

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17215

研究課題名（和文）不均一放射線場における放射線影響推定へ向けたモデル開発

研究課題名（英文）Model development for estimating radiation effects in non-uniform radiation fields

研究代表者

松谷 悠佑（Matsuya, Yusuke）

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 原子力科学研究所 原子力基礎工学研究センター・研究員

研究者番号：20826929

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞実験と計算科学による複合的アプローチを用いて、不均一放射線場において発生する照射細胞と非照射細胞間の細胞間シグナリングによる生物学的効果の解明を目指して研究を行った。既存の細胞殺傷効果予測モデルを発展させることで、細胞間のシグナリングを考慮した新たな数理モデルを開発した。また、細胞を含む培養フラスコの50%の面積を遮蔽するシンプルな不均一放射線場や臨床の複雑な放射線場に対して、細胞間シグナリングがもたらす放射線感受性へのインパクトを解析した。これらの研究により、強度変調放射線治療における腫瘍制御や正常細胞への副反応の正確な評価を可能とする放射線影響モデルの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体スケールの微視的エネルギー付与分布やDNA損傷応答、細胞間シグナリングを総合的に考慮して、不均一放射線照射後に発生する細胞死を再現する数理モデルの開発に成功した。様々な不均一放射線場にて変化する放射線感受性を高精度に予測可能な本研究のモデリングは、効率的な腫瘍制御法や正常細胞の副反応の評価を実現する基盤となるものである。今後本研究で得られた成果を基盤に研究を進展させることにより、放射線被ばく後の生物学的効果の正確な理解につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the biological effects by intercellular signaling between irradiated and non-irradiated cells under non-uniform radiation fields from standpoints of cell experiments and computational science. Modifying an existing cell-killing model, we have developed a new model considering intercellular signaling between irradiated and non-irradiated cells. Using simple non-uniform radiation field, in which 50% area of cell culture flask was shielded, and complex clinical radiation fields, we also evaluated the impact of intercellular signaling on radiosensitivity. Through these studies, we have succeeded in developing a theoretical model that enables predicting tumor control and side effects of normal cells in intensity-modulated radiation therapy with high precision.

研究分野：放射線生物学

キーワード：不均一照射 細胞死 細胞間シグナリング 数理モデル

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療では、腫瘍組織への付与線量を集中させる一方で、正常組織へのダメージを最小限に抑えるために、複数方向から危険臓器を避けて照射する強度変調照射による多門照射法が用いられる。このような照射法では、腫瘍組織や正常組織内の線量分布は不均一となり、照射細胞と非照射細胞が共存した微小環境が成立するために、これら細胞間のシグナル効果が生じる。今日までの膨大な実験研究から、照射細胞から非照射細胞に伝達するシグナル物質（一酸化窒素や活性酸素種）によって非照射細胞内に DNA 損傷や細胞死等の生物効果を引き起こすバイスタンダー効果の存在が明らかになってきた。一方で、ある特定のシグナル物質は放射線照射後の生存率を増加させる放射線誘発適応応答(レスキュー効果)を示唆する報告も存在する。このように、照射細胞と非照射細胞で伝達される双方向の細胞間シグナルが腫瘍組織の細胞殺傷効果に影響を与えることが予想されているにも関わらず、双方向の細胞間シグナルによる生物学的効果の全貌は未だ解明されていない。そのような背景から、不均一な線量分布下で発生する照射細胞と非照射細胞間のシグナル効果の細胞応答メカニズムの解明は急務であるが、生物実験によるアプローチだけでは非効率かつ限界もある。そこで、数理モデルを活用したシミュレーション研究を組合せた検討が必要な段階にある。

## 2. 研究の目的

本研究では、不均一放射線場で発生する放射線感受性を予測する数理モデルの開発を行い、細胞実験を組み合わせた複合的な研究アプローチにより、照射細胞と非照射細胞間の双方向のシグナル効果をもたらす生物学的効果の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

不均一放射線場において発生する照射細胞と非照射細胞間の双方向の細胞間シグナル効果による生物学的効果の解明を目指して、(1)細胞間シグナルを考慮した放射線感受性予測モデルの開発、(2)提案モデルを検証する細胞実験、(3)細胞間シグナル効果を考慮した放射線治療計画のシミュレーションを実施した。

### (1) 細胞間シグナルを考慮した細胞応答予測モデルの開発

細胞間シグナルを考慮した放射線感受性予測モデルの開発においては、先行研究で開発を進めてきた統合的な細胞生存率予測モデルである integrated microdosimetric-kinetic (IMK) モデルを改良することでモデル開発を進めた。この IMK モデルには、染色体サイズに相当する  $\mu\text{m}$  オーダーの微視的線量に関する不均一分布[1]や、放射線照射下の DNA の発生と修復[2-4]、細胞周期依存性等[2,5]が組み込まれている。本研究のモデル開発では、まず、非照射細胞に生じる生物効果については、多数のバイスタンダー効果に関する文献値に基づき、照射細胞から非照射細胞へ伝達されるシグナル物質により発生する DNA 損傷の線量依存性をモデリングした。一方、細胞間シグナルにより誘発する放射線抵抗性については、不均一放射線照射後の初期 DNA 損傷(二本鎖切断)の収率の変化に着目することでモデリングを行った。この開発した数理モデルを活用し、不均一放射線場で被ばくした被照射細胞群の放射線感受性の解析を行った。

### (2) 提案モデルを検証するための細胞実験

3種類の細胞株(ヒト皮膚正常細胞株 AG01522、ヒト前立腺がん細胞株 DU145、ヒト肺非小細胞がん細胞株 H1299)を使用した細胞実験を行い、細胞生存率データを実測した。この細胞実験では、図 1A に示すように、細胞を含む培養フラスコの 50%もしくは 100%の面積に 150kVp~225 kVp の X 線を照射し、急性照射もしくは分割照射後の細胞生存率や DNA 二本鎖切断数を測定し、不均一被ばくがもたらす生物学的効果への影響を評価した。同時に、細胞生存率に関する実測値と開発したモデルによる予測値と比較し、開発した数理モデルの妥当性を検証し、不均一被ばく下で発生する細胞間シグナル効果の細胞応答メカニズムの解明を行った。

また、低酸素培養キットである n-BIONIX を使用し、照射時の細胞内酸素濃度を 0~20%と変化させ、酸素濃度依存的に変化する DNA 損傷発生数と細胞生存率の関係性を測定した。同時に、20%酸素濃度と 0.0%酸素濃度条件下における活性酸素種濃度の測定も行い、放射

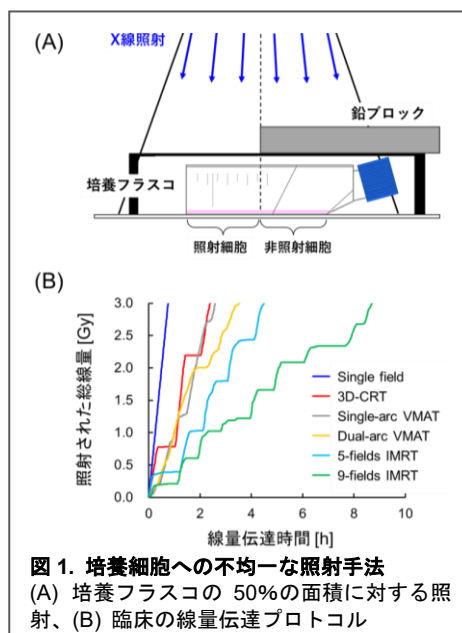


図 1. 培養細胞への不均一な照射手法  
(A) 培養フラスコの 50%の面積に対する照射、(B) 臨床の線量伝達プロトコル

線照射後に細胞内で発生される活性酸素種濃度と不均一照射後の放射線感受性の関係についても調べた。これら低酸素培養を活用した測定により、双方向の細胞間シグナル効果の細胞応答メカニズムの解明を一層進めた。

### (3) 放射線治療を模擬したシミュレーション

最後に、細胞間シグナル効果を考慮した放射線治療計画のシミュレーションを実施した。このシミュレーションでは、一門照射法、3次元原体照射(3D-CRT)、強度変調回転照射法(VMAT)や強度変調放射線治療(IMRT)の全6種類の放射線療法を想定し、図1Bに示す線量伝達プロトコルを採用した。これら臨床の線量伝達プロトコル(細胞に対する線量率情報)を開発したIMKモデルに入力し、正常細胞であるAG01522と腫瘍細胞であるDU145の細胞生存率を推定した。この放射線治療計画シミュレーションにより、細胞間シグナルにより誘発する放射線抵抗性が臨床の治療効果(細胞殺傷効果)に与える影響を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞間シグナル効果を考慮した数理モデルの開発

まず、放射線照射中のDNA損傷応答(修復ダイナミクス)と細胞間シグナル誘発DNA損傷を考慮したIMKモデルを用いて、正常細胞であるAG01522ならびにDU145細胞に対する不均一照射後の細胞生存率と照射中の回復効果を解析した。その成果の一部を図2に示す[6]。同吸収線量における全照射野を用いた照射(培養フラスコの100%の面積に対する照射)と半照射野(50%の面積に対する照射)を用いた細胞実験結果の比較から、半照射野を用いた照射時には、照射野外細胞の生存率が優位に低下することを確認する一方で、照射野内細胞の生存率が増加する傾向を新たに発見した。非照射細胞に発生する細胞死の発生は、照射細胞から非照射細胞へ伝達される細胞間シグナルにより誘発されるDNA損傷応答(線量依存性)を考慮することで再現に成功した。このモデル開発の妥当性は、細胞間シグナルの一種である一酸化窒素の阻害剤(aminoguanidine)を使用した実験結果との比較により検証を行った。一方で、照射細胞へ誘発される細胞死発生の抑制効果は、非照射細胞から照射細胞へ伝達される細胞間シグナルにより誘導されるDNA損傷の初期発生数の減少(二本鎖切断サイトで活性化する53BP1 fociの実測数)を数理モデルに入力することで再現に成功した。

従来、照射細胞へ誘導される放射線抵抗性(別名、レスキュー効果)はDNA修復能率の向上に起因すると考えられてきたが、本研究で実施した半照射野を用いた照射実験からは、図2Bに示すように修復効果の重要度は低減されることが分かった。以上より、半照射野を用いた不均一照射時の照射細胞の生存率の増加は、初期損傷生成率の低減に起因するという新たな知見を得ることに成功した。

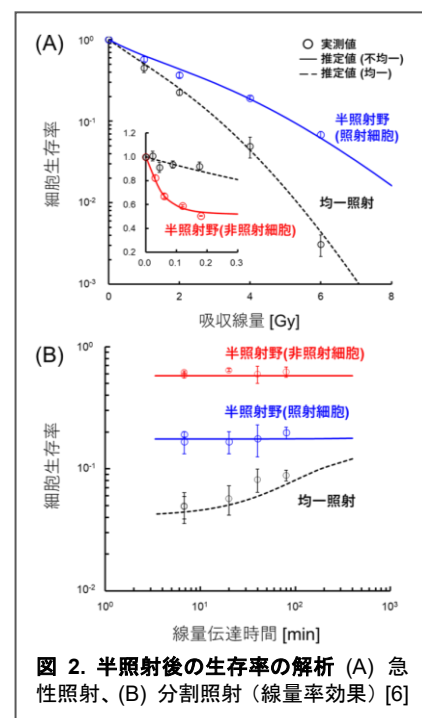
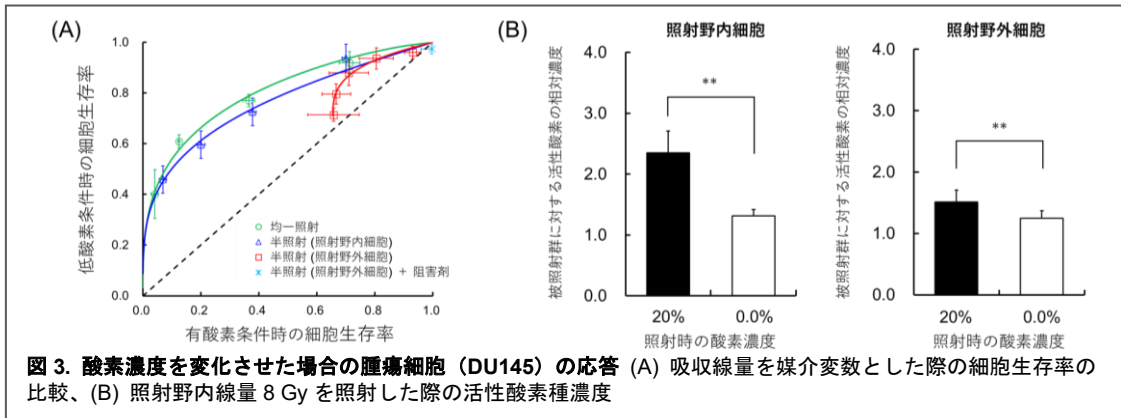


図 2. 半照射後の生存率の解析 (A) 急性照射、(B) 分割照射(線量率効果) [6]

### (2) 低酸素下における双方向の細胞間シグナル効果の細胞応答メカニズム

次に、双方向の細胞間シグナル効果の細胞応答メカニズムの解明を一層進めるために、低酸素培養キットであるn-BIONIXを活用して、酸素濃度を変化させた場合に生じる照射細胞と非照射細胞のDNA損傷(二本鎖切断)発生数と細胞生存率を調べた。その成果の一部を図3に示す[7]。図3Aは20%酸素濃度と0.0%酸素濃度におけるDU145細胞の生存率の測定結果であり、図3Bは半照射後に測定した細胞内の活性酸素種濃度の実測結果である。この実験成果から以下の3点が明らかとなった。(1)細胞間シグナル効果により非照射(照射野外)細胞に生じる二本鎖切断および細胞死の発生は酸素濃度に依存するが、その影響は照射(照射野内)細胞と比較して小さい(図3A参照)。(2)高線量照射の場合、細胞間シグナル効果により非照射細胞へ生じる生物効果の最大レベルは酸素濃度とほぼ無関係であるが(図3A参照)、活性酸素種の発生が重要な役割を果たす(図3B参照)。以上より、低酸素条件下における細胞間シグナリングは非照射細胞の二本鎖切断や細胞死の発生を増加させるが、その影響は照射細胞に比較して小さいことが明らかとなった。これら実験成果は、強度変調放射線を活用して低酸素下の腫瘍を照射する際の治療計画時において、放射線誘発の細胞間シグナリングを考慮する重要性を示すものであり、不均一被ばく後の細胞応答メカニズムの解明につなげることに成功した。



### (3) 放射線治療を想定した細胞殺傷効果の予測

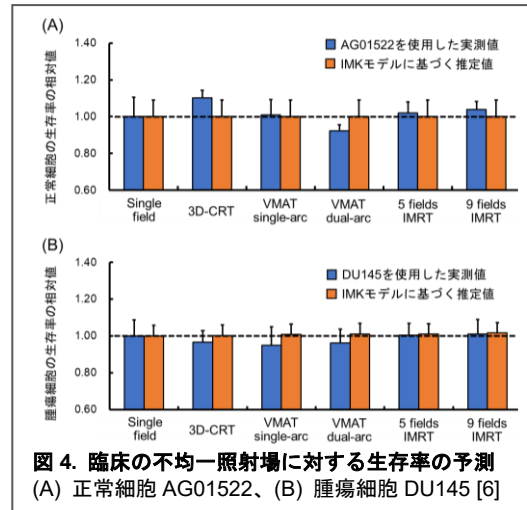
最後に、不均一放射線場において発生する細胞間シグナル効果が治療効果へ与えるインパクトを評価するために、一門照射法、3D-CRT、VMAT や IMRT を対象とした放射線治療計画シミュレーションを行った。図 4 に、臨床の 6 種類の線量伝達プロトコル (図 1B) に基づいて推定された生存率の結果を示す [6]。図 4 においては、ヒト正常細胞である AG01522 ならびにヒト腫瘍細胞である DU145 の 2 種類について、一門照射法を基準とした各放射線治療法の相対生存率の推定値と実測値が比較されている。図 4A ならびに図 4B の比較結果から、図 2B に示す半照射野を用いた生存率の傾向と同様に、不均一かつ複雑な照射となる臨床の線量伝達プロトコルにおいても照射細胞において修復効果の重要度が低減されることが分かった。

以上より、臨床で使用される線量伝達プロトコルにおいては細胞レベルで不均一な照射となり、治療効果の高精度な予測のためには照射細胞と非照射細胞間のシグナル効果 (照射細胞に誘導する抵抗性・線量率効果の重要性の低下) の考慮が不可欠であることが明らかとなった。

本研究では、細胞実験と計算科学による複合的アプローチを用いて、細胞間シグナリングによる生物影響の解明や細胞応答を統合的に予測するモデルの開発 [1-6] を進めた。半照射法のみならず臨床の複雑な線量伝達プロトコルに対して、照射細胞と非照射細胞間のシグナル効果をもたらす放射線感受性 (治療効果) へのインパクトを解析した [6,7]。得られた成果は、強度変調放射線治療における腫瘍制御や、正常細胞への健康影響の正確な評価に貢献するため、治療や防護分野でのインパクトは大きい。今後本研究で得られた成果を基盤に研究を進展させることにより、放射線被ばく後の生物学的効果の正確な理解につながると考えられる。

### 引用文献

1. A Model for Estimating Dose-Rate Effects on Cell-Killing of Human Melanoma after Boron Neutron Capture Therapy. Y. Matsuya, et al. Cells 9(5), 1117 (2020)
2. A theoretical cell-killing model to evaluate oxygen enhancement ratios at DNA damage and cell survival endpoints in radiation therapy. Y. Matsuya, et al. Phys. Med. Biol. 65(9): 095006 (2020)
3. Modeling of yield estimation for DNA strand breaks based on Monte Carlo simulations of electron track structure in liquid water. Y. Matsuya, et al. J. Appl. Phys. 126, 124701 (2019)
4. A simplified cluster analysis of electron track structure for estimating complex DNA damage yields. Y. Matsuya, et al. Int. J. Mol. Sci. 21(5): 1701 (2020)
5. Tumor radioresistance caused by radiation-induced changes of stem-like cell content and DNA repair capability. R. Fukui, R. Saga, Y. Matsuya, et al. Sci. Rep. 12, 1056 (2022)
6. Intensity Modulated Radiation Fields Induce Protective Effects and Reduce Importance of Dose-Rate Effects. Y. Matsuya, et al. Sci. Rep. 9:9483 (2019)
7. Oxygen enhancement ratios of cancer cells after exposure to intensity modulated X-ray fields: DNA damage and cell survival. Y. Matsuya, et al. Phys. Med. Biol. 66, 075014 (2021)



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuya Yusuke, McMahon Stephen J, Butterworth Karl T, Naijo Shingo, Nara Isshi, Yachi Yoshie, Saga Ryo, Ishikawa Masayori, Sato Tatsuhiko, Date Hiroyuki, Prise Kevin M | 4. 巻<br>66                    |
| 2. 論文標題<br>Oxygen enhancement ratios of cancer cells after exposure to intensity modulated x-ray fields: DNA damage and cell survival  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Physics in Medicine & Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>075014 ~ 075014 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1088/1361-6560/abf011   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Matsuya Yusuke, Fukunaga Hisanori, Omura Motoko, Date Hiroyuki   | 4. 巻<br>9                     |
| 2. 論文標題<br>A Model for Estimating Dose-Rate Effects on Cell-Killing of Human Melanoma after Boron Neutron Capture Therapy  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>1117 ~ 1117     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cells9051117   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Y. Matsuya, S. J. McMahon, M. Ghita, Y. Yoshii, T. Sato, H. Date, K. M. Prise  | 4. 巻<br>9,9483                |
| 2. 論文標題<br>Intensity Modulated Radiation Fields Induce Protective Effects and Reduce Importance of Dose-Rate Effects   | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>1-12            |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-019-45960-z   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Y. Matsuya, T. Kai, Y. Yoshii, Y. Yachi, S. Naijo, H. Date, T. Sato  | 4. 巻<br>126, 124701           |
| 2. 論文標題<br>Modeling of yield estimation for DNA strand breaks based on Monte Carlo simulations of electron track structure in liquid water   | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Applied Physics   | 6. 最初と最後の頁<br>1-8             |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-019-54081-6   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Y. Matsuya, T. Nakano, T. Kai, N. Shikazono, K. Akamatsu, Y. Yoshii, T. Sato                        | 4. 巻<br>21(5), 1701 |
| 2. 論文標題<br>A simplified cluster analysis of electron track structure for estimating complex DNA damage yields | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>1-13  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms21051701  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Y. Matsuya, T. Sato, R. Nakamura, S. Naijo, H. Date  | 4. 巻<br>65(9), 095006 |
| 2. 論文標題<br>A theoretical cell-killing model to evaluate oxygen enhancement ratios at DNA damage and cell survival endpoints in radiation therapy | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Physics in Medicine and Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>1-12    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1088/1361-6560/ab7d14   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Y. Matsuya, S.J. McMahon, M. Ghita, T. Sato, Y. Yoshii, T. Kai, H. Date, K.M. Prise                                       |
| 2. 発表標題<br>Protective effects induced following the exposure to modulated radiation intensity reduce importance of dose-rate effects |
| 3. 学会等名<br>日本放射線影響学会第62回大会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松谷悠佑、大村素子、福永久典                                   |
| 2. 発表標題<br>中性子照射中の細胞内ホウ素濃度と DNA 修復効果を考慮した BNCT 治療効果予測モデルの開発 |
| 3. 学会等名<br>日本放射線腫瘍学会第34 回学術大会(招待講演)                         |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Y. Matsuya, S.J. McMahon, T. Sato, K.T. Butterworth, R. Saga, H. Date, K.M. Prise          |
| 2. 発表標題<br>An integrated theoretical model for estimating cell death based on the DNA damage response |
| 3. 学会等名<br>日本放射線影響学会第64 回大会（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |