

スリット状X線マイクロビームに対する細胞致死効果とその回復現象におけるがん抑制遺伝子 p53 正常型がん細胞と異常型がん細胞の違い

Difference in cell-killing effect and its recovery induced by X-ray microbeams between p53 wild type and mutated type tumor cells.

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

^aResearch Center for Charged Particle Therapy, National Institute of Radiological Sciences, ^bSPRING-8, Japan Synchrotron Radiation Research Institute, ^cResearch Reactor Institute, Kyoto University.

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 μ m (スリットピッチ 200 μ m) のスリット状マイクロビームを、がん抑制遺伝子 p53 のステータスの異なる 6 種類のヒト由来正常細胞およびがん細胞に対して照射し、それに対する細胞致死効果とその回復現象を調べた。正常型 p53 遺伝子を持った細胞は、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に照射直後に対して 12 時間後の生存率が有意に上昇した。しかしながら、変異型 p53 遺伝子を持った細胞は、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 時間後の生存率に差がなかった。以上の結果から、X線スリット状マイクロビームが照射された細胞集団の致死効果からの回復現象は、p53 の遺伝子産物が直接的または間接的に関与した一連の細胞応答の一環として誘導されているバイスタンダー効果が密接に関係していることが示唆される。

Our studies using X-ray microplanar beams clearly showed that the recovery from cell killing was quite different between normal and tumor cells. One possible mechanism might be the bystander effect between irradiated and unirradiated cells by X-ray microplanar beams, however it is still unknown not only biological effect itself but also its mechanism. We focused on the relationship between p53-gene status and bystander response to explain the phenomenon. Two p53-wild type normal human cells, one p53-wild type tumor cell line and three p53-mutated type tumor cell lines were irradiated with 25 μ m-thin (200 μ m beam space) X-ray microplanar beams generated at BL28B2. The results showed that the recovery from cell killing was occurred in the p53-wild cells after 12h of post-irradiation incubation, while no recovery was observed in the p53-mutated cells. Furthermore, the recovery observed in the p53-wild cells was suppressed to the similar level of the cell killing observed in the p53-mutated cells, when using a specific inhibitor of gap-junction mediated cell-cell communications together. Our present results suggest that p53-mediated cellular responses play an important role of repair process between irradiated and unirradiated cells with X-ray microplanar beams.

【研究の背景および目的】

Microbeam Radiation Therapy (MRT)は、現在放射光の臨床応用として最も注目されている利用法である。これまでの実験動物を用いた研究から、その特徴として、50-120keVの白色X線を

200 μ m程度の間隔に並んだ幅20 μ m程度のスリット状のコリメータを通して腫瘍組織に照射すると、がん細胞だけが死滅して、照射の際にX線が透過した腫瘍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である。Slatkinらは、

放射光 X 線を利用してビーム幅 20 μm 、ビーム間隔 200 μm のスリット状の平行平板型ビームを作成し、ラットの脳に照射した。得られた結果からスリット状マイクロビームの照射野内の一回線量 625Gy 以下では全く放射線障害が現れないと報告した[1]。さらに得られた結果を放射線によるがん治療に応用する目的で、ラットの脳腫瘍に対して、ビーム幅 25 μm 、ビーム間隔 100 μm のスリット状マイクロビームを直交 2 方向より 625Gy の一回照射を行い、大幅な延命効果があると報告した[2]。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考えられる。

これまでに SPring-8 一般課題で行った研究（課題番号：2007A1092、2007B1365、2008A1133、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場合、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ような、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非照射細胞に間接的に作用し、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バイスタンダー効果が誘導されている可能性を示唆する実験結果を得た。本研究課題においては、平成 20 年度に行った拡張メディカルバイオ課題研究（課題番号：2008B1980、研究代表者：鈴木雅雄）の研究内容を継続して、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とその誘導メカニズムを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を用い X 線スリット状マイクロビーム照射に対する細胞致死効果を調べ、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致死効果が波及するの否か（バイスタンダー細胞致死効果）を明らかにする。
- 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) 細胞致死効果の回復現象を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、正常型の *p53* 遺伝子を持つヒト由来がん細胞株 1 種類および変異型 *p53* 遺伝子を持つヒト由来がん細胞株 3 種類の合計 6 種類を用いた。X 線スリット状マイクロビームは、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。

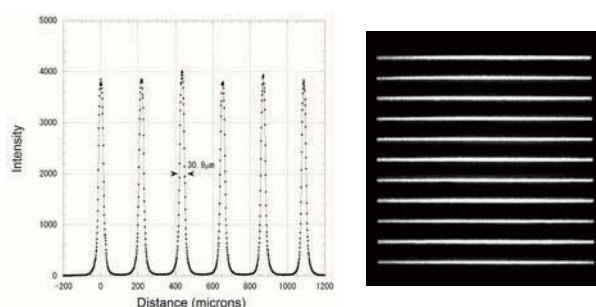


Fig.1 Beam profile of the X-ray microplanar beams generated with synchrotron radiation using the collimator. Data are taken from [3].

【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た時の細胞集団の生存率は、正常型 *p53* 遺伝子をもった細胞について、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、異なる細胞応答を介した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) さらにその回復現象は、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）であることが考えられる。

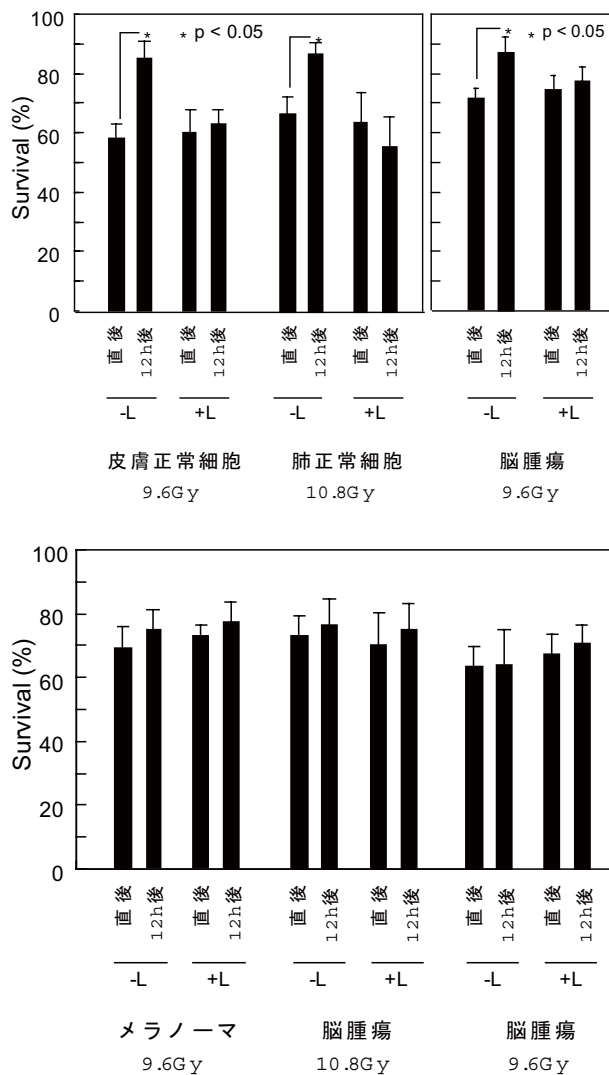


Fig.2 Cell survival assayed either immediately after irradiation or 12h after irradiation with the X-ray microplanar beams. Upper graph shows the survivals of normal human cells (normal type *p53* gene) and lower graph shows the survivals of human tumor cell lines (mutated type *p53* gene). “+L” means 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 粒子放射線を利用した研究で明らかにされているような、放射線照射された細胞が周囲の非照射細胞に対して間接的な作用を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* 遺伝子発現との関連性を考えながら、網羅的な遺伝子発現パスウェイを明らかにし、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細胞種による違いをより詳細に明らかにする必要はある。

【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。