展望 TENBO

放射線の効果を細胞から細胞へ伝えるバイスタンダー効果の特徴
―鍵を握るのは一酸化窒素―

横田　裕一郎　*Yokota Yuichiro*
舟山　知夫　*Funayama Tomoo*
（日本原子力研究開発機構）

池田　裕子　*Ikeda Hiroko*
（群馬大学大学院医学系研究科，日本原子力研究開発機構）

小林　泰彦　*Kobayashi Yasuhiko*
（日本原子力研究開発機構）

1　放射線の効果を細胞から細胞へ伝えるバイスタンダー効果とその意義

従来，放射線の生物効果は，細胞核 DNA を主な標的とし，放射線が当たってエネルギーが直接与えられた照射細胞でのみ生じると考えられてきた。ところが，照射細胞だけでなく放射線が当たっていない周囲の非照射細胞でも，照射細胞で認められるような効果（細胞の増殖阻害，DNA や染色体の損傷，突然変異の誘発など）が現れる“バイスタンダー効果”と呼ばれる現象が存在する。この現象は，1992 年にハーバード大学の H. Nagasawa と J.B. Little によって初めて報告され[1]，その後，世界中の多くの研究室で確認されている。バイスタンダー効果は，放射線が照射された細胞で産生される何らかの情報伝達物質が非照射細胞に到達することによって引き起こされると考えられており，培養液を照射しただけでは起こらない。その情報伝達経路としては，照射細胞内で産生された物質が培養液中に放出されて拡散し，非照射細胞に到達して作用を伝達する経路や，隣接して接着した細胞同士の間の細胞膜に空いた微小なトンネルである細胞間隙（ギャップジャンクション）を通って情報伝達物質が流れる経路が考えられている。このバイスタンダー効果にはどのような意義があるのか考えていきたい。

いわゆる低線量/低線量率放射線による被ばくとは，常に生体中のごく一部の細胞にしか放射線がヒットしていない状況であり，そのような低線量域での生体影響を推定するためには，非照射細胞に間接的に伝わる影響をどのように見積もるかが重要となる。例えば，直接の照射による致死効果や突然変異誘発効果が周囲の照射されていない細胞に単純に伝播するとすれば，バイスタンダー効果は低線量域での生物影

響を増幅することになる。一方，放射線によるアポトーシス（細胞の自殺）の誘導は，DNA損傷の修復を適当なところで断念し，敢えて自殺することによって，望まれない突然変異や発がんのリスクをあらかじめ除去する個体レベルでの防衛機構として機能しているとも考えられ，この場合，照射細胞の周囲に伝わるバイスタンダー効果は，この防衛機構をいっそう効果的に機能させるのかもしれない。

放射線治療はがんの3大治療法の1つである。がん細胞の増殖を抑制できる線量を目指しつつ周囲の非がん正常細胞に当たる線量を抑えることが肝要であり，放射線を一方向から腫瘍に照射する単門照射から，現在では放射線を多方向から腫瘍に集中させる多門照射に主流が移っている。しかし，この照射法では，個々の正常細胞に当たる線量は単門照射の場合に比べて低減するものの，放射線が当たる正常細胞の数は増加してしまう。従来から治療に用いられているγ線やX線は体を貫通するため腫瘍の前後の正常細胞に放射線が当たるが，最近注目されている重粒子線[*1]を用いたがん治療では，体を貫通させずに腫瘍の位置で重粒子線を止めることができるため，腫瘍の後ろの正常細胞には重粒子線が当たらない。しかし，いずれの方法でも体外から放射線を照射する限り，皮膚と腫瘍の間に存在する正常細胞に放射線が当たることは不可避であり，バイスタンダー効果を含めてその影響を最小限に留めることは二次発がんの抑制や患者のQOL維持の観点から重要になる。

筆者らは，環境放射線のような低線量/低線量率放射線被ばくや，放射線がん治療のような局所放射線照射の生物効果の制御を最終目標とし，バイスタンダー効果の特徴を明らかにして分子メカニズムを解明するための研究を日々進めている。本稿では，その取組みとこれまでに得た知見[2]について概説する。

2 γ線と重粒子線が誘発するバイスタンダー効果に違いはない

γ線やX線では物質内で光子のエネルギーを受け取った二次電子がそのエネルギーを広い空間に満遍なく付与し，それとは対照的に，重粒子線はエネルギーの大半をイオンの飛跡に沿った狭い空間に集中して付与する。このように線質が異なる放射線では照射細胞に及ぼす効果にも違いが生じる。例えば，重粒子線では線量当たりの細胞致死効果がγ線やX線と比べて大きい。これは，重粒子線が照射された細胞では，重粒子線のエネルギー付与特性を反映してゲノムDNAの近接した位置に複数のDNA損傷が生じ，そのような損傷は正確に修復することが困難であるためと考えられている。さらに，重粒子線はγ線やX線では消滅しない放射線抵抗性のがん細胞にも効率良く細胞死を引き起こすことができ，このことは重粒子線がん治療の有効性を生物学的な面から裏打ちしている。しかし，照射細胞の周囲に存在する非照射細胞で引き起こされるバイスタンダー効果が放射線の種類によって異なるかどうかは十分に分かっていない。

筆者らは，γ線と重粒子線の一種である炭素イオンビームが引き起こすバイスタンダー効果を比較するため，日本原子力研究開発機構，高崎量子応用研究所のコバルト60ガンマ線照射施設とイオン照射研究施設（TIARA）を用いて，γ線あるいは炭素イオンビームを照射したヒト肺由来の正常線維芽細胞WI-38株と照射していない同細胞を，一酸化窒素，サイトカインなどの細胞間情報伝達物質と培養液は通過できるが，細胞は通過できない多孔膜の上側と下側に隔てて培養した（**図1**）。培養を開始して

[*1] 重粒子線：原子から電子を剥ぎ取った原子核をサイクロトロンやシンクロトロンなどの加速器によって光速の数十分の一から数分の一程度にまで高速に加速した粒子線をイオンビームといい，炭素イオン等の重い粒子のイオンビームのことを特に重粒子線という。

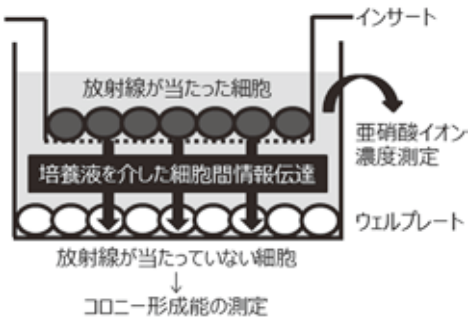

図 1　バイスタンダー効果の誘導方法
底部が多孔性メンブレンでできた培養容器（インサート）と，対になる培養容器（ウェルプレート）上で細胞を培養した。インサート上の細胞に γ 線あるいは炭素イオンビームを照射した後，インサートをウェルプレートに重ねて培養を続けた。細胞は多孔性メンブレンを通過できないが生体分子は通過するため，照射細胞と非照射細胞は非接触状態で培養液を介した細胞間情報伝達を行うことができる。培養後，非照射細胞を回収してコロニー形成能を測定するとともに，培養液を回収して亜硝酸イオンの濃度を測定した

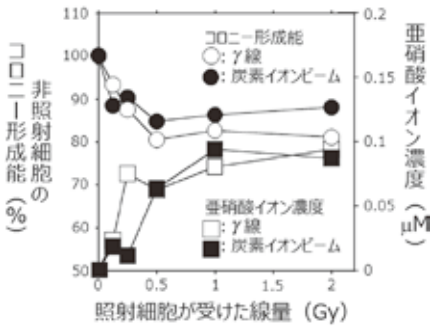

図 2　バイスタンダー効果の線量応答
γ 線（○）あるいは炭素イオンビーム（●）を照射した細胞と 24 時間培養した非照射細胞のコロニー形成能は，照射細胞が受けた線量が増加するほど低下し，およそ 80% で下げ止まった。一方，γ 線（□）あるいは炭素イオンビーム（■）を照射した細胞と非照射細胞を 24 時間培養した培養液中に含まれる亜硝酸イオンの濃度は，照射細胞が受けた線量とともに上昇し，およそ 0.1 μM で頭打ちになった。それぞれの線量応答は γ 線と炭素イオンで変わらず，培養液中の亜硝酸イオンの濃度が上昇するにつれて非照射細胞のコロニー形成能は低下する傾向が認められた

24 時間後に，多孔膜の下側の γ 線や重粒子線を照射していない細胞を回収，希釈して新しい培養容器に播き直し，単一の細胞が細胞分裂を繰り返して 50 細胞以上の細胞塊を形成する能力（コロニー形成能）を測定したところ，何も処理しなかった対照細胞と比べて，γ 線や炭素イオンビームを照射した細胞と培養した非照射細胞ではコロニー形成能が低下することを見いだした（**図 2**）。このバイスタンダー効果による非照射細胞のコロニー形成能低下の度合いは，照射細胞が受けた線量が増加するにつれて大きくなるが，同じ線量では γ 線と炭素イオンビームの効果に違いはないことが分かった。

3　バイスタンダー効果の鍵を握るのは一酸化窒素

照射細胞とともに培養した非照射細胞でバイスタンダー効果が引き起こされる分子メカニズムを明らかにするため，生体膜を自由に通り抜けて情報伝達因子として作用する一酸化窒素に注目した。一酸化窒素は，細胞中で一酸化窒素合成酵素の働きによって，L-アルギニン，還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸及び酸素から合成される。実験では，この一酸化窒素を直ちに酸化して二酸化窒素に変化させることができる carboxy-PTIO という試薬を培養液中に加えた。このようにして実験系内の一酸化窒素を意図的に消去した場合には，γ 線あるいは炭素イオンビームのどちらの場合でも，照射細胞と培養した非照射細胞のコロニー形成能は全く低下しなくなり，バイスタンダー効果が引き起こされるためには細胞内で一酸化窒素が合成される必要があることを突き止めた（**図 3**）。そこで次に，一酸化窒素の合成量と非照射細胞のコロニー形成能の関係を調べようと考えた。

一酸化窒素は carboxy-PTIO を加えなくても半減期数秒で酸化されて二酸化窒素に変化し，この二酸化窒素が更に酸化されて，比較的安定な亜硝酸イオンと硝酸イオンが生じる。そこで，実験系内で産生される一酸化窒素の量を推

定するため，培養液中の亜硝酸イオンの濃度をザルツマン法[*2]で測定した。始めに，異なる濃度の亜硝酸イオンを培養液に添加した標本を用いて検量線を作成し，次に，照射細胞と非照射細胞を 24 時間培養した培養液中に含まれる亜硝酸イオンの濃度を測定した。その結果，γ線と炭素イオンビームのどちらの場合でも，照射細胞が受けた線量が増加するにつれて培養液中に含まれる亜硝酸イオンの濃度が上昇すること，亜硝酸イオンの濃度が上昇するにつれて非照射細胞のコロニー形成能が低下する傾向があることを発見した（**図 2**）。以上の結果から，γ線や重粒子線が照射された細胞の周りの非照射細胞では，一酸化窒素の産生量が増加するほど，コロニー形成能が低下することが明らかになった。

では，一酸化窒素はどのようにして非照射細胞のコロニー形成能を低下させているのだろうか。筆者らは，細胞外から与えた一酸化窒素の細胞毒性を調べるため，半減期 100 分で自発的に分解して 2 分子の一酸化窒素を放出する，NOC12 という試薬を培養液中に投与して 24 時間インキュベートした細胞のコロニー形成能を測定した。その結果，NOC12 の濃度が 0.1～100 μM（放出される一酸化窒素の濃度は 0.2～200 μM）では投与細胞のコロニー形成能は全く低下しないことが分かった（**図 4**）。もしも，一酸化窒素が細胞間情報伝達物質として照射細胞から放出されて非照射細胞にバイスタンダー効果を引き起こすのであれば，NOC12 を投与した細胞のコロニー形成能も同じように低下してもよいはずである。また，実験に用いた正常線維芽細胞ではがん抑制遺伝子 p53 が正常に機能しており，照射によって活性化された p53 は誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子の発現を抑制するだろう。これらのことから，筆者らはバイスタンダー効果の誘導メカニズムとして，照射細胞で産生，放出されるサイトカインなどの物質が細胞間情報伝達物質として非照射細胞に到達し，それを受容した非照射細胞内で転写因子

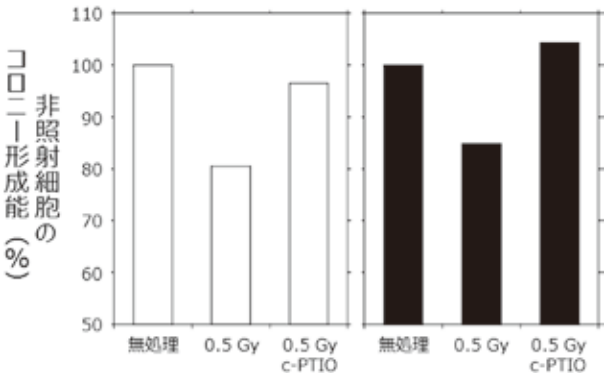

図 3　一酸化窒素の消去実験
一酸化窒素の消去剤である carboxy-PTIO を 20 μM 添加した培養液中で照射細胞と非照射細胞を 24 時間培養した。γ線（□）と炭素イオンビーム（■）のどちらの場合でも，carboxy-PTIO 存在下では非照射細胞のコロニー形成率は全く低下しなかった

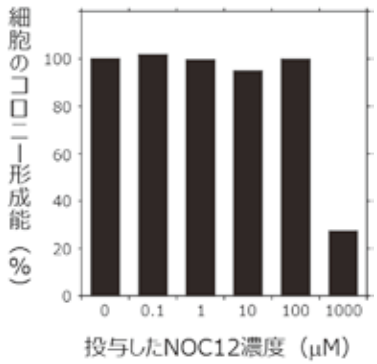

図 4　細胞外から投与した一酸化窒素の細胞毒性
半減期 100 分で自発的に分解して 2 分子の一酸化窒素を放出する NOC12 試薬を細胞に投与して 24 時間処理した後，細胞のコロニー形成能を測定した。1 mM の NOC12 を投与した場合のみコロニー形成能の低下が認められ，0.1～100 μM の濃度では毒性を示さなかった

[*2] ザルツマン法：培養液にスルファニル酸，N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩と酢酸を混合し，亜硝酸イオンの存在によって生じるアゾ色素を吸光光度法で検出する方法。

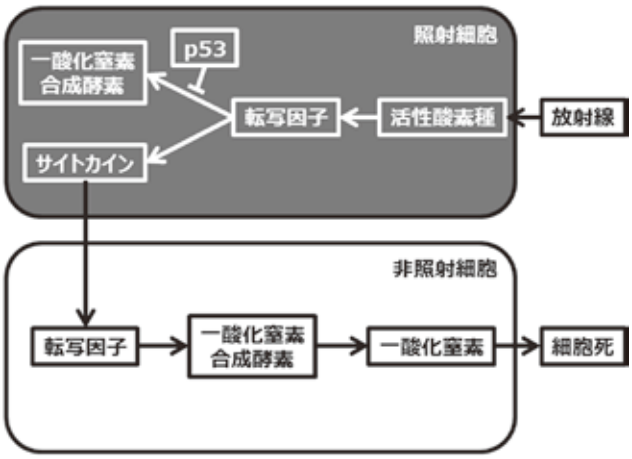

図 5　予想されるバイスタンダー効果の分子メカニズム
放射線が照射された細胞でサイトカインなどの細胞間情報伝達物質が合成され，細胞外に放出される。それを受け取った非照射細胞で転写因子の活性化などを経て一酸化窒素合成酵素の発現が活性化する。一酸化窒素は直接あるいはペルオキシナイトライトとして DNA 損傷を誘発して細胞死を誘発する

が活性化されるなどして一酸化窒素合成酵素の発現量が増加し，細胞内で産生された一酸化窒素が直接あるいは活性酸素種の一種であるスーパーオキシドと反応したペルオキシナイトライトとして DNA 損傷を誘発して細胞死を誘発する可能性があると考えている（**図 5**）。

4 将来展望

近年，体内深部のがん患部に集中して放射線のエネルギーを与えて治療できる重粒子線がん治療に期待が集まっているが，その重粒子線でも，皮膚からがん患部までの間に存在する正常組織の被ばくは避けられない。この正常組織の被ばくにおいて，放射線が当たった細胞から当たっていない細胞へのバイスタンダー効果が影響する可能性があるが，本成果によりそのメカニズムの一端が明らかになった。今後，ヒトの正常組織で一酸化窒素の消去あるいは生成の抑制・制御に有効な薬剤が開発されれば，放射線がん治療の副作用低減に，更には治療効果の増強にも役立つことが期待できる。

筆者らは現在，バイスタンダー効果の分子メカニズムの全容解明を目指し，照射細胞と共培養した非照射細胞から RNA を抽出して発現強度が変化する遺伝子を探索しており，これまでに酸化ストレス，細胞間情報伝達，アポトーシス誘発に関与する幾つかの候補遺伝子で発現強度が大きく変化することを見いだしてきた。今後は，これらの遺伝子の発現抑制あるいは遺伝子産物の特異的阻害剤を用いるなどして，候補遺伝子がバイスタンダー効果の誘発において担っている役割を調べていく予定である。なお，この研究の一部は，科学研究費補助金（25740019）の支援を受け実施した。

参考文献

1）Nagasawa, H. and Little, J.B., *Cancer Res*., **52**, 6394–6396（1992）
2）Yokota, Y., *et al*., *Int. J. Radiat. Biol*., **91**, 383–388（2015）