

第3章 カフェインの放射線増感作用

3-1 はじめに

カフェインの放射線増感作用に関しては多数の研究報告がある。その作用機序としては、潜在的致死効果の増強 (Beetham and Tolmach, 1984)、放射線照射後生じる G2/M block の解除 (これには p34^{cdc2} の関与が示唆されている)(Bernhard et al., 1996; Barratt et al., 1998)などが考えられている。またカフェインは放射線照射後のアポトーシスを誘導するとの報告もある (Bernhard et al., 1996)。しかし、膠芽腫細胞に対するこれらの作用に関してはほとんど研究されていない。そこで膠芽腫細胞に対してもカフェインが放射線増感作用を示すのか、そしてこれにアポトーシスがどのように関与するのかにつき、放射線照射及びカフェイン添加後の細胞周期の変化を flow cytometry で解析し、またアポトーシスの評価は、アポトーシス細胞に特徴的とされる DNA 断片化の検出によって試みた。

3-2 材料及び方法

3-2-1 培養細胞及び培養条件

本研究ではヒト神経膠芽腫細胞の p53 野性株 A172 と p53 変異株 TK1 と U251 を用いた。使用した培地と培養方法、ガンマ線照射法は第2章と同様である。

3-2-2 カフェイン処理、放射線照射及びコロニー形成法

カフェインは濃度が 100 mM となるように超純水に溶解し、使用まで-20℃にて冷凍保存した。MEM 5 ml の入った 25cm² 培養フラスコに 1x10⁵個の細胞を播種し、40~48 時間後にガンマ線照射を行った。用いた線量は 10 Gy 一回照射であった。放射線照射直後にトリプシン処理により細胞を培養フラスコより剥がし、細胞数カウント後適当数を 60 mm 培養皿に播種しカフェインを 5 mM 含む培地にて 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。

3-2-3 色素排除法による細胞死の定量

30 Gy 一回照射後培地に最終濃度が 5m M となるようカフェインを添加して 3 日及び 7 日後に第 2 章と同様の方法で CDI を求めた。

3-2-4 Flow cytometry による細胞周期の解析

放射線照射及びカフェイン添加後各検体を 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 µg/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 を用い細胞周期の解析を行った。

3-2-5 ヘキスト 33342 を用いた蛍光染色による核の形態学的観察

放射線照射及びカフェイン添加後 3, 7 日目に第 2 章と同様の方法で核の形態学的観察を行った。

3-2-6 アガロースゲル電気泳動法による DNA 断片化の検出

アガロースゲル電気泳動法による DNA 断片化の検出は大山らの方法に準じて行った (大山ら, 1997b)。10 Gy のガンマ線照射およびカフェイン処理後 3 日および 7 日目に細胞を細胞溶解バッファー(10mM Tris-HCl pH=7.4, 10mM EDTA pH=8.0, 0.5% Triton X-100)にて溶解し (4℃、10 分間)、15000 G にて 20 分間遠心した後上清を別のチューブに移し、1 mg/ml RNase A (最終濃度 0.4 mg/ml)を加え、37℃1 時間静置した。その後 5 M NaCl およびイソプロパノール (最終濃度 50%)を加え-20℃にて一晩静置し、15000 G にて 15 分間遠心後ペレットを TE buffer (10mM Tris-HCl pH=7.4, 1mM EDTA pH=8.0)に溶解し 0.5 µg/ml エチジウムブロマイドを含む 1.5 %アガロースゲルにて電気泳動を行った。泳動終了後 UV transilluminator 及びポラロイドカメラを用いて泳動像を写真撮影した。

3-3 結果

コロニー形成法の結果を図 5 に示す。すべての細胞株に対してカフェインは放射線増感作用を示したが、この傾向は p53 変異株 TK1, U251 に顕著に認められた。色素排除法においても同様の傾向がみられた (図 6)。

ガンマ線照射後あるいは更にカフェイン添加後の細胞周期の変化については、p53 野性株 A172 はガンマ線照射後 G1 block を生じ、カフェインを添加してもこれに顕著な変化を認めなかった。これに対し p53 変異株 TK1, U251MG は放射線照射後 S-block および G2/M-block を生じ、カフェインを加えることによりこれらが解除された (図 7)。

細胞の核の形態学的変化に関しては、アポトーシスに特徴的とされるクロマチンの凝縮及び核の断片化は、放射線照射後カフェインを添加されたものにより多く認められた (図 8)。DNA 断片化の一つの指標として本研究では更にアガロースゲルによる電気泳動法を用いたが、それでもやはり放射線照射後カフェインを添加されたものにより鮮明な DNA ladder が認められた (図 9)。

3-4 考察

放射線照射前あるいは照射直後に培地にカフェインを添加すると、放射線の殺細胞効果が増加する、つまりカフェインが放射線増感作用を示すということは様々な種類の細胞株を用いた研究で報告されている。しかしその機序に関しては今なお不明である (Beetham et al., 1984; Beetham and Tolmach, 1986)。カフェイン添加により放射線照射後の S-block あるいは G2-block が解除され、このため G2 checkpoint にて起こるべき DNA 損傷修復が正常に行われず、そのため放射線の殺細胞効果が増強する、というのが一般的に考えられている仮説である (Busse et al., 1978; Palayoor et al. 1995; Rowley et al., 1984)。この G2-block 解除の機序に関しては、カフェインが G2 期から M 期へ細胞周期を進行させるのに重要な働きを持つ p34^{cdc2} を活性化するという現象があり (Bernhard et al., 1996; Barratt et al., 1998)、さらに近年、カフェインさらに上流の G2 期制御タンパクである ATM を直接抑制するとの報告もある (Sarkaria et al., 1999)。

本研究では、ガンマ線照射量として 30 Gy 一回照射という、大量の線量を用いた。このため、照射 12~14 時間後の DNA histogram では、特に p53 変異株である TK1、U251MG において S 期での細胞周期停止が認められた。これらはともにカフェイン 5 mM を添加すると解除されたが、コロニー形成法および色素排除法の結果、ガンマ線照射+カフェイン添加群でより強い殺細胞効果が認められたことは、やはりガンマ線照射後の S-あるいは G2- checkpoint の解除と細胞死誘発には何らかの関係があることを強く示唆している。放射線照射後の G2 block の程度と細胞の放射線感受性には相関があるとの報告もあり (Nagasawa et al., 1994)、今後 G2-block の機序が解明されれば放射線治療効果の向上に貢献しうるものと期待される。

カフェイン添加によるアポトーシスの誘導は p53 変異株においても認められた。前章でも述べたごとく、神経膠腫は一般的に放射線照射後早期にはアポトーシスを起こしにくいとされている (Stapper et al., 1995)。しかし、今回の結果から放射線照射後数日単位で観察することにより、膠芽腫細胞にもアポトーシスが検出しうることを示された。胸腺細胞などでみられる放射線照射後数時間以内のアポトーシス発現とは異なり、膠芽腫細胞では、いわゆる増殖死型アポトーシスの関与があることが強く示唆された。本実験で用いたカフェインの濃度は臨床用量よりも高く、このまま臨床応用はできない。しかし、カフェインによるガンマ線の殺細胞効果増強の機序が明らかになれば、投与方法や投与方法の工夫により通常の放射線治療に用いられているエックス線やガンマ線の効果を高められることが期待される。