

細胞質の放射線応答が細胞の放射線感受性に与える影響とそのメカニズム

前田宗利¹, 前田未佳¹, 宇佐美德子², 富田雅典³

¹(公財)若狭湾エネルギー研究センター, ²(共)高エネルギー加速器研究機構, ³(一財)電力中央研究所

Impact of cytoplasmic radiation responses on cellular radiosensitivity and its mechanism

Munetoshi MAEDA¹, Mika MAEDA¹, Noriko USAMI², Masanori TOMITA³

¹The Wakasa Wan Energy Research Center, ²High Energy Accelerator Research Organization,

³Central Research Institute of Electric Power Industry

Abstract

本研究では、ビームサイズ可変(5×5 μm以上)の放射光X線マイクロビームによって細胞全体、細胞核、細胞質を照射する細胞局所照射技術を開発し、細胞中の照射領域に応じて細胞の運命が決定される仕組みを解析した。これまで、放射線の生物影響を考える上では細胞核の応答が重要視されてきたが、被ばく線量が少ない場合には細胞質の応答も細胞の運命決定に大きく関与し、細胞質への照射の有無によって生と死の競合が生じることが示された。

1. はじめに

医学利用に代表されるように、放射線利用技術は現代の社会生活を営む上で必要不可欠な社会基盤の一つといえる。また、地球温暖化対策や持続可能な開発目標(SDGs)においても原子力発電の重要性が再認識されつつある。加えて、私たちは常に自然環境からの微量の放射線にさらされており、生命はこのような低線量放射線の存在下で誕生し、維持され、あるいは進化してきた。これらの背景から、放射線の健康影響に関する正しい理解の社会的重要性は益々高まっており、そのリスクを科学的知見に基づいた論理的な考察によって推定することは放射線影響研究における重要な課題の一つとなっている。

すべての生命はその基本構成単位、すなわち、自身で増殖可能な最小単位である細胞で構成されており、例えばヒトは約37兆個の細胞によって形成された多細胞生物である。生体が低線量の放射線にさらされた場合、そのエネルギーは荷電粒子によって離散的に与えられるため、放射線のエネルギーを全く受け取らない多数の細胞の中で極少数の細胞にのみエネルギーが与えられるという状況が生じる。この時、エネルギーが与えられた細胞に目を向けると、1個の細胞の中でもエネルギーを受け取った領域と受け取っていない領域が混在する場合も生じる。このように、低線量域では被ばくした細胞集団や細胞内のエネルギーの受け取り方が均一ではないため、細胞集団の生物応答を観察してもメカニズムに関する情報は殆ど得られない。このため、広い放射線場(ブロードビーム)で細胞集団を均一に照射して平均値としての生物応答を観察する従来の手法では低線量放射線の生物影響を詳しく解析することは難しい。そこで、細胞集団中の特定細胞を狙い撃ち

し、被ばくした細胞と被ばくしていない細胞とを区別して追跡、観察することのできるマイクロビームを用いた細胞照射技術が開発された。我々は、放射光X線の指向性の高さを利用し、細胞核のみ、細胞質のみ、あるいは細胞全体をX線マイクロビームによって照射することのできる細胞局所マイクロビーム照射技術(Fig. 1a)を世界で初めて確立し[1, 2]、細胞内の照射領域と細胞の生死(放射線感受性)の関係について評価してきた。

本稿では、大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光実験施設(Photon Factory) BL-27B に設置されている放射光X線マイクロビーム細胞照射装置(Fig. 1b)を用いて実施した研究の成果を概説し、細胞内の被ばく領域に着目した低線量域における細胞の放射線応答を俯瞰する。

2. 放射光X線マイクロビーム細胞照射装置を用いた細胞局所照射

一連の研究に用いた放射光X線マイクロビーム細胞照射装置では、精密なスリットシステムによって5.35 keVのX線を切り出すことで、最小5×5 μmから任意のサイズのビームを細胞に照射することができる。照射標的である細胞あるいは細胞の一部に対して一様にX線を照射するためには、厚みが6~25 μm程度の細胞を透過するエネルギーのX線を用いる必要がある。一方で、軟X線を照射された物質からは光電効果によって電子が放出され、放射線のエネルギーの大部分は放出された二次電子によって物質中に与えられる。エネルギーを付与する領域を細胞や細胞内の一部に限定するためには、光電子の飛程が短いエネルギーのX線を用いる必要がある。5.35 keVのX線の軟組織内

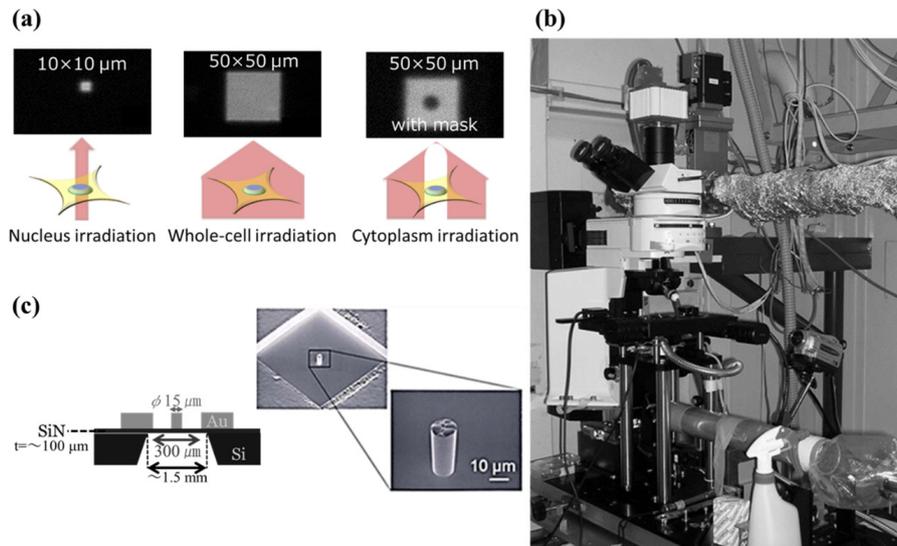


Figure 1 A method for localized cell irradiation using synchrotron radiation X-ray microbeams. (a) Shape of the X-ray beams for nucleus, whole-cell, and cytoplasm irradiation and schema of each type of irradiation. The shape of X-ray beams was visualized with a scintillator. (b) Synchrotron radiation X-ray microbeam cell irradiation system installed in beamline 27B (BL-27B) at Photon Factory, KEK. (c) Cross-sectional illustration of a custom-designed X-ray mask and scanned electron microscopy analysis showing the gold post at the center of the X-ray mask responsible for shielding the nucleus from X-ray microbeams.

の透過距離 ($1 e^{-1}$) は $290 \mu\text{m}$, 光電子の水中飛程は $0.78 \mu\text{m}$ であり, 細胞内の微小領域に限定して X 線のエネルギーを与える目的に合致している。また, 我々は, 細胞質への照射によって誘導される現象を検証するために, 培養細胞の細胞核の大きさに対応する直径の金の円柱 (直径 $15 \mu\text{m}$, 厚さ $20 \mu\text{m}$) を薄い窒化シリコン基板上に形成した特殊な X 線マスク (Fig. 1c) を用いて細胞核に相当する領域を遮蔽する照射手法を開発した [2]。5.35 keV の X 線は, この窒化シリコン基板を 99% 以上透過する。一方で, 金の円柱により遮蔽された領域では透過する X 線は 0.1% 未満となる。放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置への X 線マスクを組み込むことで, 任意のビーム内に X 線非透過領域を作り, 標的細胞の細胞核をこの領域に合わせて照射すること, 即ち, 細胞質照射が可能になった。このような照射手法は世界に類を見ず, 細胞の局所にのみ放射線のエネルギーが与えられた場合の細胞の応答を詳しく検証することがはじめて可能になった。

3. 細胞内の照射領域と細胞の放射線感受性

生命の本質である自己複製を阻害する細胞死は, 最も基本的かつ重要な放射線の生物影響である。1 個の細胞が増殖することによって形成されるコロニーを観察して細胞の生死を判別するコロニー形成法が確立され [3], 放射線にさらされた培養細胞の放射線感受性を定量的に解析することが可能となった。照射した細胞の生存率は, 非照射細胞のコロニー形成効率に対する照射された細胞のコロニー形成効率の割合で表わされる。本研究では, 一定時間培養してから全ての単独細胞に由来するコロニー像を撮影して形成された微小コロニー内の細胞数 (分裂数) を指標に細胞の生死を判定するマイクロコロニー法を確立し [4], X

線マイクロビームを照射した個々の細胞の生死を判定して放射線感受性を評価した。チャイニーズハムスター肺由来の V79 細胞の細胞全体, 細胞核, 細胞質をそれぞれ $50 \times 50 \mu\text{m}$, $10 \times 10 \mu\text{m}$, X 線マスクを併用した $50 \times 50 \mu\text{m}$ のビームで照射して求めた生存率を Fig. 2 に示した [2, 4, 5]。これまで, 放射線被ばくによる細胞死は, 主に細胞核内

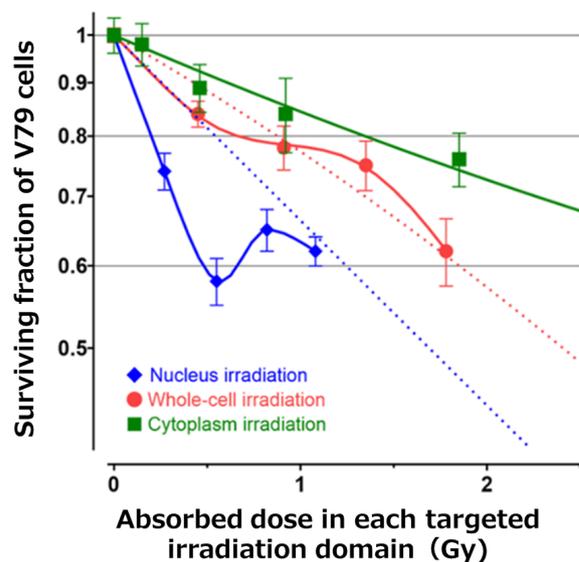


Figure 2 Surviving fraction of V79 cells irradiated with differently sized synchrotron radiation X-ray microbeams. Surviving fractions of V79 cells irradiated with a $10 \times 10 \mu\text{m}$ (◆; nucleus irradiation), a $50 \times 50 \mu\text{m}$ (●; whole-cell irradiation), and a $50 \times 50 \mu\text{m}$ X-ray beam with the X-ray mask (■; cytoplasm irradiation) were plotted as a function of the absorbed dose in each targeted irradiation domain [2, 4, 5]. Dotted lines show the linear-quadratic fitting based on data for higher radiation doses.

に生じた DNA 損傷，なかでも修復が困難な DNA 二本鎖切断 (DSB) に起因すると考えられてきた。細胞核に同質かつ同量の放射線のエネルギーが与えられた場合，細胞核だけに照射しても細胞全体に照射しても細胞核内に生じる DNA 損傷の質や量に大きな違いは生じないため，両者は同程度の放射線感受性を示すと予測された。しかしながら，細胞核に与えられた線量をそろえて比較すると，細胞核だけに X 線を照射した場合よりも細胞全体に X 線を照射した場合に，細胞に与えられたエネルギーの総量は多くなるにもかかわらず細胞死の誘導頻度が顕著に低下した [2, 4, 5]。一方，細胞質のみに X 線を照射した場合，細胞核や細胞全体へ X 線を照射した場合と比べて細胞死の誘発頻度は遙かに低いものの，線量の増加と共に直線的に細胞死が増大した [2]。一般的に，X 線照射による細胞核内の DNA 損傷に起因した細胞死の場合，修復される DNA 損傷を反映して線量-生存率応答 (生存率曲線) は肩をもった線形-二次曲線を示すことが知られている。したがって，細胞質への照射に由来する細胞死は DNA 損傷とは異なり回復応答の存在しない線量依存的に増大する因子によって誘導されると考えられる。この因子はまだ明らかになっていないが，細胞質への活性酸素種の蓄積に由来する酸化ストレスや放射線によるミトコンドリアの損傷が関与していると考えられる [2]。一連の研究から，細胞核と細胞質の両方が X 線にさらされた場合に細胞の放射線抵抗性を高める仕組みが存在することが明らかになった。

4. 細胞内の照射領域と DNA 損傷修復機構の活性化

細胞核と細胞質は緊密に連携して生理作用を営んでおり，細胞質への照射によって誘導される応答が細胞の放射線感受性を変化させると考えられる。スリットで切り出した放射光単色 X 線を用いているため，本研究に用いたマイクロビームの線質はビームサイズによって変化しない。DNA 損傷は，放射線と生体構成分子との物理化学的相互作用に起因して生じるため，細胞核に与えられた線量が等しければ細胞質への照射の有無による違いは生じない。そこで，DNA 損傷が生じた後に誘導される生物学的プロセスである DNA 損傷修復に細胞質への X 線照射の有無が与える影響を検証した。DNA はヒストンタンパク質に巻き

ついてヌクレオソームを形成し，対になって線維状に圧縮された構造 (クロマチン構造) をとっている。細胞死に繋がる可能性の高い DNA 損傷である DSB が生じると，その周辺の数百から数千のヒストン H2AX (ヌクレオソームを構成するコアヒストンの一つである H2A のバリエーション) がリン酸化されて集積する [6]。リン酸化ヒストン H2AX は， γ -H2AX の呼称で広く知られている。DNA 損傷の修復に関係する多くのタンパク質がこの γ -H2AX と相互作用することで損傷部位に集積して DSB 修復が行われる。免疫蛍光抗体法を用いると γ -H2AX の集積部位 (フォーカス) を検出できるため，DSB 修復の誘導を確認するための指標 (マーカー) として使うことができる。V79 細胞の細胞集団に対して $130 \times 130 \mu\text{m}$ の X 線ビームを用いてビーム内に存在する細胞群の全体，即ち，細胞核と細胞質の双方を $1 \sim 10 \text{ Gy}$ で照射した。また， $10 \times 10 \mu\text{m}$ の X 線ビームを用いて細胞集団中の $5 \sim 6$ 細胞の細胞核のみを $1 \sim 10 \text{ Gy}$ で照射した。照射後 30 分間培養し，蛍光抗体法を用いて DNA 損傷修復の初期に誘導される γ -H2AX のフォーカス形成を可視化して定量解析を行った。その結果，Fig. 3 に示したように，細胞全体に X 線を照射した場合には 1 Gy で照射した場合からフォーカス形成が誘導されるのに対し，細胞核のみに X 線を照射した場合には 2 Gy 以下では有意なフォーカス形成は誘導されず，細胞質に X 線が照射されている場合，X 線が照射されていない場合と比べてより低線量域から H2AX のリン酸化が誘導されることが明らかになった [2]。したがって，被ばく線量が少ない場合，核の中に生じた DSB の質や量が等しいにもかかわらず，細胞質が X 線にさらされていない場合には DSB を修復する仕組みが十分に活性化されないことが明らかになった。なお，同様の結果がヒト肺由来の正常細胞である WI-38 細胞においても確認されたことから，この応答はほ乳類細胞に普遍的な応答である可能性が高い [2]。

5. 細胞質の放射線応答による放射線感受性変化のメカニズム

細胞質に X 線が照射されている場合，細胞質に X 線が照射されていない場合よりも低い線量から DSB 修復系が活性化されると共に細胞死の抑制が観察されたことから，細

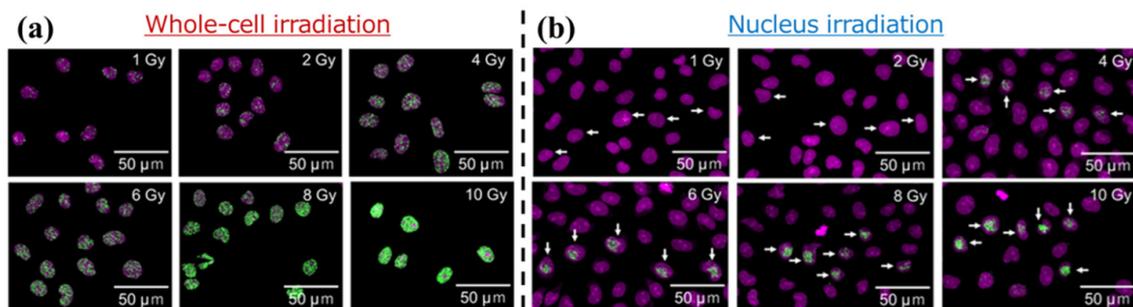


Figure 3 Accumulation of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) foci in V79 cells after 30 min of nucleus or whole-cell irradiation. γ -H2AX foci formation following the irradiation of V79 whole cells (a) or V79 nuclei (b) [2]. White arrows in right panel identify irradiated cells. Propidium iodide staining and γ -H2AX foci in the captured images are presented as magenta and green signals, respectively.

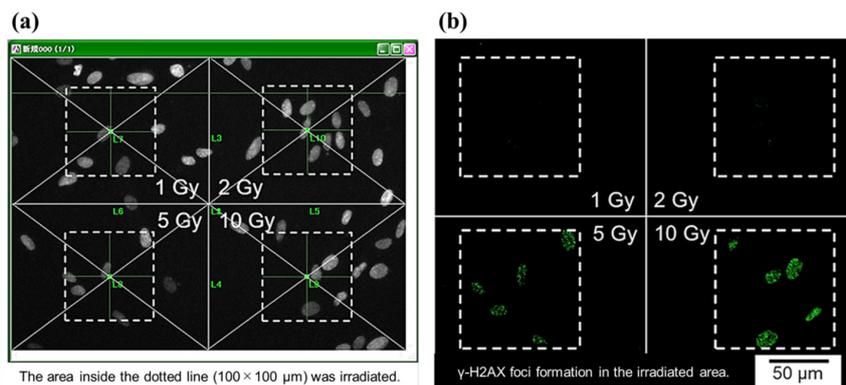


Figure 4 Accumulation of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) foci in whole-cell-irradiated WI-38 cells in the presence of an ATM inhibitor following 30 min irradiation. An acquired image frame was divided into four, with WI-38 cells existing at the center of each area irradiated with $100 \times 100 \mu\text{m}$ beams of 1, 2, 5, or 10-Gy (a), and γ -H2AX foci formation at the irradiated sites (b) [2]. γ -H2AX foci formations in the captured images are presented as green signals. White dotted squares represent the $100 \times 100 \mu\text{m}$ beam. The X-ray doses deposited in each area are shown in each panel.

胞質の放射線応答によって DNA 修復応答を修飾して放射線抵抗性を誘導するメカニズムが存在することが示唆された。そこで、細胞質への X 線照射の有無により、ヒトの正常細胞 (WI-38) において DSB 修復応答に関する既知の 84 遺伝子にどのような変化が生じるか検証した。細胞質に X 線が照射されていない細胞核照射では細胞死の誘導に関する 3 遺伝子 (*ABL1*, *CDC25C*, *TP73*) の発現が、細胞質にも X 線が照射されている細胞全体照射では DSB 修復に関連して細胞周期の進行を停止させる遺伝子 (*CDKN1A*) の発現が、それぞれ顕著に亢進した [2]。これら 4 遺伝子の発現は、いずれもヒト毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia) の原因遺伝子産物である ATM (ataxia telangiectasia mutated) によって調整されていることから、細胞質への X 線照射の有無によって ATM の働きが大きく変化すると考えられる。ATM は DSB 修復の初期過程のマーカーとして用いた H2AX のリン酸化にも関与している [7, 8]。そこで、ATM が DSB 修復に与える影響を検証した。細胞全体に X 線を照射すると低い線量で照射

した場合にも γ -H2AX フォーカスが形成された (Fig. 3) が、Fig. 4 に示したように ATM の特異的阻害剤を添加した場合には細胞全体に X 線を照射しても、細胞核だけを X 線で照射した場合と同様に 2 Gy 以下ではフォーカスが形成されなかった [2]。したがって、細胞の被ばく線量が少ない場合には細胞内の ATM の状態に応じて DNA 損傷を修復する能力が変化すると考えられる。また、被ばく線量が多くなると ATM の状態とは関係無く、DNA 損傷を修復する機能が働くことも明らかになった。

Fig. 5 に一連の研究成果から考えられる細胞質への X 線照射の有無による細胞の放射線感受性変化のメカニズムをまとめた。細胞核照射では内在性 ATM (定常状態において細胞核中に存在する一定量の ATM) を介した *ABL1*, *CDC25C*, *TP73* の活性化によって細胞死が誘導される一方で、細胞核に加えて細胞質も照射される細胞全体照射では細胞質からの ATM の核内移行 (ATM nucleo-shuttling [9]) によって細胞周期の進行を停止するために十分な量の ATM が供給されるために DNA 損傷修復が亢進して放

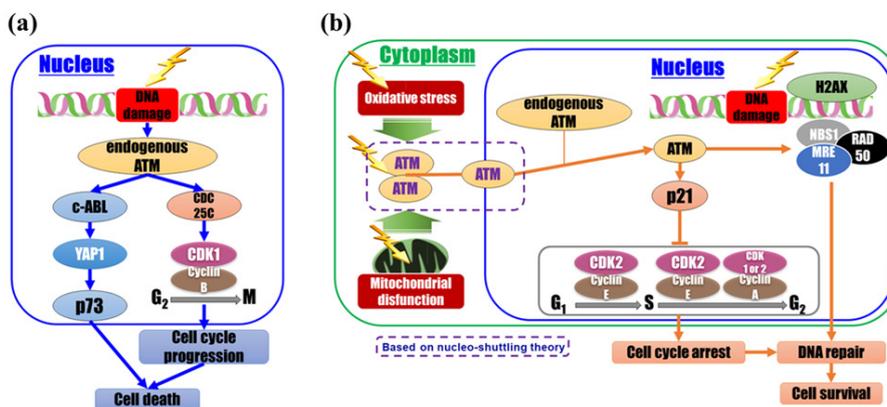


Figure 5 Schematic illustration of the possible cell death-related mechanisms involving cellular signal transduction under exposure to low-dose X-rays. Cell death-related possible mechanisms in nucleus (a) and whole-cell (b) irradiation with low dose X-ray microbeams [2]. Although functions of the molecules indicated in white color font in the pathway and nucleo-shuttling of ATM were not directly confirmed in this study, they are shown based on the knowledge reported thus far, as described in the discussion.

放射線抵抗性が増大すると考えられる [2]。低線量放射線にさらされた細胞では、細胞核に由来する細胞死誘導機構と細胞質に由来する放射線抵抗性誘導機構が競合しており、これらが ATM によって調節されていることが分かってきた。

6. おわりに

放射線の生物影響は、主に重篤な放射線損傷の一つである DSB に起因すると考えられてきた。また、被ばくした細胞では DSB を修復するための仕組みが被ばくの直後から活性化することや、放射線感受性疾患の原因遺伝子の多くが DSB 修復関連遺伝子であることから、細胞質の役割は重要視されてこなかった。マイクロビームによる細胞局所照射技術を活用した一連の研究から、細胞質への照射の有無が、ATM を介した DNA 損傷応答や細胞周期制御などを大きく修飾することが明らかとなった。ATM は従来考えられてきた以上に複雑な細胞応答の調整機構として働いており、生体内情報伝達ネットワークのいわばハブのような働きをしているのかもしれない。今後、さらに詳しく研究を進めてその機能を明らかにしていきたい。

7. 謝辞

本研究は、PF-PAC 課題番号 2008G624, 2010G040, 2017R-27 の下で実施した。本稿で紹介した内容には、(公財)放射線影響協会研究奨励助成(平成 22 年度)、科学研究費助成事業(23710076)、(公財)若狭湾エネルギー研究センターと(一財)電力中央研究所との共同研究による成果の一部を含む。本研究の推進にあたり、(共)高エネルギー加速器研究機構を退官された小林克己先生、(国研)量子科学技術研究開発機構の平山亮一先生、福井大学の松本英樹先生をはじめとする多くの方々には様々なご助言、ご協力を頂いた。関係諸氏に深く御礼申し上げる。

引用文献

- [1] K. Kobayashi, N. Usami, H. Maezawa, T. Hayashi, K. Hieda, and K. Takakura, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2**, 116 (2006).
 - [2] M. Maeda, M. Tomita, M. Maeda, H. Matsumoto, N. Usami, K. Kume, and K. Kobayashi, *Sci. Rep.* **11**, 13113 (2021).
 - [3] T. T. Puck, and P. I. Marcus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**, 432 (1955).
 - [4] M. Maeda, N. Usami, and K. Kobayashi, *J. Radiat. Res.* **49**, 171 (2008).
 - [5] M. Maeda, N. Usami, and K. Kobayashi, *Radiat. Res.* **166**, 679 (2006).
 - [6] L. J. Kuo, and L. X. Yang, *In Vivo*. **22**, 305 (2008).
 - [7] T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Löbrich, and P. A. Jeggo, *Cancer Res.* **64**, 2390 (2004).
 - [8] Y. Shiloh, and Y. Ziv, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 197 (2013).
 - [9] L. Bodgi, and N. Foray, *Int. J. Radiat. Biol.* **92**, 117 (2016).
- (原稿受付日: 2022 年 3 月 17 日)

著者紹介

前田宗利 Munetoshi MAEDA



公益財団法人若狭湾エネルギー研究センター 研究開発部 粒子線医療研究室 主任研究員

〒914-0192 福井県敦賀市長谷 64 号 52 番地 1

e-mail: mmaeda@werc.or.jp

略歴: 2006 年総合研究大学院大学高エネルギー加速器科学研究科博士課程修了,

2006 年高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所研究員, 2008 年(一財)電力中央研究所特別契約研究員, 2012 年(公財)若狭湾エネルギー研究センター研究開発部着任, 主査研究員を経て 2018 年より現職。博士(理学)。最近の研究: マイクロビームを利用した細胞局所の放射線応答解明, 異種放射線や薬剤の併用による集学的治療を活用した陽子線がん治療の高度化。

前田未佳 Mika MAEDA



公益財団法人若狭湾エネルギー研究センター 研究開発部 粒子線医療研究室 協力研究員

〒914-0192 福井県敦賀市長谷 64 号 52 番地 1

e-mail: mimaeda@werc.or.jp

略歴: 2006 年総合研究大学院大学生命科学研究科博士課程修了, 2006 年自然

科学研究機構基礎生物学研究所博士研究員, 2007 年甲南大学理工学部生物学科特別研究員, ライフイベントを経て 2018 年(公財)若狭湾エネルギー研究センター研究開発部スタッフ, 2019 年より現職。博士(理学)。

最近の研究: 集学的治療を活用した陽子線がん治療の高度化に掛かる分子生物学的課題の解決。

宇佐美徳子 Noriko USAMI

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光実験施設 講師

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

e-mail: noriko.usami@kek.jp

富田雅典 Masanori TOMITA



一般財団法人電力中央研究所 サステナブルシステム研究本部 生物・環境化学研究部門 研究推進マネージャー

〒201-3511 東京都狹江市岩戸北 2-11-1

e-mail: mstomita@criepi.denken.or.jp

略歴: 2002 年東京大学大学院医学系研究科医学博士課程修了, 2002 年理化学

研究所協力研究員, 2005 年(一財)電力中央研究所特別契約研究員, 2008 年同主任研究員, 2015 年同上席研究員, 2021 年 7 月より現職。博士(医学)。

最近の研究: 低線量率放射線による DNA 損傷の修復機構解明, 放射線感受性個人差の評価。