

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860977

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セラミドの関与の解析

研究課題名(英文)Relationship of ceramide in cellular response of heavy ion irradiation

研究代表者

河村 英将(Kawamura, Hidemasa)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80431716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞株や軟骨肉腫細胞株に放射線照射を行い、その照射した細胞と照射をしていない非照射細胞を共培養を行うことで放射線に対する細胞応答反応を解析した。特に共培養した非照射細胞の細胞応答反応におけるセラミドの関与を解析するため、蛍光免疫染色の手法を用い、画像解析を行うことでDNA損傷やセラミドの定量的な評価を行った。非照射細胞の放射線応答反応(バystander効果)を確認し、セラミドの影響について検討する基礎的な検討を行った。

研究成果の概要(英文)：X-ray irradiation was applied to fibroblast cell line and chondrosarcoma cell line and co-cultured the unirradiated cells with irradiated cells to analyze cell response to radiation. In particular, in order to analyze the involvement of ceramide in cellular response of co-cultured non-irradiated cells, DNA damage and quantitative measurement of ceramide were carried out by image analysis using fluorescent immunostaining method. Radiation response of non-irradiated cells (bystander effect) was confirmed and fundamental studies were conducted to investigate the influence of ceramide.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：セラミド

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イスタンダー効果、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、このような非 DNA 損傷による細胞死のメカニズムは明らかにされていない。

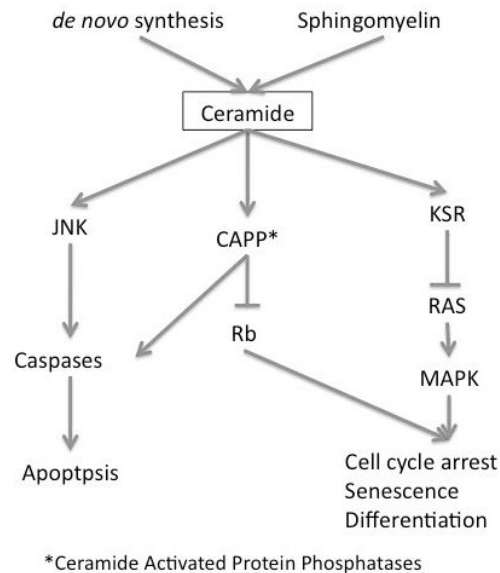
このような「DNA が照射されない細胞」は、スキャンニング照射の導入など照射方法の変更により増加する可能性があり、これらの細胞の応答反応は今後の重粒子線治療の理論的根拠として解明されるべき問題点である。我々のグループでは重粒子線の細胞応答反応のうち、特にバイスタンダー効果と細胞膜損傷を解した細胞死に関して検討を進めてきた。

バイスタンダー効果の解析にはマイクロビーム法などを用いてきた。マイクロビームとは、放射線のビーム幅を  $\mu\text{m}$  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。我々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、バイスタンダー効果による細胞死と考えられた。

細胞膜ダメージを介した細胞死に関してはショウジョウバエの初期胚および培養細胞を用いた。我々は、受精後の単核期もしくは二核期の胚細胞の、核が存在しない後極側 1/3 の部分に選択的にマイクロビームを照射し、その部位に Ark(哺乳類 Apaf-1 に相当するアポトーシス関連遺伝子)の高度な発現を確認した。また、acridine orange 染色で、重粒子線の照射部位に死滅した細胞の存在を確認した。つぎに、Drosophila melanogaster p535A-1-4 株 (p53 ノックアウトショウジョウバエ) から採取した初期胚に重粒子線、X 線または紫外線を照射したところ TUNEL陽

性細胞が検出され、また、Ark をプローブとして in situ hybridization を行ったところ、照射に伴って発現の誘導がみられた。これらの結果から、我々は初期胚では放射線照射によって p53 非依存的に Ark の発現誘導が起こりアポトーシスが引き起こされることを明らかにした。

このような、DNA ダメージを介さない細胞死の経路においてスフィンゴ脂質の一種であるセラミドがセカンドメッセンジャーとして注目されている。セラミドは、哺乳動物細胞において放射線誘導アポトーシスの経路に関連することや、種々の細胞において分化の過程に関連することが示唆されているが、その役割や分子機構には未解明な部分



が多い。

我々はこのセラミドの作用に関して検討を進めた。ショウジョウバエの培養細胞である Schneider 細胞に X 線および重粒子線を照射したところ、アポトーシスと考えられる細胞死がともに誘導されたが、炭素線照射は細胞死をおこしたと考えられる細胞の割合が多く、一方、X 線照射では、細胞の形態変化とミオシンの産生が観察され筋細胞への分化が誘導されたと考えられた。X 線照射により、Schneider 細胞内のセラミドが増加しており、抗セラミド抗体による免疫染色では細胞内に斑状のセラミドのスポットが観察された。また、Schneider 細胞に膜透過性のセラミドを添加することで、放射線照射の応答反応が再現された。これらの結果から、我々は、放射線応答反応にセラミドが関与していること、さらに、X 線と重粒子線とで細胞死および細胞死以外の反応応答の差が認められることを明らかにした。

このように「DNA が照射されない細胞」における細胞死のメカニズムは解明されておらず、重粒子線治療の理論的根拠の確立の

ために早急な検討が必要とされる。

## 2. 研究の目的

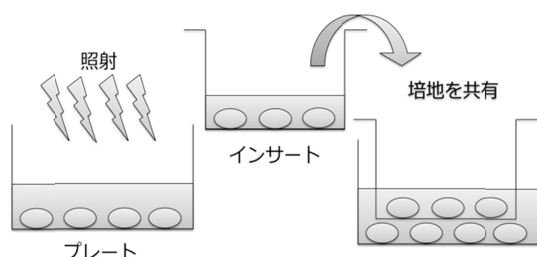
本研究ではショウジョウバエでの知見をもとに、哺乳動物細胞(腫瘍細胞 HTB-94 および正常線維芽細胞 AG01522 等)においてセラミドの放射線応答反応への関与について解析する。セラミドの細胞内濃度を变化させた状態で放射線照射を行い照射細胞および非照射細胞の細胞死の変化を定量的に解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 共培養

HTB-94 (ヒト軟骨肉腫由来細胞株)、AG01522 (初代ヒト線維芽細胞)において、インサートシステムを用いて放射線照射細胞と非照射細胞の共培養を行う。これにより腫瘍細胞及び正常組織の放射線に対する細胞応答反応、バスタンダー効果におけるセラミドの関与について DNA 損傷、遺伝的不安定性、アポトーシスなどの定量的な解析を行う。

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。

### (2) 細胞応答反応の評価

DNA 損傷、遺伝的不安定性、アポトーシスについて解析を行う。

DNA 損傷は 53BP1 の免疫蛍光染色を行い、顕微鏡下で撮影した画像を用いて細胞(核)あたりの foci 数を MetaMorph (Molecular Devices) で定量する。

遺伝的不安定性は Cytochalasin-B 存在下で培養し細胞分裂を阻害した状態で、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色を行ったのち、2 核細胞中の Micronuclei 形成のある細胞数を定量する (Fenech M., Mutat Res. 455(1-2):81-95. 2000)。

アポトーシスの解析には TUNEL 法による評価とカスパーゼ 3/7 アッセイによる定量的な

評価を行う。カスパーゼ 3/7 アッセイは Caspase-Glo 3/7 (Promega) を用い、発光をルミノメータにより測定し定量する。

上記に併せて細胞の形態学的変化を偏光顕微鏡で観察する。セラミドの影響は上記 ~ に該当しない分化や老化等も考えられるため形態学的変化の検討も重要となる。

### (3) 細胞内セラミド濃度の変化

C2 セラミドの投与、セラミド代謝酵素の阻害剤の投与による細胞内セラミド濃度上昇を試みた。

### (4) セラミドの定量的評価

当初 [ $^{32}\text{P}$ ]ATP を用いてジアシルグリセロールキナーゼアッセイを行うことを想定していたが、異なる応答を示すそれぞれの細胞毎のセラミド濃度についての情報を得るためにセラミドの蛍光免疫染色を行い、画像解析ソフトを用いて半定量的な評価を行うこと、フローサイトメトリーによる評価を行うことを試みた。

## 4. 研究成果

まず、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 線照射した細胞を共培養バスタンダー効果が認められるかどうかを確認した。53BP1 の免疫蛍光染色および Micronuclei 法により評価した。照射した細胞と共培養した非照射 AG01522 では対照と比較し、Micronuclei の増加を認めバスタンダー効果が確認された。さらに、53BP1 陽性細胞について、蛍光顕微鏡下で目視によるカウントを行い、バスタンダー効果を確認した。一方 HTB-94 ではバスタンダー効果が確認されず、以前の系での結果が再現された。

さらに、画像解析ソフトによる定量的な解析を試みるため、染色条件、撮影条件、画像処理における域値などの種々のパラメータに関して条件設定を行った。従来から行なっている目視による手動のカウントでは foci 数の閾値を設定し、DNA ダメージが一定レベル以上ある細胞の割合を計測していたので、まず、画像解析ソフトである MetaMorph を用いて従来の手動カウントと同様にバスタンダー効果を検出できるかを確認した。さらに foci のサイズや輝度による解析が可能であるか染色及び解析の条件設定を試みた。

セラミドの定量に関しては抗セラミド抗体を用い、膜透過処理の有無やそのほかの条件設定を行った。膜透過処理に関しては行なった場合、行わない場合とも X 線照射の 30 分後にセラミドの上昇を捉える事ができ、半定量的な解析を行うことが可能であった。

研究の経過中 AG01522 細胞の発育不良があり、正常コントロールの結果に問題があることが疑われた。このため、結果を再度吟味し、

検証する必要が生じた。実験のやり直し、凍結ストックのチェック等を行なったが、信頼できるデータを得るため再度元株を購入し実験を繰り返した。このことからすでに得られていた細胞株の特性に加え、より詳細な細胞周期等の情報を得る必要があると考え CENPF の染色等を開始した。このことは当初の目的である非照射細胞のメカニズムを解明するにあたり細胞周期の影響を検討することに役立つ。CENPF と 53BP1 等との二重染色などを行う事により具体的なメカニズムの検討における基礎的なデータとなる。

#### 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 1 件 )

( 査読あり )

1. Effects of Charged Particles on Human Tumor Cells.

Held KD, Kawamura H, Kaminuma T, Paz AE, Yoshida Y, Liu, Willers H, Takahashi A. Front Oncol. 2016 Feb 12;6:23. doi: 10.3389/fonc.2016.00023.

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河村 英将 (KAWAMURA, Hidemasa)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 80431716