

氏名	小林 亜利紗		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9170 号		
学位授与年月	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	医学博士	坪井 康次
副査	筑波大学教授	工学博士	榮 武二
副査	筑波大学講師	博士（医学）	小島 崇宏
副査	筑波大学助教	博士（医学）	渡邊 幸秀

#### 論文の内容の要旨

小林亜利紗氏の博士学位論文は、がん細胞と正常細胞における放射線誘発バイスタンダー効果を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

##### （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。著者は、放射線がん治療で照射されたがん組織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ために、1) 異種細胞間での RIBE の機序、2) RIBE の線質依存性、の 2 点を明らかにすることを目的としている。

##### （方法）

1) 異種細胞間での RIBE を検討するために、著者は、肺がん細胞株 A549 細胞と肺正常細胞 WI-38 を共培養した状態と、A549 細胞（肺がん）とそれを親株とする A549-H2BGFP 細胞のみで培養した状態で陽子線マイクロビームを用いてがん細胞のみに陽子線を照射し、RIBE を比較している。また、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  $\gamma$ -H2AX にて測定し、RIBE 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）について検討している。2) RIBE の線質依存性を検討するために、著者は硬 X 線を使用している。培地に何も添加しない状態では、X 線の直接作用（D）と間接作用（ID）の比 D/ID は 0.5 程度であるが、チオ尿でラジカルの生成を抑制することで D/ID 比を約 0.9 に上昇させて、A549 細胞（肺がん）における RIBE を比較している。また、照射細胞における RIBE のメカニズム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）量を指標に評価している。

##### （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

著者は、がん細胞のみの培養では、バイスタンダーがん細胞の  $\gamma$ -H2AX レベルは 8 時間で最大となり 24 時間後に減少することを示した。それに対し、がん細胞と正常細胞の共培養条件においては、バイスタンダー正常細胞の  $\gamma$ -H2AX レベルは、8 時間からがん細胞のみの培養に比べて有意に高くなり、照射

後 24 時間まで持続することを明らかにした。また共培養条件で GJIC を阻害すると、バイスタンダーがん細胞の  $\gamma$ -H2AX 誘発を抑制されなかったが、正常細胞の  $\gamma$ -H2AX レベルは照射 24 時間後において有意に抑制されていた。さらに、照射がん細胞の  $\gamma$ -H2AX レベルも GJIC の阻害によって抑制されることを示した。

## 2) RIBE の線質依存性

著者は、照射細胞の PGE2 産生ならびに COX-2 発現は低 D/ID に比べて高 D/ID で抑制され、その上流の Erk, Akt のリン酸化も同様に抑制されることを示し、さらに、バイスタンダー細胞の COX-2 発現には高 D/ID と低 D/ID での異なる RIBE 因子・経路が関与していることを明らかにしている。また、マイクロアレイ解析から、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- $\kappa$ B および FOXJ2 を候補として挙げている。さらに、著者は、照射細胞のマイクロアレイ解析から、バイスタンダー細胞の NF- $\kappa$ B の活性化因子として CD40LG, TNSF11, TNSF14, TGF- $\beta$  などを候補として挙げ、NF- $\kappa$ B の活性化が高 D/ID の方が低 D/ID より有意に高くなることを示している。

### (考察、結論)

著者はまず、1) 異種細胞間の RIBE においては、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、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を明らかにしている。さらに、3) バイスタンダー細胞の DSB 修復経路の活性化には GJIC が関与し、異種細胞間の GJIC は、照射細胞とバイスタンダー細胞両方の放射線感受性を変化させること、4) RIBE により誘導される COX-2 の発現経路は放射線の D/ID 比に依存し、それには NF- $\kappa$ B が転写因子として関与していることを明らかにしている。

以上から著者は、がん放射線治療において RIBE が正常組織に対するリスクとして無視できない可能性を明らかにするとともに、細胞環境やがんの種類によって放射線治療の効果を最適化する RIBE の選択が可能になれば、相乗効果が期待でき、生体応答を活用した新たながん放射線療法の開発につながる可能性も示している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

放射線誘発バイスタンダー効果は、放射線の“Non-targeted effect”の1つとして知られており、1992年に Hatsumi Nagasawa らが発見した現象である。がん放射線治療において、この効果はがんの制御には有利であるが、同時に正常組織へのリスクとなり得ると考えられている。そのメカニズムとしては、これまで細胞間接着装置である Gap junction と、一酸化窒素、活性酸素などが細胞間の液性のシグナル分子として関与することが示されてきたが、その詳細は不明であった。著者は、異種細胞間のバイスタンダー応答の解析により、がん細胞に対するその効果が周囲の正常細胞によって変化する事と、Gap junction を介した経路がバイスタンダー細胞の DNA 修復経路の活性化に関与する事を初めて示した点が高く評価できる。さらに著者は、放射線の種類によってもこの効果の経路が異なる可能性を示し、それには COX-2 の発現と NF- $\kappa$ B の活性化が深く関与していることを示している点も新規性があり高く評価できる。

平成 31 年 1 月 15 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。