

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22611015

研究課題名（和文）高 LET 放射線治療における酸化ダメージ分布の可視化

研究課題名（英文）Detection and observation of oxidative damage for the improvement of high-LET radiation therapy

研究代表者

伊藤 敦 (ITO ATSUSHI)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：80193473

研究成果の概要（和文）：

高 LET 放射線のがん治療における特徴、高 LET 特有の損傷の生成及び酸素効果が小さいという現象に対して、重イオン線トラック構造の観点からアプローチした。具体的には、トラック構造の低 LET 成分であるペナンプラ領域を、OH ラジカルから生成される 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の分布を指標として、マウス組織切片、培養細胞、DNA シートを対象として可視化する方法を開発した。マウス組織では、脳、心臓での 8-OHdG が検出しやすく、さらに脳の小脳プルキンエ細胞、大脳周辺部においてよりポジティブな反応が認められた。培養細胞においては、2Gy の小線量でスポット状の粒子痕と思われるドットを観察することができた。また、DNA シートについては、水不溶性のシート作成法をサーベイし、さらに均一な薄膜を作成する方法、蛍光抗体法で 8-OHdG を検出するプロトコルを検討した。その結果、OH ラジカルを生成するフェントン反応処理で有意な結果が得られ、OH の分布を観察する試料として非常に有望であることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：

In order to visualize the distribution of a penumbra, a low LET region around ion tracks, we have developed the methods to image the distribution of 8-OHdG, a radiation product resulting from the reaction of OH radicals with guanine residue, using an immunofluorescence staining for 1) mouse brain tissue, 2) human A549 cells, and 3) DNA thin film. Positive stains were evident particularly in the peripheral region of the cerebrum and in Purkinje cells of the cerebellum in mice. The immunofluorescence staining of cell nuclei was detected at a dose as small as 5 Gy where we can distinguish each incoming particle. DNA film with an insoluble property to water was developed with special reference to the uniformity, and the treatment with Fenton reaction to generate OH radicals resulted in the successful staining of uniformly formed 8-OHdG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：医学物理学・放射線技術学

キーワード：高 LET 放射線、間接作用、ラジカル、重粒子、DNA 酸化損傷、免疫染色法、8-OHdG、酸素効果、トラック構造、DNA 薄膜

1. 研究開始当初の背景

高 LET 放射線によるがん治療、特に重粒子線を用いた好成績¹⁾が報告されている。その理由として、

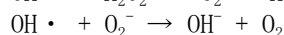
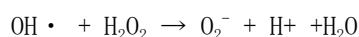
- (1) 荷電粒子線特有の局所的線量分布
- (2) X線と比べて生成される損傷のメカニズムの違い
- (3) 酸素効果がないこと

があげられる。(1)の線量分布については物理的測定によって明らかにされているが、(2)、(3)については、生物学的な手段で現象は示されているものの、そのメカニズムについては現在精力的に研究が行われているところである。それが明らかにされることによって、高 LET 放射線の治療への効果的な活用をさらに発展させることができると考える。

本研究では、(2)、(3)についても物理的アプローチ、すなわち粒子のトラック構造と密接に関連しているという立場からの提案を行う。荷電粒子のトラック構造は、サイズについては異論もあるが、一般にコアとよばれる中心部の高電離密度領域と、ペナンプラとよばれる高速二次電子線によってつくられる周辺の低 LET 領域からなるとされる。コアとペナンプラのサイズは粒子種や LET に依存する。一般に高 LET 放射線の生物作用は直接作用が主であると考えられているが、粒子線特有の生物作用はこれら領域からの寄与の和として把握される必要があると考える。

我々はこれまでに高 LET 放射線においてもラジカルが関与する間接作用が重要であることを示してきた。例えば、LET が高くなると間接作用は確かに減少するが、400keV/μm 以上の高 LET 領域においても致死の 50%以上は間接作用が寄与している²⁾。また、OH ラジカルによって生成されるグアニン酸化物 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG と略記)も高 LET 領域において生成されることが確認された³⁾。この原因は低 LET のペナンプラの寄与も無視できないことを示唆している。実際にペナンプラの広がりをもとめた計算によると、炭素とシリコンでは 10 倍程度シリコンの方が大きいという報告もある⁴⁾。しかし、実験的にこれを確認した報告はない。

次いで、(3)の酸素効果がなくなるという現象についても、トラック構造からの視点は有効である。国内外において酸素効果の LET 依存性の報告は多数あるが、その機構についての研究は、海外の研究グループによるモデルの提案があるのみである。有力なモデルの一つとして、Oxygen in the track model があげられる^{5, 6)}。トラックに沿って高密度にラジカルが生成されるためラジカル間結合から低酸素状態でも酸素が生成されるというスキームである。以下のような反応式が提案されている⁵⁾。



トラックに沿って本当に酸素が生成されるのか、これまでは酸素生成の G 値が LET とともに上昇することは報告されているが、酸素の分布を実験的に明らかにした研究はない。(参考文献)

- 1) H. Tsujii et al., J. Radiat. Res., 48 (Suppl.), A15 (2007).
- 2) A. Ito et al., Radiat. Res., 165, 703-712 (2006).
- 3) R. Hirayama et al., Radiat. Phys. Chem., 78, 1207 (2009).
- 4) A. Chatterjee and H. J. Schaefer, Radiat Environm. Biophys., 13, 215-227 (1976).
- 5) K. F. Baverstock and W. G. Burns, Radiat. Res., 86, 20 (1981).
- 6) J. Meesungnoen and J.-P. Jay-Gerin, Radiat. Res., 171, 379 (2009).

2. 研究の目的

本研究では、生成過程に OH ラジカルと酸素が関与するグアニン酸化損傷である 8-OHdG を、低 LET 領域及び酸素生成領域のプロブとして利用できる可能性を検討する。すなわち、8-OHdG 抗体の免疫組織化学 (免疫染色法) を利用してそれら領域の分布を明らかにすることによって、研究背景に述べた (2)、(3)の問題にトラック構造と関連させてアプローチすることを目的とした。

3. 研究の方法

Chatterjee and Schaefer (上記参考文献 4)によると、ペナンプラサイズは、10-100 ミクロンにも及ぶとされており、免疫染色法において用いる光学顕微鏡の分解能で観察可能と判断した。

8-OHdG を検出する対象として、マウス臓器切片、動物培養細胞、DNA シートの 3 種類を検討した。それぞれの特徴を以下に挙げる。

- (1) 動物組織：マウスを用いる。8-OHdG 組織免疫染色に関する報告がこれまで数多く見られることから、最も確実に結果が得られる見込みが高い。一方、問題点として、培養細胞のように均一の細胞系でないため、染色のされ方に不均一性があることが危惧されること、どの臓器が観察に適しているのかをサーベイしなければならぬことである。しかし、これは特徴ともなり得る。すなわち、もし 8-OHdG 生成の臓器特異性があれば、その知見が得られるからである。
- (2) 動物培養細胞：利点として、均一な核領域がはっきりしていること、我々がこれまでの HPLC による 8-OHdG の定量的分析に使用してきた経緯から、照射条件も含

めて結果の比較が可能なこと、防護剤等細胞に対する処理が容易なこと、などがあげられる。問題点として、非常に成功例が少ないことが挙げられる。これまでに培養細胞に対して行われた数少ない研究例においては、いずれも細胞核周辺の細胞質が主に染色され、一例を除いて核内での染色はわずかであった。8-OHdG はグアニンの酸化物であるから核内が主に染色されないのは実験条件が最適化されていないことを意味する。我々も本研究以前からこの問題に取り組んできたが、抗体の選択、固定方法、細胞膜透過及び細胞核透過処理など、大変難しい実験であることが判明した。ようやく細胞質に対して細胞核がより濃染される条件を求めることができたが、いまだ再現性に乏しい。これをさらに確実なものにすることを目標とした。

- (3) DNA シート：細胞、組織ともに DNA は核あるいはミトコンドリアに局在するので、離散的に存在している。8-OHdG の分布を求めるには DNA の均一な試料が望ましい。本研究では、全くの新規の試みとして、水溶液中で不溶性の DNA 薄膜の作成法の開発とその免疫染色法への適用可能性を検討した。

なお、以上の免疫染色法の条件検討には、ポジティブコントロールとして OH ラジカルを化学的に生成させる過酸化水素と金属イオンのフェントン反応 ($5\text{mM H}_2\text{O}_2 + 0.1\text{mM CuSO}_4$) を用いた。

このように分子から細胞、組織レベルに至る幅広い試料の特徴を生かして高 LET 放射線的作用におけるラジカルの関与を可視化することを目指した。

照射は、(独)放射線医学総合研究所重粒子がん治療装置 (HIMAC) を用いて、炭素、シリコン、ネオン、鉄の各イオン照射を行った。LET の範囲は、13-440 keV/ μm であった。

4. 研究成果

(1) 動物組織：

まず、マウス組織を網羅的にサーベイし、8-OHdG の臓器による生成量の違い、8-OHdG 観察に適した臓器の選択を行った。対象臓器は、脳、眼球、心臓、胃、十二指腸、肝臓、腎臓、精巣とした。マウスは麻酔下で照射後、8-OHdG の染色スポットを血管から区別して観察しやすくするため灌流を行った後、各臓器を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定し、切片を作成した。すべての臓器において、照射後有意な 8-OHdG の増加が確認されたが、8-OHdG 抗体染色細胞が同定しやすい臓器として、脳、心臓、眼球 (角膜) が挙げられた。いずれの臓器でも細胞質と比べて核がコントラスト高く染色され、培養細胞に比べて免

疫染色法を適用しやすい印象であった。シリコンとネオン照射の脳組織試料において、定量化のために 8-OHdG 抗体染色が見られた細胞を顕微鏡下でカウントした。線量に依存して 8-OHdG スポットが増加すること、ネオンよりシリコンでの 8-OHdG 生成が多いことが判明した (図 1)。この結果は、シリコンの方が低 LET 領域が広くそのため 8-OHdG 生成量が多いと解釈される。

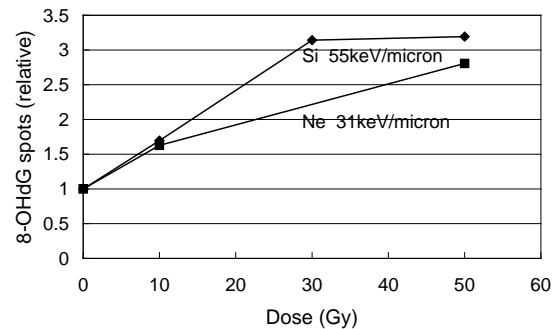


図 1. マウス脳における 8-OHdG 生成の線量依存性。Si 及び Ne 照射後 8-OHdG の濃染細胞数を計測した。

ついて、8-OHdG が生成 (検出) しやすい脳組織の部位についてより詳細な検討を行った。その結果、小脳皮質と大脳周辺領域でよりポジティブな反応が認められた。小脳皮質では、プルキンエ細胞が顕著に染色され、線量依存性も確認された。細胞が大型であることもあり、高倍率での観察に最適な部位と考えられた。図 2 に小脳皮質での Si イオン照射の結果を示す。照射試料で 8-OHdG 領域が濃く染色されている。今後はさらに高倍率での内部構造観察と、さらに細胞以外の部分のバックグラウンド低減が課題である。

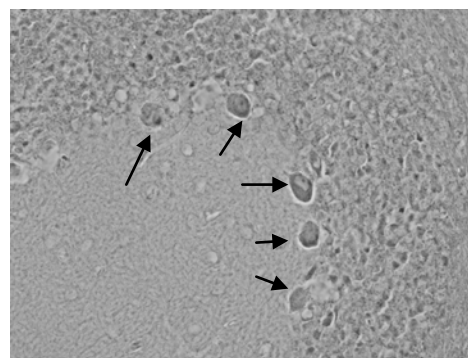


図 2. Si イオン照射小脳皮質の 8-OHdG 免疫染色像。矢印はプルキンエ細胞。線量：10Gy；LET：55 keV/ μm

(2) 動物培養細胞：

ヒト肺がん由来 A549 細胞を用いた。これまでの我々の 8-OHdG 蛍光抗体を用いた研究

により、5Gy まで検出することができていたが、本研究では、蛍光標識二次抗体を変更し、検出感度の向上を試みた。その結果、図3のように Si イオン 2Gy 照射後、細胞核内に蛍光強度の高いドットが観察され、粒子痕が示唆された。再現性については、かなり改善されたものの、観察視野に核より細胞質がより染色された細胞も見られ、細胞の状態によって染色のされ方が違う可能性が考えられた。固定条件をさらに工夫して、どのような状態の細胞でも核が濃染される条件を見いだすことが課題である。

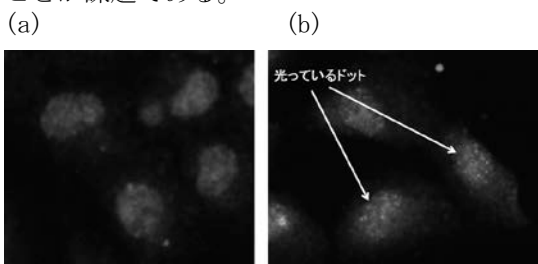


図 3. Si イオン照射 A549 細胞における 8-OHdG 生成。(a) 非照射、(b) 2Gy 照射; LET: 80 keV/ μ m。核を 44 個のイオンが通過したと推定される。

(3) DNA シート :

水不溶性の DNA シート作成のために、初年度は、DNA のサザンブロットにヒントを得て、仔牛胸腺 DNA 溶液をブロット膜に滴下し、UV クロスリンカーによって膜に固定させた。この試料を重粒子線照射後、蛍光抗体処理を行った。8-OHdG の生成は確認できたが、分布の同定までには至らなかった。また DNA 膜の不均一性、強力な UV 照射による 8-OHdG 生成の可能性などいくつかの克服すべき問題点も明らかになった。

この方法と並行して、脂質と DNA の複合体を有機溶媒に溶かし、テフロン板上にキャストすることによって、水に不溶性の DNA フィルムを作成する方法の適用可能性を考えた。この方法は東工大岡畑恵雄教授が開発したもので¹⁾、岡畑研究室の協力を得て薄膜作成法を習得し、8-OHdG 免疫染色が可能なプロトコルを検討した。このフィルムは、DNA が 4nm の間隔で密に並んでおり、その間隔が 8-OHdG の生成領域より十分に小さいこと、水中で保持することにより水由来の OH ラジカルの作用を検出できることなど、本研究への適用において利点を有している。

まずカバーガラス上に均一な薄膜を作成する方法を岡畑研究室での方法を参考に試行錯誤した。こうして作成した薄膜に対し、フェントン反応処理を施したところ、未処理試料に比べて、顕著な 8-OHdG 蛍光は観察されなかった。これは膜表面に DNA が露出している割合と膜内への水溶液の浸透度が問題と考えられた。そこでフェントン反応処理前にブアン固定を行ったところ、図 4 のような

膜全面に有意な 8-OHdG の発光が観察できた。これによって DNA 薄膜作成法と 8-OHdG 検出法がほぼ確立したので、今後重粒子照射に適用する予定である。

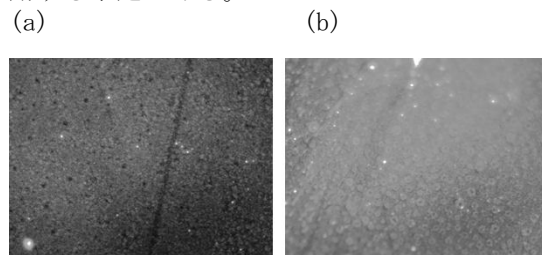


図 4. DNA 薄膜における 8-OHdG 生成。(a) コントロール ; (b) フェントン反応処理

1) 岡畑恵雄、川崎剛美、素材としての DNA、特集「DNA、タンパク質の自己組織化」、BIONICS, 2, 33 (2005).

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 15 件)

1. Y. Saisho and A. Ito: Mathematical models of the generation of radiation-induced DNA double-strand breaks. J. Mathematical Biol., (published online August 2012) in press. 査読有
2. T. Ishii, M. Miyazawa, H. Onouchi, K. Yasuda, P. S. Hartman, N. Ishii: Model animals for the study of oxidative stress from complex II. Biochim. Biophys. Acta (2012) in press. 査読有
3. 田向未来、小山裕二: 重粒子線照射細胞における DNA 損傷の修復の観察、東海大学工学部エネルギー工学科卒業論文 (2013). 査読無
4. Y. Uchino, T. Kawakita, M. Miyazawa, T. Ishii, H. Onouchi, K. Yasuda, Y. Ogawa, S. Shimmura, N. Ishii, K. Tsubota: Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. PLoS ONE 7, e45805 (2012). 査読有
5. 伊藤敦、北島里実、込宮大伍、平山亮一、石井直明、石井恭正、宮沢正樹、篠生環、村山千恵子、古澤佳也: DNA 酸化損傷 8-OHdG を指標とした高 LET 線の生物作用の解明、平成 23 年度放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置等共同利用研究報告書、126-127 (2012). 査読無
6. 北島里実: 重粒子線による DNA 酸化産物の計測～酸化損傷の LET 依存性～、東海大学工学部エネルギー工学科卒業論文 (2012). 査読無

7. R. Hirayama, A. Uzawa, Y. Matsumoto, M. Noguchi, Y. Kase, N. Takase, A. Ito, S. Koike, K. Ando, R. Okayasu, Y. Furusawa: Induction of DNA DSB and its rejoining in clamped and non-clamped tumors after exposure to carbon ion beams in comparison to X-rays. Radiat. Prot. Dosimetry, 143, 508-512, (2011). 査読有
8. T. Tsuchimoto, K. Sakata, M. Someya, H. Yamamoto, R. Hirayama, Y. Matsumoto, Y. Furusawa, M. Hareyama: Gene expression associated with DNA-dependent protein kinase activity under normoxia, hypoxia, and reoxygenation. Journal of Radiation Research, 52, 464-471 (2011). 査読有
9. T. Ishii, M. Miyazawa, P.S. Hartman, N. Ishii: Mitochondrial superoxide anion($O_2^{\cdot-}$) inducible “mev-1” animal models for aging research. BMB rep. 44, 298-305 (2011). 査読有
10. T. Ishii, M Miyazawa, A. Onodera, K. Yasuda, N. Kawabe, M. Kirinashizawa, S. Yoshimura, N. Maruyama, P.S. Hartman, N. Ishii: Mitochondrial reactive oxygen species generation by the SDHC V69E mutation causes low birth weight and neonatal growth retardation. Mitochondrion 11, 155-165 (2011). 査読有
11. 伊藤敦、上野瑞己、秋山竜城、平山亮一、石井直明、石井恭正、宮沢正樹、篠生環、村山千恵子、古澤佳也：DNA 酸化損傷 8-OHdG を指標とした高 LET 線の生物作用の解明、平成 23 年度放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置等共同利用研究報告書、107-109 (2011). 査読無
12. 上野瑞己：重粒子線照射によるマウス組織内での DNA 酸化産物の生成の観測・計測に関する実験、東海大学大学院工学研究科応用理学専攻修士論文 (2011). 査読無
13. A. Ito, H. Nakano, K. Shinohara: Role of wild-type p53 in apoptotic and non-apoptotic cell death induced by X-irradiation and heat treatment in p53-mutated mouse M10 cells. J. Radiat. Res., 51, 665-673 (2010). 査読有
14. A. Onodera S. Yanase, T. Ishii, K. Yasuda, M. Miyazawa, P. S. Hartman N. Ishii: Post-dauer life span of Caenorhabditis elegans dauer larvae can be modified by X-irradiation. J. Radiat. Res. 51: 67-71 (2010). 査読有
15. R. Hirayama, Y. Matsumoto, Y. Kase, M. Noguchi, N. Takase, A. Uzawa, A. Ito, N. Matsufuji, K. Ando, R. Okayasu, Y. Furusawa: Direct and indirect actions to high-LET radiations. NIRS-KI Joint Symposium on Ion-Radiation Sciences, NIRS-M-235, 155-162 (2010). 査読無
[学会発表] (計 18 件)
1. 税所康正、伊藤敦：DNA2 本鎖切断生成の確率モデル、生物数学の理論とその応用、京都大学数理解析研究所、2012. 11. 13.
2. 北畠里実、込宮大伍、秋山竜城、上野瑞己、伊藤敦、村山千恵子、平山亮一、古澤佳也：細胞内 8-OHdG 検出による高 LET 領域での酸素効果減少機構の検証、日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、2012. 9. 7.
3. 伊藤敦、税所康正：低 LET 放射線による DNA2 本鎖切断生成過程の確率モデル、日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、2012. 9. 7.
4. 平山亮一、伊藤敦、安藤興一、古澤佳也：酸素効果のメカニズムにおける化学的因子と生物学的因子、日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、2012. 9. 6.
5. 北畠里実、込宮大伍、秋山竜城、上野瑞己、伊藤敦、平山亮一、古澤佳也：重粒子線による DNA 酸化産物の計測～酸化損傷の LET 依存性～、日本原子力学会関東・甲越支部第 5 回学生研究発表会、神奈川 (湘南工大)、2012. 03. 09
6. 平山亮一、松本孔貴、鶴澤玲子、幸田華奈、野口実穂、加瀬優紀、松藤成弘、伊藤敦、古澤佳也：重粒子線の直接作用がもたらす生物効果、第 14 回癌治療増感研究シンポジウム、奈良、2012. 02. 11
7. 平山亮一、松本孔貴、野口実穂、鶴澤玲子、幸田華奈、古澤佳也：X 線ならびに高 LET 放射線によって生成された DNA 損傷の低酸素環境下での修復動態、日本放射線影響学会第 54 回大会、神戸、2011. 11. 18
8. 村山千恵子、吉川正信、平山亮一、鶴澤玲子、小林広幸、古澤佳也：マウス舌粘膜上皮細胞障害を指標にした炭素イオン線の RBE の評価、日本放射線影響学会第 54 回大会、神戸、2011. 11. 17
9. ジャムスランジャヴ・エルデントクトホ、加藤祥成、吉田茂生、伊藤敦：中性子によって誘発された DNA 鎖切断に対する間接作用の評価、日本放射線影響学会第 54 回大会、神戸、2011. 11. 17
10. R. Hirayama: Oxygen enhancement ratio for different particles, International Open Laboratory Radiation Quality Research Unit Kick-Off Meeting, Darmstadt, Germany, 2011. 09. 05 (招待講演)
11. R. Hirayama, Y. Matsumoto, A. Uzawa,

- N. Takase, C. Tsuruoka, M. Wada, M. Noguchi, Y. Kase, N. Matsufuji, A. Ito, R. Okayasu, Y. Furusawa: Direct action is the key to understand the high biological effects caused by particle beams, 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, 2011. 08. 30
12. 平山亮一: トラック構造と生物効果、平成 23 年度京都大学原子炉実験所専門研究会、大阪 (京大原子炉)、2011. 07. 23
 13. 伊藤敦: PF 研究会「エネルギー付与の不均一性に着目した放射線生物影響の展望」、イオウ K 殻の XANES プロファイルを利用した生体イメージング、2011. 7. 15
 14. 税所康正、伊藤敦: DNA の 2 本鎖切断に関する数理生物学的考察、日本放射線影響学会第 53 回大会、京都、2010. 10. 21
 15. 平山亮一、松本孔貴、野口実穂、高瀬信宏、加瀬優紀、鶴岡千鶴、松藤成広、伊藤敦、安藤興一、岡安隆一、古沢佳也: 重粒子線の放射線作用による高 RBE のメカニズム、日本放射線影響学会第 53 回大会、京都、2010. 10. 22
 16. 奥野寛崇、円谷遼、関位和章、富田雅典、前田宗利、伊藤敦: X 線マイクロビーム照射におけるバイスタンダー効果での p53 と 53BP1 発現、日本放射線影響学会第 53 回大会、京都、2010. 10. 21
 17. R. Hirayama, A. Ito, Y. Matsumoto, A. Uzawa, M. Noguchi, R. Okayasu, Y. Furusawa: The type of DSB by direct action of X-rays is different comparison with the DSB induced by indirect action. 38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, Sweden, 2010. 09. 06
 18. R. Hirayama, Y. Matsumoto, M. Noguchi, N. Takase, Y. Kase, C. Tsuruoka, N. Matsufuji, A. Ito, K. Ando, R. Okayasu, Y. Furusawa: Contributions of direct and indirect actions in cell killing by high-LET radiations under hypoxic condition, the 49th Annual Meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group (PTCOG 49), P1-14, Maebashi, Japan, 2010. 05. 21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 敦 (ITO ATSUSHI)
東海大学・工学部・教授
研究者番号: 80193473

(2) 研究分担者

石井 直明 (ISHII NAOAKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 60096196

平山 亮一 (HIRAYAMA RYOICHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒

子医科学センター・研究員

研究者番号: 90435701

(3) 連携研究者

村山 千恵子 (MURAYAMA CHIEKO)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 50307295