

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12249

研究課題名(和文)放射光X線マイクロビームによる細胞質限定的照射に対する低LET放射線細胞応答解析

研究課題名(英文) Cellular responses for targeted cytoplasmic irradiation with X-ray microbeams produced by synchrotron radiation

研究代表者

鈴木 雅雄 (SUZUKI, Masao)

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・専門業務員

研究者番号：70281673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：すべての細胞核のみにX線を照射した時の細胞生存率は、予めすべての細胞質にX線を照射すると照射しない場合に比べて有意に高くなることが判った。さらにランダムに選択した10%の細胞の細胞質に予めX線を照射した場合の生存率は、すべての細胞質に照射した時と同様の効果を示した。この実験でギャップジャンクション阻害剤を併用すると生存率は予めの細胞質照射を行わない場合と同じレベルに復帰した。この結果は、予めの細胞質へのX線からのエネルギー付与によって、ギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構に起因する何らかの細胞応答により細胞核に生じた放射線損傷を軽減する放射線適応応答が誘導されることが考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作業仮説である細胞質照射で誘導される細胞応答は、細胞核に放射線のエネルギーが付与された後に引き起こされるDNA損傷応答が生物影響の出発点であるとする放射線生物影響研究におけるセントラルドグマにチャレンジする研究であり、そこに礎を置いて構築された放射線防護体系の基本的概念である直線閾値無し仮説に対して、特に低線量域でのリスク曲線の再検討と新たな評価概念構築に結びつく。また東日本大震災に伴う原子力発電所事故に起因する放射性物質による環境汚染で問題となる放射性核種から放出される低LET電磁波放射線被ばくによる人体影響リスク評価をメカニズムを礎にした新たなロジックの構築を可能にする研究に発展する。

研究成果の概要(英文)：Cellular response, such as bystander effect, is essential to investigate secondary carcinogenesis after radio-therapy and evaluate radiation risk such as the accident of Fukushima Daiichi Nuclear Power Plants. A microbeam-irradiation system is useful to study such cellular response.

We examined cell killing for targeted cell nuclear or cytoplasmic irradiation (0.092Gy) using X-ray microbeams, which was produced at Photon Factory, KEK. Cell survival was 100% irradiated with cytoplasmic irradiation alone. It was 79% irradiated with all cell nuclei alone, however, it was rising to 95% when 10% of cytoplasm was irradiated beforehand. When treating with a gap-junction inhibitor, the cell survival for targeted nuclear irradiation was around 73% with the presence or absence of the targeted cytoplasmic irradiation beforehand. The results clearly showed that the bystander effect through gap-junction mediated cell-to-cell communication plays an essential role of inducing radio-adaptive response.

研究分野：放射線影響

キーワード：放射光X線マイクロビーム ヒト正常細胞 細胞質限定的照射 細胞核限定的照射 バイスタンダー効果 放射線適応応答 ギャップジャンクション 細胞間情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

がんの放射線治療・診断による医療被ばく、原子力エネルギー利用やその放射線廃棄物を源とする環境放射線や宇宙船・航空機内での放射線被ばくの人体影響は、今後益々大きな関心事となることが予想される。このような放射線被ばくに対する生物影響で問題となるのは、それ自体では急性放射線障害の自覚症状を伴わない低フルエンス / 低線量(率)放射線の照射効果であり、直接照射された細胞の周囲に存在する非照射細胞にも同様の生物効果が間接的に現れるバイスタンダー効果が生物効果解明の鍵を握ると考える。

放射線誘発バイスタンダー効果の重要性が認識された研究成果は、1992年に Nagasawa & Little によって発表された論文である。その内容は、²³⁸Pu から放出されるアルファ線をチャイニーズハムスター細胞集団に対して確率的に1%以下となる低線量(4.9mGy以下)照射を行ったところ、姉妹染色分体交換が30%の細胞に認められ、非照射細胞にも染色体損傷が生じていることを発見した(*Cancer Res.*,52,6394-6396,1992)。我々の研究グループでも米国コロンビア大学と共同でヘリウムイオンマイクロビームを用いて、細胞核に正確に1個のヘリウムイオンを照射した時の突然変異誘発・染色体異常誘発頻度がバイスタンダー効果によって予想を遙かに超えて有意に高い照射効果を示すことを明らかにした(*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,98,14410-14415,2001)。以上の結果は、低線量放射線発がんリスクに関する現在のLNT仮説(図1)について検討が必要であるとの認識を生んだが、2007年のICRP勧告 Publication 103では、バイスタンダー効果を含んだ細胞応答の知見の重要性は認めながらも、防護体系に組み込むにはエビデンス不足と判断され、LNT仮説には反映されなかった。

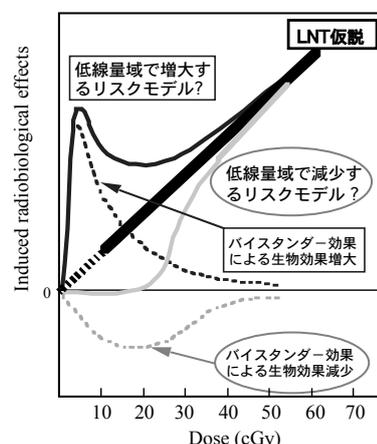


図1. LNT 仮説による放射線影響リスク評価の模式図。リスクに対して低線量域でバイスタンダー効果を加味した場合、バイスタンダー効果でリスクが増大する場合と減少する場合で、LNT 仮説との重ね合わせでリスク曲線が変化することが予想される。

細胞質への放射線照射による生物影響研究は、細胞質のみを狙い撃ちする技術確立の困難さから非常に限られている。その中で米国コロンビア大学の高 LET ヘリウムイオンマイクロビームをヒトとハムスターのハイブリッド細胞の細胞質のみに照射した研究は、遺伝情報が存在しない細胞質にイオンを照射しても突然変異が誘発されることを示した(Wu *et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,96:4959-4964,1999)。さらに、同じ実験システムを用いて酸化ストレスによる DNA 損傷と活性窒素種が誘導されること(Hong *et al. Br.J.Cancer*, 103:1263-1268,2010)、ヒト小気道上皮細胞を用いてミトコンドリアの形態・機能に変化を誘導し、それが生物効果の原因となる可能性を示すこと(Zhang *et al. Cancer Res.*,73:6700-6710,2013)を報告した。

一方、低 LET 放射線であるX線などの電磁波放射線による研究は、電磁波放射線をマイクロビーム化した後に生物影響研究へ供するに十分な強度を得ることが難しいことから、世界的に見て粒子放射線による研究に比べて遅れているが、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設のシンクロン放射光を利用したX線マイクロビーム照射装置の開発により、放射光の非常に強い強度を背景に、マイクロビーム化後も生物影響研究に対して十分な強度(線量)が得られ、細胞核又は細胞質への限定的照射実験が可能となった。その中で唯一存在する細胞質照射の実験から、ハムスター細胞の致死効果が誘導されることが判った(Maeda *et al. J.Radiat.Res.*, 49: 171-180, 2008)。しかしながら、低 LET 電磁波放射線であるX線を細胞質へ限定的に照射した時の直接的生物効果および間接的効果については、その現象論と誘導メカニズムについてはほとんど判っ

ていない。

我々の研究グループで行った、特にマイクロビーム放射線を用いた生物影響研究の結果から以下の示す仮説を得るに至った。

【作業仮説】

細胞質に予め低 LET 放射線のエネルギー付与が起こった場合、それに引き続く細胞核に生じた放射線損傷を軽減する何らかの細胞応答が働き、細胞集団の致死効果を軽減する(放射線適応応答の獲得)

2. 研究の目的

本研究は上記に掲げた作業仮説を証明すべく、細胞質にX線を照射したときの細胞応答に焦点を絞り、(1)同一細胞内での細胞質照射による細胞応答 (intracellular の細胞応答解析)、(2)細胞集団の中で細胞質のみにX線照射を受けた細胞の近傍に存在する細胞への応答 (intercellular の細胞応答解析; バイスタンダー効果)、に関して細胞レベル・分子レベルで現象論とメカニズム解明を進める。最終的放射線防護体系の基本的概念である LNT 仮説に対して、特に低線量域でのリスク曲線の再検討と新たなリスク評価概念の構築に寄与できる基礎実験データ集積を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、上記に記載した作業仮説を検証するために以下に示す実験項目をそれぞれ進めた。

- (1) マイクロビーム照射システムで認識された 100%のヒト正常細胞(マイクロビーム照射用ディッシュ上で約 1000 個)の細胞質にX線マイクロビームを照射した時の致死効果の線量効果関係を明らかにし、細胞質への予め照射の最適な線量を設定する。
- (2) 同一細胞内での細胞質照射による細胞応答を明らかにするために、認識された 100%のヒト正常細胞の細胞質に(1)で設定した線量のX線を予め照射し、その後細胞質照射の順番に従って100%の細胞核に照射した時の致死効果を明らかにする。細胞核のみの照射に対する致死効果と細胞質のみの照射に対する致死効果を礎に、細胞質への照射による同一細胞内でのシグナルの細胞質から細胞核へ移行および細胞質への予め照射の有無による放射線適応応答誘導を評価する (intracellular の細胞応答解析)。
- (3) 細胞質照射細胞の周囲に存在する細胞核照射細胞(細胞質非照射)への細胞応答(バイスタンダー効果)を明らかにするために、ランダムに選択した全数の 10%の細胞質に予め照射し、それに引き続き 100%の細胞核に照射した時の致死効果を解析し、細胞間でのシグナル伝達および放射線適応応答誘導を評価する (intercellular の細胞応答解析)。バイスタンダー効果の誘導経路として、ギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構に焦点を絞り、ギャップジャンクション阻害剤を併用した実験を合わせて行う。上記の実験内容を遂行するために、ヒト正常細胞は国内の公的な細胞バンクより分与されたヒト皮膚由来正常線維芽細胞を用いた。この細胞は、有限の分裂能を持ちヒト細胞の正常な染色体モード値を保持したヒト正常細胞であり、放射線人体影響リスク評価の基本となるヒト細胞である。細胞致死効果は、コロニー形成法による細胞増殖死を検出する。細胞致死効果は、コロニー形成法による細胞増殖死を検出した。

4. 研究成果

得られた実験データを図 1 に示す。実験結果を以下に要約する。

- (1) コンピューター制御されたマイクロビーム照射システムで認識したすべての細胞の細胞核のみに X 線マイクロビームを 10R(0.092Gy)照射した時の細胞生存率は 79%となった。
- (2) 同様に認識したすべての細胞の細胞質のみに 10R(0.092Gy)照射した時の細胞生存率は 100%となった。
- (3) すべての細胞の細胞質に予め 10R(0.092Gy)照射し、3 時間炭酸ガスインキュベーター内に保持し、その後すべての細胞の細胞核に 10R(0.092Gy)照射した時の細胞生存率は 98%となった。
- (4) 認識したすべての細胞の内ランダムに選択した 10%の細胞の細胞質に予め 10R(0.092Gy)照射し、3 時間炭酸ガスインキュベーター内に保持し、その後すべての細胞の細胞核に 10R(0.092Gy)照射した時の細胞

胞生存率は 95%となった。

(5) 上記の照射法でギャップジャンクション特異的阻害剤を併用した場合の細胞生存率は、73%となった。

以上の結果より、予めすべての細胞の細胞質に X 線を照射した細胞集団の細胞生存率は、細胞質照射がない場合の生存率と比べて有意に高くなることが判った。すなわち細胞質照射によって放射線適応応答が誘導されることを明らかにした。さらに細胞集団中ランダムに選択した 10%の細胞の細胞質に予め X 線を照射した場合の生存率は 95%となり、すべての細胞質に照射した時と同様の効果を観察した。この時ギャップジャンクション阻害剤を併用した結果、95%の生存率が 73%まで減少した。すなわち細胞質に予め照射していない対照群のレベルまで生存率が復帰したことから、ギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構によるバイスタンダー効果によって放射線適応応答が誘導されたと結論した。

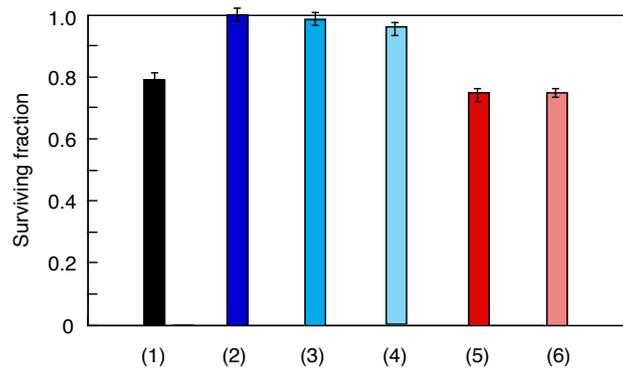


図 1. X 線マイクロビームを細胞核または細胞質限定的に照射した時のヒト正常細胞の細胞致死効果比較。(1) 認識したすべての細胞の細胞核に 10R(0.092Gy)照射した時の生存率、(2) 認識したすべての細胞の細胞質に 10R(0.092Gy)照射した時の生存率、(3) すべての細胞の細胞質に予め 10R(0.092Gy)照射し、3 時間炭酸ガスインキュベーター内で保持した後すべての細胞の細胞核に 10R(0.092Gy)照射した時の生存率、(4) 認識したすべての細胞のうちランダムに選択した 10%の細胞質に予め 10R(0.092Gy)照射し、3 時間炭酸ガスインキュベーター内で保持した後すべての細胞の細胞核に 10R(0.092Gy)照射した時の生存率、(5) ギャップジャンクション阻害剤を併用してすべての細胞の細胞核に 10R(0.092Gy)照射した時の生存率、(6) ギャップジャンクション阻害剤を併用してすべての細胞のうちランダムに選択した 10%の細胞質に予め 10R(0.092Gy)照射し、3 時間炭酸ガスインキュベーター内で保持した後すべての細胞の細胞核に 10R(0.092Gy)照射した時の生存率、をそれぞれ示す。実験データは、8 回の独立した照射実験の平均値と標準誤差を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Suzuki Masao, Funayama Tomoo, Suzuki Michiyo, Kobayashi Yasuhiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Radiation-quality-dependent bystander cellular effects induced by heavy-ion microbeams through different pathways	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 824 ~ 832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrad059	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木雅雄、佐井星
2. 発表標題 Bystander cellular effects through gap-junction-mediated cell-to-cell communication between carbon-ion irradiated tumor and unirradiated normal cells.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木雅雄、佐井星
2. 発表標題 炭素イオン照射がん細胞と非照射正常細胞間の液性因子を介したバイスタンダー効果
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第36回学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木雅雄、舟山知夫、鈴木芳代
2. 発表標題 炭素イオン照射がん細胞と非照射正常細胞の細胞間情報伝達機構を介したバイスタンダー効果
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木雅雄、崔星、小藤昌志
2. 発表標題 Radio-adaptive response induced by the targeted cytoplasmic irradiation in normal human fibroblasts with X-ray micorbeams via gap-junction mediated cell to cell communication Relationship between magnetic-field mediated cell killing and radio-adaptive response by targeted cytoplasmic irradiations with X-ray microbeams via bystander effects.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雅雄、崔星、小藤昌志
2. 発表標題 Bystander effect via gap junction between carbon-ion irradiated tumor and un irradiated normal cells.
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第35回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雅雄、舟山知夫、鈴木芳代
2. 発表標題 ヒトがん細胞のP53遺伝子依存的バイスタンダー致死効果に対するエネルギーの異なる炭素イオンマイクロビーム間比較
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雅雄、宇佐美徳子、崔星、藤森亮、小藤昌志
2. 発表標題 放射光X線マイクロビームを用いた細胞致死効果に対する細胞質照射による放射線適応応答誘導の細胞内・細胞間応答の関与
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 鈴木雅雄、宇佐美徳子、崔星、藤森亮、小藤昌志
2. 発表標題 Relationship between magnetic-field mediated cell killing and radio-adaptive response by targeted cytoplasmic irradiations with X-ray microbeams via bystander effects
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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

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