

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791472

研究課題名(和文) DNA損傷修復欠損細胞を用いた重粒子線の生物効果に関する放射線化学的アプローチ

研究課題名(英文) Approach of radiochemistry about cellular lethality in DNA repair-deficient cell lines after heavy-ion irradiation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：細胞致死におけるLET-RBE(生物学的効果比)関係とLET-OER(酸素増感比)関係を求めると、CHO細胞とHR関連遺伝子変異株である51D1細胞では照射時の酸素の有無にかかわらず、LET値が200keV/um付近で最大のRBE値を示した。しかし、NHEJ関連遺伝子変異株であるxrs6細胞では、RBE値のピークは観察されなかった。一方、OERのLET依存性は低LET領域においては、51D1細胞が他の細胞株に比べて小さいOER値を示した。細胞致死に対する間接作用の寄与を調べると、CHO細胞と51D1細胞は放射線感受性が大きく異なるものの、間接作用の寄与率は全てのLET領域でほぼ同程度であった。

研究成果の概要(英文)：We estimated the effects of indirect and direct actions on cell killing using dimethylsulfoxide (DMSO). CHO, xrs6 and 51D1 cell lines under oxic and hypoxic conditions were exposed to several intensities of high-LET radiation (13 to 200 keV/micrometer) in the presence or absence of DMSO and cell survival was determined using a colony formation assay. Under both oxic and hypoxic conditions, the contribution of direct action to cell killing increased with increasing LET. In all cell lines, the RBEs determined at a survival level of 10% increased with LET, and the OERs decreased with LET. When the RBE and OER were estimated separately for direct action (RBE-D and OER-D) and indirect action (RBE-I and OER-I); the RBE-D was larger than RBE-I and the OER-D was smaller than OER-I. Thus the direct action of heavy-ions yielded a remarkably larger RBE and smaller OER for cell killing than the indirect action.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学 重粒子線 生物学的効果比 酸素増感比 低酸素 OHラジカル 陽子線 DNA二本鎖切断修復

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療にとって腫瘍細胞に対する生物効果の増感や低酸素による放射線抵抗性の克服は重要な問題である。粒子放射線では光子放射線に比べ、大きい RBE (relative biological effectiveness: 生物学的効果比) 値や小さい OER (oxygen enhancement ratio: 酸素増感比) 値を示すため、粒子放射線と生物の相互作用は明らかに光子放射線とは異なることがわかる。申請者は放射線のエネルギーが直接 DNA に付与する作用 (直接作用) が、生体内に存在する水の分解生成物である OH ラジカルを介して DNA が損傷を受ける作用 (間接作用) よりも高い細胞致死効果を生じることを大気環境下での実験で明らかにした (Hirayama et al, Radiat. Res. 2009)。さらに重粒子線のような高 LET (linear energy transfer: 線エネルギー付与) 放射線では OH ラジカルが飛跡に沿って密に生成されるためラジカル同士の反応により、酸素が形成され低酸素による放射線抵抗性が消失することも明らかにした (Hirayama et al, Radiat. Phys. Chem. 2009)。

このように重粒子線特異的な大 RBE や小 OER の機構を OH ラジカルを指標とした放射線化学的プロセスの観点から検証を行ってきたが、放射線生物学的なプロセスにはまだいくつかの未解明な点があり、放射線生物作用機構を物理学的、化学的、生化学的、生物学的過程にもとづいて理解することが、重粒子線特異的な生物応答を解明することにつながると考えた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果をもとに、本研究は重粒子線特異的な生物応答のまだ解明されて

いない基礎的研究を完成し、重粒子線を利用した粒子線治療の高度化へ展開するための基盤研究を行うために、以下のことを目的とした。

(1) 哺乳動物細胞の NHEJ (non-homologous end joining: 非相同末端再結合) および HR (homologous recombination: 相同組換え) 関連遺伝子変異株と野生株を用いて、重粒子線の細胞生存率を大気下ならびに低酸素下で求め、DNA 損傷修復機構ならびに放射線感受性の関係性を明らかにする。

(2) RBE および OER の LET 依存性を DNA 損傷修復機構別に解析し、重粒子線特異的な生物応答と DNA 損傷修復機構の関連性を明らかにする。

(3) OH ラジカル捕捉剤を用いて、放射線誘発 OH ラジカルの細胞致死への寄与を求め、NHEJ および HR 関連遺伝子変異株と野生株の細胞致死機序に対する放射線作用を明らかにする。

(4) RBE および OER の LET 依存性を放射線の直接作用ならびに間接作用別に解析し、重粒子線特異的な生物応答と放射線作用の関連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 重粒子線がもたらす大 RBE ならびに小 OER の機構解明

これまで国内外の 2 研究グループから NHEJ 関連遺伝子変異株による重粒子線の生物効果が報告されているが (Weyrather et al. Int. J. Radiat. Biol. 1999, Okayasu et al.

Radiat. Res. 2006) HR 関連遺伝子変異株における重粒子線の生物効果は明らかにされていない。これを明らかにするために、次のような実験を行った。

#### 大気下での重粒子線による細胞致死効果の解析

野生型細胞であるチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞とその NHEJ 関連遺伝子変異株である xrs6 細胞ならびに HR 関連遺伝子変異株である 51D1 細胞を用いることで、DNA 二本鎖切断修復機構の違いによる重粒子線に対する細胞応答を調べた。各々の細胞の感受性はコロニー形成法を用いて細胞生存率の値を出し、直線-二次曲線モデル (LQ モデル) でフィットさせ、パラメーターである  $\alpha$ 、 $\beta$  値から D10 (10% 生存率を得る線量) 線量を求め、DNA 二本鎖切断修復機構の違いがもたらす放射線感受性を明らかにした。重粒子線は放射線医学総合研究所にある重粒子線がん治療装置 (HIMAC) から供給される C, Si, Ar ならびに Fe イオン核種を用いた。さらに軽粒子である陽子線照射も所属機関にあるサイクロトン (NIRS-MC) 施設で行った。

#### 低酸素下での重粒子線による細胞致死効果の解析

低酸素下での照射実験では申請者が作成した低酸素置換装置ならびに照射容器を用いて行った (図 1)。酸素濃度が 0.2 mmHg (0.035%) 以下になることは既に報告し (Hirayama et al, Radiat. Phys. Chem. 2009) 低酸素による細胞毒性が無いことも調査済みである。

大気下での実験と同様にコロニー形成法により、細胞生存率の値を出し、パラメータ

ーを求めることで低酸素下での放射線感受性を明らかにした。低酸素実験で使用するシャーレは酸素の混入を防ぐためガラスシャーレを用いた。申請者は光子放射線によるガラスシャーレからの後方散乱線の影響を排除するため、重粒子線の RBE を導き出す標準線源として陽子線を用いた。NIRS-MC で供給される陽子線の LET 値は約 2 keV/ $\mu\text{m}$  であるので、X 線と同等の低 LET 放射線と考えている。

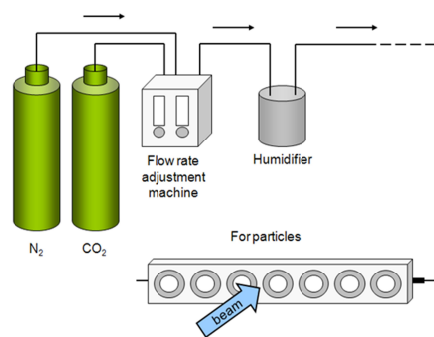


図 1 低酸素置換装置と照射容器

#### 重粒子線の大 RBE ならびに小 OER と、DNA 二本鎖切断修復機構との関連

重粒子線の RBE は陽子線との線量比で求め、CHO 細胞、xrs6 細胞ならびに 51D1 細胞における LET-RBE 関係を調べ、重粒子線特有の生物応答と DNA 二本鎖切断修復機構との関連を明らかにした。さらに OER の LET 依存性も調べ、酸素効果と DNA 二本鎖切断修復機構との関連も明らかにした。

#### (2)放射線の作用別解析による重粒子線特異的な生物応答の機構解明

OH ラジカル特異的な捕捉剤である DMSO を用いて、重粒子線の細胞致死機序を OH ラジカル由来の間接作用と直接作用に分け、LET-RBE および LET-OER 関係におけ

る直接作用と間接作用の役割を明らかにするために、次の実験を行った。

#### 間接作用の推定

D10 線量を照射し、DMSO 濃度依存的(0 ~ 1 M) に変化する細胞保護率 (DP) の割合を求めた。さらに DMSO 濃度を無限大へ外挿し、その時の最大 DP を求めることで細胞致死に寄与する OH ラジカル由来の間接作用を推定した。この手法を用いて大気下ならびに低酸素下での CHO 細胞、xrs6 細胞ならびに 51D1 細胞の放射線細胞致死機序における間接作用の寄与を明らかにした。

#### RBE ならびに OER の放射線作用別解析

細胞致死を直接作用と間接作用由来に分け、生存率曲線から RBE ならびに OER を再計算した。放射線作用別の LET-RBE ならびに LET-OER 関係から重粒子線の生物効果と酸素効果に放射線作用がどのように関与しているかを放射線化学的プロセスの観点から明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞生存率曲線

CHO 細胞に比べ、NHEJ 関連遺伝子変異株の xrs6 細胞と HR 関連遺伝子変異株の 51D1 細胞は全ての放射線に対し、高感受性を示した。生存率曲線を LQ モデルでフィットさせると、感受性である 51D1 細胞は CHO 細胞と同じように低 LET 放射線で「肩」のある生存率曲線を示したが、xrs6 細胞では「肩」は観察されなかった。DNA 損傷修復欠損株では放射線に対して高感受性を示すが、修復経路の違いによって線量-効果関係は異なることが判明した。

### (2) RBE および OER の LET 依存性

CHO 細胞と 51D1 細胞は LET 増加に伴い RBE が増加し、200 keV/μm 付近にその最大値を示すことが、大気下ならびに低酸素下照射で明らかになった。一方、xrs6 細胞では RBE 値のピークは観察されず、高 LET 領域であっても細胞致死効果の急激な増加は見られなかった。OER の LET 依存性は、LET 増加に伴い OER 値が減少する傾向を全ての細胞で観察し、細胞種の違いは現れなかった。

### (3) 放射線誘発 OH ラジカルの細胞致死への寄与

CHO 細胞では X 線ならびに陽子線 (2 keV/μm) 大気下照射では細胞致死の約 80% が OH ラジカルによることが明らかになった。LET 値が増加するに従って、OH ラジカルの寄与率は低下したが、最大 RBE 値を示す 200 keV/μm でも、細胞致死の約 40% が間接作用による細胞致死であることが判明した。さらに低酸素下では、低 LET 放射線であっても細胞致死の間接作用の寄与率は約 50% であり、高 LET 放射線 (200 keV/μm) ではさらに減少し、その値は約 30% であった。低酸素下では大気下に比べ、OH ラジカルによる細胞致死寄与が小さいことが明らかになった。HR 関連遺伝子変異株の 51D1 細胞は、放射線感受性にもかかわらず、CHO 細胞とほぼ同等の細胞致死に対する OH ラジカルの寄与率を大気下ならびに低酸素下照射で示した。一方、NHEJ 関連遺伝子変異株の xrs6 細胞では、X 線ならびに陽子線の低 LET 放射線であっても間接作用の寄与は小さく、大気下で 50%、低酸素下で 30% であった。さらに LET 増加に伴い細胞致死に対する間接作用の寄与率は

低下した。

#### (4) RBE および OER の放射線作用別解析

CHO 細胞の大気下照射での細胞致死を直接作用と間接作用(OH ラジカル)由来に別け、それぞれの生存率曲線から RBE を算出すると、200 keV/μm で示した RBE 値(2.7)が直接作用由来では 3.9、間接作用由来では 1.5 であった。低酸素下照射であっても、直接作用由来の細胞致死から計算した RBE 値の方が間接作用から求めた RBE 値よりも大きい値を示した。このことから、重粒子線が示す大きい生物効果は、直接作用による細胞致死が深く関係していることが判明した。さらに他の細胞でも、値は異なるが同様の傾向を示した。RBE と同様に OER も直接作用と間接作用由来の生存率から求めると、直接作用由来の細胞致死から計算した OER 値は間接作用から求めた OER 値よりも小さい値を示し、直接作用による細胞致死には酸素の影響は小さいことがわかった。これは他の細胞でも同様の傾向を示した。このことから OH ラジカル誘発細胞致死において、酸素は生物効果を増加させる増感剤としての作用が有り、放射線治療で問題となる低酸素領域においては、酸素の有無に依存しない直接作用による細胞致死機序が重要であることがわかった。

これらの結果をまとめると、重粒子線がもたらす大きい生物効果や低酸素細胞に対する有効性は、重粒子線の直接作用による細胞致死誘導が深く関わっていると結論づけた。

#### 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ](計 1 件)

Ryoichi Hirayama, Atsushi Ito, Miho Noguchi, Yoshitaka Matsumoto, Akiko

Uzawa, Gen Kobashi, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: OH radicals from the indirect actions of X-rays induce cell lethality and mediate the majority of the oxygen enhancement effect. Radiation Research, 180, 514-523, 2013、査読有  
DOI: 10.1667/RR13368.1.

[ 学会発表 ](計 12 件)

平山亮一、松本孔貴、鵜澤玲子、金子由美子、平野祥之、尾崎匡邦、山下慶、李恵子、苅谷文子、野口実穂、白井敏之、古澤佳也: 高LET放射線とフリーラジカルの生物影響、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013.10.19、青森

平山亮一、松本孔貴、鵜澤玲子、金子由美子、尾崎匡邦、山下慶、李恵子、苅谷文子、野口実穂、白井敏之、古澤佳也: X線ならびに重粒子線の酸素効果、第 42 回放射線治療による制癌シンポジウム-基礎と臨床の対話-、2013.07.05、仙台  
平山亮一、古澤佳也: 重粒子線誘発フリーラジカルの生物影響、第 6 回光・プラズマプロセスのバイオ応用ワークショップ、2013.03.08、大阪

平山亮一、古澤佳也: 重粒子線の放射線生物学 - 3 次元スキャニング照射法による生物学的特徴 -、第 11 回九州放射線治療システム研究会、2013.01.19、福岡

Ryoichi Hirayama, Yoshitaka Matsumoto, Kana Koda, Akiko Uzawa, Miho Noguchi, Yuki Kase, Atsushi Ito, Naruhiro Matsufuji, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: High biological effectiveness depends on the direct

action by heavy ions. 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 2012.10.18, Vietri sul Mare, Italy

平山亮一、伊藤敦、安藤興一、古澤佳也：酸素効果のメカニズムにおける化学的因子と生物学的因子、日本放射線影響学会第55回大会、2012.09.06、仙台

平山亮一：水の放射線分解によって生じたフリーラジカルの生物影響、平成24年度第1回量子ビーム科学研究施設研究会、2012.07.25、茨木市

平山亮一、松本孔貴、鶴澤玲子、幸田華奈、野口実穂、加瀬優紀、松藤成弘、伊藤敦、古澤佳也：3次元スキヤニング照射法による生物学的利点、第50回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、2012.06.30、宜野湾市

Ryoichi Hirayama, Yoshitaka Matsumoto, Kana Koda, Akiko Uzawa, Miho Noguchi, Yuki Kase, Naruhiro Matsufuji, Atsushi Ito, Yoshiya Furusawa: Direct action of heavy-ion plays a major role in the high biological effects, 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2012.06.06, Prague, Czech Republic

平山亮一、松本孔貴、鶴澤玲子、幸田華奈、野口実穂、加瀬優紀、松藤成弘、伊藤敦、古澤佳也：重粒子線の直接作用がもたらす生物効果、第14回癌治療増感研究シンポジウム、2012.02.11、奈良

平山亮一、松本孔貴、野口実穂、鶴澤玲子、幸田華奈、古澤佳也：X線ならびに高LET放射線によって生成されたDNA損傷の低酸素環境下での修復動態、日本放

射線影響学会第54回大会、2011.11.18、神戸

Ryoichi Hirayama, Yoshitaka Matsumoto, Akiko Uzawa, Nobuhiro Takase, Chizuru Tsuruoka, Mami Wada, Miho Noguchi, Yuki Kase, Naruhiro Matsufuji, Atsushi Ito, Ryoichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: Direct action is the key to understand the high biological effects caused by particle beams, 14th International Congress of Radiation Research, 2011.08.30, Warsaw, Poland

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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