

シンクロトロン放射光スリット状マイクロビームに対する細胞致死からの回復現象と *p53* 遺伝子が関与したバイスタンダー効果との関係
Relationship between cell-killing effect and *p53*-gene-mediated bystander effect in different human cell lines induced by X-ray microbeams.

鈴木雅雄^a、取越正己^a、大野由美子^a、八木直人^b、梅谷啓二^b、菓子野元郎^c

Masao Suzuki^a, Masami Torikoshi^a, Yumiko Ohno^a, Naoto Yagi^b, Keiji Umetani^b, Genro Kashino^c

^a 独立行政法人放射線医学総合研究所重粒子医科学センター、

^b 財団法人高輝度光科学研究センター、^c 京都大学原子炉実験所

^a Research Center for Charged Particle Therapy, National Institute of Radiological Sciences.

^b Japan Synchrotron Radiation Research Institute, ^c Research Reactor Institute, Kyoto University.

BL28B2において、白色X線をタングステンと polyimide filmを積層して作成したコリメーターによってスリット幅2.5 μm (スリットピッチ200 μm) にマイクロビーム化し、ヒト由来の正常細胞およびがん細胞に照射し、その細胞致死効果と致死からの回復を調べた。正常細胞において従来報告されている高Linear Energy Transfer (LET) 粒子放射線マイクロビームを利用して明らかになった生物効果のバイスタンダー効果とは性質の異なる細胞応答が、特に正常細胞で活性化しているギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構の関与によって、スリット状X線マイクロビームを直接照射された細胞の損傷がその周囲に存在している非照射細胞によって修復される (バイスタンダーレスキュー効果) という形で観察された。さらに、観察されたバイスタンダー効果は、がん抑制遺伝子の一つである*p53*遺伝子発現と密接に関係していることが判った。

Recent studies using X-ray microplanar beams generated with synchrotron radiation showed that radiobiological effects between normal and tumor tissue were quite different. This phenomenon has been attractive for a new technique of tumor radiotherapy, but it is still unknown not only biological effect itself but also its mechanism. This year we focused on the difference in the cell-killing effect between *p53*-wild and *p53*-mutated type human cell lines. Cells were irradiated with 25 μm -thin (200 μm beam space) X-ray microplanar beams generated at BL28B2. The results showed that the recovery from the cell-killing effect was occurred in *p53*-wild type cells after 12h of post-irradiation incubation, but no recovery observed in *p53*-mutated type cells. Furthermore, the recovery was suppressed to the same level with the surviving fraction of the *p53*-mutated type cells, when using a specific inhibitor of gap-junction mediated cell-cell communications together. The results suggest that *p53*-mediated cellular responses play an important role of repair process between irradiated and non-irradiated cells with X-ray microplanar beams.

研究の背景および目的：

シンクロトロン放射光の医学利用として現在注目されている Microbeam Radiation Therapy (MRT) は、生物効果比が小さい低LET放射線であるX線をスリット状にマイクロビーム化することで腫瘍を含む周辺領域に大線量を集中照射することが可能となることが特色で、大幅な治療効果の改善が期待で

きる。特に、高LET放射線である重粒子線治療でも難治である脳・中枢神経系腫瘍のように、QOLの観点から生物効果比の大きな重粒子線を腫瘍周辺に大きくマージンを取って照射することが正常組織への影響から難しい症例に対して大幅な治療効果の改善が期待できる。これまでの動物実験から、50-120keVの白色X線を200 μm 程度の間隔に

並んだ幅20 μm 程度のスリット状コリメータを通してがん組織に照射すると、がん細胞だけが死滅してがん組織周辺の正常組織は損傷を受けないとする興味深い現象が報告されている。([1],[2])。一方で、この現象の生物学的メカニズムはほとんどわかっていないが、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の照射条件から、非照射細胞へのバイスタンダー効果の関与を土台とした、照射細胞と非照射細胞のクロストークによる放射線損傷のレスキュー効果やバイスタンダー細胞への致死効果の増強などが発生メカニズムの一つであり、さらにその効果における正常細胞とがん細胞の応答の違いが関与した複雑な機構で生じているものとする。平成19年度SPring-8一般課題で行った我々の研究(課題番号:2007A1092および2007B1365、研究代表者:鈴木雅雄)より、X線スリット状マイクロビームをヒト由来の正常細胞とがん細胞に照射した予備実験から、高LET粒子線マイクロビームを用いた研究で報告されている、放射線照射を受けた細胞から放出されたバイスタンダー因子が周囲の放射線非照射細胞へ間接的に作用し、照射細胞と同様の生物効果を誘導するタイプのバイスタンダー効果とは全く別のタイプの細胞応答が誘導されている可能性を示唆する実験結果を得ている。本研究課題においては、低LET電磁波放射線によって誘導される生物効果のバイスタンダー効果の誘導メカニズムをがん抑制遺伝子*p53*の発現の観点から明らかにすることを目的とし、以下に掲げる三項目に焦点を絞り研究を行った。

1) 複数のヒト正常細胞とがん細胞に対して

X線スリット状マイクロビームの細胞致死効果の線量効果関係を調べ、マイクロビームが照射された細胞の周囲の非照射細胞に波及するの否か(バイスタンダー細胞致死効果)を明らかにする。また、正常細胞とがん細胞の違いを検討する。

2) 接触状態の細胞集団におけるギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構に焦点を当て、バイスタンダー細胞致死効果に対する細胞間情報伝達機構の関与を明らかにする。

3) 細胞致死効果の修復現象を正常細胞とがん細胞に分けて明らかにし、照射細胞と非照射細胞との細胞間情報伝達機構を介したクロストークの観点からそのメカニズムを明らかにする。同時に、がん抑制遺伝子の一つであり低線量放射線細胞応答に関与している*p53*遺伝子との関係を明らかにする。

実験:

細胞は、正常型の*p53*遺伝子を持つヒト由来正常細胞2種類(皮膚と肺由来)と変異型*p53*遺伝子を持つヒト由来がん細胞株2種類(メラノーマと脳腫瘍由来)の合計4種類を用いた。X線スリット状マイクロビームは、SPring-8のBL28B2において、タングステンとpolyimide filmを積層して作成したコリメーターによって白色光をスリット幅2.5 μm (スリットピッチ200 μm)にマイクロビーム化し[3]、スライドチャンバーに付着させたコンフルエント状態の細胞に照射した(Fig. 1)。細胞致死は、コロニー形成法による細胞の増殖死として検出した。照射後直ちにトリプシンを掛けプレートに蒔いた場合と照射後12

時間炭酸ガスインキュベーター内に保持した後にトリプシンを掛けプレートに蒔いた場合との細胞生存率を比較して、致死効果からの回復を評価した。またギャップジャンクションの特異的阻害剤を用いて、細胞致死効果と細胞間情報伝達機構との関係を調べた。

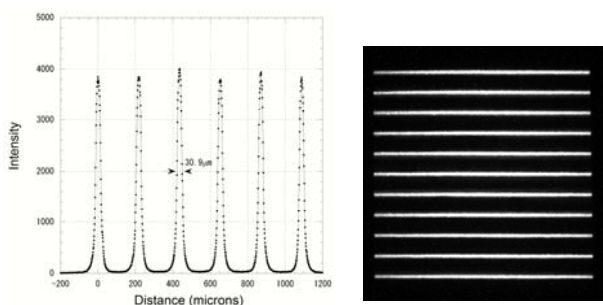


Fig.1 Beam profile of the X-ray microplanar beams generated with synchrotron radiation using the collimator. Data are taken from [3].

結果および考察：

得られた結果を Fig. 2 に示す。X線マイクロビームがスリット状に照射される細胞に 9.6Gy または 10.8Gy の線量を照射した時の細胞集団の生存率は、正常型 *p53* 遺伝子をもった正常細胞について、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用しない場合にのみ照射直後の生存率に対して 12 時間後の生存率が有意に上昇し、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用した場合は直後と 12 時間後で有意な差はなかった。一方、変異型 *p53* 遺伝子を持ったがん細胞は、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用してもしなくても、直後と 12 時間後の生存率に有意な差は現れなかった。

以上の結果から、現段階で以下の結論を導くことが出来る。

1) 動物実験における正常組織と腫瘍組織の X線マイクロビーム感受性の違いは、正常組織特異的に誘導される放射線損傷から

の回復現象に起因するものである。

2) その回復現象の細胞レベルでのメカニズムとして、がん抑制遺伝子 *p53* の活性化による一連の細胞応答の結果として修復機構がより活性化された結果であることが考えられる。

3) この細胞致死効果からの回復現象は、X線を照射されていない細胞（バイスタンダー細胞）がギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構により何らかの因子をやり取りした結果誘導されるバイスタンダー効果（バイスタンダーレスキュー効果）である。

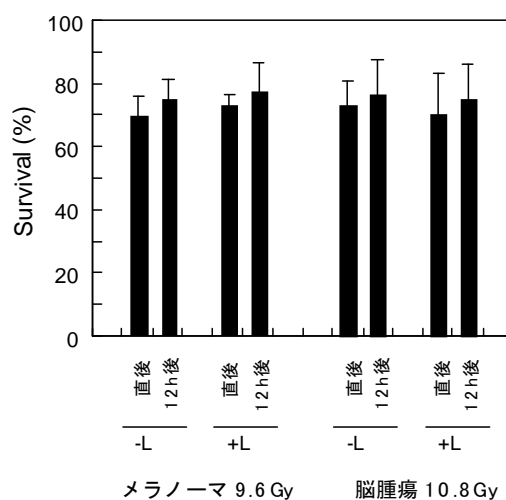
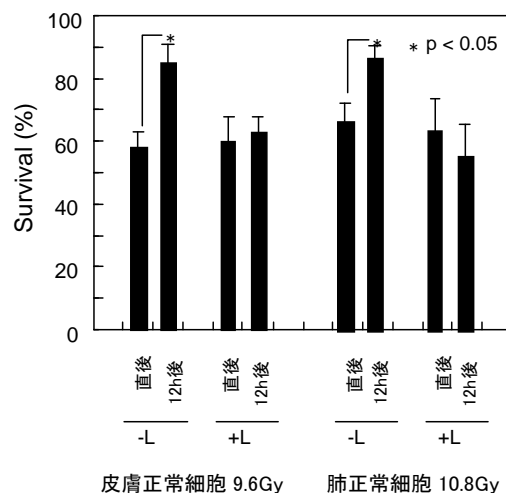


Fig.2 Cell survival assayed either immediately after irradiation or 12h after irradiation with the X-ray microplanar beams. Upper graph shows

the survivals of normal human cells (normal type *p53* gene) and lower graph shows the survivals of human tumor cell lines (mutated type *p53* gene). “+L” means the cells were treated with a specific inhibitor of gap-junction mediated cell-cell communication together.

得られた研究成果から、高 LET 粒子放射線で観察されているような、放射線照射された細胞が周囲の非照射細胞を道連れにして生物効果を修飾するタイプのバイスタンダー応答とは根本的に異なる細胞応答が生じていることが考えられる。

今後の研究課題として、*p53* 遺伝子発現がどの位深くこの現象に関与しているのか（ヒトがん細胞で *p53* 遺伝子が正常型の細胞は、今回得られた正常細胞と同様の挙動を示すのか）？など、X線スリット状マイクロビーム照射による細胞致死効果誘導のメカニズムに対する正常細胞とがん細胞との違いをより詳細に明らかにする必要がある。

参考文献：

- [1] Slatkin *et al.*, *PNAS*, 92, 8783-8787, 1995.
- [2] Laissue *et al.*, *Int.J.Cancer*, 78, 654-660, 1998.
- [3] Ohno *et al.*, *Medical Physics*,35,3252-3258, 2008.

論文発表・特許状況：

SPring-8 BL28B2 で作成したスリット状マイクロビームの物理学的特性に関しては、上記参考文献の[3]として論文発表した。生物効果の実験データに関しては、まだ論文発表を行っていない。

特許に関しては、現段階で取得もしくは申請中のものはない。

キーワードとその説明：

バイスタンダー効果

直接放射線の照射を受けた細胞から二次的・三次的な何等かのメカニズムによってその近傍に存在する非細胞（バイスタンダー細胞）にも同様の影響が生じる現象。その誘導メカニズムとして、(1)ギャップジャンクションによる細胞間情報伝達機構によってバイスタンダー因子が伝達される、(2)照射細胞の呈示するリガンドと非照射細胞の受容体間の相互作用によってバイスタンダー因子が伝達される、(3)照射細胞から分泌されたバイスタンダー因子が非照射細胞に直接作用して私物効果を誘導する、などを支持する実験データが発表されている。

マイクロビーム照射法

粒子放射線や電磁波放射線の照射面積を数ミクロンの領域に絞った放射線照射方法。顕微鏡下で個々の細胞を認識・画像処理して照射を行うことが出来るため、細胞の核のみに限定して放射線を照射したり、細胞質のみに限定して放射線を照射したりすることが可能となる。