『戦略活用プログラム課題利用報告書』

【課題番号】2005B0825
【課題名】シンクロトロン放射光誘発バイスタンダー効果のメカニズム解明
【研究責任者】独立行政法人　放射線医学総合研究所　鈴木雅雄
【ビームライン】BL28B2

【目的】放射線によるがん治療、特に高 LET 放射線である重粒子線のがん治療で考慮すべき重要な因子の一つは、標的とする容積に対する不均一・低密度照射であることと考える。一般的に実際のがん治療においては、がん病巣の標的容積に含まれる総細胞数に対して数 Gy の重粒子線照射は低密度な照射、すなわち重粒子線の直接のヒットを受けない細胞が相当数存在している可能性を否定できない。そのような重粒子線の低密度照射条件下で考慮すべき生物効果が、バイスタンダー効果である。腫瘍の周辺部分を含んだ正常細胞と腫瘍細胞が混在した中で、放射線が直接照射された細胞と照射されていない細胞が混在する細胞集団に対する放射線照射効果を正確に把握することは、重粒子線がん治療のより一層の効率化にとって必要不可欠のことであり、その鍵を握っているメカニズムの一つが放射線誘発バイスタンダー効果である。放射線誘発バイスタンダー効果は、近年原子核の崩壊に伴う低エネルギーのα線低密度照射実験や粒子放射線マイクロビーム照射実験によって、直接粒子線のヒットを受けた細胞がそのストレスに対して“一次的”な応答をした結果、その近傍にある直接粒子線のヒットを受けていない細胞に何らかのメカニズムによって“二次的”な応答が生じ、細胞集団として放射線生物作用を修飾する、とする生物効果として定義づけられ、注目を集めている現象である。この現象は、重粒子線を含んだ高 LET 放射線の生物影響研究における細胞レベル・分子レベルでの生物応答のメカニズム解明に対して重要な鍵を握るものであると考えられるが、その詳細はほとんどわかっていない。

現在放射光の臨床応用として最も近年注目されている Microbeam Radiation Therapy (MRT)は、50-120keV の白色Ｘ線を 200 ミクロン程度の間隔に並んだ幅 20 ミクロン程度のスリット状のコリメータを通してがん組織に照射する方法である。その特徴はがん細胞だけが死滅して、照射の際に電磁波放射線が透過したがん組織前後の正常細胞は損傷を受けないとする報告がなされている（Slatkin *et al.*, *PNAS*,8783-8787,1995）。この現象はさらに別の研究機関で確認され疑う余地はないが、そのメカニズムについてはほとんどわかっていない。しかしながら、スリット状マイクロビーム照射でＸ線を照射された領域と照射されない領域が交互に並ぶ組織内での細胞照射条件から、バイスタンダー効果の関与がメカニズムの一つであることを示唆される。

本課題では、放射光Ｘ線マイクロビームによって生ずる放射線損傷に対する腫瘍組織と正常組織の違い（リカバリーの違い、バイスタンダー効果の違い）を細胞レベル等で明らかにし、生物効果のメカニズムに裏付けされたより効果的な重粒子線がん治療実現のための生物学的基礎データを収集することを当面の目的とする。

【実験方法】放射光が実際にがん治療に応用された場合、体深部にまで到達する高エネルギーの重粒子線とは異なり、体表層部のがんに適応されることが想定できる。そのために、本課題では、実験に用いる細胞として、ヒト皮膚由来の正常細胞とヒトメラノーマ由来のがん細胞株を用いることとした。具体的には、ともに細胞バンクで一般に提供されている細胞で、皮膚由来の正常細胞は理研細胞銀行より供給された NB1RGB(Cell No.RCB0523)、メラノーマ由来がん細

胞株はヒューマンサイエンス研究資源バンクより供給されたC32TG(Cell No.JCRB0227)を用いた。いずれの細胞も、10%の牛胎児血清を添加したイーグル minimum essential medium (MEM)を用いて培養した。放射光マイクロビームの照射はBL28B2を利用して行った。白色光をスリット幅2.5μmのコリメータ（スリットピッチ200μm ） によってマイクロビーム化し、細胞培養可能なスライドチャンバー（Nunc 178599）に付着させたコンフルエント状態の細胞に、9.6Gy、96Gyの線量のマイクロビームを照射した。細胞致死効果は、コロニー形成法による細胞の増殖死として検出した。またバイスタンダー効果のメカニズム解明のため、本研究では細胞同士が接触した状態での細胞間情報伝達に注目して、細胞間情報伝達機構のうちのgap junctionの特異的な阻害剤であるγ-isomer of hexachloro-cyclohexane を、照射前24時間から照射中に掛けて細胞に処理して細胞致死効果を検出することによって、バイスタンダー細胞致死誘発効果と細胞間情報伝達機構との関係を調べた。

【得られた結果および考察】平成17年10, 11, 12月の3回のビームタイムにおいて得られた結果を図１（正常細胞）および図２（がん細胞株）に示す。グラフより、

（1） 正常細胞では、細胞間情報伝達を阻害した場合の細胞生存率は、阻害しなかった場合に対して何れの線量においても低い値であった。

（2） 特に、低線量照射（9.6Gy）においては、マイクロビーム照射線量に非照射面積に対する照射面積の比（約10%）を掛けた線量相当を細胞集団に平均化して照射したと仮定したときの細胞生存率（200kV X線）に比べて、細胞間情報伝達を阻害した場合はほぼ同レベルの生存率であったが、細胞間情報伝達を阻害しない場合は約1.4倍高い生存率であった。

（3） 一方がん細胞株では、何れの線量についても正常細胞で観察されたような細胞間情報伝達に依存する細胞生存率の差がなかった。

以上の結果から、正常細胞では、gap junction を介した細胞間情報伝達機構が密接に関連したバイスタンダー効果によって、マイクロビーム照射細胞の細胞内放射線損傷が修復されたことが示唆される。その結果として、全細胞集団の内マイクロビームを照射された約 10%の細胞の生存率がその周囲に存在する約 90%の非照射細胞による何らかの作用によって見かけ上回復する（バイスタンダーレスキュー効果）現象が観察された。一方、がん細胞株では、正常細胞でみられたようなバイスタンダー効果が誘導されなかったことが示唆される。

本研究で、放射光マイクロビームによっても細胞致死効果に対して細胞間情報伝達を介したバイスタンダー効果が誘導されること、その細胞応答が正常細胞とがん細胞とで異なることが明らかになった。特に正常細胞で観察された細胞致死効果に対するバイスタンダーレスキュー効果は、これまで主に粒子放射線マイクロビームを利用した研究で報告されているバイスタンダー効果とは、生物効果として正反対（バイスタンダー効果によって放射線を照射された細胞の周囲に存在する非照射細胞に悪影響が及ぶ）の効果であり、放射光マイクロビームで観察された新しい知見である。

今後は、がん細胞に対して細胞致死を促すようなバイスタンダー効果を誘導するための薬剤との併用効果、ならびに正常細胞に対してバイスタンダーレスキュー効果を誘導しかつがん細胞に対して細胞致死を促すようなバイスタンダー効果を誘導する照射法を検索し、実際のがん治療に放射光マイクロビームを適応する可能性を探りたい。

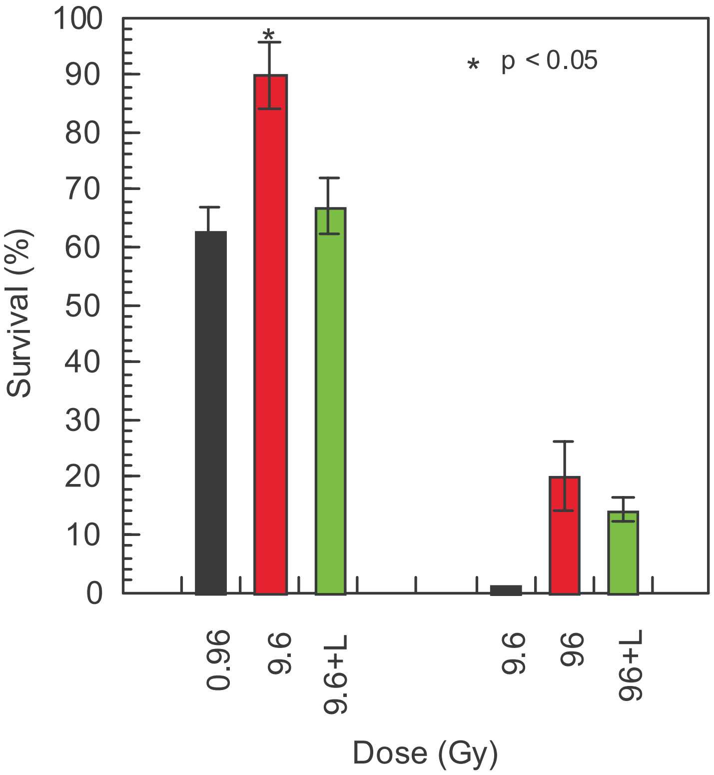

図１．ヒト皮膚由来正常細胞の細胞生存率。赤いグラフは放射光マイクロビームをそれぞれ9.6Gy、96Gy照射したとき、緑のグラフはgap junction を介した細胞間情報伝達を阻害した条件で放射光マイクロビームを照射したときのそれぞれ細胞生存率。黒いグラフは 200kV Ｘ線の細胞致死効果の実験データより、マイクロビーム照射の非照射面積に対する照射面積の比（約10%）を考慮してマイクロビーム照射線量の1/10の線量(0.96Gyと9.6Gy)を細胞集団一律に照射したときの細胞生存率を示す。データは、3回の独立した照射実験の平均値とstandard error を示す（＊ $p < 0.05$ は、細胞間情報伝達を阻害して 9.6Gy 照射したとき(9.6+L)のデータに対して)。

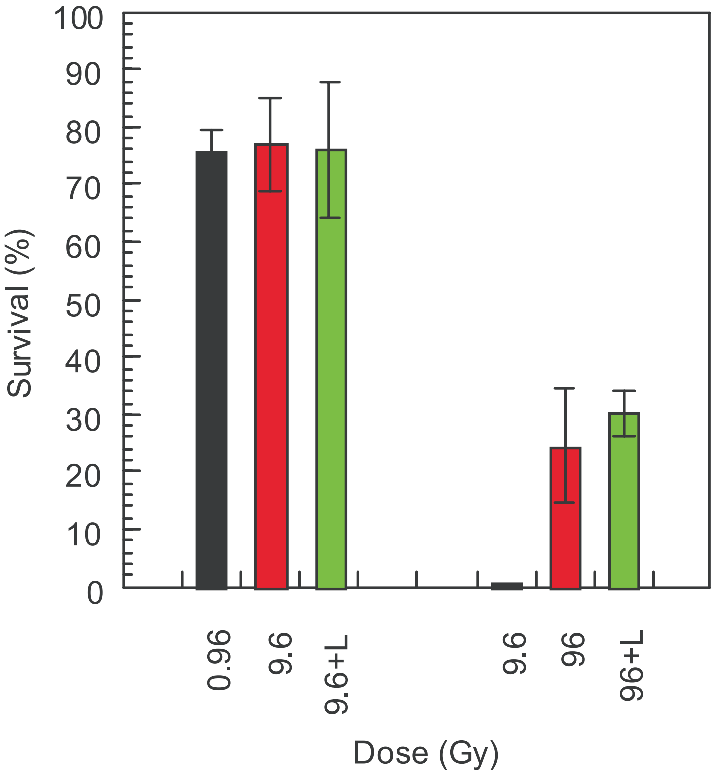

図２．ヒトメラノーマ由来がん細胞株の細胞生存率。シンボルは図１と同様である。