

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03599

研究課題名（和文）人工多能性幹細胞と光学計測技術を併用した放射線被ばく影響個人差研究基盤の構築

研究課題名（英文）Establishment of a research platform for individual differences in radiation exposure effects using induced pluripotent stem cells and advanced microscopy

研究代表者

渡邊 朋信（Watanabe, Tomonobu）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：00375205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、「先端光学イメージング技術をもちいて、iPS細胞（および分化細胞）に対する放射線被ばく影響の個人差を調査する技術基盤を確立する」ことを目的として研究開発を行った。第一に、一分子計測法を応用し、放射線被ばく後のDNA構造への影響および活性酸素代謝能を評価する技術を開発した。第二に、ラマン散乱スペクトル計測を基盤として、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）の線照射後の変化の差異を評価する技術を確立した。特に、後者の技術では、由来の異なる（人種の異なる）ヒトiPS細胞の放射線被ばく耐性とラマン散乱スペクトルとの相関が確認され、本手法の実用性および有効性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、今後の放射線被ばく影響の個人差調査を促進する可能性がある。ラマン散乱スペクトル計測には、トランスクリプトミクス等の生化学計測と比較して、一切の化学的/生物学的調整を必要としないため、非常に迅速にデータを収集できるからだ。一方で、ラマン散乱スペクトルが放射線被ばく耐性を表現できると断定するためには、実験サンプル数が少なく、また、その生物学的根拠も明らかになっていない。今後、計測実例を増やし、また、トランスクリプトミクスやゲノム情報との相関を調べていくことで、将来的には細胞に光を当てただけで放射線被ばく耐性を推定できるようになると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a technical basis for investigating individual differences in radiation exposure effects on iPS cells (and differentiated cells) using advanced optical imaging technology. First, we developed a technique to evaluate the effect of radiation exposure on DNA structure and metabolic capacity of reactive oxygen species (ROS) by applying a single molecule measurement method. Second, based on Raman scattering spectroscopy, we established a technique to evaluate the differences in human induced pluripotent stem cells (iPS cells) after -ray irradiation. Especially, the latter technique exhibited a correlation between radiation exposure tolerance and Raman spectra of human iPS cells of different origins (different races), indicating the practicality and effectiveness of this method.

研究分野：生物物理学

キーワード：放射線被ばく影響評価 ラマン散乱スペクトル計測 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

放射線被ばくは、ヒトの健康に対して、突然変異誘発、発がん、催奇形性、細胞死など、複雑かつ広範囲の生物学的反応を誘発する。放射線被ばく影響に関する見識は、未だ完全には固まっておらず、たとえば、国際放射線防護委員会（ICRP）は、「放射線被ばくは、どれだけ線量が少なくても確実に健康被害をもたらす要因である」としている。一方で、低線量域の被ばくが人間の健康に悪影響を与える科学的確定は得られていない。哺乳類試料を用いた被ばくデータが統計的に十分なほど蓄積できていないからである。放射線を正しく恐れるためには放射線被ばくの影響に関する科学的根拠のさらなる蓄積が必要不可欠である。

放射線被ばくによる障害発生率と被ばく線量の関係は、個人に大きく依存するとされている。特に、低線量域放射線被ばくには、ホルミシス（有害性を持つ要因が作用量により有益となる）があり、放射線照射が、あるヒトには有害であっても、あるヒトには治療に有効である可能性もある。低線量域放射線によるヒトへの健康被害（たとえば、発がん）の発症までには長い時間がかかり、老化等の他要因との区別もつきにくい。したがって、現時点で、安全-危険の閾値を全国民に対して一意に決めることは困難であり、患者ひとりひとりの放射線感受性に適応した放射線診断・治療を提案することも困難である。それを実現させるためには、放射線被ばくの個人差に関するデータを収集していく必要がある。しかし、実験倫理上、放射線被ばく影響に関する実験は、皮膚等の一部を除きヒトを対象に行えないため、データ収集の効率は上げにくい。

この問題を解決できるのが人工多能性幹細胞（iPS）細胞技術である。iPS細胞には、個人を特徴づける遺伝子情報が全て残っており、また、任意の細胞に分化誘導することができる。すなわち、iPS細胞あるいは分化させた細胞に放射線を照射することで、実際のヒトを被ばくさせることなく、任意の臓器特異的細胞において、放射線被ばく影響の個人差を調べることが可能である。たとえば、乳がんに対して放射線治療を施す際には、心臓への放射線被ばくが懸念される。心臓に対する被ばく影響を考慮した放射線治療を提案したい。ところが、心臓を取り出すことはできない。そこで、患者のiPS細胞を作成し、心筋細胞に分化させた後に放射線を照射し、その影響を調べれば良い。

iPS細胞技術を用いることで、ヒトには一切の放射線被ばくを与えることなく、臓器間差と個人差に関する研究データを網羅的に収集することが可能となり、定量的なテーラーメイド放射線治療の実現につながる。

2. 研究の目的

以上を鑑みて、本研究では、作成が簡単なiPS細胞胚様体を実験対象とした。解くべき生物学的課題を「放射線被ばく影響の個人差を決定する要因は何か？」に設定し、研究の出口を「個人の機能障害発生率と放射線被ばく線量との相関をiPS細胞から得られる計測データにより推定すること」と設定する。上記の大目的を達成するために、本研究期間内においては、「先端光学イメージング技術をもちいて、iPS細胞（および分化細胞）に対する放射線被ばく影響の個人差を調査する技術基盤を確立する」ことを目的とした。

3. 研究の方法

iPS細胞に対する放射線被ばくの影響を簡素に定量する手法として、①iPS細胞から作成した胚様体の成長速度、②活性酸素種生産量が挙げられる。①②についてはすでに技術が確立している。本研究においては、市販の超解像顕微鏡システム（ニコン製システム顕微鏡N-STORM）を基盤として、新たな評価方法を模索した。上記顕微鏡は、一分子計測法を応用した超解像法を採用しており、本研究では一分子計測法を応用した新規放射線被ばく影響評価技術を開発した。

合わせて、当該顕微鏡システムにラマン散乱計測用の光学系を導入し、ラマン散乱スペクトル計測を用いた放射線被ばく影響評価技術の開発を目指した。放射線耐性が強いとされる細胞は（放射線照射せずとも）コラーゲンとグリコーゲンの産生が高いことが報告されている。これらコラーゲン/グリコーゲンの産生は、ラマン散乱スペクトルにより検出可能である。また、細胞内では、放射線照射により発生したラジカルによるタンパク質等の損傷を修復する作用が働くため、オートファジーの活性化やミトコンドリアによるエネルギー産生が行われる。これらは、ラマン散乱スペクトルにおいてそれぞれ脂質を示すピーク群、チトクロムCのピーク群に反映される。すなわち、ラマン散乱スペクトルの形状によって、放射線被ばく耐性が予測可能であると期待される。

ヒトiPS細胞に対する放射線被ばく影響評価は、以下の順で行う。培養皿上の細胞（約 1.2×10^6 細胞）に対し、0.0~4.0グレイまでのγ線を照射する。至適環境で24時間培養後、生存している細胞の数を数え、細胞生存率とした。その後、継代培養を経て胚様体を形成させ、ラマン散乱計測を実施した。

4. 研究成果

(1) 一分子計測法を応用した放射線被ばく影響評価

蛍光タンパク質(GFP)を融合した転写因子をプローブとして用いる。概念実証のための実験サンプルとして、GFPを融合した転写因子 Nanog (Nanog-GFP) を恒常的に発現しているマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた。市販顕微鏡システム N-STORM の照射光学系を改良し、薄型遮光照明法 (HILO) により細胞を照射した。HILO は、細胞に対して側面からシート状に成型されたレーザーを入射する方法であり、観察焦点以外にある蛍光物質を励起しない。これにより、細胞内の Nanog-GFP 分子は、離散的にひとつひとつ可視化される。核内の未結合タンパク質の拡散は速いため、設定した露光時間 (50 ミリ秒) では検出できない。一方、Nanog-GFP が DNA 上の標的遺伝子座に安定的に結合している場合には、蛍光スポットとして可視化される。

これら蛍光スポットの重心位置を全て追跡する。細胞内で収集された追跡軌跡に対して、ひとつひとつの平均二乗距離を計算し、細胞内全てで平均化した。平均二乗距離は飽和曲線となり、以下の式により近似できる。

$$MSD''(t) \sim R_c \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{4Dt}{R_c}\right) \right\} + 2\varepsilon^2$$

ここで、 R_c は分子が自由に拡散できる範囲 (閉塞半径)、 D は半径 R_c 内における拡散運動の速さ (拡散係数)、 ε は計測誤差である。放射線照射によりクロマチンが凝集すると同然ながら、その凝集付近に相互作用する Nanog-GFP の運動範囲は制限される。すなわち、 R_c は小さくなる。DNA は様々な化学修飾を受けるが、これらは DNA 鎖の物理的な粘弾性を変化させ、そこに相互作用している Nanog-GFP の拡散運動の速さを変える。すなわち、 D が変化する。放射線照射がクロマチン構造または DNA の状態に変化を与えるのであれば、それらは R_c と D の変化として検出できることになる。

紫外線照射後のマウス ES 細胞において、Nanog-GFP 一分子の平均二乗距離を計測してみたところ (図 1)、わずかに R_c の上昇が確認され、一方で、 D には有意差が確認されなかった。照射後 24 時間静置培養させると、 R_c はさらに上昇したが、 D には変化が見られなかった。この結果から、①紫外線照射は (過去の文献に示されたように) クロマチン凝集を解く効果があることが示された。また、②DNA の物理的な粘弾性には影響を与えないことが示され、おおよそ、化学修飾状態などは変化していないと推測される。さらに、①の効果は、照射直後より 24 時間経過後の方が大きく、紫外線照射はクロマチン構造に直接影響を与えるより、むしろ、間接的に晩発的な影響を与えていると考えられる。

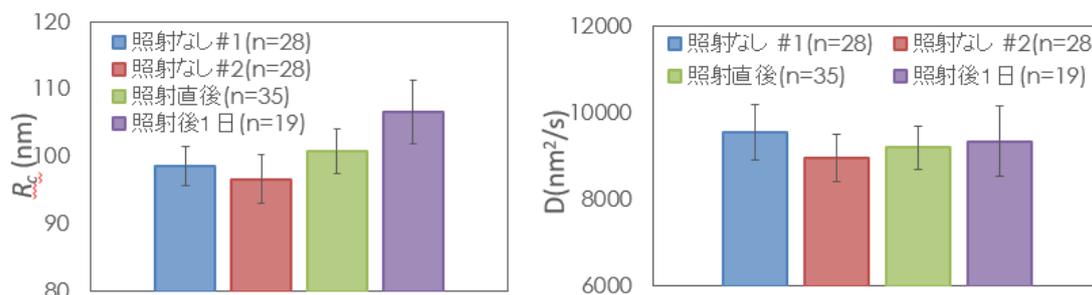


図 1. Nanog-GFP 一分子の平均二乗距離計測の結果。

紫外線照射なし (-UV, 黒)、照射あり (+UV, 赤)、照射後 24 時間 (+UV (24h), 青) の ES 細胞において、一分子測定を用いて Nanog-GFP の拡散運動の R_c (左) と D (右) を計算した。エラーバーは標準偏差を示す。

紫外線照射により細胞内に発生した活性酸素種は、生体分子のみならず、蛍光分子にも相互作用する。蛍光分子は、酸化により消光する (退色する) ので、活性酸素種の生成量と蛍光分子の消光時間には直接的な相関がある。すなわち、細胞内の Nanog-GFP の消光時間を計測すること

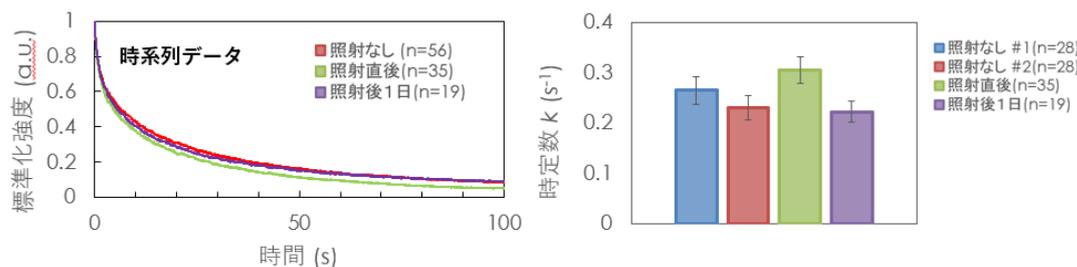


図 2. Nanog-GFP の消光時間計測の結果。

紫外線照射なし (-UV, 黒)、照射あり (+UV, 赤)、照射後 24 時間 (+UV (24h), 青) の ES 細胞において細胞全体の Nanog-GFP 強度を計測した (左)。このグラフ、減衰係数 (時定数 k) を計算した (右)。

で、細胞内の活性酸素代謝活性を評価することが可能となる。実際に、上記で収集した顕微鏡動画を用いて Nanog-GFP の蛍光の消光時間を計測すると指数関数的に減少していた (図 2 赤)。これは消光が確率過程に従っていることを表している。紫外線照射直後では、減衰速度が明らかに増加しており (図 2 緑)、確かに細胞内の活性酸素種が増加していることが示唆される。その 24 時間後には、元の減衰速度に戻っており (図 2 紫)、紫外線照射は酸化代謝能に影響を与えない、あるいは、24 時間後には活性酸化代謝能は回復していた、と考えられる。

以上のように、本研究にて、一分子計測を応用して、DNA 構造への影響、および、活性酸素代謝機能への影響の二つを数値化できる解析系が完成した。

(2) 5 種ヒト iPS 細胞株の放射線被ばく影響の調査

最初に、2 種類の健常者由来のヒト iPS 細胞株 (253G1, 648A1) について、放射線 (γ 線) 被ばく後の細胞生存率を調べた。

1.0 グレイ以下では 648G1 株は、253G1 株に比べて高い生存率を示したが、2.0 グレイ以上では逆転した (図 3 左)。すなわち、低線量域 (1.0 グレイ以下) では 648G1 株が、それ以上の線量域では 253G 株が、放射線高抵抗性を示した。同実験条件にて、細胞増殖率を比較すると、細胞生存率と反相関する結果が得られた (図 3 右)。すなわち、(一般的に良く知られるように) 細胞増殖率が高いほど放射線感受性が高いと言える。

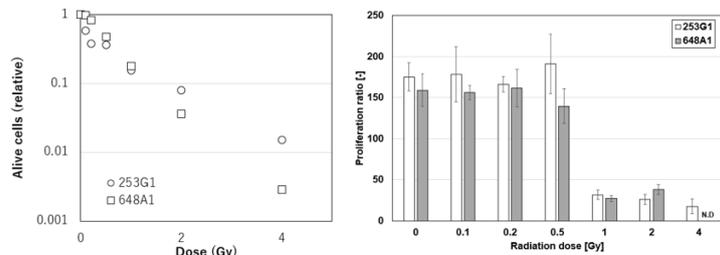


図 3. 二種のヒト iPS 細胞株 (253G1, 648A1) の細胞生存率 (左)、およびの細胞増殖率の放射線照射強度依存性 (右)。

次に、同日同時刻において、由来の異なる 5 種類のヒト iPS 細胞株 (253G1 株, 648A1 株, 201B7 株, BXS115 株, BXS114 株) について、放射線照射後の細胞生存率を調査した。 γ 線被ばく後の細胞残存率には、5 種類間の差異が明らかに示され、253G1 株, BXS0115 株および BXS0114 株が他 2 種と比較して高い細胞残存率を提示した (図 4)。特に、BXS0115 株, BXS0114 株に強い被ばく耐性が確認された。

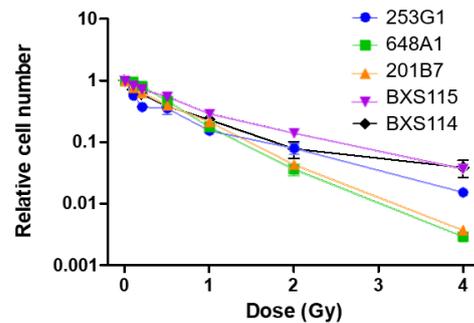


図 4. 5 種のヒト iPS 細胞株 (253G1 株, 648A1 株, 201B7 株, BXS114 株, BXS115 株) の細胞生存率)。

(3) ラマン散乱スペクトル計測による放射線被ばく影響評価

市販顕微鏡システム N-STORM を基盤とし、顕微鏡筐体右側の光学ポートにラマン散乱分光計測を可能とする光学系を導入した。ラマン散乱分光計測には、ライン共焦点光学系を採用した。顕微鏡ステージを走査することで、一つの画素がスペクトル情報を持つハイパースペクトル画像の取得が可能である。また、ラマン散乱スペクトル解析は、再現性が低い計測の一つに数えられる。本研究では、伝統的に使われてきた背景除去法ではなく、本研究者が開発してきた、光学収差、実験日、解析者に依存せず、細胞のラマン散乱スペクトルを抽出できる解析法を採用した。

図 5 に、0.0~4.0 グレイの γ 線照射後の生存した 648A1 細胞のラマン散乱スペクトルを示す。わずかではあるが、照射前後に差が確認された (図 5 上)。照射なし (0 Gy) との差スペクトルを観てみると、照射強度による明らかな違いが確認できた (図 5 下)。この細胞は、 γ 線照射後に生存した細胞を増殖させた細胞であるので、確認されたスペクトルの差は晩発的な放射線被ばくの影響、もしくは、遺伝的に維持された影響と言える。

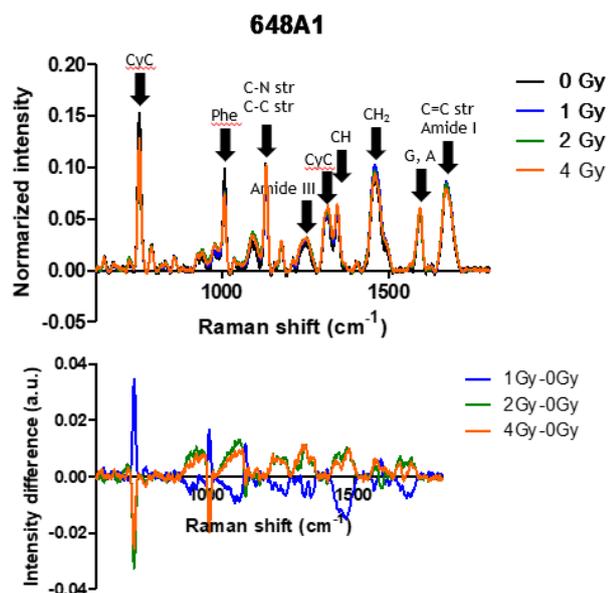


図 5. 0.0~4.0 グレイの放射線照射後生存した 648A1 株の胚様体のラマンスペクトル計測の結果。各照射強度におけるスペクトル (上) と、照射ありなしでの差スペクトル (下)。

γ線照射後の細胞生存率が明らかに異なっていた4種類のヒトiPS細胞株(648A1株, 201B7株, BXS115株, BXS114株)についてラマン散乱スペクトル計測を実施し、差スペクトルを作成すると、照射後生存率が高かった細胞株(BXS115株, BXS114株)では、4.0グレイ照射後もスペクトルは変化しなかった(図6)。まとめると、ラマン散乱スペクトル計測の結果は、細胞生存率の結果とよく一致し、ラマン散乱スペクトルが放射線照射被ばくの指標として有用であることが示された。

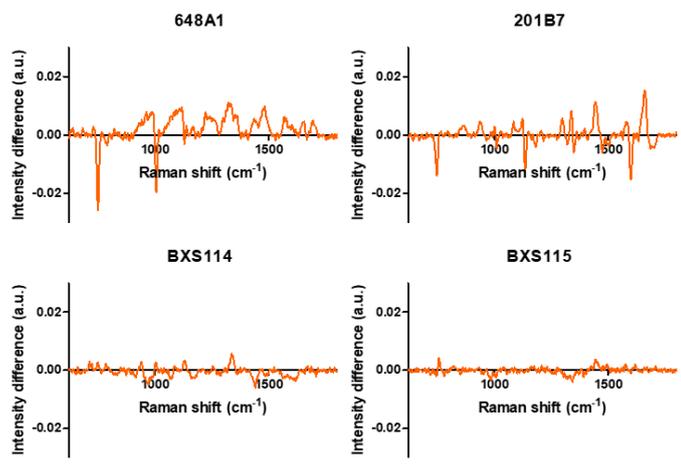


図 6. 4.0 グレイの放射線照射後生存した4種のヒトiPS細胞株(648A1株, 201B7株, BXS114株, BXS115株)の細胞生存率における、照射ありなしでの差スペクトル。

なお、γ線照射後のラマン散乱スペクトルの変化と遺伝子発現変化との関連を調査するため、ラマン散乱計測後の胚様体は回収され、トランスクリプトームデータを収集した。上記データは、今後、引き続き解析していく。なお、上記作業中にクロニングを実施しており、樹立されたγ線被ばく細胞株クローンは今後の研究に使用していく予定である。

(4) その他

研究計画当初は、既知に放射線被ばく耐性が強いハダカデバネズミのiPS細胞を準備し、放射線耐性を示すポジティブコントロールサンプルとして用意する予定であった。残念ながら、当該項目は難航し、達成されていない。しかしながら、本研究課題はハダカデバネズミの研究ではなく、必要とされる材料は、放射線耐性の異なる生体試料である。そこで、実験手法の確認には、iPS細胞株ではない。過去に放射線被ばく耐性が異なることが報告されているUM-SCC-22B, UM-SCC-4細胞株で代替し、iPS細胞株間差異の調査には、人種の異なる(肌色の異なる)ヒトiPS細胞を選定することで、目的に沿った研究遂行を継続した。

また、本研究の将来性を鑑みて、ヒトiPS細胞が放射線に被ばくした際に、分化後の細胞に機能障害が提示される、晩発性機能障害を確認した。より具体的には、ヒトiPS細胞は、放射線(紫外線)照射により、一部は死滅するが、一部は生存する。生存したiPS細胞は、分化多能性を維持しており、拍動する心筋細胞にまで分化することを確認した。しかし、分化した心筋細胞の筋活性は、正常なiPS細胞から作られた心筋細胞に比べて十分に低かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Tomonobu M., Sasaki Kensuke, Fujita Hideaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Recent Advances in Raman Spectral Imaging in Cell Diagnosis and Gene Expression Prediction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 2127 ~ 2127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13112127	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 Fujita Hideaki, Kaneshiro Junichi, Takeda Maki, Sasaki Kensuke, Yamamoto Rikako, Umetsu Daiki, Kuranaga Erina, Higo Shuichiro, Kondo Takumi, Asano Yoshihiro, Sakata Yasushi, Miyagawa Shigeru, Watanabe Tomonobu M	4. 巻 6
2. 論文標題 Estimation of crossbridge-state during cardiomyocyte beating using second harmonic generation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202302070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202302070	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 Okamoto Kazuko, Fujita Hideaki, Okada Yasushi, Shinkai Soya, Onami Shuichi, Abe Kuniya, Fujimoto Kenta, Sasaki Kensuke, Shioi Go, Watanabe Tomonobu M	4. 巻 42
2. 論文標題 Single molecule tracking of Nanog and Oct4 in living mouse embryonic stem cells uncovers a feedback mechanism of pluripotency maintenance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e112305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022112305	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊朋信
2. 発表標題 Investigation of acquired cardiomyopathy on iPS differentiation by radiation based on advanced optical microscopy
3. 学会等名 第7回放射線災害・医科学研究拠点国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊朋信
2. 発表標題 ラマン散乱スペクトルの揺らぎによる細胞の状態遷移予測
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊朋信
2. 発表標題 ラマン散乱スペクトルの「揺らぎ」から細胞分化を予測する
3. 学会等名 第45回分子生物学会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ES細胞またはiPS細胞の評価装置および評価方法	発明者 渡邊朋信, 藤田英明	権利者 広島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-0544525	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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