

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15622

研究課題名（和文）重粒子線照射に対する細胞応答反応における二次的バystanダー効果の解析

研究課題名（英文）The secondary bystander effect by irradiation with carbon ion beam

研究代表者

神沼 拓也（KAMINUMA, TAKUYA）

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60599538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：重粒子線はDNAの二重鎖切断による修復しがたい損傷を与えることにより高い生物学的効果をもたらすが、DNAが照射されない細胞にも細胞死が起こることが示されている。その機序は未だ明らかにされていないが、照射されていない細胞がその周囲の細胞に対して影響を与える「バystanダー効果」が生じることがその一因であるとされている。しかしバystanダー効果についてはその機序が完全には解明されていない。本研究ではバystanダー効果を受けた細胞が、さらにその周囲の細胞に対しても影響を与える二次的なバystanダー効果を起こす現象について研究し、バystanダー効果や二次的バystanダー効果の機序を解明しようとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「二次的なバystanダー効果」の現象の解明はバystanダー効果そのものの機序の解明の一助になると考えられている。二次的なバystanダー効果について炭素イオン線などの重粒子線を照射して検討した報告はなく、独創的であると言える。本研究により重粒子線の細胞応答反応の解明の一助になると考えられ、本研究は重粒子線治療の生物学的な根拠の一つとなり、学術的かつ臨床的に意義がある。

研究成果の概要（英文）：Heavy ion beams have a high biological effect by causing irreparable damage due to double-strand breaks in DNA, but it has been shown that cell death also occurs in cells that are not irradiated with DNA. The mechanism has not yet been clarified, but it is believed that one of the causes is the "bystander effect" in which unirradiated cells affect the surrounding cells. However, the mechanism of the bystander effect has not been completely elucidated. In this study, we study the phenomenon that cells affected by the bystander effect cause a secondary bystander effect that also affects the surrounding cells, and the opportunity for the bystander effect and the secondary bystander effect. I tried to clarify the introduction.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 バystanダー効果 二次的バystanダー効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重粒子線の高い生物学的効果は、DNAの二重鎖切断により、修復しがたい損傷を与えることによるものとされ、多くの研究者がDNA損傷に注目してきた。しかしながら、重粒子線照射における注目すべき点として「DNAが照射されない細胞」が細胞死を起こすことが知られている。低線量であれば照射範囲内であってもポアソン分布的に照射されない細胞が存在し、また、細胞自体は照射されても重イオンが核を通過しない細胞が存在するにもかかわらず、それらの細胞が細胞死を起こすことが臨床的、実験的に示されている。これらは照射された細胞の子孫細胞と周囲の細胞にも生物効果が誘発されるという遺伝的不安定性とバースタンダー効果、および、DNA損傷に依存しない、ミトコンドリアや膜のダメージを介した細胞死によるものと解されている。しかしながら、このような「DNAが照射されない細胞」は、スキャンニング照射の導入など照射方法の変更により増加する可能性があり、これらの細胞の応答反応は今後の重粒子線治療の理論的根拠として解明されるべき問題点である。応募者らは重粒子線の細胞応答反応のうち、特にバースタンダー効果を解した細胞死に関して検討を進めてきた。

バースタンダー効果の解析にはマイクロビーム法および共培養法を用いた。マイクロビームとは、放射線のビーム幅を μm スケールまで絞り込んだ照射装置のことで、正確な線量または粒子数を、細胞集団の一部の個々の細胞に狙い撃ちすることができる。応募者らは高密度に培養したA549(ヒト非小細胞肺癌由来細胞株)に日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のマイクロビームで照射を行い、照射後の細胞生残率をコロニー形成法にて検討した。ディッシュ内0.001~0.002%のみが数個の重イオンを照射されたのみであるにもかかわらず8~14%の細胞死の増加が認められ、バースタンダー効果による細胞死と考えられた[2]。共培養法はプレートで培養した細胞を照射し、ここに、同種または異種の細胞を培養したインサートを挿入することで照射細胞と非照射細胞を共培養する手法である。この系では照射細胞と非照射細胞を完全に分離して解析することが可能である。応募者らはHTB-94(ヒト軟骨肉腫由来細胞株)、AG01522(初代ヒト線維芽細胞)をX線、陽子線、重粒子線を照射した細胞を共培養し、53BP1の免疫蛍光染色およびMicronuclei法により評価した。非照射AG01522では対照と比較し、53BP1陽性細胞、Micronucleiの増加を認めバースタンダー効果が確認された。さらに応募者らは、Micronucleiの増加はX線、陽子線、炭素イオン線で1.5倍程度、鉄イオン線で2倍程度と異なり、Linear Energy Transfer (LET)依存性があることを明らかにした。一方、非照射HTB-94では53BP1陽性細胞、Micronucleiの増加は認められず、細胞種による違いも示唆された。[3]

Chenらは初代ヒト線維芽細胞およびHeLa細胞を用いた共培養法を行い、53BP1の免疫蛍光染色やMicronuclei法によって、バースタンダー効果を受けた細胞(バースタンダー細胞)が照射細胞のDNAの二重鎖切断を減少させたことを報告した[4]。しかしこの「二次的なバースタンダー効果」についてはまだ研究が十分に進められていない。

[1] Hamada N. J. Radiat. Res. 50:1-9. 2009

[2] Harada K. Cancer Sci. 100:684-688. 2009

[3] Wakatsuki M. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 84:103-108. 2012

[4] Chen S., Mutat. Res. 706:59-64. 2011

2. 研究の目的

本研究では応募者らの今までの知見をもとに、哺乳動物細胞(腫瘍細胞A549,HTB-94および正常線維芽細胞AG01522等)においてバースタンダー細胞が照射細胞や非照射細胞に対して働きかける二次的なバースタンダー効果について解析する。この「二次的なバースタンダー効果」についてはまだ十分な研究が進められていない。「二次的なバースタンダー効果」の現象の解明はバースタンダー効果そのものの機序の解明の一助になると考えられており、学術的独自性と創造性があると考えられる。共培養法を用いてそれぞれの細胞に対してX線、炭素イオン線の照射を行い、二次的なバースタンダー効果の発現の有無や線量依存性、細胞の違いによる差異について定量的に解析を行い、二次的なバースタンダー効果の機序の解明を行っていく。二次的なバースタンダー効果について炭素イオン線などの重粒子線を照射して検討した報告はなく、独創的であると言える。本研究により重粒子線の細胞応答反応の解明の一助になると考えられ、本研究は重粒子線治療の生物学的な根拠の一つとなり、学術的かつ臨床的に意義がある。

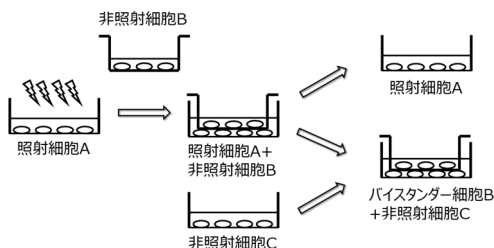
3. 研究の方法

(1)使用する細胞について、3種類の哺乳動物細胞を用いて実験を行った。正常細胞株として初代ヒト線維芽細胞AG01522、腫瘍細胞株としてヒト非小細胞肺癌由来細胞株A549、バースタンダー効果を起こさないことが報告されているヒト軟骨肉腫由来細胞株HTB94を選択した。それぞれの細胞株については細胞バンクや研究機関等より購入もしくは譲り受けた。

(2)二次的なバースタンダー効果について、以下の3実験を行った。

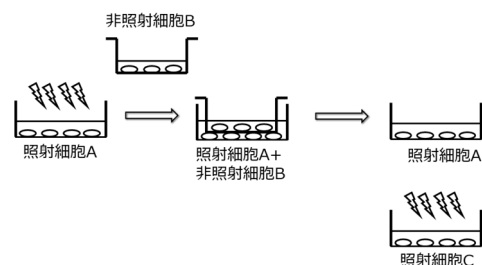
バイスタンダー細胞の非照射細胞に対する影響

バイスタンダー効果を受けたバイスタンダー細胞が、非照射細胞に対してどのような影響を与えるかを検討した。プレート2枚とインサート1枚に細胞を培養し、プレート1枚に対してX線を照射した。その後照射細胞とインサートに培養した非照射細胞を共培養し、バイスタンダー細胞を作製した。一定時間共培養した後、バイスタンダー細胞をもう1枚のプレートに培養した非照射細胞と共培養した。その後53BP1の免疫蛍光染色やMicronuclei法を用いて、それぞれの細胞のDNA二重鎖切断について定量的に評価した。



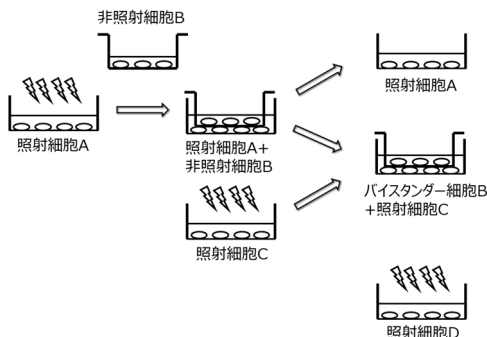
バイスタンダー細胞の照射細胞に対する影響

バイスタンダー細胞が、照射細胞に対してどのような影響を与えるかを検討した。プレート2枚とインサート1枚に細胞を培養し、プレート1枚に対してX線を照射した。その後照射細胞とインサートに培養した非照射細胞を共培養した。一定時間共培養した後、バイスタンダー細胞は破棄した。もう1枚のプレートに培養した細胞にX線を照射し、これを対照として、照射細胞Aがバイスタンダー細胞Bから受けた影響について、53BP1の免疫蛍光染色やMicronuclei法を用いて定量的に評価した。



バイスタンダー細胞の、別に照射された細胞に対する影響

バイスタンダー細胞が、別に照射された細胞に対してどのような影響を与えるかを検討した。プレート3枚とインサート1枚に細胞を培養し、プレート1枚に対してX線を照射した。その後照射細胞とインサートに培養した非照射細胞を共培養し、バイスタンダー細胞を作製した。一定時間共培養した後、別のプレートに培養した細胞にX線を照射し、バイスタンダー細胞Bを、照射細胞Cと共培養した。残りの1枚のプレートに培養した細胞にX線を照射し、これを対照として、照射細胞Cがバイスタンダー細胞Bから受けた影響について、53BP1の免疫蛍光染色やMicronuclei法を用いて定量的に評価した。

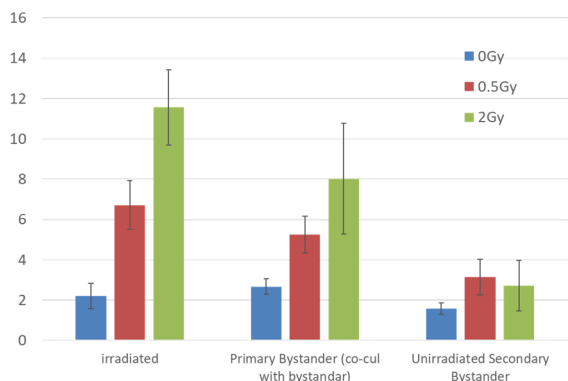


4. 研究成果

バイスタンダー細胞の非照射細胞に対する影響

条件検討を各種行い、最終的に照射細胞Aに0Gy、0.5Gy、2Gyの照射を行い、非照射細胞Bと2時間共培養を行った。その後、細胞Bと非照射細胞Cの共培養を72時間行う状況下で検討を行った。

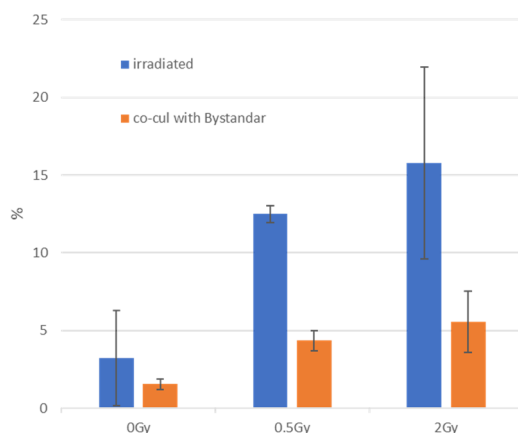
Micronuclei 法を用いた検討結果を下記グラフに示す。非照射細胞 B(Primary Bystander)においては 0.5Gy、2Gy 照射群で有意にアポトーシスが誘導され、線量の依存性も認められた。非照射細胞 C(Unirradiated Secondary Bystander)においてもアポトーシスの誘導の増加を認めたが、対照群である 0Gy と比較して有意とまでは言えなかった。しかし、Secondary Bystander といえるような影響が存在することを示唆する結果と考えられた。



バイスタンダー細胞の照射細胞に対する影響

条件検討を各種行い、最終的に照射細胞 A に 0Gy、0.5Gy、2Gy の照射を行い、非照射細胞 B と 2 時間共培養を行った。その後、照射細胞 A と非照射細胞 C の比較検討を行った。

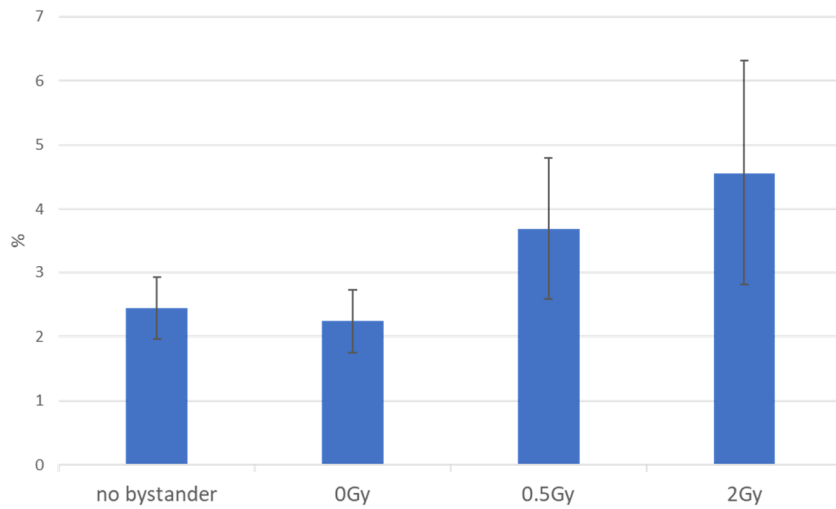
Micronuclei 法を用いた検討結果を下記グラフに示す。非照射細胞であるバイスタンダー細胞 B と共培養を行った照射細胞 A は、共培養を行っていない照射細胞 C と比較してアポトーシスの誘導が低い傾向が認められた。これはバイスタンダー細胞 B が照射細胞 A に対し、DNA 損傷を回復させるような因子を放出している可能性を示唆していた。しかし有意な差は認めておらず、さらなる検証が必要と考えられた。



バイスタンダー細胞の、別に照射された細胞に対する影響

条件検討を各種行い、最終的に照射細胞 A に 0Gy、0.5Gy、2Gy の照射を行い、非照射細胞 B と 2 時間共培養を行った。その後、バイスタンダー細胞 B と、別の照射細胞 C を 72 時間共培養を行い、Micronuclei 法による検討を行った。結果を下記に示す。

この結果によると、Bystander 効果は伝播する可能性が示唆された。しかしながら全体的に Micronuclei 法の陽性率が他の実験系と比べて低く、実験系の精度に問題がある可能性も考えられた。また、それぞれの結果も有意ではなく、さらなる条件検討が必要と考えられた。



今回の検証全体を通して考えられることは、実験系が複雑になりすぎており、そのための条件検討が難しく、本来であれば A549 や HTB94 による実験、さらに重粒子線照射を予定したが、そこに至るまでの状況にならなかった。また、新型コロナウイルス感染症流行に伴う研究時間の制限があり、予定された研究結果とはなっていない。引き続き、本実験系を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------