

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791190

研究課題名（和文） がんの微小環境因子が放射線感受性に影響を及ぼす機構に関する研究

研究課題名（英文） Involvement of the microenvironment on the radiosensitivity

研究代表者

菓子野 元郎 (KASHINO GENRO)

京都大学原子炉実験所・助教

研究者番号：00437287

研究成果の概要（和文）：

がんの微小環境はその治療効果に影響を及ぼすことから、機構の解明が必要とされている。本研究において、細胞集団が分泌する液性因子が放射線感受性に及ぼす影響を調べた。その結果、照射細胞由来の因子は周りの細胞のミトコンドリアの膜電位活性を低下させ、活性酸素を増加させることがわかった。さらに、ミトコンドリアの変化を介して、遺伝子突然変異を引き起こす可能性が示唆された。しかしながら、これらの液性因子による変化は、放射線照射をされた細胞の 53BP1 フォーカス形成を指標として調べたところ、放射線感受性には影響していないことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

It has been suggested that tumor microenvironment is important for the therapy. In this study, we examined the effects of secreted factors from irradiated cells on the treated cells to check the microenvironment after irradiation. The results suggest that membrane activity of mitochondria was reduced, and the level of reactive oxygen species was increased by the treatments of the secreted factors. Also, mutation fraction was increased in cells treated with secreted factors. However, these effects were not affected in radiosensitivity indicated by the foci formation of 53BP1 after X-irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、放射線化学

キーワード：微小環境

1. 研究開始当初の背景

（1）放射線が引き起こす生物学的反応として、「バースタンダー効果」が知られている。これまでに多くの報告によりその機構が解明されつつあるが、いまだに完全に解

明されていない。微量な放射線でもバースタンダー効果があるならば、その影響を考慮した DNA 損傷応答機構や発がんメカニズムを考えなければならない。放射線のエネルギー付与が一次的に及ぼす影響を考えるだけでも複雑であるのに、二次的なバイ

スタンダー効果を考慮することは、さらに複雑さを増すことになるが、生物の応答機構はそういうものかもしれない。低線量、低線量率の影響を評価する上でも放射線の二次的な影響（非標的効果）を解明することは重要である。

(2) バイスタンダー効果解明の鍵は、細胞集団としての環境適応を理解することである。一部の細胞が照射されることを環境適応の「センサー」として捉え、分泌性因子を「メディエーター」として捉え、周りの細胞（バイスタンダー細胞）はそれに対する「エフェクター」と考えると、理解しやすい。この考え方は、過去に行ったマイクロビーム実験の結果により支持される。マイクロビームは、細胞集団のうち、一部の細胞だけを数ミクロン幅で限定照射できる装置であるが、この照射により一部だけが照射されても周りの被ばくしていない細胞でも染色体切断（DNA 二重鎖切断、微小核生成）が生成することが明らかとなった。照射部位は限定されても、分泌性因子を介した機構により、細胞は集団として「応答」していることがわかる（Kashino et al. 2004, *Mutat. Res.*, Kashino et al. 2007 *Mutat. Res.*）。さらに、分泌性因子の作用を追求すると、その作用は周辺の健常細胞が損傷部位へ遊走する機構にも関わることが示唆された（Kashino et al. 2009, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physic.*）。この現象は、「組織」の再構成が細胞集団の連携プレーであることを示しており、放射線照射後に生存していくための生存戦略と捉えることができる。

(3) がんの性質を理解することは、がんの放射線治療において重要である。がんを理解する上では、突然変異などをはじめとする個々のがん細胞に特異的な性質を理解することも重要であるが、間質細胞を含むがん組織の巧みなネットワークを理解することも必要である。

(4) がん細胞の放射線感受性決定には、DNA 二重鎖切断の修復能力が大きく影響すると考えられる。通常、*in vitro* 条件下での放射線感受性評価は、単一の細胞株を用いて行われるが、このとき、がん組織が保持している微小環境の影響は考慮されていない。実際には、微小環境におけるネットワーク（線維芽細胞から分泌される因子の作用など）により、個々のがん細胞の性質が制御されているので、その中のがん細胞の DNA 二重鎖切断能力も制御されているかもしれない。そこで、微小環境（液性因子）の動態をも考慮した放射線感受性の

解析は重要であると考え、①放射線で誘導される液性因子の影響、②その作用による細胞内の変化について解析を行った。

2. 研究の目的

本研究は、「がん組織の微小環境における放射線照射の影響が、がん細胞の放射線感受性に如何なる変化を及ぼすのか」を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞は、癌細胞と同様に無限増殖能を持つ CHO 細胞を用いた。

(2) 放射線は X 線を用いた。実験に用いる線量としては 0.2Gy~4Gy の領域で照射を行った。

(3) 放射線照射による微小環境の変化を調べるため、放射線照射した CHO 細胞の培養上清を照射 24 時間後に回収して、それを別の（照射されていない）CHO 細胞へ処理する（メディウムトランスファー法）方法を用いた。

(4) 微小環境の変化を知るため、エネルギー産生や活性酸素生成に重要な器官であるミトコンドリアに着目し、その膜電位活性を JC-1 (Invitrogen) による蛍光で評価した。また、ミトコンドリア内に特異的なスーパーオキシドのレベルを MitosoxRed (Invitrogen) で調べた。蛍光レベルの検出には FACSscan を用いた。

(5) 放射線感受性を調べる指標としては、DNA 二重鎖切断部位に集積することが知られている 53BP1 細胞を用いた。メディウムトランスファー後 2 時間の時点において放射線を照射し、その後経時的に 53BP1 フォーカスの数を数え、DNA 二重鎖切断の誘発、及びその修復動態を調べた。

(6) メディウムトランスファー法により放射線誘発液性因子が遺伝子突然変異に影響を及ぼすか否かを調べるため、HPRT 遺伝子領域の突然変異頻度を 6 チオグアニン耐性細胞出現頻度により調べた。

4. 研究成果

(1) 放射線照射後の微小環境因子（バイスタンダー因子）がミトコンドリアへ影響を及ぼすことを確かめるため、JC-1 によるミトコンドリアの膜電位を測定した。細胞は CHO 細胞を用いた。X 線照射 24 時間後、培養上清を非照射 CHO 細胞へ処理し、2 時間後に JC-1 を

処理した。FACSscan で JC-1 に由来する FL-1 (緑) と FL-2 (赤) の蛍光強度比を調べることにより、ミトコンドリアの膜電位を測定した。その結果、0.2~4 Gy の線量域において、照射細胞由来培養上清処理により同程度の膜電位の低下がみられた。膜電位の低下は、対照群の膜電位に対して 20%程度低くなった。次に、培養上清の処理時間を変えて検討したが、処理開始から 1~24 時間後まで同程度の膜電位の低下がみられた。従って、バイスタンダー効果 (分泌性因子の作用) による膜電位の低下は比較的早い時間にはじまり、その作用は持続的に起こっていることが示唆された。

(2) (1) の実験と同じ条件により、培養上清を介したミトコンドリアの活性酸素のレベルを調べた。ミトコンドリアの活性酸素としては、MitosoxRed によりミトコンドリア特異的な O_2^- を FACSscan による蛍光値により定量した。その結果、バイスタンダー効果によりミトコンドリアの O_2^- が増加することがわかった。時間的には、培養上清の処理開始から 2 時間後にかけて急激に増加し (最大で対照群の約 8% 増加)、6 時間後から減少する傾向がみられた。一つの可能性として、膜電位の低下に依存して O_2^- レベルが増加する機構が考えられる。

(3) 液性因子を介したバイスタンダー効果を調べるため、照射細胞の培養上清を回収し、未照射細胞へ処理する時に誘発する突然変異頻度を調べた。この突然変異生成における線量依存性を調べるため、高線量 (4 Gy) と低線量 (0.2 Gy) を照射した細胞の培養上清による突然変異誘発効果を調べた。その結果、4 Gy 照射細胞の分泌性因子を介したバイスタンダー効果により、突然変異頻度が有意に増加することが分かった ($p < 0.05$)。0.2 Gy では、4 Gy 照射時より誘導レベルは低く、この線量域では線量依存性があることが分かった。次に、ビタミン C による突然変異抑制効果を調べた。その結果、バイスタンダー効果による突然変異誘発は、分泌性因子が作用した細胞をビタミン C 処理することにより顕著に抑制された。この効果は、遅発性誘発長寿命ラジカルがビタミン C 処理で抑制されることに起因するのかもしれない。

(4) (1) の実験において、培養上清処理 (メディウムトランスファー) によるミトコンドリア膜電位の低下は 1 時間以内に始まることがわかった。そこで、それ以降の時間 (メディウムトランスファー後 2 時間) に 0.5 Gy の X 線を照射した時、生成する DNA 二重鎖切断とその修復動態に変化が及ぼされるか否かを調べるため、53BP1 フォーカスの

蛍光染色によりフォーカスの数を評価した。まず、照射 15 分後のフォーカスは DNA 二重鎖切断の誘発レベルを示しているが、照射細胞由来の培養上清因子による影響は見られなかった。従って、バイスタンダー効果 (培養上清処理) によるミトコンドリアの変化は、DNA 二重鎖切断の誘発には影響しないことが分かった。また、0.5 Gy 照射から 1 時間後から 24 時間後にかけても 53BP1 フォーカスの数には影響が見られなかった。このことから、照射細胞の培養上清処理は DNA 二重鎖切断の修復動態にも影響しないことが分かった。

放射線照射細胞が分泌する因子は、微小環境形成に重要な役割を果たすと考えられる。特に本研究で得られた実験結果は以下のようによまとめることができる。

「放射線照射細胞が分泌する因子はまわりの細胞のミトコンドリア活性 (膜電位) を低下させ、活性酸素を生成させる。このことは、ゲノム DNA の突然変異生成につながる可能性が示唆された。しかし、さらなる放射線照射により生じた DNA 二重鎖切断の修復動態には影響しない」

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 14 件)

1. Kashino G, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Ohigashi T, Shinohara K, Kurihara A, Fukumoto M, Tanaka H, Maruhashi A, Suzuki M, Kinashi Y, Liu Y, Masunaga S, Watanabe M, Ono K, Inductions of DNA double strand breaks and cellular migrations through the bystander effects in the cells irradiated with slit type microplanar beam of the SPring-8 synchrotron. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physic.* 74, 229-236, 2009, 査読有

2. Nariyama N, Ohigashi T, Umetani K, Shinohara K, Tanaka H, Maruhashi A, Kashino G, Kurihara A, Kondoh T, Fukumoto M, Ono K: Spectromicroscopic film dosimetry for high-energy microbeam from synchrotron radiation. *Appl. Radiat. Isot.* 67, 155-159, 2009, 査読有。

3. Yoshikawa T, Kashino G, Ono K, Watanabe M, Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities. *J. Radiat. Res.* 50, 151-160, 2009, 査読有。

4. Masunaga S, Kono K, Nakamura J, Tano

K, Yoshida H, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Liu Y, Ono K. Usefulness of hexamethylenetetramine in combination with chemotherapy using free and pegylated liposomal doxorubicin in vivo, referring to the effect on quiescent cells. *Oncol. Rep.* 21, 1307-1312, 2009, 査読有。

5. Masunaga S, Tano K, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K, Nakamura J: Evaluation of the potential of hexamethylenetetramine, compared with tirapazamine, as a combined agent with {gamma}-irradiation and cisplatin treatment in vivo. *Br. J. Radiol.* 82, 392-400, 2009, 査読有。

6. Masunaga SI, Hirayama R, Uzawa A, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Liu Y, Koike S, Ando K, Ono K: The effect of post-irradiation tumor oxygenation status on recovery from radiation-induced damage in vivo: with reference to that in quiescent cell populations. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 1109-11016, 2009, 査読有。

7. Suzuki M, Tanaka H, Sakurai Y, Kashino G, Yong L, Masunaga S, Kinashi Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Sato T, Maruhashi A, Ono K: Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma. *Radiother. Oncol.* 92, 89-95, 2009, 査読有。

8. Kashino G, Fukutani S, Suzuki M, Liu Y, Nagata K, Masunaga SI, Maruhashi A, Tanaka H, Sakurai Y, Kinashi Y, Fujii N, Ono K: A Simple and Rapid Method for Measurement of ¹⁰B-*para*-Boronophenylalanine in the Blood for Boron Neutron Capture Therapy Using Fluorescence Spectrophotometry. *J. Radiat. Res.* 50, 377-382, 2009, 査読有。

9. Liu Y, Nagata K, Masunaga S, Suzuki M, Kashino G, Kinashi Y, Tanaka H, Sakurai Y, Maruhashi A, Ono K. Gamma-ray irradiation enhanced boron-10 compound accumulation in murine tumors. *J. Radiat. Res.* 50, 553-557, 2009, 査読有。

10. Masunaga S, Tano K, Nakamura J, Watanabe M, Kashino G, Takahashi A, Tanaka H, Suzuki M, Ohnishi K, Kinashi Y,

Liu Y, Ohnishi T, Ono K. Usefulness of hexamethylenetetramine as an adjuvant to radiation and cisplatin in the treatment of solid tumors: its independency of p53 status. *J. Radiat. Res.* 51, 27-35, 2010, 査読有。

11. Masunaga S, Hirayama R, Uzawa A, Kashino G, Takata T, Tanaka H, Suzuki M, Kinashi Y, Liu Y, Koike S, Ando K, Ono K. Influence of manipulating hypoxia in solid tumors on the radiation dose-rate effect in vivo, with reference to that in the quiescent cell population. *Jap. J. Radiol.* 28, 132-142, 2010, 査読有。

12. Suzuki K, Kashino G, Kodama S, Watanabe M, Long-term persistence of X-ray-induced genomic instability in quiescent normal human diploid cells. *Mutat. Res.* 671, 33-39, 2009, 査読有。

13. Kashino G, Liu Y, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Ono K, Tano K, Watanabe M, An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair. *J. Radiat. Res.* 51, 733-740, 2010, 査読有。

14. Kinashi Y, Tanaka H, Masunaga S, Suzuki M, Kashino G, Yong L, Takahashi S, Ono K. Ascorbic acid 2-glucoside reduces micronucleus induction in distant splenic T lymphocytes following head irradiation. *Mutat. Res.* 695, 69-74, 2010, 査読有。

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Genro Kashino, Involvement of radical species on radiation induced bystander effects. The 2nd Asian Congress of Radiation Research, (ソウル市)、2009 年 5 月 19 日

2. 菓子野元郎、熊谷純、劉勇、木梨友子、鈴木実、増永慎一郎、小野公二、渡邊正己：放射線誘発バイスタンダー効果におけるラジカル種の関与、日本保健物理学会第 43 回研究発表会 (大阪市)、2009 年 6 月 3 日

3. Genro Kashino, Jun Kumagai, Koji Ono, Masami Watanabe: The role of radicals in bystander effect through the secreted factors from irradiated cells. 55th Annual Meeting of the Radiation Research Society, (米国ジョージア州サバンナ)、2009 年 10 月 4~7 日

4. 菓子野元郎、熊谷純、劉勇、鈴木実、木梨友子、増永慎一郎、渡邊正己、小野公二、分泌因子を介したバイスタンダー効果による突然変異誘発機構、日本放射線影響学会第 52 回大会（広島）、平成 21 年 11 月 11 日

5. 菓子野元郎、熊谷純、渡邊正己、小野公二、放射線により誘導される分泌性因子を介した突然変異生成機構、日本薬学会第 130 年会（岡山）、平成 22 年 3 月 30 日

6. 菓子野元郎、熊谷純、田野恵三、渡邊正己、放射線照射による分泌性因子を介した突然変異誘発の機構解明、日本組織培養学会第 81 回大会（岡山）、平成 22 年 5 月 21 日

7. Genro Kashino, Jun Kumagai, Hiroyuki Kugoh, Mitsuo Oshimura, Keizo Tano, Koji Ono, Masami Watanabe : Slow releasing long lived radicals are involved in the bystander mutagenesis response. 56th Annual Meeting of the Radiation Research Society, (米国ハワイ州マウイ)、2010 年 9 月 25~29 日

8. 菓子野元郎、熊谷純、田野恵三、渡邊正己、放射線誘発バイスタンダー効果による突然変異誘発機構、日本放射線影響学会第 53 回大会（京都）、平成 22 年 10 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菓子野 元郎 (KASHINO GENRO)

研究者番号 : 00437287