

放射線感受性の細胞周期依存性に関する再検証の試み

三浦 雅彦
Miura Masahiko

1. はじめに

1953年、ワトソンとクリックによってDNAが二重らせん構造であることが明らかになり、その後、分子生物学は著しい進展を遂げた。一方、ほぼ同時期に、細胞周期におけるDNA複製期の可視化が可能になったこと、コロニーアッセイによって細胞の放射線感受性が定量化できるようになったことが、放射線生物学隆盛の端緒になったと言える。こうして1960年代には、分割照射の基盤とも言える“4つのR”の概念の発端となる知見が見出された。分割照射による放射線治療効果を考える上で、半世紀を経た今でも4つのRの本質は変わっておらず、不滅の概念とも言える偉大な功績である。しかしながら、十分な実証がなされていない部分も含まれている。幸にしてその後の技術の進歩はめざましく、それらを駆使して、先人の功績を検証できるようになったと著者は考える。本稿では、“4つのR”の1つであるRedistribution（再分布）の基になった放射線感受性の細胞周期依存性に関し、Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator（Fucci）と呼ばれる細胞周期を可視化する技術を導入して、再検証を試みた結果について紹介する。

2. 4つのR

1960年、Elkindらは、コロニー法によって得られる線量-細胞生存率曲線を用い、分割照射によって照射間隔を数時間以上あけると、1度に照射した場合に比べ、生存率が上昇することを見出した¹⁾。

この回復現象を、亜致死損傷（sub-lethal damage）からの回復（Recovery）と呼んだ。その定量的知見に関する記載は、ここでは割愛する。

1960年代前半、後述するように放射線感受性には細胞周期依存性が存在することが判明した^{2,3)}。したがって、1回目の照射により、放射線抵抗性期の細胞が多く生き残るが、その後一部同調しつつ、放射線感受性期に移行することになる。これをRedistribution（再分布）と呼んだ。その後、細胞周期チェックポイントの概念が生まれると、少し捉え方が変わってくる。腫瘍細胞においては、多くの細胞がp53遺伝子に変異を有し、G1チェックポイントが機能しないが、G2チェックポイントは機能する。すると、照射後、腫瘍細胞は自動的に放射線感受性の高いG2/M境界領域に集積する。このタイミングで照射されれば、より効率の良い治療につながることになる。

酸素分圧が20 mmHgを下回ると急激に放射線抵抗性となることが分かり、固形腫瘍内の壊死層近傍の増殖を停止した腫瘍細胞は、極めて高い放射線抵抗性を示す。最初の照射で血管に近い酸素に富んだ細胞が死滅すると、これまで到達しなかった低酸素細胞に酸素が届くようになり（Reoxygenation（再酸素化）⁴⁾）、次の照射が有利になるが、分割照射ではこれを繰り返していくことになる。

4つ目のRは、これまでの3つのRとは異なり、がん幹細胞の数に関するものである。放射線治療期間が長引くと、がん幹細胞の増殖スピードが増し、これを許すと、結果として腫瘍制御に必要な総線量が増える⁵⁾。これは、がん幹細胞の分裂様式が、1つ

のがん幹細胞と1つの非がん幹細胞に分裂する非対称分裂から、2つのがん幹細胞に分裂する対称分裂に様式が変化するためと考えられている。これを Repopulation (再増殖) という。

以上のRに始まる4つの現象を総称して“4つのR”と言い、半世紀以上経過した今でも、依然としてその本質的な重要性は霞んでいない。

3. 再分布の基になった放射線感受性の細胞周期依存性に関する問題点

1961年、日本人放射線生物学者である寺島東洋三とTolmachは、M期で細胞が丸くなり、ディッシュから剥がれやすくなることを利用した世界初となる細胞周期同調法(Shake-off法)を開発した。この手法を用いて、M期に同調した細胞集団が得られれば、同調しつつ細胞周期が進んでいくことから、それぞれの時期に照射をして生存率を求めることが初めて可能になった。その結果、HeLa細胞では、M期が最も放射線感受性、G1/S境界部にも感受性期があり、G1期初期とS期後期が最も放射線抵抗性であった²⁾。最初の報告では、G2期は、S期後期同様放射線抵抗性であったが、それは、同調が崩れることで多くのS期後期の細胞が混入していたことが分かり、S期を³H-チミジンを取り込ませて致死させると、G2期は感受性であることが分かった。一方、Sinclairらは、G1期が極めて短いChinese Hamster細胞を用いて同様の実験を行ったところ、HeLa細胞に認められたG1期中での放射線感受性の変動はなく、S期後期で最も放射線抵抗性、G2期、M期で最も放射線感受性であった³⁾。これらの知見が、再分布の概念を生むに至った。同調した細胞集団を得るという点において、Shake-off法は、DNA損傷等のストレスを細胞に与えず、同調度の高い優れた方法であると考えられてきた。しかしながら、一旦同調した細胞集団が得られたとしても、その後、その同調度は比較的速やかに崩れ、元の分布に戻ってしまうことも知られていた。したがって、最初は純度の高いM期集団であったとしても、その後、細胞周期が進行すると、想定された細胞周期を示す細胞集団の純度は、決して高く保たれていた訳ではないことになる。

4. 細胞周期動態の可視化

細胞周期動態を検出する最初の手段は、³H-チミジンにS期細胞に取り込ませて行うオートラジオグラフィであった。その後、³H-チミジンの代わりにBrdUやEdUが用いられるようになり、更に検出方法も、DNAにインターカレートする蛍光色素量を定量できるフローサイトメトリーが主に用いられるようになった。この技術は革新的であったが、解析のために細胞を1個1個バラバラにする必要があり、時空間的情報が得られないという欠点もあった。そこで、理研の宮脇らのグループは、細胞周期特異的に起こるユビキチン化現象を利用して、赤色と緑色の蛍光タンパク質にそれを反映させることにより、細胞が生きたまま、G1期に赤色、それ以外で緑色蛍光を発するFluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) とよばれるシステムを開発した⁶⁾。はじめ、S期とG2期は、いずれも緑色蛍光を発するため区別できなかったが⁶⁾、次世代システムとして、両者を区別できるFucci(CA)2も開発された⁷⁾。著者らは、このシステムを利用することで、放射線感受性の細胞周期依存性を検証できないか考えた。

5. Fucciを用いた放射線感受性の細胞周期依存性に関する検証

Fucciシステムを用いると、細胞が生きたままの状態で経時変化撮影が可能となる。そこで、HeLa細胞にFucci(CA)2を導入した細胞を使用して、通常の増殖動態を経時変化撮影したデータを取得した。M期をスタートポイントに合わせ、約100個の細胞のその後の細胞周期進行を追跡すると、9時間後には半数がG1期、半数がS期を示した。このことは、Shake-off法で初めに同調度の高いM期集団が得られたとしても、同調度の崩壊はかなり早くから起きていることが推測され、そうした同調度の崩れた細胞集団を用いて放射線感受性が求められていたことがこのシステムでも確認された。

そこで筆者らは、より均一性の高い細胞集団を、この経時変化データから同定する方法を考案した。まず、HeLa-Fucci(CA)2細胞の細胞周期チェックポイントを確認すると、G2期の延長のみが線量依存

的に顕著に確認された。そこで、照射時に赤色 (G1 期)、緑色 (S 期) であった細胞を、それぞれが次の相に移行するまでの時間の長い順に細胞集団をソートし、ほぼ同数になるようにそれぞれを3つの集団に分ければ、G1 期と S 期が混じり合うことのない、G1 期、S 期の前期、中期、後期の細胞集団に分離できると考えた (図 1)。しかし、それぞれの細胞集団は、実際に分離して集めることはできないため、放射線感受性をどのように求めるかが問題であった。DNA 二重鎖切断 (DSB) を持ったまま細胞分裂が起きると、小さな核の断片が検出され、これを微小核という。コロニー法による放射線感受性は、微小核生成頻度とよく相関することが知られており⁸⁾、その頻度は、経時変化撮影から計測することが可能であった (図 2)。そこで、2 Gy 照射後、それぞれの集団の微小核生成率を調べると、図 3 のような結果となった。G1 期、S 期いずれも細胞周期が進行するにつれ、次第に微小核生成率は低下し、G2 期では上昇した。興味深いことに、これまで、G1/S 境界部は感受性とされてきた領域において、G1 後期から S 期前期にかけて急激な変化が起こる

ことを見出した⁹⁾。この急激な変化は、第 1 世代の Fucci を発現した HeLa 細胞でも同様に認められた。この第 1 世代システムでは、S 期と G2 期を区別できないが、G1 期後期と S 期前期との区別が可能である。

6. まとめ

筆者らは、G1 期の長い細胞の代表格であり、最初に放射線感受性の細胞周期依存性が見出された HeLa 細胞を用いて、細胞周期を可視化する Fucci システムを導入することですべて画像データからより均一性の高い細胞集団を同定し、その放射線感受性を推定することに成功した。その結果、G1 期後期で放射線抵抗性を示し、S 期前期で感受性を示す現象を見出した。これまで、G1 期後期と S 期前期の細胞では、特に放射線感受性の相違は議論されてこなかったが、臨床的には、ジェムシタビンやヒドロキシウレア等、S 期前期に停止させる抗がん剤等も存在すること、G1 チェックポイントは G1 期後期で働くこと等を考えると、今後興味深い展開が期

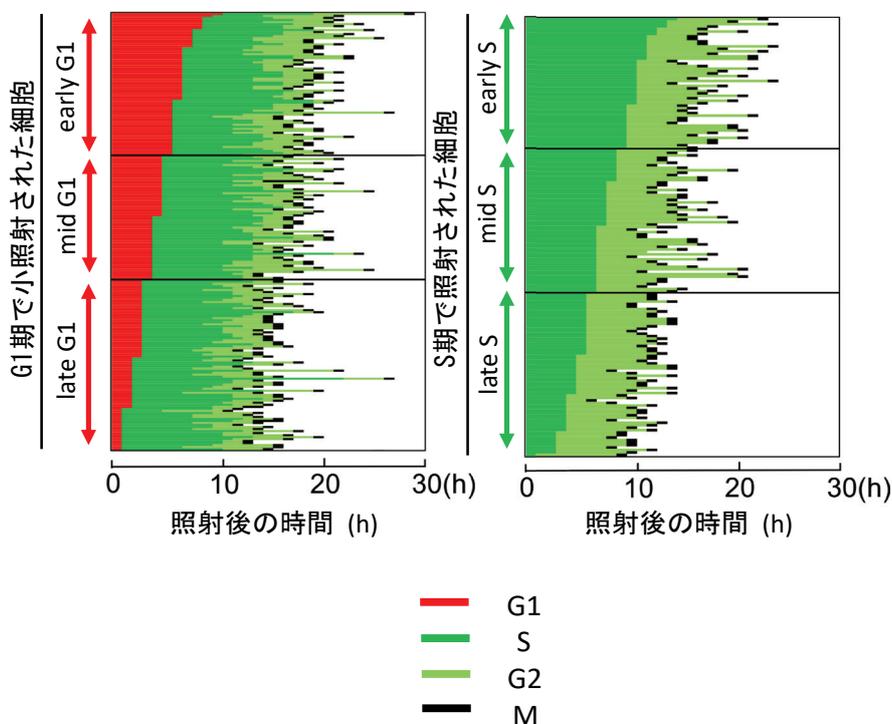


図 1 G1 期または S 期の前期、中期、後期で 2 Gy 照射された細胞における M 期までの細胞周期動態

各色は、Fucci (CA)2 システムにおけるそれぞれの細胞周期相における蛍光の色を表している。

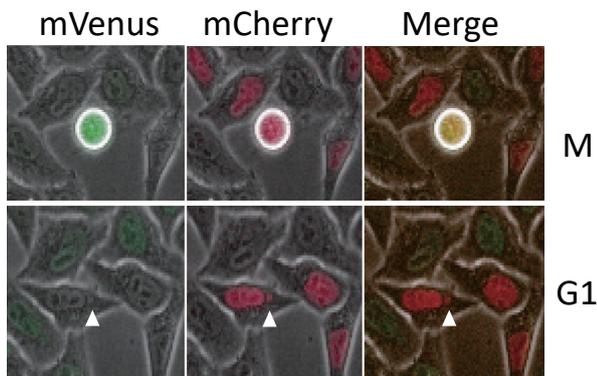


図2 2 Gy 照射後，細胞分裂によって生じる微小核の検出
mVenus, 緑色蛍光タンパク質；mCherry, 赤色蛍光タンパク質；Merge, 重ね合わせ；矢頭, 微小核

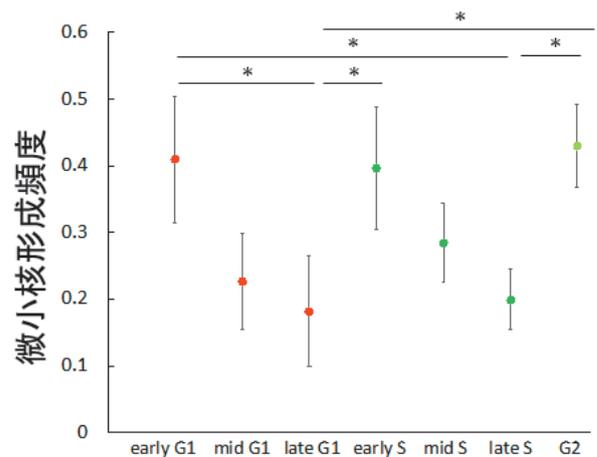


図3 G1期またはS期の前期，中期，後期で2 Gy 照射された細胞における微小核生成頻度

*, $p < 0.05$

待される。しかしながら，なぜG1後期に抵抗性となり，S期前期に感受性となるのか，そのメカニズムの解明はこれからである。最新の技術をもって他のRについても再検証し，分割照射による影響の真の姿を追求することが必要であろう。

参考文献

- 1) Elkind, MM., and Sutton, H., *Radiat Res.*, **13**, 556-593 (1960)
- 2) Terasima, T., and Tolmach, LJ., *Nature*, **190**, 1210-1211 (1961)

- 3) Sinclair, WK., and Morton RA., *Radiat Res*, **29**, 450-474 (1966)
- 4) Van Putten, LM, *Eur J Cancer*, **4**, 172-182 (1968)
- 5) Hermens AF., and Barendson, GW., *Eur J Cancer*, **5**, 173-189 (1969)
- 6) Sakaue-Sawano, A., *et al.*, *Cell*, **132**, 487-498 (2008)
- 7) Sakaue-Sawano, A., *et al.*, *Mol Cell*, **68**, 626-640 (2017)
- 8) Sommer, S., *et al.*, *Int J Mol Sci*, **21**, 1534 (2020)
- 9) Shimono H., *et al.*, *Sci Rep*, **10**, 20873 (2020)

(東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 口腔放射線腫瘍学分野)