

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710065

研究課題名（和文）

ブラッグピーク近傍の重粒子イオンを用いたイオン特異的な生物効果の研究

研究課題名（英文）

Ion-specific biological effect of heavy ion near the Bragg peak

研究代表者

小西 輝昭 (KONISHI TERUAKI)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・研究基盤センター・研究員

研究者番号：70443067

研究成果の概要（和文）：

重粒子イオンなどの荷電粒子放射（イオン）線は画期的な放射線がん治療法として実用段階にある。本課題では、ブラッグピーク近傍の重粒子イオンによる細胞致死効果およびDNA二本鎖切断（DSB）とその修復について解析を行った。細胞致死効果およびDSB誘発率を定量し、イオンの物理的な性質との相関を体系的に示した。また、それらDSBの殆どが培養細胞によって修復不可能なほど複雑な損傷であること、またDSB末端構造がイオン種によって異なることも証明した。

研究成果の概要（英文）：

Heavy-ions are in practical use as a radiation source for cancer-therapy, which is now one of the most effective techniques for treatments. In this work, we investigated the biological effectiveness of heavy ion near the Bragg peak, which region shows the drastic increase of energy deposition. We quantitatively analyzed the cell inactivation and DSB induction rate and demonstrated the systematic correlation of these biological effects between the physical properties of the ion. We also found that most of the induced DSBs were irreparable, which was due to the complexity of DNA damage. In addition, we showed evidence on the structural difference of DSB termini end depending on ion species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：放射線生物物理

科研費の分科・細目：環境学・放射線化学物質影響科学

キーワード：重粒子イオン、細胞致死、DNA二本鎖切断、DNA修復

## 1. 研究開始当初の背景

電離放射線の一種であるプロトンまたは重粒子イオンなどの荷電粒子放射線は、画期的ながん治療法として現在普及している。これ

らは、個々の荷電粒子の飛跡に沿って発生する $\delta$ -線により電離と励起を連鎖的に起こし、例えば $\delta$ -線のエネルギーとその密度分布は、特に重粒子イオンの止まり際には、急激な

LETの上昇(ブラッグピーク)とともに $\delta$ -rayの局所線量分布もイオンの飛跡に集中する。ブラッグピーク近傍のCイオンは290 MeV/nに比べてその $\delta$ -線の最大半径は10万分の1程度の数100 nm程度であるが、逆にその飛跡中心付近の局所線量は数100倍程度も大きい。このように、照射された細胞内の線量分布は空間的な分布(イオントラック構造)に大きな偏りを示すことになり、吸収線量(Gy)による生物影響評価だけでなく、イオントラック構造とその生物効果に関して評価する必要がある。このような重粒子イオンの生物効果は、イオン飛跡中心の電離密度の高い成分によるイオン特異的効果と、電離密度の低い低LETに類似する効果との和であると考えられる。しかし、重粒子イオンのブラッグピーク近傍では、エネルギー付与がイオン飛跡中心に最も集中するため、専らイオン特異的な生物効果が生じていると考えられるので、個々のイオン種固有の生物効果を検証することができる。ところが、単一イオン種のブラッグピーク近傍のイオンビームを提供できる照射場は世界的に見ても非常に少ない。そのため、現在までにこのような重粒子イオンのイオントラック構造とその生物効果を結びつけるに至っていない。例えば、治療または重粒子線生物研究に多く用いられるような高エネルギーに加速されたイオンは、その減速過程においてフラグメンテーションを起こし、軽二次粒子を発生する。そのため、このようなビームのブラッグピーク近傍ではいくつものイオン種による複合的な生物効果を示すと考えられ、イオン特異的な効果解明の目的には使用できない。したがって、イオン特異的な生物効果およびイオントラックとその生物効果の関係を明らかにするためにはフラグメンテーションを起こさない低エネルギーに加速したイオンを用いて、単一種の低エネルギーな重粒子イオンビームを用いて、イオン種の物理的な性質とそのDNA、細胞レベルでの生物効果を体系的に示す必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

プロトンまたは重粒子イオンなどの荷電粒子放射(イオン)線は画期的な放射線がん治療法として実用段階にある。これらの荷電粒子線は、局所線量分布がその飛跡に集中し、さらにはその止まり際において急激なLETの上昇(ブラッグピーク)を示すことから、これらの物理的な特徴を利用してがん患部の集中的な治療を可能にしている。しかし、このブラッグピーク近傍におけるイオンによる生物効果については、放射線生物学的な解析が不十分であり、基礎的な学問体系が確立されていない。本研究は、ブラッグピーク近傍の重粒子イオンを照射して、哺乳類培養

細胞におけるDNA損傷の誘発とその修復の研究から、イオン固有の高密度電離・励起による生物効果を明らかにするとともに、そのメカニズムを解くことを最終的な目標としている。

## 3. 研究の方法

ブラッグピーク近傍の重粒子イオンを哺乳類培養細胞に照射し、最も基礎的な放射線生物学的な評価である(1)コロニー形成法による細胞致死効果の測定、(2)パルスフィールド電気泳動(PFGE)法によるDNA二本鎖切断誘発率およびその修復率、修復速度の測定、(3) $\gamma$ -H2AXの免疫蛍光染色法によるDSB誘発部位の可視化および修復過程の追跡、(4)TUNEL法を用いてDSB二本鎖切断末端3' OH末端の検出を行った。培養細胞としては、CHO-K1細胞(チャイニーズハムスター)を用いた。

陽子線および重粒子線照射には、(独)放射線医学総合研究所の重粒子線がん治療装置HIMACより中エネルギービーム(MEXP)コースに導入されるイオンを用い、我々が開発した照射システムを用いて、ブラッグカーブ測定、線量測定、および試料の照射を行った。照射可能なイオン種およびLETを図1.に示した。

照射には、プロトン、C、N、O、Ne、Ar、Fe、の7種類を用い、それぞれのイオンのブラッグカーブに沿って、複数点の異なるLETにて照射実験を行った。

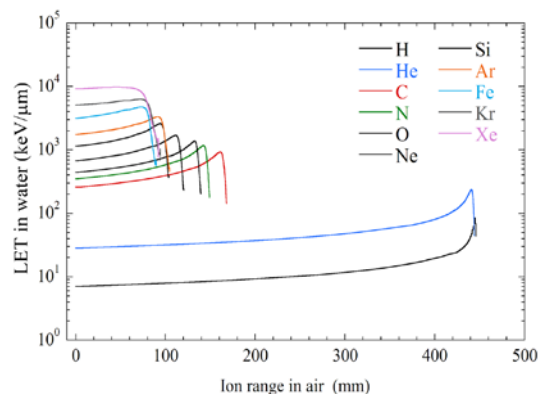


図1. HIMAC-MEXPに導入可能なイオン種およびその空気中における飛程とそのLET(ブラッグカーブ)を示した。

## 4. 研究成果

プロトンからFeイオンまで、7イオン種、合計17種類の異なるLETにおける致死的作用断面積( $\sigma$ )の取得をした(表1)。これらを表1および図2に示した。一般的に高エネルギーなイオンに見られるように、LETの増加に伴い、 $\sigma$ も増加するといった傾向は、

ブラッグピーク近傍では見られなかった。たとえば、Ne イオン、Ar イオンについては、LET の増加に対して、 $\sigma$  は減少が顕著に表れた。これは、イオントラック中心からの  $\delta$ -ray による局所線量分布が急激な減少を示すといったイオントラック構造を反映した結果であると考えられた。

また、C イオン (1.0 MeV/n, LET: 730 keV/ $\mu$ m)、Ar イオン (1.95 MeV/n, LET: 2650 keV/ $\mu$ m)、Fe イオン (4670 keV/ $\mu$ m) の三種類のイオンでの DSB 誘発率を PFGE 法を用いて測定し、照射によって断片化した DNA サイズに応じて分離し、そのサイズと DNA 断片量から Random Breakage Model を用いて、DSB 誘発率を求めた。図 3 に断片化した DNA サイズごとの DSB 誘発率を示した。重粒子イオンは、X 線や  $\gamma$  線のような低 LET 放射線とは異なり、小さい DNA 断片を効率良く生成した。そして、C イオン、Ar イオン、Fe イオンのそれぞれで DSB 誘発率は 22、64、36 DSB/ion と推定され、1 イオン通過によって誘発される DSB 数は細胞致死の  $\sigma$  と同様に、LET には依存せず、 $\delta$  線による局所線量分布から計算されるイオントラックの最大半径に依存しているように思われた。また、C イオン (1.0 MeV/n, LET: 730 keV/ $\mu$ m) によって誘発された DSB の修復過程についても着目した。同様に、PFGE 法を用いて、断片化した DNA 量を測定した。図 4 に示すように、X 線を 60 Gy 照射した際に誘発された 4.6 Mbp 以下の DNA 断片量は、細胞を通常の培養条件に 12 時間培養すると、0.3 程度までに減少する。しかし、C イオン及び Ar イオンによる DNA 断片量は全く減少しないことから、培養細胞によって修復が不可能な損傷が誘発されていることが推定できた。

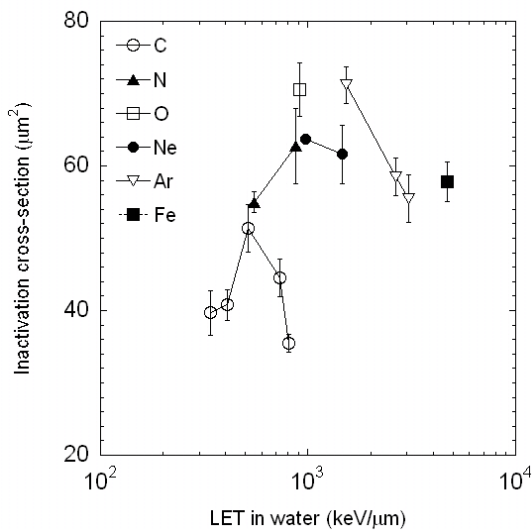


図 2. LET に対する致死の作用断面積

表 1. イオン、エネルギー、LET に対する致死の作用断面積 (cross-section,  $\sigma$ )。

ion	Energy MeV/n	LET in water keV/ $\mu$ m	cross-section $\mu$ m <sup>2</sup>
C	3.8	340	39.7 ± 3.1
	2.9	408	40.8 ± 2.1
	2.0	517	51.4 ± 3.3
	1.0	731	44.5 ± 2.6
	0.5	804	35.5 ± 1.2
N	2.3	550	55.0 ± 1.5
	0.9	870	62.7 ± 5.2
O	1.6	910	70.6 ± 3.7
Ne	3.0	974	63.7 ± 0.5
	1.1	1461	61.6 ± 4.0
Ar	2.9	1520	71.2 ± 2.5
	1.9	2652	58.5 ± 2.6
	1.7	3050	55.5 ± 3.3
Fe	1.1	4672	57.8 ± 2.7

また、DSB のマーカーと考えられているリン酸化ヒストンタンパク H2AX ( $\gamma$ -H2AX) に対して免疫蛍光染色法を用いて共焦点顕微鏡画像による解析を行った。一例を図 5 に示した。照射粒子密度から計算された細胞核あたりのイオン飛跡数に一致した  $\gamma$ -H2AX 蛍光スポット数を確認することができた。しかし、これら蛍光スポットは、細胞を照射 24 時間後までの経過観察では、 $\gamma$ -H2AX の消滅せず、また蛍光スポット数のはっきりとした減少も確認できなかった。その蛍光部位の形状変化から DSB は修復されていないが、DSB 部位の局在させているような細胞核内挙動が起きているのではないかと考えられた。

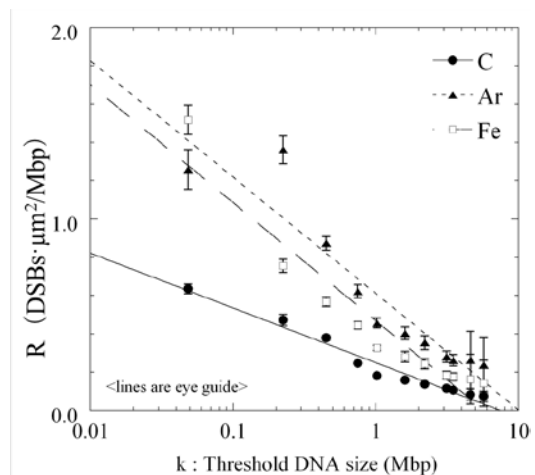


図 3. DNA 断片サイズに対する計算された DSB 誘発率 R。

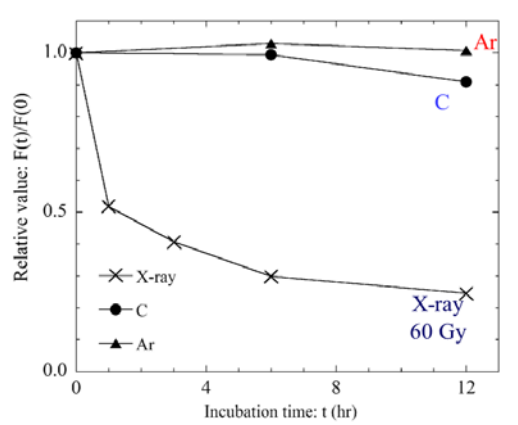


図4. 照射後、細胞を培養条件化にもどした。X線は、断片化したDNA量の減少するのに対して、CイオンとArイオンによって誘発されたDNA断片は減少しない。

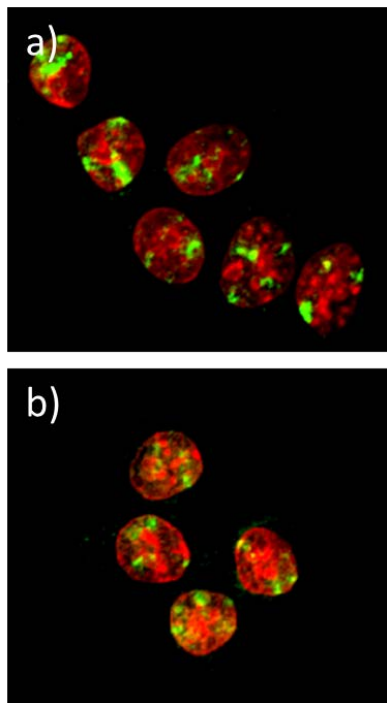


図5. Cイオンを平均3.5個/核の見積もりで照射し、a)照射1時間後、b)照射24時間後に細胞固定を行い、抗 $\gamma$ -H2AX抗体で免疫蛍光染色を行った。

次に、DSB切断末端についても、解析を進めた。制限酵素反応などでのDNA切断末端には、3' OHまたは5' Pが存在する。一般的に電離放射線によって誘発されるDSB末端には、これらは存在しないという報告がある。本研究でも、 $\gamma$ 線照射によって誘発された3' OHをTUNEL法を用いて検出するためには、およそ500 Gyの照射が必要であり、これはDSBをおよそ100 DSB/ $\mu\text{m}^2$ の密度で誘発したことになる。同様に、C、Ar、Fe、3種類のイオンについても同様に行った結果、Arイオン、Fe

イオンのブラッグピーク近傍で照射した細胞では、そのイオン飛跡に沿って3' OH誘発され、細胞上部から観察では蛍光スポットとして、細胞断面では蛍光ストライプ状に観察することができた。このことから、イオンの飛跡に沿って誘発されたDSBには、3' OHが生成されていることを確認した。しかし、Cイオンについては、3' OHを検出するには、細胞核あたり $2.6 \times 10^3$ 個のイオンを照射する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Konishi T, Takeyasu A, Natsume T, Furusawa Y, Hieda K, Visualization of Heavy Ion Tracks by Labeling 3'-OH Termini of Induced DNA Strand Breaks. J. Radiat. Res. 52:433-440. (2011) (査読有)  
DOI: 10.1269/jrr.10097

[学会発表] (計1件)

小西 輝昭他、ブラッグピーク近傍の重粒子イオンによる細胞致死効果の測定。日本放射線影響学会第52回大会、2009年11月13日、広島市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 輝昭 (KONISHI TERUAKI)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・

研究基盤センター・研究員

研究者番号：70443067