

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25740019

研究課題名(和文)重イオン誘発バイスタンダー効果の時空間依存性の解析

研究課題名(英文)Analysis of bystander effect induced by heavy ion beams

研究代表者

横田 裕一郎(YOKOTA, Yuichiro)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号：30391288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：照射細胞から非照射細胞へ放射線の効果が伝わるバイスタンダー効果の誘導機序を解明するため、ガンマ線や炭素イオンを照射したヒト培養細胞と非照射細胞を共培養した。その結果、非照射細胞のコロニー形成能は、照射細胞との共培養時間が延びるほど(時間依存)、照射細胞が受ける線量が高いほど(線量依存)低下するが、ガンマ線と炭素イオンの間では違いが無かった(線質非依存)。また、一酸化窒素の消去剤を加えるとバイスタンダー効果も消失し、一酸化窒素が酸化されて生じる亜硝酸イオンの培養液中濃度はバイスタンダー効果と相関関係を示したことから、一酸化窒素の産生量はバイスタンダー効果の決定因子の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of bystander effect, cells were irradiated with gamma-rays or carbon-ion beam. After irradiation, irradiated cells and non-irradiated cells were co-cultured in the same vessel. As a result, clonogenicity of non-irradiated cells decreased when the co-culture time with and the dose absorbed in irradiated cells increased. There was no significant difference in their clonogenicity between gamma-ray and carbon-ion irradiation. From these results, it has been clearly showed that bystander effect is dependent on co-culture time and absorbed dose, and independent of radiation quality. When a nitric-oxide scavenger was added during co-culture, reduction in clonogenicity disappeared. There were also negative relationships between the clonogenicity and the concentrations of nitrite, derived from nitric oxide, in co-culture medium. The yield of nitric oxide was, therefore, assumed to be one of the determinants of bystander effect.

研究分野：放射線生物学

キーワード：バイスタンダー効果 ガンマ線 炭素イオンビーム 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

従来、放射線の生物効果は、そのエネルギーが DNA など細胞内の標的物質に付与されることにより発現すると考えられてきた。ところが、1992 年に Nagasawa と Little は、全体の 1% の細胞にだけ放射線のエネルギーが付与されるような低フルエンスのアルファ線で細胞集団を照射した際、30% の細胞で染色体異常が観察されたと報告した (H. Nagasawa and J.B. Little, *Cancer Res.*, 52, 6394-6396, 1992)。この報告以来、放射線の効果は、照射細胞から放出される何らかの細胞間情報伝達物質を介して、照射細胞の近傍に存在する非照射のバイスタンダー細胞にも伝わることで、多くのグループにより確認されてきた (N. Hamada et al., *Curr. Mol. Pharmacol.*, 4, 79-95, 2011)。バイスタンダー効果は、放射線の照射効果を非照射細胞にまで伝えるため、原子力災害や有人宇宙飛行等による人体の低線量放射線への被曝リスクを高める可能性があると考えられる。さらに、医療技術の進歩に伴い腫瘍と正常組織の線量比が改善されつつある放射線がん治療において、放射線が照射された腫瘍だけでなく、周辺の僅かに被曝した正常組織と被曝していない正常組織間の相互作用により、正常組織における二次発がん等の副作用を引き起こす可能性があることから、バイスタンダー効果の発生機構は、放射線生物影響研究において解明が求められる喫緊の課題の一つである。

それまで申請者は、細胞集団の一部を重イオンビームで照射し、同じ容器内で照射細胞と非照射細胞を 6~24 時間共培養した後、別の容器に再播種した非照射バイスタンダー細胞のコロニー形成能を調べていた。その結果、重イオンマイクロビーム細胞照準照射装置 (T. Funayama et al., *J. Radiat. Res.*, 49, 71-82, 2008) を用いて全体の 0.02% の細胞を照射した場合、6 時間の共培養後には効果が認められないが、24 時間の共培養後にはバイスタンダー細胞の 10~20% がコロニー形成能を失うこと、重イオンブロードビーム細胞照射装置を用いて全体の 33% の細胞を照射した場合、6 時間の共培養後にバイスタンダー細胞の 10~20% がコロニー形成能を失う事実を見出ししていた。以上の事実から、我々は、「放射線が照射された細胞はバイスタンダー効果を誘導する何らかの原因物質を持続的に放出しており、その物質を受け取ったバイスタンダー細胞の一部はコロニー形成能を失う。そのため、バイスタンダー効果は照射細胞の数と、照射細胞と非照射細胞が細胞間情報伝達を行う時間に依存する。」可能性があるのではないかと考えていた。

重イオンビームとガンマ線のように線質の異なる放射線がバイスタンダー効果を誘発するかどうか、放射線が直接に照射された

細胞で認められるような線質依存性 (線質の異なる放射線を同じ線量で細胞に照射した場合に異なる生物効果が得られる現象) がバイスタンダー効果でも存在するかどうかについて、多くの研究者が正常細胞や腫瘍細胞など異なる細胞を用いて多様な結果を報告しており、そのメカニズムには不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

以上のような背景を鑑み、本研究では、重イオンビームあるいはガンマ線を照射した細胞と非照射細胞を同じ容器内で一定時間共培養した後、非照射バイスタンダー細胞のコロニー形成能と、容器内に放出される細胞間情報伝達物質の産生量を測定するとともに、バイスタンダー効果を誘導する可能性が指摘されている一酸化窒素の役割を解析し、関連する遺伝子の発現量変化を定量することにより、バイスタンダー効果発生の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト正常線維芽細胞 WI-38 株を米国 ATCC 社から取り寄せた。WI-38 細胞は 10% 牛血清 (ATCC) と 1 倍濃度のグルタミン・ペニシリン・ストレプトマイシン混合液 (Thermo Fisher) を添加した MEM 培地 (Sigma-Aldrich) で継代培養し、Population Doubling Level が 35 未満の細胞を実験に用いた。1.0 μm 径の (細胞は通過できないが、培養液や細胞間情報伝達物質のような分子は容易に通過できる) 微細孔が高密度に空いたメンブレンを底部に持つカルチャーインサート (Corning) と、対応するコンパニオンプレート (Corning) 上に細胞を播種し、高密度接着培養した。

(2) 照射と共培養

インサート上に培養した細胞を、日本原子力研究開発機構 (現: 量子科学技術研究開発機構) 高崎量子応用研究所 TIARA の AVF サイクロトロンで加速した 18.3 MeV/n 炭素イオンビーム (LET: 108 keV/ μm) 又は同研究所コバルト 60 照射施設で得られるガンマ線 (LET: 0.2 keV/ μm) で照射した。照射細胞が含まれるインサートを非照射細胞が含まれるコンパニオンプレート上に重ねることで、照射細胞と非照射細胞を多孔性メンブレンの上下側で共培養した。

(3) コロニー形成能の測定

一定時間の共培養後、コンパニオンプレート上で培養したバイスタンダー細胞をトリプシン・EDTA 混合液で処理して剥離回収した。このバイスタンダー細胞を別の容器に播種し直し、14 日間培養した後、50 細胞以上に増殖した生存細胞由来のコロニーをホルマリン固定し、クリスタルバイオレット染色し

て実体顕微鏡（オリンパス）下で計数した。コロニー形成能は、照射細胞と共培養したバイスタンダー細胞のコロニー形成率を、非照射細胞と共培養した対照細胞のコロニー形成率で除算することで求めた。

（４）一酸化窒素の影響解析

一酸化窒素ラジカルがバイスタンダー効果誘導で果たす役割を確認するため、一酸化窒素と速やかに反応して二酸化窒素に変換するカルボキシ PT10 (Wako) を 20 μM の濃度で共培養液に加えておいて、バイスタンダー細胞のコロニー形成能を測定した。また、一酸化窒素ラジカルが培養液中で酸化して生じる亜硝酸イオンの濃度をザルツマン法で測定した。具体的には、共培養 24 時間後に回収した培養液とザルツマン試薬（0.5% スルファニル酸：Wako、0.002% N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：Wako、14% 酢酸：関東化学）を 1:1.5 の割合で混合して室温で 15 分間インキュベートした後、550 nm での吸光度を分光光度計（島津製作所）で測定した。さらに、培養液中に放出された一酸化窒素ラジカルがバイスタンダー効果を誘導する現象を模擬するため、半減期 120 分で分解して 2 倍量の一酸化窒素ラジカルを放出する NOC12（同仁化学）の濃度を変えて非照射細胞に投与し、24 時間培養した後、細胞のコロニー形成能を測定した。

（５）遺伝子発現解析

バイスタンダー効果誘導にかかわる分子メカニズムを調べるため、照射細胞と 2~24 時間共培養した非照射細胞から RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて全 RNA を抽出した。RT2 First Strand Kit (Qiagen) を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR 装置と RT2 qPCR Primer Assay Kit (Qiagen) を用いて関連する遺伝子の発現量を定量解析した。

4. 研究成果

（１）バイスタンダー効果の時間依存性

バイスタンダー効果に時間依存性が存在するかどうか調べるため、0.5 Gy のガンマ線を照射した細胞と非照射細胞を 6~24 時間共培養した後、非照射バイスタンダー細胞のコロニー形成能を測定した。その結果、バイスタンダー細胞のコロニー形成能は共培養時間が延びるにつれて減少する傾向を示し、バイスタンダー効果に時間依存性が存在することを確認することができた。以降の実験では、バイスタンダー効果を最大化するため、照射細胞と非照射細胞の共培養時間は 24 時間に設定した。

（２）バイスタンダー効果の線量依存性と線質非依存性

バイスタンダー効果に線量依存性あるいは線質依存性が存在するかどうか調べるた

め、0.125 Gy~2 Gy の炭素イオンビームあるいはガンマ線を照射した細胞と非照射細胞を 24 時間共培養した後、非照射バイスタンダー細胞のコロニー形成能を測定した。その結果、バイスタンダー細胞のコロニー形成能は、ガンマ線でも炭素イオンビームでも、照射細胞が受ける線量が 0.5 Gy まで増加するにつれて低下し、それ以上の線量では対照区の 80% 程度で推移した。以上の結果から、ヒト正常線維芽細胞で誘導されるバイスタンダー効果は、線量に依存するが、線質には依存しないことを発見した。

（３）バイスタンダー効果で一酸化窒素が果たす役割

一酸化窒素を速やかに二酸化窒素に変換するカルボキシ PT10 をあらかじめ培養液に加えておくと、0.5 Gy のガンマ線あるいは炭素イオンビームを照射した細胞と共培養した非照射細胞のコロニー形成能は低下しなかった。この結果から、一酸化窒素がバイスタンダー効果の誘導に何らかの役割を果たしていることがわかった。次に、照射細胞と非照射細胞の共培養液に含まれる、一酸化窒素が酸化して生じた亜硝酸イオンの濃度を測定したところ、亜硝酸イオンの濃度は照射細胞に照射するガンマ線や炭素イオンの線量が増加するにつれて増加し、1~2 Gy では 100 nM に達することがわかった。亜硝酸イオンの濃度にはガンマ線と炭素イオン区の間で違いが無かった。また、バイスタンダー細胞のコロニー形成能と亜硝酸イオンの濃度との間には負の相関関係があるように見えた。以上のことから、一酸化窒素の産生量はバイスタンダー効果の決定因子の一つである可能性が示唆された。しかしながら、一酸化窒素を発生する NOC12 を 100 nM~100 μM の濃度で処理した非照射細胞のコロニー形成能は全く低下しなかった。以上の結果から、一酸化窒素は、照射細胞で産生されて細胞間情報伝達物質として機能するのではなく、照射細胞から何らかの情報伝達分子を受け取ったバイスタンダー細胞の細胞内で産生されて、直接あるいは酸化型のペルオキシナイトライトとして DNA 損傷を誘発して細胞死を引き起こす可能性があると考えている。

（４）バイスタンダー細胞で発現量が変動した遺伝子

バイスタンダー効果誘導の分子メカニズムを探るため、細胞間情報伝達やアポトーシス誘発などに関与する 426 種類の遺伝子の発現強度を、照射細胞と共培養した非照射バイスタンダー細胞と、非照射細胞と共培養した対照細胞との間で比較した。その結果、照射細胞と 6 時間共培養したバイスタンダー細胞では、対照細胞と比べて、酸化ストレス、サイトカイン情報伝達、アポトーシス、DNA 修復及び細胞周期停止に関与する 13 種類の遺伝子で発現量が 2 倍以上増加することを見出

した。一方、照射細胞と 24 時間共培養したバスタンダー細胞では対照細胞と比べて発現量が 2 倍以上変化した遺伝子は無かった。発現強度が変化した遺伝子はバスタンダー効果の誘導に關与する可能性があることから、今後は、対応するタンパク質の阻害剤や受容体の遮断薬を用いてバスタンダー効果に及ぼす影響を調べたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

横田 裕一郎、舟山 知夫、池田 裕子、小林 泰彦、放射線の効果を細胞から細胞へ伝えるバスタンダー効果の特徴 - 鍵を握るのは一酸化窒素 -、Isotope News、査読無、741 巻、2016、21 - 25
http://www.jrias.or.jp/books/pdf/201601_TENBO_YOKOTA_HOKA.pdf

Y. Yokota, T. Funayama, H. Ikeda, T. Sakashita, M. Suzuki, Y. Kobayashi, The role of nitric oxide in radiation-induced bystander cell-killing effect, JAEA-Review, 査読無, 2015-022 巻, 2015, 67 - 67
DOI: 10.11484/jaea-review-2015-022

Y. Yokota, T. Funayama, Y. Mutou-Yoshihara, H. Ikeda, Y. Kobayashi, The bystander cell-killing effect mediated by nitric oxide in normal human fibroblasts varies with irradiation dose but not with radiation quality, International Journal of Radiation Biology, 査読有, 91 巻, 2015, 383 - 388
DOI: 10.3109/09553002.2015.1021960

Y. Yokota, T. Funayama, H. Ikeda, T. Sakashita, M. Suzuki, Y. Kobayashi, Bystander effect mediated by nitric oxide depends on irradiation dose but not on radiation quality, JAEA-Review, 査読無, 2014-050 巻, 2014, 75 - 75
<http://jolissrch-inter.tokai-sc.jaea.go.jp/pdfdata/JAEA-Review-2014-050.pdf>

Y. Yokota, T. Funayama, H. Ikeda, M. Suzuki, T. Sakashita, Y. Kobayashi, Radiation-induced bystander cell-killing effect is dependent on dose of carbon ions and γ -rays but independent of LET, JAEA-Review, 査読無, 2013-059 巻, 2013, 74 - 74
<http://jolissrch-inter.tokai-sc.jaea.go.jp/pdfdata/JAEA-Review-2013-059.pdf>

〔学会発表〕(計 9 件)

横田裕一郎、ヒト正常線維芽細胞においてバスタンダー効果の誘導に關与する遺伝子の探索、第 10 回高崎量子応用研究シンポジウム、2015 年 10 月 8 日~9 日、高崎量子応用研究所 (群馬県・高崎市)

Y. Yokota, Radiation quality-independent bystander effect and its molecular mechanism, The 12th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, 2015 年 5 月 30 日~6 月 1 日、若狭湾エネルギー研究センター (福井県・敦賀市)

Y. Yokota, Bystander cell-killing effect mediated by nitric oxide in normal human fibroblasts depends on irradiation dose but not on radiation quality, 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 5 月 25 日~29 日、京都国際会館 (京都府・京都市)

横田裕一郎、バスタンダー効果の線量応答と分子機構、第 9 回高崎量子応用研究シンポジウム、2014 年 10 月 9 日~10 日、高崎シティギャラリー (群馬県・高崎市)

横田裕一郎、ヒト正常線維芽細胞において一酸化窒素ラジカルが媒介するバスタンダー細胞致死効果は線質に依存しない、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日~3 日、かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

Y. Yokota, Bystander cell-killing effect mediated by nitric oxide in normal human fibroblasts depends in part on irradiation dose but not on radiation quality, The 60th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 2014 年 9 月 21 日~24 日、Las Vegas (USA)

横田裕一郎、重イオンとガンマ線により誘発されるバスタンダー効果の線質依存性と時間依存性の解析、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日~20 日、ホテルクラウンパレス(青森県・青森市)

横田裕一郎、重イオンとガンマ線により誘発されるバスタンダー効果の解析研究：バスタンダー効果は線量に部分的に依存するが線質に依存しない、第 8 回高崎量子応用研究シンポジウム、2013 年 10 月 10 日~11 日、高崎シティギャラリー (群馬県・高崎市)

Y. Yokota, Analysis of bystander effects induced by heavy ions and gamma-rays, The 11th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, 2013 年 10 月 3 日 ~ 4 日, Bordeaux (France)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 裕一郎 (YOKOTA, Yuichiro)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構
原子力科学研究部門 量子ビーム応用
研究センター・研究副主幹

研究者番号：3 0 3 9 1 2 8 8