

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2007 ～ 2008
 課題番号：19790870
 研究課題名（和文） バイスタンダー効果の抵抗性因子を標的とした殺腫瘍細胞効果の増強に関する研究
 研究課題名（英文） Enhancement of bystander effects by the inhibition of resistant factors
 研究代表者 菓子野 元郎
 （ KASHINO GENRO ）
 京都大学原子炉実験所 助教
 研究者番号： 00437287

研究成果の概要：

放射線を照射された細胞集団において、バイスタンダー効果による細胞死、増殖抑制などが知られている。照射後の細胞間または細胞内シグナル伝達経路において、バイスタンダー効果による細胞死を抑制するような因子があるのであれば、それを標的とすることでバイスタンダー効果による細胞死を多く引き起こすことができると考えた。SPRING-8 放射光施設では、特殊コリメータの利用により、25 ミクロン幅、200 ミクロン間隔でスタレ状照射が可能である。この照射細胞からのシグナルによる非照射細胞での影響を調べた。その結果、バイスタンダー効果により DNA 二重鎖切断が誘発されていることが 53BP1 フォーカス形成の実験から明らかとなった。この時、照射細胞から分泌される何らかの因子が作用していることが示唆された。また、照射細胞から分泌される因子は、周りの細胞の遊走を促し、ターンオーバーを促している可能性が示唆された。このことから、バイスタンダー効果が致死的影响を及ぼすことは細胞集団のターンオーバーと関連性があることが示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、放射線科学

キーワード：バイスタンダー効果

1. 研究開始当初の背景

放射線誘発バイスタンダー効果は、照射細胞が周りの細胞へ致死的影响を及ぼす影響である。しかし、その効果による細胞死誘発レベルはわずかである。この機構を解明し、バイスタンダー効果のシグナル伝達経路を解明することは重要である。さらに、致死的なバイスタンダー効果発現を抑制する因子があるならば、これを標的することにより、

効果的な細胞致死誘発を促すことができると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バイスタンダー効果の機構を解明し、その中でも、致死的影响を誘導する機構を明らかにすることである。そのため、以下の 2 つの実験を行った。

①一つ目の実験は、バイスタンダー効果によ

り DNA 二重鎖切断が誘発され、それが致死的損傷につながるのであれば、その修復機構を阻害することで増感作用をもたらすことができるか否かを調べることである。

②二つ目の実験は、SPring-8 放射光による線量率の高い放射線をスリット状に照射する手法である。この方法では、照射細胞集団において、バイスタンダー効果をもたらす影響を調べることができ、如何なる作用機序による致死的影響がバイスタンダー効果によりもたらされているのかについて解明を試みた。

3. 研究の方法

①DNA 二重鎖切断の誘発の有無については、CHO 細胞株の修復欠損株を用いた。DNA 二重鎖切断修復の関与を調べるため、非相同末端結合修復に異常を持つ *xrs5* 細胞を使用した。この細胞でバイスタンダー効果が起こりやすいか否かを調べ、バイスタンダー効果による致死損傷誘発の増感作用として、この修復経路の阻害が使えるのか否かを確かめた。

②SPring-8 における照射実験において、細胞はグリオーマ細胞 (C6 及び U251) を用いた。SPring-8 放射光施設の 50~200 keV の白色放射光をスリット状コリメータへ入射し、細胞へ照射した。この時の照射領域は、200 ミクロン間隔で 4 本のスリット状照射で、照射部位の幅は 25 ミクロンであった。照射部位周辺の被ばく線量評価は、リン酸化 H2AX の蛍光染色により行った。照射 48 時間後における致死的損傷細胞についても、リン酸化 H2AX を核質全体に保持しているか否かにより評価した。バイスタンダー効果は、分泌因子を介して生じていると考え、照射細胞の培養上清を非照射細胞へ処理することによる影響を調べた。致死的影響を高感度に評価するため、DNA 二重鎖切断部位へ集積することが知られている 53BP1 フォーカスの数により評価した。

4. 研究成果

①DNA 二重鎖切断修復欠損細胞の *xrs5* 細胞は、バイスタンダー効果による微小核生成頻度が高いことがわかった。修復正常の CHO 細胞ではバイスタンダー効果による微小核の誘導はほとんど見られなかった。このことから、バイスタンダー効果による致死的損傷を誘発させる際、DNA 二重鎖切断修復機構を阻害することは有効である可能性が示唆された。

②バイスタンダー効果は、通常の培養方法では表れにくい。そこで、無血清合成培地の培

養で実験を行った。その結果、バイスタンダー効果によると思われる細胞遊走の現象が、照射細胞集団で見られた。細胞の遊走の特徴としては、①照射により致死的なダメージを受けた細胞は強度のリン酸化 H2AX を核全体に 2 日間以上保持する、②リン酸化 H2AX 陽性細胞はその場でとどまり続け、周りの健常細胞がその周りに遊走しているということであった。無血清培養では細胞の増殖能は明らかに低下していたので、照射部位 (山領域) に細胞は集積したのに対し、照射部位と照射部位の間の領域 (谷領域) は細胞数が減少した。このことは、谷領域の細胞が山領域へ移動し、ターンオーバーによりダメージ細胞が排除され、健常細胞と入れ替わっているのかもしれない。

この現象における照射細胞からの分泌性因子の作用を確かめるため、メディウムトランスファー実験を行った。この方法では、スリット状照射を行った細胞を 24 時間後に、別のディッシュに用意した非照射細胞へ処理することになる。その結果、照射細胞からの培養上清を処理された細胞では、DNA 二重鎖切断部位へ集積することが知られている 53BP1 のフォーカス形成が見られた。このことは、照射により誘導された分泌性因子が DNA 二重鎖切断を引き起こしている可能性を示唆している。

このように、SPring-8 放射光のスリット状照射によるバイスタンダー効果は、分泌性因子を介して致死的損傷を誘発していることが明らかとなった。次に、放射線により誘導される分泌性因子として知られている TGF-beta に着目した。TGF-beta がバイスタンダー効果に関わる液性因子であることを確かめるため、前述の細胞遊走を指標に TGF-beta 阻害による影響を確かめた。その結果、未処理時には照射部位に沿って細胞遊走が見られたが、TGF-beta の中和抗体処理によっても、影響を受けなかった。

以上の結果より、液性因子を介したバイスタンダー効果が見られたものの、如何なる因子が致死的作用を及ぼすのかについては同定することができなかった。今後、分泌因子の作用機序について解明する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Kashino G, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Ohigashi T, Shinohara K, Kurihara A, Fukumoto M, Tanaka H, Masuhashi A, Suzuki M, Liu Y, Kinashi Y, Masunaga S, Watanabe M, Ono K: Induction of DNA double strand breaks

and cellular migration through bystander effects in cells irradiated with the slit type microplanar beam of the Spring-8 synchrotron. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74 (1) : 229 – 236, 2009. 査読有

2. Yoshikawa T, Kashino G, Ono K, Watanabe M: Phosphorylated H2AX Foci in Tumor Cells Have No Correlation with Their Radiation Sensitivities. *J. Radiat. Res.* 50 (2) : 151-160, 2009. 査読有

3. Nariyama N, Ohigashi T, Umetani K, Shinohara K, Tanaka H, Maruhashi A, Kashino G, Kurihara A, Kondob T, Fukumoto M, Ono K: Spectromicroscopic film dosimetry for high-energy microbeam from synchrotron radiation. *Appl. Radiat. Isot.* 67 (1) : 155-159, 2009. 査読有

4. Suzuki M, Tanaka H, Sakurai Y, Kashino G, Yong L, Masunaga S, Kinashi Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Sato T, Maruhashi A, Ono K: Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma. *Radiother. Oncol.* in press, 2009. 査読有

5. Masunaga SI, Hirayama R, Uzawa A, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Liu Y, Koike S, Ando K, Ono K: The effect of post-irradiation tumor oxygenation status on recovery from radiation-induced damage in vivo: with reference to that in quiescent cell populations. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* in press, 2009. 査読有

6. Masunaga S, Tano K, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K, Nakamura J: Evaluation of the potential of hexamethylenetetramine, compared with tirapazamine, as a combined agent with {gamma}-irradiation and cisplatin treatment in vivo. *Br. J. Radiol.* in press, 2009. 査読有

7. Masunaga S, Kono K, Nakamura J, Tano K, Yoshida H, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Liu Y, Ono K. Usefulness of hexamethylenetetramine in combination

with chemotherapy using free and pegylated liposomal doxorubicin in vivo, referring to the effect on quiescent cells. *Oncol. Rep.* 21 (5) : 1307-1312, 2009. 査読有

8. Harada T, Kashino G, Suzuki K, Matsuda N, Kodama S, Watanabe M, Different involvement of radical species in irradiated and bystander cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (4) : 809-814, 2008. 査読有

9. Masunaga S, Ando K, Uzawa A, Hirayama R, Furusawa Y, Koike S, Sakurai Y, Nagata K, Suzuki M, Kashino G, Kinashi Y, Tanaka H, Maruhashi A, Ono K. Radiobiologic significance of response of intratumor quiescent cells in vivo to accelerated carbon ion beams compared with gamma-rays and reactor neutron beams. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70 (1) : 221-228, 2008. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. Kashino G: Involvement of the secreted factors and radical species by X-irradiations on the induction of bystander effects, An International Symposium of Kyoto University RRI, December 18, Kumatori, Osaka (2008).

2. 菓子野元郎、近藤威、栗原愛、福本学、篠原邦夫、鈴木実、増永慎一郎、渡邊正己、小野公二、微小平板ビーム照射されたグリオーマ細胞におけるバイスタンダー効果、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月、名古屋

3. 菓子野元郎、近藤威、栗原愛、福本学、劉勇、鈴木実、増永慎一郎、木梨友子、小野公二、微小平板ビーム療法における殺細胞効果の解析、日本放射線腫瘍学会第 21 回学術大会、2008 年 10 月、札幌

4. 菓子野元郎、劉勇、鈴木実、木梨友子、増永慎一郎、渡邊正己、小野公二、Radiation induced bystander effects

in glioma、第9回文部科学省特定領域
研究「がん」5領域若手研究者ワーク
ショップ、2008年9月、蓼科

5. G. Kashino, T. Kondoh, N. Nariyama,
T. Ohigashi, K. Umetani, K. Shinohara,
A. Kurihara, M. Fukumoto, H. Tanaka, A.
Maruhashi, M. Suzuki, Y. Kinashi, S.
Masunaga, M. Watanabe, K. Ono,
Bystander effects in microplanar beam
irradiated glioma cells, New Prospects
for Brain Tumor Radiotherapy :
Synchrotron Light and Microbeam
Radiation Therapy (SYRAD workshop),
June 2008, Grenoble

6. 菓子野元郎、鈴木実、木梨友子、
増永慎一郎、小野公二、渡邊正己、マ
イクロビーム照射により培養細胞集
団に及ぼされるバイスタンダー効果、
日本組織培養学会第81回大会、2008
年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菓子野 元郎 (KASHINO GENRO)
京都大学原子炉実験所・助教
研究者番号 : 00437287