

機関番号：82502

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790923

研究課題名 (和文) 放射線化学ならびに放射線生物学的観点からの低酸素環境下での細胞致死機構の解析

研究課題名 (英文) Radio-chemical and biological mechanisms in cell inactivation under hypoxia

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：大気下ならびに低酸素下での X 線誘発 OH ラジカルによる間接作用が細胞致死にどの程度関与しているかを、OH ラジカル捕捉剤である DMSO を用いて調べ、濃度を無限大へ外挿することで細胞致死への間接作用の寄与率を求めた。HRR 修復関連遺伝子変異株である 51D1 細胞では、野生型である CHO 細胞や AA8 細胞と同程度の間接作用による細胞致死寄与率を示したが、NHEJ 修復関連遺伝子変異株である xrs-6 細胞では、野生型よりも明らかに低い間接作用による細胞致死寄与率を示すことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We examined the contributions of OH radical mediated indirect action of X-irradiation on cell killing of CHO, AA8, xrs-6 and 51D1 cells under oxic and hypoxic conditions. The contributions of indirect action for xrs-6 cells under both conditions showed lower than that for CHO, AA8 and 51D1 cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：細胞致死、直接作用、間接作用、OH ラジカル、DMSO、X 線、DNA 損傷修復欠損細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線治療において抵抗性を示す低酸素性がん細胞の存在は解決すべき重要課題である。有酸素下で X 線照射された培養細胞は低酸素環境下に比べ感受性になることが酸素効果として古くから知られ、酸素効果の機構は酸素による損傷固定や還元性ラジカルとの中和反応であると言われてきた。このような化学的視点から低酸素細胞の放射線感受性増強を図る薬剤開発が行われてきたが、臨床試験では必ずしも良い結果を出せた

わけではない。研究代表者は酸素効果の機構に化学的要素だけでなく、DSB 修復といった生物学的要素の関与を明らかにし (R. Hirayama, et al., J. Radiat. Res., 46, 325-332, 2005)、両者が密接に関連していることを報告した。

(2) 放射線の生体への影響を考える上で、放射線の初期反応 (化学反応過程) が非常に重要な問題と考えられている。水の放射線分解で生じたフリーラジカル (放射線の間接作

用)がDNAと反応し損傷が生成される。フリーラジカルの中でも活性度の高いOHラジカルは10塩基対以内の異なる鎖上に2つの一本鎖切断(SSB)を形成し二本鎖切断(DSB)を生じさせるため、OHラジカルは細胞の生死に大きく影響を与えることが知られている。一般的にDSBはnon-homologous end-joining(NHEJ)とhomologous recombination repair(HRR)によって修復が行われ、本研究代表者はSFGE法により直接DSBを検出し極短時間の修復によってDSBはほとんど消滅することを報告した(R. Hirayama, et al., J. Radiat. Res., 46, 325-332, 2005)。

(3)放射線誘発OHラジカルによって生成したDSBがNHEJとHRRのどちらの修復機構によって修復され易いのか否かは不明である。またOHラジカルによるDSB生成の際に酸素がどのような修飾効果を果たしているのかも不明であり、放射線誘発OHラジカルの生物影響に関する詳細なデータを取得することが必須であった。

2. 研究の目的

本研究では酸素効果に深く関わる酸化性ラジカルの生物影響の基礎的知見を取得することで、低酸素細胞の放射線抵抗性を克服し、放射線治療効果向上を図るための戦略を確立することを大きな目的とした。具体的には細胞致死機構に対し、放射線誘発OHラジカルがどの程度関与しているかをラジカル捕捉剤による細胞保護率の割合から算出した。また、DSB修復能の違う細胞株を用いることでOHラジカルによる細胞致死とDSB修復機構の関係を明らかにすることを目指した。さらに低酸素下での細胞致死に対するOHラジカルの寄与率を求めることで、低酸素下での細胞致死機構の機構解明も進めた。

3. 研究の方法

(1) 大気環境下での放射線感受性

ハムスター細胞野生型(CHO, AA8)に対し、DSB修復能の異なる細胞の候補としてNHEJ修復関連遺伝子変異株(xrs-6)、HRR修復関連遺伝子変異株(51D1)を用いた。X線照射1時間前から有酸素ガス(95%Air/5%CO₂)を細胞照射容器へ流し、密封後照射を行い、コロニー形成法を行った。照射後10~14日間培養を行い、細胞の固定・染色によりコロニー数をカウントし、細胞生存率を算出した。

(2) 低酸素環境下での放射線感受性

(1)の場合と同様の細胞株を用いて、照射1時間前から低酸素ガス(95%N₂/5%CO₂)を細胞照射容器へ流し(図1)、低酸素状態に置換を行った。置換後、照射容器を密封しX線照射を行い、細胞生存率を求めた。

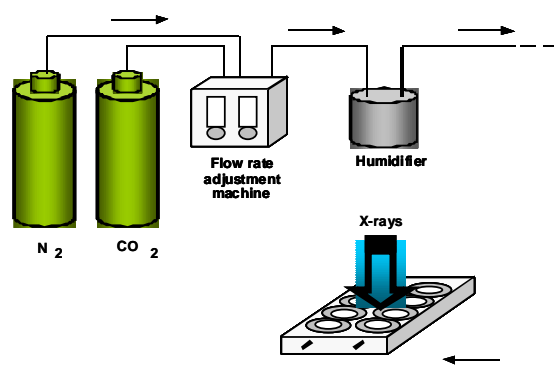


図1 低酸素置換装置と照射容器

(3) 大気環境下でのOHラジカルの細胞致死効果

一定線量(細胞生存率10、1%を得るのに必要な線量)を照射したときのOHラジカル捕捉剤であるDMSO(ジメチルスルホキシド)と細胞致死効果の関係を細胞生存率により求めた。照射1時間前に培養細胞を0.15から1M濃度で処理し、X線照射後DMSOを洗い流しコロニー形成法を行った。DMSOと細胞生存率の関係からOHラジカルの最大保護率を算出し(図2)、X線誘発OHラジカルの細胞致死への寄与率を求めた。

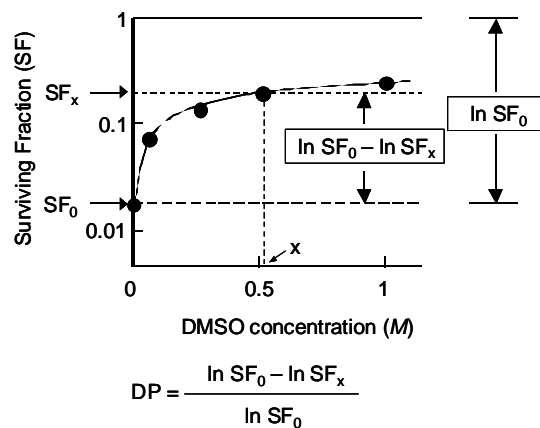


図2 放射線による細胞致死作用におけるDMSOの放射線防護効果とDMSOによる細胞保護率(Degree of protection: DP)の算出方法。DMSO濃度0MとxMで処理された時の細胞生

(4) 低酸素環境下でのOHラジカルの細胞致死効果

(3)の場合と同様にDMSOで培養細胞を処理し、低酸素状態へ置換を行った後にX線照射を行った。コロニー形成法より細胞生存率を算出し、X線低酸素下照射によって誘発されたOHラジカルの細胞致死効果を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 大気環境下ならびに低酸素環境下におけるハムスター細胞のX線感受性

X線に対するハムスター細胞野生型 (CHO, AA8)、NHEJ 修復関連遺伝子変異株 (xrs-6) および HRR 修復関連遺伝子変異株 (51D1) を調べた (図 3)。各々の生存率曲線から 10%細胞生存率を示す線量を用いて、OER (酸素増感比) を求めたところ、野生型である CHO、AA8 と NHEJ 修復関連遺伝子変異株である xrs-6 の OER は 2.7~2.8 であったのに対し、HRR 修復関連遺伝子変異株である 51D1 では 2.5 であった。このことは HRR 修復ができない細胞では低酸素による放射線抵抗性が小さいことを意味し、非常に貴重なデータを取得できた。低酸素に対する放射線抵抗性克服には HRR 修復機構を標的とした治療戦略が今後は重要となることを示唆する結果である。

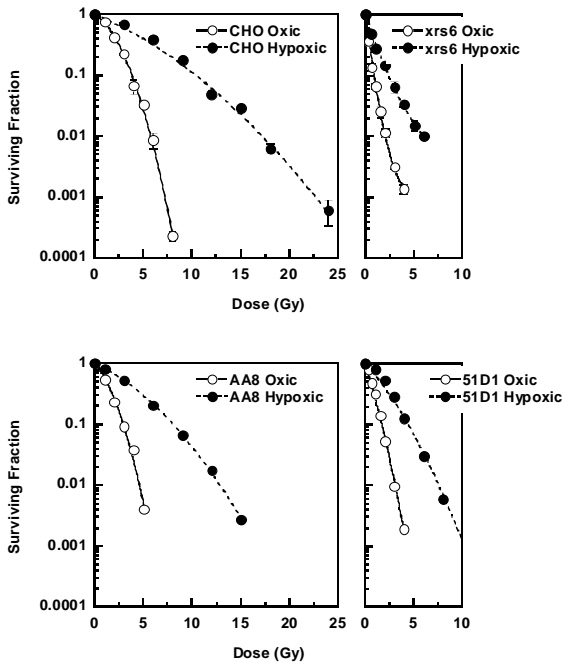


図 3. X線照射による線量-効果関係

(2) 細胞致死に対する間接作用の寄与率

X線誘発 OH ラジカルによる細胞致死への寄与率はハムスター細胞野生型 (CHO, AA8) および HRR 修復関連遺伝子変異株 (51D1) では大気下で 80~90%、低酸素環境下では 50~60%であった。野生型における寄与率の値は過去に報告されてきた値と矛盾するものではなかった。低酸素下での研究はほとんどないため、新たな知見を取得できた。NHEJ 修復関連遺伝子変異株 (xrs-6) での結果は、他の細胞株とは異なり、大気下での細胞致死に対する寄与率は 50%、低酸素環境下では 30%と非常に低い値を示した。従来から言われているX線のような「光子放射線では細胞致死

の主作用は間接作用である」という一般的な説とは異なる結果となった。X線の直接作用ならびに間接作用によって生じたDSBに対するNHEJとHRRの働き方が異なることが、明らかになった。今後は直接作用と間接作用によって生じたDSBの構造等の違いについて調べる必要が出てきた。

本研究では細胞への放射線作用と生じたDSBに対する修復機構の応答を調べることにより、放射線の物理、化学ならびに生物過程に至る一連のプロセスを放射線化学および放射線生物学的観点から解き明かすことができた。

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 4 件)

① Ryoichi Hirayama, Yoshitaka Matsumoto, Yuki Kase, Miho Noguchi, Nobuhiro Takase, Akiko Uzawa, Atsushi Ito, Naruhiro Matsufuji, Koichi Ando, Ryuichi Okayasu, Yoshiya 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

② 平山亮一、伊藤敦、古澤佳也: 細胞やDNAへの影響から見たトラック構造、放射線化学、No. 89、9-12、March、2010、査読有

③ Ryoichi Hirayama, Yoshitaka Matsumoto, Yuki Kase, Miho Noguchi, Koichi Ando, Atsushi Ito, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: Radioprotection by DMSO in Nitrogen Saturated Mammalian Cells Exposed to Helium Ion Beams. Radiation Physics and Chemistry, 78, 1175-1178, 2009, 査読有

④ Ryoichi Hirayama, Atsushi Ito, Masanori Tomita, Teruyo Tsukada, Fumio Yatagai, Miho Noguchi, Yoshitaka Matsumoto, Yuki Kase, Koichi Ando, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High LET Radiations. Radiation Research, 171, 212-218, 2009, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

① 平山亮一、松本孔貴、野口実穂、高瀬信宏、加瀬優紀、鶴岡千鶴、松藤成弘、伊藤敦、安藤興一、岡安隆一、古澤佳也: 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、2010. 10. 22、京都

② **平山亮一**：重粒子線誘発OHラジカルの細胞致死影響と酸素効果の機構解明、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010. 10. 21 (受賞講演)、京都

③ **Ryoichi Hirayama**, Yoshitaka Matsumoto, Yuki Kase, Miho Noguchi, Nobuhiro Takase, Akiko Uzawa, Atsushi Ito, Naruhiro Matsufuji, Koichi Ando, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: Direct and indirect actions to high-LET radiations. NIRS-KI Joint Symposium on Ion-Radiation Sciences, 2010. 09. 10, Stockholm, Sweden

④ **Ryoichi Hirayama**, Atsushi Ito, Yoshitaka Matsumoto, Akiko Uzawa, Miho Noguchi, Ryuichi Okayasu, Yoshiya 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, 2010. 09. 06, Stockholm, Sweden

⑤ **平山亮一**、松本孔貴、野口実穂、高瀬信宏、加瀬優紀、鶴岡千鶴、松藤成弘、伊藤敦、安藤興一、岡安隆一、古澤佳也：低酸素下における高LET放射線誘発OHラジカルの細胞致死作用、第 49 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、札幌、2010. 07. 09

⑥ **Ryoichi Hirayama**, Yoshitaka Matsumoto, Miho Noguchi, Nobuhiro Takase, Yuki Kase, Chizuru Tsuruoka, Naruhiro Matsufuji, Atsushi Ito, Koichi Ando, Ryuichi Okayasu, Yoshiya 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), 2010. 05. 20, Maebashi

⑦ **平山亮一**、古澤佳也：DNA二本鎖切断はLET増加に伴い増加するのか？減少するのか？
(3) DSB生成収率の増減ファクターは何か？、日本放射線影響学会第 52 回大会、2009. 11. 13、広島

⑧ **平山亮一**：高線量域におけるRBEとOER、平成 21 年度京都大学原子炉実験所専門研究会、2009. 10. 18、大阪

⑨ **平山亮一**、古澤佳也、岡安隆一：細胞の生き死にから見たトラック構造、高LET放射線研究会、2009. 07. 30、東京

⑩ **平山亮一**、古澤佳也、伊藤敦、野口実穂、松本孔貴、鶴澤玲子、安藤興一、岡安隆一：NHEJ修復欠損xrs6 細胞における放射線作用の細胞致死効果、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008. 11. 21、北九州

⑪ **Ryoichi Hirayama**, Yoshiya Furusawa, Chieko Murayama, Yohsuke Kusano, Atsushi Ito: LET dependence of oxidative DNA base damage in 2-deoxyguanine aqueous solution irradiated with heavy ions, The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008), 2008. 09. 01, Tokyo

⑫ **Ryoichi Hirayama**, Yoshitaka Matsumoto, Yuki Kase, Miho Noguchi, Koichi Ando, Atsushi Ito, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: Radioprotection by DMSO in Nitrogen Saturated Mammalian Cells Exposed to Helium Ion Beams, The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008), 2008. 08. 30, Tokyo

⑬ **平山亮一**、加瀬優紀、伊藤敦、古澤佳也：トラック構造と生物学的エンドポイントの関係、平成 20 年度弥生研究会~放射線化学とその周辺から~、2008. 07. 29、茨城

⑭ **Ryoichi Hirayama**, Yoshiya Furusawa, Atsushi Ito, Miho Noguchi, Yoshitaka Matsumoto, Akiko Uzawa, Koichi Ando, Ryuichi Okayasu: Contribution of indirect action of X-irradiation under oxic and hypoxic conditions in different radiosensitivity cells, 10th International Workshop Radiation Damage to DNA 2008. 06. 12, Fukushima,

[その他]

(1) ホームページ

<http://www.nirs.go.jp/index.shtml>

(2) 表彰

①平成 22 年度日本放射線影響学会奨励賞
平山亮一：重粒子線誘発OHラジカルの細胞致死影響と酸素効果の機構解明、2010. 10. 21、京都

②Travel Support Award. **Ryoichi Hirayama**: 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, 2010. 09, Stockholm, Sweden

③The Outstanding Poster Award. **Ryoichi Hirayama**: Contributions of direct and

indirect actions in cell killing by high-LET radiations under hypoxic condition. 49th Annual Meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group (PTCOG 49) 2010.05.21, Maebashi

④ Financial Assistance for Young Scientists. **Ryoichi Hirayama**: INDUCTION OF DNA DSB AND ITS REJOINING IN THE CLAMPED AND NON-CLAMPED TUMORS AFTER CARBON ION BEAMS COMPARED WITH X RAYS. 15th International Symposium on Microdosimetry (Micros 2009) 2009.10, Verona, Italy

⑤第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会大会長賞 **平山亮一**: 移植腫瘍のX線と重粒子線に対する感受性の比較 -RBEとOERを中心に-、第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、2009.07.10、富山

⑥ Young Investigator Awards. **Ryoichi Hirayama**: Contribution of indirect action of X-irradiation under oxic and hypoxic conditions in different radiosensitivity cells. 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2008.06, Fukushima

(活動)

①平成 22 年度日本放射線影響学会評議員

②若手放射線生物学会副運営委員 (2010.01-2010.12)

③平成 21 年度日本放射線影響学会評議員

④平成 21 年度日本放射線影響学会学会連携検討委員会委員

⑤平成 21 年度日本放射線影響学会「評議員選挙」選挙管理委員会委員長

⑥若手放射線生物学会運営委員 (2009.01-2009.12)

⑦ The 2nd Asia-Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008), EXECUTIVE COMMITTEE, 2008.08

⑧平成 20 年度日本放射線影響学会評議員

⑨平成 20 年度日本放射線影響学会学会連携検討委員会委員

⑩若手放射線生物学会運営委員 (2008.01-2008.12)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 亮一 (HIRAYAMA RYOICHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医学センター・研究員

研究者番号：90435701

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし