

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07695

研究課題名(和文) 初期レドックス反応に基づく重粒子線の増感に関する研究

研究課題名(英文) Radiosensitization of heavy-ion beam based on modifying early phase redox reaction

研究代表者

松本 謙一郎 (Matsumoto, Ken-ichiro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線規制科学研究部・グループリーダー

研究者番号：10297046

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)：重粒子線が生成する過酸化水素(H₂O₂)の生物影響に対する増感因子についてマウス個体を用いて評価した。H₂O₂分解酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)を失活するセレン(Se)欠乏マウスを作成した。X線または炭素線をSe欠乏マウスに単回全身照射後の30日間生存率、後肢への単回照射後の脚短縮率、頭部への単回照射後の脳内レドックス状態を調べた。Se欠乏は30日間生存率を有意に低下したが、脚短縮率および脳内レドックス変化は正常マウスと差が無かった。後肢への炭素線照射直後に紫外線照射を行い、H₂O₂を分解してヒドロキシルラジカル生成を試みたところ、脚短縮率の増大と加速が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレン欠乏によりグルタチオンペルオキシダーゼの過酸化水素分解能を失活させた場合には、炭素線の生体影響の増感を組織単位で観察することはできなかった。しかし炭素線照射直後の組織への紫外線照射により、過酸化水素を分解してヒドロキシルラジカルの生成を試みたところ、炭素線の生物効果の増感が見られた。過酸化水素からヒドロキシルラジカルが発生する反応を促進すれば、重粒子線による過酸化水素の特徴ある分布に基づいて、腫瘍組織特異的に重粒子線の効果を増幅できる可能性が得られた。

研究成果の概要(英文)：Sensitization of biological effect of heavy-ion beam was tested by enzymatic or photochemical processing of hydrogen peroxide (H₂O₂) induced by heavy-ion beam in mice. A method of preparing selenium-deficient (SeD) model mouse, which has lacked glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and can not decompose H₂O₂, was developed and reported. Effect of Se-deficiency on 30-day-lethality, leg contracture, and redox status in brain after X-ray and carbon-ion beam irradiation was investigated. Se-deficiency could exaggerate the 30-day-lethality of both X-ray and carbon-ion beam, however no marked difference on biological effects between X-ray and carbon-ion beam was observed. Effect of UVB irradiation after a carbon-ion irradiation to a mouse hind leg, which probably produce hydroxyl radical from H₂O₂, was investigated. The UVB irradiation immediately after carbon-ion beam irradiation increase the maximum length of leg contracture, and exaggerated rate constant of shortening.

研究分野：物理系薬学

キーワード：放射線増感 重粒子線 炭素線 放射線生物影響 活性酸素 過酸化水素 紫外線 ヒドロキシルラジカル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

放射線による水中でのヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)生成は局在しており、数 mmol/L レベルの比較的疎な生成と、mol/L レベルの極めて密な状態があることを報告した(引用文献)。また炭素線では、LET の増大にともなって比較的疎な $\cdot\text{OH}$ 生成が減少し、極めて密な $\cdot\text{OH}$ 生成の割合が増加した。 $\cdot\text{OH}$ が極めて密に生じることにより、 $\cdot\text{OH}$ 同士の反応を可能になり、以下の式 1 により酸素非依存的に H_2O_2 を生じることができる。



その結果、LET が増大するほど酸素非依存的な H_2O_2 生成が増加すると考えられる。生体内の酸素分圧は、比較的酸素分圧が高い正常な筋組織でも大気の 1/4 程度で、特に腫瘍組織は酸素濃度が低いと考えられている。そのため高 LET の重粒子線は、主に $\cdot\text{OH}$ 同士の反応により酸素消費を伴わずに H_2O_2 を発生させることができる。逆に電磁波放射線や重粒子線の低 LET 成分による H_2O_2 の生成は酸素消費を伴うため、低酸素状態の腫瘍組織ではもちろんのこと正常組織においても比較的起こりにくいと考えられる。 H_2O_2 の G 値は LET の増大とともに増加することが知られており(引用文献)。また炭素線の酸素消費量は LET の増大とともに低下することが報告されている(引用文献)。これらの事実からも、LET が増大するほど酸素非依存的な H_2O_2 生成が増加することが予想できる。そのため重粒子線治療時の H_2O_2 の生成は、高 LET 成分が集中する標的部位(病巣)で起こり易いと予想できる。そこで H_2O_2 の分解を妨げるか、あるいは H_2O_2 から $\cdot\text{OH}$ が発生する反応を促進すれば、 H_2O_2 の特徴ある分布に基づいて、腫瘍組織特異的に重粒子線の効果を増幅させることが可能と考えられる。

2. 研究の目的

マウスに重粒子線を照射した際に組織中に発生した H_2O_2 の分解を妨げるか、あるいは H_2O_2 から $\cdot\text{OH}$ が発生する反応を促進することにより、炭素線の生物効果が増強されるか否かを調べる。 H_2O_2 の分解酵素で体内に広く分布しているグルタチオンペルオキシダーゼの活性中心であるセレン(Se)を欠乏させたマウスモデルを作成し、炭素線を照射した場合にその生物効果が増感されるか否かを調べる。また正常マウスに炭素線を照射した直後、照射部位に更に紫外線を照射して H_2O_2 の光分解による $\cdot\text{OH}$ 生成を促した際に、炭素線の生物影響が増感されるか否かを調べる。活性酸素種の生成を制御することによる放射線増感の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) Se 欠乏モデルマウスの作製：妊娠後期(妊娠 14-15 日目、交配日確認済み)の C3H/He Slc 系マウス(日本エスエルシー(株))を購入し、通常飼料(MB-1、(株)フナバシファーム)と超純水(Milli-Q)を与えて飼育を開始した。出産 2 週間後からトルラ酵母をベースとした Se 欠乏飼料(F2SeDD、オリエンタル酵母工業(株))に切り替え、生まれたマウスは、4 週間目の離乳時まで、それぞれの母マウスと一緒に飼育した。離乳後から実験で使用するまで、仔マウスには Se 欠乏飼料と超純水を摂取させた。購入から実験に使用するまでの飼育は全て、恒温恒湿(23 ±

2) 12 時間の明暗サイクルに設定された飼育室で行った。GSH-Px 活性を測定し、Se 欠乏の程度が充分であることを確認した。また、ウェスタンブロッティングにより、肝 GSH-Px タンパク質の発現を確認した。

(2) 5.6 Gy 全身照射後 30 日間生存率の評価：8 週齢に至った各マウスを麻酔下で保定し、X 線または炭素線 (SOBP = 6 cm, BF = 0 mm or BF = 117 mm) を 5.6 Gy 全身に照射した。照射後はマウスを保定から直ちに解放して飼育ケージに戻した。その後 30 日間の生存率を観察した。観察中は 2~3 日に 1 回の頻度で体重を測定した。

(3) 脳組織への炭素線照射後の組織内レドックス経時変化の評価：8 週齢の Se 欠乏マウスを麻酔し、専用の固定板に紙製粘着テープで張り付けた。HIMAC 照射装置のスリットを通して頭部(大脳部位)に炭素線を照射した。頭皮表面における LET を 60 keV/ μ m、線量を 8 Gy とした。照射 0 日後、1 日後、2 日後、4 日後、8 日後に核磁気共鳴レドックスイメージング測定を行った。7 T MRI 装置を用いて FLASH シーケンスで T₁ 強調画像の連続撮像を行った。ベースラインとなる画像を撮像後(連続撮像の途中で)尾静脈のカニューレからニトロキシル造影剤を投与した(0.75 μ mol/g b.w.)。ニトロキシル造影剤は BBB を通過可能な MC-PROXYL を用いた。造影剤投与後 20 分間の連続撮像を続けた。信号強度(造影剤由来の信号増加率)の減衰速度とパターンを解析し、組織のレドックス状態を評価した。コントロールとして正常餌で飼育したマウスでも同様の実験を行った。同様の実験を X 線でも行い比較した。

(4) 炭素線による Se 欠乏マウスの後肢短縮率の評価および炭素線によるマウスの後肢短縮に対する紫外線照射の影響：8 週齢に至った Se 欠乏マウスを麻酔下で保定し、X 線あるいは炭素線 (SOBP = 6 cm, BF = 50 mm) を 32 Gy 左下肢に照射した。照射後はマウスを保定から直ちに解放して飼育ケージに戻した。その後、週に 1 回、25 週にわたり下肢の長さを測定した。

正常マウスを麻酔下で保定し、下肢に炭素線 (SOBP = 6 cm, BF = 0 or 117 mm) を 32 Gy 照射した。炭素線照射の直後に、炭素線と同一の照射野に UVB 1.16 J/cm² を 5 分間で照射した。その後、週に 1 回、25 週にわたり下肢の長さを測定した。

4. 研究成果

(1) Se 欠乏マウス(引用文献)は GSH-Px 活性がほとんど見られないが、飲水を Se 化合物添加超純水に置き換えると、GSH-Px 活性の回復が認められた。また、GSH-Px 活性の無い Se 欠乏マウスにおいても GSH-Px タンパク質の発現が認められ、活性中心の Se の欠落が GSH-Px を失活させていることが確かめられた。

(2) 麻酔下での 5.6 Gy 全身照射では、正常マウスは X 線でも炭素線でも照射後 30 日間での生存率はほぼ 100%であった。しかしながら Se 欠乏マウスでは、雄で生存率は約 60%、雌では更に生存率が低く 0%~20%であった。Se 欠乏は放射線全身照射による致死に対して増感的に働いたが、明確な線質の違いは観察できなかった。

(3) Se 欠乏マウス頭部に重粒子線を照射し、MR レドックスイメージング法により得られた脳内のレドックス状態の変化を解析した。放射線照射後の比較的早い時間(1 日以内)で、ニトロキシ

シドラジカル還元速度が一旦遅くなり、その後、一週間程度をかけて徐々に回復するというパターンは共通して見られた。しかしながら、正常マウスと Se 欠乏マウス間ではニトロキシドラジカル還元速度の経時変化のパターンに顕著な違いは見られなかった。

(4) マウス下肢の短縮の大きさは、非照射の右下肢と照射した左下肢の長さの差を短縮長 S として評価した。下肢短縮が指数関数的に生じると仮定し、フィッティングにより最大短縮長 S_{\max} と短縮時間 T_s を求めた。Se 欠乏マウスと正常マウスとの間で有意な S_{\max} の違いは見られなかったが、Se 欠乏マウスでは T_s が長くなる傾向が得られた。炭素線をマウス下肢に照射した直後に、炭素線と同一の照射野で UVB を照射すると S_{\max} は有意に増加し、 T_s が短縮する傾向が見られた (図 1)。

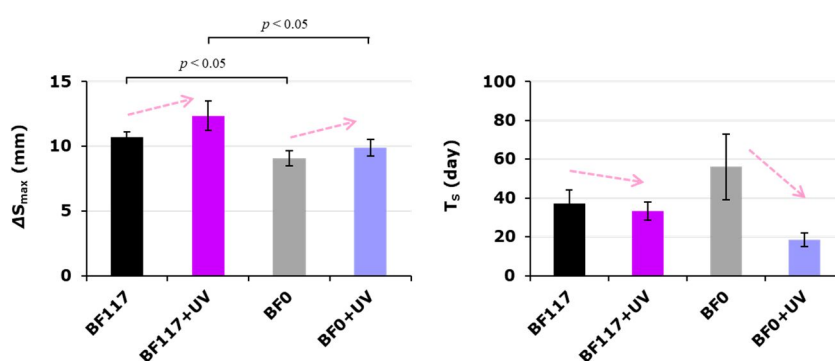


図 1. 照射脚の最大短縮率と短縮速度。

GSH-Px は低濃度の H_2O_2 を処理することはできるのだろうが、高密度の H_2O_2 を処理することはできないため、Se 欠乏マウスを用いた場合に顕著な炭素線の影響の増大が見えなかったと思われる。 H_2O_2 分解能を失活させた場合には、炭素線の生体影響の増感を組織単位で観察することはできなかった。 H_2O_2 から $\cdot OH$ が発生する反応を促進すれば、重粒子線の効果を増幅できる可能性が得られた。

<引用文献>

Matsumoto K, Ueno M, Nakanishi I, Anzai K. Density of hydroxyl radicals generated in an aqueous solution by irradiating carbon-ion beam. Chem. Pharm. Bull. 63, 2015, 195–199

室屋裕佐、最新放射線化学（基礎編）5 水と水溶液の放射線化学、RADIOISOTOPES、66、2017、425–435

Matsumoto K, Aoki I, Nakanishi I, Matsumoto A, Nyui M, Endo K, Anzai K. Distribution of hydrogen peroxide-dependent reaction in a gelatin sample irradiated by carbon ion beam. Magn. Reson. Med. Sci. 9, 2010, 131–140

Ueno M, Shimokawa T, Sekine-Suzuki E, Nyui M, Nakanishi I, Matsumoto K.* Preparation of an experimental mouse model lacking selenium-dependent glutathione peroxidase activities by feeding a selenium-deficient diet. J. Clin. Biochem. Nutr. 68, 2021, 123–130

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsumoto Ken-ichiro, Ueno Megumi, Nyui Minako, Shoji Yoshimi, Nakanishi Ikuo	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of LET on oxygen-dependent and-independent generation of hydrogen peroxide in water irradiated by carbon-ion beams	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 589 ~ 594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1915489	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 Ueno Megumi, Nakanishi Ikuo, Matsumoto Ken-ichiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Inhomogeneous generation of hydroxyl radicals in hydrogen peroxide solution induced by ultraviolet irradiation and in a Fenton reaction system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 481 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1819995	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 Ueno Megumi, Shimokawa Takashi, Sekine-Suzuki Emiko, Nyui Minako, Nakanishi Ikuo, Matsumoto Ken-ichiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Preparation of an experimental mouse model lacking selenium-dependent glutathione peroxidase activities by feeding a selenium-deficient diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 123 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.20-36	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 Matsumoto Ken-ichiro, Ueno Megumi, Shoji Yoshimi, Nakanishi Ikuo	4. 巻 55
2. 論文標題 Heavy-ion beam-induced reactive oxygen species and redox reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 450 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1899171	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 Ueno Megumi, Nakanishi Ikuo, Matsumoto Ken-ichiro	4. 巻 54
2. 論文標題 Generation of localized highly concentrated hydrogen peroxide clusters in water by X-rays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 360 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1774574	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 松本 謙一郎、上野 恵美、荘司 好美、中西 郁夫	4. 巻 55
2. 論文標題 水の放射線分解で生成する活性酸素種の定量測定と生成密度の評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 303 ~ 321
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 Matsumoto Ken-ichiro, Nyui Minako, Ueno Megumi, Ogawa Yukihiro, Nakanishi Ikuo	4. 巻 65
2. 論文標題 A quantitative analysis of carbon-ion beam-induced reactive oxygen species and redox reactions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.18-34	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Ueno Megumi, Shoji Yoshimi, Nakanishi Ikuo, Matsumoto Ken-ichiro
2. 発表標題 A combination effect of carbon ion beam and UVB irradiations to mouse leg contracture
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ueno Megumi、Minako Nyui、Nakanishi Ikuo、Matsumoto Ken-ichiro
2. 発表標題 Generation of hydrogen peroxide in water irradiated by carbon-ion beam; Effects of dissolved oxygen and LET
3. 学会等名 20th Biennial Meeting of SFRR International (SFRR-I 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ueno Megumi、Minako Nyui、Nakanishi Ikuo、Matsumoto Ken-ichiro
2. 発表標題 Oxygen independent generation of hydrogen peroxide in water irradiated by carbon-ion beam
3. 学会等名 27th Annual Conference of the Society for Redox Biology & Medicine (SfRBM 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本謙一郎、上野恵美、中西郁夫
2. 発表標題 炭素線による水中における酸素非依存的な過酸化水素の生成
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 / 第20回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Megumi Ueno, Minako Nyui, Takashi Shimokawa, Ikuo Nakanishi, Ken-ichiro Matsumoto
2. 発表標題 Preparation of Selenium-Deficient Mouse Model for Investigating Biological Effects of Ionizing Radiations
3. 学会等名 9th Biennial Meeting for the Society for Free Radical Research Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本謙一郎, 上野恵美, 青木伊知男
2. 発表標題 セレン欠乏モデルマウス脳のレドックス状態に対する炭素線の影響評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichiro Matsumoto, Megumi Ueno, Minako Nyui, Yoshimi Shoji, Ikuo Nakani
2. 発表標題 Free Radical Generations and Reactions in an Aqueous Sample Irradiated by X-ray or 290 MeV Carbon-Ion Beam
3. 学会等名 Oxygen Radicals, Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野恵美, 下川卓志, 中西郁夫, 松本謙一郎
2. 発表標題 セレン欠乏マウスにおける放射線影響評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Megumi Ueno, Takashi Shimokawa, Ikuo Nakanishi, Ken-ichiro Matsumoto
2. 発表標題 Preparation of a Younger Selenium-Deficient Mouse Model
3. 学会等名 第28回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Megumi Ueno, Takashi Shimokawa, Ikuo Nakanishi, Ken-ichiro Matsumoto
2. 発表標題 Preparation of Selenium-Deficient Mouse Model and its Glutathione Peroxidase Activity
3. 学会等名 The 19th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (SFRR12018) (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	上野 恵美 (Ueno Megumi) (30296826)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門放射線医学研究所放射線規制科学研究部・研究員 (82502)	
研究協力者	下川 卓志 (Shimokawa Takashi) (20608137)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門量子医科学研究所物理工学部・研究統括 (82502)	
研究協力者	中西 郁夫 (Nakanishi Ikuo) (70356137)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門量子生命科学研究所・グループリーダー (82502)	
研究協力者	関根 絵美子 (Sekine Emiko) (90455387)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門人材育成センター・主任研究員 (82502)	

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
---------	---------