

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461902

研究課題名(和文) DNA損傷修復関連因子を用いた粒子線トラック構造の生物学的可視化に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on biological visualization of particle track structure using DNA damage repair related factor

研究代表者

平山 亮一 (HIRAYAMA, Ryoichi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・主任研究員(定常)

研究者番号：90435701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では粒子線の飛跡構造(トラック構造)と生物効果の関係を明らかにすることを試み、バイオマーカーを用いて生物学的トラック構造を可視化し、放射線誘発フリーラジカルの影響等を含めた粒子線トラック構造とその生物効果に関する知見を取得した。照射30分後では粒子線のLETが増加してもトラックサイズ(面積)の変化は見られなかったが、照射24時間後では高LET粒子線によるトラックサイズが他の低LET粒子線よりも大きいことがわかった。さらにOHラジカル捕捉剤(DMSO)を照射1時間前に処理し、照射後にトラックサイズを定量すると、トラックサイズが小さくなる傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：I tried that we clarified the relationship between the track structure of the particle and the biological effects. I visualized the truck structure of the particle using a biomarker. After 30 minutes of irradiation, track size (area) did not change even when LET values increased, but it was found that the track size due to the high-LET particle beam was clearly larger than the other low-LET particles 24 hours after the irradiation. Furthermore, when the OH radical scavenger (DMSO) was treated one hour before irradiation and the track size was quantified after irradiation, the track size tended to decrease due to 1M DMSO addition. These results showed that the increase of the biological effect accompanying the increase of LET does not depend on the size of the particle track. In addition, the involvement of OH radicals was revealed in DSB formation on a surrounding a particle track.

研究分野：粒子線治療生物学

キーワード：粒子線 飛跡構造 OHラジカル DNA損傷

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は非常に重要であり、光子放射線に比べ粒子放射線である炭素線は明らかに大きい生物効果を示し、放射線抵抗性腫瘍に対して有効な放射線の1つである。粒子放射線では光子放射線に比べ、大きいRBE値や小さいOER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させることがわかっている。さらに炭素線のような高LET(線エネルギー付与)放射線は、直接作用や間接作用が粒子線トラック付近で密に発生し、その近傍にあるDNAなどの生体標的と相互作用を起こす。その結果、生じたDNA損傷は光子放射線に比べ修復困難な損傷である。

このように光子放射線と比べ、粒子線特異的な生物応答を放射線の初期作用やDNA損傷修復の観点から検証を行ってきたが、粒子線トラック構造と生物効果の関連性についてはまだいくつかの未解明な点があり、物理的な粒子線トラック構造と粒子線と生体の相互作用を化学的、生化学的ならびに生物学的過程にもとづいて理解することが、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る。

2. 研究の目的

本研究は粒子線の飛跡構造(トラック構造)と生物効果の関係を明らかにする。DNA損傷修復関連因子を用いて粒子線のトラック構造を生物学的に可視化し、放射線誘発フリーラジカルの影響やトラック構造の数理モデルを組み合わせることにより、放射線物理学、化学ならびに生物学の3要素を含めた粒子線トラック構造とその生物効果に関する知見を取得し、粒子線特異的な生物応答の機構解明を行った。

まずは複数のDNA損傷修復関連因子マーカーを用いた、粒子線トラック構造の生物学的可視化を試みた。次に粒子線のLETの違いによる生物学的トラック構造変化の可視化を行い、線質の影響を明らかにした。ラジカル捕捉剤を用いた生物学的トラック構造変化の可視化を行い、OHラジカルのDNA損傷生成への寄与さらに空間分布を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA二本鎖切断の空間分布解析:

すでに予備実験で用いているヒト正常細胞をG0/G1に同調し、DNA二本鎖切断部位を反映しているH2AXのリン酸化領域を測定し、DNA二本鎖切断の粒子線トラックの広がり調べた。粒子線は、核破砕による二次粒子

の混入を避けるため、量子科学技術研究開発機構にあるイオン照射研究施設(TIARA)から供給される低エネルギー炭素イオンビーム(18.3 MeV/n: ~420 keV/μm)を用いて照射実験を行った。線量は1細胞あたりに1粒子がヒットするように調整した(~1 Gy)。さらにH2AXのリン酸化領域は照射後の時間によって、変化することが知られているため、照射後30分と損傷修復が終わっている24時間の蛍光領域を測定した。

(2) 粒子線トラック構造のLET依存性:

同一粒子種におけるLET依存的な粒子線トラックサイズを計測し、粒子線トラック構造のLET依存性を明らかにした。TIARAから供給される炭素イオンビーム(18.3 MeV/n)を用いて、細胞サンプル直前にニッケル箔を置き、炭素イオンビームのエネルギーを減速させ、細胞表面でのLET値を100, 200 and 420 keV/μmに合わせ、H2AXのリン酸化の蛍光領域を測定した。また、照射後の細胞固定までの時間を変えることにより、蛍光領域の時間依存性についても調べた。

(3) 粒子線トラック構造とOHラジカルによる損傷分布への影響:

OHラジカル捕捉剤であるDimethyl sulfoxide(DMSO)を用いて、粒子線誘発OHラジカルのDNA損傷生成を抑え、OHラジカルによるH2AXのリン酸化の蛍光領域を測定し、粒子線トラック構造とOHラジカルによるDNA損傷への寄与と空間分布への影響を調べた。予備実験により細胞毒性のない1 M DMSOを照射30分前に処理し、DMSO依存的な蛍光領域の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) DNA損傷修復関連因子マーカーを用いた、粒子線トラック構造の生物学的可視化:

粒子線トラックの可視化にはDNA二本鎖切断(DSB)のバイオマーカーであるH2AXのリン酸化を指標に、トラックの細胞核を通過した際に生成したDSB領域を可視化し、その傾向分布をイメージソフトで解析し、H2AXのリン酸化領域を定量することに成功した。

(2) 線質(LET)の違いによる生物学的トラック構造変化の可視化:

炭素イオン線を用いて、LET依存的にH2AXのリン酸化による生物学的トラック領域の定量評価を行った。照射30分後にトラックの可視化を行った結果、LETが増加しても統計的にトラックサイズ(面積)は変化が無かったが、LETが420keV/umでは、照射24時間後のトラックサイズはLETが100, 200 keV/umよりも明らかに大きく、生成したDSBの質の違いが明らかになった。

(3) ラジカル捕捉剤を用いた生物学的トラック構造変化の可視化:

OH ラジカル捕捉剤 (DMSO) を照射 1 時間前に処理し、照射後にトラックサイズを定量したが、DMSO を添加した細胞でのトラックサイズは、小さくなる傾向を示した。

これらの成果をまとめると、LET 増加に伴う生物効果の増大は、単純にトラックサイズの大きさに依存せず、トラック近傍にできた DSB の質が強く関わっていることが明らかになった。また、その DSB 生成には、OH ラジカルの関与が明らかになった。

<引用文献>

Ryoichi Hirayama, Atsushi Ito, Masanori Tomita, Teruyo Tsukada, Fumio Yatagai, Miho Noguchi, Yoshitaka Matsumoto, Yuki Kase, Koichi Ando, Ryuichi Okayasu, Yoshiya Furusawa: Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High LET Radiations. Radiation Research, 171, 2009, 212-218

Atsushi Ito, Hisako Nakano, Yohsuke Kusano, Ryoichi Hirayama, Yoshiya Furusawa, Chieko Murayama, Tomoyuki Mori, Yosuke Katsumura, Kunio Shinohara: Contribution of Indirect Action to Radiation Induced Mammalian Cell Inactivation: Dependence on Photon Energy and Heavy ion LET. Radiation Research, 165, 2006, 703-712

Nakako Izumi Nakajima, Holly Brunton, Ritsuko Watanabe, Amruta Shrikhande, Ryoichi Hirayama, Naruhiro Matsufuji, Akira Fujimori, Takeshi Murakami, Ryuichi Okayasu, Penny Jeggo, Atsushi Shibata: Visualisation of γ H2AX foci caused by heavy ion particle traversal; Distinction between core track versus non-track damage. PLOS ONE. 8, 2013, e70107

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)

[学会発表](計 9 件)

平山亮一、小原麻希、鶴澤玲子、松本孔貴、伊藤敦、古澤佳也、長谷川純崇: 放射線感受性の異なる培養細胞における細胞致死と間接作用の寄与率、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016.10.27、JMS 明アステールプラザ (広島県・広島市)

Ryoichi Hirayama, Maki Obara, Akiko Uzawa, Yoshitaka Matsumoto, Atsushi Ito, Yoshiya Furusawa, Sumitaka Hasegawa: Contributions of indirect action to low and high LET

radiation-induced cell killing in CHO wild-type and DNA repair mutants. The 43rd Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 2016.09.06, Amsterdam (Netherlands)

平山亮一、小原麻希、鶴澤玲子、松本孔貴、伊藤敦、古澤佳也、長谷川純崇: 細胞致死に対する放射線の直接・間接作用の寄与率は DNA 損傷修復能に依存する、第 54 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、2016.07.16、I-site なんば (大阪府・大阪市)

平山亮一: 光子ならびに粒子放射線が及ぼす生体応答と酸素効果、平成 27 年度放射線影響研究奨励賞受賞講演、2016.04.28、山の上ホテル (東京都・千代田区) (招待講演)

平山亮一: X 線と重粒子線によって生じるラジカルと生物効果、北里大学がんプロフェッショナル養成基盤推進プランセミナー放射線生物セミナー、2016.03.18、北里大学 (神奈川県・相模原市) (招待講演)

平山亮一、小原麻希、鶴澤玲子: 放射線の直接作用や間接作用も生物学的効果比(RBE)の大きさに影響を与える、日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ、2015.10.16、富山大学 (富山県・富山市)

Ryoichi Hirayama, Yoshitaka Matsumoto, Akiko Uzawa, Maki Obara, Atsushi Ito, Toshiyuki Shirai, Yoshiya Furusawa: The Mechanisms of Large RBE and Small OER in Cell Killing by High-LET Particles under Oxidic and Hypoxic Conditions. The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015)、2015.05.28、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

Ryoichi Hirayama, Akiko Uzawa, Maki Obara, Nobuhiro Takase, Kana Koda, Masakuni Ozaki, Yoshitaka Matsumoto, Toshiyuki Shirai, Yoshiya Furusawa: THE HIGH BIOLOGICAL EFFECTS OF CARBON-ION BEAMS FOR CELL KILLING AND MICRONUCLEUS FORMATION. International Conference on Radiation Biology (ICRB2014). 2014.11.11, Delhi (India)

平山亮一、松本孔貴、鶴澤玲子、小原麻希、野口実穂、伊藤敦、岡安隆一、白井敏之、古澤佳也: 放射線の直接作用による細胞致死も酸素によって増感される、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014.10.02、かごしま県民交流センター (鹿児島・鹿児島市)

[図書](計 2 件)

大西武雄 他、医療科学社、放射線医科学 - 生体と放射線・電磁波・超音波 -、

2016、11-13

窪田宜夫 平山亮一 他、医療科学社、
新版 放射線生物学、2015、3-13

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平山 亮一 (Ryoichi HIRAYAMA)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発
機構・放射線医学総合研究所 放射線障害
治療研究部・主任研究員

研究者番号：90435701