

論 文 概 要

○ 論 文 題 目

放射線誘発バイスタンダー効果の異種細胞間応答
および線質依存性に関する研究

○ 指 導 教 員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 熊谷 嘉人 教授

筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻

小林 亜利紗

【目的】

放射線誘発バイスタンダー効果 (Radiation Induced Bystander Effect, RIBE) は、照射された細胞と類似した影響が周囲の非照射細胞に起こる現象である。この RIBE は放射線がん治療によるがん患部への照射においても誘発されることが報告されているが、その機序は不明な点が多い。これまでの RIBE 研究は、単一細胞種のみでの報告が殆どであり、がん細胞とその周囲にいる正常細胞間についての報告はほとんどない。また放射線治療にはさまざまな放射線種が使用されているが、この RIBE に線質依存性があるのかについては未だ定かではない。そこで本研究では、放射線がん治療における細胞種環境・照射条件を *In vitro* で模擬し、照射されたがん患部とその非照射周辺組織における RIBE の機序を明らかにすることとした。具体的には、放射線がん治療における RIBE に注目して、1) 異種細胞間のバイスタンダー応答とその作用機序、ならびに 2) RIBE の線質依存性を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

1) 異種細胞間のバイスタンダー応答とその作用機序については、放射線がん治療における細胞種環境を可能な限り *in vitro* の実験系にて模擬するために肺がん A549 細胞と肺正常 WI-38 細胞が混在する共培養条件と肺がん A549 細胞とそれを親株とする A549-H2BGFP 細胞のがん細胞のみの条件を比較した。そして、がん細胞のみに狙い撃ち照射を実施するために、陽子線マイクロビーム細胞照射装置を用いた。照射細胞および周辺のバイスタンダー細胞に誘発された DNA 二本鎖切断 (DSB) をヒストンタンパク質 H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) を測定し、RIBE と照射されたがん細胞への逆 RIBE ならびに RIBE 因子の培地介在性情報伝達 (MMIC) ならびにギャップ結合細胞間情報伝達 (GJIC) について検討した。

2) RIBE の線質依存性については、放射線の直接作用 (D) と間接作用 (ID) の D/ID 比に着目した。低 LET 放射線である硬 X 線は D/ID=0.5 程度であるのに対して、培養液の間接作用の主要因である \cdot OH を、チオ尿を添加することによって削減し、D/ID 比が約 0.9 と高い放射線を模擬し、RIBE の線質依存性の有無の証明を試みた。A549 細胞を用いて、照射細胞における RIBE 因子産生およびその因子の伝播、さらには、バイスタンダー細胞の応答を、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の誘導ならびに COX-2 を介して産生されるプロスタグランジン E2 (PGE2) 量を指標に評価した。

【結果】

1) 異種細胞間のバイスタンダー応答とその作用機序
がん細胞のみの条件のバイスタンダーがん細胞の γ -H2AX レベルは、照射の 24 時間後に減少する前に 8 時間で最大を示した。同様に、共培養条件におけるバイスタンダー正常細胞は、8 時間からコントロールに対して有意に高い値を示し、その後同様のレベルを照射後 24 時間まで維持した。これは異なる細胞種における応答の違いであると考えられた。しかし、共培養条件のバイスタンダーがん細胞は、がん細胞のみ条件

とは異なる応答を示した。それは、共培養条件のバイスタンダー正常細胞に類似していた。共培養条件の GJIC を阻害すると、バイスタンダーがん細胞の γ -H2AX 誘発を抑制されなかった。しかし、正常細胞の γ -H2AX レベルは照射 24 時間後において有意に抑制された。一方で、照射がん細胞の γ -H2AX レベルは照射 1 時間後から 24 時間後にかけて減少するが、がん細胞のみの条件と比較して、共培養条件の方が早く、また、これは GJIC の阻害によって抑制された。

2) RIBE の線質依存性については、高 D/ID 条件における照射細胞の PGE2 産生ならびに COX-2 発現が低 D/ID 条件に比べて抑制され、またその上流の Erk, Akt のリン酸化も同様に抑制された。高 D/ID 条件のバイスタンダー細胞は、低 D/ID 条件に比べて COX-2 上流の ERK は同レベルに活性化したのに対して、Akt は抑制されていたにもかかわらず、同レベルの COX-2 発現を示した。このことから高 D/ID 条件のバイスタンダー細胞の COX-2 発現には、低 D/ID 条件とは異なる RIBE 因子・経路が関与していることを示した。そして、マイクロアレイ解析の結果から低・高 D/ID 条件のバイスタンダー細胞において異なる転写因子が COX-2 の発現に関与しており、低 D/ID 条件では、CREB および STAT5A, 高 D/ID 条件では NF- κ B および FOXJ2 が候補として挙げられた。そのうちバイスタンダー細胞の NF- κ B の活性化因子として、照射細胞のマイクロアレイ解析結果より、CD40LG, TNSF11, TNSF14, TGF- β などが候補として挙げられた。そして、バイスタンダー細胞において NF- κ B の活性化は、高 D/ID 条件の方が低 D/ID 条件より有意に高いことを確認した。

【考察】

異種細胞間（がん細胞と正常細胞間）の GJIC を阻害すると初期の γ -H2AX 誘発量はバイスタンダー細胞に増加した。つまり、GJIC はバイスタンダー細胞の DSB 修復経路の活性化に関与することを初めて示した。さらに、照射されたがん細胞の DSB 修復は正常細胞との GJIC 阻害によって修復速度が低下した。つまり、バイスタンダー正常細胞との GJIC が照射されたがん細胞の DSB 修復経路の活性化に関与すると考えられる。すなわち、異種細胞間の GJIC は照射細胞、バイスタンダー細胞両方の放射線感受性を変化することを示唆した。また、バイスタンダー応答として誘導される COX-2 の発現経路には線質依存性があることを示唆した。高 D/ID 照射条件でのバイスタンダー細胞の COX-2 発現経路は、低 D/ID 条件と比較して明らかに異なる経路を介しており、D/ID 比に依存する転写因子の一つとして NF- κ B を突き止めた。以上のことから RIBE は、細胞種環境ならびに線質のパラメータの一つである D/ID 比の双方によって伝搬する因子および応答経路が異なることを本研究で明らかにした。

【結論】

本研究では、放射線がん治療における細胞種環境・照射条件を *in vitro* で模擬し、照射されるがん患部とその非照射周辺組織における RIBE の機序を明らかにすることができた。それは、1) 異種細胞間のバイスタンダー応答については、がん細胞の放射

線感受性は周囲の正常細胞によって変化することを示した。そして、2) RIBE の線質依存性については、RIBE 因子ならびに経路は線質に応じて変わること示唆した。これらの知見は、生体へのリスクの観点から RIBE が治療において無視できないことを強く示唆している。しかし、照射がん細胞から産生されるいくつかの RIBE 因子はある種のがん細胞の増殖抑制効果があるという報告がある。そこで、RIBE の細胞種環境や照射条件 (線質) に対するパラメータを構築することができれば、細胞環境やがんの種類によって放射線の種類を変えることで放射線がん治療の効果を最大化する RIBE の選択が可能となるとともに、放射線効果との相乗効果が期待できる。本研究は、がんへの殺傷能力や放射線の集中性に重きを置いて選択していた放射線がん治療に対し、生体応答を活用した新たな放射線がん治療展開への可能性を示した。