

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82502
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K21588
研究課題名（和文）単一細胞標的照射で誘発される細胞内酸素動態観察のための蛍光寿命顕微システムの構築

研究課題名（英文）Development of a fluorescence lifetime imaging system for observation of intracellular oxygen dynamics induced by single cell targeted irradiation in SPICE

研究代表者
大澤 大輔（Ohsawa, Daisuke）
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 物理工学部・主任技術員

研究者番号：90324681
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、陽子線マイクロビーム細胞照射装置SPICEに蛍光寿命イメージングシステムと低酸素照射チャンバを導入することで、ビーム照射を起点とする μs オーダーの細胞内酸素動態の可視化・定量を目的とする。SPICEと同等仕様のオフライン顕微鏡への蛍光寿命イメージングシステムの組み込み、最適化と性能評価を行った。また、低酸素対応ガス混合システムを導入し、低酸素照射チャンバを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPICE基幹部分に故障が発生し、期間内に当初の目的の達成には至らなかった。しかしながら、蛍光寿命イメージング（FLIM）技術を放射線生物研究に応用した例は未だなく、これまでの低酸素放射線抵抗性の研究は、培養液内の溶存酸素濃度のみを制御し、細胞集団へのブロードビーム様照射下で行われており、メカニズム解明には至っていない。FLIM導入には放射線の照射位置の特定、放射線とレーザー照射の同期が可能なマイクロビーム技術が必須であり、単一細胞レベルで放射線による物理化学反応と細胞内生物応答とをマルチモーダルに解析することで、抵抗性発現の本質に迫れると考えており、今後も引き続き研究を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：This study aims to visualize and quantify intracellular oxygen dynamics on the order of μs from targeted irradiation of single cells by incorporating a fluorescence lifetime imaging system and a hypoxic cell irradiation chamber into a single particle cell irradiation system (SPICE). We incorporated a fluorescence lifetime imaging system into an off-line microscope with specifications equivalent to those of SPICE, optimized it, and evaluated its performance. We also introduced a gas mixing system for hypoxia and developed a hypoxia irradiation chamber.

研究分野：放射線生物学

キーワード：マイクロビーム 蛍光寿命イメージング 低酸素放射線抵抗性 イオントラック構造 ライプセルイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陽子線マイクロビーム細胞照射装置 SPICE は、ブラッグピーク領域の 3.4 MeV 陽子線を直径約 2 μm に集束させ、1 個から任意個数を 400 個/分で細胞核/質を狙い撃ち照射できる世界でも類を見ない先進装置である。我々は、粒子線がん治療への応用を念頭に置き、SPICE の細胞選択照射能を活用して、放射線局所損傷による単一細胞内応答、あるいは、集団細胞間応答についてこれまでに多くの研究成果を挙げてきた。なかでも、集団細胞間応答として、放射線誘発バースタンダー効果に着目し、照射細胞から非照射細胞への DSB 損傷誘発、あるいは、非照射正常細胞から照射がん細胞への DSB 修復促進を見出した。得られた知見は、同種/異種細胞間の双方向シグナル伝達が細胞の放射線感受性に影響することを強く示唆しており、従って、*in vitro* での単一細胞レベルの細胞応答解析においても、がん患部とその周辺正常組織環境を可能な限り模擬することが不可欠であることを意味している。

腫瘍組織環境において、放射線感受性を左右する修飾因子として酸素効果が重要である。その発現は放射線照射直後の初期物理過程($\sim\text{ps}$)における二次電子放出と、その後の物理化学過程($\text{ns}\sim\mu\text{s}$)におけるラジカル生成・拡散に起因するため、その解明には放射線照射を起点として μs オーダーの細胞内酸素動態の可視化・定量が必要となるが、これまでその手段がなかった。一方、近年の蛍光寿命イメージング (FLIM) 技術の発展は目覚ましい。蛍光寿命は蛍光プローブ分子に固有な値を示し、光退色、励起光強度、励起波長に依存しないため、単一細胞レベルで濃度を非侵襲的に高速かつ高精度に定量できる。以上から、我々は、SPICE に FLIM 技術と低酸素環境を導入すれば、*in vitro* でがん患部とその周辺正常組織環境をほぼ完全に再現でき、単一細胞レベルの細胞応答解析から低酸素下にある腫瘍組織の放射線抵抗性を解明できるとの構想に至った。

2. 研究の目的

重粒子線がん治療はブラッグピークの線量集中性を活かし、有効ながん治療法としての地位を確立している。しかしながら、低酸素下にある腫瘍組織の放射線抵抗性を考慮した治療効果は未だ予測ができていない。放射線間接作用により照射直後($\text{ns}\sim\mu\text{s}$)から細胞内ではラジカルが生成・拡散する。酸素効果の本質は、これらラジカルと細胞内酸素とが反応産生する有機過酸化物により惹起される難修復性損傷であり、その解明には、極微の時空間スケールで、放射線による物理化学反応と細胞内生物応答とを同時に観測することが必要になる。

我々は、SPICE を用いて細胞内局所付与線量を制御することで、単一細胞レベルで異なる線量の損傷を模擬し、それに伴う修復過程を追跡できる。本研究では、SPICE に蛍光寿命イメージングシステムと低酸素照射チャンバを導入することで、さらに腫瘍組織環境をも模擬し、ビーム照射を起点とする μs オーダーの細胞内酸素動態の可視化・定量を目的とする。続いて、損傷・修復過程との相関解析により、低酸素による放射線抵抗性のメカニズムを解明し、ひいては、治療効果の予測へと展開するための研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

細胞へのマイクロビーム標的照射と蛍光寿命イメージングの概要は以下になる。すなわち、あらかじめ蛍光酸素プローブ分子を取り込ませた細胞を SPICE 専用皿に播種し、標的細胞核/質にマイクロビームを照射する。ビーム照射を起点として細胞内酸素濃度の時間変化を追跡するため、プローブ分子の励起波長の短パルスレーザーをパルスディレイジェネレータでビームに同期させて細胞に照射する。レーザー照射された細胞の蛍光を高速ゲートイメージンシファイアで増幅・時分割した後、高感度 CMOS カメラで撮像する。従って、蛍光寿命イメージングシステムとして新たに、短パルスレーザー光源、パルスディレイジェネレータ、高速ゲートイメージンシファイア、高感度 CMOS カメラの組み込みが必要となる。SPICE は照射位置決めとしてヘキスト染色された細胞核蛍光画像撮像のために蛍光顕微鏡 (Olympus BX-51) を備えており、レーザーはその光源として、その他 3 つもアダプタを介して既設顕微鏡に取り付け可能である。先行研究から、用いる蛍光酸素プローブ分子の励起波長、蛍光波長、溶存酸素濃度に対応する蛍光寿命範囲はそれぞれ $\sim 380\text{ nm}$ 、 $\sim 650\text{ nm}$ 、 $20\sim 70\ \mu\text{s}$ と分かっており、そこから組み込む機器の仕様が絞られる。仕様を満足する機器を組み込み、調整・最適化した後、蛍光寿命計測の性能を評価する。具体的には、既知の蛍光寿命(時定数)を持つ極薄プラスチックシンチレータを SPICE 専用皿の細胞播種位置に固定し、ビーム照射によるシンチレータ発光を時分割撮像することで蛍光寿命を求めエラー範囲内で値の一致を確認する。

チャンバを開発した後、細胞皿内の培養液を一定酸素濃度とし、蛍光酸素プローブ分子を混在させ、短パルスレーザー励起による蛍光を時分割撮像することで、溶存酸素濃度と蛍光時定数との相関曲線(検量線)を取得する。蛍光酸素プローブ分子については、Papkovsky らが、白金 Pt(II) を中心金属とするポルフィリン錯体をナノ粒子内に導入した NanO_2 を細胞内に取り込ませ、時間分解能を有するプレートリーダーで蛍光強度を測定することで、細胞内酸素濃度の定量に成功しており、まずはこれを第一候補とする。一方、近年、イリジウム Ir(III) を中心金属とする Ir 錯体が高脂溶性により細胞内に取り込まれやすいことが分かってきており、必要あればこれを

第二候補とする。

蛍光酸素プローブ分子を取り込ませた低酸素/常酸素細胞の細胞核にマイクロビームを照射し、同時に、プローブ分子を励起する短パルスレーザーも照射する。レーザー照射された細胞の蛍光を時分割撮像して蛍光寿命を評価し、さらに、検量線から溶存酸素濃度を定量する。ビーム照射後、細胞を固定し、さらに、 γ -H2AX, 53BP1 を指標として免疫蛍光染色し、蛍光顕微鏡で撮像・解析することで、DNA 二本鎖切断損傷・修復タンパク質の動態の酸素濃度依存性を取得する。

4. 研究成果

SPICE と同等仕様のオフライン顕微鏡への蛍光寿命イメージングシステムの組み込み、最適化と性能評価を行った。具体的には、顕微鏡に外部 TTL にて高速にオンオフ制御可能な LED 光源と高感度 CMOS カメラを設置した。続いて、細胞蛍光の模擬として、顕微鏡ステージ上で、標準線源 Am-241 からアルファ線を銀活性硫化亜鉛の粉末に照射し、放射されるシンチレータ光を 10 倍の対物レンズで集光した後、顕微鏡鏡筒内に設置した光電子増倍管で増幅させ、高速プリアンプで波形処理し、オシロスコープで波形計測したところ、低 S/N 比ながら、シンチレータ光の時定数にほぼ一致するパルスを取得できた。

現在、SPICE では、細胞は専用細胞皿のポリプロピレン薄膜上に播種され大気雰囲気下にて垂直下から薄膜越しにビーム照射される。SPICE と同等仕様のオフライン蛍光顕微鏡の既設ステージに組み込みできるように SPICE 細胞皿の専用アタッチメントを設計し、細胞を密閉容器内に封じ切ることができた。続いて、低酸素対応ガス混合システムを導入し、密閉容器内の CO₂ ガスの流量を制御することで、下面からビーム照射、上面からレーザー照射可能な低酸素照射チャンバを開発した。

一方で、SPICE 基幹部分に長年の使用に伴う経年劣化と思われる故障が発生し、その修理を実施せざるを得なくなった。具体的には、オンライン顕微鏡システムのレンズスライダ駆動部(S 軸)が故障したことにより、細胞蛍光画像の撮像、細胞位置座標の取得、細胞照準、照射の一連の動作が不能となった。また、オフライン顕微鏡システムにもレンズ駆動部(Z 軸)が故障したことにより、SPICE 照射細胞の観察、撮像、画像解析等が不能となった。これらの修理により計画に大幅な遅延が生じた。さらに、新型コロナウイルスの影響により顕微鏡用部品、試薬等の納品が大幅に遅れたことでマシンの日程調整に不具合が生じた。また、研究代表者の主要業務が課題申請時の研究(量子生命研・シングルセル応答解析・主任研究員)から加速器の運営管理(量医研・静電加速器運転室・主任技術員)へと変更になり、所属・職位・主要業務の変更後も研究継続に向け検討を続けたが、生物実験室・試料保管場所の確保、大型装置利用時間調整など様々な点で調整困難が生じた。

以上より、期間内に当初の目的の達成には至らなかった。しかしながら、蛍光寿命イメージング(FSIM)技術を放射線生物研究に応用した例は未だなく、また、これまでの低酸素放射線抵抗性の研究は、培養液内の溶存酸素濃度のみを制御し、細胞集団へのブロードビーム一様照射下で行われており、メカニズム解明には至っていない。FSIM 導入には放射線の照射位置の特定、放射線とレーザー照射の同期が可能なマイクロビーム技術が必須であり、単一細胞レベルで放射線による物理化学反応と細胞内生物応答とをマルチモーダルに解析することで、抵抗性発現の本質に迫れると考えており、今後も引き続き研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大澤大輔, 小西輝昭, 及川将一	4. 巻 QST-M-46
2. 論文標題 マイクロビーム細胞照射装置SPICEの研究&デベロプメント(R&D)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 令和4年度 共用施設 (PASTA&SPICE、NASBEE、X/ 線照射装置) 成果報告書	6. 最初と最後の頁 55-58
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 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke Ohsawa, Teruaki Konishi
2. 発表標題 STED microscopy of single ion tracks in a fluorescent nuclear track detector (FNTD) toward super-resolution cellular dosimetry
3. 学会等名 The 63rd Symposium of The Japanese Society of Microscopy
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤大輔, 小林亜利紗, 及川将一, 小西輝昭
2. 発表標題 蛍光飛跡検出器(FNTD)を用いたSPICEマイクロビームのビームサイズの計測
3. 学会等名 第34回固体飛跡検出器研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤大輔, 小西輝昭, 及川将一
2. 発表標題 マイクロビーム細胞照射装置SPICEの研究&デベロプメント(R&D)
3. 学会等名 令和4年度 共用施設 (PASTA&SPICE、NASBEE、X/ 線照射装置) 成果報告会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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	小林 亜利紗 (Kobayashi Alisa) (30773931)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・物理工学部・主任研究員 (82502)	
研究 分担者	小西 輝昭 (Konishi Teruaki) (70443067)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・チームリーダー (82502)	

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
---------	---------