

平成 22年 5月 12日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710046
 研究課題名 (和文) 軟X線ビームを用いたエネルギー付与領域の違いに関する
 バイスタンダー効果の解明
 研究課題名 (英文) Bystander effect induced by Laser plasma x-ray beam
 and soft x-ray laser beam
 研究代表者
 錦野 将元 (NISHIKINO Masaharu)
 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 研究員
 研究者番号：70370450

研究成果の概要 (和文)：超短パルス・単色・高輝度という特徴を持つ軟X線レーザーとレーザープラズマX線を培養細胞集団程度の大きさまで集光できるパルス軟X線マイクロビーム照射装置を開発し、X線照射によって誘発される放射線影響に関する研究を実施した。本装置を用いて複数のがん細胞へのX線照射を行い、光子エネルギーの異なる2種類のX線を用いた細胞の放射線影響 (DNA二本鎖切断生成) に関して細胞核内で発現する影響の違いを免疫蛍光染色により観察することができた。また、放射線誘導性バイスタンダー効果を評価するために、X線照射後に照射細胞および照射細胞周辺で応答するタンパク質を免疫蛍光染色で観察することにより周辺細胞への放射線照射によるストレスの伝搬を観察し、バイスタンダー効果の直接観察を行った。

研究成果の概要 (英文)：A dedicated radiation biology x-ray generation and exposure system has been developed. 8.0 keV and 90 eV in energy x-ray pulses generated with a short pulse laser were used to irradiate sample cells through a custom-made culture dish with a silicon nitride membrane. The x-ray irradiation resulted in DNA double-strand breaks in the nucleus of a culture cell that were similar to those obtained with a conventional x-ray source. To elucidate the bystander effects, we have observed the propagation of stress responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：プラズマ科学 放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：レーザープラズマX線・軟X線レーザー・放射線生物影響・マイクロビーム・DNA二本鎖切断・バイスタンダー効果

1. 研究開始当初の背景

X線等の放射線によるがん治療は、照射技術や画像技術の発展により腫瘍に対しての高線量集中制御が可能となっている。しかし、治療後のがん転移や再発の抑制は大きな課題であり、がん細胞の浸潤・転移能に対する放射線影響の研究が進められている。がん細胞の致死に至らない程度の線量（亜致死線量）のX線のがん細胞に照射した場合、転移に大きく関与する浸潤・遊走能を促進させることも報告されている[1]。そのため腫瘍の動きが大きい部分では線量不均一によるがん転移や再発の影響を考慮する必要がある。このような放射線影響の細胞レベルでの研究を実施するため、粒子線やX線を用いたマイクロビーム照射装置の開発研究が行われている。マイクロビーム照射装置によって単一細胞に放射線を照射すると、周囲に存在する直接照射を受けていない細胞（バイスタンダー細胞）においてH2AXのリン酸化（DNA二本鎖切断）や53BP1などのタンパク質の活性化など発がんに結びつくような影響（バイスタンダー効果）が引き起こされる[2]。このバイスタンダー効果には、Gap Junctionと呼ばれる物質のやりとりにより情報を交換する経路やNOラジカルなどの活性酸素が関与していると考えられている[3-5]。このバイスタンダー効果のメカニズムの解明について研究が進められているが、最近では細胞内の照射部位の違いによるバイスタンダー効果のメカニズムについても報告されている。低放射線量領域において細胞核のみに照射した（細胞質へのエネルギー付与がない）場合、照射細胞やバイスタンダー細胞の細胞死が細胞全体に照射した場合に較べて増大する効果が確認されている。この結果より細胞質内においてエネルギー付与を関知し、バイスタンダーシグナルを制御するような未知の機構が考えられている[6]。現在、バイスタンダー効果のメカニズム解明から放射線治療応用に向けて、研究が進展している。

米国コロンビア大学（イオン）、英国グレイ研究所（X線）、独GSI研究所（イオン）、日本原子力研究開発機構高崎研究所（イオン）、高エネルギー加速器研究機構（X線）、放射線医学総合研究所（プロトン）、長崎大学（X線、グレイ研究所と同じ装置）等でマイクロビーム照射装置が開発され放射線影響によるバイスタンダー効果の研究が実施されている。日本では粒子線やX線と線質やエネルギーの異なった多種のマイクロビーム装置が整備され、諸外国と同等な研究が行

われている。これらのマイクロビーム照射装置は、主に α 線、Ar線、Ne線などの高エネルギー重粒子線照射装置であり遺伝子等に異常のないヒト細胞正常細胞株（繊維芽細胞株）を使用して発がんなどのバイスタンダー効果のメカニズムに関する研究が行われてきた。そのため、低エネルギー領域の軟X線を用いた照射部位の違いによるバイスタンダー効果の研究に関連する研究は行われてこなかった。我々は上記のような放射線生物影響の解明にレーザープラズマX線[7, 8]が持つ「超短パルス性」「集光能力」「光子エネルギー可変性」が有効であると考え研究を開始した。

（参考文献）

- [1] T. Ogata *et al.*, *Cancer Res.* **65**(1), 113-120 (2005).
- [2] V. M. Sokolov *et al.*, *Oncogene* **24**, 7257-7265 (2005).
- [3] E. I. Azzam *et al.*, *Cancer Res.* **63**, 7128-7135 (2003).
- [4] H. Matsumoto *et al.*, *J. Radit. Res.* **48**, 97-106 (2007).
- [5] C. Shao *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 837-844 (2002).
- [6] Y. Kobayashi *et al.*, *J. Radiat. Res.* **50**, Suppl., A29-A47 (2009).
- [7] W. Liu *et al.*, *Phys. Rev. E* **80**, 026404 (2009).
- [8] M. Nishikino *et al.*, *Appl. Opt.* **47**, 1129-1134 (2008).

2. 研究の目的

可視光顕微鏡下で試料(細胞)の照準を合わせ、これに軟X線ビームを細胞集団レベルに集光する軟X線マイクロビーム照射装置の開発を行う。開発した装置によりがん細胞へ軟X線照射を行い、その後引き起こされるDNA損傷やバイスタンダー効果の研究を行う。細胞質内のエネルギー付与によってバイスタンダーシグナルを制御する未知の機構があると考えられるため、2種類の光子エネルギーを持つレーザープラズマX線源（89eVと8 keV）を使用することにより、軟X線のエネルギー付与領域の違いによる放射線影響について比較を行う。また、ピコ秒程度のパルスX線マイクロビームが引き起こす時間的・空間的に高密度な構成物質の励起と電離が生物影響にどのように反映されるかについて研究を行う。

3. 研究の方法

レーザープラズマ軟 X 線を集光して細胞レベルの X 線照射を実現するには、可視光顕微鏡下でサンプルの照準を合わせ、これに軟 X 線ビームを集光する装置が必要となる。軟 X 線照射による放射線応答の実験として図 1 のような軟 X 線マイクロビーム照射装置の開発を行う。本装置は、 $20\mu\text{m}$ 程度の大きさの単一細胞への軟 X 線照射を実現するために生物用顕微鏡の一部にミクロン単位的位置制御可能なステージを付加し、可視光による観測と軟 X 線照射光学系とがミクロン単位で精密調整可能な装置を製作し、真空容器に組み合わせたものである。軟 X 線照射実験では、まず始めに軟 X 線ビームの強度と集光位置・サイズを軟 X 線用背面照射型 CCD カメラにより確認し評価を行う。軟 X 線ビームの集光位置等を確認した後、細胞照射用顕微鏡装置に切り替え、同じ位置に細胞を設置して実際の照射を実施する。低格子エネルギー領域 (100 eV 程度) の軟 X 線を細胞に照射するためには、大気による X 線の減衰の影響を避ける必要があるため窒化シリコン薄膜を真空窓にし、照射する。細胞も同程度の厚さの窒化膜上に培養して照射を行う。窒化膜上に貼り付いた細胞を窒化膜の裏側から軟 X 線を照射する設計のため照射時に培養液を取り除く必要が無く、細胞のコンタミネーションの発生および、照射時の細胞へのストレスを抑制させることができる。

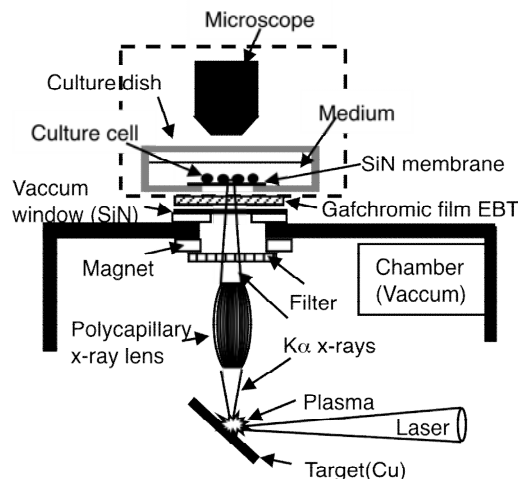


図1: 軟X線ビーム照射装置

放射線生物学研究では DNA 二本鎖切断を評価するための方法の一つとして、DNA 二本鎖切断に応じて活性化するタンパク質を抗原抗体反応により検出し、これを蛍光顕微鏡で観察する免疫染色法が利用されている。

本研究では、軟 X 線照射により DNA 二本鎖切断が生じた細胞を同定するために、ATM (Ataxia telangiectasia mutated) やヒストンバリエーションの一つである H2AX のリン酸化に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行い蛍光顕微鏡により評価した。

4. 研究成果

(1) 軟X線マイクロビーム照射装置の開発

軟 X 線のエネルギーに対応して 2 種類の照射方法を開発した。

① 8 keV 軟 X 線照射マイクロビーム照射装置

装置の概要としては図 1 のようになっており、厚さ $1\mu\text{m}$ の窒化シリコン膜を真空窓にし、照射する細胞も厚さ $1\mu\text{m}$ の窒化シリコン膜上に培養して照射を行った。照射した軟 X 線ビームの空間プロファイルは、図 2 (a) のようになっている。

② 90 eV 軟 X 線照射マイクロビーム照射装置

大気による X 線の減衰の影響を避ける必要があるため、厚さ $0.1\mu\text{m}$ の窒化シリコン膜を真空窓と細胞培養基板と同時に使用できる X 線照射方式と照射用シャーレを開発した[特許出願]。照射した軟 X 線ビームの空間

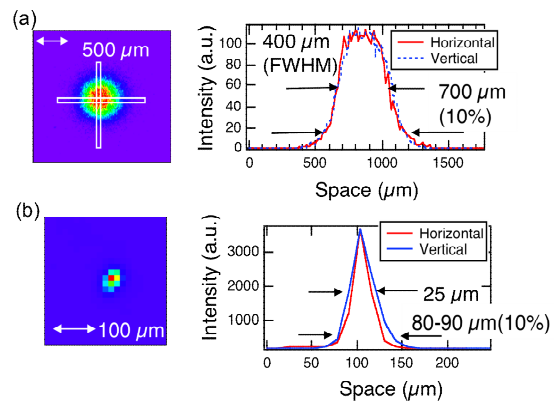


図2: 軟X線ビームの空間プロファイル
プロファイルは、図 2 (b) のようになっている。

(2) 軟 X 線マイクロビームによる放射線影響の確認と DNA 損傷部位の可視化

レーザープラズマ軟 X 線ビーム (8keV) を照射したときに生成した DNA 損傷細胞核の様子を図 3 (a) に示す。明るい緑の部分、DNA 損傷が生成している細胞核であり、青い

部分は、損傷が生成していない細胞核である。X照射された領域（点線円内）でDNA損傷が生成されていることがわかる。この細胞核内のDNA二本鎖切断の様子を示したものが図3(b)である。細胞核内でDNA二本鎖切断が生じた部分（ γ -H2AX フォーカスと呼ばれるスポット）が核内に広く分布している。

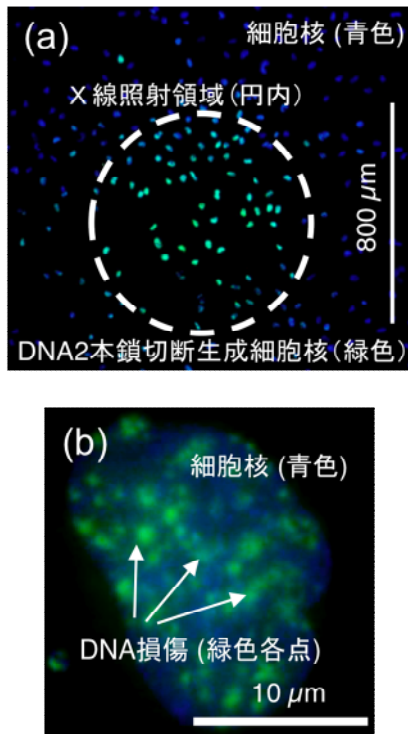


図3: 軟X線ビーム照射された細胞の様子

(3) 波長の違う軟X線による放射線損傷発生の様子

図4は、ATM抗体を用いた免疫蛍光染色法により観察したDNA二本鎖切断の様子である。図4(a)の8keVの軟X線照射の場合は、核内全体にリン酸化ATMのフォーカスすなわちDNA損傷が生成しているのに対して、(b)の89eVの軟X線照射では、核内の局所（一部）にDNA損傷が生成していることが確認できる。これは光子エネルギーの違いにより細胞内での軟X線エネルギーの吸収領域が違うことでDNA損傷生成が局所領域になったと考えられる。今後、詳細な解析と実験に

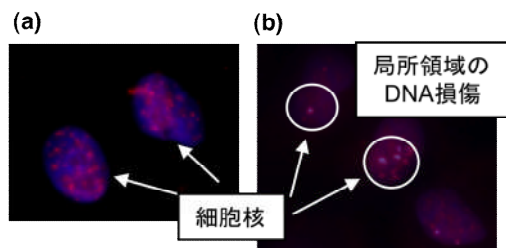


図4: 細胞核内の二本鎖切断の様子

よりエネルギー吸収領域の違いによるDNA損傷の生成について解明できると考えられる。

(4) 軟X線照射によるバイスタンダー効果の確認

また、軟X線ビーム照射(8 keV)周辺の細胞においてのバイスタンダー効果を直接観察するために、照射2時間後の周辺における非照射細胞でのストレス応答の観察を行った。図5のようにX線照射領域外において、細胞核内にストレス応答が起きていることを確認した。これはバイスタンダー効果を起こす原因の1つの直接観察と考えられる。今後、ストレス応答が発生する空間領域や経過時間について詳細な実験によりバイスタンダー効果の解明につながると考えられる。

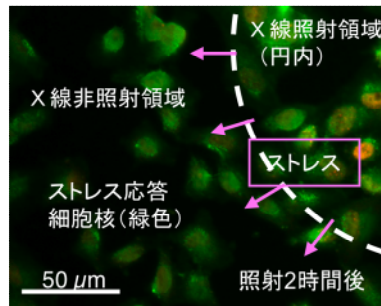


図5: 照射領域周辺部でのストレス応答細胞核

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4件)

- ① Masaharu Nishikino *et al.* (他9名), Application of Laser Produced Plasma K α X-ray Probe in Radiation Biology, Review of Scientific Instruments, 査読有, Vol. 81, 2010, 20266217.
- ② Masaharu Nishikino *et al.* (他9名), Development of Laser Plasma X-ray Beam for Radiobiological Applications, 査読有, CD-ROM, 2009, TuA2-4.
- ③ Masaharu Nishikino *et al.* (他3名), Development of Soft X-ray Fourier Transform Holography with Fresnel Zone Plate, X-Ray Lasers 2008, 査読有, 427-432.
- ④ Masaharu Nishikino *et al.* (他9名), Development of Focused Laser Plasma X-ray Beam for Radiobiological Applications, Journal of Radiation Research, 査読有, vol. 50A, 2009, A112

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 錦野将元、レーザー駆動単色 X 線と放射線生物学への応用、第 57 回 応用物理学関係連合講演会、2010 年 3 月 18 日、東海大学
- ② 錦野将元、超短パルスレーザープラズマ X 線ビームの放射線生物影響研究への応用、レーザー学会 学術講演会第 30 回年次大会、2010 年 2 月 3 日、千里ライフサイエンスセンター
- ③ 錦野将元、放射線生物応用研究に向けた超短パルスレーザープラズマ X 線ビームの開発、高速度イメージングとフォトニクスに関する総合シンポジウム、2009 年 12 月 11 日、大阪大学
- ④ Masaharu Nishikino, Development of Laser Plasma X-ray Beam for Radiobiological Applications, CLEO Pacific Rim 2009, 2009 年 9 月 1 日、Shanghai, China
- ⑤ 錦野将元、レーザープラズマ X 線マイクロビーム照射装置の開発と放射線生物学への応用、2008 年 12 月 11 日、九州大学
- ⑥ Masaharu Nishikino, Development of Soft X-ray Fourier Transform Holography with Fresnel Zone Plate, 11th International Conference on X-ray Lasers, 2008 年 8 月 19 日、Belfast, Northern Ireland
- ⑦ Masaharu Nishikino, Development of Focused Laser Plasma X-ray Beam for Radiobiological Applications, 2008 年 11 月 15 日、放射線医学総合研究所

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：放射線照射試料用シャーレ及び放射線照射方法

発明者：錦野将元

権利者：日本原子力研究開発機構

番号：特願 2009-2220831

出願年月日：2009 年 9 月 25 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錦野 将元 (NISHIKINO MASAHARU)

日本原子力研究開発機構

量子ビーム応用研究部門・研究職

研究者番号：70370450

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし