

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11641

研究課題名(和文) 一細胞 線照射ライブイメージングによる体内局所被ばく影響評価

研究課題名(英文) Evaluation of the internal exposure effect in by the single cell - alpha particle irradiation live imaging system.

研究代表者

角山 雄一 (Tsunoyama, Yuichi)

京都大学・環境安全保健機構・准教授

研究者番号：90314260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、狙った一細胞への線できるシステムの確立と、これを用いての照射細胞周囲へのバystanダー効果の組織・臓器特異性の検出を目指した。結果、一個のヒト培養細胞の核を狙ってPo-210由来の線を数個単位で照射し、その後の細胞内分子挙動をリアルタイムで観察することが可能となった。また、平滑培養細胞だけでなく三次元培養の細胞塊に対しても照射可能であることも示した。バystanダー効果については、効果を鮮明に検出するには至らなかったものの、DNA二本鎖切断(DSB)の修復関連蛋白質が、線がヒットした核内の局所に集積する様子を動画で撮像することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線がん治療の分野では、加速器が生成する重粒子線や、BNCT(ホウ素中性子捕捉療法)における線など、高い線エネルギー付与(LET)の放射線が用いられるようになった。また短半減期核種を用いたセラノスティクス医療の臨床研究も始まっている。しかしミクロスケールでの高LET放射線影響については未解明な部分がある。バystanダー効果(もらい泣き効果)がその一つである。本研究により、大型の加速器を用いずとも簡便にこれらの未解明領域を明らかにすることが可能な細胞照射解析システムの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a system that enables irradiation of α -rays to a single targeted cell and to detect tissue/organ specificity of bystander effects around irradiated cells using this system. As a result, it was possible to irradiate several units of Po-210-derived α -rays targeting the nucleus of a single human cultured cell and observe the subsequent intracellular molecular behavior in real time. We also showed that it is possible to irradiate not only smooth cultured cells but also cell masses in three-dimensional culture. Although the bystander effect could not be detected clearly, we succeeded in capturing moving images of DNA double-strand break (DSB) repair-related proteins accumulating at localized sites in the nucleus hit by α -rays.

研究分野：放射線影響

キーワード：細胞照射 線 高LET放射線 DNA二本鎖切断 DNA損傷修復 バystanダー効果 ライブイメージング シングルセル

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

近年、線を含む重粒子線などの高 LET 放射線の性質を活用した先進的ながん治療が行われる機会が増えた。加速器で生成した重イオンビームや陽子線を腫瘍組織に照射する重粒子線治療法や、ホウ素薬剤と中性子線を組み合わせることにより発する線を用いたホウ素中性子療法 (BNCT) などは既に実際の治療現場で高い治療成績をあげている。また、最近では短寿命崩壊核種を薬剤に結合させた薬剤などを用いて、全身に転移したがんを消滅させる手法や、検査と治療を同時に行うセラノスティクス医療活用なども、日々研究開発が進み、間もなく臨床での利用が始まろうとしている。こうした高 LET 放射線を用いた先進医療が進む中、全臨床段階の研究についてはいまだ未解明の部分も多く、治療での安全性や精度をさらに確実なものに高めるためにも、細胞や生体分子レベルといったミクロスケールでの高 LET 放射線の生体影響の実態を明らかにすることが必要不可欠である。

現在、この未解明領域の一つとして、「バスタンダー効果 (もらい泣き効果)」がある。この効果は、加速器などのイオンビームを利用した研究によりその存在が知られることとなった。重イオンを一個または数個の細胞に対して照射したところ、照射した標的細胞に隣接する周囲の未照射細胞が、あたかもイオンが照射されたかのようなふるまいをとった (図 1)。これまでに加速器のマикроイオンビームを用いた研究分野においてバスタンダー効果に関連する候補物質が報告されているものの、効果の伝達に関連する物質が候補物質以外にも存在し得るのか、照射によりどのようにシグナルが発せられるのか、シグナル物質が細胞間を伝播する範囲、あるいは細胞種 (臓器や組織など、由来が異なる細胞株) による伝播範囲の差異などがあるのか、などについてはほとんど不明なままである。今後は、マイクロイオンビーム照射による極めて小さな腫瘍をも対象としたがん治療技術などが開発されることも予想されるが、その実現のためには、バスタンダー効果の範囲を臓器や組織ごとに推定することが必要である。この課題を解決できれば、腫瘍周辺にある正常細胞の損傷を極力回避することが可能となる。

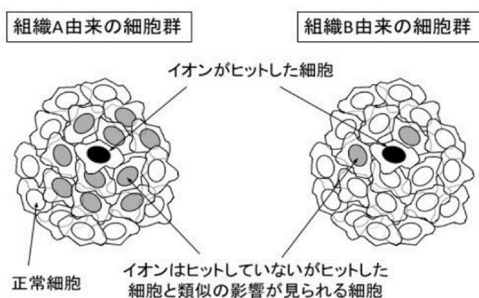


図1 バスタンダー効果などの影響拡散の組織特異性概念図

2. 研究の目的

まずは、細胞内局所における被ばく影響をリアルタイムで解析することを可能とするために、高 LET 放射線による生体分子損傷情報が細胞内あるいは細胞間を伝播する過程をミクロスケールでライブイメージングする技術を確立することとした。ヒト培養細胞を照射対象とし、その細胞一個の核に対して顕微鏡下で高 LET 放射線である線 (He^{2+} イオン、アルファ粒子) を照射する。そして線によりもたらされる生体分子損傷シグナルが細胞内外へどのように時空間的に伝播して行くのかについて、数個の細胞に相当する範囲で映像を記録する。これによって、線により発生した生体内シグナルがミクロスケールで伝播する様子を視覚的に捉え解析する。また、iPS 細胞などを活用し、さまざまな臓器や組織を構成する細胞に対して線照射を行う実験を行う。影響が伝播する様子を比較観察することで、組織や臓器の違いによる線照射影響の伝播範囲の相違についても知ることができるようになると考えた。

3. 研究の方法

1) 一細胞照射影響ライブイメージング系の確立

まずは、任意の一細胞に対して1~数個の線 (He^{2+} イオン) を照射することができる一細胞照射影響ライブイメージング系 (卓上型のシングルセル・イオン照射影響ライブイメージングシステム) の開発を行う。この装置では、極細 (直径 2~5 μm) の白金線の先端にごく少量の Po-210 を電着させた微小線源を用いる。この微小線源を、標的とするただ一個の細胞にマイクロマニピュレータを用いて培養液中で近接させ、標的とする細胞に He^{2+} イオンを照射する。理論的には、事前の予想として、直径 40 μm の照射野の範囲で約 5.3MeV の He^{2+} イオンを 0.1~10cps (0.1~10 個/秒) で照射することが可能となるはずである。照射後の細胞内外の様子については、高冷却 CCD によりリアルタイムで撮像し、動画として記録する。生体の分子レベルでの放射線影響の変動を記録し、多様な細胞種における放射線被ばく影響の伝播範囲の相違の検出を試みる。

2) 照射イオン数とエネルギーの評価

腫瘍細胞である U2OS 細胞や HeLa 細胞 (これらは接着型のヒト培養細胞株) を形質転換し、DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復関連タンパクである RPA70 と緑色蛍光タンパク質 EGFP を共

発現する細胞株、及び同様に DSB 修復関連タンパクである MDC1 と赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を共発現する細胞株を用意し、これら細胞をそれぞれ一層で密に培養シャーレ上に播いておく。そして、本研究により確立する一細胞照射影響ライプイメーシング系を用いて、これら形質転換細胞の一細胞に対して He^{2+} イオンを 1~数個程度照射する。なお、照射したイオン数が 10 個近くなると、照射細胞が細胞死を引き起こすことが予想されるため、照射イオン数はまずは 1~数個程度に留める。照射後は、RPA70:EGFP または MDC1:DsRed2 の蛍光起点 (Foci) が形成される様子を動画で撮像し、実際に形成される Foci の個数や形成されるまでの時間などを計測する。

これらの細胞照射実験とは別に、一細胞照射影響ライプイメーシング系を用いて粒子線検出樹脂 CR-39 上に対する水中照射実験を行い、エッチング処理後に CR-39 上に形成されるエッチピットの個数や形状を観察する。さらに、モンテカルロ計算コード PHITS (Particle and heavy-ion transport code) によるシミュレーションを行い、開発する一細胞照射影響ライプイメーシング系による線の水中での照射範囲や細胞にヒットするイオン数及びそのエネルギー分布を推定する。これらにより、一細胞照射影響ライプイメーシング系で一細胞核に照射されるであろうイオン数及びエネルギーを正確に見積もり、実際の細胞を用いての照射実験の結果と比較し、その精度を評価する。

3) 分子マーカーの探索

上記の二種の DSB 修復関連蛋白質がバースタンダー効果に関係しているかは不明である。このため、市販の蛍光物質によるアポトーシス関連因子 (カスパーゼなど) 検出キットなども活用し、一細胞照射影響ライプイメーシング系を活用して、バースタンダー効果のライプイメーシングに最適となる分子マーカーを探索する。

4) 三次元照射方法の構築

組織や臓器の種類によっては、接着培養のような二次元での培養では細胞の生育や分化が十分に行えない場合があることはよく知られる事実である。また臨床での応用を想定した場合、治療のターゲットとなる腫瘍は三次元的な広がりを持っている。よって、細胞塊に対して線を照射することを想定しておく必要がある。そこで、一細胞照射影響ライプイメーシング系に改良を加え、三次元の細胞塊に対しても線を照射することが可能となるよう工夫を施す。

4. 研究成果

4-1. 一細胞照射影響ライプイメーシング系の確立

当初の計画のうち、一細胞に対して He^{2+} イオン (粒子) を照射するシステムを開発するという目標については、研究計画二年目 (令和元年度) に照射システムの基盤技術の確立に成功した。すなわち、一細胞への照射系及び照射後の細胞内分子挙動をリアルタイムで観察することが可能なライプイメーシング系を確立した。

完成した一細胞照射影響ライプイメーシング系の概要は以下のとおりである。

倒立型蛍光顕微鏡にマイクロインジェクション用の微動マニピュレータを装着し (図 2A)、このマニピュレータに先端直径 2 又は 5 μm の白金線を固定した (図 2C)。尚、この白金線の先端には微量の Po-210 (半減期 138.4 日、99.999% の崩壊率で 5.305 MeV の線を放出するほぼ純粋な線放出核種、図 2D) を電着させてある。

細胞への照射は、シャーレ上に均一に播種した接着培養細胞に対し、上記の微小線源を近接させることで照射する (図 2B)。

尚、計算上 5.305 MeV 線の飛程は水中で約 40 μm であると推定される。この通りであれば、細胞培養液中では半径 40 μm の照射野の範囲で約 5.3 MeV の He^{2+} イオンを 0.1~10 cps で照射することが可能となることが想定された。ただし、実際には細胞と線源とが接触することを避ける必要がある (接触刺激により細胞が死滅する恐れがある) ため、z 軸方向上方に細胞から少し距離をとって照射することとなる。その結果、照射野は半径 40 μm よりも狭い範囲となるが、細胞と線源との距離を正確に調節することさえできれば、理論上は一個の細胞または細胞核に対してのみ Po-210 由来のイオンを照射できるはずである (図 3)。

この想定が確かであることを検証するため、一細胞

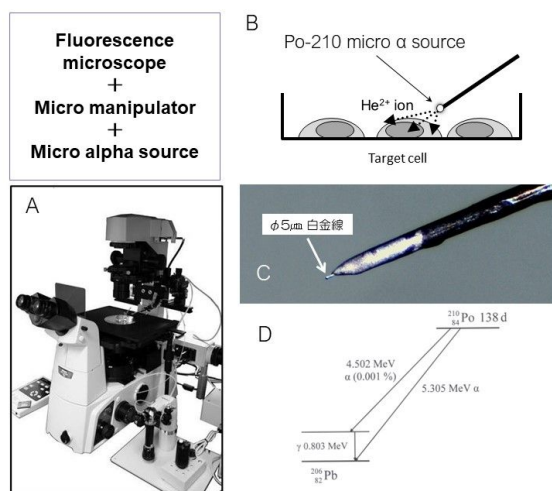


図 2 一細胞照射影響ライプイメーシング系の概要

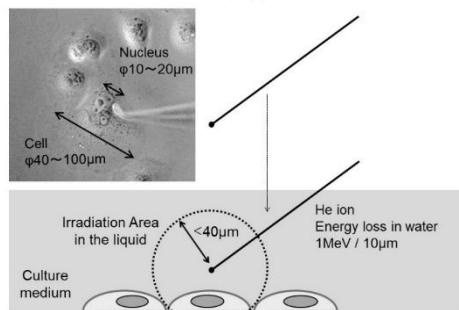


図 3 細胞培養液中での Po-210 由来の α 線照射範囲

照射影響ライブイメージング系に線源と照射するターゲットの間との距離を精密に測定できる機構（NIS-Research 制御装置 2 等）を顕微鏡に実装し、照射距離の調節を微細に制御できるよう改良した。

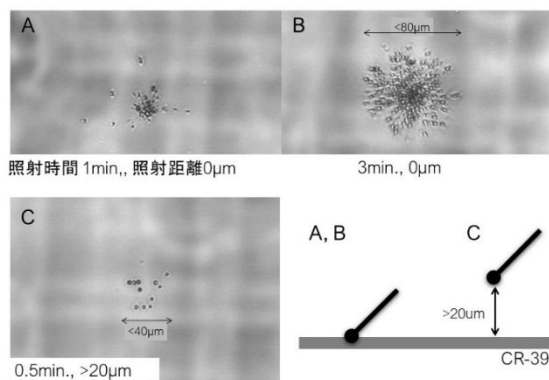


図4 CR-39への水中照射実験

水中に置いた粒子線固体検出樹脂 CR-39 への照射実験を行った(図4)。Po-210 微小線源 ($2 \mu\text{m Pt}$, 60cpm) と CR-39 との間の距離を $10 \mu\text{m}$ 単位で調節しイオンの照射を行い、照射後のエッチング処理は 70 の 7N NaOH 水溶液中で 1 時間後行った。その結果、ゼロ距離照射では想定通り半径約 $40 \mu\text{m}$ の範囲内に全てのエッチピット (CR-39 表面にイオンがヒットした痕跡) が収まっていた(図4A,B)。また、距離を $20 \mu\text{m}$ とした場合は、約 $20 \mu\text{m}$ (約 $1250 \mu\text{m}^2$ の範囲内) にエッチピットが数個形成され、そのピットの形状からほぼ垂直にイオンが落射されていることが確認された(図4C)。ちょうど接着培養細胞の細胞 1 個の大きさに

4C) この距離約 $20 \mu\text{m}$ における照射野の範囲は、相当する(図3写真)。

このように一細胞へのイオン照射が線源と細胞との距離を調節することで可能となることが確認されたため、次に実際に形質転換細胞への照射実験を行い、ライブイメージングによる照射影響の撮像が可能かを確かめた。

その結果、Po-210 由来のイオンを照射した RPA70:EGFP 形質転換細胞において、照射後約 30 分が経過すると DSB 修復関連タンパク RPA70 が照射した細胞核内で集積しはじめる様子をタイムラプス画像としてとらえることができた。培養液中で細胞から約 $20 \mu\text{m}$ の距離から 10 秒間イオン照射を行った。この照射実験は異なる細胞に対して繰り返し実施したが、照射した細胞核のすべてで Foci 形成が観察されたわけではなかった。これは、RPA70 が作用するとされる相同組換え修復が細胞周期中で DNA が複製された後の S 期と G2 期のみで起こるためであると考えられる。尚、今回の研究において、照射対象となった細胞の細胞周期を確認するまでには至っていない。また、図5の細胞照射実験の例では、既に照射直後の時点(0min.)で2か所細胞核内での Foci 形成が見られる。このように照射前から DSB が発生していると考えられる細胞においても新たな Foci 形成が確認されるケースがあった(この例では照射後 30 分以降で新たな Foci が形成されている)。さらに、この照射実験例では無数の小さな Foci が照射後 60 分以降に発生している。これは、 He^{2+} イオンの飛程に沿って二次的に発生した線による影響が観察されたものと考えられる。即ち、この一細胞照射影響ライブイメージング系が、線の照射影響についても観察可能なほど、極めて感度の高い照射観察系であるといえる。

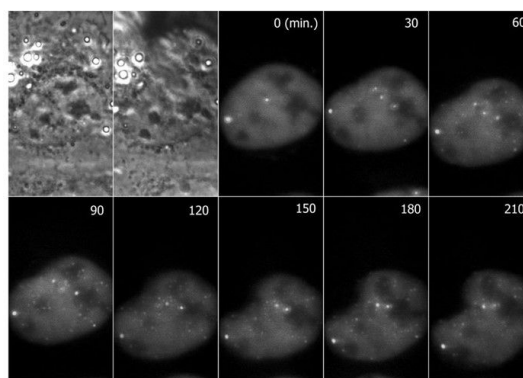


図5 RPA70:EGFP形質転換細胞への一細胞α線照射実験

既に照射直後の時点(0min.)で2か所細胞核内での Foci 形成が見られる。このように照射前から DSB が発生していると考えられる細胞においても新たな Foci 形成が確認されるケースがあった(この例では照射後 30 分以降で新たな Foci が形成されている)。さらに、この照射実験例では無数の小さな Foci が照射後 60 分以降に発生している。これは、 He^{2+} イオンの飛程に沿って二次的に発生した線による影響が観察されたものと考えられる。即ち、この一細胞照射影響ライブイメージング系が、線の照射影響についても観察可能なほど、極めて感度の高い照射観察系であるといえる。

4-2. 照射イオン数とエネルギーの評価

この一細胞照射影響ライブイメージング系は、線源が放射性同位体 (RI) であるため、確率的に線源より放出されるイオンの数を正確に予測することが困難である。よって、ターゲット(1細胞あるいは1細胞核)にヒットするイオン数やイオンのエネルギーをあらかじめ予測しておくことが必須である。そこで、ヒットするイオン数については、単位時間あたりの放射粒子数が低い線源(約 10Bq)を用意し、ある程度の時間をかけて(数十秒~1分)照射することによって抑えることとした。また、四年目(令和3年度)には、ターゲットへのヒットイオン数及びエネルギーの評価方法を確立することとした。上記の CR-39 を用いた評価に加え、モンテカルロ計算コード PHITS (Ver.3.16) を用いたシミュレーションを行い、細胞照射実測の結果と比較した。

CR-39 に約 $20 \mu\text{m}$ の距離から水中で 30 秒間照射を行ったところ、エッチピットの個数は $0.03 \sim 0.33$ 個(平均 0.12 個)であった。このエッチピット数は細胞核相当の面積 ($300 \mu\text{m}^2$) あたりになると平均 0.029 個/秒となる。一方、

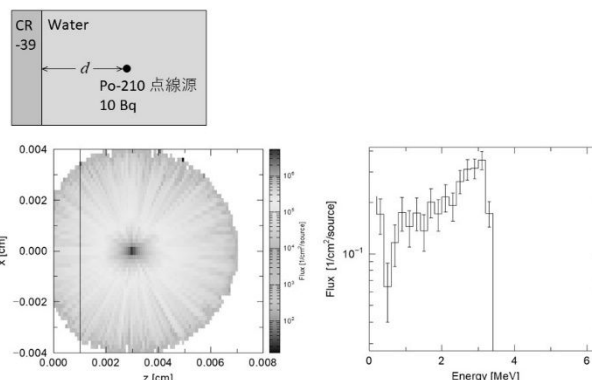


図6 モンテカルロ計算コードPHITSによるシミュレーション結果

RPA70:EGFP 形質転換細胞への細胞照射実験においてイオン照射により新たに形成された Foci の個数は一細胞あたり 0~0.3 個 (平均 0.06 個) であった。また、PHITS によるシミュレーションでは、水中に Po-210 点線源 (10Bq) を置き、CR-39 に対して照射を行うとした場合、線源から CR-39 表面までの距離 (d) が 20 μm の時の 粒子の広がり、直径は約 70 μm であり、ヒットする 粒子のエネルギーは最大約 3.4MeV との計算結果であった (図 6)。DNA 二本鎖切断を引き起こすのに十分なエネルギーである。

さらに、細胞に対して確実にイオンがヒットしていることを確認するための新たな手法の開発も試みた。厚さわずか 50 μm の厚さの CR-39 ディスクを用意し、接着細胞培養用のグリッドガラスシャーレ観察孔上にこれを圧着させた (図 7)。細胞をこの CR-39 上に播いて培養・照射することを想定している。この方法であれば、150 μm 間隔の格子状に印字されたグリッド及び座標番号により、照射細胞の位置と CR-39 上に形成されるはずのエッチピットの位置とを照合することが可能である。ただし、この方法の場合、細胞を通過したイオンによるエッチピットのみ確認できることとなるため、細胞内で止まったイオンによる照射影響については確認することができない。さらに確実な手法も今後の検討課題としたい。

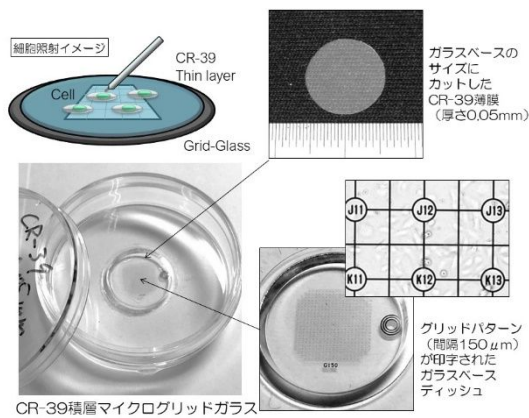


図 7 CR-39 薄膜を使用した細胞照射

4-3. 分子マーカーの探索

最終年度 (令和 4 年度) 及び研究期間を延長しての令和 5 年度は、本研究により作出した RPA70::EGFP 細胞と MDC1::DsRed2 細胞や、細胞死関連の分子マーカーなどを用いて、一細胞照射実験、及びバースタンダー効果の検出実験を行った。その結果、粒子を数個程度照射した細胞核内で、照射後に 粒子がヒットしたとみられる部分に RPA70 又は MDC1 が集積する様子 (foci の形成) を確認したものの、バースタンダー効果は検出されなかった (図 8 は MDC1::DsRed2 形質転換細胞への照射事例、写真上方の細胞にのみイオンを照射している。下方の細胞の核内での Foci 形成は観察されなかった)。また、細胞死関連のマーカーについてもバースタンダー効果の検出には至らなかった。よって、同効果の検出には、さらなるマーカー探索の継続が必要である。

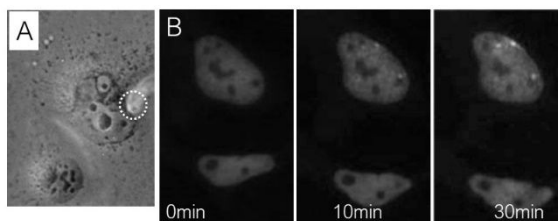


図 8 MDC1::DsRed2 形質転換細胞への一細胞 α 線照射実験

4-4. 三次元照射方法の構築

分子マーカーの探索と同時に四年目 (令和 3 年度) 以降には、一細胞照射影響ライブイメージング系にさらに改良を加え、三次元での一細胞イオン照射を行うためのシステムの構築を目指すこととした。三次元照射に必要なマニピュレータの増設を行った。また、ガラスキャピラリーを工作するためのプラーも導入した。今回の研究期間においては、支持体 (図 10 中のドロップ保持キャピラリー) の先端に表面張力を利用して細胞培養液のドロップを形成させ、このドロップに対して Po-210 微小線源の芯線を挿入するところまでは実施することができた。この照射手技については、これまでの細胞照射実験や照射イオンの評価方法などの成果とともに、「第 3 回日本放射線安全管理学会・日本保健物理学会合同大会優秀ポスター賞」の受賞対象となった。今後も引き続き、細胞塊を用いての実証的な照射実験など、三次元照射系の構築を試みる。

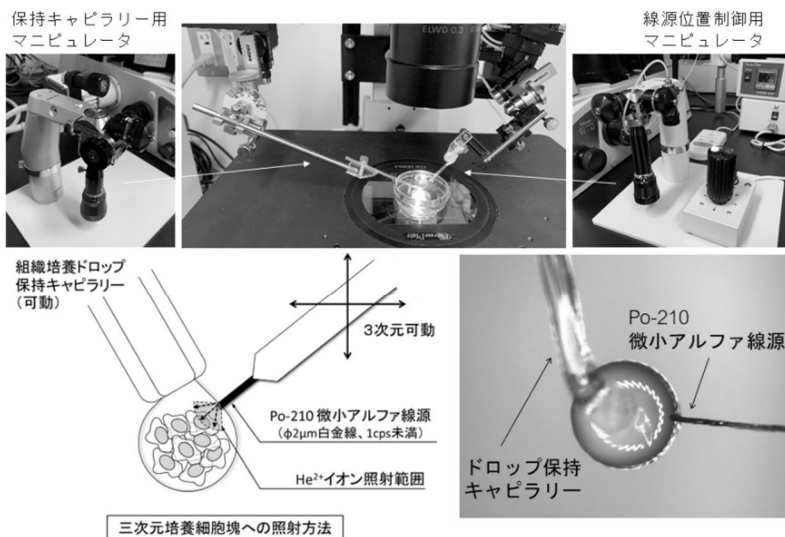


図 9 三次元照射方法の一例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角山雄一, 堀江正信, 五十棲泰人, 戸崎充男
2. 発表標題 Po-210微小線源を用いた一細胞を標的とした三次元照射方法の検討
3. 学会等名 第3回日本放射線安全管理学会・日本保健物理学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角山雄一, 五十棲泰人, 戸崎充男
2. 発表標題 一細胞照射用マイクロ線源の開発
3. 学会等名 日本放射線安全管理学会 第19回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角山雄一, 堀江正信, 五十棲泰人, 戸崎充男
2. 発表標題 Po-210微小線源を用いた局所照射系の評価
3. 学会等名 第2回日本放射線安全管理学会・日本保健物理学会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角山雄一, 戸崎充男, 五十棲泰人
2. 発表標題 He2+イオン三次元細胞照射系の検討
3. 学会等名 日本放射線安全管理学会第17回学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

He2+イオン-細胞照射影響ライブイメージングシステムSRiLの開発
<http://radi.rirc.kyoto-u.ac.jp/alpha.html>

Radiation & radioisotopes
<http://radi.rirc.kyoto-u.ac.jp/>

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
研究分担者	堀江 正信 (Horie Masanobu) (60727014)	京都大学・環境安全保健機構・助教 (14301)	
研究分担者	戸崎 充男 (Tosaki Mitsuo) (70207570)	京都大学・環境安全保健機構・准教授 (14301)	

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