

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791354

研究課題名(和文)軟骨肉腫細胞における二種類の経路を介したバイスタンダー効果の解明

研究課題名(英文)Bystander response in chondrosarcoma cells

研究代表者

若月 優(Wakatsuki, Masaru)

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・医長

研究者番号：40399449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫は放射線抵抗性の腫瘍として知られているが、放射線抵抗性の詳しいメカニズムは明らかになっていない。また近年、従来のX線による放射線治療と比較して高LETである炭素イオン線治療の良好な成績が報告されている。我々はLETの異なる炭素イオン線照射に伴う軟骨肉腫細胞におけるLET依存性のバイスタンダー効果を解析した。高LET炭素イオン線照射では低LET炭素イオン線照射と比較して軟骨肉腫細胞に対する高い殺細胞効果を示した。一方で照射された軟骨肉腫細胞と共培養した繊維芽細胞におけるDNA損傷を調べるとLETによる損傷に差は無く軟骨肉腫細胞ではバイスタンダー効果にLET依存性がない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The bystander effect, whereby cells that are not traversed by ionizing radiation exhibit various responses when in proximity to irradiated cells, is well documented in the field of radiation biology. In the present work, we investigated the bystander response induced by ionizing radiation in chondrosarcoma cells.

Human chondrosarcoma cells (HTB94) and human skin fibroblasts (AG01522) were irradiated with carbon irradiation of varied Linear energy transfer (LET) using a transwell insert co-culture system that precludes physical contact between targeted and bystander cells. We investigated the bystander signaling between mixed cultures of tumor cells and normal human skin fibroblasts (AG01522). We analyzed DNA damage by using micronucleus formation assays.

Bystander AG01522 fibroblasts show increases above the levels of MN in control cells after co-culture with tumor cells. However, there were no differences between high and low LET.

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 炭素イオン線 重粒子線 軟骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

近年、正常細胞や腫瘍細胞に対する放射線照射により誘発されるバイスタンダー効果に関して多くの報告がある。バイスタンダー効果は実際に照射を受けた細胞が、周囲の照射を受けていない細胞に与える影響であり、その影響を与える経路として、ギャップ結合を介したものと、メディウムを介したものがあることがすでに複数の報告で示されている。しかしながら、そのメカニズムの詳細に関してはまだ明らかにされていない。

このメディウムを介したバイスタンダー効果を調べる方法として、Transwell insert co-culture システムを用いた方法を考案され、複数の報告がなされている。Transwell insert co-culture システムは従来の照射細胞が培養されていたメディウムを非照射細胞の培地に移す方法とは異なり、照射細胞と非照射細胞が接触することなく、メディウムを共有することによる共培養を可能にし、バイスタンダー効果を調べる方法である。この方法により薬剤の投与やメディウムを共有する時間の調整などの実験が容易に可能となった。

一方軟骨肉腫は放射線抵抗性の腫瘍として知られており、一般に外科的切除が治療の第一選択とされているが、切除不能症例や残存症例などに対して、放射線治療が行われている。軟骨肉腫の放射線抵抗性の要因として、腫瘍における細胞外基質の存在や細胞周期が長いこと、血管が少ないこと等が考えられているが、その詳しいメカニズムは明らかになっていない。また近年、陽子線治療・炭素イオン線治療の報告が複数なされており、従来の X 線による放射線治療と比較して、良好な成績が報告されている。

我々は以前の研究にて Transwell insert co-culture システムを用いて、軟骨肉腫細胞における X 線照射・粒子線照射（鉄イオン・陽子など）により誘発されるメディウムを介したバイスタンダー効果の欠如を示すこと、その原因が軟骨肉腫細胞におけるバイスタンダー刺激の受容・反応の欠如であることを報告しているが、いまだその詳細なメカニズムに関しては不明な点が多く存在する。

2. 研究の目的

(1)異なる LET の炭素イオン線照射がされた軟骨肉腫細胞 (HTB94) の生存曲線を作成し、LET の異なる炭素イオン線照射による軟骨肉腫細胞の殺細胞効果を解析すること。

(2)LET の異なる炭素イオン線照射がされた軟骨肉腫細胞とヒト線維芽細胞を Transwell insert co-culture システムを用いて共培養し、ヒト線維芽細胞の DNA 損傷を解析すること。

上記煮の解析により、LET の異なる炭素イオン線照射により軟骨肉腫細胞から産生・放出されるバイスタンダー刺激における LET 依存性の有無を確認する。

3. 研究の方法

ヒト軟骨肉腫細胞 (HTB94) およびヒト線維芽細胞 (AG0157) を使用する。

軟骨肉腫細胞に対して 3 種類の LET (15、30、70 KeV/ μ l) を用いた炭素イオン線照射 1Gy-8Gy を行い、コロニー形成法により、細胞の生存率を計測した。

Transwell insert co-culture システムを用いて、細胞同士が接触をせず、メディウムを共有する形での共培養状態とする。非照射細胞における DNA 損傷の頻度を micronucleus assay を用いて調べることにより、照射細胞のバイスタンダー刺激を調べる。

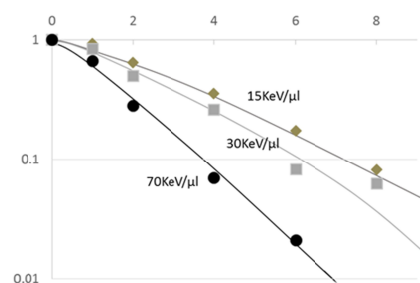
異なる線種・LET (X 線・陽子 (1 GeV/amu; LET of 0.2 keV/mm)・炭素イオン (290 MeV/amu; LET of 15 keV/mm)・鉄イオン (1 GeV/amu; LET of 151 keV/mm)) により照射された軟骨肉腫細胞と非照射のヒト線維芽細胞を共培養し、その DNA 損傷を調べ、軟骨肉腫細胞における線種ごとのバイスタンダー刺激を調べる。

続いて炭素イオン線 (290MV/amu) において 3 種類の LET (15、30、70 KeV/ μ l) を照射された軟骨肉腫細胞と非照射のヒト線維芽細胞を共培養し、その DNA 損傷を調べ、軟骨肉腫細胞における線種ごとのバイスタンダー刺激を調べる。

4. 研究成果

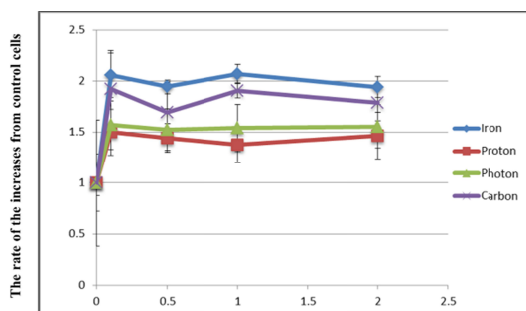
(1)軟骨肉腫細胞に対して 3 種類の LET (15、30、70 KeV/ μ l) を用いて炭素イオン線照射 1Gy-8Gy を行い、コロニー形成法により、細胞の生存率を計測した。その結果、高 LET 炭素イオン線照射では低 LET 炭素イオン線照射と比較して高い殺細胞効果を示し、LET 依存性の殺細胞効果が示された。(図 1)

図 1 LET の異なる炭素イオン線 (15, 30, 70 KeV/ μ l) における生存曲線



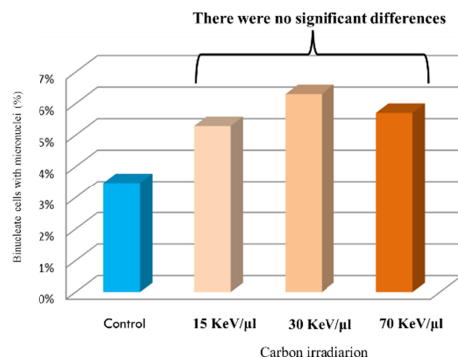
(2)異なる線種・LET (X線・陽子(1 GeV/amu; LET of 0.2 keV/mm)・炭素イオン(290 MeV/amu; LET of 15 keV/mm)・鉄イオン(1 GeV/amu; LET of 151 keV/mm))により照射された軟骨肉腫細胞から産生・放出されるバイスタンダー刺激によるDNA損傷の頻度を調べると、LETの高い炭素イオン・鉄イオンによる反応がLETの低いX線・陽子線照射による反応と比べて大きい傾向にあった。(図2)

図2 異なる線種・LETにより照射された軟骨肉腫細胞と共培養したヒト線維芽細胞のDNA損傷の頻度の変化



(3) LETの異なる炭素イオン線(15、30、70 KeV/μl)を2Gy照射された軟骨肉腫細胞とバイスタンダーヒト線維芽細胞を共培養し、DNA損傷の頻度をmicronucleus assayを用いて、計測するとコントロールと比較して照射細胞と共培養した線維芽細胞におけるバイスタンダー反応をいずれのLETでも認めましたが、LETによる差は無い傾向であった。(図3)

図3 LETの異なる炭素イオン線(15,30,70 KeV/μl)照射された軟骨肉腫細胞と共培養されたヒト線維芽細胞におけるDNA損傷の頻度



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 5 件)

Wakatsuki M, Ohno T, Nakano T et al. Impact of boost irradiation on pelvic lymph node control in patients with cervical cancer. J Radiat Res. 査読有 55巻 2014 pp.139-45.

Wakatsuki M, Kato S, Shozu M, et al. Clinical outcomes of carbon ion radiotherapy for locally advanced adenocarcinoma of the uterine cervix in phase 1/2 clinical trial (protocol 9704). Cancer. 査読有 120巻 2014、pp1663-1669

Wakatsuki M, Kato S, Shozu M, et al. Dose-escalation study of carbon ion radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix (9902). 査読有 Gynecol Oncol.132巻 pp87-92

Okada T, Murata K, Wakatsuki M, et al. Upregulated expression of FGF13/FHF2 mediates resistance to platinum drugs in cervical cancer cells. Sci Rep. 査読有 2013 in press

Katoh H, Tsuji H, Wakatsuki M, et al. Health-related quality of life after carbon-ion radiotherapy for prostate cancer: A 3-year prospective study. Int J Urol. 査読有 2013 in press

[学会発表](計 4 件)

Wakatsuki M, Irie D, Kamada T. LET-dependent bystander effect after particle irradiation (発表確定) 第73回日本医学放射線学会 2014年4月10-13日(横浜)

若月 優 子宮頸癌に対する重粒子線治療の臨床試験 第51回日本癌治療学会 2013年10月24-26日(京都)

Wakatsuki M, Kato S, Shozu M et al. carbon ion radiotherapy for locally advanced adenocarcinoma of the uterine cervix PTCOG2013 2013年6月5-8日(Essen)

若月 優、加藤真吾、生水真紀夫ら 局所進行子宮頸部扁平上皮癌に対する重粒子線単独の臨床試験成績 第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2013年7月19-21日(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若月 優 (WAKATSUKI, Masaru)

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・医長

研究者番号：40399449

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：