

中沢 由華 論文内容の要旨

主 論 文

Reciprocal paracrine interactions between normal human epithelial and mesenchymal cells protect cellular DNA from radiation-induced damage

(正常ヒト上皮および間葉系細胞間の傍分泌による相互作用が放射線誘発損傷から DNA を防護する)

中沢由華、サエンコ・ウラジミール、ログノビッチ・タチアナ、鈴木啓司、光武範吏、松瀬美智子、山下俊一

(International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：山下俊一教授)

緒 言

人体組織は多種多様な細胞から形成されており、組織レベルでの放射線応答は非常に複雑であると考えられる。生体への放射線影響をより正確に理解するためには、この複雑な応答を明らかにする必要がある。これまでに、癌細胞を含む 2 種類の細胞を混合培養して放射線影響がどのように変化するかについては幾つか報告がある一方で、異なる種類の正常細胞間での放射線ストレス下における相互作用は十分に検討されていない。そこで、本研究では、正常上皮細胞と正常間葉系細胞の相互作用を反映する *in vitro* 実験系を確立し、一方または双方における放射線誘発 DNA 損傷の変化について詳細な検討を行った。

対象と方法

正常ヒト初代培養甲状腺細胞(PT)、正常ヒト乳腺上皮細胞(HMEC)、正常ヒト線維芽細胞(BJ、MRC-5、WI-38)、正常ヒト血管内皮細胞(HUV-EC-C)、ヒト甲状腺乳頭癌細胞(NPA、TPC-1)、ヒト甲状腺未分化癌細胞(ARO、FRO)及びヒト乳癌細胞(MCF-7)を用いた。

1 種類の細胞のみの単独培養、及び 2 種類の細胞を混ぜ合わせる混合培養を行い、 γ 線(0.25 - 5Gy)照射後、免疫蛍光染色法により細胞核あたりのリン酸化 H2AX foci 数を調べることで DNA 損傷の数を評価した。また、単独培養又は混合培養した細胞に Lindane(ギャップ結合阻害薬)を添加後、同様の検討を行なった。次に、一度細胞培養に用いた培地(条件付け培地)を、別に準備した標的細胞の培地と置換し、 γ 線照射後、免疫蛍光染色法又はコメット法により DNA 損傷の程度を評価した。さらに、条件付け培地を熱処理もしくは trypsin ビーズ処理後に培地置換し、 γ 線照射後、DNA 損傷数の変化を調べた。

結 果

- 1) PT と BJ 両細胞ともに、単独培養及び混合培養いずれの培養方法でも、 γ -線照射後、リン酸化 H2AX foci 数は急増し、その後時間とともに減少した。また、どちらの培養方法でも線量効果関係が確認された。しかし、リン酸化 H2AX foci 数は両細胞とも混合培養の方が単独培養よりも有意に少なかった。
- 2) PT・BJ いずれの細胞においても、Lindane を加えることで混合培養と単独培養双方のリン酸化 H2AX foci 数が増加した。しかし、混合培養では単独培養ほど増加しなかった。
- 3) PT・BJ いずれの細胞においても、自身の細胞よりも他方の細胞で条件付けられた培地(ヘテロ条件培地)の方が、有意に放射線誘発 DNA 損傷を減少させた。
- 4) ヘテロ条件培地による放射線誘発 DNA 損傷の減少は、条件培地を標的細胞に与えてから数分で確認され、条件培地を熱処理あるいは trypsin ビーズ処理することで抑制された。
- 5) ヘテロ条件培地による放射線誘発 DNA 損傷の減少は、正常上皮-線維芽細胞(PT と MRC-5、PT と WI-38、HMEC と BJ)の間及び正常内皮-線維芽細胞(HUV-EC-C と BJ)の間でも観察された。しかし、正常上皮-内皮細胞(PT と HUV-EC-C、HMEC と HUV-EC-C)の間では確認されなかった。また、上皮由来の癌細胞(ARO、FRO、MCF-7、NPA、TPC-1)と正常線維芽細胞(BJ)の間でも観察されなかった。

考 察

PT 及び BJ を用いた混合培養と単独培養とで、放射線照射後のリン酸化 H2AX foci 形成と消失のカイネティクスに差がないにもかかわらず、foci 数は混合培養の方が有意に少なかったことから、両細胞間に DNA を防護する相互作用の存在が示唆された。また、ギャップ結合阻害時にも防護効果が確認されたことから、ギャップ結合は防護作用に関わる主要な経路ではないと考えられた。さらに、ヘテロ条件培地によっても防護効果が観察されたことから、この防護作用は傍分泌を介していると推察された。また、この防護作用はごく短時間で効果を現したことから、遺伝子発現の変化に伴う蛋白合成を介さない細胞内の生化学的な変化によるものと推測され、熱処理あるいは trypsin ビーズ処理により不活化するペプチドが作用因子である可能性が示唆された。

ヘテロ条件培地による防護作用は、数種類の正常上皮-間葉系細胞間、及び正常内皮-間葉系細胞間で認められたが、正常上皮-内皮細胞間では観察されず、細胞の種類に特異的な作用であることが明らかになった。また、上皮由来の癌細胞と間葉系細胞の間で防護作用が観察されなかったことから、癌細胞では遺伝子発現等の異常により、防護因子の産生及び受容伝達に変化が生じていると推測された。

今後これらの傍分泌相互作用に関わる物質の同定が進めば、新たな放射線防護剤の開発と治療への応用が期待される。