

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19969

研究課題名（和文）放射線が誘発する細胞内温度、pH変化とそのダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Elucidation of radiation-induced intracellular temperature and pH changes and dynamics

研究代表者

神長 輝一（Kiichi, Kaminaga）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・研究員

研究者番号：90825176

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：温度とpHは、細胞内のタンパク質活性や化学反応速度を変化させる要因であり、微小な変化もシグナルネットワークを介した細胞の恒常性維持に影響を与える。一方、電離放射線はDNAおよびオルガネラに様々な損傷を誘発するが、その影響の一つとして、細胞内の温度およびpH変化を誘発する可能性があると考えられる。本研究では量子センサーの一種である蛍光ナノダイヤモンドを用いてX線照射後の細胞内温度計測により、がん、および正常細胞においてX線照射1時間後に細胞内温度計測が上昇すること、正常細胞においてはこの温度上昇が一週間後においても持続している可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで放射線による細胞影響研究において温度やpHなど物理化学的パラメーターを指標とした検討は前例が少なく、本研究は新たな側面からの放射線影響解明にアプローチしており、これまでにない新規知見を得られると期待される。また、近年、腫瘍内微小環境における温度、pHの重要性も明らかになりつつあり、本研究を拡大することで発がんメカニズムの解明、がん治療の高度化に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Temperature and pH are factors that alter intracellular protein activity and chemical reaction rates, and even small changes can affect cellular homeostasis via signalling networks. On the other hand, ionising radiation induces various types of damage to DNA and organelles, one of the effects of which may be the induction of temperature and pH changes within the cell. In this study, intracellular temperature measurements after X-ray irradiation using fluorescent nanodiamonds, a type of quantum sensor, revealed that the intracellular temperature measurement increased after 1 hour of X-ray irradiation in cancer and normal cells. In addition, we obtain the results suggest that this temperature increase in normal cells may persist even after a week of X-ray irradiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：蛍光ナノダイヤモンド 細胞内温度 放射線影響

1. 研究開始当初の背景

温度と pH は、細胞内のタンパク質活性や化学反応速度を変化させる要因であり、微小な変化もシグナルネットワークを介した細胞の恒常性維持に影響を与える。一方、電離放射線は DNA およびオルガネラに様々な損傷を誘発するが、その影響の一つとして、細胞内の温度および pH 変化を誘発する可能性があると考えられる。DNA 損傷応答により活性化される修復タンパク質の多くは、ATP を消費しその活性を發揮する。しかし、ATP 加水分解で生じるエネルギーの一部は、熱として消費されてしまう。つまり、DNA 損傷応答による ATP 消費の亢進は、細胞内の温度上昇を誘発する可能性がある。また、X 線照射後に観察されるミトコンドリアのオートファジー(マイトファジー)は、プロトンがミトコンドリアからの流出する脱共役の誘発を示唆している。過去の研究から脱共役剤は細胞温度の上昇を誘発することが解明されており、放射線によりミトコンドリア脱共役も温度上昇を誘発する可能性がある。

また、pH は水素イオン(プロトン)濃度により規定される化学パラメーターである。ミトコンドリア脱共役は、膜間腔から細胞質あるいはマトリクス側へのプロトン流出であり、周囲の pH は低下すると考えられる。以上のことから、放射線は ATP 消費の亢進による熱産生とミトコンドリアでの脱共役を介して温度、pH 変化を誘発し、細胞内のタンパク質活性と化学反応速度を変化させている可能性がある。しかし、放射線により誘発される細胞内温度、pH 変化に関する知見は蓄積が乏しい。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 電離放射線が誘発する核、ミトコンドリアの温度、pH 変化の程度とそのダイナミクス、(2) DNA 損傷と損傷応答の核、ミトコンドリアの温度、pH 変化への寄与の解明を目的に研究を行う。これにより、電離放射線による DNA 損傷応答を介した細胞内環境の変化を明らかにすることができるかと期待される。

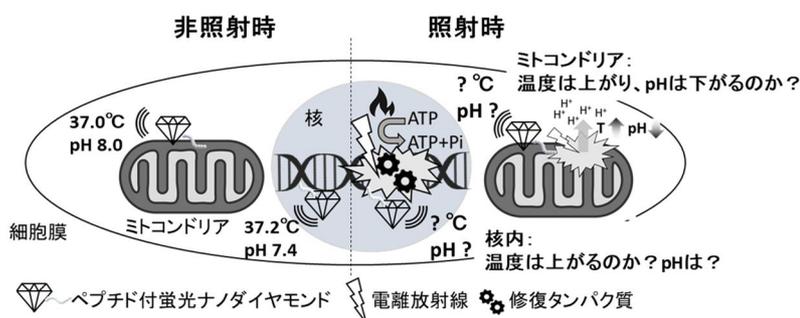


図1 研究目的の概要

特定の細胞小器官に FND を送達し、電離放射線照射前後の温度・pH を計測する。

3. 研究の方法

本研究で使用する蛍光ナノダイヤモンド(Fluorescent Nano Diamond : FND)は、特定周波数のマイクロ波を印加することで蛍光強度が低下するが、蛍光強度が低下する周波数は周囲の温度依存的に変化する(図2)。そして、蛍光強度が低下する周波数は他の要因に影響されず、独立した応答を示すことが物理学的に証明されている。さらに、協力研究者の五十嵐等は FND が pH 変化に対して鋭敏に応答する性質を利用し、pH ナノセンサーとして利用できることを報告している (Fujisaku T. et al. ACS Nano 2019)。FND は細胞に対する毒性が少なく、褪色が生じないため、長期間にわたる温度、pH センサーとして非常に有用である。

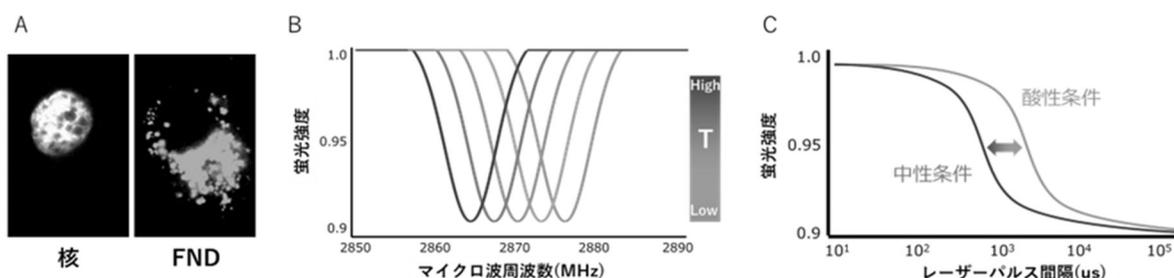


図2 蛍光ナノダイヤモンド(FND)を用いた温度、pH 計測の原理

- (A) 細胞内に取り込まれた FND の蛍光イメージ
- (B) 温度計測の原理：温度依存的に変化するマイクロ波共鳴周波数を解析することで温度計測を行う
- (C) pH 計測の原理：FND 周囲のプロトン濃度依存的に変化するスピン緩和時間(T1)の変化を蛍光強度変化として検出する

まず、FND を用いた細胞内温度計測手法を確立するため、数十～数百 nm 程度の FND を異なる濃度で培地に懸濁し、オーバーナイト培養による取込条件の最適化を行った。また、FND 添加による細胞毒性評価のため、MTT アッセイを用いた毒性評価を試みた。

次に、細胞全体への X 線照射が誘発する核、ミトコンドリアの温度、pH 変化の定量とダイナミクスの解明を目的に、前述の検討により最適化した FND 導入法により FND を導入した培養細胞に X 線発生装置を用いた X 線照射(全体照射)を行った。

4. 研究成果

培養細胞への蛍光ナノダイヤモンド導入法を最適化するため、蛍光ナノダイヤモンドの粒子径および表面修飾方法、濃度の検討を行った。粒子径の検討では数十 nm から数百 nm 程度のナノダイヤモンド粒子を細胞に導入した。どの粒子径においても培養細胞への取込が確認されたが、粒子径の増大に伴い温度計測精度が高くなったことから、200nm 程度のナノダイヤモンドを用いることとした。また、未修飾のナノダイヤモンド粒子は疎水性が高く疎水性相互作用により水中で凝集が生じるため、培地中での分散性を確保するための表面カルボキシ化が必要であることが分かった。さらに、細胞内の蛍光ナノダイヤモンド数は培地への添加濃度依存的に増加するが、オーバーナイトで蛍光ナノダイヤモンドを添加した場合、500ug/ml 以上の濃度では培養中に細胞が剥離することから 200-100ug/ml 程度が至適濃度であると考えられる。

さらに、リソソーム染色試薬を用いて蛍光ナノダイヤモンドとリソソームの共局在を確認したところ、大半の蛍光ナノダイヤモンドがリソソーム内に存在することが確認された。このことから培地に添加された蛍光ナノダイヤモンドはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソームからリソソームに移行していると考えられた。

ここまでの検討結果から 200nm 程度の蛍光ナノダイヤモンドを 100-200ug/ml の濃度で培地添加(オーバーナイト)により導入した HeLa 細胞および BJ-5ta 細胞の温度計測を行った結果、1 細胞の温度を 0.5-1 の精度で計測することに成功した。さらに、X 線照射による細胞内温度への影響を明らかにするため、X 線照射装置を用いて前述条件で蛍光ナノダイヤモンドを導入した HeLa 細胞および BJ-5ta 細胞に X 線 10Gy を照射し、照射 1~2 時間後の細胞内温度を計測した。その結果として、X 線照射により細胞内温度が 0.5 程度上昇する可能性を示唆する結果を得た(図 3A,B)。さらに、BJ-5ta 細胞においては老化様増殖停止が誘発されていると考えられる X 線 20Gy 照射 8 日後において、細胞内温度が上昇している可能性を示唆する結果を得ており、細胞老化と細胞内温度の関連も今後、検討が必要であると考えられる。

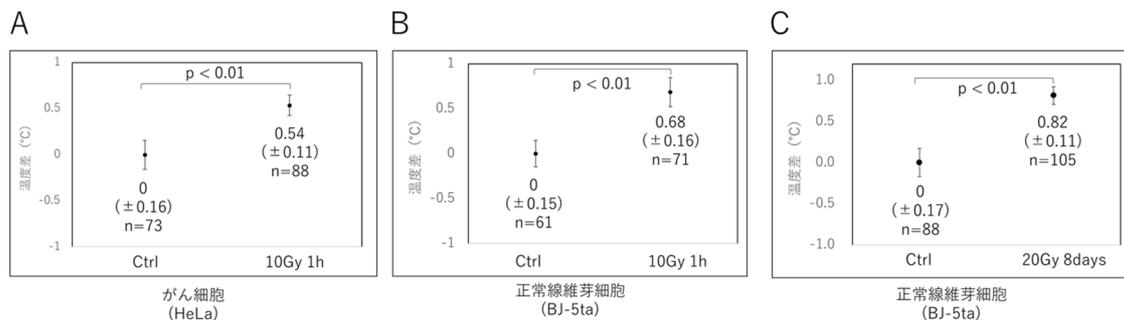


図 3 X 線照射後の細胞内温度計測結果

細胞周期依存的な細胞質の温度変化解明につながる知見の収集に努めた。放射線照射による DNA 損傷は細胞周期チェックポイントによる細胞周期停止および遅延生じさせるため、その前提となる細胞周期依存的な細胞内温度変化の解明は、放射線による細胞内温度変化を明らかにするための重要な基礎的知見となる。細胞周期依存的な細胞質の温度変化を明らかにするため、細胞周期可視化システム(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator : Fucci)を導入した HeLa 細胞に蛍光ナノダイヤモンドをエンドサイトーシスにて取り込ませ、各細胞周期の温度計測を実施した結果、G2/M 期の細胞質温度が他細胞周期よりも高いことを示唆する結果を得た。

また、本研究の基礎的知見となる、細胞質(主にミトコンドリア)に対する放射線の影響を放射光 X 線マイクロビームを用いて解明を試み、正常細胞では細胞質のみへの X 線照射はミトコンドリア量の減少を誘発し、一方、核のみへの照射では mitotic skip によるミトコンドリア量の増加を誘発するという照射部位特異的に相反する影響を誘発することを解明した(図 4、Kaminaga K., et al. Radiat. Res.,2020)。さらに、将来的な動物個体レベルでの放射線による細胞温度変

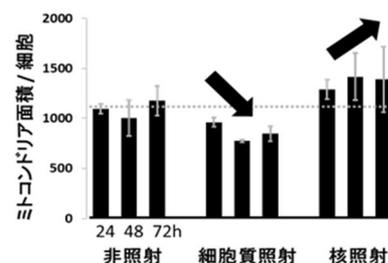


図 4 照射部位特異的なミトコンドリア量変化

化の解明に向け、マウスを用いた in vivo イメージング系において世界最高範囲のナノダイヤモンドを用いた温度計測手法の開発にも成功した(図 5、Kaminaga K., et al. Biomater. Sci., 2021)。

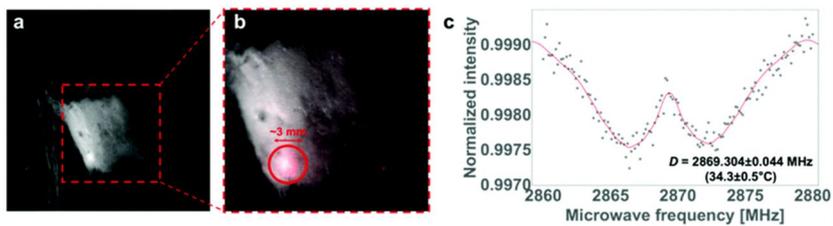


図 5
マウス背部に投与したダイヤモンド粒子を用いた in vivo 温度計測実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukunaga Hisanori, Kaminaga Kiichi, Hirose Eri, Watanabe Ritsuko, Usami Noriko, Prise Kevin M., Yokoya Akinari	4. 巻 22
2. 論文標題 No Intercellular Regulation of the Cell Cycle among Human Cervical Carcinoma HeLa Cells Expressing Fluorescent Ubiquitination-Based Cell-Cycle Indicators in Modulated Radiation Fields	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12785 ~ 12785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312785	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 該当する
1. 著者名 Yanagi Tamami, Kaminaga Kiichi, Suzuki Michiyo, Abe Hiroshi, Yamamoto Hiroki, Ohshima Takeshi, Kuwahata Akihiro, Sekino Masaki, Imaoka Tatsuhiko, Kakinuma Shizuko, Sugi Takuma, Kada Wataru, Hanaizumi Osamu, Igarashi Ryuji	4. 巻 15
2. 論文標題 All-Optical Wide-Field Selective Imaging of Fluorescent Nanodiamonds in Cells, In Vivo and Ex Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 12869 ~ 12879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.0c07740	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 Kaminaga Kiichi, Yanagihara Hiromi, Genjo Takuya, Morioka Takamitsu, Abe Hiroshi, Shirakawa Masahiro, Ohshima Takeshi, Kakinuma Shizuko, Igarashi Ryuji	4. 巻 9
2. 論文標題 Non-contact measurement of internal body temperature using subcutaneously implanted diamond microparticles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 7049 ~ 7053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1BM01187A	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 Yanagi Tamami, Kaminaga Kiichi, Kada Wataru, Hanaizumi Osamu, Igarashi Ryuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Optimization of Wide-Field ODMR Measurements Using Fluorescent Nanodiamonds to Improve Temperature Determination Accuracy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 2282 ~ 2282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano10112282	査読の有無 無
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 Fukunaga Hisanori, Kaminaga Kiichi, Sato Takuya, Butterworth Karl T., Watanabe Ritsuko, Usami Noriko, Ogawa Takehiko, Yokoya Akinari, Prise Kevin M.	4. 巻 194
2. 論文標題 Spatially Fractionated Microbeam Analysis of Tissue-sparing Effect for Spermatogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 698-706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-19-00018.1	査読の有無 無
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 Kaminaga Kiichi, Hamada Ryo, Usami Noriko, Suzuki Keiji, Yokoya Akinari	4. 巻 194
2. 論文標題 Targeted Nuclear Irradiation with an X-Ray Microbeam Enhances Total JC-1 Fluorescence from Mitochondria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 511 - 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RR15110.1	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神長輝一
2. 発表標題 蛍光ナノダイヤモンドを用いたX線照射が誘発する細胞内温度変化の解明
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

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 顕微鏡対物レンズ、顕微鏡対物レンズ用アタッチメント及び顕微鏡	発明者 五十嵐龍治、神長輝一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-043239	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
---------	---------