

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17162

研究課題名（和文）超解像顕微鏡をもちいた重粒子線クラスター損傷の修復動態予測アルゴリズム開発

研究課題名（英文）Development of algorithm to predict the repair kinetics of cluster DNA lesions induced by carbon ions using super resolution microscopy

研究代表者

尾池 貴洋（Oike, Takahiro）

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10643471

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）：初年度に正常酸素環境下で多様なLETの炭素イオン線によって誘導される二本鎖切断の高精度3次元データを取得した。しかしその後のCOVID-19感染拡大に伴い、それ以降の実験を遂行することが不能となった（各年度実績報告書参照）。このことから、それまでの本研究課題の成果を、副次的初見も含めて全て学術集会や学術誌に発表し社会に還元することに注力する方針へ変更し、本研究課題を終了させた。結果として英文査読あり学術誌へ3報の論文を発表し、学術集会で9回発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者の知る限り正常酸素環境下で多様なLETの炭素イオン線によって誘導される二本鎖切断の高精度3次元データの取得は世界初である。今後はこれを論文として発表する。発表されれば同データはLETの最適化による炭素イオン線がん治療のさらなる個別最適化に資する重要な生物学的基盤情報となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the first fiscal year, we obtained high-precision 3D data of double-strand breaks induced by carbon-ions of various LETs under normoxic conditions. However, due to the subsequent COVID-19 pandemic, it became practically impossible to carry out further experiments (see the annual performance reports for details). Thus, we changed the research plan to focus on publishing all the data obtained up until that time, including secondary findings, in order to contribute to scientific community. As a result, we published three papers in English peer-reviewed journals and made nine presentations at scientific meetings.

研究分野：放射線生物学

キーワード：炭素イオン線

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炭素イオン線治療は X 線抵抗性腫瘍にも高い抗腫瘍効果を示す有望な放射線治療法である。本邦では平成 6 年に放射線医学総合研究所で治療が開始され、平成 28 年より骨軟部腫瘍、頭頸部腫瘍、前立腺癌の治療が相次いで保険収載されるなど適応拡大が進んでいる。治療施設数も増加傾向であり、将来的には低侵襲で根治性の高い治療法としてがん治療の主軸の一端を担うと期待されている。炭素イオン線の高い抗腫瘍効果は DNA に誘導される「クラスター損傷」の修復困難性に依る。クラスター損傷とは炭素イオンが通過した軌跡に沿って発生する高密度な電離によって誘導される多種の DNA 損傷の密集した集合を指す。具体的には、炭素イオン線は DNA 百塩基以内に二本鎖切断 (double strand break: DSB)、一本鎖切断 (single strand break: SSB)、塩基損傷 (base damage: BD) をそれぞれ複数誘導することが物理シミュレーション研究から示唆されている。しかし、従来の分子生物学的手法の検出限界から、クラスター損傷中の各種 DNA 損傷は可視化困難であった。このため、DSB、SSB、BD は通常、独立した機構により修復されるが、クラスター損傷部位における各種 DNA 損傷の修復動態は未解明である。さらに、がん治療に使用される炭素イオンビーム中には多様な線エネルギー付与 (linear energy transfer: LET) を有するビームが混在するが、異なる LET の炭素イオン線により誘導されるクラスター損傷の内容および修復動態の違いについては未解明である。DeltaVision OMX は世界最高の空間解像度を有する超高解像蛍光顕微鏡である。具体的には、OMX は 3D structured illumination (3D-SIM) 技術を採用し、X 軸: 100 nm、Y 軸: 100 nm、Z 軸: 250 nm と、従来の共焦点蛍光顕微鏡より 3~5 倍高い解像度を有する。OMX によって様々な生命科学分野で単分子蛍光イメージングが可能となった。本研究に関連する DNA 修復分野での一例を挙げると、Ku70/80 は DSB 末端へ 1~2 分子のみが集積するため従来法では可視化困難だったが、OMX によってこれが可視化された。申請者らは平成 26 年より OMX の DNA 修復研究への応用を開始し、OMX の超高解像蛍光シグナルを画像解析ソフトウェア Imaris 上で 3 次元再構成し定量する手法を開発した。さらに、炭素イオン線治療が X 線治療とは異なる大きく複雑な DSB を誘導することを OMX をもちいて超高解像レベルで世界で初めて同定した(2017 年 JASTRO 梅垣賞受賞論文)。以上から、OMX と Imaris の併用により、炭素イオン線誘導クラスター損傷部位における各種 DNA 損傷の修復動態の高精度な 3 次元定量が可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は超高解像顕微鏡 DeltaVision OMX をもちいて多様な線エネルギー付与 (LET) の炭素イオン線によって誘導されるクラスター損傷中の各種 DNA 損傷の修復動態を高精度解析し、LET からクラスター損傷の誘導と修復動態を予測するアルゴリズムを開発することである。

### 3. 研究の方法

概要は以下のとおりである。培養ヒト細胞株に LET 20~120 keV/μm の炭素イオン線を照射し、照射 0.5~24 h 後にそれぞれ DSB、SSB、BD のマーカー分子である Ku70/80、XRCC1、OGG1 を蛍光免疫染色する。超高解像顕微鏡 DeltaVision OMX と画像解析ソフトウェア Imaris をもちいて各マーカー分子の蛍光シグナルを 3 次元定量する。定量データを機械学習をもちいて解析し、LET と酸素状況からクラスター損傷の誘導と修復動態を予測するアルゴリズムを開発する。詳細は以下のとおりである。ヒト線維芽細胞株 1BRhTERT およびヒト肺癌細胞株 A549 をグラスシャーレ上に単層培養し、群馬大学重粒子線医学研究センターの生物実験用炭素イオン線照射装置を使用し、LET 20, 40, 60, 80, 100, 120 keV/μm のモノピーク炭素イオン線を照射角 5 度で照射する。線量は 1 細胞に炭素イオンの 1 トラックがヒットする 1 Gy を使用する。炭素イオン照射 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 時間後に検体をパラホルムアルデヒド固定し各種 DNA 損傷マーカー分子を確立されたプロトコールにのっとり蛍光免疫染色する。DSB、SSB、BD マーカー分子としてそれぞれ Ku70/80、XRCC1、OGG1 を使用する。OMX をもちいて各種 DNA 損傷マーカー分子の蛍光シグナル画像を実験条件あたり 20 細胞核取得する。Imaris をもちいて蛍光シグナルを 3 次元定量する。定量データを Deep Convolutional Neural Network や Random Forest などの機械学習をもちいて解析し「LET」の入力により「DSB、SSB、BD の誘導量と修復割合」を出力する回帰アルゴリズムを作製する。

### 4. 研究成果

初年度: 培養ヒト細胞株に正常酸素下で LET 20, 40, 60, 80, 100 keV/μm の炭素イオン線を照射し、照射 0.5h 後に DSB のマーカー分子である H2AX foci などを蛍光免疫染色した。超高解像顕微鏡 DeltaVision OMX と画像解析ソフトウェア Imaris をもちいて各マーカー分子の蛍光シグナルを 3 次元定量した。定量データの機械学習の予備的研究として、micronuclei を評価指標とし、放射線照射により誘導される micronuclei を自動検出する deep learning アルゴリズムの構築を試みた。具体的には(i) 培養細胞に X 線を照射し DAPI 染色した標本における核の蛍光顕微鏡画像を数百枚取得し、(ii) 正常核および micronuclei をアノテートし、(iii) これをテストセットとして

deep learning モデルを training し、(iv) パラメータを最適化中である。

第2年度：COVID-19 感染拡大に伴い、2020年4月頃より診療・研究の存続が困難なほどの甚大な影響が出現し、これにより申請時の研究計画の変更を余儀なくされた。具体的には現在までに得られている正常酸素環境下における超解像レベルのDSBの3次元体積と炭素イオン線LETの関連データは新規知見であるため、これをひとまず本研究課題の成果として学会や学術誌に発表する方針とし準備を進めた。

第3年度：昨年度よりCOVID-19 感染拡大により診療・研究の存続が大きく制限される状況が継続した。具体的には、第一に申請者または所属部局の同僚がCOVID-19 診療に動員されることにより研究時間が削減された。第二に2021年度初頭に超解像顕微鏡が故障し修理に必要なエンジニアが日本へ入国できないという事態が発生した。後者は現在まで続いており改善の見通しが立たない。以上から、当時点までの本研究課題の成果を副次的初見も含めて全て学術集会や学術誌に発表し社会に還元することに注力する方針へ変更し、結果として英文査読あり学術誌へ3報の論文を発表し、学術集会で9回発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Daijiro Kobayashi, Takahiro Oike, Kazutoshi Murata, Daisuke Irie, Yuka Hirota, Hiro Sato, Atsushi Shibata, Tatsuya Ohno.	4. 巻 10
2. 論文標題 Induction of micronuclei in cervical cancer treated with radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm10030110.	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 Takahiro Oike, Tatsuya Ohno	4. 巻 in press
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying radioresistance: data compiled from isogenic cell experiments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 Oike Takahiro, Uchihara Yuki, Permata Tiara Bunga Mayang, Gondhowiardjo Soehartati, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 54
2. 論文標題 Quantitative volumetric analysis of the Golgi apparatus following X-ray irradiation by super-resolution 3D-SIM microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00277-z	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takahiro Oike
2. 発表標題 Precision Radiotherapy
3. 学会等名 International Training Course on Carbon-ion Radiotherapy 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Oike
2. 発表標題 What Is Mutation, Precision Medicine, and Their Impact on Radiotherapy?
3. 学会等名 Indonesian Radiation Oncology Society Webinar “Personalized Medicine: From The Bench to The Clinics” (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾池貴洋
2. 発表標題 放射線生物学 最近のトピックス
3. 学会等名 第56回日本医学放射線学会秋季臨床大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾池貴洋, 村田和俊, 野田真永, 大野達也
2. 発表標題 How Can We Identify Actionable Target for Carbon Ion Resistance? A Pilot Study
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第33回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松秀一郎, 尾池貴洋, 小松有香, 松井利晃, Darwis NDM, Nachankar A, 中野隆史, 大野達也
2. 発表標題 ヒトがん細胞株の放射線感受性に関する大規模公共データベースの樹立と公開
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第33回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kobayashi D, Sato H, Saitoh JI, Oike T, Nakajima A, Noda SE, Kato S, Iwanaga M, Shimizu T, Ohno T, Nakano T
2. 発表標題 Salvage Re-Irradiation with Stereotactic Radiotherapy for In-Field Neck Lymph Node Recurrence: A Retrospective Study
3. 学会等名 2020 ASTRO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾池貴洋, 小松秀一郎, 久保田佳樹, 酒井真理, 齋藤淳一, 中野隆史, 大野達也
2. 発表標題 Machine learning-aided pipeline for data mining of cancer cell radiosensitivity
3. 学会等名 第79回日本医学放射線学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾池貴洋
2. 発表標題 炭素イオン線の殺細胞効果の体系的理解を目指して
3. 学会等名 日本量子医科学会第1回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾池貴洋
2. 発表標題 放射線治療におけるプレジジョンメディシンの推進を目指したトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第34回学術大会
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
---------	---------