

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16782

研究課題名（和文）放射線治療における放射線誘発コホート効果による細胞間相互作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of cell-cell interactions by radiation-induced cohort effects in radiotherapy

研究代表者

寺島 真悟（TERASHIMA, Shingo）

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：00583733

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）：照射された隣接細胞同士による細胞コミュニケーションにより相互作用をもたらす放射線誘発コホート効果という非標的効果が報告されている。本研究では、異なる線量を照射された細胞集団を作成し、放射線治療における放射線誘発コホート効果の影響を評価した。実験により、隣接細胞にX線を照射することにより相対的な増殖率が増加することがわかった。これらの結果より、腫瘍細胞に隣接する細胞の線量の低下が放射線治療の効果に悪影響を及ぼさないことが示唆された。また、放射線誘発コホート効果は液性因子が関係していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高精度放射線治療では高い位置精度が担保されており、腫瘍及び隣接する正常組織に対して従来手法より急激な線量変化が起こっている。また、標的腫瘍内で線量の強弱を作成可能なSimultaneous Integrated Boostでは、急峻な線量分布が形成される。しかしながら、このような状況で照射された隣接する細胞同士が及ぼす生物学的な影響評価はほとんど行われていない。研究結果は、細胞のダメージが物理線量だけでなく、線量の分布からも影響を受けることを示している。隣接する細胞の線量の低下が腫瘍細胞に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。これらの結果は、放射線治療の生物学的な線量分布解析に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：A non-targeted effect called radiation-induced cohort effect has been reported in which cell communication between irradiated neighboring cells leads to interaction. In this study, we generated cell populations irradiated with different doses of X-rays to evaluate the impact of radiation-induced cohort effects in radiotherapy. Experiments showed that exposure of neighboring cells to X-rays increased the relative proliferation rate. These results suggest that reducing the dose to cells adjacent to tumor cells does not adversely affect the efficacy of radiotherapy. The results also suggest that the radiation-induced cohort effect is related to humoral factors. These results may contribute to the analysis of the biological dose distribution of radiotherapy.

研究分野：放射線治療

キーワード：コホート効果 非標的効果 放射線治療 共培養

1. 研究開始当初の背景

外科療法、化学療法とともにがんの三大治療の一つである放射線療法は、局所療法で組織の形態と機能を温存できる優れた治療である。放射線治療装置の技術的進歩は著しいが、線量集中性という物理学的一面から開発されたもので、例えば腫瘍に対して勾配を持った線量が短時間間隔で複数回照射されるなどといった影響については不明である。一方で、放射線治療では非標的効果 (**Non-targeted effects**) の誘導が注目されている。局所に放射線照射がされた場合、照射部位とは離れた場所で抗腫瘍効果をもたらすアブスコパル効果 (**Abscopal effect**) や、照射部位の近傍で非照射部位の細胞に抗腫瘍効果をもたらすバイスタンダー効果 (**Bystander effect**) が有名である。さらに、照射された隣接細胞どうしによる細胞コミュニケーションにより相互作用をもたらす放射線誘発コホート効果 (**Cohort effect**) という現象が報告されている (**BJ Blyth et al., Radiation research. 176(2), 2011**)。対象がどちらも照射された細胞であるという点が、バイスタンダー効果と異なる。コホート効果は、空間的に不均一に放射線が当たる場合「細胞のダメージは線量に応じて増加する」という従来のモデルが当てはまらず、また放射線治療においては腫瘍のみならず隣接する正常組織に対し、必ずしも物理学的線量のみで評価できないことを示唆している。

高精度放射線治療である強度変調放射線治療 (**IMRT**) は腫瘍に対して複数方向からの照射 (多門照射) かつ複雑な照射野で放射線を照射するため、しばしば線量が局所的に不均一な線量分布を示すことがある。治療開始前に患者ごとの品質保証として、絶対線量や線量分布の検証が行われる。線量検証結果が許容を満たさなかった場合 (線量分布の不一致率が高い、線量誤差が **5%** を超えた等) 誤差を示す箇所を医師に提示し、臨床上に許容し得るか否かの判断を仰ぐことになる。ただし、線量検証で使用する対象はファントムであるため、患者とは形状や密度が異なり、物理学的な指標のみでは医師においても正確な判断は困難を来す。また、高精度放射線治療では患者位置の固定精度も上昇しており、腫瘍に対する照射野の腫瘍マージンも少なくなり腫瘍及び隣接する正常組織に対して従来手法より急激な線量変化が起こっている (**1 cm** に満たない距離でゆうに **50%** を超える線量変化がある) (図 1)。しばしば起こる腫瘍辺縁からのがん再発もコホート効果が関与しているか不明である。このような状況の変化があるが、腫瘍に対して線量分布が不均一な場合や、腫瘍及びその隣接する正常組織に対して急激な線量変化があった場合に、それらの照射された細胞間で、どのような影響を及ぼしあっているかは不明瞭な部分が多い。

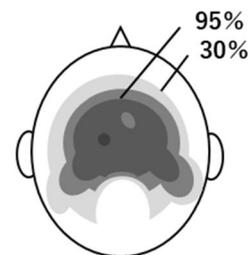


図1. 頭頸部の放射線治療の線量分布の例

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線治療における不均一な線量分布でのコホート効果の影響を明らかにし、その作用機序を解明することである。加えて、臨床的多門照射による影響を考慮した複数回照射がコホート効果に及ぼす影響を明らかにする。放射線治療における放射線誘発コホート効果の影響の研究が進めば、**IMRT** などにおける線量検証で基準を満たさない場合に、放射線生物学的観点から判断をアシストすることが期待でき、放射線治療に貢献できる。本研究の影響評価及び作用機序解明により得られる学術的成果は放射線生物学・放射線腫瘍学分野において非常に価値があると考えられる。

申請者は線量分割における違いが細胞に及ぼす影響とその要因を明らかにしている。**10 秒** ~ 数分といった短時間間隔での複数回照射であっても、総線量ならびに線量率が同じ単回照射と比べて癌細胞生存率が有意に低下することを見出している (**Terashima et al., J Radiat Res. 58 (6), 2017**)。これらの時間的に不均一な照射である複数回照射は、単回照射よりも実際の臨床に近い。これらの臨床的な照射条件は研究において考慮されていないことが多いが、放射線治療における多門照射による線量分割を条件としコホート効果を研究することは、より生体に近い細胞応答を観察することに繋がる。

3. 研究の方法

本研究では、臨床での線領域において急激な線量変化がある部位を、異なる線量を照射した細胞として共培養し、不均一な線量が照射された細胞としコホート効果の影響を評価した。

(1) 使用細胞及び X 線照射について

使用細胞は、ヒト舌扁平上皮癌細胞株 (**SAS**) 及びヒト非小細胞肺癌細胞株 (**A549**) を用いた。**150 kVp**、**0.5 mm Al+0.1 mm Cu** フィルターを装着して線量率 **2.0 Gy/min** で照射を行った。解析を行う **target cells** には **4 Gy** を照射し、共培養する **co-cultured cells** には **4 Gy** の **0、20、80、100%** (**0、0.8、3.2、4 Gy**) の線量を照射した。**Co-cultured cells** との線量の組み合わせにより、共培養された **target cells** を **4 Gy-0%、4 Gy-20%、4 Gy-80%、4 Gy-100%** と呼称する。

(2) 異なる線量を受けた細胞集団の作成

異なる線量を受けた細胞集団として、本研究は、急峻な線量分布により異なる線量を受けた細胞集団におけるコホート効果の影響を評価するために行われた。コホート効果の影響評価は、**direct contact co-culture (DCC)**と**indirect contact co-culture (ICC)**の2通りの共培養で行われた(図2)。DCCでは、異種性の細胞群を解析する際などに利用される蛍光プローブである**cell tracer**を用い、染色した細胞としていない細胞に、別々に異なる線量を照射し共培養した。この手法で、物理的及び液性因子による細胞間コミュニケーションを阻害せずにコホート効果の評価を行った。

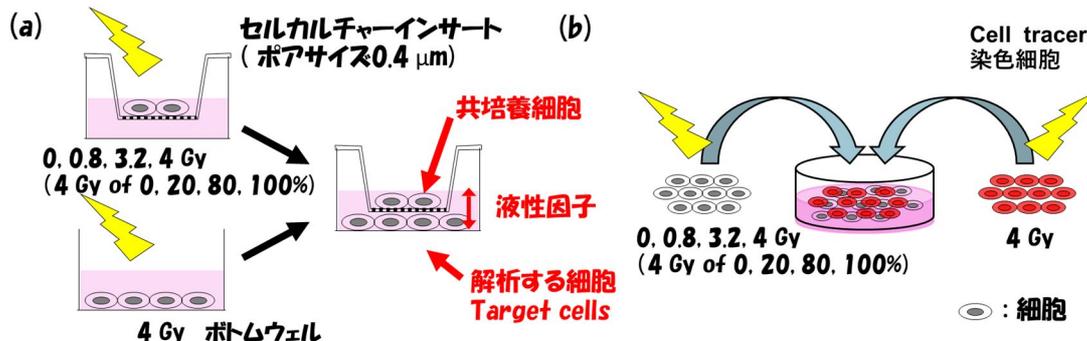


図2. (a) インサートを利用した異なる線量を受けた細胞集団の作製、(b) Cell Tracer を利用した異なる線量を受けた細胞集団の作製

インサートを利用した異なる線量を受けた細胞集団の作製

Target cells は 6 well plate のボトムウェルに、共培養用の細胞はインサート (Falcon) (高密度半透明、ポアサイズ 0.4 μm) に 5 万ずつ播種し、1 日培養した。6 well plate の target cells には通常通り照射を行った。インサートの細胞に照射後は、インサートを target cells が播種された 6 well plate にセットし、3 日間共培養した。共培養後に、**Modified High-Density Survival Assay (MHDS assay)**、**clonogenic assay**、**TUNEL assay** の 3 つの実験を行った。

Cell Tracer を利用した異なる線量を受けた細胞集団の作製 (DCC)

Target cells は、細胞追跡用蛍光色素である **CellTrace Far Red (CTFR)** (Invitrogen, Carlsbad, CA) で 20 μM の濃度で製品マニュアルのプロトコルに沿って染色された。染色後、SAS 及び A549 細胞は Φ35 mm dish にそれぞれ 35、40 万個播種された。Co-cultured cells 用として、CTFR で染色しない細胞も同じ細胞数で用意した。6 時間培養後、細胞に X 線を照射し、target cells と共培養細胞を混ぜ合わせ、培地で 1 回洗浄し、Φ35 mm dish に播種した。2 日間培養後に、規定数の細胞数を Φ60 mm dish に播種し、X 線照射より SAS は 4、5 日 A549 は 5、6 日間培養した。規程日数培養後、細胞は固定可能な死細胞の判別蛍光色素である **Live-or-Dye™ 568/583 (biotium, CA)** で染色後、1% **Paraformaldehyde (PFA)** で固定処理され、**flow cytometer** の解析まで 4 暗所で保存した。

コホート効果ではパイスタンダー効果に關与するシグナル伝達分子が重要な役割を果たす可能性があるとして推測されており、一酸化窒素(NO)に焦点を絞って解析を行った。NO のラジカルスカベンジャーである **c-PTIO** を用いた実験では、X 線照射後に target cells と共培養細胞を混ぜ合わせた後に最終濃度が 20 μM になるように **c-PTIO** を添加した。その他の手順は、**c-PTIO** を添加しない場合と同様である。

(3) Modified High-Density Survival Assay

kuwahara らの MHDS assay を参考に実験を行い、細胞生存率を評価した(Kuwahara et al., *Radiat Res.* 51(3), 2010)。3 日間共培養された 6 well plate の target cells を回収し、4 Gy の target cells に対しては SAS、A549 とともに 1/10 の希釈倍率で播種した。4 日間培養後、トリパンブルー色素除外法で細胞数をカウントした。

(4) Clonogenic assay

3 日間共培養後における、細胞生存率をコロニーアッセイにて評価した。6 well plate の target cells を回収し、Φ60mm dish に以下の細胞数で再播種した。播種数は、4 Gy の target cells に対しては SAS と A549 でそれぞれ 1800、1500、0 Gy においてはそれぞれ 200、400 とした。7~8 日間培養後、メタノール及びギムザ染色液を使用してコロニーを固定・染色した後、細胞数が 50 以上からなる集団をコロニーとしてカウントした。

(5) TUNEL assay by flow cytometry

アポトーシスは TUNEL assay で評価した。Target cells を回収し、4% PFA で固定し、70% エタノールを加え使用まで -20 で保存した。TUNEL assay は、MEBSTAIN Apoptosis

TUNEL Kit Direct (Medical and Biological Laboratories, Tokyo, Japan)を用いて、製品マニュアルのプロトコルに沿って行った。解析はフローサイトメーターCytomics FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA) 及び解析ソフトウェア FlowJo 7.6.5 (Treestar, San Carlos, CA)を用いて行った。

(6) Cell proliferation assay using cell tracer

Cell proliferation assay は、細胞集団を解析する増殖モデリングで CTFR 陽性細胞を解析することにより行われた。CTFR 陽性細胞は、フローサイトメーターCytoFLEX (Beckman Coulter)及び FlowJo 7.6.5 で解析された。死細胞は Live-or-Dye にて取り除いた。解析では、分裂した細胞の平均分割数である Proliferation index (PI)と増殖率の指標である Expansion index (EI)を評価した。PI は、FlowJo 7.6.5 にて算出した。EI は、細胞集団を解析する増殖モデリングより得られたデータを基に算出した(FlowJo 7.6.5 では直接 EI の算出は出来ない)。EI 算出の計算は、総細胞数÷培養開始時の細胞数を示しており、単純に言えば実験中に細胞が何倍に増えたかを示している。

Generation 0 に相当する細胞の平均蛍光強度は、増殖モデリングに必要なパラメーターであるが、解析を行うサンプルでは時間経過により消失してしまっている。そのため、Day0 のデータより G0 の平均蛍光強度を算出して利用した。

4. 研究成果

(1) Modified High-Density Survival Assay

ICC の実験における、SAS 及び A549 の MHDS assay による relative survival(4 Gy-0%で規格化)を図 3 に示す。SAS では、共培養細胞への線量増加と共に、target cells の統計的に有意に相対生存率が上昇する傾向が観察された。A549 では、統計的な有意な差は観察されなかったものの、同様の傾向が観察された。当初は、共培養細胞への線量が増加すればコホート効果により target cells の生存率が低下すると考えていたが、逆の結果だった。解析が複雑化する可能性があり、実験を予定していた多門照射による線量分割を条件としコホート効果の影響評価は中止した。

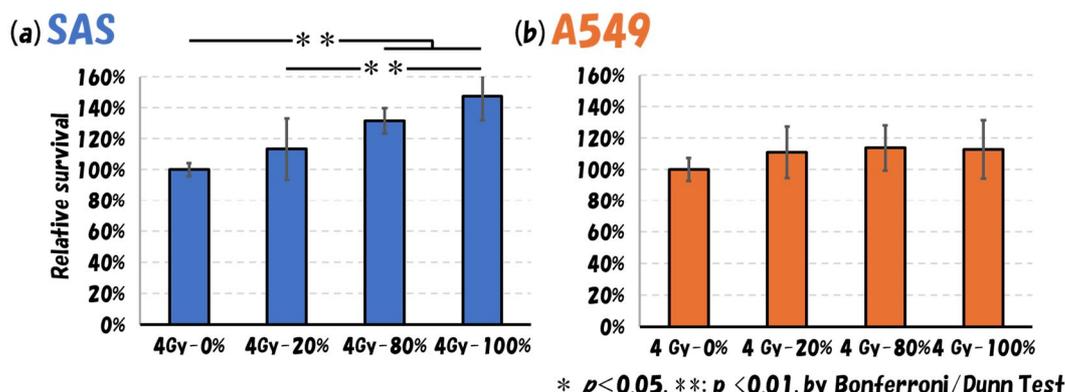


図 3. ICC における SAS (a) 及び A549 (b) Modified High-Density Survival Assay による相対生存率

(2) Clonogenic assay

ICC の実験における、SAS の Clonogenic assay による relative survival(4 Gy-0%で規格化)は 4 Gy-20%の相対生存率が最も低く、その他の条件と比較して相対生存率が統計的に有意に減少していた(それぞれ $p < 0.01$)。A549 も統計的に有意な増減は観察されなかったが、SAS と共に似たような傾向であった。これらは、MHDS assay の結果と一見矛盾するような結果であるが、4Gy-0%の条件では、非照射細胞が照射細胞を保護する rescue 効果が表れたと結果と考えられる。

(3) TUNEL assay by flow cytometry

ICC の実験における、SAS 及び A549 の TUNEL assay によるアポトーシス解析では、実験条件によるアポトーシス量の変化はほとんど観察されなかった。

(4) Cell proliferation assay using cell tracer

DCC での実験において、SAS 及び A549 において co-cultured cells に X 線を照射することにより、4 Gy 照射された target cells の相対 EI(4 Gy-0%で規格化)が増加する傾向が観察された(図 4)。SAS においては、A549 と比較してはっきりとしたコホート効果の影響が現われ共培養細胞への線量増加と共に、相対 EI が緩やかに上昇する傾向が観察された。SAS 及び A549 共に Carboxy-PTIO を添加により相対 EI の若干の上昇があった。また、統計的に有意な増減は消失したが、c-PTIO の添加の有無で EI の傾向はほとんど変化しなかった。

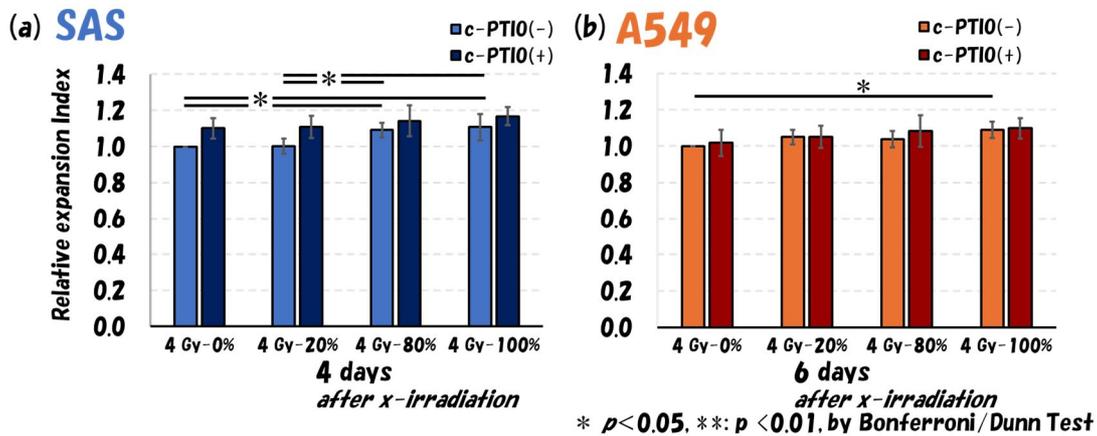


図4. Direct contact co-culture における flow cytometer を用いた cell proliferation 解析より得られた relative expansion Index. (a)は SAS における照射より4日目の相対 EI、(b)は A549 における照射より6日目の相対 EI を示す。

コホート効果における物理的な細胞コミュニケーションによる影響については、はっきり評価できなかったが、臨床的な条件から考えて、申請者は液性因子による結果を重視している。なぜなら、X線の放射線治療の線量分布から考えれば隣り合う細胞同士で急激な線量変化が起こることはないからである。現実的な線量分布として条件で考えれば、より効果範囲が広いと考えられる液性因子による影響が重要と考えられる。本研究により放射線誘発コホート効果は、液性因子が関係していることが明らかとなった。コホート効果の影響により、必ずしも細胞のダメージが物理線量に依存せず、線量の分布からも影響をうけることが示唆された。コホート効果は、bystander 効果と似たメカニズムと考えられているが、ほとんど研究がないため効果範囲も不明である。海外では、dish 全体で強弱をつけた照射によるコホート効果を評価した研究が報告されているおり、不均等な照射は、均一な照射よりも殺細胞効果が高いことを報告している(Zhang et al., *Oncotarget*. 7(27), 2016)。本研究では、2種類の線量を利用して不均一な線量を照射された細胞集団を模擬している。したがって、より局所的な影響を評価していることになるが、それゆえに線量の大小によるコホート効果のはっきりした影響を評価しているという利点がある。

本研究結果を臨床的な状況に当てはめると、標的腫瘍周辺の急激な線量分布の低下により target の腫瘍への殺細胞効果に悪影響がないことを示している。より詳細な評価においては、臨床の条件に近づけて co-culture cells に正常細胞を選択して実験する必要があるかもしれない。同様に臨床にて、コホート効果の影響が想定されるのは標的腫瘍内に対しても強弱をつけた線量分布が作成できる Simultaneous Integrated Boost (SIB)法である。腫瘍内に急峻な線量分布が作成されるため、target cells と co-cultured cells が同一細胞種であるこの実験デザインが適している。本研究により、コホート効果により、SIB 法により作成された線量勾配のある高線量域の細胞には悪影響を及ぼさないことが示唆された。

コホート効果については、明らかにされていない部分が多い。Bystander 効果においては、線量や細胞種の影響について報告されている(Tang H et al., *Front Oncol*. 13, 2023)。細胞種の違いや正常細胞との組み合わせ、また、Target cells 及び共培養細胞に照射する線量の変化によるコホート効果への影響評価が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Terashima Shingo, Sano Junta, Osanai Minoru, Toshima Keisuke, Ohuchi Kentaro, Hosokawa Yoichiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Monte Carlo simulations of organ and effective doses and dose?length product for dental cone-beam CT	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 37～48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11282-023-00705-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤廉, 木村直希, 小原秀樹, 寺島真悟, 駒井史雄, 鈴木将志, 成田将崇
2. 発表標題 モンテカルロシミュレーションを用いた小照射野における計算アルゴリズムの軸外線量比の精度検証
3. 学会等名 第12回東北放射線医療技術学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 直希, 寺島 真悟, 小原 秀樹, 駒井 史雄, 細川 洋一郎, 青木 昌彦, 成田 将崇
2. 発表標題 モンテカルロシミュレーションを用いた位置照合CBCTの臓器線量および実効線量の評価
3. 学会等名 第35 回日本放射線腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 TERASHIMA SHINGO, TATEMURA RYOTA, HOSOKAWA YOICHIRO
2. 発表標題 Impact of non-uniform dose on cell survival
3. 学会等名 2021日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺島 真悟、齋藤 航、館村 亮汰、細川 洋一郎
2. 発表標題 不均一な線量が照射された細胞に対する放射線誘発コホート効果の影響評価
3. 学会等名 第60回 日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細川 洋一郎, 寺島 真悟
2. 発表標題 モンテカルロシミュレーションによる歯科用コーンビームCTの線量評
3. 学会等名 日本歯科放射線学会 第 236 回関東地方会・第 42 回北日本地方会・第 30 回合同地方会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上 翔, 木村 直希, 寺島 真悟, 鈴木 将志, 近藤 廉, 小原 秀樹, 駒井 史雄, 成田 将崇
2. 発表標題 様々な検出器並びにフィルムを使用した小照射野における軸外線量比(OCR)の比較
3. 学会等名 第13回東北放射線医療技術学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村 直希, 岩森 賢大, 寺島 真悟, 小原 秀樹, 駒井 史雄, 細川 洋一郎, 成田 将崇
2. 発表標題 モンテカルロシミュレーションを用いた位置照合 CBCT の臓器線量の評価
3. 学会等名 第37回青森県放射線治療技術研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学 研究者総覧
https://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000267_ja.html?k=%E5%AF%BA%E5%B3%B6

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------