

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16496

研究課題名(和文)放射線がん治療におけるバイスタンダー効果の機構解明

研究課題名(英文) Study on the radiation quality dependence of the bystander effect in radiation cancer treatment

研究代表者

小林 亜利紗 (Kobayashi, Alisa)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・研究員(任常)

研究者番号：30773931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は放射線誘発バイスタンダー効果の線質依存性の有無と機序を解明する事を目的とした。その為X線で生成されるOHラジカルをチオ尿素で消去する事で異なる線質を模擬した。細胞にチオ尿素有(TU+)無(TU-)条件でX線照射し、同一生存率を示す条件間を比較評価した所、バイスタンダー効果の指標として検出したCyclooxygenase-2(COX-2)がTU+条件のバイスタンダー細胞ではNuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) 依存的に発現する可能性を見出した。つまり本研究は、バイスタンダー効果に線質依存性が存在し、バイスタンダー効果経路の決定に重要な役割を担う事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線がん治療では様々な放射線が用いられており、其々の放射線が持つ特性(線質)を生かした治療がなされている。しかし、照射領域外の非照射細胞に対して照射細胞と類似した生物学的効果が現れる"放射線誘発バイスタンダー効果"が線質によって変わるのかは明らかになっていない。そこで本研究はバイスタンダー効果に線質依存性があるか評価した。その結果、バイスタンダー効果の発現機序は線質によって変化することを見出した。これは、用いる線質によって周囲の非照射細胞への影響が異なることを意味し、放射線がん治療における局所制御率等の向上の為には、バイスタンダー効果による影響も加味し、線質を決定する必要がある事を示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine whether radiation-induced bystander effect is affected by radiation quality. We exposed A549 cells at low or high LET-like condition using thio-urea (TU) as a  $\cdot$ OH scavenger to mimic different radiation qualities of direct action/indirect action. Cells were exposed to X-rays, with (TU+) or without TU (TU-). After irradiation, cells were co-culture with non-irradiated bystander cells up to 24 hours. As a result, COX-2 expression in TU+ (high LET-like) irradiated cells were significantly suppressed compared to TU-. However, COX-2 was equally expressed in TU+ and TU- bystander cells. These results indicate that COX-2 expression pathway of bystander cells is modulated by radiation quality. Thus, we observed NF- $\kappa$ B phosphorylation which is one of upstream molecule of COX-2. We detected the NF- $\kappa$ B phosphorylation only in the TU+ bystander cells. Therefore, findings of this study indicate that bystander effect and its signaling pathways depend on radiation quality.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射線誘発バイスタンダー効果 ヒドロキシラジカル がん細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線がん治療は、その最大の特徴である患部への線量の集中性により、がん患部が最大線量を受け、周囲の正常細胞への照射線量が少なくなるよう実施されている。一方、放射線による生物効果を評価する上で照射された細胞のみでなく、隣接した非照射細胞群が受ける影響を加味する必要があることが近年の放射線誘発バースタンダー効果研究によって明らかになっており、アメリカ合衆国学術会議書 The National Research Council においてバースタンダー効果によるヒトへの健康リスクは、重要研究課題として挙げられている。放射線誘発バースタンダー効果は照射された細胞の周囲にいた非照射細胞にも、細胞死や染色体異常のような、負の効果がある一方で、放射線適応応答や、DNA の修復促進といった正の効果、いわゆるレスキュー効果があることが報告されている[Chen et al., Mutat Res, 2011]。これまでにバースタンダー効果因子として、活性酸素種、窒素酸化物ラジカル、プロスタグランジン、サイトカイン、マイクロ RNA などが報告されているが、その誘発メカニズムは不明な点が多い[Blyth et al., Radiat Res, 2011]。放射線誘発バースタンダー効果因子の一つである窒素酸化物ラジカルの誘導型合成酵素 (Inducible Nitric Oxide Synthase; iNOS) は、酸化ストレス、炎症性刺激などによって転写誘導を開始し、窒素酸化物ラジカルを産生する。がん細胞にあらかじめ低線量のガンマ線を慢性照射しておく、つぎのエクソ線急性照射によって iNOS が誘導され、細胞は窒素酸化物ラジカルを放出する。この iNOS が誘導されている照射細胞と非照射細胞を共培養しておく、共培養された非照射細胞は放射線抵抗性を獲得することが報告されている[Matsumoto et al., Cancer Res, 2007]。これまでに我々はインビボ、インビトロの実験系で窒素酸化物ラジカルが、バースタンダー効果や、レスキュー効果に関わることを報告した。ゼブラフィッシュ受精卵を用いた実験では、陽子線もしくはエクソ線をあらかじめ低線量照射しておく、次の高線量エクソ線照射に対して、低線量照射しなかった群に比べてアポトーシス誘発細胞が有意に減少すること、またこの効果は窒素酸化物ラジカル捕獲剤の添加によって消失することが分かった。しかし、これらの実験系は直接作用と間接作用の和としての効果であるため、どちらの作用がバースタンダー効果やレスキュー効果因子の誘発に優位に働いているかは分からない。また、粒子線のような高 LET 放射線を用いたがん治療では、硬エクソ線とは異なり、患部に直接作用が大きく付与されるよう実施される。つまり、放射線誘発バースタンダー効果のメカニズムを調べるためには、直接・間接作用を分離して評価する必要があると考えた。さらにバースタンダー効果の経路には液を介した(培地介在性経路)と細胞同士の直接の結合であるギャップジャンクションを介した二つの経路があることが知られている。放射線がん治療で特に懸念されるのは、正常細胞への影響であるが、現在までに、我々は放医研陽子線マイクロビーム照射装置 SPICE によるがん正常細胞共培養条件下におけるがん細胞のみの狙い撃ち照射を実現させた。SPICE を用いた実験で、照射されたがん細胞は周囲に非照射の正常細胞がいることによって修復速度が速くなることがわかった。照射がん細胞の周囲にいた非照射の正常細胞は、DNA 二本鎖切断シグナルである gamma-H2AX の増加が確認されたが、これは窒素酸化物ラジカル捕獲剤の添加により減少することを第 58 回日本放射線影響学会大会(鹿児島)で発表した。つまり、培地介在性の因子が非照射正常細胞の DNA 損傷を誘発しており、また、照射がん細胞も正常細胞から何らかのシグナルを受け取っていることが示唆される。硬エクソ線照射実験に加え、マイクロビーム細胞照射法を組み合わせることで、放射線がん治療において懸念されるがん細胞と正常細胞間のバースタンダー効果因子の伝達システムを解明可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

放射線誘発バースタンダー効果因子のトリガーは、直接作用・間接作用どちらなのか、またそのメカニズムを明らかにする。具体的には、間接作用(OH ラジカル)の捕獲剤添加・無添加条件でがん細胞に放射線照射し、照射がん細胞に誘発されるバースタンダー効果因子の発現と、非照射細胞におけるバースタンダー応答の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)放射線誘発バースタンダー効果因子のトリガーは、直接作用・間接作用どちらなのかについて

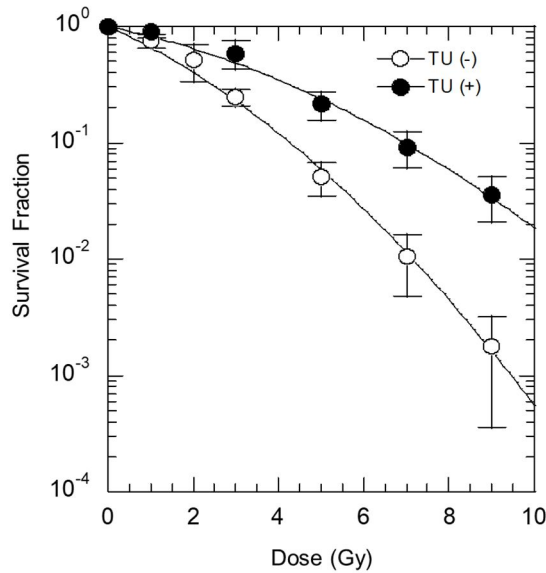
がん細胞のみにエクソ線を照射し、非照射細胞と培養液を介した共培養を行うことで、起こるバースタンダー因子の誘導を明らかにする。間接作用による効果を防ぐため OH ラジカルのスカベンジャーである Thio-Urea (TU) を 100 mM 添加する。TU 無添加条件と比較することで、照射細胞のバースタンダー因子産生に対する OH ラジカル(間接作用)の寄与を評価した。

(2)バースタンダー応答のメカニズムについて

がん細胞のみに陽子線マイクロビームを照射し、照射によって起こるバースタンダー応答の経路を明らかにする。ギャップジャンクション阻害剤(18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid; AGA)添加条件と非添加条件を用い、照射がん細胞と非照射(がん・正常)細胞間における培地介在性およびギャップジャンクションを介した応答によるバースタンダー効果を評価した。

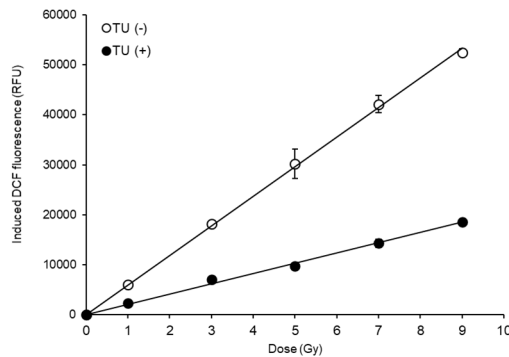
#### 4. 研究成果

(1) 放射線誘発バスタンダー効果因子のトリガーは、直接作用・間接作用どちらなのかについて



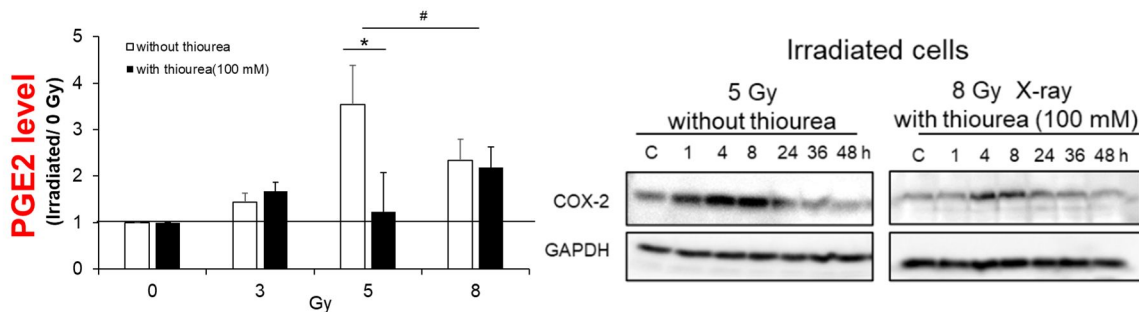
(1) A549 細胞チオ尿素有(TU+)・無(TU-)条件 X 線生存率曲線

ヒト肺がん A549 細胞にチオ尿素有(TU+)・無(TU-)条件で X 線照射し、同一生存率を示す線量に対するバスタンダー効果を評価する為、細胞生存率から LQ Model で生存率曲線を求めた。



(1) TU による OH ラジカル捕獲効率

TU による OH ラジカル捕獲効率を活性酸素種蛍光試薬の蛍光量から測定した。その結果同一生存率において、TU+は TU-に対して約 45%の OH ラジカルを消去した。

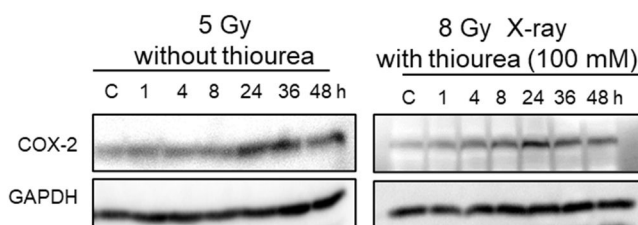


(1) 照射細胞内バスタンダー因子の産生

上記の生存率曲線を基に、バスタンダー因子ならびにバスタンダー効果の指標として、窒素酸化物ラジカル合成酵素 (iNOS) もしくはプロスタグランジン (PGE2) 及びその代謝に関与するシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現について線量依存性があるかを評価した。はじめに、X 線を A549 細胞に照射し、iNOS の経時的な変化を観察したが、iNOS の誘導は検出できなかった。

た。そこで COX-2 および PGE2 に着目した。3, 5, 8 Gy の照射を行ったところ PGE2 の産生量は、5 Gy で最大を示した（左）。それに対し、TU+条件での X 線照射（5 Gy）を行った場合、有意な PGE2 の抑制が見られた。これは同一生存率を示すチオ尿素有の 8 Gy においても、同様であった。また、PGE2 産生酵素である COX-2 の発現量も TU+ は TU-と比べて抑制された（右）

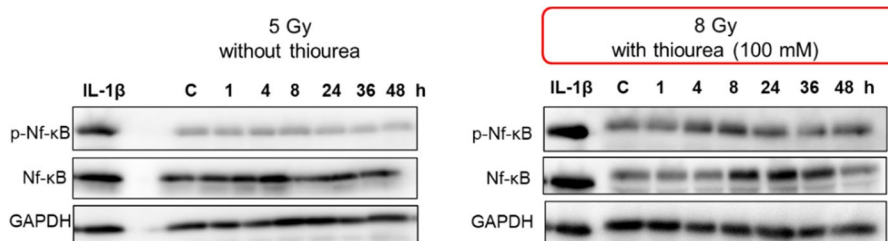
### Bystander cells



(1) バイスタンダー細胞の応答

4 - I - の照射細胞と培地を介した共培養を行った非照射細胞内の COX-2 応答を検出したところ、TU+、TU-条件ともに COX-2 の発現が検出され、両者に有意な差はなかった。

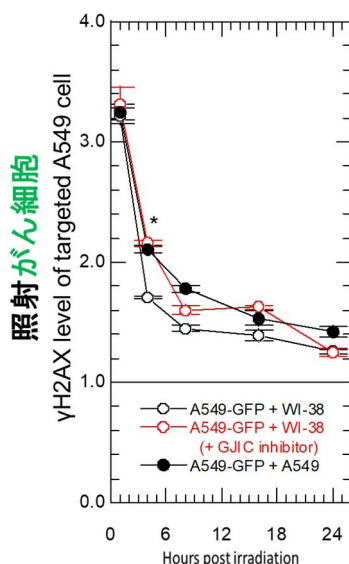
以上の結果から、放射線誘発バイスタンダー因子の発現には線質依存性が存在することが明らかになった。しかし、バイスタンダー細胞側の応答は差異がないことから、間接作用と直接作用の量や割合が、バイスタンダー因子の発現経路を調節していることが示唆された。これらの成果は Journal of Radiation Research に投稿し、掲載された。



(1) バイスタンダー細胞側の NF-κB リン酸化

4 - I - の結果から、TU+、TU-条件における COX-2 発現経路を調べるため、COX-2 上流分子である NF-κB のリン酸化について調べた。その結果、TU+条件は TU-条件と比較して有意な NF-κB のリン酸化増加がみられた。このことから、線質がバイスタンダー経路を調節し、TU+条件のバイスタンダー細胞では NF-κB による COX-2 誘導が起きることが示された。

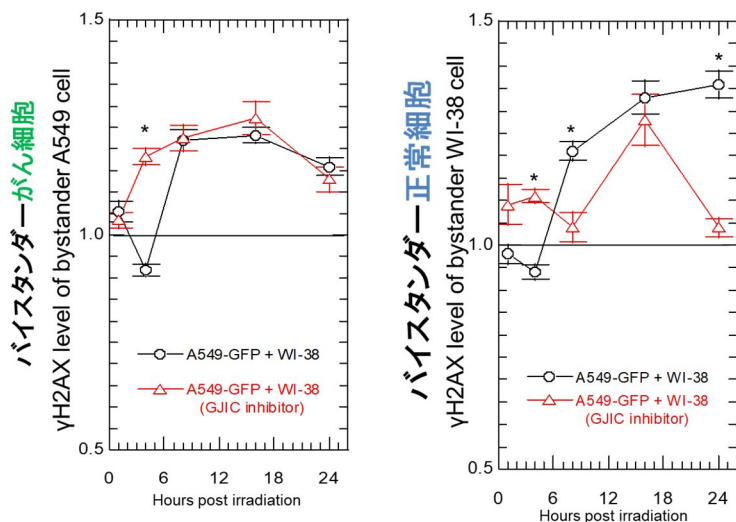
### (2) バイスタンダー応答のメカニズムについて



(2) がん細胞へのマイクロビーム照射による照射細胞の応答

がん細胞のみに陽子線マイクロビームを照射し、照射によって起こるバイスタンダー応答の経

路を明らかにするため、ギャップジャンクション阻害剤(18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid ; AGA)添加条件 AGA+と無添加条件 AGA-を用い、照射がん細胞と非照射(がん・正常)細胞間における培地介在性およびギャップジャンクションを介した応答によるバイスタンダー効果を DNA 二本鎖切断の指標である gamma-H2AX 蛍光量から評価した。その結果、がん細胞のみの条件は、正常細胞共培養条件と比べて gamma-H2AX の減少速度が遅かった。そして、この遅延は AGA+によって早まった。



## (2) がん細胞へのマイクロビーム照射による非照射細胞の応答

バイスタンダー正常細胞側の応答について(右): AGA-と比べて AGA+による gamma-H2AX レベルが照射 8,24 時間後低下した。一方バイスタンダーがん細胞(左)は AGA+と AGA-における 24 時間後の gamma-H2AX レベルに有意差はなかった。

まとめ: 放射線誘発バイスタンダー効果因子のトリガーは、直接作用・間接作用どちらなのか、またそのメカニズムについて、エックス線とマイクロビーム照射法によって調査したところ、直接作用と間接作用の比によってバイスタンダー因子と経路が変化することが示された。また、バイスタンダー因子の伝播経路としては、バイスタンダーがん細胞では培地介在性因子が、バイスタンダー正常細胞ではギャップジャンクション経路が特に寄与することが示唆された。今後、実際に異なる線質を用い、バイスタンダー経路が線質に応じて変化するかを詳細に調べることで、細胞応答による非照射細胞への影響が明らかになり、起こるバイスタンダー効果が治療における線質の選択の一つの指標となり得ると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Alisa Kobayashi、Teruaki Konishi	4. 巻 59
2. 論文標題 Radiation quality effects alteration in COX-2 pathway to trigger radiation-induced bystander response in A549 lung carcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rry065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Alisa Kobayashi、Narongchai Autsavapromporn、Tengku Ahbrizal Farizal Tengku Ahmad、Masakazu Oikawa、Shino Homma-Takeda、Yoshiya Furusawa、Jun Wang、Teruaki Konishi	4. 巻 -
2. 論文標題 BYSTANDER WI-38 CELLS MODULATE DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR IN MICROBEAM-TARGETED A549 CELLS THROUGH GAP JUNCTION INTERCELLULAR COMMUNICATION	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncy249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 亜利紗、Tengku Ahbrizal Farizal Tengku Ahmad、Narongchai Autsavapromporn、及川 将一、古澤 佳也、小西 輝昭
2. 発表標題 放医研マイクロビーム照射装置SPICEを用いたヒト正常及びヒトがん細胞間における放射線誘発バイスタンダー細胞応答の解析
3. 学会等名 量子生命科学研究会第2回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Alisa Kobayashi
2. 発表標題 Analysis of radiation-induced bystander response between human normal cells and cancer cells using SPICE-NIRS microbeam
3. 学会等名 International Open Laboratory Symposium 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 亜利紗、小西 輝昭
2. 発表標題 NOSとCOX-2を指標としたバystanダー効果因子誘発機序に対する間接作用の寄与の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kobayashi A, Autsavapromporn N, Tengku Ahmad TAF, Oikawa M, Homma-Takeda S, Furusawa Y, Wang J, Konishi T
2. 発表標題 Bystander WI-38 normal lung fibroblast cells modulate DNA double-strand break repair in microbeam-targeted A549 cells through gap junction intercellular communication
3. 学会等名 MICROS 2017 17th International Symposium on Microdosimetry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林 亜利紗、及川 将一、古澤 佳也、武田 志乃、テングウ アーマッド テングウ アプリザル ファリザル、アッサワプロンポー ン ナロンチャイ、ワン ジュン、小西 輝昭
2. 発表標題 陽子線マイクロビーム照射法を利用した異種細胞間の放射線誘発細胞応答に関する研究
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kobayashi A, Autsavapromporn N, Tengku Ahmad TAF, Homma-Takeda S, Furusawa Y, Wang J, Konishi
2. 発表標題 Bi-directional cellular signaling between microbeam targeted cancer cells and non-targeted normal cells
3. 学会等名 1st QST International Symposium "Quantum Life Science" -The path breaking life-scientists with quantum eyes and hands. National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology (QST)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小西 輝昭  (Konishi Teruaki)  (70443067)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学 領域シングルセル応答解析グループ・グループリーダー   (82502)	
研究協力者	大澤 大輔  (Ohsawa Daisuke)  (90324681)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学 領域シングルセル応答解析グループ・主任研究員   (82502)	
研究協力者	テングウアーマッド テングウ ア ブリザル ファリザル  (Tengku Ahmad Tengku Ahbrizal Farizal)	マレーシア原子力庁・主任研究員	
研究協力者	アウトサヴァプロンポーン ナロン チャイ  (Autsavapromporn Narongchai)	チェンマイ大学・助教	