

令和元年6月24日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0079

研究課題名(和文)放射線生体ストレス応答のシステム生物学

研究課題名(英文) Systems biology for cellular responses to radiation stress

研究代表者

横谷 明德 (YOKOYA, Akinari)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員(定常)

研究者番号：10354987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線ストレスに対する非線形な細胞応答を調べるためのツールとして、従来の放射線源であるX線に加え、細胞や細胞集団の局部照射を可能とする高エネルギー加速器研究機構・放射光実験施設(フォトンファクトリー)のX線マイクロビームを用いた実験手法を確立した。この技術を様々な蛍光プローブと組み合わせることで、放射線照射による細胞競合や組織回復効果などの検証を行うことが可能になった。また低線量放射線に対する細胞の放射線適応応答に関して初めてとなる、多数の酵素反応のフィードバック反応を考慮した数理モデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内・細胞間の複雑な反応ネットワークとして放射線に対する生体の頑強性と影響生起を捉え、これを実験と理論の両面から検討した本研究は、従来の研究手法には無いシステム生物学的な視点からの知見を当該研究領域に加えることができた。特に放射光X線マイクロビームをツールとして、細胞・細胞集団の特定部位にのみ放射線を照射することで、細胞(集団)応答の非線形性を検討するための有力なツールの開発に成功した。また、複雑な放射線適応応答についてもこれを数理モデル化することに初めて成功し、当該研究分野にシステム生物学の手法を初めて適用する先駆けとなった。

研究成果の概要(英文)：A novel experimental approach was established to investigate nonlinear cellular responses to radiation stresses using synchrotron X-ray microbeam which allows targeting a particular region in a cell or cell population. Combining the beam technique with fluorescent probes, cell competition induced by irradiation or tissue-sparing effect can be analyzed. The theoretical modeling of cellular response initiated by DNA damage and repair, as well as various network reactions including feedback loops in the radiation adaptive response, was also established.

研究分野：放射線生物物理学

キーワード：放射線影響 放射光X線マイクロビーム 器官培養組織 細胞競合 放射線適応応答 数理モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子生物学的手法の導入により、放射線による DNA 損傷とその修復に関する分子レベルの理解は急速に進みつつある。しかし素朴な疑問として培養ディッシュ上の細胞集団に一樣に X 線を照射した場合でも、生存してコロニー形成能を維持する細胞とそうでない細胞に別れ、全ての細胞が“半分だけ生存”している中間状態とはならない。このような不連続で“非線形”な細胞応答は、これまで放射線生物学分野の基礎とされてきた標的理論やこれに基づく反応断面積では説明できない。放射線に反応する個々の細胞内における反応ネットワークに含まれるフィードバック回路の特性を、機能分子の活性化に関する時間発展(ダイナミクス)に基づいて理解する必要がある。さらに上位の階層構造である細胞集団においても、照射・非照射細胞間のコミュニケーションに依存するバスタンダー効果や細胞競合などの非線形な細胞応答に関して近年実験的知見が急速に蓄積されつつあり、これらの根底にある放射線生体応答に関する一般化された数理モデル化の必要性が指摘されるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、照射細胞の運命を決定する細胞内反応ネットワークのスイッチング機構及び三次元培養細胞系における細胞間コミュニケーションによるストレス応答を、実験及び理論的な数理モデルの両面から解明することを目指した。実験と理論が車の両輪となって研究を主導することで、細胞内及び細胞間のコミュニケーションを支配する一般則の理解を進め、放射線ストレスが引き起こす生体システムへの影響生起の本質を見極めることを目標とした。

3. 研究の方法

シンクロトロン X 線マイクロビームを利用し、細胞あるいは細胞集団の特定部位のみへの放射線照射を実施した。試料としては、動物培養細胞、細胞集団、器官培養組織を用いた。照射後の細胞の分裂や増殖、分化の様子を、それぞれの細胞ステージに特異的に発現するよう設計された蛍光ラベルタンパク質の時間動態(ダイナミクス)を、ライブセル観察により時間動態として調べた。また低線量放射線に対する細胞内の複雑な反応ネットワークに着目し、MAPK カスケードを含むポジティブフィードバックを考慮した放射線適応応答のモデリングを実施した。特に、タンパク質の活性の度合いを連続値で表した微分方程式モデルについて検討を行った。

4. 研究成果

放射線ストレスに対する非線形な細胞応答を調べるためのツールとして、従来の放射線源である X 線に加え、細胞や細胞集団の局部照射を可能とする高エネルギー加速器研究機構・放射光実験施設(フォトンファクトリー)の X 線マイクロビームを用いた実験手法を確立した。この技術を様々な蛍光プローブと組み合わせることで、放射線照射による細胞競合や組織回復効果などの検証を行うことが可能になった。また低線量放射線に対する細胞の放射線適応応答に関して、多数の酵素反応のフィードバック反応を考慮した数理モデルを構築した。以下、これら得られた成果の内、特に重要なものについて述べる。

(1) 器官培養マウス精巣に対する空間的に線量変調させた照射による精子形成能の影響

高いがん治療効果をあげている強度変調放射線治療(IMRT)であっても、周囲の正常組織への放射線影響により不妊など影響が出る恐れがある。これを低減化することを最終目標とし、任意のビーム形状が利用できる X 線マイクロビームの持つユニークな特性を生かし、器官培養した *Acr-GFP* トランスジェニックマウスの胎児の精巣に対して横幅 12.5、50 及び 200 μm のサイズの縦長ビームを簾状にそれぞれ 25、100 及び 400 μm の間隔で照射を行った。試料が受ける総線量を一定にした上で GFP 蛍光発現により精子形成能を評価した。その結果、50 及び 200 μm のサイズでは、精子形成能はコントロール(非照射)に近いレベルまで回復したが(図 1)、細胞サイズに近い 12.5 μm まで横幅を狭めると回復能は著しく阻害された。これらの結果から、非照射部位で生き残った精幹細胞が簾状の照射損傷部位へ移動し、大幅な機能回復が観測されたことが推測された。放射線の線量に対し単純な線形応答をしないことを見出した興味深い成果であり、Scientific Report 誌に投稿し現在査読結果に対して改定中である(Fukunaga et al. submitted)。

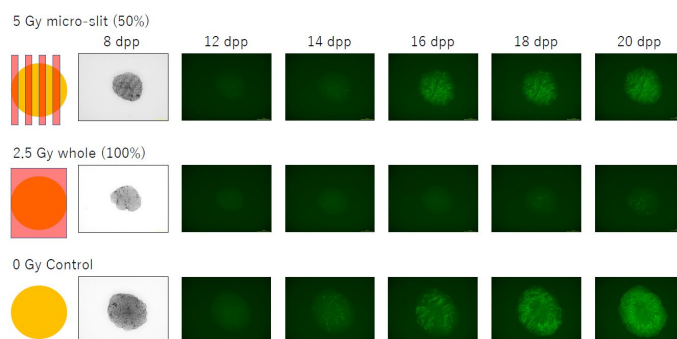


図 1 器官培養したマウス精巣に対するすだれ状のマイクロビーム照射

上: 照射部位が 5 Gy となるように 200 μm のビーム幅、ビーム間隔 200 μm で照射した場合。照射面積は試料面積の 50% となるため、試料全体の平均線量は 2.5Gy となる。中: 試料全体に均一に 2.5Gy を照射した場合。下: コントロール(非照射)

(2) 細胞競合影響研究のためのマイクロビーム照射技術開発

低線量環境下では、放射線を受けた少数の細胞が多数の正常細胞の集団中に混在する可能性がある。この場合、両者の競合によって弱い細胞が排除される「細胞競合」という現象が起こる可能性がある。これもまた、単純に線量に線形的に依存しない生体反応であると考えられるが、競合が起こる条件については未解明の部分が多い。本研究では、ラットから得た乳腺の培養細胞集団中の一部の細胞に蛍光タンパク質により目印をつけてX線マイクロビームを照射することで、X線のヒットした細胞とヒットしていない細胞とを同一組織内に混在させ、その後の照射細胞と非照射細胞の細胞動態を追跡するための実験系の構築を目指した。異なる蛍光タンパク質（GFPとDsRed）を発現する二系統のラットから抽出した乳腺上皮細胞を単離し、1:10の割合でそれぞれの細胞を混合して培養し、モザイク状に細胞が混ざった立体的なコロニーをマトリゲル内に作らせた(図2)。この立体コロニーにマイクロビームを照射した時の効果を、蛍光顕微鏡を用いた継時観察する実験スキームを確立することに成功し、現在実験データの蓄積を行っている。

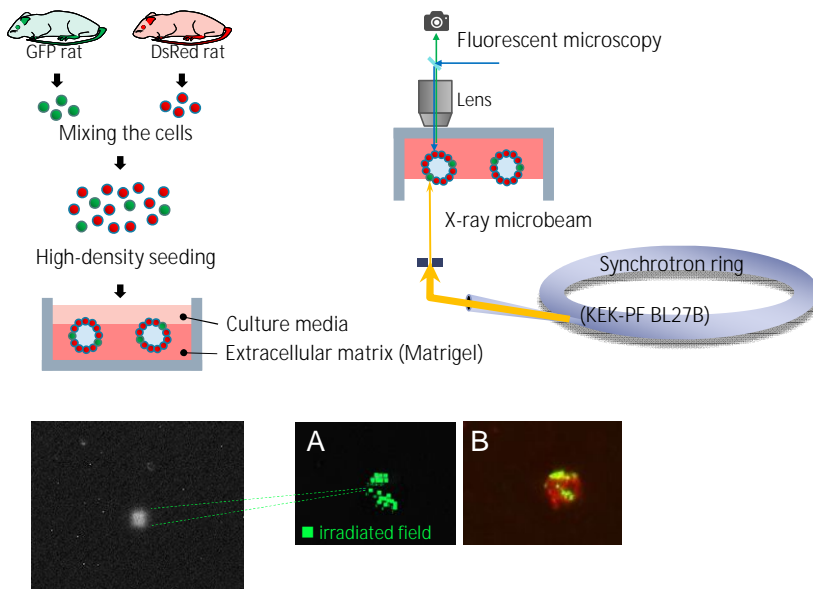


図2 二種類の蛍光タンパク質（GFPとDsRed）発現細胞からなる細胞集団に対するX線マイクロビーム照射のセットアップの模式図

写真：左は実際のX線マイクロビームを蛍光板に照射した像（ビームサイズは $10 \times 10 \mu\text{m}$ ）、AはGFP発現細胞のみを用いて照射した際の制御PC上のターゲティング画面、Bは実際に照射した細胞画像で、GFP(緑)とDsRed(赤)が混在した細胞集団であることが分かる(照射1時間後に撮影)。

(3) 細胞に低線量放射線をあらかじめ照射（事前照射）すると、その後の高線量放射線を照射した時に細胞に現れる影響が事前照射なしと比べて減少する放射線適応応答（以下、適応応答）が報告されている。適応応答は、事前照射のタイミング（時間）や最適線量があることが報告されており、細胞運命を決定づけるための何らかのスイッチング機構が存在することが推測される。適応応答に関する細胞内シグナリングには、PKC、p38 MAPK、PLCなどのタンパク質が関与する反応のポジティブフィードバックが含まれていることが明らかになりつつある。本研究では、これを考慮した数理モデルを構築し、適応応答のシステム生物学的な解析を試みた。図3に示したシグナリングモデルにおいて、 $x_1(t)$ 、 $x_2(t)$ 、 $x_3(t)$ は、それぞれPKC、p38 MAPK、PLCの活性の度合いの時間変化を表す。フィードバック回路への入力は、細胞に照射された線量 $u(t)$ 、出力は放射線への適応度 $y(t)$ とした。矢印は影響を与える方向を表しており、影響の強さは与える側のタンパク質の活性の度合いに依存している。モデルの入出力関係を、従来研究の実験で得られた放射線適応応答の時間・線量依存性と比較検討を行った。モデルの動作式は、図1を基にタンパク質の活性の度合いを連続値で表した微分方程式モデルを構築した。モデルの入出力関係と実験データを比較し、 $x_1(t)$ 、 $x_2(t)$ 、 $x_3(t)$ の振る舞いや各要素間の影響を調べた結果、 $x_1(t)$ 、 $x_2(t)$ 、 $x_3(t)$ が一定値に収束する活性パラメータの条件では、線量 $u(t)$ を入力すると、適応度 $y(t)$ が一時的に増加し、その後、減少する過渡状態が観られた。さらに、線量 $u(t)$ の累積値の増加に対して、過渡状態における適応度 $y(t)$ の最大値が増加した。また、この最大値は、線量 $u(t)$ の累積値が一定値を超えると飽和した。この結果から、本モデルの過渡状態のふるまいは、放射線適応応答の時間・線量依存性の非線形性と似た傾向が得られたため、放射線適応応答は、放射線刺激に対する細胞の一時的な過渡状態である可能性が示唆された。本研究成果は、論文として投稿準備中である。

PKC α -p38 MAPK - PLC δ 1のポジティブフィードバックを考慮した放射線適応応答の数理モデル化

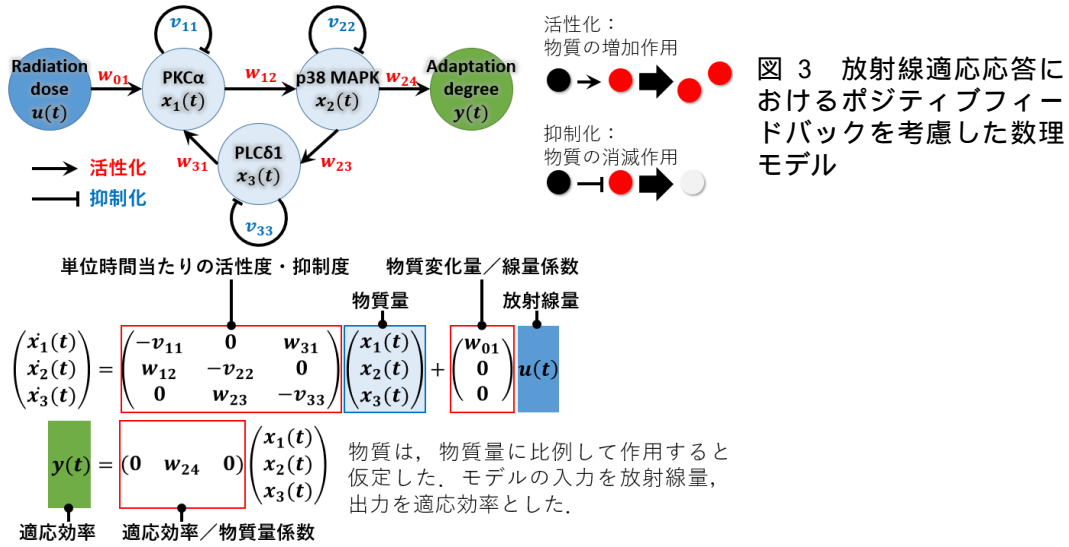


図3 放射線適応応答におけるポジティブフィードバックを考慮した数理モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

横谷明德、(巻頭言)真の放射線影響解明に向けて進む放射光マイクロビーム評価技術、放射線、44、125-125、(2019) 査読無

渡辺立子、服部佑哉、横谷明德、放射線照射による線量分布と生物影響の初期過程で生じるDNA 損傷応答のシミュレーション研究、放射線、44、131-134、(2019) 査読無

〔学会発表〕(計 15 件)

服部佑哉、今岡達彦、横谷明德、渡辺立子、乳腺末梢芽状突起の放射線応答の細胞数動態推定モデル、日本放射線影響学会第 61 回大会(長崎)(2018)

横谷明德、放射線による複雑な DNA 損傷の生成に関する物理化学的初期過程の研究、長崎原研研究会(招待講演)(長崎)、(2018)

横谷明德、放射光を量子ツールとして用いた生命・医科学研究、JEAQ-QST 放射光科学シンポジウム 2018(招待講演)(兵庫)、(2018)

横谷明德、神長輝一、浜田涼、宇佐美徳子、鈴木啓司、マイクロビーム X 線照射後のミトコンドリア活性変化のライブセル観察、若手放射線生物学研究会 H30 年度専門研究会(招待講演)(東京)、(2018)

渡辺立子、服部佑哉、横谷明德、放射線照射による線量分布と生物影響の初期過程で生じる DNA 損傷応答のシミュレーション研究、応用物理学会放射線分科会春季企画シンポジウム「真の放射線生体影響解明に向けて進む放射光マイクロビーム評価技術(招待講演)(東京)、(2018)

神長輝一、浜田涼、宇佐美徳子、鈴木啓司、横谷明德、X 線マイクロビームを用いた細胞内照射部位特異的なミトコンドリア応答の研究、第 31 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(つくば)(2018)

服部佑哉、渡辺立子、倉林大輔、横谷明德、放射線適応応答に関する細胞内シグナリングの数理モデル化、第 27 回日本数理生物学会年会(札幌)(2017)

Yuya Hattori, Hiroto Komiyama, Akinari Yokoya, Ritsuko Watanabe, Daisuke Kurabayashi, A mathematical model of enhanced DNA repair effect on cell survival in radiation-induced adaptive responses, 17th International Symposium on Microdosimetry (Venice, Italy), (2017)

服部佑哉、小宮山裕人、倉林大輔、横谷明德、渡辺立子、セルオートマトンをベースとした放射線適応応答解析モデルの構築、第 30 回自律分散システム・シンポジウム(名古屋)(2017)

服部佑哉、今岡達彦、横谷明德、渡辺立子、乳腺の末梢芽状突起の低線量放射線応答モデルの構築、日本放射線影響学会第 60 回大会(千葉)(2017)

杉本理峻、小林涼香、服部佑哉、渡辺立子、立花章、横谷明德、Ca²⁺オシレーションを含む細胞内ネットワークシステムの変化をパラメータとした放射線適応応答誘導経路のモデル化の試み、日本放射線影響学会第 60 回大会(千葉)(2017)

Yuya Hattori, Akinari Yokoya, Daisuke Kurabayashi, Ritsuko Watanabe, Computational analysis of

bystander signaling in cellular population irradiated with microbeam、第 55 回日本生物物理学会年会 (熊本) (2017)

服部佑哉、横谷明德、渡辺立子、バイスタンダー効果による DNA 二本鎖切断生成数の数理解析、第 59 回日本放射線影響学会(広島)、(2016)

横谷明德、神長輝一、渡辺立子、服部佑哉、鈴木啓司、泉雄大、藤井健太郎、放射線生体影響のメカニズム解明に向けた放射光利用研究、PF 研究会・福島環境回復を目指した放射光研究の現状と今後の課題(つくば)、(2016)

杉本理峻、神長輝一、服部佑哉、渡辺立子、立花章、横谷明德、低線量 X 線による放射線適応応答誘導経路のモデル化の試み、若手放射線生物研究会専門 H28 年度専門研究会「DNA 損傷応答機構の破綻と疾患」(招待講演) (東京)、(2016)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：服部 佑哉
ローマ字氏名：HATTORI, Yuya
所属研究機関名：東京工業大学
部局名：工学院
職名：助教
研究者番号(8桁)：30709803

研究分担者氏名：今岡 達彦
ローマ字氏名：IMAOKA, Tatsuhiko
所属研究機関名：国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
部局名：量子生命科学領域
職名：チームリーダー(定常)
研究者番号(8桁)：40356134

(2)研究協力者

研究協力者氏名：福永 久典
ローマ字氏名：FUKUNAGA, Hisanori

研究協力者氏名：神長 輝一
ローマ字氏名：KAMINAGA, Kiichi

研究協力者氏名：杉本 理峻
ローマ字氏名：SUGIMOTO, Masatoshi

研究協力者氏名：渡辺 立子
ローマ字氏名：WATANABE, Ritsuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。