

各種LET放射線による癌細胞の死型解析

高橋 昭久¹⁾ 大西 健¹⁾ 青木 瑞穂²⁾ 古澤 佳也²⁾ 大西 武雄¹⁾

1) 奈良県立医科大学・生物学教室

2) 放射線医学総合研究所・粒子線治療グループ

Special Lecture

Analysis of Death Pattern in Cancer Cells by Using Different Kinds of LET Radiation

Akihisa Takahashi¹⁾, Ken Ohnishi¹⁾,
Mizuho Aoki²⁾, Yoshiya Furusawa²⁾,
and Takeo Ohnishi¹⁾

We investigated the death pattern of cancer cells by using different kinds of linear energy transfer (LET) radiation. We used two human squamous cell carcinoma cell lines with an identical genotype except for the *p53* gene. SAS/mp53 cells were established by transfection with the mp53 gene to SAS cells having functional *p53* (*wtp53*). As the control, a neo-vector was transfected to the SAS cells (SAS/*neo* cells). Both types of cells were exposed to X-rays (1.5 KeV/ μ m) or accelerated C-beams (30-100 KeV/ μ m). The frequency of cell death (apoptosis and necrosis) was measured by acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double staining for fluorescence microscopy. We found that (1) low-LET radiation induced apoptosis only in SAS/*neo* cells; (2) high-LET radiation at an iso-survival dose induced apoptosis not but necrosis in SAS/*neo* cells at a higher frequency; (3) high-LET radiation induced *p53*-independent apoptosis even in SAS/mp53 cells. Our findings suggest that high-LET radiotherapy is expected to (1) have validity in its application to patients carrying mutated *p53* cancer cells and (2) reduce injury to adjacent normal tissue for high-frequency-induced apoptosis without inflammatory response. We propose that elucidation of *p53*-independent apoptosis-related genes might provide new insights into radiotherapy for cancer.

Research Code No.: 6.2

Key words: LET, Apoptosis, Necrosis, AO/EB method, *p53*

Received August 9, 2002

1) Department of Biology, Nara Medical University

2) Heavy-ion Radiobiology Research Group, Research Center for Charged Particle Therapy, National Institute of Radiological Sciences

本論文は、日本医学放射線学会誌編集委員会が企画し、執筆依頼した。

別刷請求先

〒634-8521 奈良県橿原市四条町840

奈良県立医科大学生物学教室

高橋 昭久

e-mail atakahas@naramed-u.ac.jp

はじめに

損傷による受動的な細胞崩壊現象で“細胞他殺”ともいえるネクロシスとは形態学的に全く異なる細胞の終焉として、ギリシャ語の木の葉が落ちることを意味するアポトーシスという新たな概念に関する論文が1972年に発表されていた¹⁾。アポトーシスは形態学的に細胞膜と核内構造の変化を伴う急速な細胞縮小が特徴である。核クロマチンの核膜辺縁への凝集・凝縮が起こり、細胞全体が縮小し、細胞表面に大小の突起が多数出現し、多くの粒子に断片化し、周囲の細胞やマクロファージに炎症を伴うことなく貪食除去される。細胞の形態レベルで捉えられていたアポトーシスは当初ほとんど脚光を浴びずにいた。しかし、このアポトーシスは個体の発生や恒常性の維持のために能動的な異常細胞排除機構として機能し、いわば、“細胞自殺”であることがやがて注目されることとなった。

1990年代に入り、分子生物学の進歩に伴い、死に行く細胞が自らエネルギーを使い、多数の遺伝子を発現して、死を制御していることが明らかにされてきた。また、アポトーシスに関与する分子の異常と、癌との関連も相次いで見出し、爆発的にアポトーシス研究が進展した²⁾。この研究の盛り上がりの中で、放射線治療の分野ではアポトーシス研究はあまり重要視されてこなかった。癌細胞のタイプによっては放射線をあててもアポトーシスがおこりにくいこと、特に固形癌では放射線治療によって生じるアポトーシス頻度が非常に低いことから、放射線治療における基礎研究と治療研究とのギャップからか、「放射線癌治療研究においてアポトーシスは本当に重要か？」という命題を生み出す背景ともなっているように思われる。

われわれの研究グループは、固形癌では放射線治療によって生じるアポトーシス頻度が非常に低いことを逆手にとって、アポトーシス誘導を促進できれば、癌細胞を積極的・選択的に殺すことができると考えた³⁾。高い放射線治療効果をもたらす可能性を秘めていることから、アポトーシス研究に魅力を感じている。本稿は、放射線治療研究において、アポトーシス研究は重要であるという立場で、われわれの各種LET放射線による癌細胞の死型の解析結果を紹介

介する。

LET依存的な殺細胞効果

癌細胞の遺伝的背景の違いは放射線治療における癌細胞の致死感受性に大きく影響することが予想される⁴⁾。癌細胞のどの遺伝子を検定すれば癌細胞の感受性を知ることができるのか、効率の良い治療効果が望めるのかを明らかにする必要がある。これまでわれわれはアポトーシス誘導調節に関与する癌抑制遺伝子 $p53$ に注目してきた。悪性腫瘍の約半数に認められる $p53$ の異常はX線抵抗性をもたらすが、LETが高くなるにつれ、放射線感受性が増し、 $p53$ の遺伝子型による感受性には違いは認められなくなることを見出した (Fig. 1)⁵⁾⁻⁹⁾。この時の細胞死型に違いはあるのだろうか？

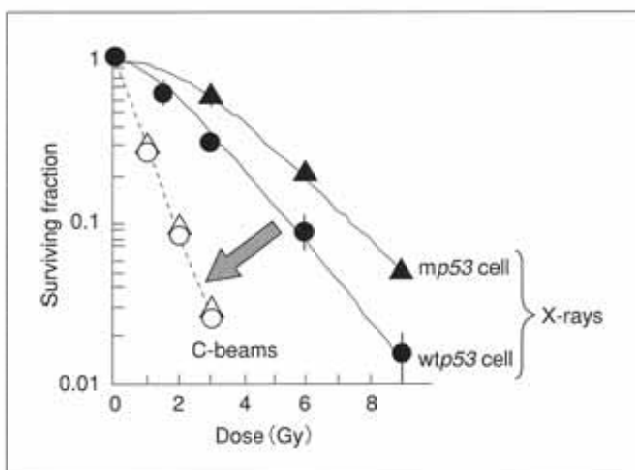


Fig. 1 Survival curves of cells exposed to X-rays (closed symbols) and carbon-ion beams (open symbols). Circles, wtp53 cells; triangles, mp53 cells. Error bars indicate standard deviations.

細胞死型の測定原理

アポトーシスの重要性を論じる前に、細胞死のアポトーシスとネクローシスを正しく測定することが重要であろう。今回われわれは、アクリジンオレンジ・エチジウムブロマイド二重染色蛍光顕微鏡観察(AO/EB)法を採用した。この方法は、Leiteら¹⁰⁾が従来のギムザ染色法、トリパンブルー色素排除法、アクリジンオレンジ・エチジウムブロマイド染色フローサイトメトリー法、ヨウ化プロピジオウム染色法、アネキシンV染色法、TUNEL法、DNAラダー法と比較検討した中でも、手間はかかるが、正確にアポトーシスとネクローシスを区別することができることを報告している。細胞レベルでの研究に大いに活用できる。AO/EB法の原理はFig. 2のとおりで、DNA結合蛍光色素の異なる細胞取込みの性質と細胞形態を組み合わせることで細胞死型を区別できる。アクリジンオレンジは細胞膜損傷の有無にかかわらず細胞内に取込まれ核内のDNAと結合して緑色の蛍光を発する。一方、エチジウムブロマイドは細胞膜に損傷をもった後期のアポトーシスとネクローシス細胞に取込まれ核内のDNAと結合して赤色の蛍光を発する。また、エチジウムブロマイドはアクリジンオレンジよりも優先的に染色される。結果として、生細胞は緑色に、初期のアポトーシス細胞は濃縮した核が鮮やかな緑色に、後期のアポトーシス細胞は濃縮した核が鮮やかな赤色に、ネクローシスは膨潤した核が赤く染まる。生細胞の染色なので直ちにデジタル画像に記録して、後日サンプルあたり300個以上の細胞を3回カウントして、アポトーシスとネクローシス頻度を求めた。

各LETの等生存率線量における細胞死型の出現頻度

ヒト舌扁平上皮癌由来の $p53$ の表現型が正常型のSAS/neo細胞および変異型のSAS/mp53細胞を用いて¹¹⁾、アポトーシ

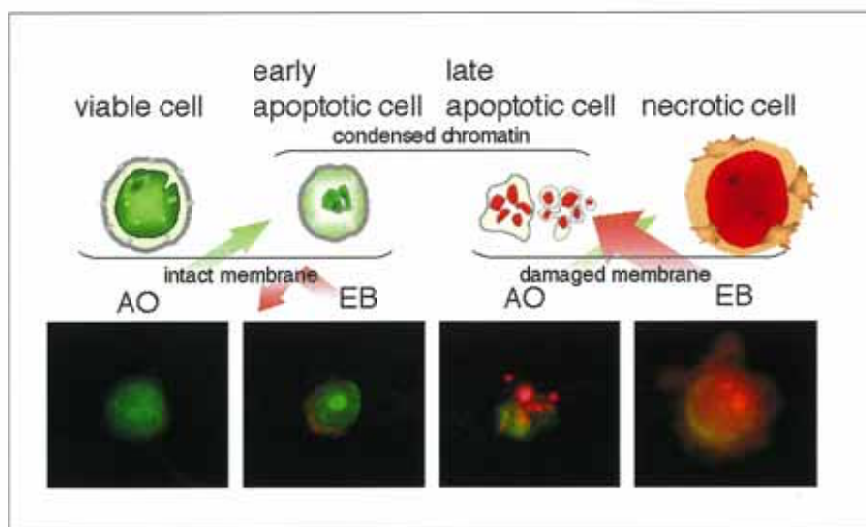


Fig. 2 Definitions of apoptosis and necrosis. Double staining with acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) was applied for fluorescence microscopy. This method was combined with the morphological aspect of chromatin condensation in the stained nucleus and the differential uptake of fluorescent DNA binding dyes. AO, which stained nucleus through both intact and damaged membranes, emits green fluorescence. In contrast, EB stained nucleus only through damaged membrane. It emits red fluorescence and predominated over AO. Therefore, it is possible to distinguish between viable, apoptotic, and necrotic cells.

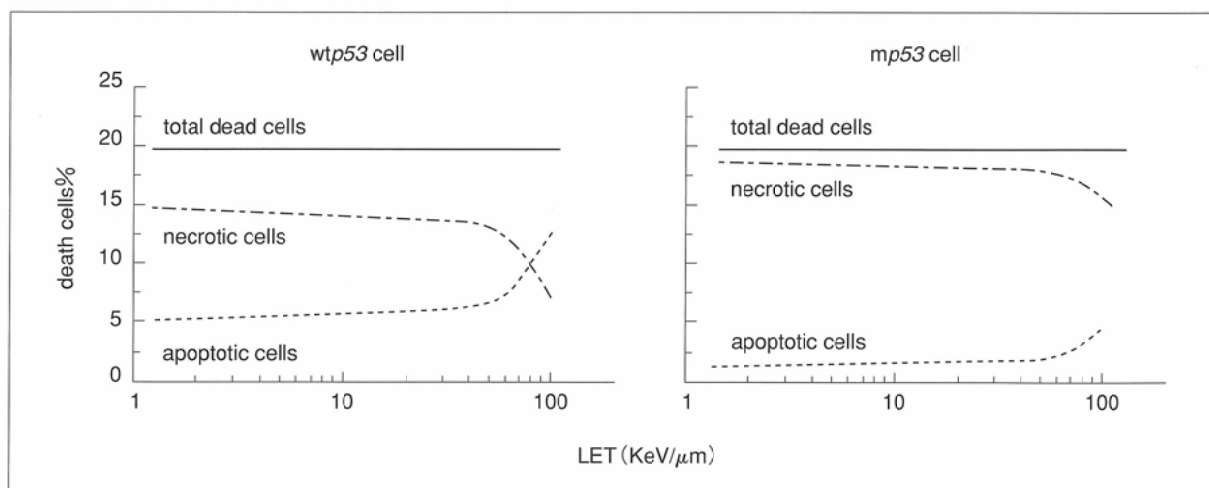


Fig. 3 LET dependency of radiation-induced cell death. Cells were cultured in normal medium for 48 h after irradiation at iso-survival dose (D_{30}). Apoptosis (----); necrosis (---); total cell death (—). Left panel, *wtp53* cells; right panel, *mp53* cells.

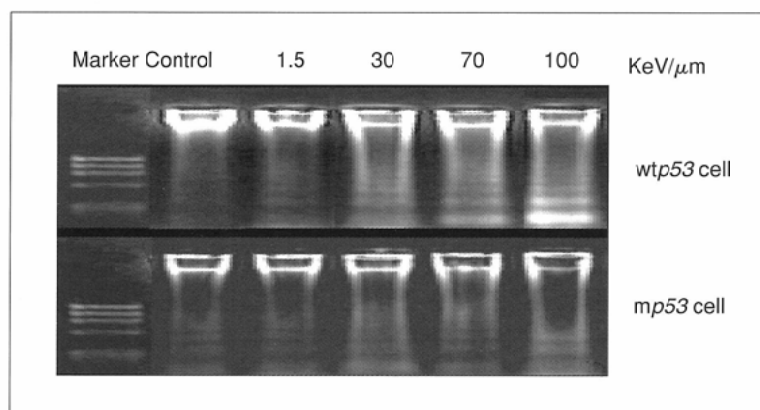


Fig. 4 LET dependency of radiation-induced DNA fragmentation. Cells were cultured in normal medium for 48 h after irradiation at iso-survival dose (D_{30}). Lane Marker, ϕ X174 DNA *Hae* III fragments as size markers; lane Control, non-irradiated; lane 1.5, X-rays (1.5 KeV/μm); lanes 30-100, C-beams (30-100 KeV/μm). Upper panels, *wtp53* cells; lower panels, *mp53* cells.

スとネクロシスの二つの細胞死型についてLET依存性を調べた結果をFig. 3 に示した。各LETの30%生存率の線量を細胞に照射した48時間後のアポトーシス頻度とネクロシス頻度および細胞死の総和を示している。細胞死の総和はいずれもほぼ一定であるのに対して、LETが高くなるにつれてアポトーシス頻度が増え、ネクロシスの頻度が減っている。高LETは細胞死におけるアポトーシスの占める割合を高める。また、このことは程度の差はあれ、変異型*p53*細胞でも同様の傾向を示した。

各LETの等生存率線量におけるDNAラダーの検出

さらに、Leiteら¹⁰⁾がアポトーシスの定性的な検出に優れていると報告しているDNAラダー法により、各LETの等生存率線量における結果をFig. 4 に示した。各LETの30%生存率の線量を照射して、48時間後のDNAラダーの検出結果も、正常型*p53*細胞および変異型*p53*細胞に高LETは細胞死におけるアポトーシスの占める割合を高めた。このことは、高LETは*p53*非依存的なアポトーシスを誘導していることを意味している。

低LET放射線による細胞死のバランス

等線量の低LET放射線による生死の割合をFig. 5Aに示している。*p53*はアポトーシス誘導による細胞死に導く経路と、細胞周期の調節や修復の誘導による生存に導く経路の2つを誘導する¹²⁾。変異型*p53*細胞はドミナントネガティブ効果によって*p53*の働きが抑えられており、*p53*依存性の生存経路は絶たれているため死に、かわりに*p53*依存性アポトーシスは起こらず生存すると考えられる。これまでも*p53*の遺伝子型と放射線感受性が調べられ、効くこともあれば、効かないこともあると相矛盾した報告があった。これは細胞の遺伝的背景が異なるため、*p53*による生存と死を導くバランスが異なっているためとわれわれは考える。本実験で用いたSAS細胞は*p53*依存性アポトーシスによる細胞死が生存への働きかけより優先的であるため、*p53*の機能が抑えられた変異型*p53*細胞は低LET放射線に抵抗性であったのであろう。

高LET放射線による細胞死のバランス

高LET放射線による生死の割合をFig. 5Bに示している。等生存率の照射でも高LETになるにつれて、細胞死の総和は変わらないが $p53$ 非依存的にアポトーシス頻度が高く、ネクロシス頻度が低くなることを見だした。高LET放射線では変異型 $p53$ 細胞でもアポトーシスがみられたことから、修復されにくいDNA損傷が増えることで、 $p53$ 非依存性アポトーシスが誘導されているものと考えられる。さらに、低LET放射線に比べて高感受性になること、また、正常型 $p53$ 細胞と変異型 $p53$ 細胞の感受性に差がなくなることから、正常型 $p53$ 細胞では $p53$ 依存性の生存の経路が絶たれ、変異型 $p53$ 細胞では $p53$ 依存性アポトーシスをおこなさなくても、 $p53$ 遺伝子に関係ない細胞死を引き起こしていると考えた。

おわりに

癌細胞の遺伝的背景が異なれば、遺伝子発現をとともうアポトーシスの誘発頻度が異なることを容易に想像することができる。患者のアポトーシスにかかわる癌関連遺伝子の検索は、放射線癌治療法の適用と治療効果予測に役立つであろう¹³⁾。今後どの遺伝子を検定すれば効率の良い先行指標を望めるのかを明らかにすることが重要と考える。しかし、放射線治療の対象患者は、アポトーシスに関連する遺伝子群の変異により放射線抵抗性を獲得した悪性腫瘍で

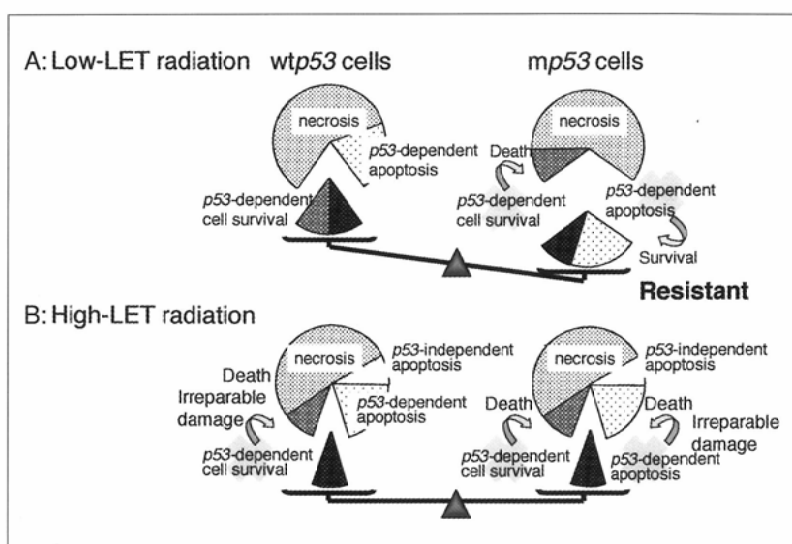


Fig. 5 Possible contribution of apoptosis and necrosis to cell death induced by low-LET or high-LET irradiation at iso-dose in wtp53 and mp53 cells.

あることも考えられるので¹⁴⁾、より効果的に放射線誘導アポトーシスを癌細胞にもたらす癌治療の工夫も必要となるかも知れない。その一つに、高LETの重粒子線治療は、今回の結果から $p53$ 遺伝子型に非依存的に癌細胞の退縮につながるアポトーシスを高頻度に誘導することから、周囲の正常組織の障害の軽減が期待できる。他には、アポトーシスに関与する遺伝子を利用した遺伝子治療もあげられるであろう。少なくともより的確なアポトーシスに関与した癌関連遺伝子の検索とともに、より効率のよいアポトーシス誘導機構が解明されることを期待してやまない。

文 献

- 1) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 2) 太田一郎, 高橋昭久, 大西武雄: 癌・放射線療法 2002. 大川智彦, 田中良明, 佐々木武仁 編: 癌関連遺伝子からみた放射線誘導アポトーシス. 203-214, 2002, 篠原出版, 東京
- 3) 太田一郎, 高橋昭久, 大西健, 他: 放射線および温熱治療の増感 アポトーシスの増感を狙う. *放射線生物研究* 35: 67-79, 2000
- 4) 高橋昭久, 大西武雄: 放射線感受性と癌関連遺伝子. *放射線腫瘍学会誌* 9: 1-13, 1997
- 5) Ohnishi T, Takahashi A, Yano T, et al: Hyperthermic enhancement of tumor growth inhibition by accelerated carbon-ions in transplantable human esophageal cancer. *Int J Hyperthermia* 14: 195-202, 1998
- 6) Takahashi A, Ohnishi K, Wang X, et al: The dependence of $p53$ on the radiation enhancement of thermosensitivity at different LET. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47: 489-494, 2000
- 7) Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, et al: $p53$ -Dependent thermal enhancement of cellular sensitivity in human squamous cell carcinomas in relation to LET. *Int J Radiat Biol* 77: 1043-1051, 2001
- 8) Takahashi A, Ota I, Tamamoto T, et al: $p53$ -Dependent hyperthermic enhancement of tumor growth inhibition by X-ray or Carbon-ion beam irradiation. *Int J Hyperthermia*: in press
- 9) Asakawa I, Yoshimura H, Takahashi A, et al: Radiation-induced growth inhibition in transplanted human tongue carcinomas with different $p53$ gene status. *Anticancer Res*: in press
- 10) Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS, et al: Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death-study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Anal Cell Pathol* 19: 139-151, 1999
- 11) Ota I, Ohnishi K, Takahashi A, et al: Transfection with mutant $p53$ gene inhibits heat-induced apoptosis in a head and neck cell line of human squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47: 495-501, 2000
- 12) Lane D: $p53$, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992
- 13) Reiter I, Krammer B, Schwamberger G: Cutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J Immunol* 163: 1730-1732, 1999
- 14) Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17: 2941-2953, 1999