、その溶液を 0.5 % SSA 水溶液を用いて順次希釈し、調製した。

Substrate working solution

事前に作製した Substrate 溶液と Buffer solution を 1 : 2 で混合し、調製した。

Enzyme/coenzyme working solution 調製

事前に調製した Enzyme working solution と coenzyme working solution、さらに Buffer solution を 1 : 1 : 1 で混合した。

・濃度測定

96 well プレートを用いて、サンプル(n=2)、標準液(n=1)をウェルにそれぞれ 20 μl ずつ添加後、Buffer solution を 30μl ずつ添加し、37 °Cで 1 時間インキュベーションを行った。その後、添加された well に Substrate working solution は 30 μl、Enzyme/coenzyme working solution は 30 μl ずつそれぞれ添加し、37 °Cで 10 分間インキュベーションを行い、ARVOX3 を用いて 405 nm で吸光度測定を行った。

・解析

Standard solution の吸光度から、検量線を作成した。以下の計算式を用いて、各サンプルのグルタチオン濃度を求めた。

$$\text{濃度} = (\text{GSH/GSSG サンプルの吸光度} - \text{blank の吸光度}) / \text{GSH/GSSG 検量線の傾き}$$

4. 遺伝子発現解析

- A) マウス腫瘍(C3H、SCCVII移植)
- B) RNAzol (MRC、RN 190)
- C) RNase free water
- D) イソプロパノール(富士フィルム和光純薬、166-04836)
- E) エタノール
- F) NanoDrop One/One^C
- G) NucleoSpin[®] RNA Clean-up (TaKaRa、U0948B)

・ RNA 抽出

5 mm 角に切り取った腫瘍を RNAzol 1 ml が入ったチューブに入れ、ホモジナイザーを用いて細胞破碎を行った後、遠心分離(10,000 × g;10 min)を行った。上清 1 ml を新しいチューブに移して RNA free water を 0.4 ml 加え、激しく振とうし、15 分室温で静置した後、遠心分離(10,000 × g;10 min)を行った。上清を新しいチューブに移し、1 ml のイソプロパノールを加えた後、室温で 10 分静置し、遠心分離(10,000 × g;10 min)した。上清を新しいチューブに移し、75 %エタノールを 1 ml 加え、で遠心分離(8,000 × g;3 min)する過程を 2 回行った。上清を捨て、50 μl の RNase free water を加え、室温で 5 分静置した後、NanoDrop One/One^Cを用いて RNA 量を測定した(260,280 nm)。測定後、RNA 精製を行うため、RNA 濃度が 50 μg/μl 以下になるよう調製した。残りは-80 °Cで保存した。

・ RNA 精製

濃度が 50 μg/μl 以下の RNA を NucleoSpin[®] RNA Clean-up を用いて精製した。RNA に RNA free water を合計 100 μl になるまで加えた。Prepare premix 600 μl (buffer RA1 300 μl + 99.5 %エタノール 300 μl) を RNA に加え、ボルテックス、collection tube に差したカラムに移し、遠心分離(8,000 × g;30 s)を行った。カラムに buffer RA3 700ul を加え、遠心分離(8,000 × g;30 s)を行った。再び、カラムに buffer RA3 350ul を加え、遠心分離(8,000 × g;2 min)を行った。カラムを RNA free tube に移し、RNA free water 60ul を加え、遠心分離(8,000 × g;1 min)を行った。チューブに沈澱したものを cDNA

合成用のサンプルとした。

- cDNA 合成

精製した RNA を NanoDrop One/One^c によって RNA 濃度を再度測定し、250 µg/µl に調製した。1 サンプルにつき、合計 30 µl の cDNA を合成した。200ul のマイクロチューブに精製した RNA 3 µl、5 × PrimeScript RT Master Mix 6 µl、RNA free water 21 µl 加えた。軽く攪拌後、Gene[®]Amp PCR System 9700 を用いて、逆転写反応を行った。(37 °C, 15 min → 85 °C, 5 s → 4 °C) その後、low TE を 90 µl 加え、-50 °C で凍結保存した。

- RT-qPCR

1 well あたり、cDNA 0.3 µl、THUBDERBIRD SYBR qPCR Mix 4.7 µl、Primer 0.3 µl、RNase free water 4.7 µl を加えた。どのプレート上にも、cDNA の control (全ての cDNA を mix したもの)、Primer のハウスキーピング遺伝子 (Hrpt1) を必ず加えた。軽く攪拌後、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System を用いて、増幅反応を行った。

(95 °C, 1 min → (95 °C, 15 s → 60 °C, 30 s) × 40 cycle

→ (95 °C, 30 s → 65 °C, 5 s → 95 °C, 5 s) × 1 cycle → 4 °C)

今回の実験で使用した Primer の配列は表 1 に示した。

- 解析

解析には、CFX Maestro を使用し、control を用いてプレート間の誤差を補正し、ハウスキーピング遺伝子 Hrpt1 を用いて各サンプルの相対値を求めた。

表 1

Mouse

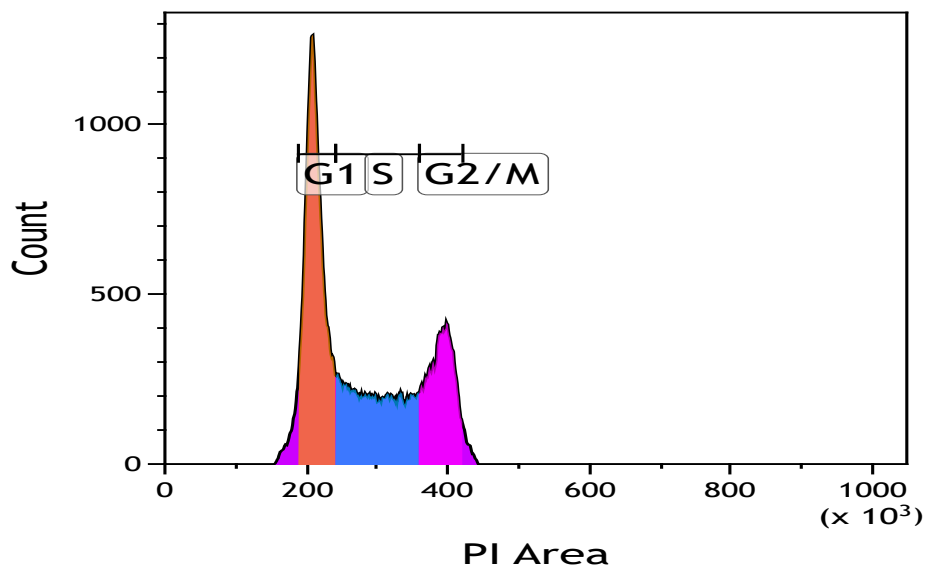
遺伝子名	Forward Primer 配列(F) 5'	Reverse Primer 配列(R) 3'
Arp	F: TGC ACTCTCGCTTTCTGGAGGGTGT	R: AATGCAGATGGATCAGCCAGGAAGG
Hprt1	F: CAACGGGGGACATAAAAAGTTATTGGTGGA	R: TGCAACCTTAACCATTTTGGGGCTGT
Gapdh	F: GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG	R: CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT
Mki67	F: GCCGAACAGACTTGCTCTGGCCTAC	R: TGGTTGGCGTTTCTCCTCTTTTCAGTG
Ccnd	F: GAGAACAAGCAGACCATCCGCAAGC	R: CATGGAGGGTGGGTTGGAAATGAAC
Cdkn1a	F: TGGGAGGGGACAAGAGGCCAGTACT	R: CGGGGAATCTTCAGGCCGCTCAGACAC
Gpx1	F: GGGACCTCGTGGACTGGTGGTGCT	R: CCCGCCACCAGGTCCGACGTACT
Gpx4	F: GTCCAGCCCAAGGGCAGGGGCAT	R: GCGCTTCACCACGCAGCCGTTCT
Gpx7	F: TTGCCCGCCGCACCTACAGTGTCT	R: GGGGTCCCATGCTCCCACCACCTTT

【結果】

マウス腫瘍の細胞周期解析

時刻によって細胞周期に変化がみられるか調べるため、担がんマウスを用いて細胞周期解析を行った。SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後に取り出し、腫瘍のシングルセル化を行った。その後、エタノールで細胞固定し、細胞の核を蛍光色素PIで染色することで、細胞周期をフローサイトメーターで細胞周期分布を調べた(図)。最初に、培養細胞の細胞周期分布を調べたところ、G1・S・G2+M期のピークがはっきりとみられた(図 5(a))。次に、マウス腫瘍を組織分散装置でシングルセル化を行い、細胞周期分布を調べ、培養細胞と比較した。培養細胞と同様のピークを確認することはできたが、培養細胞ではみられなかった、がん細胞よりも小さい蛍光強度でのピークも確認された(図 5(b))。そこで、組織分散装置の後に Percoll を用いて SCCVII細胞より小さな粒子の除去を試みたが、改善はみられなかったため、SCCVII細胞とは別の細胞が腫瘍内に含まれていることが示唆された(図 6)。同様に、細胞分散装置を用いずに、腫瘍をインキュベーター内で振とうさせることでシングルセル化を試みたが改善はみられなかった。最後に、細胞固定を行わずに細胞の核を染色するため、Hoechst という蛍光色素を用いて、培養細胞の細胞周期分布を調べた。Hoechst は最終濃度 25~50ug/mL になるように加え、蛍光(FL9(検出波長 450nm)) を測定した。しかし、細胞周期のピークを確認することはできなかった(図 7)。

(a)



(b)

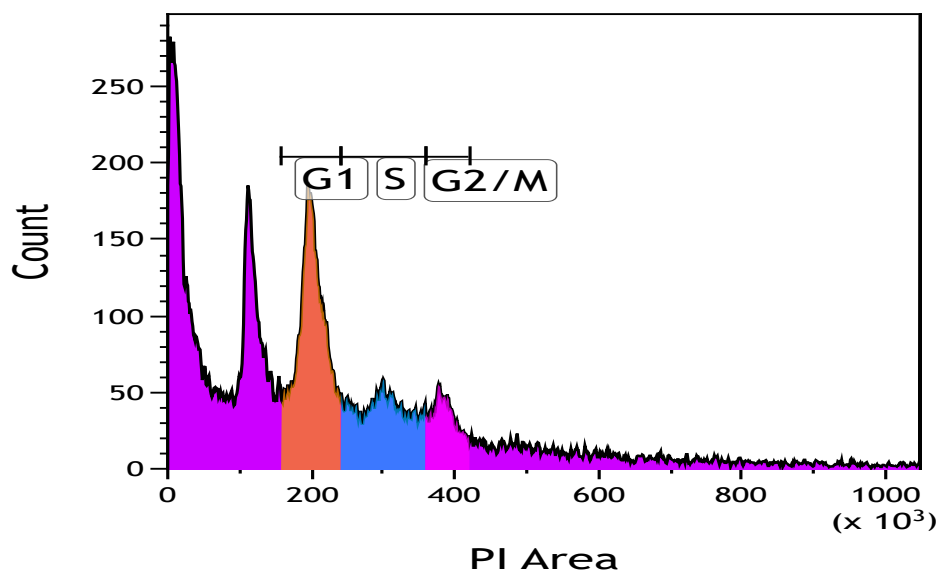


図 5. 培養細胞とマウス腫瘍の細胞周期分布の比較 (n=1)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍は、7日後に取り出し、組織分散装置を用いてシングルセル化を行った。培養細胞・腫瘍の細胞を固定・PI染色後にフローサイトメトリー解析で得られた細胞周期分布を示している。

(a)は培養細胞、(b)はマウス腫瘍の細胞周期分布を示す。

縦軸は細胞数、横軸は蛍光量を示す。

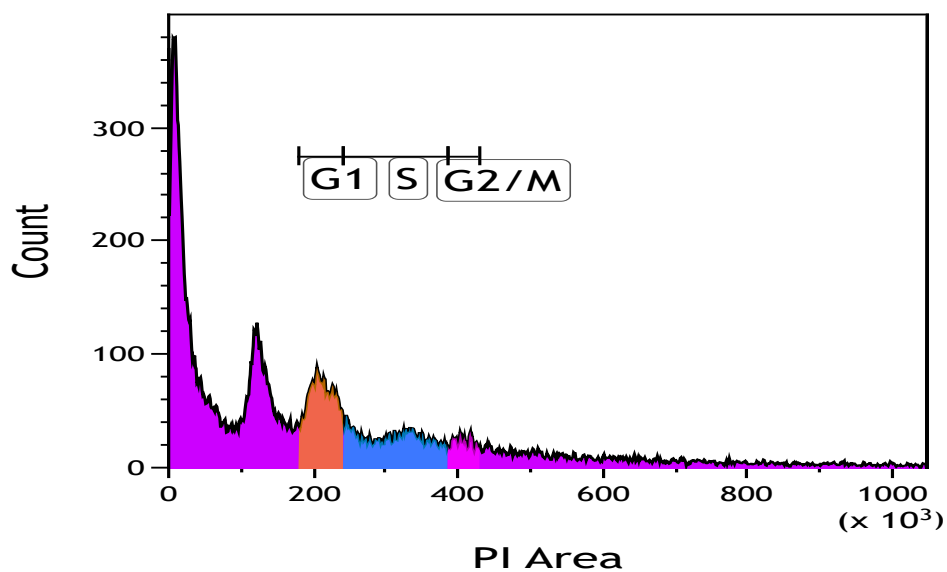


図 6. Percoll を用いたマウス腫瘍の細胞周期分布 (n=1)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を 7 日後に取り出し、組織分散装置と Percoll を用いてシングルセル化を行い、細胞固定・PI 染色後にフローサイトメトリー解析で得られた細胞周期分布を示している。

縦軸は細胞数、横軸は蛍光量を示す。

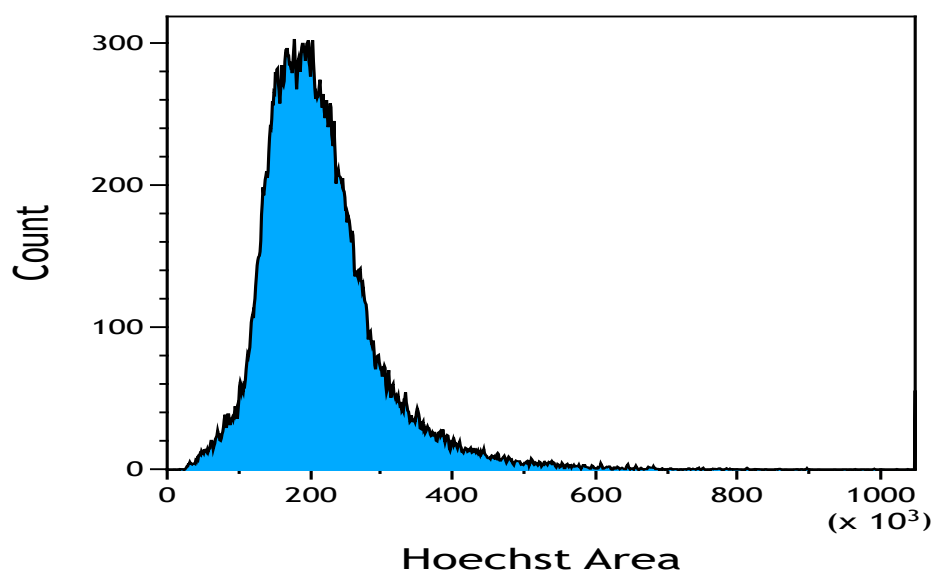


図 7. Hoechst 染色による培養細胞の細胞周期分布 (n=1)

培養細胞を細胞固定せずに、蛍光色素 Hoechst で細胞の核を染色した時の細胞周期分布をフローサイトメトリーで得られた細胞周期分布を示している。

縦軸は細胞数、横軸は蛍光量を示す。

マウス腫瘍の細胞周期(細胞増殖度)の日内変動解析

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後に取り出し、図5(b)の方法でマウス腫瘍のシングルセル化を行い、放射線感受性の低いG1期、放射線感受性の高いG2+M期の細胞の割合を調べ、細胞増殖度としてその比率(G2+M期/G1期比)を求めた。有意差はみられなかったが、3時の方が15時よりもG2+M期/G1期比が高い傾向にあるということが分かった(図8)。さらに、同様の条件で摘出したマウス腫瘍をRNAzol中でホモジナイズし、腫瘍からRNAを抽出・精製し、cDNAを合成した。このcDNAを用いて、細胞周期に関連する遺伝子の発現量を調べた。がん細胞の増殖マーカーで知られるMKi67、G1期からS期への進行を誘導するCcndは、3時と21時に有意差がみられ、3時に最も発現量が多い傾向にあった(図9(a), (b))。これらの結果から、3時の方が15時よりも細胞増殖度が高く、放射線感受性が高いことが明らかになり、細胞周期は放射線がん治療効果と相関性があると示唆された。一方、G1期の細胞周期の停止を誘導するCdkn1aの遺伝子発現量では、3時に最も多く発現量がみられた(図9(c))。

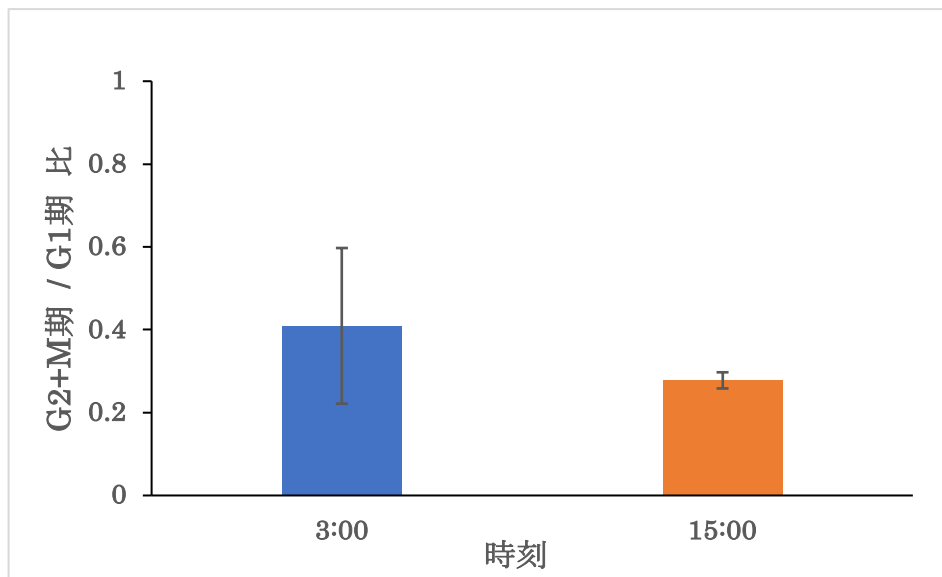


図 8. マウス腫瘍の細胞増殖度の日内変動(n=3)

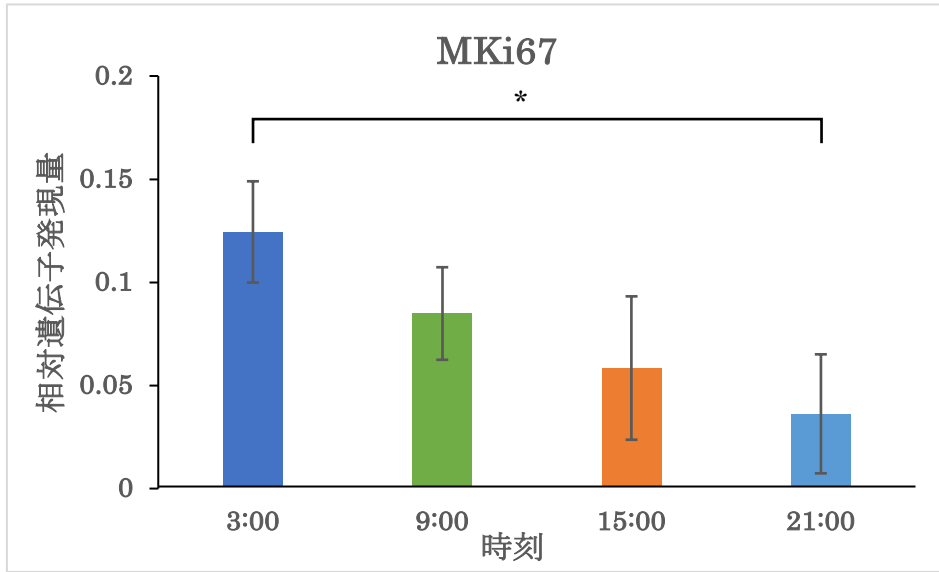
移植 7 日後の 3 時と 15 時に腫瘍を取り出し、図 4 (b) の方法で細胞周期解析を行い、マウス腫瘍の G1 期、G2+M 期の細胞数を求め、その割合 (G2+M/G1) を示している。

3 時と 15 時で有意差はみられなかった。

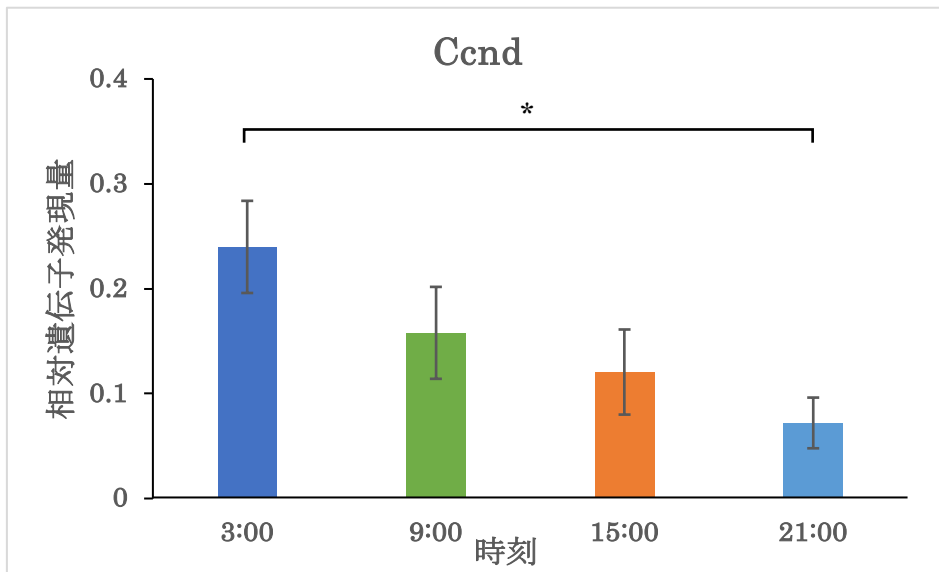
縦軸は G2 期+M 期/G1 期の割合、横軸は時刻を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

(a)



(b)



(c)

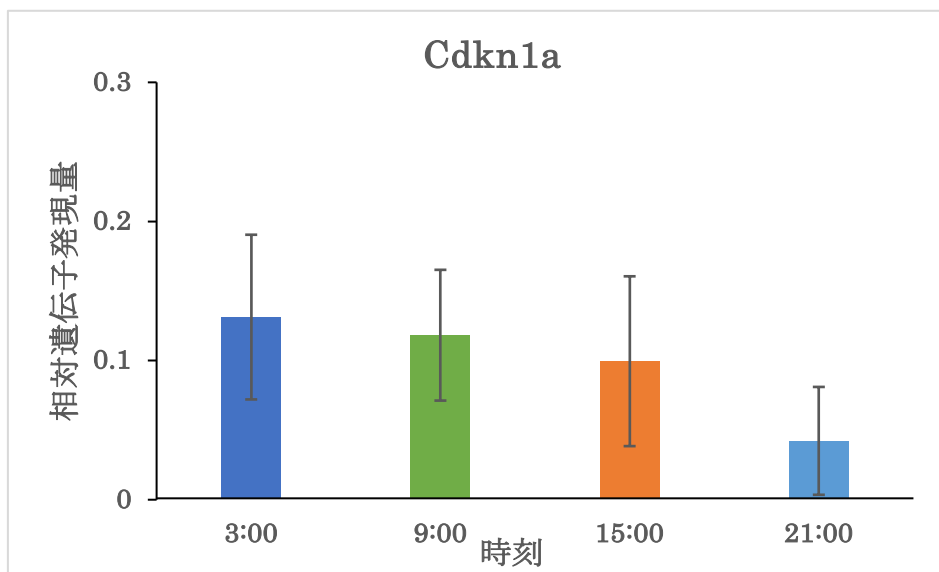


図 9. マウス腫瘍の細胞周期関連遺伝子の日内変動 (n=3)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析で得られたマウス腫瘍の細胞周期関連遺伝子の発現量を示している。(a)はMKi67、(b)はCend、(c)はCdkn1aの相対遺伝子発現量を示している。

(a)、(b)では有意差はみられなかったが、(c)では3時と15時、9時と21時で有意差がみられた。

縦軸はHrpt1の発現量を1とした時の相対遺伝子発現量、横軸は時刻を示す。エラーバーは標準偏差、*は有意差を示す。

マウス腫瘍の抗酸化能(グルタチオン濃度)の日内変動解析

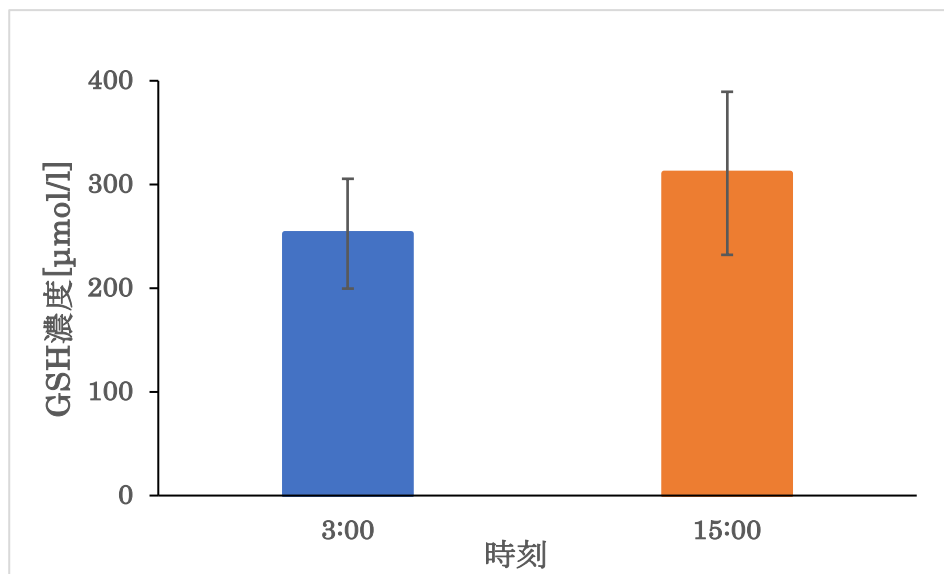
本研究では、体内に含まれる抗酸化物質の中で最も多い物質の1つであるグルタチオン(GSH)を用いた。グルタチオンは、構成アミノ酸であるシステインのチオール基の化学反応性により、活性酸素種を還元的に消去し、活性酸素によるDNA損傷を防ぐ働きを持っている。

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、5%SSA中でホモジナイズ・遠心分離で得た低分子化合物をサンプルとし、GSHアッセイキットを用いてグルタチオン濃度を求めた。有意差は見られなかったが、3時の方が15時のよりもGSH(還元型)の量が高い傾向にあった(図10(a))。よって、夜間では抗酸化能が低いことが明らかになり、治療効果と相関性があることが示唆された。

さらに、酸化ストレス比を示すGSH(還元型)/GSSG(酸化型)比を求めた。3時の方が15時よりもGSH/GSSG比が低く、有意差もみられたため、この時、GSH/GSSG比では有意差はみられなかったが、酸化ストレス比では有意差がみられた(図10(b))。GSH/GSSG比が低い場合、酸化ストレス比は高いため、夜間では酸化ストレス比が高いことが明らかになり、治療効果と相関性があることが示唆された。

一方、GSH(還元型)を利用して生体内の過酸化水素の除去を行うグルタチオンペルオキシダーゼ(Gpx)の遺伝子発現量を図5の方法で調べたが、Gpx1,Gpx4ともに時刻による発現に大きな変化は見られず、Gpx7は発現量が低く評価できなかった(図11(a),(b))。よって、Gpxは治療効果と相関性はみられなかった。

(a)



(b)

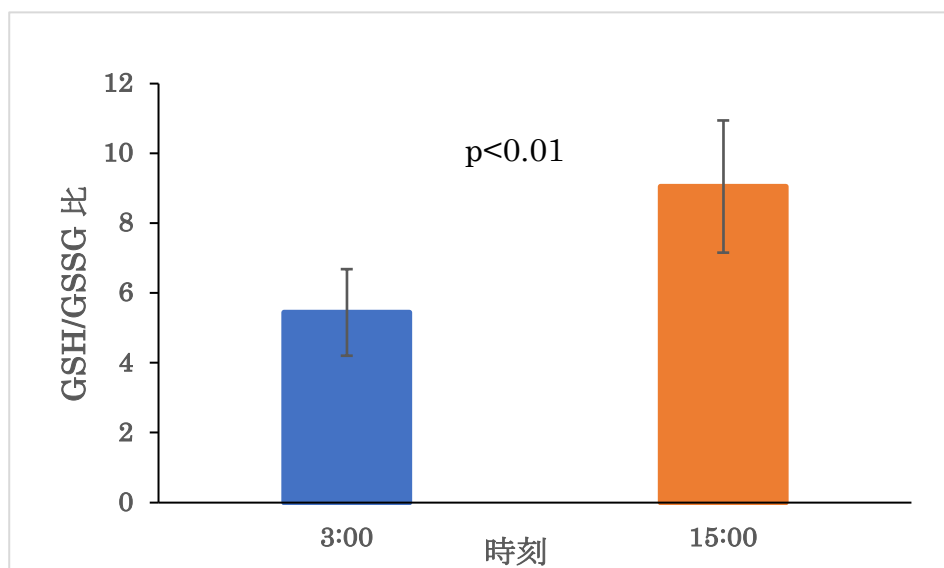


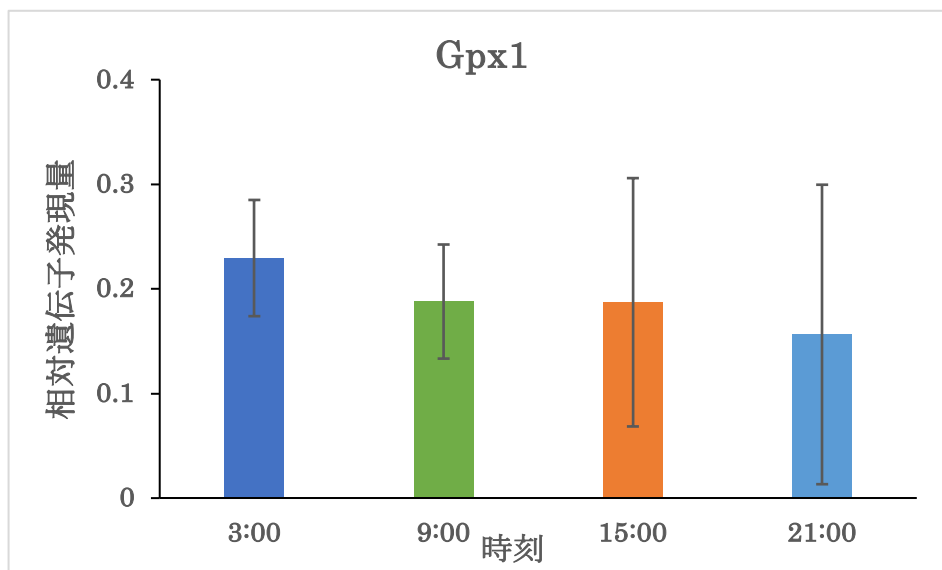
図 10. マウス腫瘍のグルタチオンの日内変化 (n=3)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・15時に取り出し、5%SSA中でホモジナイズ・遠心分離で得た低分子化合物をGSHアッセイキットを用いて吸光度測定して得られたマウス腫瘍のグルタチオン濃度を示している。(a)はGSH濃度、(b)は酸化ストレス比を表すGSH/GSSG比を示している。

(a)では有意差はみられなかったが、(b)では有意差がみられた。

(a)の縦軸はGSH濃度、横軸は時刻を示す。(b)の縦軸はGSH/GSSGの割合、横軸は時刻を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

(c)



(d)

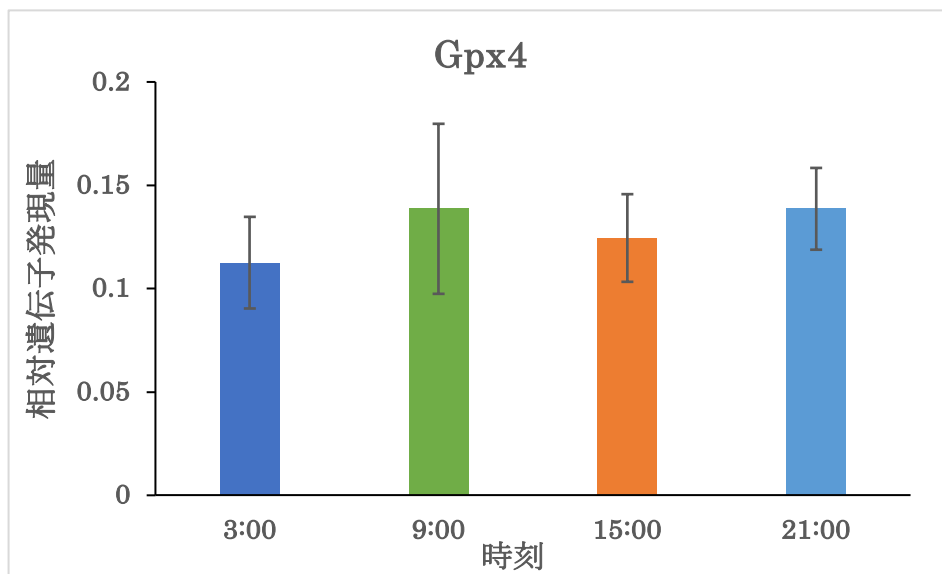


図 11. マウス腫瘍の Gpx 遺伝子の日内変動 (n=3)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析で得られたマウス腫瘍のGpx遺伝子の発現量を示している。(a)はGpx1、(b)はGpx4の相対遺伝子発現量を示す。

(a),(b)ともに有意差はみられなかった。

縦軸はHrpt1の発現量を1とした時の相対遺伝子発現量、横軸は時刻を示す。エラーバーは標準偏差、*は有意差を示す。

【考察】

フローサイトメトリーによる腫瘍内の細胞周期解析では、様々な方法で腫瘍細胞の単離を試みたが、がん細胞とは異なると考えられる蛍光ピークがみられたため、がん細胞の細胞周期の正確なデータが得られなかった。しかし G2+M 期の割合及び G2+M 期/G1 期の値が 3 時に最も多いという今回の実験結果と同様の報告もある (6)。そのため、今回の実験結果の信憑性は高いと考えられる。

一方で、正体不明の蛍光ピークは何かを考える必要がある。まず、図 6 の細胞の単離に用いられる Percoll を使用して解析を行っても、他の方法を用いた時と結果に大きな差はみられなかったため、正体不明の蛍光ピークは細胞の蛍光ピークであると示唆される。さらに、今回の実験で用いた SCCVII 細胞は、免疫浸潤性が高い細胞であるため、この蛍光ピークは、免疫細胞のものではないかとされる。

今後、より正確な細胞周期分布を調べるため、正体不明のピークを取り除く必要がある。そこで、細胞内で蛍光タンパクを発現させるプラスミドを SCCVII 細胞にトランスフェクションすることで、細胞周期解析時に SCCVII 細胞の蛍光のみを解析することが可能なのではないかと考えている。さらに、正体不明の蛍光ピークの正体を明らかにするため、抗体を用いた腫瘍細胞の免疫染色を試みることも考えている。

腫瘍内の抗酸化能測定では、GSH 濃度は日内変動がみられたが、Gpx は日内変動があまりみられなかった事から、グルタチオンの放射線がん治療効果への関与は示唆された。

関与の可能性として 2 種類あると考えられる。1 つは、抗酸化酵素 Gpx の基質としての関与である。Gpx は、グルタチオンを基質として、活性酸素である過酸化水素を水に変える働きを持っている。そのため、基質であるグルタチオンの量が減少すれば、Gpx による抗酸化作用は低下するのではないかと考えられる。もう 1 つは、抗酸化物質としての関与である。グルタチオン自身にも活性酸素を除去する機能を持っているため、グルタチオンの量が減少すれば、抗酸化作用は低下するのではないかと考えている。

一方、生体内で生じる抗酸化作用は、グルタチオンによる影響は大きいですが、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によっても変動するのではないかと考えている。SOD は、活性酸素であるスーパーオキシドを過酸化水素に変える働きを持っている (16)。つまり、Gpx による抗酸化作用は、SOD による抗酸化作用が働かないと機能できないことを示している。よって、SOD が日内変動することで、生体内のスーパーオキシドを過酸化水素に変化する量が変動してしまい、生体内の抗酸化作用も変動するのではないかと

考えている。

今後、SODについても着目し、日内変動が起こるのか、そして生体内の抗酸化能にどのような影響をもたらすのかについてもグルタチオンと交えて検討していく。

第3章 抗腫瘍免疫の日内変動および放射線がん治療効果との相関性

【諸論】

抗腫瘍免疫は、①腫瘍細胞からの抗原放出、②末梢腫瘍で樹状細胞に抗原提示し、樹状細胞のリンパ節への移動、③T細胞などの免疫細胞への抗原提示、④抗原提示を受けたT細胞が標的を認識し活性化、腫瘍へ遊走、⑤活性化T細胞が腫瘍に浸潤、⑥活性化T細胞が腫瘍を認識、⑦活性化T細胞が腫瘍を殺傷することで、がんの増殖を抑制している(18)。しかし、実際にはがんの増殖によって様々な障害が生じるため、免疫応答が誘導されなくなってしまうのである。

放射線の照射することで、腫瘍内の免疫も活性化されることが知られている。放射線照射は、DAMPと呼ばれる内因性リガンドの放出を促進する。DAMPは、受容体と結合すると、自己増幅サイトカインカスケードを開始し、免疫原生細胞死機構や自己免疫応答の活性化につながると考えられている(19)(20)。リンパ球では、放射線照射によって腫瘍細胞によるネオ抗原の発現を誘導し、NK細胞を活性化、または死にかけている腫瘍細胞から放出されるDAMPおよびROSを介して間接的にNK細胞を活性化させることが報告されている(21)。マクロファージでは、放射線照射によってp53依存性ROS/RNS経路を活性化させる(22)。さらに、組織内の腫瘍関連マクロファージでは、炎症促進性のM1マクロファージを活性化させる。また、放射線誘発性アポトーシス細胞および破片の貪食を増加させ、細胞内で様々な物質の分解を行うリソソームやROSの増加と活性化を促すことや、腫瘍流入リンパ節に移動し、ヘルパーT細胞に抗原提示するMHC Iの活性化を促進させることが報告されている(23)(24)(25)(26)。樹状細胞では、放射線照射によって腫瘍流入リンパ節に移動し、キラーT細胞に抗原提示するMHC IIの活性化を促進させることが報告されている(27)。

さらに免疫細胞は、放射線照射によって腫瘍への浸潤性も増加させることが知られている。多核型白血球、マクロファージ、樹状細胞は、放射線照射による腫瘍微小環境における炎症促進反応中に生成されるケモカインによって促進され、腫瘍への浸潤が増加することが報告されている(28)。そして、細胞傷害性リンパ球の腫瘍浸潤を増加させることで、CD8+DCやIFN- γ による抗原提示を増強させることも報告されている(29)。

つまり、放射線照射によって免疫細胞を活性化させるだけでなく、免疫細胞の腫瘍への浸潤性を高めることができる。

放射線にとって免疫細胞は重要な存在であり、CD8抗体によるT細胞の除去によって、放射線がん治療効果は低下するという報告もある(30)。よって、放射線がん治療効果の向上には抗腫瘍免疫の働きが非常に重要であると考えている。

本研究では、抗腫瘍免疫に着目し、それらの日内変動を明らかにするとともに、

放射線がん治療効果との関連性について検討することを目的とした。

【材料・方法】

- A) マウス腫瘍(C3H、SCCVII移植)
- B) RNAzol
- C) RNase free water
- D) イソプロパノール
- E) エタノール
- F) NanoDrop One/One^C
- G) NucleoSpin[®] RNA Clean-up

・ RNA 抽出

5 mm 角に切り取った腫瘍を RNAzol 1 ml が入ったチューブに入れ、ホモジナイザーを用いて細胞破碎を行った後、遠心分離(10,000 × g;10 min)を行った。上清 1 ml を新しいチューブに移して RNA free water を 0.4 ml 加え、激しく振とうし、15 分室温で静置した後、遠心分離(10,000 × g;10 min)を行った。上清を新しいチューブに移し、1 ml のイソプロパノールを加えた後、室温で 10 分静置し、遠心分離(10,000 × g;10 min)した。上清を新しいチューブに移し、75 %エタノールを 1 ml 加え、で遠心分離(8,000 × g;3 min)する過程を 2 回行った。上清を捨て、50 μl の RNase free water を加え、室温で 5 分静置した後、NanoDrop One/One^Cを用いて RNA 量を測定した(260,280 nm)。測定後、RNA 精製を行うため、RNA 濃度が 50 μg/μl 以下になるよう調製した。残りは-80 °Cで保存した。

・ RNA 精製

濃度が 50 μg/μl 以下の RNA を NucleoSpin[®] RNA Clean-up を用いて精製した。RNA に RNA free water を合計 100 μl になるまで加えた。Prepare premix 600 μl(buffer RA1 300 μl + 99.5 %エタノール 300 μl)を RNA に加え、ボルテックス、collection tube に差したカラムに移し、遠心分離(8,000 × g;30 s)を行った。カラムに buffer RA3 700ul を加え、遠心分離(8,000 × g;30 s)を行った。再び、カラムに buffer RA3 350ul を加え、遠心分離(8,000 × g;2 min)を行った。カラムを RNA free tube に移し、RNA free water 60ul を加え、遠心分離(8,000 × g;1 min)を行った。チューブに沈澱したものを cDNA 合成用のサンプルとした。

・ cDNA 合成

精製した RNA を NanoDrop One/One^Cによって RNA 濃度を再度測定し、250 μg/μl に調製した。1 サンプルにつき、合計 30 μl の cDNA を合成した。

200ul のマイクロチューブに精製した RNA 3 μ l、5 \times PrimeScript RT Master Mix 6 μ l、RNA free water 21 μ l 加えた。軽く攪拌後、Gene[®]Amp PCR System 9700 を用いて、逆転写反応を行った。(37 $^{\circ}$ C, 15 min \rightarrow 85 $^{\circ}$ C, 5 s \rightarrow 4 $^{\circ}$ C)その後、low TE を 90 μ l 加え、-50 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

• RT-qPCR

1 well あたり、cDNA 0.3 μ l、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 4.7 μ l、Primer 0.3 μ l、RNase free water 4.7 μ l を加えた。どのプレート上にも、cDNA の control (全ての cDNA を mix したもの)、Primer のハウスキーピング遺伝子 (Hrpt1) を必ず加えた。軽く攪拌後、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System を用いて、増幅反応を行った。

(95 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow (95 $^{\circ}$ C, 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 30 s) \times 40 cycle

\rightarrow (95 $^{\circ}$ C, 30 s \rightarrow 65 $^{\circ}$ C, 5 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C, 5 s) \times 1 cycle \rightarrow 4 $^{\circ}$ C)

今回の実験で使用した Primer の配列は表 2 に示した。

• 解析

解析には、CFX Maestro を使用し、control を用いてプレート間の誤差を補正し、ハウスキーピング遺伝子 Hrpt1 を用いて各サンプルの相対値を求めた。

表 2

Mouse

遺伝子名	Forward Primer 配列(F) 5'	Reverse Primer 配列(R) 3'
Arp	F: TGCACTCTCGCTTTCTGGAGGGTGT R: AATGCAGATGGATCAGCCAGGAAGG	
Hprt1	F: CAACGGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGA R: TGCAACCTTAACCATTTTGGGGCTGT	
Gapdh	F: GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG R: CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT	
Cd47	F: GAATGCTTCTGGACTTGGCCTCATTGT R: CAAAGCAAGGACGTAGCCAGCACT	
Cd4	F: ACCCCAGGTCTCGCTTCAGTTTGCT R: GGTAGGTCCCATCACCTCACAGGTCAA	
Cd8	F: GCCAGTGCTGCGAACTCCCTCACCT R: GGGCCACGCAGATTCCGGCCAA	
Pd-1	F: CTGGTCATTCACCTGGGCTGTGCTG R: GGTGGCATTGCTCCCTCTGACACT	
Ctla4	F: CAACTGCAGCTGCCTTCTAGGACTTGG R: GGACCTCATCAGTGTTGTGTGATGGTGAAT	
Cd11c	F: TCACAACCCCGTCCCTCTTATCGTG R: TGTCCATTTGCTTCCTCCAACATCTCC	
Cd80	F: CACTTGTGCTCTTTGGGGCAGGATT R: GGCCCGAAGGTAAGGCTGTTGTTTG	
Cd86	F: CAGGCCAGCAACACAGCCTCTAAG R: GCTGAAGCAATTTGGGGTTCAAGTTCC	
Arg1	F: AGCCGCTGGAACCCAGAGAGAGCAT R: CTTTCCTCAGTGCTGCAGGGCCTTT	
Cxcr2	F: ACCTGCTGAACCTGGCCATTGCTGACC R: ACAATGGCCAGGTAGCGGTCCATG	
Cxcr4	F: GGACAAGTACCGGCTGCACCTGTCAGTG R: AGCGAGGTACCGGTCCAGGCTGATGAA	

【結果】

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析を行い、免疫マーカー遺伝子の発現量を調べた。

免疫の中心であるリンパ球、抗原の排除や免疫細胞の働きを調節するT細胞マーカーについて調べたところ、リンパ球に多く発現し、血球細胞がマクロファージや樹状細胞によって貪食されるのを防ぐCd47、キラーT細胞に多く発現し、抗原との接着に関わるCd8は、有意差はみられなかったが、3時の方が15時よりも発現量が多い傾向がみられた(図12(a),(c))。一方、ヘルパーT細胞に多く発現し、抗原を認識して免疫応答の中心的な役割を担うCd4は、有意差はみられなかったが、15時の方が3時よりも発現量が多い傾向がみられた(図12(b))。

活性化T細胞マーカーについて調べたところ、Ctla4は、9時に最も発現量が多かった。また、Pd-11と結合してT細胞からのサイトカインの生成量を低下させるPd-1とT細胞応答の負の制御因子として働くCtla4は、ともに3時の方が15時よりも発現量が多い傾向がみられ、Pd-1では有意差がみられた(図13(a),(b))。

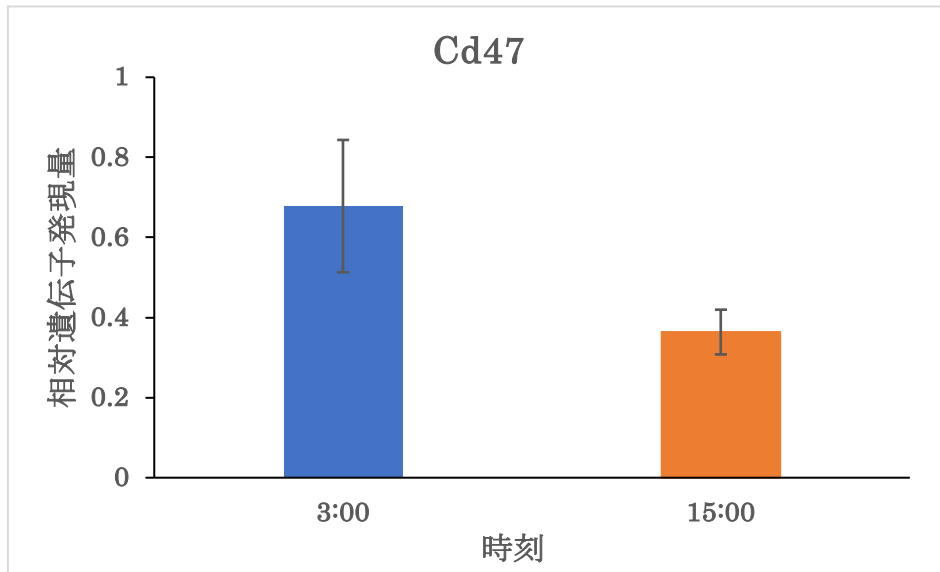
抗原情報をT細胞に伝達する樹状細胞マーカーについて調べたところ、傷害性T細胞の死滅、単球および好中球の内皮への接着に関与するCd11c、T細胞にシグナルを送りB細胞を活性化させるCd80、T細胞にシグナルを送り単球・樹状細胞を活性化させるCd86は、ともに3時の方が15時よりも発現量が多い傾向がみられ、Cd11cでは有意差がみられた(図14(a),(b),(c))。

抗原情報をT細胞に伝達するマクロファージマーカーについて調べたところ、感染防御機構であるM1マクロファージマーカーのArg1は有意差はみられなかったが、3時に最も発現量が多い傾向がみられた。

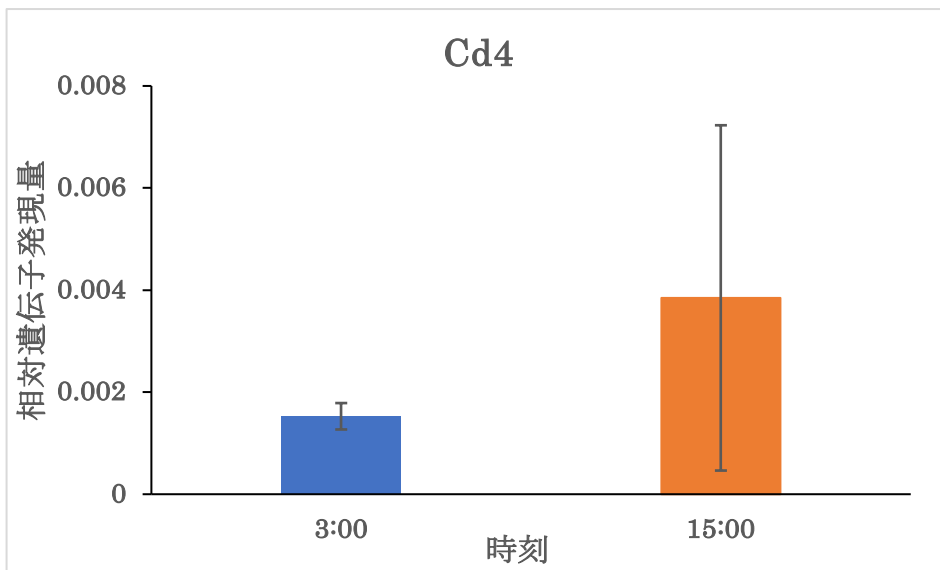
その他の免疫関連遺伝子について調べたところ、免疫細胞に発現し、がん細胞の遊走に関わるCxcr2は15時の方が3時よりも発現量が多い傾向がみられ、同じく免疫細胞に発現し、がん細胞の遊走に関わるCxcr4は3時の方が15時よりも発現量が多い傾向がみられた。

以上の結果より、T細胞マーカーであり、免疫応答の中心であるCd4やがん細胞の遊走に関わるCxcr2では、治療効果との相関性はみられなかった。

(a)



(b)



(c)

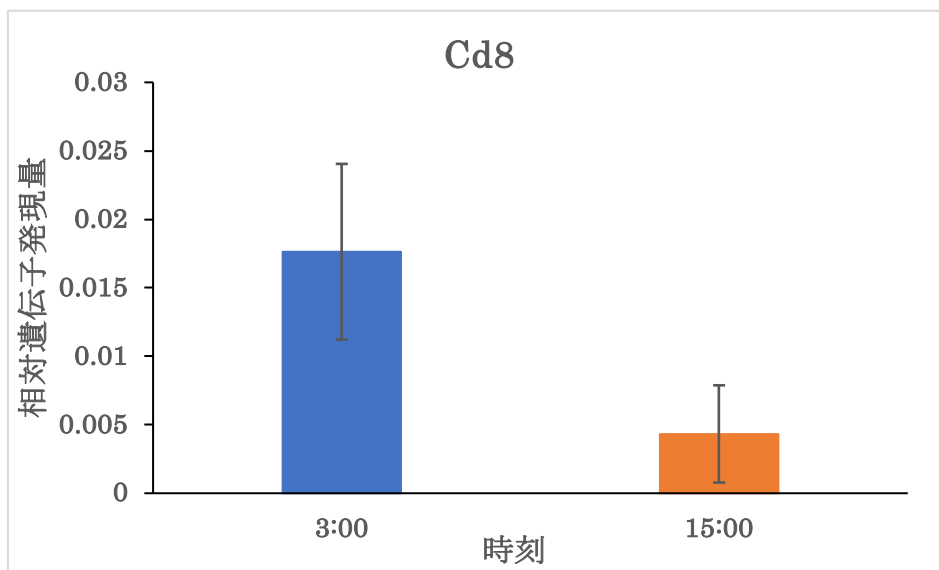


図 12.リンパ球・T 細胞マーカー遺伝子の日周変動(n=3)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析で得られたマウス腫瘍のリンパ球マーカー遺伝子(図12(a))、ヘルパーT細胞マーカー遺伝子(図12(b))、キラーT細胞マーカー遺伝子(図12(c))の発現量を示している。

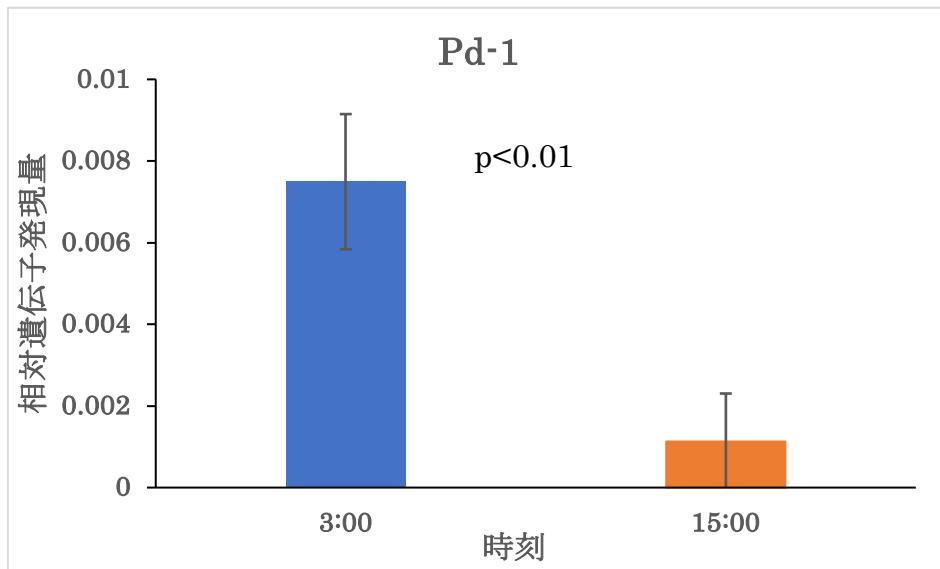
(a)はCd47、(b)はCd4、(c)はCd8の相対遺伝子発現量を示す。

(a)、(b)、(c)ともに有意差はみられなかった。

縦軸はHrpt1の発現量を1とした時の相対遺伝子発現量、横軸は時刻を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

(a)



(b)

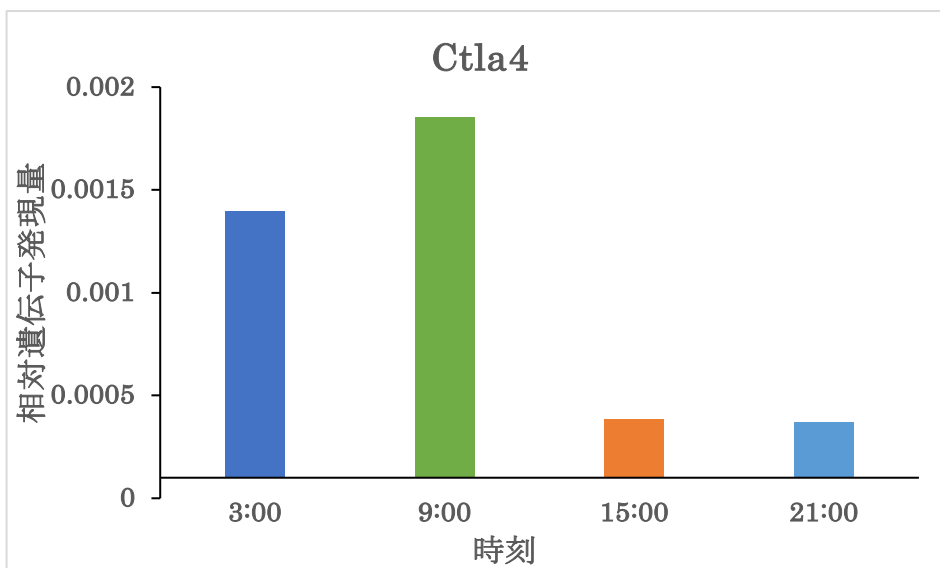


図 13.活性化 T 細胞マーカー遺伝子の日周変動 ((a) n=3, (b) n=1)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析で得られたマウス腫瘍の活性化T細胞マーカー遺伝子(図13(a),(b))の発現量を示している。

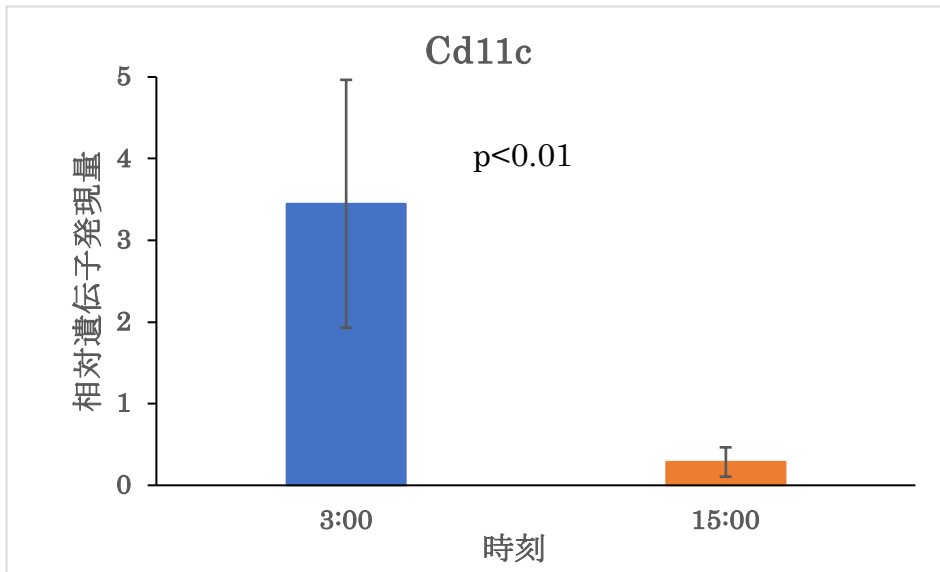
(a)はPd-1、(b)はCtla4、の相対遺伝子発現量を示す。

(a)は有意差がみられたが、(b)は有意差はみられなかった。

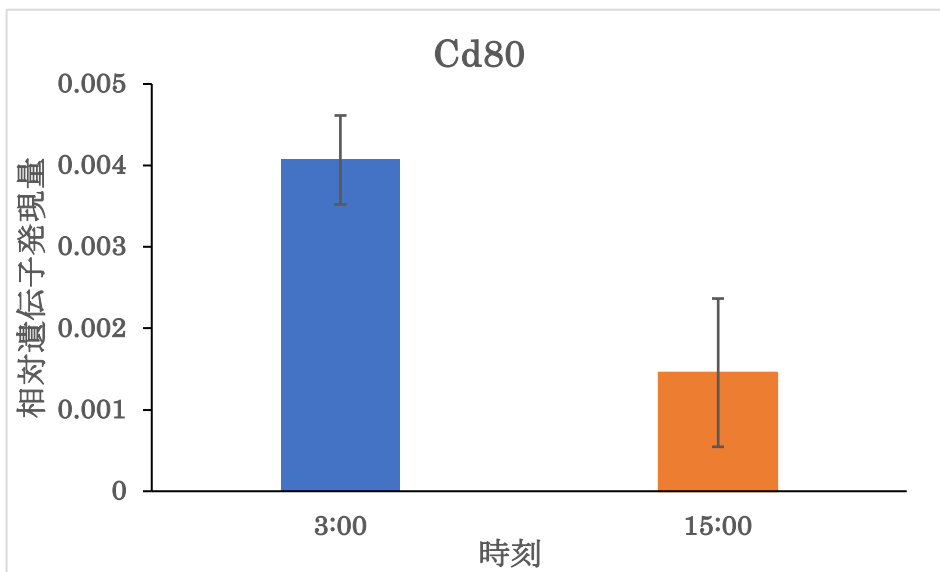
縦軸はHrpt1の発現量を1とした時の相対遺伝子発現量、横軸は時刻を示す。

エラーバーは標準偏差を示す。

(a)



(b)



(c)

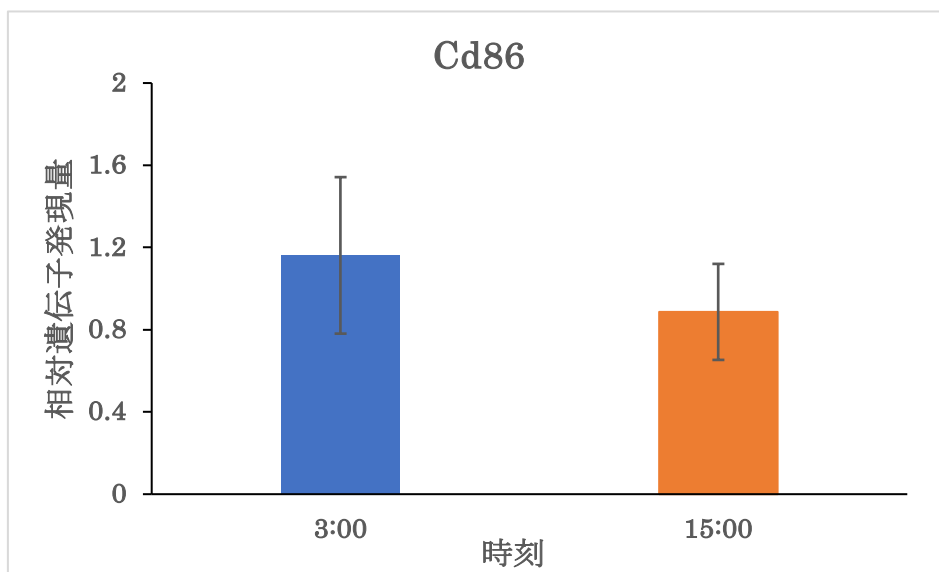


図 14.樹状細胞マーカー遺伝子の日周変動(n=3)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析で得られたマウス腫瘍の樹状細胞マーカー遺伝子(図14(a),(b),(c))の発現量を示している。

(a)はCd11c、(b)はCd80、(c)はCd86の相対遺伝子発現量を示す。

(a)は有意差がみられたが、(b),(c)は有意差はみられなかった。

縦軸はHrpt1の発現量を1とした時の相対遺伝子発現量、横軸は時刻を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

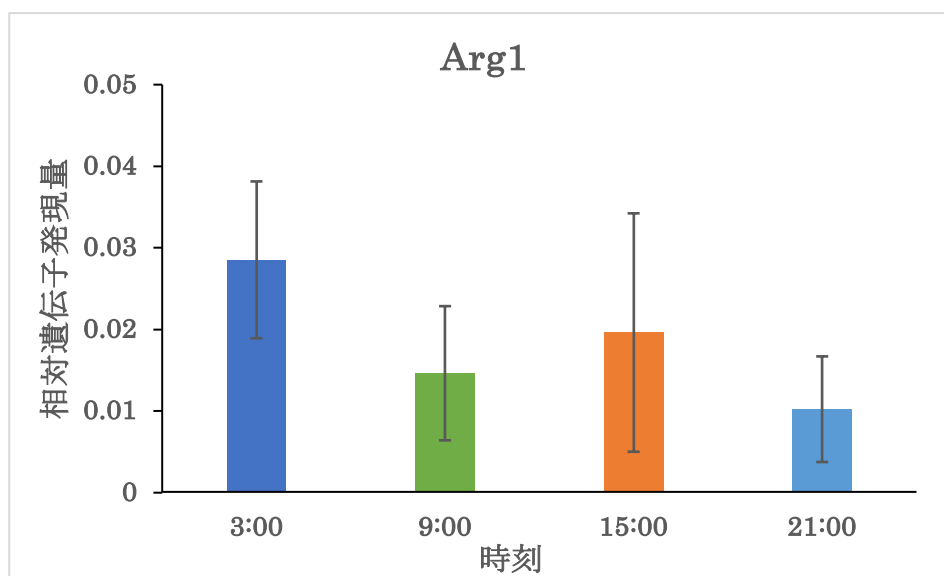


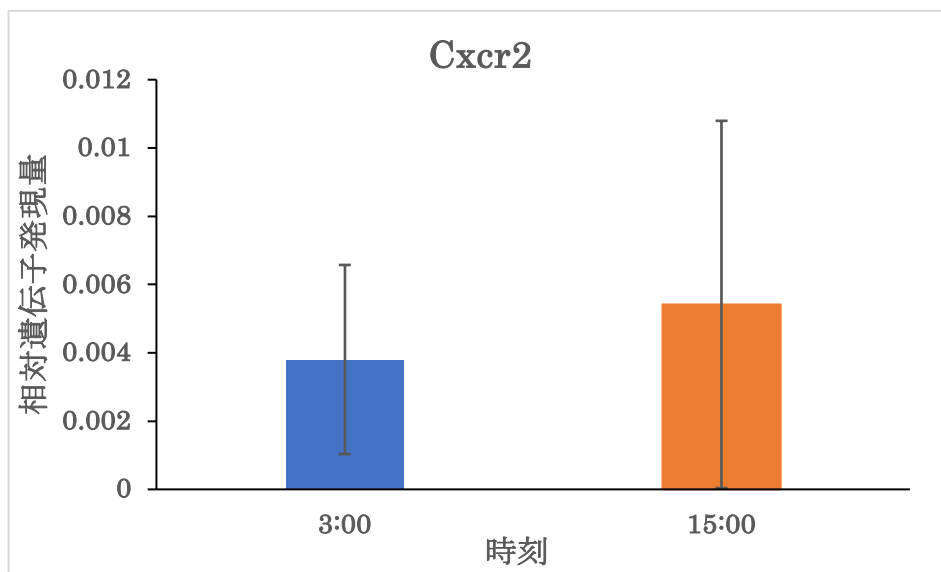
図 15. マクロファージマーカー遺伝子の日周変動 (n=3)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析で得られたマウス腫瘍のマクロファージマーカー遺伝子 Arg1 の発現量を示している(図 15)。

有意差はみられなかった。

縦軸は Hrpt1 の発現量を 1 とした時の相対遺伝子発現量、横軸は時刻を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

(a)



(b)

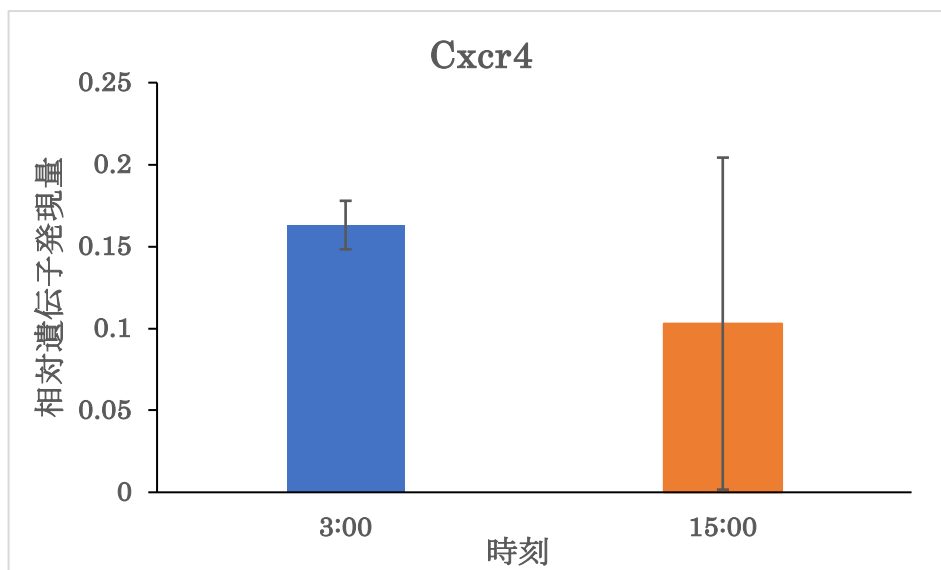


図 16. その他の免疫関連遺伝子の日周変動 (n=3)

SCCVII細胞を移植したマウスの腫瘍を7日後の3時・9時・15時・21時に取り出し、RNA抽出・精製、cDNA合成後、遺伝子発現解析で得られたマウス腫瘍の免疫細胞に発現する遺伝子(図16(a),(b))の発現量を示している。

(a)はCxcr2、(b)はCxcr4の相対遺伝子発現量を示す。

(a),(b)ともに有意差はみられなかった。

縦軸はHrpt1の発現量を1とした時の相対遺伝子発現量、横軸は時刻を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

【考察】

腫瘍内の免疫細胞マーカーの遺伝子解析では、免疫応答の中心である Cd4 が放射線がん治療効果と相関性はみられないという仮説とは異なる結果となった。しかし、今回の実験結果は、Cd4 と放射線がん治療効果との相関性を完全に飛程するものではないと考えている。何故なら、今回の実験では放射線を照射していない場合の腫瘍内の免疫細胞の日内変動について調べたのであり、放射線を照射した後の腫瘍内の免疫細胞の日内変動については調べていない。そして免疫細胞は、放射線を照射することで、腫瘍内への浸潤性および活性化が高まることが知られているため、照射後の腫瘍内の免疫細胞はどの時刻においても上昇し、さらに各時刻による免疫細胞の変動もより顕著にみられるのではないかと考えている。そのため、今回の実験結果だけでは、評価するのは困難である。

一方で、放射線照射を受けた腫瘍微小環境においても、抗炎症作用をもたらす M2 マクロファージを活性化させることで、腫瘍の増殖を促進させるという報告もあり(26)、全ての免疫系が放射線によって抗腫瘍効果の向上に働くわけではないのである。

また、放射線に関与している免疫系の中でも、特に重要な役割を持つものもあるとされている。T 細胞や NK 細胞から分泌されるサイトカインである IFN γ が放射線がん治療において重要な役割を果たしており、IFN γ がノックアウトされたマウスでは、放射線照射による治療効果は見られないという報告もされている(31)。

以上のように、免疫系の放射線への関わり方は種類によって様々であるため、様々な免疫細胞の放射線への関与の有無について調べながら、腫瘍内の免疫細胞の日内変動と放射線治療効果の日内変動の相関性について今後も検討を行う必要がある。

【総括】

以上の結果から、炭素イオン線の照射時刻によるがん治療効果の変動を検証し、日中よりも夜間に照射した方が高い治療効果が得られることが明らかになった。さらに、腫瘍内の細胞周期と抗酸化能が日内変動していることを明らかにし、放射線がん治療効果と相関性があることが示唆された。

一方で、本研究の臨床応用への課題は多い。その一つとして生活リズムが挙げられる。個人によって睡眠や食事の時間が異なるため、生体機能変動し、治療効果も影響を及ぼすと考えられる。そこで、同様の問題が生じている化学療法では、テーラーメイド治療を取り入れ始めている。テーラーメイド治療とは、個々の患者の体質や病態を調べることで、最適な治療法をデザインする方法である。生体機能の日内変動を予測するために時計遺伝子などの遺伝子情報を網羅的に把握して治療を行っており(2)、コストなど課題も多いが、放射線治療への活用も期待できる。さらに、細胞種間の日内変動の違いについても検討する必要がある。正常細胞とがん細胞では、日内変動が異なることが知られている。そのため、正常細胞の日内変動について解析し、正常細胞の放射線感受性が低い時間帯を推測することで、放射線による正常細胞へのダメージの更なる軽減が期待できる。さらに、がん細胞の中でも種類によって増殖速度が異なるため、日内変動が異なることが予測される。よって、細胞ごとによって放射線治療の最適な時刻を検討する必要がある。

今後、重粒子線および放射線がん治療の発展に向けて、細胞周期・抗酸化能をはじめとした腫瘍内の放射線感受性に関わる標的マーカーの開発の検討をする必要である。さらに、メラトニンやコルチゾールなど血液中の分子でも日内変動が生じることが知られており(32)、(33)、様々な検査で採取される血液中の日内変動も解析することで、個人の日内変動解析の簡易化に繋がると考えられる。

これらの研究が進んでいくことで、治療時刻の最適化を可能にし、重粒子線および放射線がん治療の成績向上が期待できる。

【謝辞】

本修士論文は、私が東邦大学 大学院 理学研究科 生物分子科学専攻 在学中に、国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 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で行った研究をまとめたものです。

本学 藤崎真吾 教授には、量子医科学研究所で研究を行う機会をいただきました。また、研究室セミナーにて、本実験に関してのアドバイスをいただきました。心より感謝申し上げます。

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 下川卓志 グループリーダーには、本研究所に私を受け入れてくださり、本研究の実施および修士論文ご指導していただきました。また、実験に対するご指導だけでなく、礼儀作法や私の将来についても真摯にアドバイスをしていただきました。心より感謝申し上げます。

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 小林亜理紗 主任研究員には、実験や学会のポスター作成に関する相談を何度も聞いていただき、適切なアドバイスしていただきました。心より感謝申し上げます。

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 鈴木沙彩 技術員には、研究を行いやすい環境を作ってください、研究以外の相談も真摯にアドバイスしていただきました。心より感謝申し上げます。

東邦大学 理学部 分子生物科学科 佐野太陽君には、実験の準備を始め、研究のサポートをしてもらいました。ありがとう。

生物研究推進室 森竹浩之様には、実験動物棟でのマウス飼育のご指導をして頂きました。また、私が困っている時には相談に乗って頂きました。心より感謝いたします。

その他、量子医科学研究所・放射線医学研究所、藤崎研究室の皆様には、心より感謝申し上げます。

家族には、私の希望に応じて大学院まで進学させて頂きました。さらに、通学距離が遠いだけでなく不規則な実験もあるため、不規則な生活リズムになることが多くありましたが、それに合わせて食事などの身の回りのサポートをして頂きました。私を信頼し、応援してくれた家族にはとても感謝しています。今まで育てて頂き、ありがとうございました。

【業績】

[原著論文]

A²¹¹At-labelled mGluR1 inhibitor induce cancer senescence to elicit long-lasting anti-tumor efficacy.

Lin Xie, Lulu Chang, Kuan Hu, Masayuki Hanyu, Yiding Zhang, Masayuki Fujinaga, Katuyuki Minegishi, Takayuki Ohkubo, Kotaro Nagatsu, Cuiping Jiang, Takashi Shimokawa, Kazuma Ashishuke, Noriyuki Okonogi, Shigeru Yamada, Feng Wang, Rui Wang, Ming-Rong Zhang

Cell Rep Med. 2023;4(4):100960.

DOI: 10.1016/j.xcrm.2023.100960

[研究・技術・調査報告]

1. 次世代重粒子線治療実施に向けた生物学的データの取得

下川 卓志, 住吉 晃, 森岡 孝満, 飯山 恵, 足助 一真, 鶴澤 玲子, パラジュリ
ラジュ クマル, 青木 伊知男

2021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, 量子
医科学研究所, 2023-2:48-49

[口頭発表]

1. 重粒子線照射による免疫チェックポイント関連遺伝子の発現変動解析

足助 一真, 黒澤ふき, 藤崎真吾, 白井敏之, 下川卓志

日本量子医科学会第1回学術大会, 日本量子医科学会 2021-12-10

優秀演題発表賞

2. 次世代重粒子線治療実施に向けた生物学的データの取得

下川 卓志, 住吉 晃, 森岡 孝満, 飯山 恵, 足助 一真, 鶴澤 玲子, パラジュリ
ラジュ クマル, 青木 伊知男

2021年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会, 量子科学技術研究開発機構,
2022-5-30

3. 炭素線照射による腫瘍免疫応答の解析

中島 菜花子, 下川 卓志, 謝 琳, 足助 一真, 武島 嗣英, 長谷川 純崇

2022 年度重粒子線がん治療装置等共同利用成果報告会, 量子科学技術研究開発機構, 2023-5-30

4. 放射線によるがん根治を目指して～放射線-免疫併用療法の可能性と基礎研究における課題

下川 卓志, 中島 菜花子, 謝 琳, 鈴木 沙彩, 小林 亜利紗, 足助 一真, 劉 暢, 長谷川 純崇, 張 明栄, 白井 敏之

第 51 回放射線による制癌シンポジウム, 日本放射線腫瘍学会, 2023-06-24

5. mGluR1 陽性ヒト癌に対する ^{211}At -AITM によるがん種横断的な標的アイソトープ治療の開発

謝 琳, 破入 正行, 張 一鼎, 藤永 雅之, 峯岸 克行, 大久保 崇之, 永津 弘太郎, 下川 卓志, 足助 一真, 山田 滋, 小此木 範之, 張 明栄

令和 5 年部門交流会, 量子科学技術研究開発機構, 2023-7-20

6. 放射線がん治療の向上を目指した放射線感受性因子の日内変動解析

足助 一真, 佐野太陽, 馬 立秋, 鈴木 沙彩, 小林 亜利紗, 藤崎 真吾, 下川 卓志

フリーラジカルスクール 2023, 日本酸化ストレス学会 若手の会, 2023-11-12
優秀演題賞

7. mGluR1 陽性ヒト癌に対する ^{211}At -AITM による標的アイソトープの検証

謝 琳, 破入 正行, 張 一鼎, 藤永 雅之, 峯岸 克行, 大久保 崇之, 永津 弘太郎, 下川 卓志, 足助 一真, 張 明栄

第 63 回日本核医学会学術総会, 日本核医学会, 2023-11-18

[ポスター発表]

1. 重粒子線免疫併用療法に資する ^{64}Cu -PD1 PET 画像バイオマーカーの開発

謝 琳, 破入 正行, 中島 菜花子, 張 一, 足助 一真, 國府田 知美, 下川 卓志, 張 明栄

日本量子医科学会第 2 回学術大会, 日本量子医科学会, 2022-12-09

2. 重粒子線-免疫併用療法のための早期治療効果予測マーカーの検討
Liu Chang, Xie Lin, Yiding Zhang, Kumata Katsushi, Nengaki Nobuki,
Ashisuke Kazuma, Shirai Toshiyuki, Zhang Ming-Rong, Shimokawa
Takashi
日本量子医科学会第2回学術大会, 日本量子医科学会, 2022-12-09

3. Impact of circadian changes in tumor on therapeutic efficacy of the
Carbon-ion radiotherapy
足助 一真, 佐野 太陽, 馬 立秋, 鈴木 沙彩, 小林 亜利紗, 藤崎真吾, 下川 卓
志
日本放射線影響学会第66回大会, 日本放射線影響学会, 2023-11-07

[受賞歴]

1. 重粒子線照射による免疫チェックポイント関連遺伝子の発現変動解析
足助 一真, 黒澤ふき, 藤崎真吾, 白井敏之, 下川卓志
日本量子医科学会第1回学術大会, 日本量子医科学会 2021-12-10
優秀演題発表賞
2. 放射線がん治療の向上を目指した放射線感受性因子の日内変動解析
足助 一真, 佐野太陽, 馬 立秋, 鈴木 沙彩, 小林 亜利紗, 藤崎 真吾, 下川 卓
志
フリーラジカルスクール 2023, 日本酸化ストレス学会 若手の会, 2023-11-12
優秀演題賞

【参考文献】

1. 厚生労働省, 人口動態統計月報年計(概数)の概況, 2019
2. 長谷川正俊, 放射線療法 2017 改訂第 7 版, 秀潤社
3. 大西武雄, 放射線医科学の事典 放射線および紫外線・電磁波・超音波, 朝倉書店
4. QST, 重粒子線がん治療装置 HIMAC パンフレット
5. Rahn DA., Gamma knife radiosurgery for brain metastasis of nonsmall cell lung cancer: is there a difference in outcome between morning and afternoon treatment? *Cancer*, 2011;117(2):414-20
6. YanLing Z., Synergistic effect of combination topotecan and chronomodulated radiation therapy on xenografted human nasopharyngeal carcinoma. *J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013;1-87:356-62
7. Lee Y., Time-of-day specificity of anticancer drugs may be mediated by circadian regulation of the cell cycle. *Sci adv*, 2021;12:7(7)
8. 大戸茂弘・吉山友二, 時間療法の基礎と実践, 丸善株式会社
9. Nakagawa H., 24 hour oscillation of mouse methionine aminopeptidase2, a regulator of tumor progression, is regulated by clock gene proteins. *Cancer Res* 2004;64:8328-8333
10. Ohdo S., Chrono-drug-delivery focused on biological clock: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010;62:885-897
11. 環境省, 放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料 (平成 30 年度版)
12. Sinclair WK., X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1966;29:450-474.
13. Sinclair WK., Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat Res*. 1968;33:620-643.
14. Kaufmann WK., Paules RS. DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J* 1996;10:238-247.
15. Zhang M., CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *Am J Cancer Res*. 2021;11(5):1913-1935
16. 吉川敏一, 酸化ストレスの医学 改訂第 2 版, 診断と治療社
17. Pengying L, NAC selectively inhibit cancer telomerase activity: A higher redox homeostasis threshold exists in cancer cells, *Redox Biol.*2015;8:91-97

18. Chen DS., Oncology meets immunology : the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39:1-10
19. Sridharan V., Immune effects of targeted radiation therapy for cancer. *Discov Med*. 2015;19(104):219-28
20. Miller RA., Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66(2):191-201
21. P Finkel., The dual role of NK cells in antitumor reactions triggered by ionizing radiation in combination with hyperthermia. *OncoImmunology*. 2016;5:e1101206
22. Lorimore SA., Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene*. 2001;20:7085–7095
23. Farooque A., Polarization of macrophages towards M1 phenotype by a combination of 2-deoxy-d-glucose and radiation: Implications for tumor therapy. *Immunobiology*. 2016;221:269–281
24. Klug F., Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell*. 2013;24:589–602
25. Rastogi S., Interactions of apoptotic cells with macrophages in radiation-induced bystander signaling. *Radiat Res*. 2013;179:135–145
26. Tsai CS., Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2007;68:499–507
27. Lee Y., Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8(+) T cells: changing strategies for Cancer treatment. *Blood*. 2009;114:589-595
28. Kamrava M., Combining radiation, immunotherapy, and antiangiogenesis agents in the management of cancer: the Three Musketeers or just another quixotic combination? *Mol Biosyst* 2009;5:1262–1270
29. Movahedi K., Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008;111:4233–4244

30. Yoshimoto Y., Radiotherapy-Induced Anti-Tumor Immunity Contributes to the Therapeutic Efficacy of Irradiation and Can Be Augmented by CTLA-4 Blockade in a Mouse Model. 2014, 9(3): e92572
31. Gerber AG., IFN- γ Mediates the Antitumor Effects of Radiation Therapy in a Murine Colon Tumor. *Am J pathol.* 2013;182:2345-2354
32. Kennaway DJ., Circadian Rhythm of Free Melatonin in Human Plasma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998;83:1013-15
33. Bocci V., et.al., Administration of interferon at night may increase its therapeutic index. *Cancer Drug Deliv.* 1985;2:313-6