

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861137

研究課題名(和文)異種細胞間における放射線誘発バystander効果に関する細胞応答解析

研究課題名(英文) Study on radiation induced bystander signaling between targeted human lung cancer cells and neighboring normal cells.

研究代表者

小西 輝昭 (Konishi, Teruaki)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・研究基盤センター・研究員

研究者番号：70443067

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)：放射線がん治療は、がん患部への線量集中性により非常に高い治療効果を上げている。本課題では、照射がん細胞と非照射正常細胞の間における細胞間情報伝達の有無とその影響を明らかにすることを目的とした。そのためにマイクロビーム細胞照射装置SPICEを活用し、細胞レベルでがん患部を模擬するべく、がん細胞と正常細胞の共培養条件下で、がん細胞へのみ陽子線を照射することを実現した。その結果、照射されたがん細胞は、隣接する正常細胞による細胞間情報伝達によって、誘発されたDNA二本鎖切断の修復に関与することを見出した。つまり、照射されたがん細胞とその隣接する正常細胞は、双方にシグナル伝達を行っていることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Radiation cancer therapy is now one of the most successful method due technological innovations of the highly accurate and selective localization of the dose. The purpose of this study was to construct a simple model in radiotherapy, and to clarify the effect and its mechanism of cellular communication between irradiated cancer cells and non-irradiated normal cells. We applied microbeam irradiation technologies to target only the A549 human lung carcinoma cells in the mixed population of cells with human normal lung fibroblast cells. SPICE-NIRS microbeam was used to irradiate 500 protons of 3.4 MeV (LET: 12 Kev/um in water) two nuclei of A549 cells. As a result, we found that two major pathways of radiation induced bystander response, media transfer signaling pathway and gap junction mediated signaling pathway mediate DNA double strand breaks repair pathway in irradiated A549 cells by non-irradiated WI-38 cells.

研究分野：放射線生物学

 キーワード：バystander効果 マイクロビーム DNA二本鎖切断 窒素酸化物ラジカル 細胞間情報伝達 ギ
 ャップジャンクション H2AX

1. 研究開始当初の背景

放射線がん治療には、硬エックス線、陽子線、重粒子線またはホウ素中性子捕獲療法 (BNCT) と様々な優位性を生かした治療が現在実用化されている。放射線治療の最大の特徴として、がん患部への線量の集中性がある。また、非がん患部領域への線量付与量を減らすために、複数の方向からの外部照射である多門照射によってその線量の集中性は格段に上がっている、しかし、一方で、この方法では、非がん患部への照射線量を減らすことはできるが、放射線の線量が付与される領域が拡大することになるといった懸念もある。つまり、非がん患部領域において低線量放射線による被ばく領域が増大していることになる。低線量放射線影響において、バースタンダー細胞応答は大きな割合を占めている。このバースタンダー効果には、培地介在性 (Media Transfer, MT) 経路と細胞膜間情報伝達 (Gap Junction, GJ) 経路に大別される。バースタンダー効果には、細胞致死、染色体異常などの負の効果がある一方で、放射線適応応答や DNA 損傷修復を促進するなどの正の効果またはレスキュー効果についても報告されている。これらの正・負の効果を定量的に評価するには、MT, GJ 経路を正確に分離して評価する必要があると考えた。またこのような放射線誘発バースタンダー応答に関するメカニズムについて知見を蓄積することが放射線治療だけでなく放射線防護・リスク等にも貢献できると考えた。

組織中においては、がん患部にはがん細胞を種々の正常細胞が隣接すると考えられる。このような細胞環境を細胞レベルでの実験で模擬するために、がん細胞と正常細胞を同一の細胞皿中で共培養する必要がある。また、がん細胞へののみ放射線を付与することが可能であれば、照射されたがん細胞とその周辺の正常細胞間における細胞間伝達メカニズムを解明できるだけでなく、放射線治療の際のがん患部およびその周辺組織における細胞環境内応答モデルの基礎を構築できるのではないかと考えた。

これらを実験的に実現するために、がん細胞へののみ放射線を付与することが必要である。そのため、最先端放射線照射技術によって実用化されているマイクロビーム細胞照射装置を最大限活用することにした。

2. 研究の目的

がん細胞への放射線照射によってその周辺部に存在する正常細胞との細胞間情報伝達機構について、その細胞応答および分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのために、ヒト肺がん細胞 A549 細胞およびヒト肺正常 WI-38 細胞を用いることにし、またマイクロビーム細胞照射装置 SPICE によって導入される陽子線マイクロビームにより A549 がん細胞へののみ照射することが可能な実験系の構築を行った。次に、単一細胞

レベルでの 1) 非照射細胞におけるバースタンダー応答、と 2) 非照射細胞との細胞間情報伝達による照射細胞であるがん細胞の DNA 二本鎖切断修復への影響について解析を行った。

3. 研究の方法

本研究課題において、照射細胞と非照射細胞ならびにがん細胞と正常細胞を区別して解析する必要があった。そのために、放射線医学総合研究所の陽子線マイクロビーム細胞照射装置 SPICE を活用した。SPICE は、我々が開発・実用化した装置であり、世界トップレベルのマイクロビーム細胞照射装置である。本装置は、3.4MeV の陽子線を直径 2 マイクロメートルにまでビームを集束することが可能であるとともに、陽子線 1 個から任意の粒子数までを照射可能である。また、その照射速度も、毎分 400 細胞の高速性を実現している。

照射するがん細胞には、親株を A549 細胞とし、pBOSH2BGFP vector をトランスフェクションして安定的にヒストンタンパク質 H2B-GFP タンパク質を発現させた A549H2BGFP 細胞を作成し、これを用いた。A549H2BGFP 細胞をヒト正常 WI38 細胞と共培養させた試料では、この GFP 蛍光を頼りにマイクロビームにて照射、照射を行うことが可能となった。同様に、がん細胞のみの集団においても、親株である A549 細胞と共培養し、照射細胞と非照射細胞を区別することを可能にした。

本研究課題において、1) A549 細胞と A549H2BGFP 細胞を共培養したがん細胞のみの試料、2) A549H2BGFP 細胞と WI38 細胞を共培養したがん細胞・正常細胞の共培養試料を設定した。この 2) がん細胞・正常細胞集団に対しては、共培養のみのものに加えて、ア) MT 経路の主因と考えられる窒素酸化物ラジカル捕獲剤 (cPT10) を添加したもの、イ) GJ 経路阻害剤 (AGA) を添加したもの、ウ) また、その両方を添加したものを準備した。

これらの試料に対して、照射領域として設定した領域 (1.6 mm × 0.8 mm) に存在した A549H2BGFP 細胞の細胞核へののみ陽子線 500 個をマイクロビーム照射した (図 1)。試料あたり照射細胞数は 500 個以上を目標とした。照射の 1, 4, 8, 16, 24 時間後にパラホルムアルデヒド (PFA) にて固定し、DNA 二本鎖切断のマーカーである H2AX に対して免疫蛍光染色を行った。SPICE 顕微鏡システムにて蛍光画像を取得し、細胞核あたりの H2AX 量を蛍光を頼りに算出した。具体的には、画像解析ソフトウェアには、ImageJ を使い、1) 照射領域の A549H2BGFP 細胞、2) 同領域に存在した非照射細胞 (A549 細胞または WI38 細胞)、3) 非照射領域にいる A549 細胞または WI38 細胞について、細胞核あたりの H2AX を数値化した。

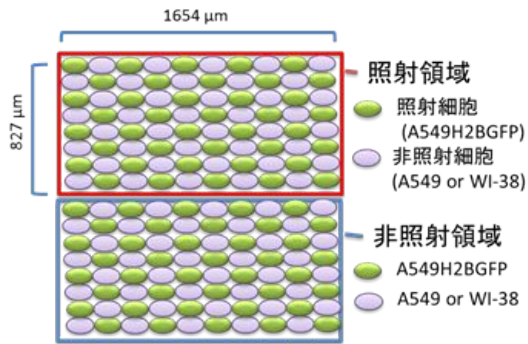


図1．照射領域と非照射領域。照射領域のA549H2BGFP細胞のみマイクロビーム照射し、それ以外の両領域にいる細胞についても解析を行った。

4．研究成果

照射された細胞 (A549H2BGFP) には必ず DNA 二本鎖切断 (DSB) が誘発されることから、H2AX (+) 細胞となると考えられ、また照射後、細胞は DSB 修復を行う。我々は、この照射 A549H2BGFP 細胞の DSB について、残存する H2AX を有する細胞集団の割合を測定した。非照射試料 (コントロール) より測定された H2AX 値の分布を求め、H2AX 値の上位 5 % を示す H2AX 値を閾値として設定した。照射細胞・非照射細胞において、この閾値以上の H2AX 値を有する細胞を H2AX (+) と定義した (図 2)。

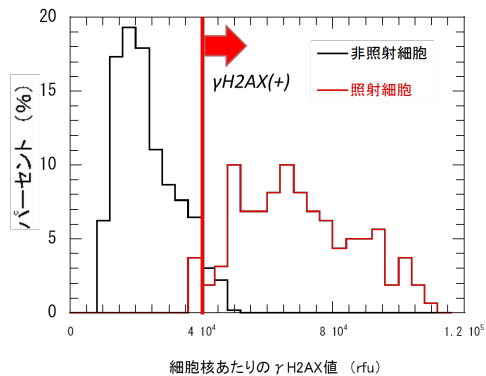


図2．A549H2BGFP 細胞の細胞核当たりの H2AX 蛍光値の分布。非照射細胞を黒、照射 1 時間後の H2AX 値を赤で示した。

その結果、A549H2BGFP と A549 細胞のがん細胞のみの集団、並びに A549H2BGFP 細胞と正常 WI38 細胞との共培養集団の各培養条件において、以下の図 3 に示す結果を得た。がん細胞のみの場合に比べて、正常細胞との共培養条件の方が、H2AX (+) 細胞の割合の減少が若干早い傾向がみられる。つまり、正常細胞とがん細胞間における細胞間シグナル伝達によって、H2AX (+) を示す細胞集団

を減少させていることになる。これに対して、照射の 8, 16, 24 時間後では、cPT10 を添加した試料の方が無添加比べて修復早かったことから、MT 経路の窒素酸化ラジカルは、照射された細胞の DSB 復経路を抑制していると考えられる。また、その逆に GJ 阻害剤 (AGA) を添加するとその効果が打ち消されているような現象がみられたことから、GJ 経路は DSB 修復経路の活性化に関与していると考えられた。しかし、cPT10 と AGA の両方を添加した場合、その H2AX (+) 細胞の割合の減少が最も緩やかであった。つまり、これは、MT 経路と GJ 経路の両経路が DSB 修復経路に対して、相互に関係して作用している可能性を示唆している。

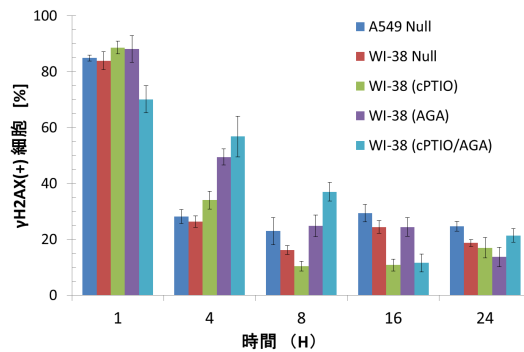


図3．照射細胞 (A549H2BGFP 細胞) の H2AX (+) 細胞の割合の経時変化。凡例 A549 は、がん細胞との共培養、WI38 は正常細胞との共培養、また () 内は添加した試薬を示す。

照射領域の非照射細胞についても、同様に H2AX (+) 細胞の割合を図 4 に示した。その頻度は非常に小さくばらつきが大きい結果となった。しかし、がん細胞のみ、正常細胞との共培養の集団ともに、照射 4 時間後以降は、コントロール (非照射試料) より高い値を示していることから、照射細胞に隣接する非照射細胞にも H2AX を誘発していることを確認した。しかし、cPT10 添加によって有意にその効果を抑制したのは、照射 4 時間後と 16 時間後のみであり、また、cPT10、AGA ともにこの効果を抑制しておらず、H2AX (+) 細胞の割合は依然とコントロールより高かった。

照射領域と同様に、非照射領域に存在する A549 細胞の H2AX (+) 細胞の割合を図 5 に示した。この領域にいる細胞は、照射細胞に隣接していないため、その影響は MT 経路を主としたバイスタンダー効果によって H2AX が誘発されたと考えられた。照射の 4, 8, 16 時間後において、がん細胞のみと、正常細胞との共培養試料の両方において、また、照射 24 時間後では共培養試料の正常細胞にのみでコントロールに比べて高い割合の H2AX (+) を示した。そして、cPT10、AGA、並びにその両方の添加によって、その効果は

照射 24 時間後で有意に抑制されたことを確認した。

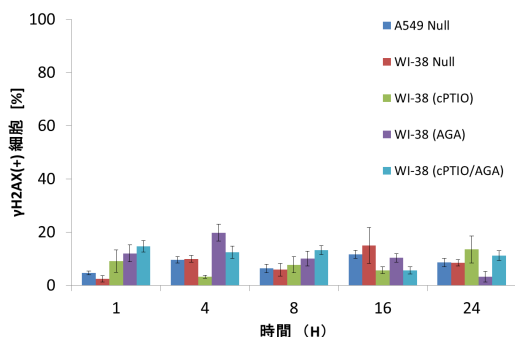


図 4 . 照射領域の非照射細胞 A549 細胞または WI38 細胞の H2AX (+) 細胞の割合の経時変化。凡例は図 2 と同じ。

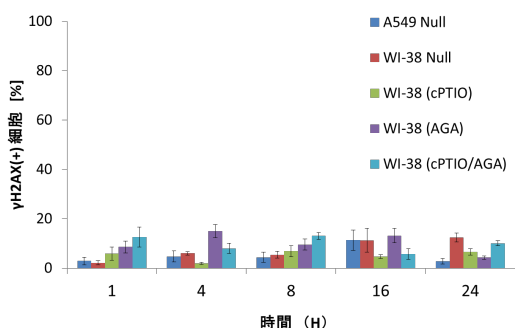


図 5 . 非照射領域の非照射 A549 細胞または WI38 細胞の H2AX (+) 細胞の割合の経時変化。凡例は図 2 と同じ。

これらの結果より、照射された A549H2BGFP 細胞集団は、その近傍の WI38 細胞による DSB 修復経路への関与がみられ、その作用は MT 経路、GJ 経路と相反する影響を及ぼすとともに、相互に関係している可能性を示唆している。そして照射された細胞に隣接している非照射細胞とある一定の距離を有している細胞の両方について H2AX (+) 細胞の増加を確認し、また cPTIO、AGA によるその効果の抑制がみられたことから、両経路に依存してバイスタンダー効果が存在した。

しかし、本結果より、MT 経路の主因と考えられる窒素酸化物ラジカルについては、どの細胞から産生されたのか、不明である。そして、GJ 経路によるバイスタンダー効果の伝播についても、その原因となる因子または受容体等についても断定できていない。つまり、照射されたがん細胞と非照射の正常細胞集団における放射線誘発細胞応答について、どのような誘導経路を介して、どのようなシグナルが伝播し、または受け取られたのか、などの詳細なメカニズムの理解には至っていない。今後は、これら知見を積み上げていくとともに、バイスタンダー効果による DSB 修

復経路への寄与については研究を進めていきたい。

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 1 件)

Desai S, Kobayashi A, Konishi T, Oikawa M, Pandey BN, Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation., Mutation Research -Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 763-764, p39-44, 2014 (査読あり) DOI:10.1016/j.mrfmmm.2014.04.004

[学会発表] (計 6 件)

Teruaki Konishi, Alisa Kobayashi, Peter KN Yu, Gen Yang, Tengku Ahbrizal Farizal Tengku Ahmad, Masakazu Oikawa, Yoshiya Furusawa, SPICE-NIRS Microbeam: a focused vertical system for proton irradiation of a single cell for radiation biology. The 12th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, Microbeam Workshop 2015(国際学会), 2015年5月30 - 6月1日, The Wakasa Wan Energy Research Center (WERC) (日本)

Alisa Kobayashi, Teruaki Konishi, Masakazu Oikawa, Yukio Uchihori, Shino Takeda, Yoshito Kumagai, Yoshiya Furusawa, An examination of how neighboring un-irradiated normal cells inhibit repair of irradiated cancer cells., The 12th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, Microbeam Workshop 2015(国際学会), 2015年5月30 - 6月1日, The Wakasa Wan Energy Research Center (WERC) (日本)

Teruaki Konishi, Alisa Kobayashi, Peter KN Yu, Gen Yang, Masakazu Oikawa, Yoshiya Furusawa, Current status and radiobiological studies using SPICE-NIRS Microbeam irradiation system., International Congress of Radiation Research (ICRR2015)(国際学会)、2015年5月26日~28日, Kyoto International Conference Center (日本)

Alisa Kobayashi, Teruaki Konishi, Masakazu Oikawa, Yukio Uchihori, Shino Takeda, Yoshito Kumagai,

Yoshiya Furusawa, Analysis of the bystander effect between microbeam targeted cancer cells and non-targeted normal cells., International Congress of Radiation Research (ICRR2015)(国際学会)、2015年5月26日～28日、Kyoto International Conference Center (日本)

小西輝昭、小林亜利紗、及川将一、ウォーレン圭子、古澤佳也、酢屋徳啓、内堀幸夫、白川芳幸、放医研マイクロビーム細胞照射装置S P I C Eの現状、日本放射線影響学会第57大会、2014年10月1日～4日、かごしま県民交流センター

小林亜利紗、小西輝昭、及川将一、バッドリパンディ、デザイセジャル、前田武、内堀幸夫、白川芳幸、ヒトがん細胞と正常細胞間における放射線誘発バイスタンダー効果の解析、日本放射線影響学会第57大会、2014年10月1日～4日、かごしま県民交流センター

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小西輝昭 (KONISHI, Teruaki)

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所・研究基盤センター・研究員

研究者番号：70443067

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

小林亜利紗 (KOBAYASHI, Alisa)

前田武 (MAEDA, Takeshi)

及川将一 (OIKAWA, Masakazu)

古澤佳也 (FURUSAWA, Yoshiya)

ピーター ユー (YU, Peter)

デザイ セジャル (DESAI, Sejal)

パンディ バッドリ (PANDEY, Badri)