

I はじめに

膠芽腫患者に対する放射線治療の有効性を示す報告は複数あるが(9,13)、依然満足のいく治療効果は得られていない。それに対する新たな有力な治療手段として、重粒子線が注目を集めた。重粒子線は光子線と比べると、LET が高いのみならず、鋭敏な Bragg peak ionization を生ずる (18,19)。さらに酸素増感率 (Oxygen enhanced ratio: OER) が低いために組織の酸素濃度にかかわらず高い生物学的効果を得ることが可能と考えられた。しかし、米国におけるネオン粒子線を用いた膠芽腫に対する臨床治験においては、当初期待されたほどの効果は得られなかったが、Castro らは “intense radioresistance of glioblastoma” がその原因であると述べている (1,2)。本邦でも 1994 年より放射線総合医学研究所にて重粒子線治療が可能となったが、これまで重粒子線が膠芽腫細胞に及ぼす影響に関する細胞レベルでの基礎的研究は非常に限られていた。

従来、放射線感受性の評価には、従来コロニー形成法による生存曲線による解析が一般的に用いられてきた。この方法は感度が高く再現性もよい優れた方法であるが、照射された細胞の分裂能の有無を評価しているために細胞の生死を直接観察してはいない。その一方、臨床的な放射線治療の効果は一般的に腫瘍の大きさの変化により判断され、治療が有効と判断されるためには、細胞死による腫瘍サイズの減少あるいは消失が必須条件である。そこで本研究ではコロニー形成法による生存率の解析のみならず、細胞死をもう一つの end-point として炭素粒子線の膠芽腫細胞に対する効果を評価するとにした。その際、このような放射線誘発細胞死には細胞周期の変化と p53 遺伝子の関与が示唆されていること(7)、さらに悪性神経膠腫の 50-60 %に p53 の変異が認められることから (16)、本研究では野生型 p53 と変異型 p53 を持つ細胞株を対象として細胞周期の変化を分析することにした。

II 対象及び方法

1) 培養細胞及び培養条件

ヒト悪性神経膠芽腫細胞株 U87MG、A172 (p53 野性株) と TK1 (p53 変異株) 及び髄芽腫細胞株 ONS76 (p53 変異株) を用いた。U87MG、A172 及び ONS76 は American Type Culture Collection より購入した。TK1 は著者らが膠芽腫患者より確立した細胞株で、p53 cDNA の exon 8 に点突然変異があることを確認している(20)。また対照として理化学研究所細胞バンクより入手したヒト線維芽細胞 NB1RGB を用いた。これらの細胞はいずれも 10%牛胎児血清、ストレプトマイシン、ペニシリンをそれぞれ 100 µg/ml、100 U/ml 含む Eagle's minimal essential medium(MEM)で 37°C、5%炭酸ガス培養器の中で NUNC 社製 25 cm² フラスコにて静置培養した。細胞は 3 - 7 日間隔で継代培養を行い、対数増殖期に以下の条件で照射した。

2) 放射線照射

重粒子線照射は放射線医学総合研究所の Heavy Ion Medical Accelerator (HIMAC)によって加速された 290 MeV/u の炭素粒子線を用いた。本研究で使用した LET の範囲は約 10~100keV/µm である。尚、HIMAC 生物照射室における線量および LET 測定の詳細に関してはすでに報告されている(5)。比較実験としてのガンマ線照射は、本学医学 RI 棟ガンマセル(¹³⁷Cs)を用いて行い、線量率は約 1.2Gy/min であった。コロニー形成法による生存率の解析では線量を以下に示す如く変化させたが、色素排除法による細胞死の評価とアポトーシスの検出、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析には、炭素線、ガンマ線とも線量を 10 Gy で一定とした。また、これらの放射線照射はすべて室温 (約 26°C) で行った。

3) コロニー形成法による生存率の解析

コロニー形成法についてはすでに報告されているが (19,21)、即ち、0, 1, 2, 4, 6, 8 Gy の放射線照射直後にトリプシン処理により細胞を 25 cm² 培養フラスコより剥がし、細胞数計数後適当数を 60mm シャーレに播種し約 2 週間培養した。

2週間後コロニーを75%メタノールに溶解した0.5%メチレンブルーにて固定染色し、コロニー計数後生存曲線を作成した。細胞数50個以上のものを生存したコロニーと判定した。未照射でのコロニー数を100%として各Dose pointでのコロニー数を換算して生存曲線を作成した後、それを市販のsoftware (DeltaGraph Pro Ver. 4.0, DeltaPoint, Inc., Monterey CA) を用い linear-quadratic model (LQ model) によりカーブフィットしその後の解析を行った。これらの実験は独立して3回行い、それらの結果を統計処理した。

4) 色素排除法による細胞死の評価

色素排除法は大山らの方法に従って行った(10)。10 Gyの放射線照射後1, 4, 7日目にトリプシン処理にてフラスコに付着している細胞を剥がし培地内の浮遊細胞とともに集め、0.02% erythrosin B/PBSにて染色後、血球計算板を用い総細胞数および染色された細胞数をカウントし、以下の式により Cell Death Index (CDI)を求めた。 $CDI (\%) = \text{染色された細胞数} / \text{総細胞数} \times 100$

5) アポトーシスの検出及び定量化

アポトーシス検出も同様に大山らの方法に準じ(10)、核の形態学的変化から判定した。ヘキスト33342は濃度が1 mMとなるようにPBSにて溶解し、使用まで-20℃にて保存した。放射線照射後1, 4, 7日目に付着細胞をトリプシン処理し培養液中の浮遊細胞とともに遠心して集め、PBSにて2回洗浄後2%グルタルアルデヒドにて一晩以上固定し、固定後最終濃度が0.2 mMとなるようにヘキスト33342を加え、核の形態学的変化を蛍光顕微鏡にて観察した。蛍光顕微鏡下で数視野の総細胞数及びアポトーシスを起こした細胞数を数え、以下の式により Apoptotic Index (AI: %)を算出、グラフ化した。 $AI (\%) = \text{アポトーシス細胞数} / \text{総細胞数} \times 100$

6) フローサイトメトリー

放射線照射後各検体を12 - 14時間培養した後、細胞を75%エタノールにて

16 - 18 時間 4℃ で固定した。固定後 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロピジウムイオジン (PI) にて 30 分以上染色し、Becton & Dickinson 社製の FACS Calibur を用いて細胞周期の解析を行った。各細胞周期の分布率は ModFit LT software (B&D) にて算出した。また、放射線照射後 1, 4, 7 日目に付着細胞をトリプシン処理し培養液中の浮遊細胞とともに遠心して集め、同様に固定後細胞周期を解析し、細胞死を表す sub-G1 peak を定量化した。

7) ウェスタンブロット

放射線照射前及び照射後 1, 4, 7 日目に付着細胞をトリプシン処理し培養液中の浮遊細胞とともに遠心し、細胞融解バッファー (50mM Tris pH8.0, 120mM NaCl, 0.5% NP40 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phenylmethanesulfonyl fluoride) を加えマイクロチューブに集め 4℃ にて 15 分間振盪融解後、12000G にて 4℃ で 10 分間遠心し蛋白抽出液を得た。これを別のチューブに移し Bradford assay にて蛋白質量の定量を行った。各細胞株あたり 50 μg のタンパク質を 10% SDS-PAGE にて分離し、ニトロセルロース膜に転移した。転移終了後ニトロセルロース膜を 4% スキムミルクを含む 0.1% Tween 20, Tris- buffered saline (TTBS) を用い、室温で 2 時間ブロッキングし、その後 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の 1 次抗体 (p53, p21) と 4℃ にて一晩反応させた。ニトロセルロース膜は室温で 15 分 x 4 回 TTBS にて洗浄後、室温で 2.5 時間 50 ng/ml の濃度の 2 次抗体と反応させて再び同様に洗浄した。最後のシグナルの検出には ECL detection kit (Amersham) を用いた。

III 結果

1) コロニー形成法による生存曲線の解析

コロニー形成法により算出した全ての生存曲線を図 - 1 に示した。各細胞の生存曲線を linear-quadratic (L-Q) model で解析すると、 γ 線に対しては一般に p53 野生株は変異株より感受性が高かったが、炭素粒子線を用いて LET を上げてゆくと生存曲線は次第に近似し、約 80 keV/ μm でもっとも接近した後、105

keV/ μm になるとやや差が拡大した。10 % 生存率におけるガンマ線に対する relative biological effectiveness (RBE)の変化を図 - 2A に示した。81 keV/ μm における RBE は p53 変異株で約 3.2、野生株で約 2.3 となり、p53 の変異を持つ抵抗性株の方が野生株より有意に高くなることが明らかになった。また、各細胞の生存曲線の曲線成分も約 80 keV/ μm では最も少なくなつて直線に近づき、曲線の“曲がり具合”を示す α/β 値は最も高値を示した (図 - 2B)。

2) 細胞周期の変化

炭素粒子線照射 12 時間後の各細胞の DNA histogram を図 - 3 に示した。その結果、p53 野生株ではガンマ線と 20 keV/ μm 炭素粒子線照射後には S 期が消失して G1 block が認められたが、さらに LET が高くなるとこの現象は認められなくなった。それに対して G2 block は全ての細胞に認められ、LET が上昇するにつれて強く出現した。特に p53 変異株においては照射後 G1 block は起きないが、極めて著しい G2 block が線量依存性に生じることが示された。

3) 色素排除法による細胞死の解析

まず p53 野生株である U87MG と変異株である TK-1 を用いて色素排除法による死細胞の割合 (cell death index : CDI) を出してみると CDI は照射後 7 日まで経時的に LET 依存性に増加した。照射後 7 日目に CDI を非照射細胞と比較すると、U87MG では γ 線照射では約 2 倍であったが、20, 40, 80 keV/ μm の炭素粒子線照射ではそれぞれ約 3 倍、4 倍、5 倍と増加した (図 - 4)。ガンマ線に対し高感受性を示す U87MG は、抵抗株である TK1 よりも全体に約 10% 程度大きな CDI を示し、コロニー形成法の結果と一致した。

4) アポトーシスの解析

図 - 5 にアポトーシスの出現率 : AI の結果を示したが、ガンマ線照射群では照射後 7 日目まで観察してもアポトーシス細胞はほとんど認められなかった。それに対して、炭素粒子線照射では 4 日あるいは 7 日目にアポトーシス細胞の

増加が認められ、U87MG で 5~7 %、TK-1 では 3~4%のアポトーシスが観察された。両細胞株において AI は LET 80 keV/ μ m 照射 7 日後に最高値を示し、その値は A172 では 8 %、TK1 では 4.5 %であった。

5) フローサイトメトリーによる細胞死

DNA ヒストグラムでは、これらの細胞に 4 日目から sub-G1 に細胞死を示すピークが出現し始め、7 日目まで経時的に増加したが、明らかな LET 依存性は認められなかった。この sub-G1 ピークの大きさは p53 野生株である U87MG の方が、変異株の TK-1 よりも大きくなり、線維芽細胞である NB1RGB では最も小さかった(図-6)。さらに TK-1 では照射後 10 日目でも G2 block が著明に残っており、G1 peak は低くなったままであるが、U87MG では G1 block が回復し S 期が出現すると共に細胞死を示す sub-G1 peak が増加してくることがわかった(図-7)。

6) ウェスタンブロット

同時期の p53, p21 の発現をウェスタンブロットで経時的に解析すると、変異株である TK-1 では γ 線を含むいずれの LET においても、照射前後ではほぼ一定して変異型 p53 の高発現が認められたが、下流に存在する p21 の発現はほとんど認められなかった(図-8)。それに対して、p53 野生型の u87MG では、照射前の発現は弱く、照射後 1 日目には発現が亢進したが、LET が上昇するにつれてその発現はしだいに減少していく傾向が認められた。同じく U87MG における p21 の発現を見ると、 γ 線照射後には発現が亢進した後、経時的にゆっくりと減少したが、炭素線照射後には LET が上昇するにつれて 4 日目以降の発現は極端に減少した。線維芽細胞である NB1RGB でも照射後に p53 の発現亢進が認められたが、U87MG とは逆に LET が上昇するにつれて発現は逆に長引く傾向になり、p21 の発現も同様な傾向を示した(図-8)。

IV 考察

1) コロニー形成法による生存曲線の解析

膠芽腫細胞の高 LET 粒子線に対する感受性に関する詳細な研究はこれまで極めて少ない。膠芽腫細胞が放射線に対して抵抗性であることはよく知られているが、今回の我々の生存曲線による解析では、同じ膠芽腫細胞でも p53 変異株は野生株よりも γ 線に対して抵抗性であった。しかし、LET が上昇するにしたがって生存曲線の肩は消失して細胞間の感受性の差は減少し、約 80 keV/ μ m で最も近似した。この現象は、低い LET では各細胞全体としての修復能の違いが、はっきり現れていたが、LET が高くなるにつれて差がなくなったためと解釈できる。もちろん DNA 修復の全てを p53 のみで説明できるわけではないが、LET が上昇するにつれて少なくとも p53 の機能の有無は感受性にさほど関係しなくなるという可能性が示唆された。また、生存曲線を L-Q model にてカーブフィットし解析してみると、いわゆる“曲線の曲がり具合”にも同様な傾向があり、最も直線に近くなる 80 keV/ μ m で、最も修復が起き難くなっていることを示している。さらに、ガンマ線抵抗性株において RBE がより高値となったことも同様の現象と考えられる。

2) 細胞周期の変化

照射後の細胞周期の解析で高 LET の影響がはっきり出たのが腫瘍細胞における G1 block の消失と、著しい G2 block の出現である。LET が低いと p53 野生株は p21 の働きによって G1 block を起こすことは良く知られている。今回の実験結果から特に p53 野生型の腫瘍細胞株でも LET が上昇すると G1 block が起きにくくなることが示された。このことは U87MG のウェスタンブロットの結果、1日目には p53 とその下流にある p21 の発現上昇があったが、4日目以降では p21 の発現は減少してしまったことと合致する。しかし、興味深いのは同じ p53 野生株でも正常線維芽細胞ではいつまでも p21 は発現して、DNA histogram でも G1 block が起きていたことである。腫瘍細胞と線維芽細胞では同じ p53 野生型でも反応に違いがある可能性を示唆する結果といえる。一方、高 LET 照射後に強い G2 block が起きることは Lucke-Huhle らが既に報告しており、その程度も

LET 依存性であると述べている(8)。今回、膠芽腫細胞でも LET が上昇すると G2-M のピークも大きくなり、特に、p53 変異株では極めて著しい G2 block が出現することがわかった。p53 は G1 における check point であるが、Pellagata らは、G1 期で停止した細胞は G2 には止まらず、G1 で停止しなかった細胞が G2 に止まることを報告している(11)。そうすると、p53 野生株で、G1 block が起きている細胞では逆に G2 block は起きにくくなり、p53 変異株で G1 block が起きないと細胞の多くは G2 に停止してしまうことになる。我々の観察でも正常線維芽細胞株では LET が上昇しても p21 が発現した結果 G1 block が持続して G2-M のピークはそれほど大きくならなかったが、同じ p53 野生型でも腫瘍細胞では G1 block が消失するとともに G2 block が強く起きており反応が異なった。それに比べて、もともと G1 block が起きない p53 変異株ではいきなり著しい G2 block が起きている。G2 block のメカニズムはいまだに不明な点が多いが、DNA 修復と放射線感受性に大きくかかわっていると考えられる。

3) 細胞死の解析

腫瘍細胞の放射線感受性の評価にはコロニー形成能による増殖死を end-point とする評価法とともに、冒頭で述べた如く直接の細胞死を end-point とする評価法が臨床的にも重要であるが、その際、細胞死をどの方法でモニターするかが問題となる。erythrosine-B を用いた色素排除法は細胞死に伴う細胞膜の変化を見る方法で、比較的早期の細胞死を検出できるとされている(12)。この方法で見ると、高 LET 炭素粒子線は γ 線よりも効率的かつ LET 依存性に膠芽腫細胞に細胞死を誘導していることがわかり、増殖死を end-point とした場合と同様に p53 野生株は変異株に比べて高い値を示した。一方、flow-cytometry では細胞死の結果、断片化した DNA を検出しているので、細胞死のプロセスから考えると先の色素排除法に比べて細胞死増加の立ち上がりは遅くなることは理解できるが、経時的にまたほぼ LET 依存性に増加している点は同様である。このように細胞死を定量化するには一つの方法のみでは不十分で、複数の方法で評価する必要がある。

4) アポトーシスの解析

膠芽腫細胞における高 LET 放射線照射と放射線誘発アポトーシスに関する研究は非常に限られている(17, 21)。放射線誘発アポトーシスは、胸腺細胞などの血液系細胞においては、エックス線照射後数時間以内に生じることが知られている(22)が、14 種類の神経膠腫細胞を用いた Stapper らは、ガンマ線照射後 30 時間以内には、アポトーシスは全く認められなかったと報告した(14)。本研究ではアポトーシスを起こした細胞の核を蛍光色素で染色して形態系的に観察したが、やはり Stapper らの報告(17)と同様にガンマ線照射後ではアポトーシスは認められなかった。それに対して、炭素粒子線照射後にはアポトーシスを起こした細胞が出現し経時的に増加したが、全細胞死の 13~17%程度にとどまった。ただし、この方法では、明らかにアポトーシスに陥った細胞のみを数えていることから考えると、実際のアポトーシスはさらに高率に起きている可能性が高い。p53 は、放射線照射などによる DNA 損傷後に誘発されるアポトーシスにおいて重要な役割を担っている(6, 7)。本研究でも、炭素線照射後 p53 変異株である TK1 よりも p53 野生株である A172 の方が AI は高かったが、変異株においてもかなり増加していた。またウェスタンブロットの結果、野生型の腫瘍細胞株では LET が上昇すると逆に p53 と p21 の発現は減少してしまうことも明らかとなった。近年 p53 非依存性のアポトーシスの存在が報告されているが(3, 4, 15)、以上の結果から考えると、高 LET の照射においても p53 を介さない経路でアポトーシスが起きている可能性が高い。さらに、フローサイトメトリーの結果も総合すると、膠芽腫においては、胸腺細胞などに起きるような間期死が短期に生じることが極めて少なく、高 LET 炭素粒子線照射後には主として G2-block によって細胞回転が著しく遅れたのちに、細胞周期の回復とともにゆっくりと遅延型細胞死が出現していると考えられる。

V 結論

以上をまとめると、以下の通りになる。

- 1) 炭素粒子線は γ 線よりも膠芽腫細胞に対する細胞傷害性が高く、LET が約 80 keV/ μm で RBE は最大となり、 γ 線抵抗性の高い p53 変異株のほうが炭素粒子線の γ 線に対する RBE は高くなる。
- 2) 膠芽腫細胞株では炭素粒子線照射後の G2 block は p53 変異株で強く出現し、LET が上昇するにつれて増大するが、細胞回転の回復に伴い遅延型の細胞死が起きている。
- 3) 膠芽腫細胞では、炭素線照射後のみにアポトーシスが出現するが、全体の細胞死に対するアポトーシスの割合はほぼ 13~17%で、この値は p53 野生株の方が変異株よりも若干多い値を示す。さらにこのアポトーシスは p53 を介さないで起きている可能性が高い。
- 4) 炭素粒子線照射後の p53 と p21 の発現の変化を見ると、p53 野生型の膠芽腫細胞では LET が高くなるにつれて照射後のこれらの発現が減少するが、線維芽細胞では持続する。

膠芽腫に対する放射線療法は現在広く用いられ、延命効果も確認されているが、完治に導くことは不可能といわざるを得ない。今後、高 LET 重粒子線を利用して膠芽腫に対する治療効果を向上させるためには、照射後の膠芽腫細胞における修復酵素や細胞周期関連酵素の動態に関する研究が極めて重要になってくると考えられる。本研究の成果が、膠芽腫患者の予後向上ににささやかながら貢献することを期待している。