

令和元年6月10日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03598

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

研究課題名(英文) Cellular response by the targeted cytoplasmic irradiation in normal human fibroblasts with monochromatic X-ray microbeams

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・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・上席研究員(定常)

研究者番号：70281673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,700,000円

研究成果の概要(和文)：放射光X線マイクロビームを利用して、細胞質のみに低線量照射した時の細胞致死効果に与える影響を調べた。得られた結果から、予め細胞質に致死効果を誘導しないような低線量のX線を照射した場合、3時間以内に完結するような細胞応答が細胞内に生じ、引き続き細胞核へのX線照射に依る細胞損傷を軽減する効果が起こることが判った。これは細胞質へのX線照射によるエネルギー付与によって放射線の照射効果に適応するような反応が細胞内に誘導されたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロビーム化したX線を細胞核または細胞質に限定的に照射して誘導される生物効果・細胞応答を解明しようとする研究は世界に例のない独創的な研究である。強い強度の放射光X線マイクロビームによる細胞特定部位限定的照射技術の汎用化は、放射線損傷の初期過程から細胞レベルの影響の広範囲に渡る放射線生物影響誘導メカニズムの解明が期待出来るとともに、東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所の事故に起因する放射性物質による環境汚染で最も問題となる低線量(率)放射線被ばくの人体影響解明からがんの放射線治療や宇宙放射線の防護など広い応用面にもインパクトを与える研究となることが期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We have been examining the radio-adaptive response induced in the cells pre-irradiated cytoplasm with low-LET electromagnetic radiations. The cytoplasm of all cells captured by the computerized irradiation system was irradiated with 10R first, and then the cell nucleus of all cells captured was irradiated with 10R at the 3hr interval, within which the cells were kept in a CO2 incubator at 37°C. Cell-killing effect was measured with a colony-forming assay as a reproductive cell death. The surviving fraction for the targeted cell nucleus irradiation alone was around 0.80 and no cell-killing effect was induced by the targeted cytoplasm irradiation alone. The surviving fraction in the cells irradiated with the targeted cell nuclei when irradiated the cytoplasm beforehand was increased at 0.96. The obtained results clearly suggest that the radio-adaptive response should occur in the cells pre-irradiated to cytoplasm with the X-ray microbeams.

研究分野：放射線基礎医学

キーワード：電磁波放射線 シンクロトロン放射光 マイクロビーム バイスタンダー効果 放射線適応応答 細胞質限定的照射 ヒト正常細胞 細胞増殖死

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がんの放射線治療や診断に代表される医療被曝に関わる人体への放射線影響、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に対する人体への放射線影響、宇宙空間あるいは高高度飛行における宇宙船・航空機内での人体への放射線影響などは、今後大きな関心事の一つになることが予想される。また研究開始当初においても、東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所の事故に起因する放射性物質による環境汚染で最も問題となっていたセシウム137によるベータ線、ガンマ線の低線量（率）放射線被ばくの生物影響の全容解明には遠い状況であった。このような放射線源に対する放射線影響研究で特に問題となるのは、それ自体では急性な放射線障害の自覚症状を伴わない低線量（率）放射線の照射効果であり、そこでは放射線細胞応答の一つである直接照射された細胞の生物効果が周囲の直接放射線の照射を受けていない非照射細胞（バイスタンダー細胞）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メカニズム解明の鍵を握ると考え、低 LET 放射線により細胞応答（バイスタンダー効果）解明を目指した本研究の計画作成に至った。

バイスタンダー効果研究は、これまでに世界中の研究室で放射性元素やマイクロビーム放射線を駆使して精力的に展開されているが、そのほとんどが高い線エネルギー付与（Linear Energy Transfer：LET）の放射線である²³⁸Puから放出されるアルファ線やヘリウムイオンマイクロビームを利用した研究で、比較的 low LET 放射線である電磁波放射線を細胞局所に照射した研究は世界的に見ても非常に限られている。そこで本研究では、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設に設置された放射光 X 線マイクロビーム照射装置を駆使して、高輝度の放射光を利用することにより、単色化し 10 μ m x 10 μ m レベルにマイクロビーム化した後でも、放射線生物影響実験に供するに十分な強度の X 線が得られる利点を生かし、X 線を細胞の核または細胞質のみに放射線照射することによる細胞応答研究にチャレンジした。

2. 研究の目的

低線量（率）放射線で誘導される生物効果のうち、直接放射線を照射された細胞の生物効果が周囲の直接放射線を照射されていない細胞（バイスタンダー細胞）にも現れるバイスタンダー効果は、高 LET 放射線であるイオンビームを用いた研究では明らかになってきたが、福島第一原子力発電所の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 low LET 電磁波放射線によるバイスタンダー効果を含めた低線量放射線応答の実体は不明な点が多い。本研究は単色化・マイクロビーム化しても生物影響研究に供することが出来る強い強度の放射光を線源として X 線を 10 μ m x 10 μ m のビームサイズにマイクロ化し、細胞質のみに X 線を限定的に照射することによって誘導される細胞応答のメカニズムを解明する事を目的として計画した。

3. 研究の方法

本研究では、日本国内の公的な細胞バンクより購入したヒト皮膚由来正常線維芽細胞を用いた（供給元：理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室、細胞番号：RBC0222、細胞名：NB1RGB）。生物学的エンドポイントは、コロニー形成法によって細胞の増殖死を検出した。放射光 X 線マイクロビームの照射は、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設の BL-27B に設置された X 線マイクロビーム照射装置を利用して行った。用いたヒト正常細胞の細胞質への限定的照射は、以下の方法によって実施した。

- (1) 中央部分を削り貫いた金製の板に X 線を 99%透過する SiN 膜を張り、その上に直径 22 μ m、高さ 20 μ m の金製ポストを立てた細胞質限定的照射用アタッチメントを照射システムに組み込む（図 1）。
- (2) ヘキストによる蛍光色素で染色した細胞核にマイクロビームの中心をコンピューター制御して照準し、金製ポストで細胞核を遮蔽することによって認識した一つ一つの細胞の細胞質のみに X 線を照射する（図 2）。

この方法に従い、申請書に掲げた作業仮説『細胞質に電磁波放射線のエネルギー付与が起こった場合、細胞核に生じた放射線損傷を軽減する何らかのメカニズムが働き、バイスタンダー効果を抑制することにより細胞致死を軽減する（放射線適応応答）』を検証するために、細胞質に予め 10 レントゲン（0.092Gy 相当）を照射し、3 時間炭酸ガスインキュベーター内で保持し

細胞応答を完了させた後引き続き細胞核に 10 レントゲン照射したときの細胞生存率を調べ、細胞核単独照射の場合の生存率と比較検討し、掲げた作業仮説を評価した。

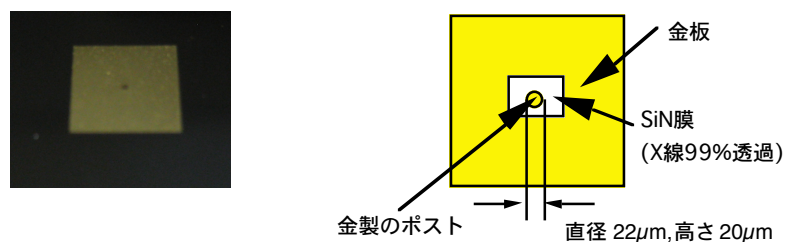


図 1. 放射光 X 線マイクロビームを細胞質のみに限定的に照射するための金製アタッチメント。

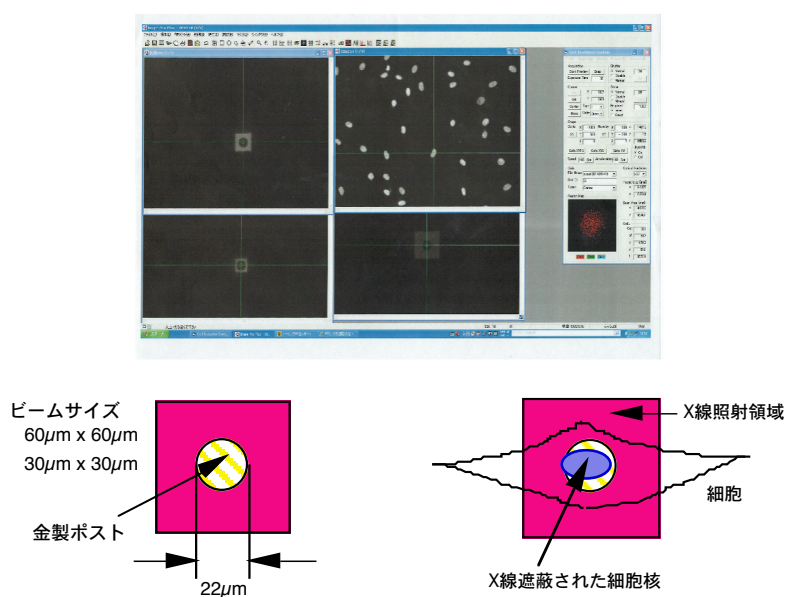


図 2. 細胞質限定的照射法の概念図。上図は実際に使用したコンピューター制御によるマイクロビームの形状とヘキスト染色して認識したヒト正常細胞の細胞核の制御画面のハードコピー。X 線マイクロビームサイズとしては、 $60\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$ と $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ の二種類を作成し、それぞれ中央部分が金製ポストで遮蔽された正方形ドーナツ状のビームを用いてヒト正常細胞の細胞質のみに X 線を照射する。

4. 研究成果

得られた結果を図 3 に示す。細胞核に 10 レントゲン (0.092Gy 相当) 単独で照射した時の生存率が 80%であったのに対して、細胞質に 10 レントゲン単独で照射した時の生存率がほぼ 100%で有った。このようにヒト正常細胞の細胞核または細胞質のみに限定的に X 線の低線量照射を行い、細胞致死効果を明らかにしたのは国内外のこれまでの研究を見ても初めての知見であると認識する。これらの実験データを基に続いて予め細胞質に 10 レントゲンを照射してその後細胞核に 10 レントゲン照射したときの生存率を調べたところ、96%まで統計学的に有意に上昇する実験データを得た。この結果は、予め細胞質に致死効果を誘導しないような低線量の X 線を照射した場合、3 時間以内に完結するような細胞応答が細胞内に生じ、引き続き細胞核への X 線照射に依る細胞損傷を軽減した、と解釈することが出来る。従って、予めの細胞質への X 線照射によるエネルギー付与によって放射線適応応答が誘導されたと考えることが出来、掲げた作業仮説を証明するものと考えられる。

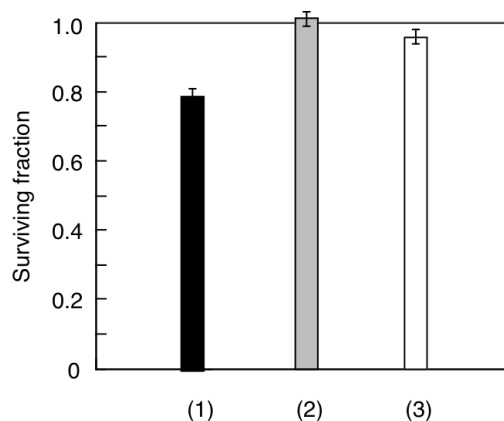


図3. ヒト正常細胞の細胞核または細胞質へ放射光X線マイクロビームを限定的に照射したときの細胞致死効果。(1)は、細胞核のみに10レントゲン(0.092Gy相当)照射した時、(2)は、細胞質のみに10レントゲン照射した時、(3)は、予め細胞質のみに10レントゲン照射し、3時間炭酸ガスインキュベーター内で保持(37°C)した後細胞核のみに10レントゲン照射した時のそれぞれ細胞致死効果を示す。データは、8回の独立した実験の平均値とその標準誤差を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ① T. Inaniwa, M. Suzuki, S. Sato, A. Noda, Y. Iwata, N. Kanematsu, T. Shirai, K. Noda, Enhancement of biological effectiveness of carbon-ion beams by applying a longitudinal magnetic field. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1-10 (2019).
DOI:10.1080/09553002.2019.1569774, PMID:30652933
- ② C. M. Tsuey, A. Nisbet, M. Suzuki, N. Matsufuji, T. Murakami, B. Jones, D. A. Bradley, Potential lethal damage repair in glioblastoma cells irradiated with ion beams of various types and levels of linear energy transfer. *J. Radiat. Res.*, 60, 59-68 (2019).
DOI:10.1093/jrr/rry081, PMID:30452663
- ③ S. Sai, M. Suzuki, E. H. Kin, M. Hayashi, G. Vares, N. Yamamoto, T. Miyamoto, Effects of carbon ion beam alone or in combination with cisplatin on malignant mesothelioma cells *in vitro*. *Oncotarget*, 9, 14849-14861 (2018).
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23756>
- ④ N. Autsavapornporn, T. Konishi, L. Cuihua, N. Usami, T. Funayama, A. I. Edouard, M. Suzuki, A correlation of long term effects and radiation quality in the progeny of bystander cells after microbeam radiations : The experimental study of radiotherapy for cancer risk mitigation. *Journal of Physics.*, 860, 012026 (2017).
DOI: 10.1088/1742-6596/860/1/012026
- ⑤ I. Shiraishi, N. Shikazono, M. Suzuki, K. Fujii, A. Yokoya, Efficiency of radiation-induced base lesion excision and the order of enzymatic treatment. *Int. J. Radiat. Biol.*, , 295-302 (2017).
DOI: 10.1080/09553002.2017.1239849, PMID:27707033

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① 鈴木雅雄、宇佐美德子、小林克己、細胞質への予めのX線照射がそれに引き続く細胞核への照射効果を低減する(放射線適応応答誘導)。第32回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、福岡市、福岡国際会議場、2019.1.9-11。
- ② 鈴木雅雄、舟山知夫、横田裕一郎、鈴木芳代、小林泰彦、炭素イオンマイクロビーム照射がん細胞と周囲の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誘導。QST高崎研サイエンスフェスタ2018、高崎市、高崎シティギャラリー、2018.12.11-12。

- ③ 鈴木雅雄、宇佐美徳子、細胞核への放射光 X 線限定的照射による細胞致死効果に対する
 予めの細胞質への X 線照射による適応応答誘導。日本放射線影響学会第 61 回大会、長
 崎市、長崎ブリックホール、2018. 11. 7-9。
- ④ Masao Suzuki, Yuichiro Yokota, Tomoo Funayama, Michiyo Suzuki, Yasuhiko Kobayashi,
 Bystander effects in non-irradiated normal cells via secreted factor(s) to medium
 from carbon-ion irradiated tumor cells. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪市、大阪
 国際会議場/リーガロイヤルホテル、2018. 9. 27-29。
- ⑤ 鈴木雅雄、宇佐美徳子、舟山知夫、横田裕一郎、鈴木芳代、小林泰彦、放射光マイクロ
 ビームを使った生物照射効果研究。第 65 回応用物理学会春季学術講演会 放射線分科
 会シンポジウム 『真の放射線生体影響解明に向けて進む放射光マイクロビーム評価技
 術』、新宿区、早稲田大学西早稲田キャンパス、2018. 3. 18。
- ⑥ 鈴木雅雄、放射線の線質に依存したバイスタンダー効果の現状。中部原子力懇談会平成
 29 年度第 3 回放射線専門部会、名古屋市名古屋商工会議所ビル、2018. 3. 9。
- ⑦ 鈴木雅雄、舟山知夫、横田裕一郎、鈴木芳代、小林泰彦、炭素イオンビームを照射され
 たヒトがん細胞から非照射正常細胞へのバイスタンダー効果解析。QST 高崎研サイエン
 スフェスタ 2017、高崎市、高崎シティギャラリー、2017. 12. 12-13。
- ⑧ Masao Suzuki, Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Michiyo Suzuki, Yasuhiko Kobayashi,
 Cell-cell communication mediated bystander effects from carbon-ion irradiated
 tumor to non-irradiated normal cells. 日本放射線影響学会第 60 回大会、千葉市、京
 葉銀行文化プラザ、2016. 10. 25-28。
- ⑨ Masao Suzuki, Yuuichiro Yokota, Sei Sai, Bystander effects from carbon-ion
 irradiated tumor to non-irradiated normal cells, simulating spot scanning
 irradiation. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜市、パシフィコ横浜、2017. 9. 28-30。
- ⑩ 鈴木雅雄、宇佐美徳子、舟山知夫、横田裕一郎、鈴木芳代、小林泰彦、宇宙放射線の生
 物影響は細胞質へのエネルギー付与が鍵を握る？日本宇宙生物科学会第 32 回大会、前橋
 市、群馬会館、2017. 9. 20-22。
- ⑪ 鈴木雅雄、舟山知夫、横田裕一郎、鈴木芳代、坂下哲哉、小林泰彦、炭素イオンマイク
 ロビームを照射されたヒトがん細胞と非照射正常細胞間の情報伝達を介したバイスタン
 ダー致死効果。第 1 回 QST 高崎研シンポジウム、高崎市、2017. 1. 26-27。
- ⑫ 鈴木雅雄、舟山知夫、横田裕一郎、鈴木芳代、坂下哲哉、小林泰彦、遺伝子突然変異に
 おける液性因子を介したバイスタンダー効果の核種依存性。日本放射線影響学会第 59 回
 大会、広島市、2016. 10. 26-28。
- ⑬ Masao Suzuki, Sei Sai, Secreted factor(s) mediated bystander effects between
 carbon-ion irradiated tumor and non-irradiated normal cells. 第 75 回日本癌学会学
 術総会、横浜市、2016. 10. 6-8。
- ⑭ Masao Suzuki, Sei Sai, Cell-cell communication mediated bystander effects between
 carbon-ion irradiated tumor and non-irradiated normal cells. 第 74 回日本癌学会
 学術総会、名古屋市、2015. 10. 8-10。
- ⑮ Masao Suzuki, Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Michiyo Suzuki, Hiroko Ikeda, Tetsuya
 Sakashita, Yasuhiko Kobayashi, Takeshi Murakami, P53-dependent cell-killing effect
 via bystander effect using carbon-ion microbeams simulating the spot scanning
 system with pencil beams. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto,
 2015. 5. 25-29。

〔その他〕(計 1 件)

- ① プレス発表、稲庭拓、鈴木雅雄：照射空間に外部磁場をかけて粒子線の細胞殺傷効果を
 増強、2019. 2. 13 発表。