

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19510059

研究課題名（和文） 高 LET 放射線による酸化的 DNA 損傷生成の評価

研究課題名（英文） Detection of oxidative DNA damage induced by high LET radiation

研究代表者

伊藤 敦 (ITO ATSUSHI)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：80193473

研究成果の概要（和文）：

高 LET 放射線の酸素効果減少の機構を理解するために、高 LET 領域でのラジカルによる酸化損傷の評価を行った。DNA の OH ラジカルによる酸化損傷 8 ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) を指標に、その細胞内生成量を HPLC によって求め、また、分布は蛍光抗体法によって観察する方法をプロトコールも含めて検討した。8-OHdG の酸素下と低酸素下での収量測定から、高 LET での酸素効果の減少は、酸素下での酸化損傷の減少と低酸素下での一定値あるいはわずかな上昇によると解釈された。また蛍光抗体法によって、高 LET でも核内での酸化損傷の生成を可視化することができた。

研究成果の概要（英文）：

Production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), an OH radical induced base damage, was examined upon irradiation with carbon, neon, silicon and iron ions over an LET range from 20 to 440 keV/ $\mu$ m under oxic and hypoxic conditions. 8-OHdG was detected by HPLC and an electro-chemical detector after extraction of DNA from irradiated cells. The yield of 8-OHdG was decreased with increasing LET under oxic condition, and strongly depended on ion species. Under hypoxic condition the yield appeared not to decrease monotonically but to approach constant level or rather to increase in the high LET region. This observation is consistent with the oxygen-in-the-track model where oxygen molecules are supposed to be produced along ion tracks. To visualize the distribution of 8-OHdG along ion tracks we imaged 8-OHdG distribution using FITC-labeled 8-OHdG antibody. At a dose as small as 5Gy, 8-OHdG was detected for every ion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、(2003-A)放射線・化学物質影響科学

キーワード：高 LET 放射線、重イオンビーム、間接作用、ラジカル、DNA 酸化損傷、酸素効果、トラック構造、8-OHdG

## 1. 研究開始当初の背景

高LET放射線の生物作用は、一般に、低LET放射線と対照的に直接作用が主であると考えられている。たとえば、高LET放射線生物作用の顕著な特徴の一つである酸素効果が小さいという現象も、酸素効果の原因が、間接作用によって生成された生体分子ラジカルが酸素によって固定されると考えると一応説明可能である<sup>1)</sup>。しかしながら、これまで高LET放射線として重粒子線を用いて間接作用の細胞死への関与のLET依存性を検討してきた我々の研究によれば、400 keV/μm以上の高LET領域においても致死の50%以上の間接作用の寄与が明らかとなった<sup>2)</sup>。そこでは、OHラジカルスカベンジャーであるDMSOの濃度無限大での防護率を化学反応キネティクス解析によって求めたものであった。この結果は、Chapmanら<sup>3)</sup>やRootsら<sup>4)</sup>がDMSO、グリセロールなどのOHラジカルスカベンジャーを高濃度で使用した実験から示唆した結果を支持するものであった。高LET放射線でも、低LET放射線同様に間接作用によって生じたラジカル経路の損傷が多いことを示唆するこれらの報告は、高LET放射線と低LET放射線の生物作用の違いは、どのような初期過程の違いに起因するのか、という問題を提起する。このような現状をふまえて、本研究では、まず高LET領域でのラジカル損傷の評価が重要と考え、以下の課題に取り組むこととした。

(1) 実際にラジカル損傷が細胞内で生成されているのかどうか。その生成量の評価と細胞内分布について明らかにする。

上記の結論は、いずれもラジカルスカベンジャーという間接的な手法によって導かれたものである。実際に間接作用によってのみ生成されることが明らかな損傷を測定することによって、より直接的な証拠を得ることができる。これまでcell culture溶液中でのOHラジカル生成を調べた報告はあるが<sup>5)</sup>、本研究は細胞内においてOHラジカル由来の損傷の量と分布を求める試みとして位置づけられる。

(2) 酸素効果が小さいことはどのように説明されるのか。

酸素効果はほとんどの場合LETが200 keV/μmを超えるとほぼゼロとなる<sup>1, 6)</sup>。従って、高LETで酸素効果がなくなる現象は直接作用のみによって説明することはできない。高LET放射線特有の酸素効果の低下に関しては、国内外において酸素効果のLET依存性の報告が多数あるが、その機構についての研究は、海外の研究グループによるモデルの提案があるのみである。たとえば、高LETでのラジカル生成の特徴をふまえたモデルが提案されている。高LETでは、ラジカルが高密度に生成されるため、ラジカル同士の再結合が

増大する。Oxygen in the track model<sup>7, 8, 9)</sup>は、ラジカル間結合から低酸素下でも酸素が生成されるというスキームであるが、いまだ実験的な裏付けはなされていない。本研究では、酸素の関与する損傷を指標として、このモデルの妥当性を検証することも計画している。参考文献：

- 1) E. A. Blakely et al., *Adv. Radiat. Biol.*, **11**, 295 (1984).
- 2) A. Ito et al., *Radiat. Res.*, **165**, 703-712 (2006).
- 3) J. D. Chapman et al., *Radiat. Environ. Biophys.*, **16**, 29 (1979).
- 4) R. Roots et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **47**, 157 (1985).
- 5) T. Moritake et al., *Radiat. Res.*, **159**, 670 (2003).
- 6) Y. Furusawa et al., *Radiat. Res.*, **154**, 485 (2000).
- 7) G. J. Neary, *Int. J. Radiat. Res.*, **9**, 477 (1965).
- 8) K. F. Baverstock and W. G. Burns, *Nature*, **260**, 316 (1976).
- 9) K. F. Baverstock and W. G. Burns, *Radiat. Res.*, **86**, 20 (1981).

## 2. 研究の目的

ラジカル損傷として、OHラジカルによって生成されるDNAグアニン塩基に生成する代表的な損傷産物(8-hydroxydeoxyguanosine; 8-OHdGと略記)をとりあげ、課題(1)については、生成量をHPLCと電気化学検出器(ECD)の組み合わせにより、また、細胞内の分布については、8-OHdG蛍光抗体の顕微鏡観察によって明らかにする。

8-OHdGはその生成過程に酸素が必要という点で、課題(2)についても有効な材料である。すなわち、常酸素下と低酸素下において8-OHdGの生成量を比較し、それらのLET依存性を求めることによって、Oxygen in the track modelの検証を行う。なお、8-OHdG定量はHPLCとECDによる。

## 3. 研究の方法

(1) 常酸素下及び低酸素下での8-OHdG生成のLET依存性

細胞内に生成された8-OHdGの検出・定量は、HPLCによって分離し、ECDで検出する方法を用いた。これは8-OHdG検出で最も一般的な手法として認められている。ECDの選択は特に重要で、Coulochem III (esa社)を利用した。低酸素状態をつくりだすために、純窒素と5% CO<sub>2</sub>の混合気体を細胞懸濁液表面に吹きかけながら40分間細胞を振とうを行った。この条件で低酸素状態が実現されていることは、X線照射による細胞死(コロニー形成能による)においてOERが約3になったこと

から確認済みである。以上の方法によって下記条件下で測定を行った。

①細胞：ヒト白血病HL-60細胞を用いた。検出には細胞数が必要なため ( $1 \times 10^7$ 個)、浮遊細胞でかつこれまでの間接作用の寄与の研究で用いてきた細胞種を採用した。

②重粒子線照射：放射線医学総合研究所がん治療装置を用いた。

LET：20-500 keV/ $\mu\text{m}$  の範囲で行った。これはこれまでの研究で用いた範囲であること、酸素効果はLETが500 keV/ $\mu\text{m}$ では十分にゼロに近づくこと、の理由による。

粒子種：炭素、シリコン、ネオン、鉄を用いた。同一LET値で照射することにより、粒子種の違い（エネルギー付与の空間構造の違い）の影響を求めた。

(2) 常酸素下での8-OHdG細胞内生成の蛍光抗体法による観察

8-OHdGの蛍光抗体を用いて、細胞内の8-OHdG分布を明らかにする。細胞はこれまで我々の蛍光抗体法観察経験が豊富なヒト肺癌細胞A549を用いた。培養細胞の蛍光抗体法についてこれまでの文献でははっきりしたプロトコルが確立されておらず、あっても細胞質が破壊されるような処理を用いていた。そこで、まず培養細胞に対するプロトコルの確立を行った。はじめに、フェントン反応によって生成したOHラジカル処理試料をポジティブコントロールとして、最適な8-OHdG抗体選定を行った。ついでX線によって検出限界の線量を求めた。それらの結果をもとに、重粒子線照射試料の観察を行った。重粒子線種、LETは(1)でHPLC実験と同様である。ただし、線量を検出限界まで下げた。

#### 4. 研究成果

(1) 酸素下での8-OHdG生成のLET及び粒子種依存性

図1に常酸素下にて、炭素 (LET: 20, 50, 80 keV/ $\mu\text{m}$ )、ネオン (LET: 80, 150 keV/ $\mu\text{m}$ )、シリコン (LET: 150, 200, 250 keV/ $\mu\text{m}$ )、鉄 (LET: 440 keV/ $\mu\text{m}$ ) 照射を行った結果を白抜きマークのマークにて示した。いずれの粒子種、LETもネオンをのぞいて、3回以上のデータを蓄積した結果である。照射は4°Cで行うことによって修復を抑えた。対照としてX線のデータは、この図には示していないが、縦軸の単位で約3となった。粒子種によって大きな差があるが、全体として8-OHdG生成量は、LETの増大とともに減少した。この結果は以前行ったdG水溶液の場合と一致する。粒子種の違いについては、たとえば150 keV/ $\mu\text{m}$ においてネオンとシリコンを比較すると、明らかにシリコンの収量が大きい。シリコンではpenumbra領域が広く、従って低LET部分による8-OHdG生成が大きいからと考えられ

る。LETが80 keV/ $\mu\text{m}$ における炭素とシリコン（あるいはネオン）の場合についても同様の解釈が可能である。

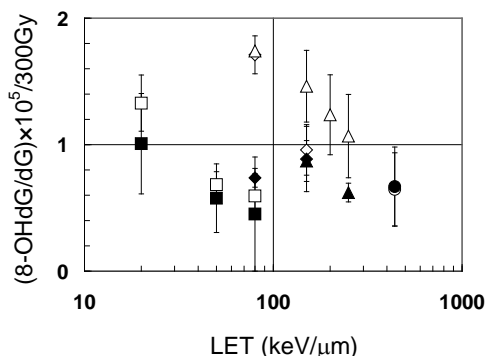


図1. 常酸素下及び低酸素下における8-OHdG生成のLET及び粒子種依存性。白抜きマークは常酸素下、黒マークは低酸素下を示す。

□, ■: 炭素、◆, ◇: ネオン、△, ▲: シリコン、○, ●: 鉄。

(2) 低酸素下での8-OHdG生成のLET及び粒子種依存性とOxygen in the track modelの検証

低酸素下でのデータは、図1に黒マークとして示した。用いたLET、粒子種ともに常酸素下の場合と同様である。常酸素下と同様にLET増加に伴い8-OHdG収量も減少する傾向にあったが、100 keV/ $\mu\text{m}$ 以上の高LET領域では収量がほぼ飽和となり、むしろやや上昇する傾向も見られた。例えば、シリコンのLETが150と200 keV/ $\mu\text{m}$ 、ネオンのLETが80と150 keV/ $\mu\text{m}$ との比較では、ほとんど収量が変わっていない。OERをLETに対してプロットすると1に近づくが、これは常酸素下での8-OHdG収量の低下とともに、低酸素下でのわずかな収量の上昇の2つの原因によってOERが小さくなっていることがわかる。これらの結果は、低酸素下でもトラックに沿って酸素が生成されるという仮説を支持するものと考えられる。ただし、特に低酸素下での測定値は、バックグラウンドレベルの約2倍と小さく、その結果ばらつきが大きく、さらにバックグラウンドレベルを下げる細胞からの8-OHdG抽出法が検討課題である。

(3) 培養細胞での8-OHdG蛍光抗体観察法のプロトコルの確立

蛍光抗体法観察のための試料作成の手順は、固定、抗原賦活化、ブロッキング、抗体処理から成る。これまでの培養細胞での蛍光抗体観察例は、非常に限られており、かつ多くの場合、抗原賦活化（抗原をむき出しにして抗体と反応させやすくする）において、熱、強酸、強塩基、蛋白質分解酵素などを用いた形

態変化を伴う処理を行っており、細胞形態を保存して 8-OHdG の位置情報を得る目的には不適である。そこで、抗原賦活化処理を除いて検出可能な方法を模索した。結果として、固定にブアン溶液を用い、抗体に Kamiya Biomedical Co. のものを用いた場合において良好な染色画像が得られた。図 2 に陽性試料としてフェントン反応 (5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+0.1mM CuSO<sub>4</sub>) で処理した画像を示した。

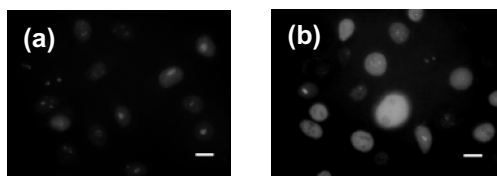


図 2. A549 細胞における 8-OHdG 生成の可視化。(a) : 未処理、(b) : フェントン反応処理。スケールバーは 10 μm

#### (4) 細胞内 8-OHdG 生成分布の LET 及び粒子種依存性

上記 (3) で求めたプロトコールによって、X 線、重粒子線照射試料の観察を行った。まず、X 線照射試料において検出可能線量限界を調べた。その結果、わずか 5Gy 照射にて有意な 8-OHdG 染色が検出された。HPLC の場合、約 300 Gy を要することと比べて、約 60 倍の高感度であった。この観察例に加えて、重粒子線各 5Gy 照射の結果を図 3 に示した。

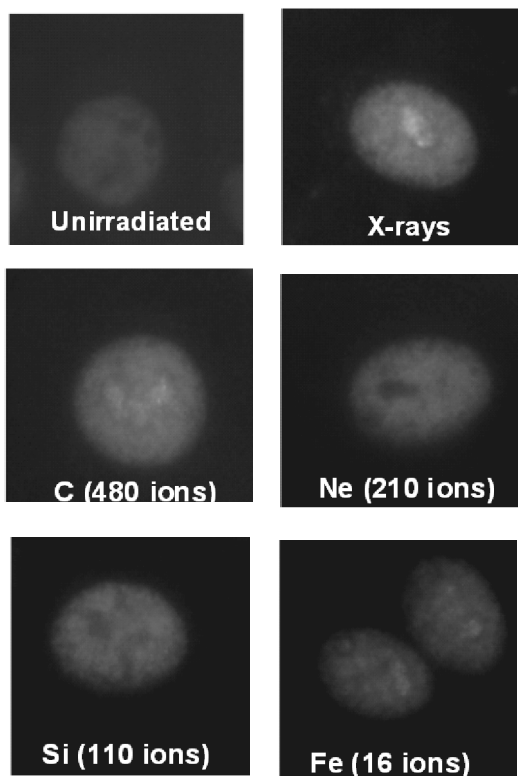


図 3. FITC 標識 8-OHdG 抗体による細胞核内 8-OHdG 分布。

図中に 5Gy 照射線量での粒子数を示した。各粒子はフラグメンテーションの起こらない条件で照射を行った。LET は以下の通りである。炭素: 13 keV/μm; ネオン: 31 keV/μm; シリコン: 55 keV/μm; 鉄: 440 keV/μm

すべての粒子において、5 Gy の低線量で間接作用に由来する 8-OHdG が有意に生成されていることがわかった。X 線と炭素では核内がほぼ均一に染色されたが、ネオン、シリコン、鉄の順に不均一性が見られた。特に鉄では粒子トラックに沿って局所的に 8-OHdG が生成されているようにみえる。他の粒子種について細胞核通過イオン数を鉄イオン程度に減じた場合も試みたが、未照射の場合と区別ができず、さらに高感度の検出が望まれる。本方法での検出限界は、例えば鉄の場合、0.4 Gy では未照射と同程度の染色となり、1-5 Gy の範囲にあると思われる。なお、本方法で単一粒子での 8-OHdG 検出が可能と考えられる鉄の場合の局所線量を Chatterjee and Shaefer<sup>1)</sup> による計算から見積もると、1μm<sup>2</sup>あたり 6 Gy 程度となる。この値は粒子種により異なる可能性は十分にあるが、他の粒子でも現在より LET を上げ局所線量を増加させて観察することが必要と考える。

今後の課題として、画像からの Oxygen in the track model の検証のために、低酸素下での観察を行うこと、標識蛍光色素の工夫により、より高感度の検出を試みること、LET をそろえて粒子種による 8-OHdG 生成の違いを調べることがあげられる。

1) A. Chatterjee and H. J. Schaefer, Radiat. Environ. Biophys., **13**, 215 (1976).

#### 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 7 件)

1. 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、**89**, 9-12 (2010). 査読有
2. R. Hirayama, Y. Matsumoto, Y. Kase, M. Noguchi, K. Ando, A. Ito, R. Okayasu, Y. 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
3. R. Hirayama, Y. Furusawa, C. Murayama, Y. Kusano, A. Ito, "LET dependence of the formation of oxidative damage 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in

- 2'-deoxyguanosine aqueous solution irradiated with heavy ions”, *Radiation Physics and Chemistry*, **78**, 1207-1210 (2009). 査読有
4. R. Hirayama, A. Ito, M. Tomita, T. Tsukada, F. Yatagai, M. Noguchi, Y. Matsumoto, Y. Kase, K. Ando, R. Okayasu, Y. Furusawa, “Contributions of direct and indirect actions in cell killing by high-LET radiations”, *Radiat. Res.*, **171**, 212-218 (2009). 査読有
  5. 伊藤敦、古市渉、平山亮一、村山千恵子、古沢佳也、“DNA酸化損傷の細胞内生成のLET依存性”、平成19年度放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置共同利用研究報告書(2008).査読無
  6. Y. Kusano, T. Kanai, S. Yonai, M. Komori, N. Ikeda, Y. Tachikawa, A. Ito, H. Uchida, “Field-size dependence of doses of therapeutic carbon beams”, *Med. Phys.*, **34**, 4016-4022 (2007).査読有
  7. N. Miyazaki, H. Nakano, A. Ito, K. Shinohara, “Different contributions of the indirect effects of  $\gamma$ -rays on the cytotoxicity in M10 and XRCC4 transfected M10 cells”, *Radiat. Environ. Biophys.*, **46**, 237-246 (2007).査読有  
[学会発表] (計 21 件)
  1. R. Hirayama, A. Uzawa, Y. Matsumoto, M. Noguchi, Y. Kase, A. Ito, R. Okayasu, S. Koike, K. Ando, Y. Furusawa, “Induction of DNA dsb and its rejoining in the clamped and non-clamped tumors after carbon ion beams compared with X-rays”, *MICROS 2009 15th International Symposium on Microdosimetry*, Verona, Italy, 2009.10.29.
  2. 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、広島、2009.11.13.
  3. 高瀬信宏、平山亮一、上野瑞己、古澤佳也、岡安隆一、村山千恵子、伊藤敦 “放射線誘発 8-OHdGの免疫染色による細胞内可視化－LET依存性と検出感度の検討”、日本放射線影響学会第52回大会、広島、2009.11.12.
  4. 伊藤敦、税所康正 “確率論を用いたDNA2本鎖切断生成に関する数理生物学的考察”、日本放射線影響学会第52回大会、広島、2009.11.12.
  5. 平山亮一、古澤佳也、鶴澤玲子、高瀬信宏、小池幸子、安藤興一、増永慎一郎、松本孔貴、加瀬優紀、野口実穂、伊藤敦、岡安隆一 “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、富山、2009.07.10.
  6. 伊藤敦、高瀬信宏、上野瑞己、平山亮一、村山千恵子、古澤佳也 “DNA酸化損傷の細胞内生成量評価とその分布”、平成19年度放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置共同利用研究成果発表会、千葉、2009.4.14.
  7. 上野瑞己、伊藤敦 “フェントン反応による細胞のDNA損傷とその修復”、日本原子力学会関東・甲越支部主催 第2回学生研究発表討論会、平塚、2009.3.13.
  8. 高瀬信宏、伊藤敦 “X線及び重粒子線によって誘発されたDNA塩基損傷の細胞内分布の観察”、日本原子力学会 関東・甲越支部主催 第2回学生研究発表討論会、平塚、2009.3.13.
  9. 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、小倉、2008.11.20.
  10. 高瀬信宏、平山亮一、古市渉、古澤佳也、岡安隆一、村山千恵子、伊藤敦 “蛍光抗体法によるX線及び重粒子線誘発された細胞内 8-OHdGの生成分布の観察”、日本放射線影響学会第51回大会、小倉、2008.11.20.
  11. 伊藤敦、草野陽介、平山亮一、古市渉、高瀬信宏、村山千恵子、古澤佳也 “高LET放射線によるラジカル損傷について”、日本放射線影響学会第51回大会、小倉、2008.11.21.
  12. 高瀬信宏、伊藤敦、平山亮一、古澤佳也 “蛍光抗体法を用いた重粒子線誘発されたDNA酸化損傷の分布観察”、平成20年度京都大学原子炉実験所専門研究会、大阪、2008.9.9.
  13. 平山亮一、加瀬優紀、伊藤敦、古澤佳也 “トラック構造の違いがもたらす生物影響”、平成20年度京都大学原子炉実験所専門研究会、大阪、2008.9.9.
  14. R. Hirayama, Y. Furusawa, C. Murayama, Y. Kusano, A. 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)*, Tokyo, 2008.9.1.
  15. R. Hirayama, Y. Matsumoto, Y. Kase, M. Noguchi, K. Ando, A. Ito, R. Okayasu, Y. Furusawa, “Radioprotection by DMSO in nitrogen saturated mammalian cells exposed to helium ion beam”, *The 2nd Asia Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC-2008)*, Tokyo, 2008.8.30.
  16. 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～、東海村、  
2008.07.29.

17. 伊藤敦、古市渉、平山亮一、村山千恵子、古沢佳也“DNA酸化損傷の細胞内生成のLET依存性”、平成19年度放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置共同利用研究成果発表会、千葉、2008.4.15.
18. 高瀬信宏、古市渉、伊藤敦“蛍光抗体法によるX線誘発されたDNA酸化損傷の検出”、日本原子力学会関東・甲越支部第1回学生研究発表会、東京、2008.3.14.
19. 平山亮一、野口美穂、伊藤敦、安藤興一、古澤佳也、岡安隆一“大気下ならびに無酸素下でのOHラジカルによる間接作用の細胞致死効果”、日本放射線影響学会第50回大会、千葉、2007.11.14.
20. 古市渉、平山亮一、古澤佳也、高瀬信宏、村山千恵子、伊藤敦“重粒子線の細胞照射における8-OHdG生成:LET、粒子種、酸素依存性”、日本放射線影響学会第50回大会、千葉、2007.11.14.
21. R. Hirayama, A. Ito, Y. Kase, K. Ando, Y. Furusawa, “Differential contribution of direct and indirect actions in cell killing by low- and high LET region”, ASR2007, International symposium on ” Charged Particle and Photon Interactions with Matter”, 茨城、2007.11.8.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 敦 (ITO ATSUSHI)  
東海大学・工学部・教授  
研究者番号：80193473

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

村山 千恵子 (MURAYAMA CHIEKO)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：50307295

### 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