

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24620014

研究課題名(和文)重粒子線低フルエンスで誘導されるバイスタンダー効果の線質依存性の解明

研究課題名(英文) Radiation-quality dependent bystander effects induced by the low-fluence irradiation with heavy ions

研究代表者

鈴木 雅雄 (Suzuki, Masao)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・主任研究員

研究者番号：70281673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：二つの異なる経路によって誘導されるバイスタンダー効果の線質依存性を解明するために、重イオン(炭素、ネオン、アルゴン)、X線およびプロトンの各種放射線マイクロビームを用い、公的な細胞バンクより入手したヒト由来正常細胞の細胞死と遺伝子突然変異に対するバイスタンダー効果を明らかにする研究を実施した。得られた成果は以下のようにまとめられる。(1)炭素イオン照射試料ではギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構によるバイスタンダー効果が観察された。(2)アルゴンイオン照射試料ではマイクロビーム照射試料よりメデイウム中に湧出する液性因子によるバイスタンダー効果誘導が照射後24時間で観察された。

研究成果の概要(英文)：We have carried out the induction of bystander cellular effects, such as cell death and gene mutation, in normal human skin fibroblasts irradiated with the microbeams of different radiation types. We focused on two different pathways of bystander effects, such as gap-junction mediated cell-cell communication and secrete factor(s). The results suggested that the carbon-ion induced bystander effects were dominant via gap-junction mediated cell-cell communication, not secrete factor(s). No bystander effects were observed in X-ray, proton and neon-ion irradiated cells. The argon-ion induced bystander effects were dominant via secrete factor(s) to culture medium from the irradiated cells. There is clear evidence that radiation-induced bystander effects is dependent on radiation quality and the bystander cellular effects are induced by the different mechanisms between carbon- and argon-ion-irradiated cells.

研究分野：放射線基礎医学

キーワード：マイクロビーム バイスタンダー効果 細胞増殖死 遺伝子突然変異 HPRT遺伝子座 ギャップジャンクション 細胞間情報伝達機構 液性因子

### 1. 研究開始当初の背景

宇宙空間や高高度飛行における宇宙船・航空機内での放射線影響は、それ自体では急性的な放射線障害の自覚症状を伴わない低線量(率)・低フルエンスの照射効果である。これまで、低線量放射線領域に対する生物影響リスクは、高線量域での実験データを低線量域に外挿して推定する他なかった。しかし近年マイクロビーム放射線照射法を駆使した低線量(率)・低フルエンス放射線の生物影響研究の新たな展開から、明確な実験的証拠が示されるようになった直接照射された細胞の生物影響が周囲の非照射細胞へも現れるバイスタンダー効果の存在により、高線量照射と低線量照射に対する細胞応答は根本的に異なることが示唆され、より正確な生物影響リスク評価のための研究が必要であると考える。宇宙放射線の生物影響が様々な核種で広範囲のエネルギーを網羅した粒子放射線の低フルエンス照射の照射効果である特殊性を考慮すると、放射線の線質や生物学的エンドポイントの違いを考慮しながら詳細に調べる必要があると考える。しかしながら、複数の研究施設を跨いで同一の実験系を用いて異なる種類の放射線に対する生物効果のバイスタンダー効果の異なる線質の放射線の間での系統立った線質依存性を調べた研究は皆無である。

### 2. 研究の目的

宇宙放射線の特殊性を考慮し、様々な種類の放射線低フルエンス照射によるバイスタンダー効果の放射線線質依存性とその誘導メカニズムを細胞レベルで解明することを目的として計画した。

### 3. 研究の方法

日本国内で稼働中のマイクロビーム放射線照射施設を利用して、粒子放射線(重イオン、陽子)と電磁波放射線(X線)低フルエンス照射に対する生物効果のバイスタンダー効果の放射線線質依存性をヒト正常細胞における異なる生物学的エンドポイント(細胞致死、遺伝子突然変異)について解析した。さらにその誘導メカニズムを、(1)ギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構の関与、(2)照射細胞より周囲の環境(メディアム等)に放出される液性因子の関与、に焦点を当てて解明した。

細胞は公的な細胞バンクより供給されたヒト由来正常細胞を用いた。細胞致死効果は、コロニー形成法による増殖死を検出した。突然変異は、*HPRT*遺伝子座を標的とし6チオグアニン耐性クローンを検出して突然変異誘発頻度を算定した。低フルエンス放射線照射

は、X線マイクロビームは高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設、プロトンマイクロビームは放射線医学総合研究所マイクロビーム細胞照射装置、重イオンマイクロビーム(炭素・ネオン・アルゴンイオン)は、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所で実施した。バイスタンダー効果検証実験法は、自作のマイクロビーム照射用ディッシュを用いたマトリックス照射法を用いた(図1)。この照射法により、ディッシュ上に培養した全細胞数に対して0.04%程度の細胞のみを限定的に“狙い撃つ”ことが可能となり、同一ディッシュ内に照射細胞と非照射細胞(バイスタンダー細胞)を共存させる事が出来る。得られた生物効果を解析することで、バイスタンダー効果が誘導されたか否かを評価した。

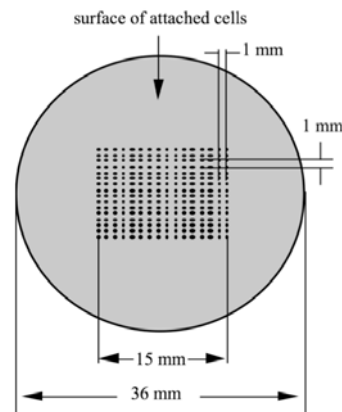


図1. 高精度に制御されたマイクロビームのマトリックス照射法。

### 4. 研究成果

本研究によって得られた研究成果は以下のようにまとめられる。

(1) 高精度に制御されたマイクロビーム放射線照射法により、細胞集団中のごく一部の細胞にのみマイクロビームの直接照射が行われる実験条件で細胞増殖死を解析したところ、炭素イオンマイクロビーム照射群の細胞生存率は88%となり、予想を超えて有意に高い細胞死を示した(図2)。また、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用した場合は、炭素イオンに対する生存率はその他の放射線マイクロビームと同様100%となった(図2)。一方、X線・プロトン・ネオンイオン・アルゴンイオンマイクロビーム照射群では、ギャップジャンクション阻害剤併用の有無に関わりなく生存率は100%となった。以上の結果より、炭素イオンマイクロビーム照射でのみ細胞増殖死にバイスタンダー効果が誘導されたと結論した。また、観察されたバイスタンダー効果は、細胞内在性因子としてギャップジャンクションを介した細胞

間情報伝達機構が誘導メカニズムに関与していることが示唆された。

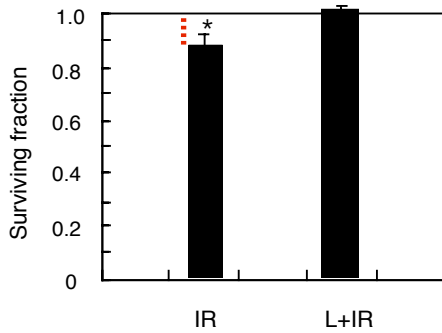


図2. 炭素イオンマイクロビームを照射された細胞群の生存率。IRはマイクロビーム照射群、L+IRはギャップジャンクション特異的阻害剤を併用したマイクロビーム照射群を示す。データは、8回の独立した照射実験の平均値と標準誤差を示す (\*  $p < 0.05$ )。赤い点線部分の細胞死がバイスタンダー効果によって誘導されたと考える。

(2) ヒトX染色体上に位置する *HPRT* 遺伝子座に対する突然変異誘発効果を解析したところ、炭素イオンマイクロビーム照射群の突然変異誘発頻度は、非照射群に対して約6倍高くなったが、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用すると突然変異は非照射群と同じレベルまで減少した(図3)。一方、X線・プロトン・ネオンイオン・アルゴンイオンマイクロビーム照射群では、非照射群と統計学的に有意な差が観察されなかった。

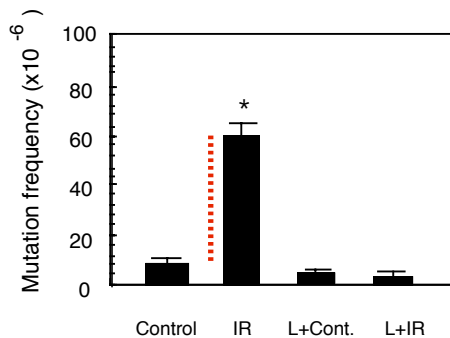


図3. 炭素イオンマイクロビームを照射された細胞群の突然変異誘発。Controlはマイクロビーム非照射群、IRはマイクロビーム照射群、L+Cont.はギャップジャンクション阻害剤処理のみ、L+IRはギャップジャンクション特異的阻害剤を併用したマイクロビーム照射群を示す。データは、8回の独立した照射実験の平均値と標準誤差を示す (\*  $p < 0.05$ )。

以上の結果より、炭素イオンマイクロビーム照射のみで突然変異にバイスタンダー効果が誘導されたと結論した。また、観察されたバイスタンダー効果は、ギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構がバイ

スタンダー効果誘導のメカニズムに関与していることが示唆された。細胞死および遺伝子突然変異で観察されたバイスタンダー効果は、放射線の線質に依存していること、細胞内在性因子としてギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構が密接に関与していることが示唆された。

(3) 放射線を照射された細胞よりメディウム中に湧出する液性因子によるバイスタンダー効果誘導の有無を明らかにする目的で、生物効果のバイスタンダー効果が観察された炭素イオンと観察されなかったネオン・アルゴンイオンを用いて、マイクロビーム照射後0.5、3、24時間での細胞増殖死を調べた。得られた結果から、炭素イオンマイクロビーム照射サンプルでは、0.5・3時間で細胞生存率は90%前後となり、ギャップジャンクション阻害剤併用ではほぼ100%を示した。また、24時間後では生存率はギャップジャンクション阻害剤の有無に係わらずほぼ100%となった。ネオンイオンマイクロビーム照射サンプルでは、0.5・3・24時間何れのタイミングにおいても、ギャップジャンクション阻害剤の有無に係わらず生存率はほぼ100%となった。一方アルゴンイオンマイクロビーム照射サンプルでは、0.5・3時間のタイミングでは生存率はほぼ100%であったが、24時間では生存率は約90%まで減少した。さらに、ギャップジャンクション阻害剤を併用しても同様に生存率は約90%となった(図5)。この効果は、DMSOを添加しても変化がなかったが、アスコルビン酸を併用することによって生存率が100%まで上昇した(図6)。アルゴンイオン照射サンプルの24時間でのデータはバイスタンダー効果を仮定しない場合の予想を遙かに超えて細胞死が起こったことを示しており、アルゴンイオンでは、アスコルビン酸によって抑制される何らかの因子によって、細胞死を増幅するようなバイスタンダー効果が誘導されることが示唆された。

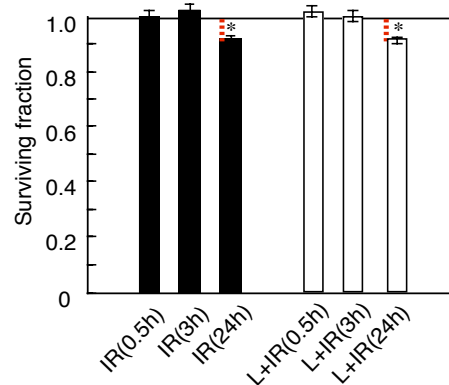


図5. アルゴンイオンマイクロビームを照射された細胞群の生存率の時間変化(0.5、3、24h)。IRとL+Cont.表示は図1と同じ。デー

タは、8回の独立した照射実験の平均値と標準誤差を示す (\* p < 0.05)。

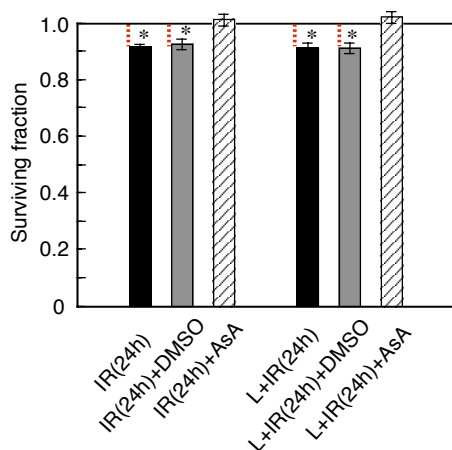


図6. アルゴンイオンマイクロビームを照射された細胞群の24時間後の生存率とラディカルスキャベンジャーとの関係。IRとL+Cont.表示は図1と同じ。AsAはアスコルビン酸を表す。データは、8回の独立した照射実験の平均値と標準誤差を示す (\* p < 0.05)。

#### 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 8 件)

- ① T. Inaniwa, N. Kanematsu, M. Suzuki, R. B. Hawkins, Effects of beam interruption time on tumor control probability in single-fractionated carbon-ion radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Phys. Med. Biol.*, **60**, 4105-4121 (2015). 査読有、DOI: 10.1088/0031-9155/60/10/4105.
- ② N. Autsavapromporn, I. Plante, C. Liu, T. Konishi, N. Usami, T. Funayama, E. I. Azzam, T. Murakami, M. Suzuki, Genetic changes in progeny of bystander human fibroblasts after microbeam irradiation with X rays, protons or carbon ions: The relevance to cancer risk. *Int J. Radiat. Biol.*, **91**, 62-70 (2015). 査読有、DOI: 10.3109/09553002.2014.950715.
- ③ L. Barazzuol, J. C. G. Jaynes, M. J. Merchant, A-C. Wera, M. Barry, K. J. Kirkby, M. Suzuki, Radiosensitisation of glioblastoma cells using a histone deacetylase inhibitor (SAHA) comparing carbon ions with X-rays. *Int J. Radiat. Biol.*, **91**, 90-98 (2015). 査読有、DOI:10.3109/09553002.2014.946111.
- ④ A. C. Were, L. Barazzuol, J. C. Jaynes, M. J. Merchant, M. Suzuki, K. J. Kirkby,

Influence of the nucleus area distribution on the survival fraction after charged particles broad beam irradiation. *Phys. Med. Biol.* **59** (15), 4197-4211 (2014). 査読有、DOI:10.1088/0031-9155/59/15/4197.

- ⑤ M. Wada, M. Suzuki, C. Liu, Y. Kaneko, S. Fukuda, K. Ando, N. Matsufuji, Modeling the biological response of normal human cells, including repair processes, to fractionated carbon beam irradiation. *J. Radiat. Res.*, **54**, 798-807 (2013). 査読有、DOI:10.1093/jrr/rrt012.
  - ⑥ T. Inaniwa, M. Suzuki, T. Furukawa, Y. Kase, N. Kanematsu, T. Shirai, R. B. Hawkins, Effect of dose-delivery time structure on biological effectiveness for therapeutic carbon-ion beams evaluated with microdosimetric kinetic model. *Radiat. Res.*, **180**, 44-59 (2013). 査読有、DOI:10.1667/RR2178.1.
  - ⑦ N. Autsavapromporn, M. Suzuki, I. Plante, C. Liu, Y. Uchihori, T. K. Hei, E. I. Azzam, T. Murakami, Participation of gap junction communication in potentially lethal damage repair and DNA damage in human fibroblasts exposed to Low- or High-LET radiation. *Mutat. Res., -Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **756**, 78-85 (2013). 査読有、DOI:10.1016/j.mrgentox.2013.07.001.
  - ⑧ N. Autsavapromporn, M. Suzuki, T. Funayama, N. Usami, I. Plante, Y. Yokota, Y. Mutou, H. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Kobayashi, Y. Uchihori, T. K. Hei, E. I. Azzam, T. Murakami, Gap junction communication in the propagation of bystander effects induced by microbeam irradiation in human fibroblast cultures: The impact of radiation quality. *Radiat. Res.*, **180**, 367-375 (2013). 査読有、DOI:10.1667/RR3111.1.
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 鈴木雅雄、宇佐美徳子、小林克己、村上健、細胞質限定的照射に対するX線照射効果解析の試み。第28回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、草津市、2015.1.10-12。
  - ② 鈴木雅雄、マイクロビーム放射線を利用した細胞核・細胞質限定的照射によるバイスタンダー効果解析。日本放射線影響学会第57回大会、鹿児島市、2014.10.1-3。
  - ③ Masao Suzuki, Biological late effects for secondary radiations from carbon

ions simulating clinical heavy-ion radiotherapy. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜市、2014. 9. 25-27。

- ④ 鈴木雅雄、Narongchai Autsavaporn、宇佐美徳子、飯塚敏江、小林克己、村上健、バイスタンダー効果で誘導されるヒト正常細胞の染色体損傷誘発効果の X 線マイクロビームによる解析。第 27 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、広島市、2014. 1. 11-13。
- ⑤ 鈴木雅雄、Narongchai Autsavaporn、舟山知夫、横田裕一郎、武藤泰子、池田裕子、鈴木芳代、服部佑哉、坂下哲哉、小林泰彦、村上健、アルゴンイオンマイクロビーム照射で誘導される細胞死効果のバイスタンダー効果。日本放射線影響学会第 56 回大会、青森市、2013. 10. 18-20。
- ⑥ M. Suzuki, Y. Yokota, P53-dependent cell-killing effect via bystander effect using carbon-ion microbeams simulating the 3D fast scanning system with pencil beams at HIMAC. 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市、2013. 10. 3-5。
- ⑦ M. Suzuki, N. Autsavaporn, N. Usami, T. Funayama, I. Plante, Y. Yokota, Y. Mutou, M. Suzuki, H. Ikeda, Y. Hattori, K. Kobayashi, Y. Kobayashi, T. Murakami, Radiation-quality dependent bystander effects induced by the microbeams with different radiation sources. Heavy Ion in Therapy and Space Radiation Symposium 2013 (HITSRS2013)、Chiba、2013. 5. 15-18。
- ⑧ M. Suzuki, N. Autsavaporn, T. Funayama, I. Plante, Yuichiro Yokota, Yasuko Mutou, M. Suzuki, H. Ikeda, Y. Hattori, Y. Kobayashi, T. Murakami, Cellular response for low-fluence irradiation with HZE-ion beams. 3rd Asian Congress of Radiation Research, Beijing、中国、2013. 5. 10-13。
- ⑨ N. Autsavaporn, M. Suzuki, C. Liu, Y. Uchihori, T. K. Hei, E. I. Azzam, T. Murakami, Participation of intercellular communication in repair of potentially lethal damage and DNA damage in human cells exposed to low- or high-LET radiations. The 10<sup>th</sup> International Symposium on Chromosome Aberration、イタリア、2012. 10. 19-21
- ⑩ 鈴木雅雄、地上実験による各種低線量率放射線生物影響研究でわかったこと。日本宇宙生物科学会第 26 回大会、徳島市、2012. 9. 27-29。
- ⑪ M. Suzuki, N. Autsavaporn, H. Kitamura, C. Liu, T. Murakami、

P53-dependent bystander cell-killing effect in human tumor cell lines irradiated with the HIMAC carbon-ion beams. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012. 9. 19-21。

- ⑫ 鈴木雅雄、宇佐美徳子、Narongchai Autsavaporn、飯塚敏江、劉翠華、金子由美子、小林克己、村上健、放射光 X 線マイクロビーム細胞核限定的照射に対する細胞致死効果のバイスタンダー効果。日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台市、2012. 9. 6-8。

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 雅雄 (SUZUKI MASAO)  
独立行政法人放射線医学総合研究所・  
重粒子医科学センター・主任研究員  
研究者番号：70281673

### (2) 研究分担者

該当せず ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

該当せず ( )

研究者番号：