

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006 ～ 2009
 課題番号：18310042
 研究課題名 (和文) マイクロビームにおけるクロマチン損傷誘発バystanダー効果のイオン種・LET 依存性
 研究課題名 (英文) LET and Ion-species dependent bystander effects induced by microbeams

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

研究成果の概要 (和文) : バystanダー効果で非照射細胞に誘導される細胞損傷を明らかにするため、ヘリウムイオン照射で生成されるクロマチン損傷をヒト正常上皮性細胞を用いて直接照射細胞と非細胞に分けて解析した。直接照射された細胞には、低 LET 放射線で観察される軽微な損傷に加えて高 LET 放射線で観察される重篤な損傷が生成された。一方、直接照射細胞の近傍にある非細胞には、低 LET 放射線で観察される軽微な損傷しか生成されなかった。

研究成果の概要 (英文) : We have investigated bystander chromosomal damage in primary normal human bronchial epithelial cells irradiated with low-energy He-ion beams. When the unirradiated cells were kept with He-ion irradiated cells on the dishes, bystander chromosomal effect was observed in the unirradiated bystander cells. Chromatid-type fragments, such as chromatid break, acentric fragment, isochromatid deletion and interchromatin exchange, were observed in the direct hit cells. On the other hand, only chromatid breaks and acentric fragments were observed in the bystander cells. There is evidence that simple chromosomal damage occur in bystander chromosomal effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	10,200,000	3,060,000	13,260,000

研究分野：複合新領域（放射線生物学）

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：粒子放射線、マイクロビーム、バイスタンダー効果、細胞間情報伝達機構、ギャップジャンクション

1. 研究開始当初の背景

原子力エネルギー利用やその放射線廃棄物を源とする環境放射線に対する人体の放射線影響、宇宙空間あるいは高高度飛行における宇宙船・航空機内での放射線影響、がんの放射線治療や診断に代表される医療被曝に関わる放射線影響などは、今後ますます大きな関心事の一つになることが予想される。このような放射線源に対する放射線影響研究で特に問題となるのは、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・低線量率の照射効果である。

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目標とする低線量域に外挿して推定するほかなかった。しかし、高線量域のデータを低線量域に外挿する方法に限界があることは、論議の対象になっており、また近年マイクロビーム放射線照射法の放射線生物影響研究への応用による低線量（率）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、低線量・低フルエンス照射実験から直接得たデータとそのデータを基礎に創造されたメカニズムを礎としたより正確な生物影響リスクの記述の可能性を実現するための研究の一層の充実が必要であると考えられる。

放射線誘発バイスタンダー効果の重要性が認識された一つの大きなきっかけは、1992年の Nagasawa and Little の論文である (*Cancer Res.*, 52: 6394-6396, 1992.)。彼等は、²³⁸Pu から放出されるアルファ線ブロードビーム低フルエンス照射により、チャイニーズハムスター細胞の細胞集団に対して確

率的に1%以下の細胞が照射される低線量照射 (4.9mGy 以下) を行ったところ、姉妹染色分体交換が予測値を遥かに超えて30%の細胞に認められ、従ってアルファ線非照射細胞にも染色体レベルの損傷が生じていることを見出した (バイスタンダー効果)。この結果は、低線量放射線発がんリスクに関する、現在の放射線防護体系の基本的概念である非しきい値効果 (no-threshold effect) をはじめ、低線量、低フルエンス被曝による生物影響について改めて検討が必要であるとの認識を生んだ。しかしながら、放射線誘発バイスタンダー効果の誘導機構については、いまだ不明な点が多く、現在は世界各国それぞれの研究室で断片的な状況証拠が集められているのが現状である。²³⁸Pu から放出されるアルファ粒子を利用した確率的低フルエンス照射実験や粒子線マイクロビームを利用した限定的照射実験の結果から、低線量域での放射線生物影響においてバイスタンダー効果が重要な役割を演じている事は間違いない。バイスタンダー効果という現象の存在は、直接放射線照射された細胞と非照射細胞との混合細胞集団を一つの被曝集団として解析し、もたらされる生物影響は照射された細胞に起因するものであり、直接照射されていない細胞は現れた生物影響に寄与しないものであるとする大前提のもとに解釈されてきたこれまでの放射線生物学の考え方には合致しないものである。このような低線量域の放射線照射に対してより正確な放射線影響を把握するためには、特に低線量・低フルエンス照射に対して、

- (1) 直接照射された細胞への生物効果
- (2) 照射された細胞の近傍にある非照射細胞の生物効果 (バイスタンダー効果)
- (3) さらに照射された細胞とされていない細胞との相互作用機序の解明

が、必要不可欠であると考えられる。さらに、生じたバイスタンダー効果とその後の細胞集団の生物影響として、適応応答のように生体にプラスに働く効果を誘導するのか？遺伝的に不安定な状態に導くようにマイナスの効果を誘導するのか？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られる。しかし

ながら、これまでに行われた研究は、1種類の核種・エネルギー(LET)のマイクロビームを照射してその応答を見るもので、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

低線量率放射線で誘導される生物効果のうち、直接放射線を照射された細胞と非照射細胞とが共存する環境で観察されるバイスタンダー効果は、その現象論が実験的に明らかになってきたが、異なる種類の放射線を用いたバイスタンダー効果の放射線線質依存性に関する系統立った研究はほとんど行われていないのが現状である。本研究課題では、異なる粒子放射線および電磁波放射線のブロードビーム・マイクロビームを駆使して、生物効果のバイスタンダー効果の線質依存性を解明することを目的として計画した。

3. 研究の方法

細胞はヒト正常細胞を用いた。クロマチン損傷の検出は、ポリエチレングリコールによる細胞融合法を利用した早期染色体凝縮法(PCC法)によって、光学顕微鏡下で観察可能なG₁/G₀期の凝縮クロマチンにおけるクロマチン損傷を検出した。細胞致死効果は、コロニー形成法による細胞の増殖死を検出した。遺伝子突然変異は、X染色体上の*hprt*遺伝子座を標的遺伝子として6チオグアニン耐性クローンの出現頻度より誘発頻度を算出した。実験には、日本原子力研究開発機構重イオンマイクロビーム照射装置の炭素・ネオン・アルゴンイオンマイクロビーム、高エネルギー加速器研究機構単色軟X線マイクロビーム、放射線医学総合研究所プロトンマイクロビーム、コロムビア大学ヘリウムイオンマイクロビームおよびブロードビームを用いた。バイスタンダー効果によるクロマチン損傷の検出は、厚さの薄いマイラフィルムを張ったリングに厚いマイラフィルムを帯状に張ったリングを重ね合わせ、ヘリウムイオンを照射した。薄いマイラフィルム上に培養した細胞にはヘリウムイオンが直接ヒットするが、厚いマイラフィルム上の細胞にはイオンの残存飛程が届かず直接ヒットしな

い照射条件で、バイスタンダー細胞となる厚いマイラフィルム上の細胞のクロマチン切断を観察した。細胞致死および遺伝子突然変異に対するバイスタンダー効果の放射線質依存性は、直径36mmの照射用シャーレ面上にコンフルエント状態に培養した細胞に対して直径20 μ mに絞ったマイクロビームを16x16=256点の格子状に照射を行った。マイクロビームが直接照射された細胞は、測定した一つの細胞の面積をもとにシャーレ上の全細胞数に対して約0.2%と計算された。この照射方法により、同一照射野にマイクロビーム照射細胞と非照射細胞(バイスタンダー細胞)を共存させることが出来、全細胞集団の生物効果を評価してバイスタンダー細胞への生物効果を推定することによってバイスタンダー効果の有無を判定した。また、バイスタンダー効果誘導メカニズムを探る目的で、コンフルエント状態で隣細胞同士に接触による増殖阻止能が働く正常細胞の特性に注目し、ギャップジャンクションの特異的阻害剤を併用して、細胞間情報伝達機構のバイスタンダー効果への関与を調べた。

4. 研究成果

(1)バイスタンダー効果で誘導されるクロマチン損傷の実体

ヘリウムイオンを直接照射された細胞には、通常低LET放射線照射で観察される軽微なchromatid-typeの損傷(chromatid gaps、chromatid breaks)に加えて高LET放射線で観察される重篤な損傷であるisochromatid gaps & deletionsが生成された。また、クロマチン間のexchange-typeの損傷も観察された。一方、ヘリウムイオンを直接照射されず、直接照射細胞の近傍に存在していたバイスタンダー細胞には、chromatid-typeの損傷のうちchromatid gapsとchromatid breaksしか観察されず、直接ヒット細胞で生成された高LET放射線タイプであるisochromatid gaps & deletionsが全く誘導されないことが判った。以上の結果から、ヘリウムイオンマイクロビーム照射によって誘導されるバイスタンダー効果では、直接ヘリウムイオンを照射されていないバイスタンダー細胞に低LET放射線で生成されるクロマチン損傷と同質の比較的複雑でない損傷のみが誘導されることが示唆された。これまでバイスタンダー効果の現象は多数の報告

があるが、バイスタンダー効果によって誘導される細胞損傷の実態を明らかにした研究は非常に限られている。本研究で得られた成果は、バイスタンダー効果で誘導される細胞損傷の内、染色体/クロマチンレベルの損傷の実態を明らかにしたものであり、生成される細胞損傷の立場からバイスタンダー効果の誘導メカニズムを解明する足掛かりとなる成果である。

(2) 細胞致死および遺伝子突然変異に対するバイスタンダー効果の放射線線質依存性

各放射線マイクロビームを照射された細胞の細胞致死効果は、炭素イオンマイクロビームを照射された細胞集団では細胞生存率は、81-94%であった。また、照射時に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、生存率は約100%であった。しかしながら、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を照射された細胞集団では、ギャップジャンクション特異的阻害剤併用の有無に係わらず、ほぼ100%であった。

突然変異誘発効果は非照射コントロールに対してプロトンで4.2倍、炭素イオンで6.3倍、ネオンイオンで2.4倍高い誘発頻度を示したのに対して、X線とアルゴンイオンではコントロールと有意な差がなかった。また、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用することによって高頻度に誘発した突然変異はコントロールレベルまで減少した。

得られた結果のうち、炭素イオンによる細胞致死効果とプロトン・炭素イオン・ネオンイオンによる遺伝子突然変異は、生物効果は放射線が直接ヒットした細胞のみに生じ、非ヒット細胞には起こらない、と仮定すると、マイクロビームが照射された細胞が0.2%程度しか存在しない細胞集団に生ずる結果として説明することが出来ず、非照射細胞の一部にも二次的・三次的な何らかのメカニズムによって生物効果が誘導されたと考えることが必要となる。このことにより、炭素イオン照射された細胞集団において観察された細胞致死効果およびプロトン・炭素イオン・ネオンイオン照射された細胞集団において観察された突然変異誘発効果にバイスタンダー効果が誘導されたと結論する。また、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用した実験結果から、観察されたバイスタンダ

ー効果の誘導に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密接に関与していることが示唆された。以上の成果は、同一の細胞実験系により複数の異なる放射線マイクロビームを用いた生物効果のバイスタンダー効果誘導に対する放射線線質依存性を系統立って明らかにしたものであり、同時にバイスタンダー効果誘導には生物学的エンドポイント依存性が存在することも明らかにした成果である。

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 7 件)

- ① M. Suzuki, C. Tsuruoka, Y. Uchihori, H. Kitamura, C. H. Liu, Radiation-quality dependent cellular response in mutation induction in normal human cells. *J. Radiat. Res.*, **50**, 395-399 (2009) 査読有。
- ② C. Tsuruoka, M. Suzuki, Y. Furusawa, K. Anzai, R. Okayasu, The influence of mutation induction in normal human fibroblasts irradiated with X rays and Iron ions. *Biol. Sci. Space.*, **23**, 55-60 (2009) 査読有。
- ③ Y. Ohno, M. Torikoshi, M. Suzuki, K. Umetani, K. Uesugi and N. Yagi, Dose distribution of a 125 keV mean energy microplanar x-ray beam for basic studies on microbeam radiotherapy. *Medical Physics*, **35** (7), 3252-3258 (2008) 査読有。
- ④ F. Yatagai, M. Suzuki, N. Ishioka, H. Ohmori and M. Honma, Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays. *Radiat. Environ. Biophys.*, **47**, 439-444 (2008) 査読有。
- ⑤ C. Tsuruoka, M. Suzuki, M. P. Hande, Y. Furusawa, K. Anzai and R. Okayasu, The difference in LET and ion species dependence for induction of initially measured and non-rejoined chromatin breaks in normal human fibroblasts.

Radiat. Res., **170**, 163-171 (2008) 査読有.

- ⑥ M. Okada, A. Okabe, Y. Uchihori, H. Kitamura, E. Sekine, S. Ebisawa, M. Suzuki and R. Okayasu, Single extreme low dose/low dose rate irradiation causes alteration in lifespan and genome instability in primary human cells. *British Journal of Cancer*, **96**, 1707 - 1710 (2007) 査読有.
- ⑦ Y. Umebayashi, M. Honma, M. Suzuki, H. Suzuki, T. Shimazu, N. Ishioka, M. Iwaki, F. Yatagai, Mutation induction in cultured human cells after low-dose and low-dose-rate γ -ray irradiation: Detection by LOH analysis. *J. Radiat. Res.*, **48**, 7-11 (2007) 査読有.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 鈴木雅雄、鶴岡千鶴、宇佐美徳子、古澤佳也、小林克己、放射光単色X線マイクロビームによるヒト正常細胞の致死と遺伝子突然変異に対するバイスタンダー効果解析。第27回PFシンポジウム、つくば市、2010. 3. 9-10。
- ② 鈴木雅雄、取越正己、大野由美子、菓子野元郎、鶴岡千鶴、八木直人、梅谷啓二、劉翠華、浜田信行、X線スリット状マイクロビームに対する細胞致死効果の回復現象とp53 遺伝子に関係したバイスタンダー効果。日本放射線影響学会第52回大会、広島市、2009. 11。
- ③ Masao Suzuki, Genro Kashino, Chizuru Tsuruoka, Yoshiya Furusawa, Relationship between cell-killing and p53-dependent bystander effects in human cells induced by X-ray microplanar beams. 第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009. 10。
- ④ Masao Suzuki, Chizuru Tsuruoka, Cui Hua Liu, Radio-adaptive response in normal human cells induced by protons. 日本宇宙生物科学会第23回大会、つくば市、2009. 10。
- ⑤ 鈴木雅雄、取越正己、大野由美子、鶴岡千鶴、菓子野元郎、八木直人、梅谷啓二、劉翠華、X線スリット状マイ

クロビーム照射で誘導される致死効果に対するバイスタンダー効果の細胞種依存性。第48回日本医学放射線学会生物部会学術大会、富山、2009. 7。

- ⑥ Masao Suzuki, Chizuru Tsuruoka, Hisashi Kitamura, Cui Hua Liu, Yukio Uchihori, Dependence in bystander cellular responses in mutation induction on normal human fibroblasts induced by the pre-treatment with different radiation types. 第二回アジア放射線連合会議 (2nd Asian Congress of Radiation Research)、韓国ソウル、2009. 5。
- ⑦ 鈴木雅雄、鶴岡千鶴、内堀幸夫、北村尚、劉翠華、ヒト正常細胞の突然変異誘発における適応応答の放射線線質依存性。日本放射線影響学会第52回大会、北九州、2008. 11。
- ⑧ M. Suzuki, C. Tsuruoka, Y. Furusawa, Difference in bystander cell-killing effect between normal and tumor cells irradiated with carbon-ion beams. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008. 10。
- ⑨ 鈴木雅雄、古澤佳也、鶴岡千鶴、劉翠華、小西輝昭、舟山知夫、宇佐美徳子、深本花菜、横田裕一郎、浜田信行、小林泰彦、小林克己、マイクロビーム放射線照射法を利用した低フルエンス照射に対するヒト正常細胞の生物効果のバイスタンダー効果。日本宇宙生物科学会第22回大会、奈良、2008. 9。
- ⑩ 鈴木雅雄、鶴岡千鶴、安田仲宏、小西輝昭、北村尚、炭素イオンで誘発されるバイスタンダー細胞致死効果のヒト正常細胞とがん細胞の違い。第47回日本医学放射線学会生物部会学術大会、高知、2008. 6。
- ⑪ 鈴木雅雄、取越正己、大野由美子、八木直人、梅谷啓二、鶴岡千鶴、石川顕一、小山田敏文、夏堀雅宏、古澤佳也、スリット状X線マイクロビームに対するバイスタンダー効果の正常細胞とがん細胞の違い。第21回日本放射光学会年会、滋賀、2008. 1。
- ⑫ 鈴木雅雄、鶴岡千鶴、内堀幸夫、北村尚、粒子放射線低フルエンス照射によ

- って誘導される突然変異誘発効果の増強とバイスタンダー効果。日本放射線影響学会第50回大会、千葉、2007. 11。
- ⑬ 鈴木雅雄、古澤佳也、取越正己、大野由美子、鶴岡千鶴、八木直人、梅谷啓二、小西輝昭、小山田敏文、夏堀雅宏、Bystander cell-killing effect induced by X-ray microplanar beams generated with synchrotron radiations. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007. 10。
- ⑭ 鈴木雅雄、鶴岡千鶴、安田仲宏、小西輝昭、北村尚、炭素イオンと鉄イオンで誘導される生物効果のバイスタンダー効果の違い。日本宇宙生物科学会第21回大会、東京、2007. 9。
- ⑮ 鈴木雅雄、古澤佳也、取越正己、大野由美子、鶴岡千鶴、八木直人、梅谷啓二、小西輝昭、小山田敏文、夏堀雅宏、放射光X線スリット状マイクロビームによるヒト培養細胞の致死効果に対するバイスタンダー効果。第46回日本医学放射線学会生物部会学術大会、つくば、2007. 7。
- ⑯ M. Suzuki, C. Tsuruoka, Y. Uchihori, H. Kitamura, Radiation-quality dependence of genomic instability in mutation induced by the pre-treatment with low-fluence heavy ions. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, 2007. 7。
- ⑰ 鈴木雅雄、古澤佳也、鶴岡千鶴、舟山知夫、坂下哲哉、柿崎竹彦、深本花菜、浜田信行、原孝光、小林泰彦、炭素イオンマイクロビームで誘導されるヒト正常細胞の生物効果のバイスタンダー効果。第2回高崎量子応用研究シンポジウム、高崎、2007. 6。
- ⑱ 鈴木雅雄、鶴岡千鶴、取越正己、大野由美子、八木直人、小西輝昭、夏堀雅宏、小山田敏文、梅谷啓二、篠原邦夫、古澤佳也、スリット状X線マイクロビームに対するヒト培養細胞の致死効果とバイスタンダー効果。第20回日本放射光学会年会、広島、2007. 1。
- ⑲ 鈴木雅雄、鶴岡千鶴、内堀幸夫、北村尚、線質の異なる放射線低線量照射によって誘導される細胞応答の違い。日

本宇宙生物科学会第20回大会、大阪、2006. 9。

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：