

## 기관고유연구사업 결과보고서

(과제번호 : 0610270)

연구과제명 (국문): 양성자선의 상대적 생물학적 효과에 대한 연구

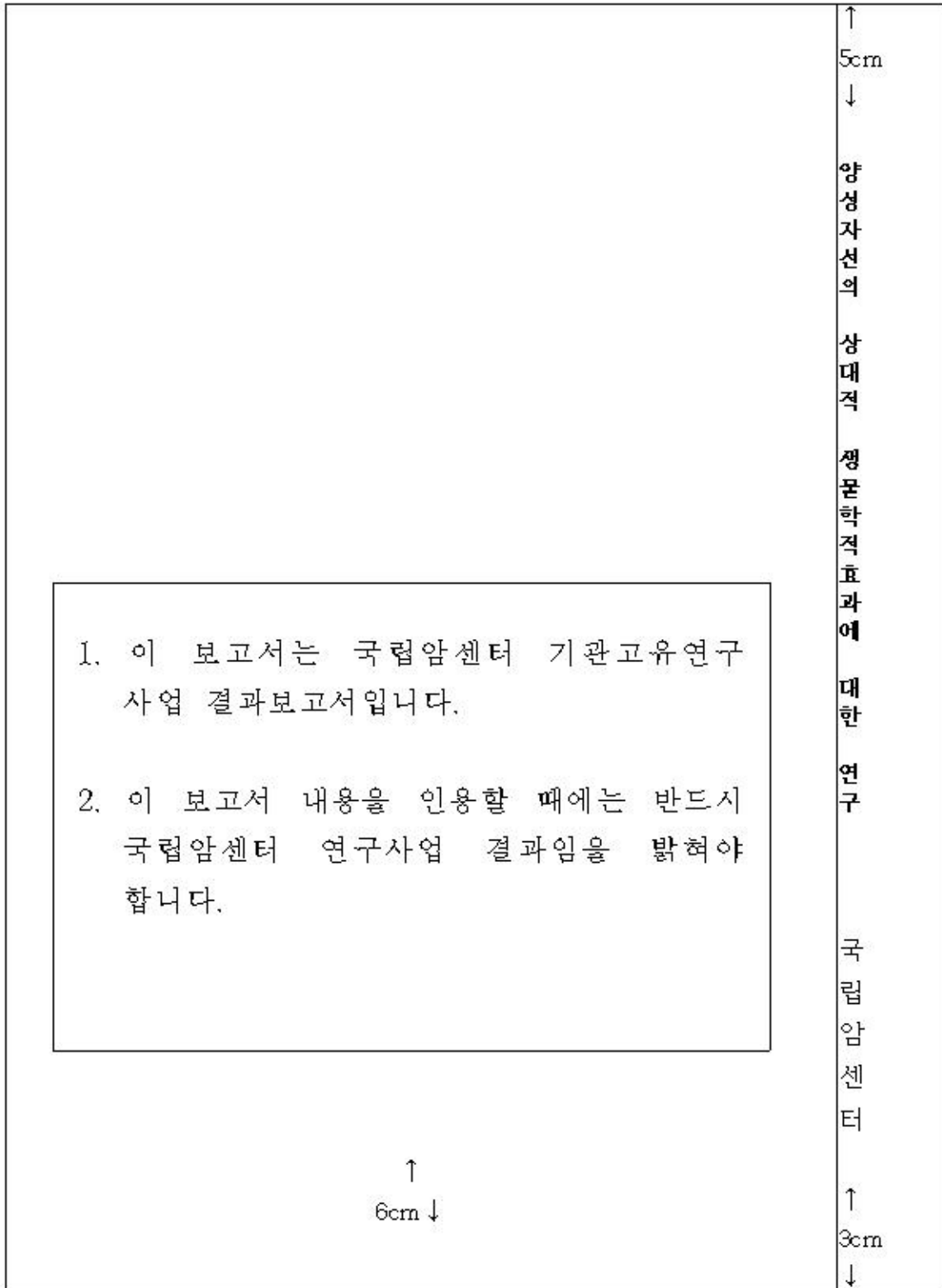
연구과제명 (영문): Relative Biological Effectiveness (RBE) of Proton  
Beam

과제책임자 : 조관호

국립암센터

(뒷면)

(측면)



# 제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “양성자선의 상대적 생물학적 효과에 대한 연구” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2008. 12. 31

국립암센터

과제책임자 : 조관호

## 목 차

### < 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구사업의 최종목표
2. 연구사업의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

## < 요약 문 >

연구분야(코드)		과제번호	0610270
과제명	<b>양성자선의 상대적 생물학적 효과에 대한 연구</b> <b>(Relative Biological Effectiveness (RBE) of Proton Beam)</b>		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2006년 1월 1일 ~ 2008년 12월 31일	
	1차년도	2006년 1월 1일 ~ 2006년 12월 31일	
	2차년도	2007년 1월 1일 ~ 2007년 12월 31일	
	3차년도	2008년 1월 1일 ~ 2008년 12월 31일	
과제책임자	성명	조관호	주민등록번호
	전화번호	031-920-1720	전자우편
			kwancho@ncc.re.kr
색인단어	국문	상대적 생물학적 효과, 양성자	
	영문	<b>Relative Biological Effectiveness (RBE), Proton Beam</b>	
<p><b>◆ 연구목표</b></p> <p>&lt;최종목표&gt;  국립암센터 양성자 센터의 양성자선의 상대적 생물학적 효과 (relative biological effectiveness: RBE) 측정을 통한 양질의 양성자치료를 환자에 제공</p> <p>&lt;당해년도 목표&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 양성자선의 <i>in vivo</i> RBE 측정</li> <li>- 암 억제 유전자 변이에 따른 RBE 변화 여부 측정</li> </ul>			
<p><b>◆ 연구내용 및 방법</b></p> <p>국립암센터에 양성자치료기가 국내 최초로 도입되어 환자치료에 이용되고 있음. 양성자치료에서 사용되는 방사선량은 등가선량 (equivalent dose) 인데, 이는 cobalt-60 치료로 환산한 CGE (cobalt Gy equivalent) 또는 X-ray 치료로 환산한 GE (Gy equivalent) 를 사용. 이 때 등가 선량은 양성자 흡수선량 x RBE (relative biological effectiveness) 의 공식으로 환산. 따라서 RBE 값을 명확히 규명하는 것은 양성자 치료에 있어서 필수적인 요소임. 보통 임상적으로 이용되는 양성자의 RBE는 1.0-1.1로 보고됨. RBE는 방사선의 종류, 방사선 흡수선량, 분할치료 방법, 생물학적 시스템 (biological system), 관찰하고자하는 최종 목표등에 의해 차이가 생김. 그러므로 새로운 시설에 발생하는 양성자선에 대한 RBE 검증과 측정이 필수적이며 본 과제는 국립암센터의 양성자선을 세포를 이용하는 <i>in vitro</i> system과 mouse intestinal crypt 세포를 이용하여 측정하는 <i>in vivo</i> system을 이용하여 RBE 측정.</p> <p><b><u>in vitro system을 사용한 RBE의 측정</u></b></p> <p>HSG 세포를 25 cm<sup>2</sup>의 플라스크에 10<sup>6</sup> cells로 심은 후 양성자와 X-선을 조사. 이 후 trypsin (0.25%) 으로 세포를 부유시킨 후 세포의 수를 세어 각 60 mm 배양용기마다 160개의 세포를 배양. 약 2 주간의 세포 배양을 통해 각 세포의 colony가 형성 되었는지를 methanol로 고정, Giemsa (Fluka) 염색으로 확인.</p>			

colony중 50개 이상의 세포로 이루어진 colony를 surviving colony로 추정하고 각 dose에 해당되는 colony의 수는 각기 다른 3개의 그룹의 결과를 평균으로 하여 추산 하여 RBE 측정.

**in vivo system을 사용한 RBE의 측정**

방사선조사를 위해 특별히 고안된 틀에 쥐를 고정하고 전체조사 한 후에 공장을 채취하여 일정 길이로 자르고 각 section에서 존재하는 crypt의 수를 측정하여 RBE 값을 계산. 양성자는 치료에 가장 빈번히 사용되는 190 MeV, spread out Bragg peak (SOBP)를 6 cm 너비로 조정하여 양성자를 조사하고 선형가속기 6 MeV X-선을 대조군으로 이용.

쥐는 방사선에 대한 생존곡선 (survival curve) 을 얻기 위해 방사선 민감도에 따라 0, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 Gy 선량에서 분율을 구함. 생존분율 (surviving fraction)은 관찰되는 crypt의 수를 측정하여 구함.

**방사선 반응 유전자 돌연변이에 의한 RBE의 변화 측정**

방사선 치료는 방사선에 의한 세포치사 반응의 하나로 이 반응에 관련된 여러 가지 유전자가 이미 알려졌으며 이 유전자들은 대개 암에서 빈번히 돌연변이 되는 유전자임이 알려짐. 따라서 방사선 반응유전자의 돌연변이는 방사선 처치의 추이를 결정하는 중요한 요소라 생각되며 이의 돌연변이에 의해 양성자의 RBE 값의 변화가 있는지 측정해 보고자 함. 이러한 시도는 방사선 반응 유전자들이 돌연변이에 따른 방사선의 선택이 중요한 치료효과의 차이를 보이는지를 알 수 있는 효율적인 접근으로 생각됨. 이를 위해 현재 방사선의학 연구과에서 보유하고 있는 Chk2 유전자가 특이적으로 돌연 변이된 knockout mice를 이용하여 RBE를 측정하여 상호 비교.

**◆ 연구성과**

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수		
IF 합		
기타 성과		

-정성적 성과

1. 국립암센터 양성자 치료기의 RBE 측정 완료.
2. RBE를 통한 국립암센터 양성자치료기의 적절성 확인.
3. 유전적 변이가 방사선의 감수성과 RBE에 미치는 영향 확인.

**◆ 참여연구원**

(최종연도 참여인원)

성 명 김상수, 백혜정, 오빛나리

주민등록번호

## Project Summary

<b>Title of Project</b>	Relative Biological Effectiveness (RBE) of Proton Beam
<b>Key Words</b>	Relative Biological Effectiveness (RBE), Proton Beam
<b>Project Leader</b>	Cho, Kwan Ho
<b>Associated Company</b>	Radiation Medicine Branch, National Cancer Center
<p><b>Purpose:</b> Estimation of the relative biological effectiveness (RBE) of the proton beam at the National Cancer Center Proton Therapy Center in Korea (NCCPTC) is required clinically for the treatment of cancer.</p> <p><b>Materials and Methods:</b> The proton beam was fixed at 190 MeV with 6 cm spread out Bragg peaks (SOBP) for expecting most frequent clinical condition. The RBE was estimated from the survival of human salivary gland (HSG) cells using the traditional colonogenic and MTT assays. The HSG cells were irradiated in a cell-stack chamber at a defined depth and monitored for survival to identify whether the characteristic depth-dose profile was observed. In addition, western blot, FACS analysis, and <math>\gamma</math>-H2AX staining were performed to assess cell cycle arrest and DNA damage. The RBE was also estimated from the survival of mice crypt in jejunum of wild type of C3He mice and Chk2 knockout mice.</p> <p><b>Results:</b> The RBE of the NCCPTC from the cell culture was estimated to be <math>1.024 \pm 0.007</math> and <math>1.049 \pm 0.028</math> at the middle of SOBP using colonogenic and MTT assays, respectively. Further analysis on the biological response of proton exposure revealed no difference compared to conventional X-ray treatment in western blot, and FACS analysis. The proton beam of the NCCPTC also exhibited the characteristic depth-dose profile. Interestingly, we also found that plateau region showed the survival protection in proportion to physical dose resulting from DNA repair in sub-lethal dose exposure. The RBEs of the NCCPTC using the mice crypt were estimated to be 1.10 and 1.05 at the middle of SOBP using wild type mice (C3He) and <i>chk2</i> knockout mice, respectively.</p> <p><b>Conclusion:</b> The RBE values of the NCCPTC are comparable with other proton therapy facilities worldwide. The determined RBE of the NCCPTC is assigned as a value of 1.1 for the representative clinical RBE value.</p>	

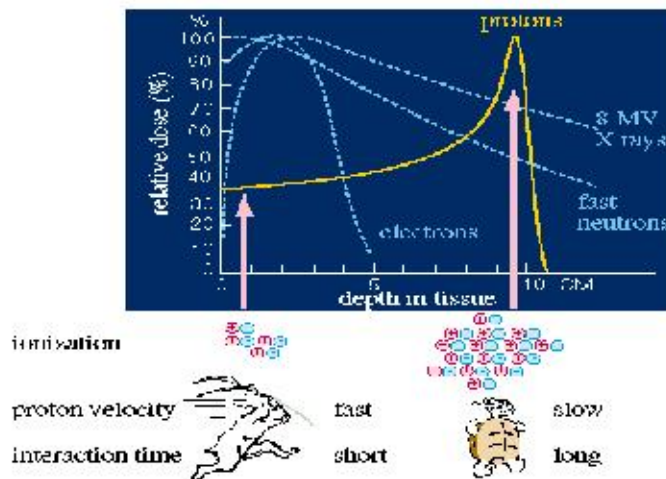
## 1. 연구사업의 최종목표

**최종목표** : 양성자선의 상대적 생물학적 효과(relative biological effectiveness: RBE)에 대한 명확한 검증을 통해 양질의 양성자치료를 환자에 제공

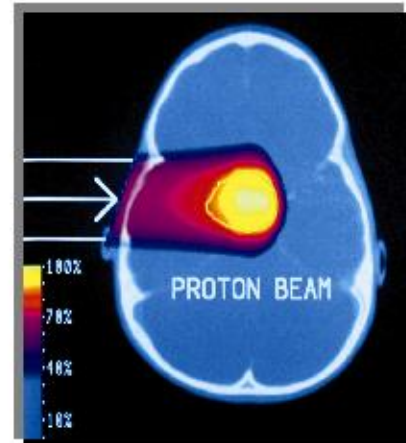
## 2. 연구사업의 내용 및 결과

### A. 연구사업의 필요성

방사선이 암치료에 처음 사용된 이래 많은 발전을 거듭하였다. 최근에는 3차원 입체조형 방사선치료 (3-D conformal radiotherapy), 강도변조방사선치료 (intensity modulated radiotherapy) 등이 개발되어 예전에 비해 완치율을 높이면서 부작용은 줄일 수 있게 되었다. 현재 전체 암환자의 반 정도가 완치적 또는 고식적 방사선치료를 받게 되고, 종양이 국소 부위에 국한된 경우 방사선치료로 50-60%의 완치율을 보이고 있다. 대개의 종양에서 선량-반응간의 연관성 (dose-response relationship)이 관찰되어, 선량을 증가시킴으로서 완치율을 향상시킬 가능성이 있다. 하지만 이 경우, 방사선 치료에 일반적으로 사용되는 x-선을 이용하면 주위 정상조직에 고 선량이 조사되어 합병증이 증가할 우려가 있다. 왜냐하면 전자파 (electro-magnetic wave)의 일종인 고 에너지 x-선은 종양에 도달하기 전, 정상조직에 최대 선량이 투입되고, 종양을 통과한 이후 정상조직에도 상당량의 방사선노출을 피할 수 없기 때문이다. 이와는 달리, 입자 (particle)방사선인 양성자선은 종양 앞에 있는 정상조직 통과 시 적은 선량을 투입하다가, 가속된 입자가 종양에서 정지하는 순간 최대 선량을 투입하고 소멸되어, 종양 이후의 조직에는 전혀 방사선 노출이 없는 것이 그 특성이다. 이를 브래그 피크라 한다 (그림 1, 2).



(그림 1)



(그림 2)

이러한 입자방사선 고유 물리학적성질을 이용하면 부작용의 증가 없이, 방사선량을 높여 종양의 완치율을 향상시킬 수 있다. 그리고 일반적으로 부작용을 줄임으로서 치료 후 삶의 질도 향상시킬 수 있다.

최근 국립암센터에 양성자치료기가 국내 최초로 도입되어 환자치료에 이용되고 있다. 이의



임상적용을 위해 기존 x-ray에 대한 양성자선의 상대적 생물학적 효과 (relative biological effectiveness: RBE)의 검증이 선행되어야 한다. 방사선의 흡수선량의 단위로 Gray (Gy = joule/kg)가 통상 사용되는데, 이는 코발트 또는 x-ray에 근거한 흡수선량이다. 하지만 양성자 또는 중성자와 같이 방사선의 종류가 달라지면 같은 흡수선량에 대한 생물학적 효과에 차이가 있으며, 이를 x-선에 비교한 상대적 생물학적 효과 (RBE)의 개념이 필요하다. RBE는 Dx-ray/Dr 로 표시되며, 즉 동등한 생물학적 효과를 얻기 위해, 필요한 x-ray 선량(Dx-ray)을 테스트 하려고 하는 다른 종류의 방사선량 (Dr)으로 나눈 비율이다. 예를 들어, 같은 생물학적 효과를 얻기 위해 x-ray로 10 Gy가 필요하고, 중성자치료로 5 Gy가 필요하다면 RBE 는 2 ( $10 \text{ Gy} / 5 \text{ Gy} = 2$ )가 된다. 따라서 RBE가 x-ray와 다른, 즉 1이 아닌 방사선을 사용할시 편의상 x-ray 흡수선량으로 환산한 등가선량 (equivalent dose)을 사용하게 되고, 이 때 (등가 선량= 흡수선량 x RBE) 의 공식으로 환산된다. 예를 들면, 어떤 종양을 중성자치료로 5 Gy를 조사하였고 중성자의 RBE가 2라고 가정하면 등가선량은 10 Gy ( $5 \text{ Gy} \times 2$ )가 된다. 양성자 치료에서 언급되는 선량 역시 등가선량인데, 이는 cobalt-60 치료로 환산한 CGE (cobalt Gy equivalent) 또는 x-선량으로 환산한 GE (Gy equivalent)를 사용한다. 보통 임상적으로 이용되는 양성자의 RBE는 1.0-1.1로 보고되고 있으나, RBE에 영향을 줄 수 있는 인자로는 방사선의 종류, 방사선 흡수선량, 분할치료 방법, 생물학적 시스템 (biological system), 관찰하고자하는 최종 목표 (end-point), 등이 있다. 따라서 RBE 값을 명확히 규명하는 것은 양성자 치료에 있어서 필수적인 요소이다. RBE를 검증하는 시스템은 크게 세포를 이용해서 검증하는 *in vitro* system 과 mouse intestinal crypt 세포 및 다른 biological system을 이용하여 검증하는 *in vivo* system 두 가지가 있다.

## B. 연구방법

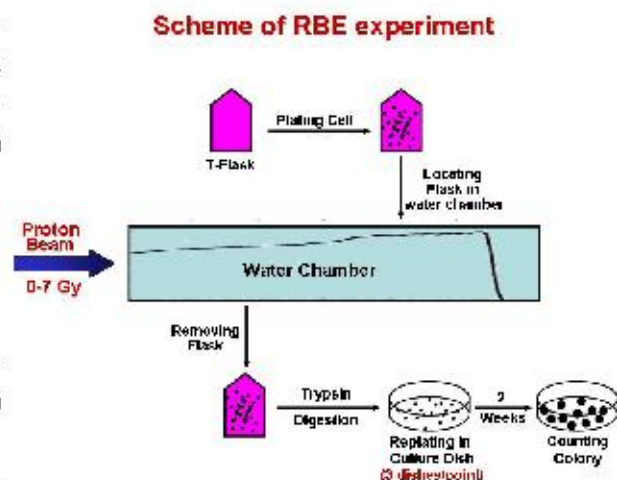
### 1) *in vitro* system

#### A) 세포 배양과 colony의 측정

*in vitro* RBE에 사용될 HSG 세포는 일본의 Human Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)에서 취득하였으며 이 세포는 DMEM, 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin (Invitrogen) 의 배양액에서 배양하였다. 세포는 25 cm<sup>2</sup>의 플라스크에 10<sup>6</sup> cells의 세포를 심은 후 방사선 조사를 하였다. 이후 trypsin (0.25%) 으로 세포를 부유시켜 Z1 coulter counter (Beckman-Coulter) 로 세포의 수를 세어 각 60 mm 배양용기마다 160 개의 세포를 배양하였다. 약 2 주간의 세포 배양을 통해 각 세포의 colony의 형성 되었는지를 methanol로 고정, Giemsa (Fluka) 염색으로 확인하였다. colony중 50개 이상의 세포로 이루어진 colony를 surviving colony로 추정하고 각 dose에 해당되는 colony의 수는 각기 다른 3개의 그룹의 결과를 평균으로 하여 추산 하였다.

#### B) MTT를 이용한 cell growth determination assay

위와 동일하게 방사선 조사된 HSG cell은 10<sup>4</sup> cell/ml의 농도로 24-well plate에 5일간 더 배양한 후 세포를 Hank's balanced salt solution (Invitrogen) 로 세척한 후 MTT용액 (0.5 mg/ml



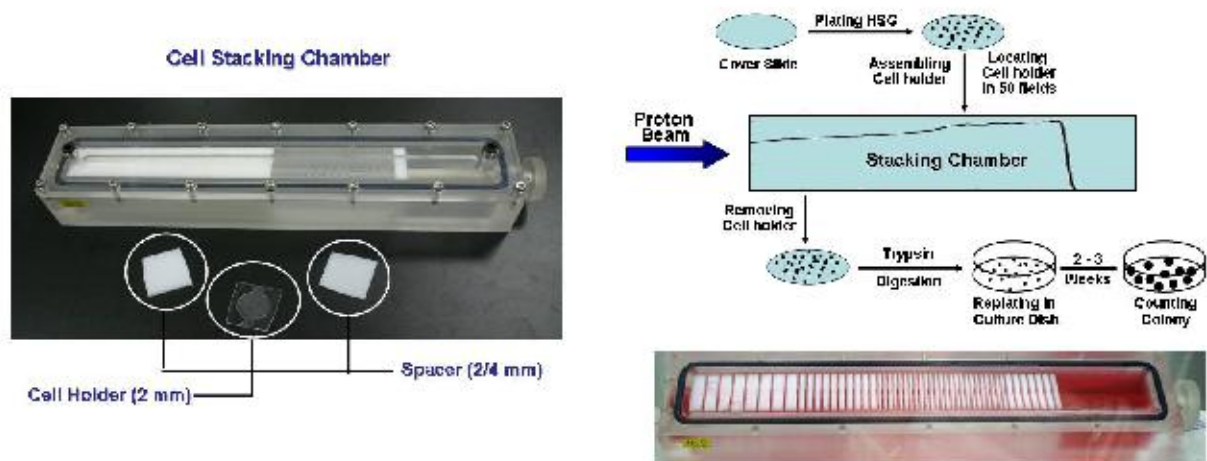
MTT in HBSS) 에서 약 1-2시간 동안 적절한 색깔이 나오도록 배양한다. 이후 생긴 MTT formazan crystal을 MTT solubilization 용액 (10% Triton X-100, 0.1 N HCl in isopropanol) 으로 완전히 녹여 spectrophotometer를 사용하여 570 nm와 690 nm 파장에서 측정값을 읽은 후 앞의 값에서 뒤의 값을 빼 준 것을 측정값으로 한다.

### C) Depth-field survival assay

먼저 양성자선은 매질에서 통과 깊이에 따라 흡수선량이 현저하게 다르므로 깊이에 따른 세포 생존분율 (surviving fraction) 변화를 측정한다. 이를 측정하기 위해서 세포를 둥근 thermanox thin plate (falcon: 직경 25 mm, 두께 1mm)에 20개 정도를 배양한다. 그 다음에 20개의 plate를 "cell stack chamber"라고 하는 특별히 고안된 acryl 용기 (그림 4)에 2 mm 간격으로 넣은후 serum을 포함하는 배지를 채워둔 후 배양한다. 특정 선량의 양성자를 조사한 후 chamber로부터 plates를 꺼내 세포를 다시 회수하여 colony 형성능력 (colony forming ability)을 측정한다.

약 10-14일 후에 생긴 colony의 수를 세어 생존 분율을 계산한다. 이렇게 하여 깊이에 따른 세포의 colony 형성 능력을 비교해 보면 특정 깊이에서 세포의 생존이 급격히 떨어지는 것을 알 수 있을 것이다. 이는 양성자선의 물리학적 특성인 브래그 피크 (bragg peak)현상에 의한 것으로, 매질을 통과하던 양성자가 멈추었을 때 주변에 최대의 이온화 현상을 유발함으로써 나타나는 현상이다.

HSG cell을 25 mm diameter 의 Thermanox plastic coverslip (Nunc) 에  $10^5$ 개의 세포를 배양한 후 아래 그림과 같이 coverslip을 cell holder를 사용하여 cell stack chamber에 장치하도록 한다. 총 50개의 다른 depth의 HSG cell을 cell-stack chamber에 장치하여 190 MeV, 6 cm SOBП 상태에서 physical dose 3.5 Gy를 조사 하였다. 조사 후에는 위의 colony측정과 같은 방법으로 각 depth에 따른 colony의 수를 측정하였다.



### D) 기타 세포 분석법

세포내의 DNA손상을 측정하기 위해 세포를 gamma-H2AX에 특이적인 항체 (Cell Signaling Technology) 를 사용하여 형광염색을 시행 하였다. 이외에 방사선의 조사에 의한 세포 주기 조절을 알아보기 위해 Western Blot과 flow cytometry를 사용한 세포 주기 분석도 병행 하였다.

### E) RBE 측정

상기한 세포주들을 이용하여 spread out bragg peak (SOBP)을 6 cm 너비로 조정하여 양성자를 조사한다. 선형가속기 6 MV X-선을 대조군으로 이용한다. 각세포주에 대한 생존곡선

(survival curve)를 얻기 위해 세포주의 방사선 민감도에 따라 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 Gy 또는 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy 선량에서 생존분율을 구한다. 그리고 각 세포주 생존곡선을 이용하여 RBE 값을 측정한다. 세포 생존 분율 (surviving fraction)을 0.1 (10%)로 낮추는 선량을  $D_{0.1}$ 로 정의한다. RBE는  $D_{0.1x}/D_{0.1p}$  로 계산하고, 여기서  $D_{0.1x}$ 는 6MV x선 선량이고  $D_{0.1p}$ 는 양성자선량이다.

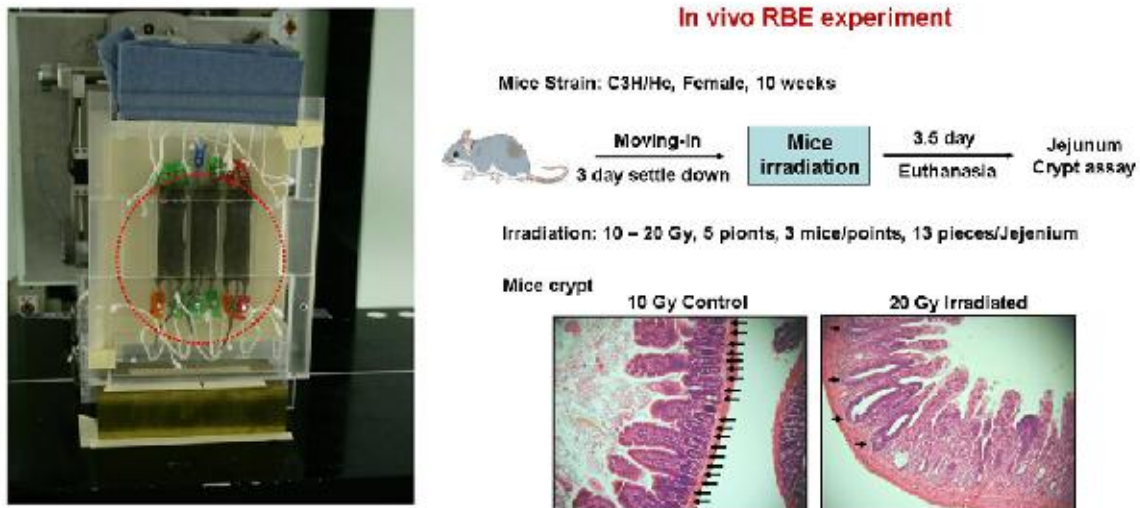
## 2) *in vivo* system

C3H/He 쥐를 전체조사 한 후에 공장 (jejunum)을 일정 길이로 자르고 각 section에서의 성장하는 crypt의 수를 측정하여 RBE 값을 계산한다. crypt의 수를 1/10로 낮추는 선량을  $D_{0.1}$ 로 정의한다. RBE는  $D_{0.1x}/D_{0.1p}$  로 계산하고, 여기서  $D_{0.1x}$ 는 6MV x선 선량이고  $D_{0.1p}$ 는 양성자선량이다.

RBE의 측정방법 중 가장 효율적이고 적합한 mouse intestinal crypt 세포 활성을 측정하는 *in vivo* system을 이용하여 RBE를 측정한다.

### A) 쥐의 방사선 조사

쥐의 방사선조사를 위해 아래와 같이 특별히 고안된 틀에 쥐를 고정하고 전체조사 한 후에 공장 (jejunum)을 채취하여 일정 길이로 자르고 각 section에서 존재하는 crypt의 수를 측정하여 RBE 값을 계산한다. 양성자는 치료에 가장 빈번히 사용되는 190 MeV, spread out Bragg peak (SOBP)이 6 cm 너비로 조정하여 양성자를 조사한다. 선형가속기 6 MeV X-선은 대조군으로 이용한다. 쥐는 방사선에 대한 생존곡선 (survival curve)을 얻기 위해 방사선 민감도에 따라 0, 10, 12, 14, 16, 18, 20 Gy 선량에서 분율을 구한다. 생존분율 (surviving fraction)을 0.1 (10%)로 낮추는 선량을  $D_{10}$ 로 정의한다. RBE는  $D_{10x}/D_{10p}$  로 계산하고, 여기서  $D_{10x}$ 는 6 MeV X선 선량이고  $D_{10p}$ 는 양성자선량이다.



### B) 방사선 반응 유전자 Knockout 마우스에서의 RBE의 측정

방사선 치료는 방사선에 의한 세포치사 반응의 하나로 이 반응에 관련된 여러 가지 유전자가 이미 알려졌으며 이 유전자들은 대개 암에서 빈번히 돌연변이가 되는 유전자임이 알려져짐. 따라서 방사선 반응유전자의 돌연변이는 방사선 처치의 추이를 결정하는 중요한 요소라 생각되며 이의 돌연변이에 의해 양성자의 RBE 값의 변화가 있는지 측정해 보고자 함. 이러한 시도는 방사선 반응 유전자들이 돌연변이에 따른 방사선의 선택이 중요한 치료효과의 차이를 보이게 할 수 있는 효율적인 접근으로 생각됨. 이를 위해 현재 방사선의학 연구과에서 보유하고 있는 p53, Chk2,

ATM의 유전자가 특이적으로 돌연 변이된 knockout mice를 이용하여 위와 같은 방법을 통해 D10, 혹은 RBE를 측정하여 상호 비교 해 보고자 함.

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

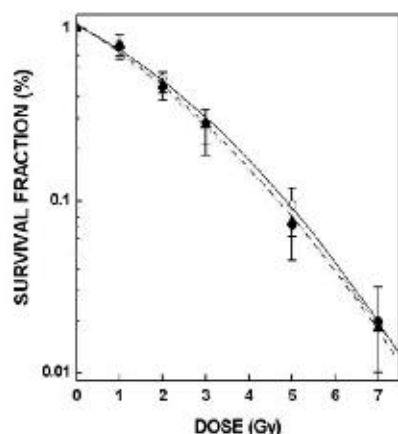
#### 1) RBE 검증은 위한 시스템 구축

RBE 측정을 통한 검증은 고전적 방사선생물학의 한 분야이다. 본 센터에서 사용하게 될 입자방사선의 일종인 양성자선에서 RBE 측정은 임상적 적용을 위해서는 반드시 필수적인 과정이다. 양성자선은 매질에서 통과 깊이에 따라 흡수선량이 현저하게 다르므로 깊이에 따른 세포 생존분율 (surviving fraction) 변화를 정확히 측정하는 것은 그리 쉬운 일이 아니다. 이를 효율적으로 수행하기 위해 본 연구팀에서는 1차년도에 일본의 NIRS (National Institute of Radiological Research)에 연구원을 파견하여 그곳의 연구진과 같이 Tsukuba대학의 PMRC (Proton Medical Research Center)에서 행해지는 *in vitro* and *in vivo* RBE 측정을 관찰토록 하였다. 그리고 NIRS의 Furusawa박사의 협력으로 depth field distribution을 측정할 수 있는 특별히 고안된 cell stack chamber를 일본의 Sangki제작소에 제작 의뢰하여 도입하였다. 또한 *in vivo* RBE 연구의 전문가인 Gueulette박사 (Catholic University in Belgium) 를 초빙하여 이에 대한 조언을 구하였다. 이와 같은 외부 연구자들과의 교류를 통해 양성자의 RBE측정 방식에 대한 이해를 높일 수 있었다.

#### 2) 세포를 이용한 국립암센터 양성자의 RBE의 측정

배양세포실험에 선택한 HSG cell은 일본내의 모든 양성자 치료센터의 RBE 측정에 사용된 세포주로 국립암센터에서 측정된 RBE 결과를 쉽게 다른 기관과 비교 해 주는 장점을 가지고 있다. 배양세포를 이용하여 총 3회의 독립적인 실험을 통해 국립암센터 양성자의 RBE를 측정하였다. RBE는 양성자선의 트랙 중 SOBP의 중간 위치 (mid-SOBP) (18 cm depth) 와 빔의 진입부 (3 cm depth) 두 곳에서 측정하였다. 이때 entrance에서 조사되는 physical dose의 양은 mid-SOBP위치에 대비해 75.1%를 차지하는 것으로 조사되었다. 아래 그림과 표에서 나타나듯이 측정되어진 D<sub>10</sub> (10% survival dose) 은 양성자의 mid-SOBP가 4.70 ± 0.21 Gy, entrance가 4.73 ± 0.26 Gy로 측정되었으며 X-rays의 D<sub>10</sub>은 4.81 ± 0.23 Gy로 측정되었다. 이를 통해 계산된 RBE는 mid-SOBP에서 1.024 ± 0.007, entrance에서 1.021 ± 0.064로 나타났다. 이 측정치는 일반적인 양성자의 RBE

#### Summary of RBE Experiments

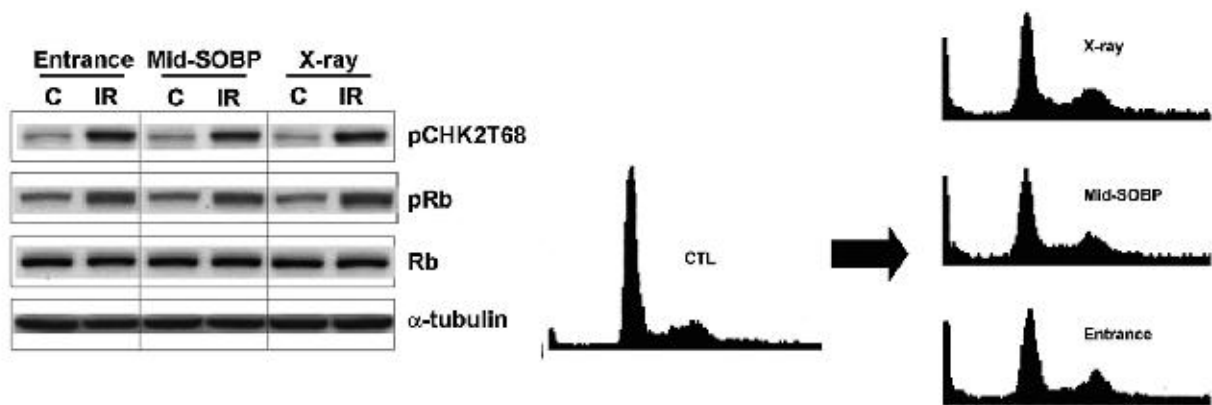


	D <sub>10</sub> of Survival (Gy)			RBE	
	X-ray	SOBP	Entrance	SOBP	Entrance
1	5.094	4.951	4.677	1.029	1.089
2	5.008	4.871	5.203	1.028	0.962
3	4.354	4.283	4.299	1.016	1.013
<b>SUM</b>	<b>4.81±0.23</b>	<b>4.70±0.21</b>	<b>4.73±0.26</b>	<b>1.024±0.007</b>	<b>1.021±0.064</b>

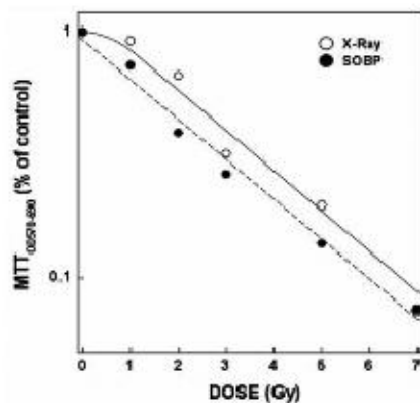
인 1.0-1.1사이에 존재하며 동일 세포주를 통해 모든 일본의 양성자 치료시설의 RBE 평균값인 1.034와 매우 비슷한 측정값을 보인다. 따라서 국립암센터의 양성자 치료기는 적절한 수준의 RBE를 가지고 있으며 생물학적 효과는 해외시설과 비교해서 유사한 양상을 보인다.

### 3) 세포실험에서의 양성자와 X-ray의 비교

다음으로 방사선의 종류 혹은 양성자의 depth에 의해 생물학적 영향이 차이가 있는지를 알아보기 위해 X-ray, 양성자의 entrance와 mid-SOBP 3가지 상황에서 생물학적 영향을 알아보기 위하여 western blot과 flow cytometry를 이용하여 분석해 보았다. 아래와 같이 DNA damage repair와 cell cycle regulation에 관여하는 phospho-68<sup>th</sup>(threonine)CHK2, phospho-807/811<sup>th</sup>(serine)Rb, Rb에 특이적인 항체를 사용하여 이의 발현정도를 알아 보았을때 각 실험군 간에 유의 할만한 차이가 나타나지 않았다. 또한 flow cytometry를 이용하여 측정된 각 세포의 cell cycle에서의 분포 또한 차이가 없는 것으로 보아 이들 간에 cell cycle arrest를 포함한 생물학적 차이는 없는 것으로 생각 된다.



### 4) 세포실험에서의 MTT assay를 통한 RBE의 측정

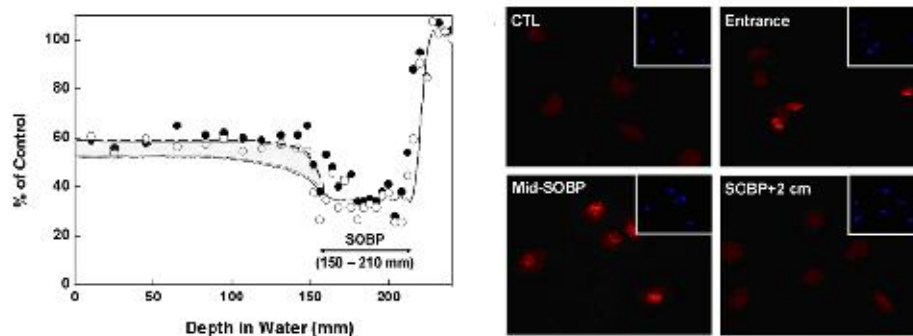


RBE의 측정은 일반적으로 하나의 세포가 colony를 형성할 수 있는 능력을 측정할 수 있는 colonogenic assay가 사용되어 왔으나 이 방법은 적용 가능한 세포주에 제한이 있으며 많은 시간이 소요 되어 현재 viability와 cytotoxicity의 측정에 널리 사용되는 MTT assay를 사용하여 양성자에서의 RBE를 측정해 보았다. MTT assay를 사용하여 측정한 양성자의 mid-SOBP에서의 RBE는  $1.049 \pm 0.028$ 로 colonogenic assay를 통해 측정된 수치와 2.44%의 근소한 차이를 보이는 매우 유용한 측정 방법이라 생각되며 이는 양성자의 biological effectiveness의 측정에 유용한 대체 측정법이라 생각된다.

### 5) 세포실험에서의 Depth distribution 측정

양성자선의 가장 매력적인 성질인 양성자 특이적 depth-dose profiles을 국립암센터 양성자 치료기에서 확인하기 위해 cell stacking chamber을 사용하여 depth에 따른 HSG cell의 survival을 측정하여 보았다. 실험방법은 이전의 양성자 치료기 설치기관들의 임상연구를 바탕으로 20 cm의 beam range, 190-MeV, 6 cm의 SOBP를 "standard treatment beam"이라 정하고 preclinical

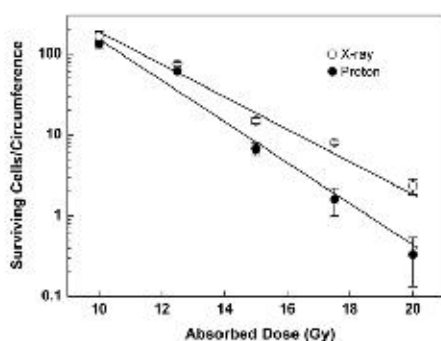
biological assessment를 시행 하였다. 우선 P190/6 cm SOBP에서의 dosimetry에 의해 산출된 depth-dose curve의 형태가 생물학적 측정에서도 재현되는지를 알아보기 위해 cell-stack irradiation을 통해 predefined depth에서 colony formation능력을 측정하였다. 아래의 그림에서 나타난 결과를 보면 양성자의 중요특성인 SOBP가 예상되는 위치에 적절한 크기로 나타남을 알수 있고 SOBP 이후의 급격한 효과도 감소가 일어나는 distal fall-off도 관찰된다. 흥미롭게도 구해진 physical dose curve에 biological survival을 fitting시켜 보았을 때 두 가지 측정방법이 높은 상관도를 보이거나 도입부에서 cell survival이 주어진 dose에 비례해 더 나은 survival을 보이는 것이 관찰 되는데 이는 sub-lethal한 정도의 조사에 의해 이 부분의 세포가 더 나은 생존을 보이는 것으로 생각된다.



또한 효과적인 distal fall-off를 재확인 하기위해 세포의 DNA damage를 모니터 할수 있는 방법으로 널리 사용되고 있는 histone-2AX단백질의 인산화 (gamma-H2AX)를 같은 조건에서 측정하여 보았을 때 SOBP 종료 후 2 cm뒤의 위치에서 나타나는 gamma-H2AX의 양은 매우 적게 나타나며 전혀 방사능을 주지 않은 대조군과 비슷한 정도를 보인다. 따라서 이를 통해 국립암센터의 양성자 치료기는 양성자 특이적인 빔 특성을 모두 가지고 있는 적절한 생물학적 효과를 나타낼 수 있는 것이 이상의 실험을 통해 입증되었다.

### 6) 마우스 실험에서의 RBE의 측정

선량에 따른 Mouse Jejunal Crypts의 생존도



RBE of NCCPTC from Mice Crypts Assay

Surviving Cells (n)	Absorbed Dose (Gy)		RBE
	Proton	X-ray	
100	10.71	11.36	1.06
50	11.90	12.66	1.06
20	13.45	14.83	1.10
10	14.65	16.31	1.11
5	15.85	17.82	1.12

*D<sub>20</sub>: Mouse jejunal crypts to 20 per circumference*

마우스실험에 선택한 C3He strain은 모든 양성자 치료센터의 RBE 측정에 사용된 strain으로 국립암센터에서 측정된 RBE 결과를 쉽게 다른 기관과 비교 해 주는 장점을 가지고 있어서 마우스를 이용하여 국립암센터 양성자의 RBE를 측정하였다. RBE는 양성자선의 트랙 중 SOBP의 중간

위치 (mid-SOBP)에서 측정하였다.

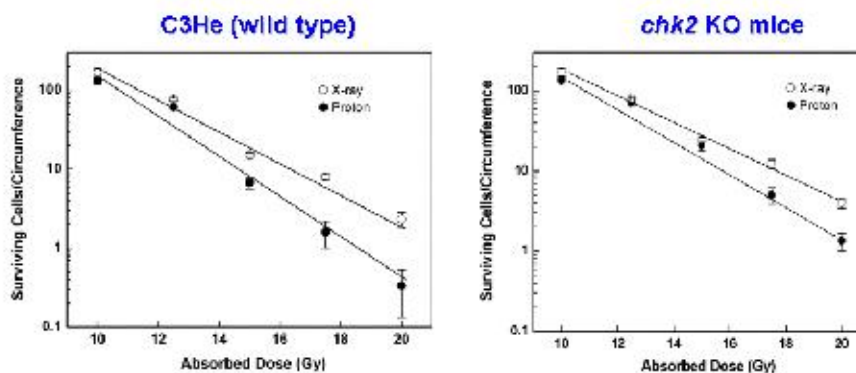
위의 그림과 표에서 나타나듯이 측정되어진  $D_{20}$ 은 양성자의 mid-SOBP 위치에서 13.45 Gy로 측정되었으며 X-rays의  $D_{20}$ 은 14.83 Gy로 측정되었다. 이를 통해 계산된 RBE는 mid-SOBP에서 1.10으로 나타났다. 이 측정치는 일반적인 양성자의 RBE인 1.0-1.1사이에 존재하며 현재 암의 치료에 사용하고 있는 RBE값과 동일하다. 이 수치는 다른 해외의 양성자 치료시설과 비교해서 유사한 양상을 보인다. 따라서 국립암센터의 양성자 치료기는 적절한 수준의 RBE를 가지고 있다고 생각된다.

Comparison of in vivo RBEs at various centers

Paul Scherrer Institute, Villigen, Switzerland (1998)	1.18
Paul Scherrer Institute, Villigen, Switzerland (1997)	1.16
National Accelerator Center, Faure, South Africa (1998)	1.15
National Accelerator Center, Faure, South Africa (1996)	1.14
Harvard University Cyclotron, MGH, Boston, MA (1977)	1.11
UT M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX (2007)	1.09
Loma Linda University Medical Center, CA (1986)	1.08
Louvain-la-Neuve, Belgium (1993)	1.08
National Cancer Center Hospital East, Japan (1998)	1.08
Loma Linda University Medical Center, CA (2003)	1.07
<b>National Cancer Center, Korea (2008)</b>	<b>1.10</b>

## 7) Chk2 돌연변이 마우스에서의 RBE의 측정

### 선량에 따른 Mouse Jejunal Crypts의 생존도



방사선에 의한 세포치사 반응에 관여하며 결실 되었을 때 암을 유발시키는 것으로 알려진 Chk2 유전자의 돌연변이 쥐를 이용하여 유전자의 변이가 방사선에 의한 감수성과 RBE에 미치는 영향을 알아보기 위해 위와 같은 방법으로 RBE를 측정. 위의 그림에서 나타나듯이 Chk2 돌연변이 쥐에서 crypt의 생존도는 C3He에서 보다 동일 조사조건에서 높게 나타남. 이는 Chk2의 돌연변이가 방사선에 대한 저항성을 일으키는 원인이 될 수 있음을 시사. 이를 수치로 비교해 보면  $D_{20}$ 에 필요한 방사선 선량이 양성자의 경우 10%, X-선인 경우 6% 더 필요한 것으로 측정됨. RBE 역시 Chk2 돌연변이인 경우 C3He에서 나타난 1.10보다 약간 낮은 1.05로 측정되어 유전적 변이는 방사선의 감수성 뿐 아니라 RBE에도 어느 정도 영향을 주는 것으로 측정됨.

### RBE from Mice Crypts Assay

Surviving Cells (n)	C3He			Chk2 KO		
	Absorbed Dose (Gy)			Absorbed Dose (Gy)		
	Proton	X-ray	RBE	Proton	X-ray	RBE
100	10.71	11.36	1.06	11.05	11.51	1.04
50	11.90	12.85	1.08	12.72	13.34	1.05
20	13.45	14.83	1.10	14.92	15.73	1.05
10	14.65	15.31	1.11	15.55	17.53	1.60
5	15.85	17.82	1.12	18.23	19.36	1.60

*D<sub>20</sub>: Mouse jejunum crypts to 20 per circumference*

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자 구분)	저널명 (I.P.)	Vol(No) Page	구분	과제 관련성
Radiosensitivity enhancement by combined treatment of celecoxib and gefitinib on human lung cancer cells	공동	Clinical Cancer Research (5,715)	12: 4989~99	국외 SCI	중
Tumor-associated carbonic anhydrases are linked to metastases in primary cervical cancer	공동	Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (2,469)	132: 302~308	국외 SCI	중
CT-guided intracavitary brachytherapy for cervical cancer: Comparison of conventional Point A plan with clinical target volume-based three-dimensional plan using dose-volume parameters	공동	International Journal of Radiation Oncology Biology Physics (4,463)	64: 197~204	국외 SCI	중
A Simple Scoring Method to Calculate the Homogeneity and Coverage Indices of Dose Volume Histogram	공동	Korean Journal of Medical Physics	17: 6~16	국내	중
Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in O8 rat glioma cells	공동	International Journal of Cancer (4,693)	118: 2056~63	국외 SCI	중
A new evaluation method of target volume coverage and homogeneity for IMRT treatment planning	공동	Physica Medica (313)	22: 43~51	국외 SCI	중
Intensity-modulated radiotherapy with a belly board for rectal cancer	공동	International Journal of Colorectal Disease (1,918)	22: 373~379	국외 SCI	중
Accuracy of inhomogeneity correction algorithm in intensity-modulated radiotherapy of head-and-neck tumors	공동	Medical Dosimetry, (2,187)	32: 44~51	국외 SCI	중
A new homogeneity index based on statistical analysis of the dose-volume	공동	Journal of Applied Clinical Medical	8: 9~17	국외 SCI	중



histogram		Physics (963)			
Optimized matching of film dosimetry with calculated doses for IMRT quality assurance	공동	Physica Medica (136)	23: 49~57	국외 SCI	중
The clinical values of squamous cell carcinoma antigen and carcinoembryonic antigen in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy	공동	International Journal of Gynecologic Cancer (1,469)	17: 872~878	국외 SCI	중
Effect of radiation scattering on dose uniformity in open and closed cell culture vessels	공동	International Journal of Radiation Biology, (1,468)	83: 561~566	국외 SCI	중
Computed tomography-based high-dose-rate intracavitary brachytherapy for uterine cervical cancer: Preliminary demonstration of correlation between dose-volume parameters and rectal mucosal changes observed by flexible sigmoidoscopy	공동	Int J Radiat Oncol Biol Phys, (4,463)	68: 1446~54	국외 SCI	중
Optimal matching of 3D film-measured and planned doses for intensity-modulated radiation therapy quality assurance	공동	Medical Dosimetry (2,167)	32: 316~324	국외 SCI	중
Isocenter optimal matching shift algorithm to verify the dose distribution in intensity-modulated radiation therapy through the stochastic property	공동	Journal of the Korean Physical Society (1,204)	51: 1792~97	국외 SCI	중
Carbonic anhydrase 9 (CA9) expression in tumor cells enhances sensitivity to tirapazamine	공동	Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (2,366)	134: 397~404	국외 SCI	중
The effect of belly board location in rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy	공동	Clinical Oncology (1,471)	18: 441~446	국외 SCI	중
SMART (Simultaneous Modulated Accelerated RadioTherapy) for locally advanced nasopharyngeal carcinomas	교신	Head Neck (2,007)	30: 159~169	국외 SCI	중
Image Based Quality Assurance of Range Compensation for Proton Beam Therapy	공동	Korean Journal of Medical Physics,	19: 35~41	국내	중
Comparison of Helical TomoTherapy with Intensity-modulated Radiotherapy for Head & Neck Cases	공동	Korean Journal of Medical Physics	19: 89~94	국내	중
Inter- and intrafractional movement-induced dose reduction of prostate target volume in proton beam treatment	공동	International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics (4,29)	71: 1091~1102	국외 SCI	중
Computerized tomography-based quality assurance tool for proton range compensators	공동	Medical Physics (3,198)	35: 3511~17	국외 SCI	중
Radiobiological Characterization of Proton Beam at the National Cancer Center in Korea	교신	Journal of Radiation Research, (1,26)	49: 509~515	국외 SCI	상
Hepatocellular cancer arises from loss of TGF-beta signaling adaptor protein ELF through abnormal angiogenesis	공동	Hepatology (10,734)	48: 1128~37	국외 SCI	상
Influence of lipiodol agent on proton beam range in radiotherapy planning using computed tomography for hepatocellular carcinoma	공동	International Journal of Radiation Oncology Biology Physics (4,29)	72: 687~694	국외 SCI	중
Dosimetric comparison of four different external beam partial breast irradiation techniques: Three-dimensional conformal radiotherapy, intensity-modulated radiotherapy, helical tomotherapy, and proton beam therapy	공동	Radiotherapy and Oncology (4,074)	Online: Published	국외 SCI	중

## (2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
	1차년도	RBE 검증 시스템의 구축	달성		
		<i>in vitro</i> RBE 측정	달성		
	2차년도	<i>in vitro</i> 실험 완료	달성		
		<i>in vivo</i> RBE 측정	달성		
	3차년도	<i>in vivo</i> 실험 완료	달성		
		유전적 변이에 의한 <i>in vivo</i> RBE의 변화 측정	달성		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
<i>In vivo</i> RBE 실험	D <sub>20</sub> RBE 측정 완료
유전적 변이에 의한 <i>in vivo</i> RBE의 변화 측정	D <sub>20</sub> RBE 측정 완료

## 5. 연구결과의 활용계획

### (1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	International Journal of Radiation Oncology Biology Physics (IF: 4.29)외
산업재산권 등록		
기 타		

### (2) 연구성과의 활용계획

본 과제를 통해 국립암센터 양성자 치료기의 RBE를 측정할 수 있게 되었으며 이를 통해 국립암센터 양성자치료기의 적절성 확인할 수 있게 되었음 또한 유전자 돌연변이마우스를 통해 유전적 변이가 방사선의 감수성과 RBE에 미치는 영향 확인. 본 과제의 성공적인 수행을 통해 얻어진 경험과 구축된 측정 방법을 통해 정기적인 국립암센터 양성자빔의 RBE 측정을 시행. 또한 향후 유전 변이에 의한 방사선의 감수성 연구에 유용한 기초자료가 됨. 본 연구진을 이를 통해 양성자치료에 보다 효과적인 방사선 감작제의 발굴에 사용하고자 함.

## 7. 첨부서류

-이하 첨부