

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08215

研究課題名（和文）放射線誘発DNA二本鎖切断の修復過程における低酸素の影響

研究課題名（英文）Effect of hypoxia on the repair process of radiation-induced DNA double-strand breaks

研究代表者

平山 亮一（Hirayama, Ryoichi）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 重粒子線治療研究部・主幹研究員

研究者番号：90435701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：がん組織には抗がん剤や放射線が効きにくいとされる低酸素領域が存在し、この低酸素がん細胞の根絶が、放射線によるがん治療では重要となる。がん組織内の低酸素細胞は、放射線照射後も一定の期間は低酸素状態にあるため、放射線誘発DSB（double-strand break）が低酸素状態でどのような修飾を受けるのかは明確になっていない。本研究ではDSBと微小核形成頻度を調べ、DNAレベルと染色体レベルでの損傷修復過程における酸素/低酸素の影響を調べた。DSBは低酸素環境下で修復効率の低下が認められ、重粒子線誘発DSBであっても同様の傾向を示した。一方、微小核形成では修復時の酸素の影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の中には様々な酸素濃度の異なる細胞が存在し、放射線照射後も様々な酸素濃度の微小環境下で生物応答が行われている。しかし、このような状況を模擬した研究報告はほとんど無いため、放射線の照射前、中、後を低酸素状態に保つことで、実際の腫瘍内の微小環境の一部を模擬することが、重要と考えた。その結果、本研究からは放射線照射後の酸素濃度の違いが異なる生物応答を誘導することを発見した。放射線照射後の生物応答に酸素濃度が深く関わることは、分割照射の間隔や薬剤併用の投与タイミングを考える上で重要な知見と考え、放射線がん治療の高度化に有益な成果を提供したものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cancer tissues contain hypoxic regions that are considered to be ineffective against anticancer drugs and ionizing radiation, and eradication of these hypoxic cancer cells is important in cancer therapy by ionizing radiations. Since hypoxic cells in cancer tissues remain hypoxic condition for a certain period of time after irradiation, it is not clear how radiation-induced double-strand breaks (DSBs) are modified by hypoxia. In this study, we examined DSBs and micronuclei formation on frequency to investigate the effects of oxia/hypoxia on the damage repair process at the DNA and chromosome levels. DSBs repair efficiency showed a decrease under hypoxic condition, and even heavy particle induced DSBs showed a similar trend. On the other hand, no effect of oxygen during repair was observed in micronuclei formation.

研究分野：放射線生物物理学

キーワード：放射線 重粒子線 DNA二本鎖切断 微小核形成 低酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療にとってがん細胞に対する生物効果を向上させることは重要であり、特に低酸素による放射線抵抗性の克服は必須の検討課題である。原子核を加速させ、腫瘍に狙いを絞って照射する重粒子線治療は、従来の放射線治療(X線やガンマ線)に比べ、高い細胞致死効果を示し、低酸素による放射線抵抗性にも効果を示す放射線である。研究代表者は、重粒子線特異的な生物効果を明らかにするため、低酸素環境下での培養細胞に対する放射線作用やDNA二本鎖切断(DSB)の生成とその修復機構を調べてきた。その結果、重粒子線はDNAに直接的に損傷を生成させ、その損傷は修復が困難であることを明らかにした。さらにX線では、低酸素環境下での照射は大気下での照射に比べDSB量が著しく低下するが、重粒子線では低酸素環境下であっても修復困難なDSBを大気下とほぼ同程度生成することができ、高い細胞致死効果を示すことを定量的に明らかにしてきた。これらの低酸素実験は照射後、大気環境下で培養を行い細胞致死やDSBの定量を行っている。それゆえ、これらの実験は放射線照射時における酸素の役割(酸素効果)を知るうえで最適な実験系であった。しかし、実際の腫瘍では放射線治療後にも低酸素領域は存在し、一部のがん細胞は低酸素環境下で放射線に対する生物応答をしているものと予想される。そこで予備的に低酸素下でのX線照射後に生じたDSBを、そのまま低酸素環境下で修復を行う予備実験を開始した。するとDSBの修復効率は、大気下と低酸素下では明らかに異なることが判明した。以上の結果から、放射線照射後の酸素/低酸素の役割を明らかにするためには、X線や重粒子線などの放射線によって生じた複雑性が異なるDSBが、照射後の酸素環境によってどのような修復動態を示すかを明らかにするとともに、細胞の生死に照射後の酸素環境がどの程度関わっているのかを明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、放射線抵抗性を引き起こすと予想される低酸素環境でのDSB修復動態や細胞の生死と関連性のある微小核形成頻度を調べ、放射線照射後の生物応答に対する低酸素の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

X線誘発DSBの修復時における低酸素の影響(照射後の酸素効果)をまとめ、重粒子線誘発DSBにおいても低酸素環境下でのDSB修復について調べた。さらにX線では"照射後の酸素効果"が観察されていることから、細胞の生死と関連性のある微小核形成頻度を調べ、DSB修復以外の生物効果にも低酸素の影響が関与するか明らかにした。

1) 重粒子線誘発DSBの修復における低酸素の検討

X線実験と同様に、重粒子線実験でもCHO細胞を用いて定電圧電気泳動法によりDSBを定量する(Hirayama R et al., J Radiat Res, 46, 325-332, 2005)。低酸素環境はこれまでの実験で用いた低酸素置換装置を用いて、95%N₂/5%CO₂混合ガスにより、CHO細胞を低酸素状態(酸素濃度0.04%以下)にし、重粒子線照射を行った(Hirayama R et al., Radiat Phys Chem, 78, 1175-1178, 2009)。大気下で修復を行う場合は照射容器からサンプルを取出し、インキュベータに移動させた。また低酸素下での修復は照射容器を密封させ、ウォーターバスにて保温し、95%N₂/5%CO₂混合ガスを流しながら修復を行った。重粒子線は低酸素による放射線抵抗性が2倍程度(酸素効果が約2)であるアルゴン線および放射線抵抗性がほとんど現れない(酸素効果が約1)鉄線を使用した。DSB修復時以外では、すべての作業を低温で行った。

2) 低酸素環境下での微小核形成

前述の低酸素置換装置を用いてCHO細胞の微小核形成頻度を、サイトカラシンBを用いた細胞分裂阻害微小核形成アッセイにより行う。照射前にサイトカラシンBを添加し、照射後48時間大気下もしくは低酸素下で培養を行い、蛍光抗体により微小核を計測する。微小核形成実験は*in vivo*実験ですでに経験があり、本研究においても同様の方法で実施した。(Hirayama R et al., Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 793, 41-47, 2015)。

4. 研究成果

放射線誘発DNA損傷の修復過程における低酸素の影響を明らかにするため、X線、炭素線、シリコン線、アルゴン線ならびに鉄線を用いて~200 keV/micrometreまでのLET依存性を調べた。実験はチャニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞を用いて行われ、DNA-DSBは定電圧電気泳動法にて定量した。酸素濃度は0.026%以下であり、この無酸素状態で照射や修復(5時間)を行った。X線や他の重粒子線誘発DSBに対する低酸素環境下での修復は、大気下での修復よりも効率が悪いことが明らかになった。また同実験システムを用いて、エンドポイントを微小核形成にしてX線照射実験を行った。照射後の低酸素処理は48時間とした。微小核形成では低酸素下修復した群は大気下修復した群よりも微小核形成頻度が抑えられる傾向を示したが、統計的には有意差がつかなかった。DNA修復欠損細胞を用いても同様の傾向が示された。これまでの結果をまとめると、DNA断片の結合修復において、酸素の関与が認められ、低酸素環境では修復効率が低

下ることがわかり、高 LET 放射線でも同様の傾向を示した(一部統計的な有意差はなかった)。また、細胞致死と関連の深い微小核形成頻度を調べると、その形成頻度には酸素の関与は小さいことがわかった。よって、低酸素環境下で修復されなかった DNA-DSB は致死損傷にあまり寄与しておらず、致死損傷となり得る DNA-DSB は効率的・選択的に修復が行われていたと推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirayama Ryoichi, Ito Atsushi, Uzawa Akiko, Matsumoto Yoshitaka, Noguchi Miho, Li Huizi, Suzuki Motofumi, Ando Koichi, Okayasu Ryuichi, Hasegawa Sumitaka, Furusawa Yoshiya	4. 巻 195
2. 論文標題 Lethal DNA Lesions Caused by Direct and Indirect Actions of X rays are Repaired via Different DSB Repair Pathways under Aerobic and Anoxic Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 441 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-20-00235.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Le Sech Claude, Hirayama Ryoichi	4. 巻 159
2. 論文標題 Dual aspect of radioenhancers and free radical scavengers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 103 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 平山亮一、高野勇貴、前田宗利、岩田宏満、永根大幹、松本孔貴、富田雅典、小西輝昭	4. 巻 57
2. 論文標題 FLASH 放射線治療の歴史と今後の展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 放射線生物研究 (Radiation Biology Research Communications)	6. 最初と最後の頁 31 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakano Toshiaki, Akamatsu Ken, Tsuda Masataka, Tujimoto Ayane, Hirayama Ryoichi, Hiromoto Takeshi, Tamada Taro, Ide Hiroshi, Shikazono Naoya	4. 巻 119
2. 論文標題 Formation of clustered DNA damage in vivo upon irradiation with ionizing radiation: Visualization and analysis with atomic force microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2119132119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Dousatsu, Suzuki Masao, Hirayama Ryoichi, Abe Yasushi, Muramatsu Masayuki, Sato Shinji, Belov Oleg, Kyriakou Ioanna, Emfietzoglou Dimitris, Guatelli Susanna, Incerti Sebastien, Inaniwa Taku	4. 巻 13
2. 論文標題 Performance Evaluation for Repair of HSGc-C5 Carcinoma Cell Using Geant4-DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6046 ~ 6046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13236046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Du Junyan, Kageyama Shun-Ichiro, Hirata Hidenari, Motegi Atsushi, Nakamura Masaki, Hirano Yasuhiro, Okumura Masayuki, Yamashita Riu, Tsuchihara Katsuya, Hojo Hidehiro, Hirayama Ryoichi, Akimoto Tetsuo	4. 巻 585
2. 論文標題 Comparative analysis of the immune responses in cancer cells irradiated with X-ray, proton and carbon-ion beams	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Li Ping, Liu Xiongxiang, Zhao Ting, Li Feifei, Wang Qiqi, Zhang Pengcheng, Hirayama Ryoichi, Chen Weiqiang, Jin Xiaodong, Zheng Xiaogang, Wang Zhen, Li Qiang	4. 巻 7
2. 論文標題 Comparable radiation sensitivity in p53 wild-type and p53 deficient tumor cells associated with different cell death modalities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-021-00570-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 平山亮一
2. 発表標題 FLASH : 1 回大線量による生物効果軽減のメカニズム
3. 学会等名 第 20 回九州放射線治療システム研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平山亮一
2. 発表標題 低酸素環境下における光子ならびに重粒子放射線が与える生物効果の機構解明
3. 学会等名 第58回アイソトープ・放射線研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoichi HIRAYAMA, Akiko UZAWA, Yoshiya FURUSAWA and Sumitaka HASEGAWA
2. 発表標題 Why are there an increase in RBE and a decrease in OER with increasing LET?
3. 学会等名 RAON School of Bio-Medical Research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山亮一、鶴澤玲子、高野勇貴、平野祥之、長谷川純崇
2. 発表標題 培養細胞における高LET放射線誘発致死損傷：生物学的効果比（RBE）と酸素増感比（OER）における放射線の直接作用と間接作用の関連性
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoichi Hirayama, Yuki Tabrez Ahmed Takano, Akiko Uzawa, Sumitaka Hasegawa
2. 発表標題 Micronucleus formation by X-ray in CHO cells in hypoxia
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平山亮一
2. 発表標題 酸素効果が生じるメカニズム-放射線化学的側面から-
3. 学会等名 第11回放射線生物学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平山亮一、鶴澤玲子、古澤佳也、長谷川純崇
2. 発表標題 Rejoining efficiency of X-ray-induced DSBs in hypoxia
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山亮一、鶴澤玲子、古澤佳也、長谷川純崇
2. 発表標題 Efficiency of DSB rejoining depends on oxygen environment
3. 学会等名 Radiation Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山亮一、鶴澤玲子、古澤佳也、長谷川純崇
2. 発表標題 X線誘発DSBの修復に酸素の存在は重要であるか？
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 宮下 宗治（平山 亮一）ほか	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社インナービジョン	5. 総ページ数 123
3. 書名 月刊インナービジョン	

1. 著者名 福士 政広（平山 亮一）ほか	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 412
3. 書名 第1種放射線取扱主任者試験 マスター・ノート	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平野 祥之 (Hirano Yoshiyuki) (00423129)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	ISMO	University of Bordeaux		
中国	Chinese Academy of Sciences	中国科学院大学	Northwest Normal University	
ロシア連邦	Joint Institute for Nuclear Research	Dubna State University		

共同研究相手国	相手方研究機関			
ギリシャ	University of Ioannina			
オーストラリア	University of Wollongong			