

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17175

研究課題名（和文）リアルタイムイメージングを用いた陽子線照射後の癌細胞動態メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of cancer cell dynamics after proton irradiation using real-time imaging

研究代表者

橋本 眞吾（Hashimoto, Shingo）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学分野・研究員

研究者番号：90803510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：培養細胞を用いてX線および陽子線を用いて実験を行った。本研究では照射実験後の遊走能についてタイムラプス画像で検討を行い有意な差を示すことができなかった。一方、照射線量や線質によって遊走能が一過性に異なる可能性が示唆された。陽子線は近位端では低線量被曝となり、遠位端では高線量被曝となる特性をもち、異なる効果を持つ可能性がある。細胞生存率予測にはしばしば H2AXによる評価が用いられるが、低線量域での最適な評価タイミングは不明であり、検討する必要がある。低線量（10mGy）から高線量（4000mGy）のX線照射後の細胞生存率予測に最適な H2AX評価タイミングは照射後12時間だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陽子線は一つのビームの中で近位端の低線量被曝領域と遠位端の高線量被曝領域が混在しているという物理的な特性をもち、10-4000mGy領域におけるX線照射後の細胞生存率予測に最適な H2AX評価タイミングを確立することができた。これを用いて低線量被曝領域と高線量被曝領域における陽子線とX線の放射線生物学的な効果の推定につなげていくことができ、陽子線治療の最適な治療指針の確立という目的に向けて有意義なものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Experiments were performed on cultured cells using X-ray and proton beam. In this study, the migration ability after irradiation experiments was examined using time-lapse images, and no significant difference could be shown. On the other hand, it was suggested that the migration ability may differ transiently depending on the irradiation dose and the type of beam. Proton beam have the characteristic of low dose exposure at the proximal end and high dose exposure at the distal end, and may have different cellular effects at the proximal and distal ends. Although H2AX is often used to predict cell viability, the optimal timing of the evaluation in the low-dose range is unknown and needed to be investigated. The optimal timing of H2AX evaluation for cell viability prediction after low (10 mGy) to high (4000 mGy) doses of X-rays was 12 hours after irradiation.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：陽子線 X線 DNA二本鎖切断 H2AX 遊走能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陽子線は低いエネルギーで体内へ入り、飛程終端でエネルギーを急激に放出し止まる特性(ブラッグピーク形成)をもつ。この特性により複雑な形状をもつ標的腫瘍に対し、特異的にエネルギーを集中させることができるため、近年、癌治療における陽子線治療の重要性は高まってきている。これまでに我々は陽子線の生物学的な効果について研究を重ね、X線照射と比較して陽子線照射後には“細胞増殖能”が低下することを明らかにしてきた(文献1)。陽子線には他にも未知なる効果が隠されている可能性があり、照射が“細胞遊走能”に与える影響について実験することとした。陽子線の物理特性から、人体に照射する際に、近位端(正常組織)と遠位端(腫瘍周囲)での被曝量に大きな差がある。低線量被曝領域である近位端と高線量被曝領域である遠位端において、放射線生物学的な効果に差がでる可能性がある。我々は肺癌患者に対する陽子線治療成績を報告したが、近位端と比較して遠位端で強い肺炎像が見られることがあった(文献2)。これは遠位端では線エネルギー付与が増加することなどが関与しているものと考えられた。高線量被曝における細胞障害の程度を測定する手法として、リン酸化 H2AX (γ H2AX) を未修復の DNA 二本鎖切断のマーカーとして定量する手法がよく用いられる(文献3)。多くの報告では、 γ H2AX 染色のタイミングを被ばく 15 分後に設定しているが、亜致死損傷の回復(SLDR)による DNA 修復動態を考慮すると、15 分後が至適なタイミングかどうかに関しては議論が分かれる。また低線量被曝 (≤ 500 mGy) の場合に、照射後のどのタイミングでの γ H2AX foci 数が細胞障害の予測に適するか不明である。低線量被曝領域での細胞障害予測モデルを構築することが、近位端と遠位端での被曝量が異なる陽子線治療における生物学的効果を見積もるための一助になると考えられる。

2. 研究の目的

リアルタイムイメージングを用いて陽子線照射後の“細胞遊走能”について評価する。また培養細胞モデルを用い、低線量から高線量の X 線照射後、細胞生存率予測に最適な γ H2AX 評価タイミングを探索する。

3. 研究の方法

(1) 照射後の遊走能について

協力研究施設において複数の培養細胞(EMT6 細胞、V79 細胞、HSG 細胞)に対して実験を行った。専用ウェルプレートで細胞培養した後に IncuCyte Cell Migration Kit を用いて均一に溝をつくりスクラッチアッセイを行い、その溝が埋まる様を IncuCyte Zoom を用いてタイムラプス画像を取得し遊走能について比較を行った。

(2) 低線量域での細胞障害を検証する実験系の構築

ヒト HeLa S3 細胞、マウス EMT6 乳腺肉腫、B16F0 メラノーマ細胞に対し 10、50、150、500、2000、4000 mGy の X 線照射後、それぞれ 15 分、2、6、12、24 時間後に γ H2AX 免疫染色を行い蛍光顕微鏡下 1 核あたりの γ H2AX foci 数・蛍光量を計数した。また、DNA 損傷と細胞生存率の関係を調べるため、コロニー試験により細胞生存率(Surviving fraction)と γ H2AX foci のコントロールに対する相対的な foci 数・蛍光量の相関関係を求めた。細胞増殖の影響が予想されたため、全視野の核数変化も測定も同時に行った。

4. 研究成果

(1) 照射後の遊走能について

これらの細胞の場合、この実験系では 48 時間程度観測すると定量的に評価が可能と判断した。しかしながら放射線(X線, 陽子線)照射線量によって遊走能に有意な違いは得られなかった。5Gy 照射群と 2Gy 照射群を比較すると、傾向としては X 線では 2Gy 照射群で照射後 9 時間から 24 時間の遊走能が増加する印象であったが、陽子線では同期間においてそのような傾向はみられなかった(Fig. 1, Fig. 2)。これにより細胞死に至らないレベルの放射線照射では、X 線では細胞接着因子が抑制され遊走能が一過性に亢進されるが、陽子線照射では遊走能の一過性亢進が起きにくいのではないかという仮説を立てた。2Gy 以下の線量における細胞障害の数と遊走能の関連を調べるための準備として、(2)の実験を行った。

(2) 低線量域での細胞障害を検証する実験系の構築

X 線照射後、15 分で γ H2AX foci 数は最大となり、コントロール群に比べ B16F0、HeLa 細胞では 500 mGy~4000 mGy 群、EMT6 では 2000、4000 mGy 群において有意に γ H2AX foci 数が上昇した。また、B16F0、HeLa 細胞では 10~150 mGy、EMT6 では 50 mGy~150m Gy においても、線量依存性に γ H2AX foci 数が上昇する傾向が観察された。その後、 γ H2AX foci 数は緩やかに減少し、総じて 12~24 時間後にはコントロール群と同レベルに低下した(Fig. 3)。 γ H2AX 量の増加に応じて、細胞生存率は直線的に低下する傾向が見られた。傾きは 15 分後で最大になり、その後低

下して2~12時間後の間はほぼ一定であった(Fig. 4)。時間ごとにモデルの適合度を比較(Table 1)すると、相対的 foci 数では2~12時間後、相対蛍光量では15分~12時間後の適合度が高い傾向が見られた。2000、4000 mGy の高線量群では12、24時間後の細胞数はコントロール群よりも低い傾向が見られ、EMT6、HeLa 細胞では4000 mGy で有意に低下していた(Fig. 5)。

任意の細胞系列で γ H2AX の線量依存性が観察され、CT レベルの低線量域(10~50mGy)でも有意ではないものの γ H2AX foci 数の上昇が見られた。これは、一般に照射後15~30分で γ H2AX 量が最大に達することから照射直後の定量感度が高かったと考えられる。一方、15分後は細胞生存率との相関が弱い結果だった。考えられる要因として、2~6時間までに緩徐に初期のDNA二本鎖切断が修復され、早期では低線量によるDNA損傷を過大評価している可能性や、照射直後の細胞内環境のダイナミックな変化によってばらつきが生じやすくなる可能性が考えられる。細胞生存率をよく推定するタイミングとしてしばしば24時間後が用いられている(文献4)が、この実験では24時間後の相関は弱く、また有意な線量依存性もほぼ消失していた。12時間以降には細胞数が線量に応じて不均衡となるという核数変化の検討により、DNA損傷の強い細胞における細胞増殖遅延、初期の細胞死などによって、 γ H2AX カウントの対象となる母集団が変化し、定量結果が薄まっている可能性も考えられた。12時間以降では γ H2AX カウントの母数変化により γ H2AX 量に対する細胞生存率変化の傾きが鈍化し、また照射直後では低線量域のDNA損傷を過大評価する傾向がみられたことから、12時間後の γ H2AX 定量が安定して細胞生存率を推定する可能性が示唆された(文献5)。引き続きこの実験系を用いて、低線量被曝領域と高線量被曝領域における陽子線とX線の放射線生物学的な効果の違いを検証していく方向で研究を継続中である。

<引用文献>

1. Hashimoto S, Sugie C, Iwata H, *et al.* Recovery from sublethal damage and potentially lethal damage : Proton beam irradiation vs. X-ray irradiation. *Strahlenther Onkol.* 2018 Apr;194(4):343-351.
2. Hashimoto S, Iwata H, Hattori Y, *et al.* Outcomes of proton therapy for non-small cell lung cancer in patients with interstitial pneumonia. *Radiat Oncol.* 2022;17(1):56.
3. Keogh MC, Kim JA, Downey M, *et al.* A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature.* 2006 Jan 26;439(7075):497-501.
4. Marková E, Schultz N, Belyaev IY. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol.* 2007;83(5):319-329.
5. Takano S, Shibamoto Y, Wang Z, *et al.* Optimal timing of a γ H2AX analysis to predict cellular lethal damage in cultured tumor cell lines after exposure to diagnostic and therapeutic radiation doses. *J Radiat Res.* 2023;64(2):317-327.

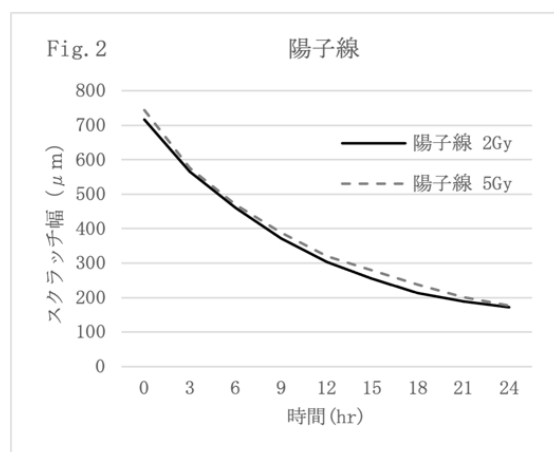
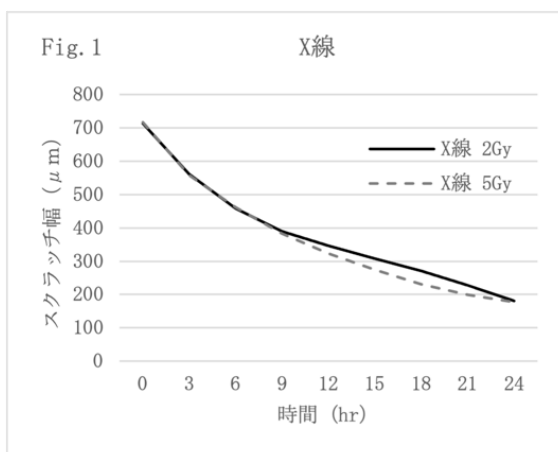


Fig. 3

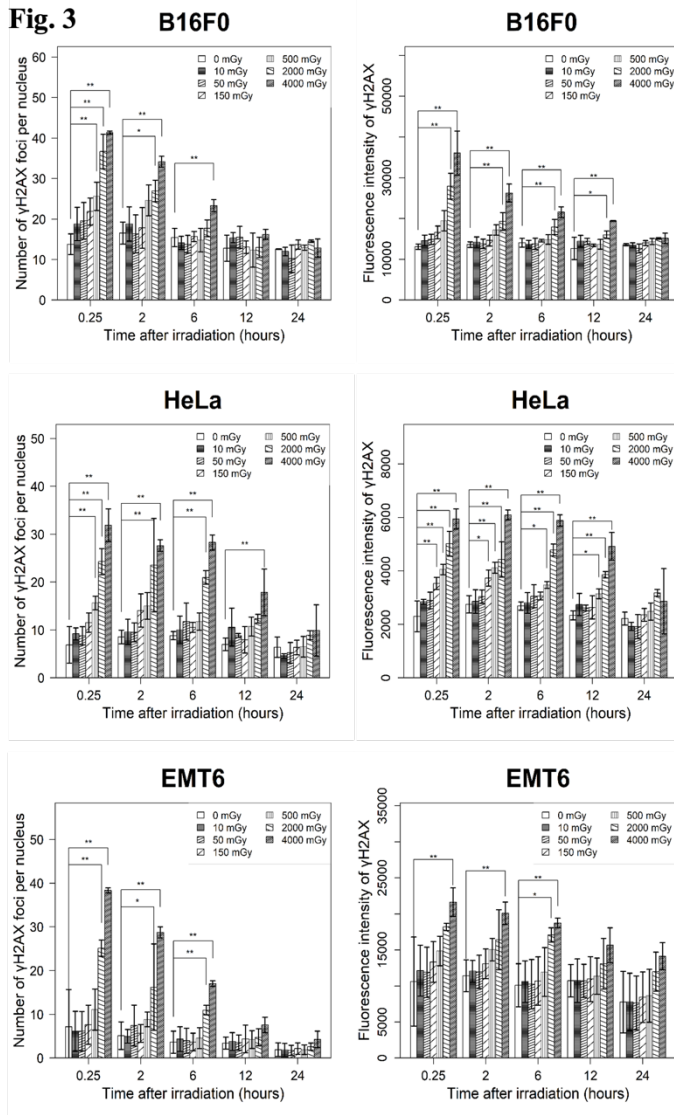


Fig. 4

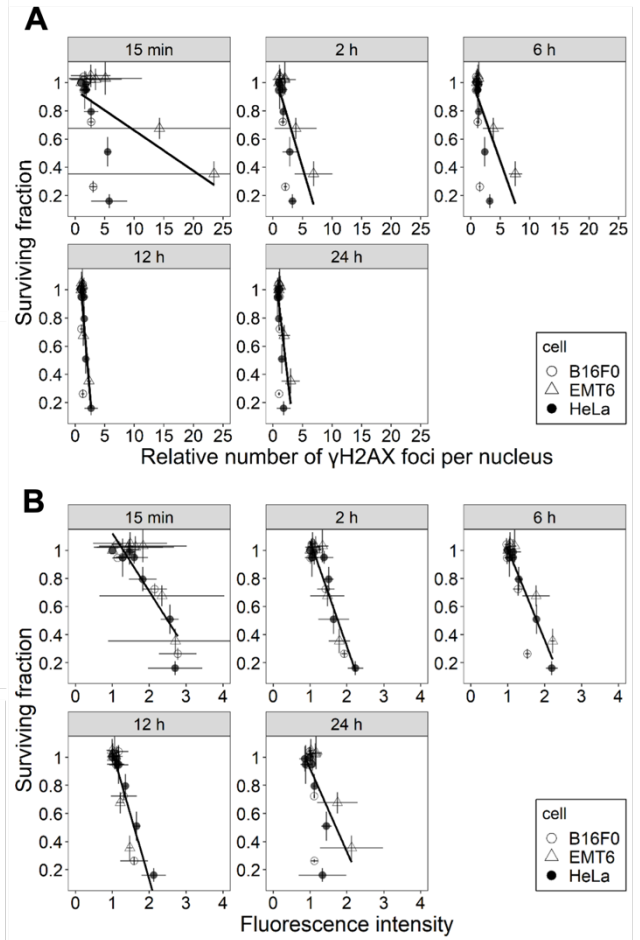


Fig.5

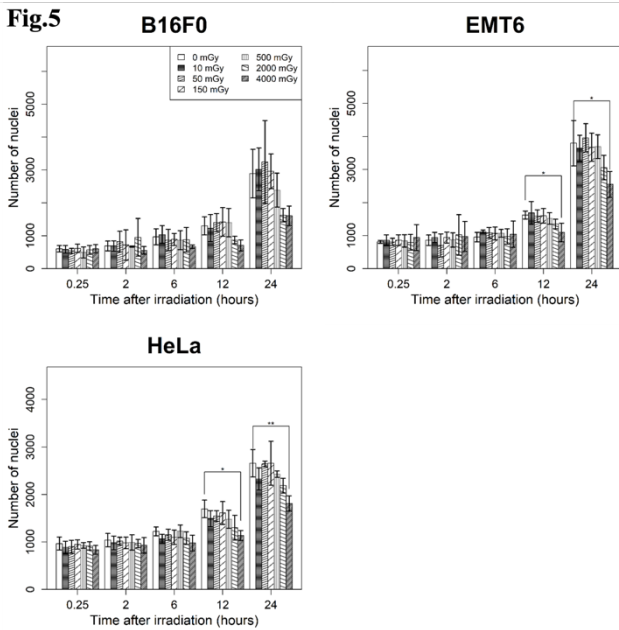


Table 1. Parameters in the linear regression

	Relative number of γH2AX foci per nucleus					
	equation	R2	P value	F value	AIC	BIC
15 min	-0.0276x+0.934	0.28	0.020	6.59	5.2	8.033
2 h	-0.138x+1.09	0.47	0.001	15.2	-0.714	2.119
6 h	-0.115x+1.02	0.42	0.003	12.1	1.224	4.057
12 h	-0.488x+1.48	0.61	< 0.001	27.1	-6.67	-3.837
24 h	-0.349x+1.24	0.41	0.003	11.6	1.547	4.381
	Relative intensity					
	equation	R2	P value	F value	AIC	BIC
15 min	-0.445x+1.6	0.82	< 0.001	79.9	-21.64	-18.81
2 h	-0.772x+1.85	0.88	< 0.001	130	-29.55	-26.71
6 h	-0.648x+1.66	0.82	< 0.001	77.3	-21.13	-18.3
12 h	-0.92x+1.96	0.85	< 0.001	92.7	-24.01	-21.17
24 h	-0.578x+1.49	0.39	0.004	11	1.947	4.78

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto Shingo, Iwata Hiromitsu, Hattori Yukiko, Nakajima Koichiro, Nomura Kento, Hayashi Kensuke, Toshito Toshiyuki, Yamamori Eiko, Akita Kenji, Mizoe Jun-etsu, Ogino Hiroyuki, Shibamoto Yuta	4. 巻 17
2. 論文標題 Outcomes of proton therapy for non-small cell lung cancer in patients with interstitial pneumonia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13014-022-02027-0	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 Takano Seiya, Shibamoto Yuta, Wang Zhen, Kondo Takuhito, Hashimoto Shingo, Kawai Tatsuya, Hiwatashi Akio	4. 巻 64
2. 論文標題 Optimal timing of a H2AX analysis to predict cellular lethal damage in cultured tumor cell lines after exposure to diagnostic and therapeutic radiation doses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 317 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrac096	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本眞吾
2. 発表標題 Outcomes of Proton Therapy for Non-small Cell Lung Cancer in Patients with Interstitial Pneumonia
3. 学会等名 2020 ASTRO annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野聖矢、橋本眞吾
2. 発表標題 放射線照射後のDNA二本鎖切断の定量タイミングが細胞生存率予測に及ぼす影響
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第35回学術大会
4. 発表年 2022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	高野 聖矢 (Takano Seiya)		
研究協力者	近藤 拓人 (Kondou Takuhito)		
研究協力者	岩田 宏満 (Iwata Hiromitsu) (40611588)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院・医学・研究員 (23903)	
研究協力者	荻野 浩幸 (Ogino Hiroyuki) (60315885)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院・医学・研究員 (23903)	

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