

## 培地経由バイスタンダー効果に対する数理モデルの開発

### Numerical Analysis of the Medium-mediated Bystander Effects

佐々木 恒平\* 早川 修\* 真田 哲也\*  
奥山 豪\* 菊池 明泰\* 西本 尚樹\*  
板東 道夫\* 織田 圭一\* 北間 正崇\*

Kohei Sasaki, Osamu Hayakawa, Tetsuya Sanada,  
Go Okuyama, Akihiro Kikuchi, Naoki Nishimoto,  
Michio Bandoh, Keiichi Oda, and Masataka Kitama

#### Abstract

The radiation-induced bystander effect (RIBE) has been observed for various types of radiation, cell types, and cell culture conditions. However, the behavior of signal transmission between irradiated and bystander cells is not clear. In this study, we have constructed a novel model for RIBE based on the diffusion of soluble factors in cell cultures using a Monte Carlo technique. The model involves the signal emission probability from bystander cells following Poisson statistics. Simulations with this model show that the spatial configuration of the damaged cells agrees well with that of corresponding experiments. Furthermore, it was suggested that sixty hours were needed to the medium-mediated bystander signaling in sparse cell populations.

#### 1. 背景

放射線被ばく効果に関し、最近 20 年の間に多くの研究グループによってこれまでの定説が覆るような報告が出されてきた。それは放射線が細胞核を通過したと推測される細胞の数よりもはるかに多くの細胞に、放射線照射と同様の影響が現れるというものであった。これは非標的効果 (Non-Targeted Effect: NTE)、または放射線誘発バイスタンダー効果 (Radiation-Induced Bystander Effect: RIBE) と呼ばれる現象である<sup>(1)</sup>。この現象により観測される生物学的影響は、アポトーシス、細胞死、DNA 二本鎖切断 (DSB)、微小核形成、染色体異常、遺伝的不安定性、突然変異、遅延細胞死、細胞周期停滞、増殖促進など多岐にわたる<sup>(2)</sup>。

RIBE のシグナル伝達には、少なくとも 2 つの経路があることがわかっている。一つ目は、細胞培養液 (以下、培地とする) を介したシグナルの拡散現象による培地経由 (Medium-mediated: MM) シグナル伝達である。二つ目は、隣接細胞間に形成されたギャップ結合経由 (Gap Junction Intercellular Communication: GJIC) シグナル伝達である。伝達されるシグナル物質の正体は現在までの研究では明

らかになっていないが、その候補にはインターロイキン 8 (interleukine-8: IL-8) のようなサイトカインや transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) のような成長因子、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS)、カルシウムイオン、一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO)、Cox-2 や NDPH oxidase などの酵素が含まれる。このように RIBE には多種多様なシグナル物質が関与するが、そのシグナル伝達は細胞の種類や細胞密度、生物学的評価点などの生物学的要素と照射放射線量や放射線種などの物理学的要素に依存すると考えられる。

多くの研究グループによって *in vitro* 環境の RIBE に対するシミュレーション研究が行われてきた。Khvostunov and Nikjoo は照射細胞からある数のたんぱく質様シグナル (Protein-like Molecule Signal: PLMS) が放出し、それが熱拡散により非照射細胞へ伝達する生物物理学的モデル (ByStander Diffusion Modeling: BSDM) を考案した<sup>(3)</sup>。Ballarini らは、低密度に培養された細胞環境で数個の細胞をマイクロビーム照射したときの RIBE を模擬したモンテカルロシミュレーションを行った。このあと、同グループは RIBE を伝搬するサイトカインのよう

\* 北海道科学大学保健医療学部診療放射線学科

なシグナルの濃度変化に注目したシミュレーションを行った<sup>(4)</sup>。この研究では、サイトカインを RIBE におけるシグナル伝達物質として扱い、RIBE を再現することに成功した。従って、RIBE のシグナル伝達経路としてのサイトカインのようなたんぱく質による培地経由 RIBE の存在は、低密度 *in vitro* 細胞培養環境におけるシミュレーション研究でも証明された。

一方で、Shuryak らは解析的に解ける形で RIBE を説明するモデルを構築した<sup>(5)</sup>。彼らはこのモデルを、人工 3 次元ヒト皮膚システムに対して適応した。このシステムは従来使われてきた培養細胞系よりも、生理学的に *in vivo* 環境に近いものである。RIBE に関わるシグナルが、0.95~1.00 mm, 0.65~0.70 mm の範囲でそれぞれ、アポトーシス、微小核形成の誘導に関与していることを見いだした。また、この研究で RIBE を伝搬するシグナル伝達経路には、少なくとも一つの非常に速くシグナルを伝える経路の存在を示唆した。

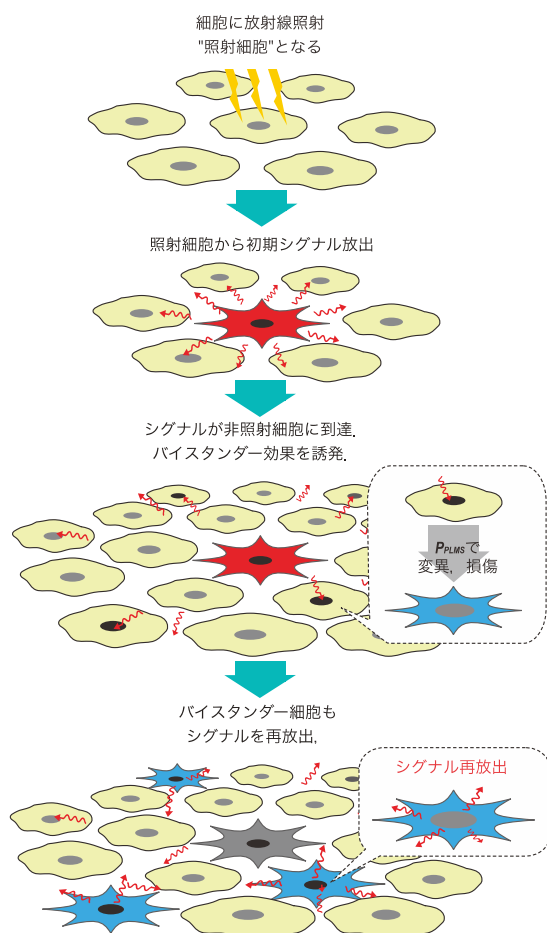


図1 シミュレーションモデル概略

また Xia らは、Khvostunov and Nikjoo と同様の仮定に基づき、PLMS シグナルの拡散をモンテカルロ法によりシミュレーションし、RIBE が伝播する範囲について検討した<sup>(6)</sup>。Xia らの研究では、初期シグナル数、シグナルが細胞を損傷する確率 ( $P_{dam}$ ) と、損傷した細胞が 1 個のシグナルを再放出する確率 ( $P_{em}$ ) の 3 つを変数として用いている。さらに Xia らは、シグナル再放出過程を考慮することによって、RIBE による損傷細胞の空間分布を再現した。この研究では損傷細胞から再放出するシグナルは 1 個に限定しているが、再放出シグナル数は一定ではなく、その再放出は確率的な事象として考えるのが自然である。加えて、Xia らのモデルではすべての変数が任意の値を取り得るため、それらの値を一意に決定することが難しいという問題もあった。

本研究では RIBE のシグナル伝達およびその動態について知見を得ることを目的としている。そこで、バイスタンダー応答を受ける非照射細胞の時空間分布を明らかにするため、Xia らのモデルを改良した Poisson 統計に基づくシグナル再放出モデルを開発し、Schettino らの行った軟 X 線マイクロビームによる単一細胞照射実験<sup>(7)</sup>を対象とした確率的モデルを構築し、計算機シミュレーションを行った。

## 2. シミュレーションモデル

対象とした Schettino らによる実験<sup>(7)</sup>は細胞同士が物理的に接触しないよう低密度で培養しているため、ここでは照射細胞から放出される可溶性高分子 (PLMS) が熱拡散によって培地中を移動することによるシグナル伝達 (MM) のみを考慮した。同実験では、RIBE により損傷を受けた細胞が観察領域内に集団 (クラスター) を形成していたことが報告されている。本研究ではこの点に着目して、シミュレーションに損傷細胞からのシグナル放出を考慮した、Poisson 統計に基づくシグナル再放出モデルを新たに開発した。また、照射細胞から放出される初期シグナル数と、バイスタンダー応答を受けた細胞からシグナルを再放出する確率に注目し、モンテカルロ法によって損傷細胞の空間分布を推定した。図 1 にモデルの概略図を示す。

本研究では、照射細胞および損傷細胞が放出したたんぱく質様シグナル (PLMS) が細胞外を移動することで RIBE が伝播するという仮説のもとで現象の説明を試みた。モデルの仮定を以下に説明する。

はじめに、照射細胞から放出されたシグナルは培養皿に充填した培地中を移動すると仮定する。培地を充填した際の厚みは、平面方向の拡がりと比較して3桁以上小さいため、シグナルは二次元の拡散方程式に従って移動するものとした。ここで、時刻  $t$  におけるシグナルの原点からの変位の二乗の平均は、以下の式(1)で表される。

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt \quad (1)$$

ここで、 $D$ は拡散係数である。本モデルではシグナルを一般的なサイトカインとして計算した。それらの物質は約 10 kDa の質量を持ち、その質量から実験的に求めた細胞質中の拡散係数  $D = 10^{-8} \text{ nm}^2 \text{ s}^{-1}$  (8) をシミュレーション条件として使用した。計算時の単位時間は 1 秒とした。

次に、シミュレーションでの細胞径を一般的な哺乳類の細胞から  $25 \mu\text{m}$  と仮定した。シグナルが非照射細胞の中心から  $12.5 \mu\text{m}$  に近づくと、図1のようにその細胞は確率  $P_{PLMS}$  で“損傷細胞”になり、そのシグナル物質は消滅するものとした。このとき損傷を受けた細胞は連鎖反応を誘発し、 $k$  個のシグナルを確率  $P_{re}$  で生成し、細胞外へ放出するものと仮定した。本研究ではこの確率  $P_{re}$  は Poisson 統計に従うものとし、 $\mu$  を平均再放出シグナル数とすると、 $k$  個のシグナルを再放出する確率  $P_{re}(\mu, k)$  は、

$$P_{re}(\mu, k) = \frac{\mu^k}{k!} e^{-\mu} \quad (2)$$

で表される。図2に式(2)で計算した  $\mu = 0.5$  から 5.0 までのシグナル再出確率  $P_{re}$  のグラフを示す。さらに総再放出確率  $P_{reT}$  を以下のように定義する。

$$P_{reT}(\mu) = \sum_{k=1}^{\infty} P_{re}(\mu, k) \quad (3)$$

ここで、式(3)では、 $k = 0$  はシグナルが再放出しない場合になるため除外した。

全てのシグナルは活性化時間  $T_a$  を持ち、生成されてから  $T_a$  経過すると不活性化するものと仮定し、追跡を終了する。シミュレーションにはモンテカルロ法を使用し、259,200 ステップ(実時間換算で3日間)すべてのシグナルを追跡した。乱数シードを変更して、上記の手順を統計的に十分な回数で繰り返し計算した。シミュレーションプログラムコードはFortran90言語で作成し、疑似乱数発生器にはMersenne Twisterを使用した。

シミュレーションで設定した幾何学的条件、モデル変数を以下に述べる。細胞の位置座標は、Schettino らの実験結果(7)を用いた。サイトカ

イン固有受容体の存在確率が約 1% であることから(9)、細胞損傷確率  $P_{PLMS}$  を 0.01 と仮定した。RIBE を媒介するシグナル物質が60時間以上活性化状態を保ったという報告(10)から、 $T_a = 60$  [時間] と仮定した。照射細胞から  $t = 0$  に放出されるシグナルの数(初期シグナル数  $n_i$  とする)は、 $n_i = 10, 15, 20, 25, 30$  の5通りとした。それぞれの  $n_i$  に対し、平均再放出シグナル数( $\mu$ )を0.5から5.0まで変化させ最適な再放出シグナル数を推定した。

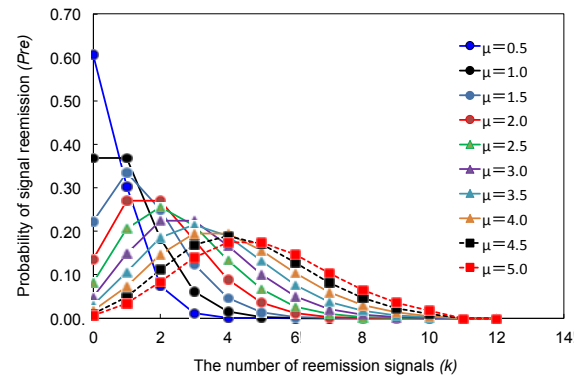


図2 シグナル再放出確率(Pre)

### 3. 結果と考察

#### 3-1. バイスタンダー細胞の空間分布

シミュレーション終了後に記録した損傷細胞分布の例を図3に示す。半径 3 mm の円の中心にある★は照射細胞、●は RIBE によって損傷を受け増殖能を失った細胞、○は影響を受けなかった正常細胞を示す。半径 3 mm の円は点線によってそれぞれの幅が 0.5 mm のドーナツ型領域を形成している。図のように損傷細胞が観察領域内に均一に分布する傾向を再現することができた。

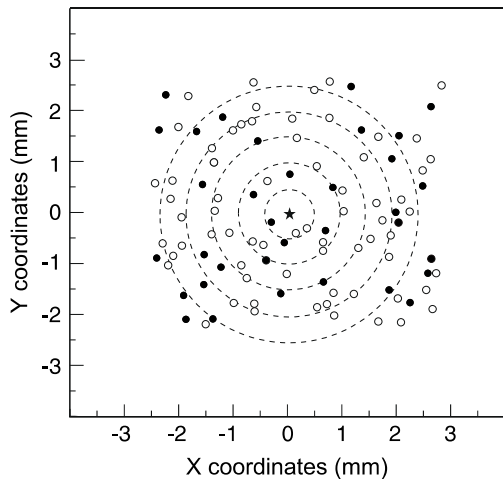


図3 シミュレーションによるバイスタンダー細胞の空間分布の一例

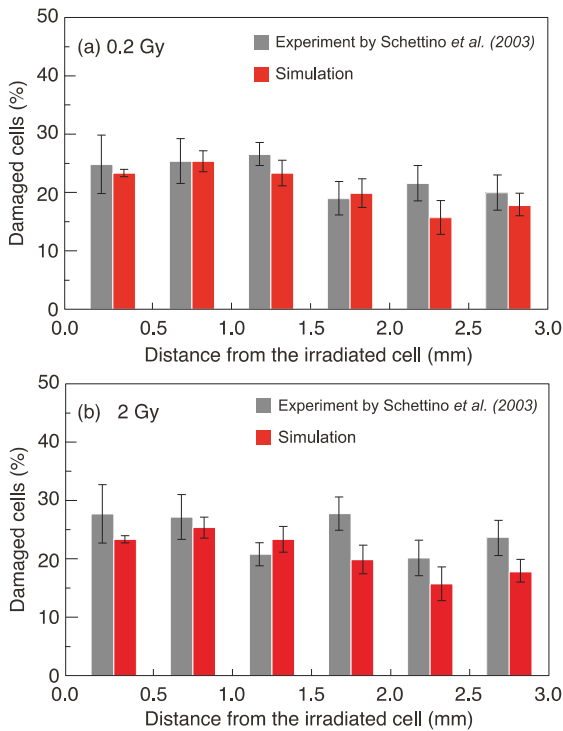


図4 損傷細胞の距離別割合

### 3-2. 距離別解析

次に、照射細胞からの距離別(ドーナツ型領域ごと)に解析した損傷細胞数の割合を図4に示す。この図はシミュレーション結果を文献より得た実験結果と比較したものである。図4(a)は中心の細胞1個に0.2 Gy照射, (b)は同様に2 Gy照射した場合を示す。吸収線量に関する変数は設定していないため、これらは実験に一致するように変数を変化させてシミュレーションを行った結果である。

図4より、シミュレーション結果は誤差の範囲で実験結果と一致した。しかし、図4(b)を見ると、照射細胞からの距離が1.5~2.0 mmの領域では1.0~1.5 mmよりも約7%の増加がみられるが、シミュレーションでは再現できなかった。照射細胞から初期シグナルを放出すると仮定しているため、通常は照射細胞から離れるに従って損傷細胞が減少すると考えられる。しかし、平均再放出シグナル数( $\mu$ )を変えて多数回繰り返した試行により、照射細胞から離れても損傷細胞の割合は必ずしも単調減少しなかった。この傾向は、本研究で導入したPoisson統計に基づくシグナル再放出確率によるシグナル伝達の結果であると考えられる。

次に、シミュレーションで得られた中心から*i*番目のドーナツ型領域( $i = 1 \sim 6$ )における損傷細胞の割合の平均を $r_{sim}(i)$ とし、同様に文献から得た割合の平均を $r_{exp}(i)$ とする。シミュレーション結果の実験結果に対する一致度を、観察領域全体( $i = 1 \sim 6$ )の平均二乗偏差(root mean square deviation: RMSD)で評価した。RMSDは以下のように計算できる。

$$RMSD(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 [r_{exp}(i) - r_{sim}(i)]^2}{6}}$$

それぞれの初期シグナル数( $n_i$ )と平均再放出シグナル数( $\mu$ )に対してRMSDを計算した。0.2 Gy, 2 Gy照射した場合の、平均再放出シグナル数( $\mu$ )とRMSD(%)の関係を図5に示す。初期シグナル数 $n_i = 10, 15, 20, 25, 30$ の5通りにおいて、RMSDは $\mu = 1.0 \sim 2.5$ で最小値を持つことがわかった。RMSDは実験結果との差異を表すため、この範囲でシミュレーションが実験とよく一致していることを表す。また、初期シグナル数( $n_i$ )が増加するに従い、RMSDが最小値をもつ平均再放出シグナル数( $\mu$ )が減少する傾向があった。

### 3-3. 損傷細胞数の時間依存性

また、本提案モデルを使用したシミュレーションにより、シグナル伝達時間の推定を試みた。図6に観察領域内全体における照射後経過時間( $t$ )と損傷細胞の割合の関係を示す。シミュレーションによるシグナル追跡時間は、3日間(4,320分)とした。図6から、観察領域内全体では3,600分(60時間)で飽和していることがわかる。次に各ドーナツ型領域に評価したものを図7に示す。ここで、縦軸

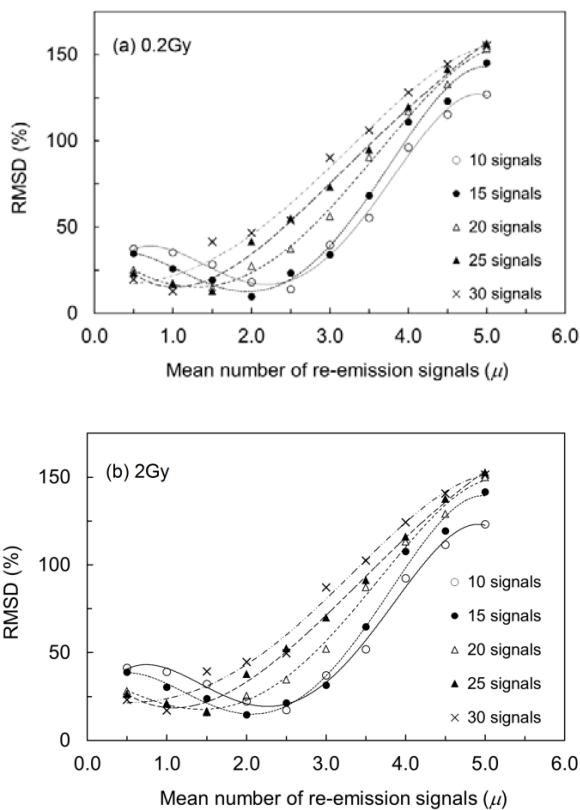


図5 初期シグナル数 ( $n_i$ ) と平均再放出シグナル数 ( $\mu$ ) を変えて行ったシミュレーションと実験結果<sup>(7)</sup>のRMSD (%)

は損傷細胞数を 4,320 分(3 日間)の値で規格化した。照射細胞からの距離が 0.0~1.5 mm までの 3 つのドーナツ型領域では、1,440 分(24 時間)で損傷細胞数が飽和した。一方、照射細胞からの距離が 1.5~3.0 mm の 3 つのドーナツ型領域では、2,880 分(2 日間)を過ぎても増加した。本モデルではシグナルの活性化時間を 60 時間(3,600 分)としているため、3,600 分付近で損傷細胞数が飽和するが、その後の損傷細胞の増加は再放出シグナルによるものと考えられる。

本研究で対象とした Schettino らの報告を始めとする低密度細胞培養環境での RIBE 実験では、観察期間を 3 日間としているものが散見される。これは、3 日間程度の十分に長い観察時間を設けないと、RIBE の影響が培養皿全体に行き渡らないためと推察される。よって、本研究で開発したモデルは密度細胞培養環境における RIBE 伝達動態をよく再現するものであることが示唆された。

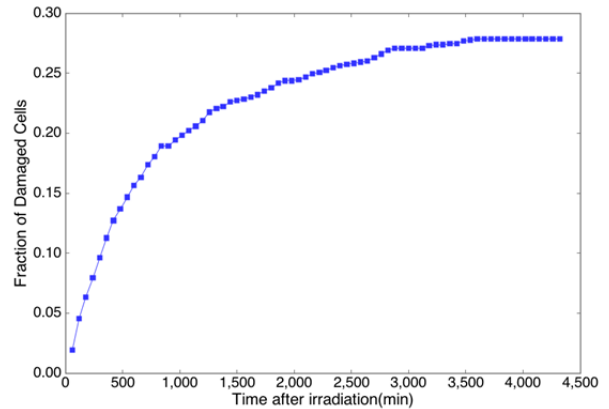


図6 観察領域内全体における照射後経過時間と損傷細胞の割合の関係

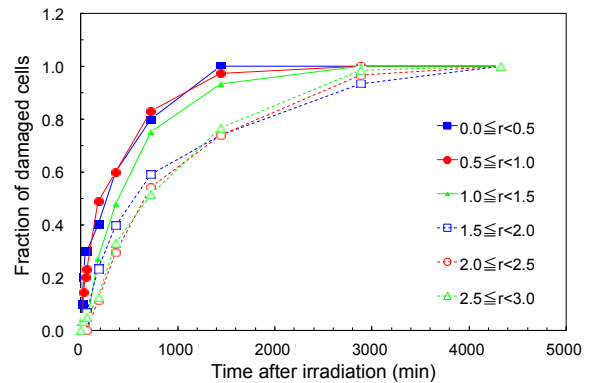


図7 各ドーナツ型領域での照射後経過時間と損傷細胞の割合の関係

#### 4. まとめ

本研究では Poisson 統計を導入した新たなシミュレーションモデルを開発し、低密度培養細胞環境における放射線誘発バスターンダー効果(RIBE)に対するシミュレーションを行った。このモデルを用いたモンテカルロシミュレーションの結果は、Schettino らの行った RIBE 実験と良く一致した。このシミュレーションにより、RIBE によって損傷を受けた細胞からのシグナル再放出確率を推定した。加えて、この提案モデルによるシミュレーションで RIBE の伝達時間について検討を行い、培地経由 RIBE の伝達動態について新たな知見を得た。シミュレーション結果から、培養皿全体では RIBE による細胞損傷は約 60 時間で飽和することを示唆した。また照射細胞からの距離毎にも解析を行い、RIBE のシグナル伝達時間の距離依存性を明らかにした。

## 5. 参考文献

- (1) H. Nagasawa and J. B. Little. "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of  $\alpha$ -particles". *Cancer Research*, Vol. 52, No. 22, pp. 6394–6396, 1992.
- (2) C. Mothersill and C. Seymour. "Radiation-induced bystander effects: past history and future directions". *Radiation Research*, Vol. 155, No. 6, pp. 759–767, 2001.
- (3) H. Nikjoo and I. K. Khvostunov. "Biophysical model of the radiation-induced bystander effect". *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 79, No. 1, pp. 43–52, 2003.
- (4) F. Ballarini, D. Alloni, A. Facchetti, A. Mairani, R. Nano, and A. Ottolenghi. "Modelling radiation-induced bystander effect and cellular communication". *Radiation Protection Dosimetry*, Vol. 122, No. 1-4, pp. 244–251, January 2007.
- (5) I. Shuryak, R. K. Sachs, and D. J. Brenner. "Biophysical models of radiation bystander effects: 1. Spatial effects in three-dimensional tissues". *Radiation Research*, Vol. 168, pp. 741–749, 2007.
- (6) J. Xia, L. Liu, J. Xue, Y. Wang, and L. Wu. "Modeling of radiation-induced bystander effect using Monte Carlo methods". *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B*, Vol. 267, No. 6, pp. 1015–1018, 2009.
- (7) M. Schettino et al., "Low dose studies of bystander cell killing with targeted soft X rays". *Radiation Research*, Vol. 160, No. 5, pp. 505–511, 2003.
- (8) K. Jacobson and J. Wojcieszyn. "The translational mobility of substances within the cytoplasmic matrix". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 81, No. 21, pp. 6747–6751, 1984.
- (9) H. R. Petty. "Molecular biology of membranes". Springer, 1993.
- (10) C. Mothersill and C. Seymour. "Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells". *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71, No. 4, pp. 421–427, 1997.