

放射線生体影響のメカニズム解明に向けた放射光利用研究

横谷明德^{1,2)}、神長輝一^{2,1)}、渡辺立子¹⁾、服部佑哉³⁾、福永久典^{4,5)}、鈴木啓司⁶⁾、
泉雄大⁷⁾、藤井健太郎¹⁾、

1) 量子科学技術研究開発機構 東海量子ビーム応用研究センター、

2) 茨城大学大学院 理工学研究科、3) 東京工業大学 工学部、

4) Centre for Cancer Research & Cell Biology, Queen's University Belfast, UK、

5) 東北大学 加齢医学研究所、6) 長崎大学 原爆後障害医療研究所、

7) 広島大学 放射光科学研究センター

【背景】低線量の放射線による健康への影響は、福島における原子力災害の発生直後から最も懸念され、5年を経過した現在においても一部地域の住民の帰還を妨げているばかりか、風評被害は依然として福島の農水産業に深刻なダメージを与え続けている。広島・長崎の被ばく者の疫学データから、積算される線量が100mSv以下であれば発がんによる死亡率の明確な上昇は見られないことは、国際放射線防護委員会（ICRP）をはじめとする国内・外の研究機関の共通の見解であり、これを基準として住民の帰還や廃炉に向けた作業員の放射線管理が行われている。一方、最近のゲノム情報に基づく生命科学の急速な進展に伴い、個々人の遺伝的バックグラウンドの違いが疾病の発症を大きく左右することが分かりつつある。100mSvという基準は、健康な人にとっては一つの基準となり得るが、通常よりも放射線感受性が高い人に対してこの基準が適切であるかどうかは議論の余地がある。例えば、DNA修復遺伝子は私たちが細胞内に両親から受け継いだ一对の染色体の両方にあり、放射線などにより一方に変異が生じても影響はないが、生まれつき一方に変異をもつ（ヘテロ接合体）人は、もう片方の正常な遺伝子が放射線により変異を受けるとDNA修復能が失われてしまうので、正常な人よりも高い確率で放射線障害を発症するリスクを有すると考えられる。一般にはヘテロ接合体保因者の割合は小さく、統計的な平均値の影に隠れ頭在化することはまれである。しかし、もし幼い子供が保因者である場合、長期にわたる低線量被ばくにより成人して行く過程でその子の健康に影響出る可能性は否定できず、福島における医療現場において最も懸念されている問題の一つである。DNA修復関連遺伝子について、過去の知見から推定したヘテロ接合体の頻度をTable 1に示した[1]。例えば、DNA損傷を検知し後続のDNA修復タンパク質の集積を促す機能を持つATMタンパク質をコードしている遺伝子であれば、福島県の人口201万5千人のうちの1%である約2万人がヘテロ接合体の保因者となる。

Table 1. Estimated prevalence of heterozygous carriers of DNA repair disorders

DNA repair gene	Responsible disease	Estimated prevalence
<i>ATM</i>	Ataxia telangiectasia	1 : 100
<i>WRN</i>	Werner syndrome	1 : 100
<i>FANCA, FANCC, FANCG</i>	Fanconi anemia	1 : 181 (in the US)
<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM</i>	Lynch syndrome	1 : 370 (or higher)
<i>BRCA1, BRCA2</i>	Hereditary breast ovarian cancer syndrome	1 : 400 – 800

このような状況を踏まえ、これまで用いられてきた実効線量に対して個人の遺伝的バックグラウンドまで考慮に入れた個人線量（Personalized dose）という新しい線量体系を構築す

る必要性がある[2]と同時に、疫学調査では解明しきれない放射線、特に低線量の生体影響のメカニズム研究を推進して行くことが重要である。その最重要なツールの一つはシンクロトン放射（以下、放射光）であり、もう一つがコンピュータを用いたシミュレーションである。本研究グループが行っている放射線影響のメカニズム研究を、以下に紹介する。

【低線量放射線の細胞に対するエネルギー付与特性】福島の前原第一原発の事故により福島に飛散した ^{137}Cs から発生する低線量の γ 線や電子線により、細胞内にどのようにエネルギー付与が行われるかを理解するため、モンテカルロ法による放射線のトラックシミュレーションが行われている[3]。その結果の一部を、Fig. 1 に示す。

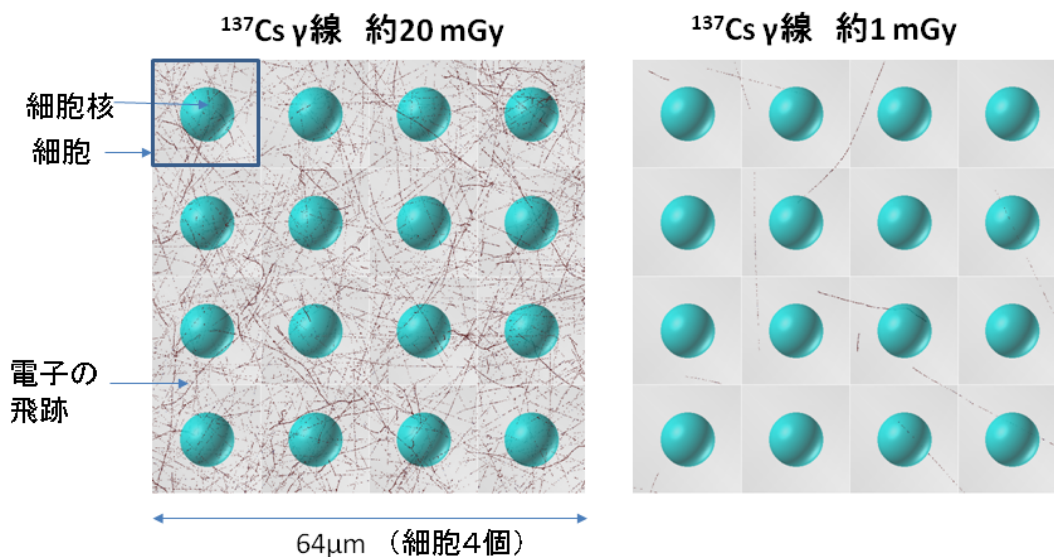


Fig. 1 ^{137}Cs γ 線により発生する2次電子の飛跡シミュレーション結果

線量が低くなるにつれ、放射線トラックが通過しない細胞が存在することが、低線量下の細胞集団環境の大きな特徴である。近年、非照射細胞であっても照射された細胞からシグナルを受け取ることで、染色体異常や細胞死などの影響が現れることが見いだされ[4]、いわゆるバイスタンダー効果として注目されている。バイスタンダー効果により、照射した線量から予測される以上、あるいは以下の生物影響が現れる可能性があるが、放射線防護の基準となるリスクの評価に取り入れるためには、さらにそのメカニズムの詳細を明らかにする必要があることがICRPにより報告されている[5]。バイスタンダー効果を研究するための強力なツールのひとつは特定細胞のみへのエネルギー付与を可能とするX線マイクロビームであり、PFのBL27においても研究が進められている[6, 7]。

最近私たちは、照射細胞と周囲の非照射細胞集団について、細胞周期の変調を明らかにするためのライブセル観察を行った。細胞周期に特異的な蛍光タンパク質を発現するヒトのFucci細胞(HeLa-Fucci)を用いて、細胞集団(コロニー)中の一部の細胞のみにX線マイクロビームを照射した後、数日間に渡りライブセル蛍光観察するための実験システムをPFのBL27Bに構築した。その時得られた、バイスタンダー細胞集団に現れる細胞周期変調の結果の一部を、Fig. 2 に示す[8]。照射されていない細胞であっても、細胞周期の遅延や停止や細胞死が観測され、バイスタンダー効果が誘発することを明らかにした。またこれらの細胞周期変調を受ける細胞は、娘細胞や従妹細胞など、近縁の細胞群に顕著に観測されることから、照射を受けた細胞中のDNAが修復された後であっても何らかの照射による“痕跡”が残り、

これが照射後時間経過した後も細胞周期変調を誘導していると推測された。

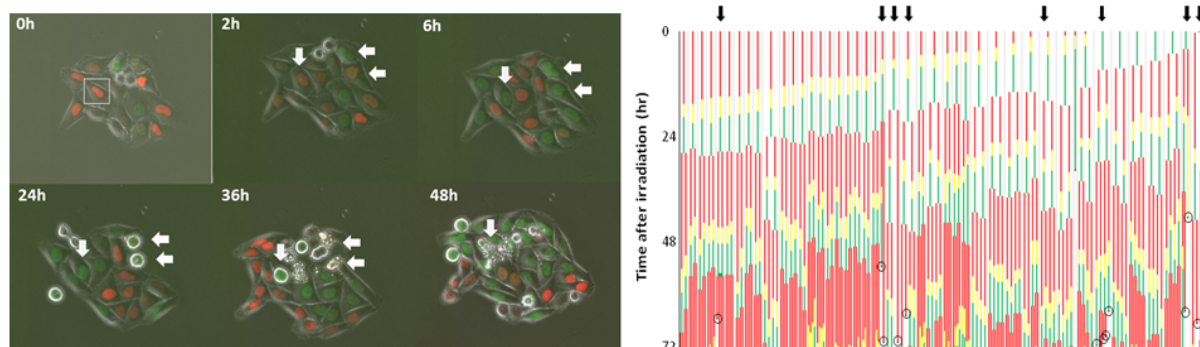


Fig. 2 X線マイクロビームを用いた特定細胞の照射とライブセル観察

左図： マイクロビーム照射後のライブセル観察により得られた細胞集団(コロニー)の写真。Fucci化したヒト細胞(HeLa)細胞を用いることで、G1期(赤)とS/G2期(緑)の細胞をそれぞれの蛍光により区別することが可能となる。写真では、G1期(赤い核)の細胞を一つだけ選んで(下向きの矢印)四角で囲んだ部分にマイクロビーム照射後、細胞集団の挙動をライブセル観察により48時間まで追跡した。矢印(左向)は、細胞死するバイスタンダー細胞を示す。

右図： さらに72時間までライブセル観察した時の、バイスタンダー細胞の細胞周期動態。赤、黄色、緑の棒線はそれぞれG1、S、G2期の長さを示す。グラフ中の○印は、細胞が細胞死が観察された時点を示す。

さらに、通常の単層培養した細胞集団をより実際の生体内の環境に近づけた上でマイクロビームを照射する試みもなされている。坂本等により、3次元培養したヒトがん細胞集団である HeLa 細胞 Spheroid に対して X 線マイクロビームを照射することに成功した(Fig. 3, [9])。今後は複数種類の細胞が混在する培養系である、細胞シートや乳腺組織に近い万モスフィアを標的としたマイクロビームの照射実験を実施する予定である。

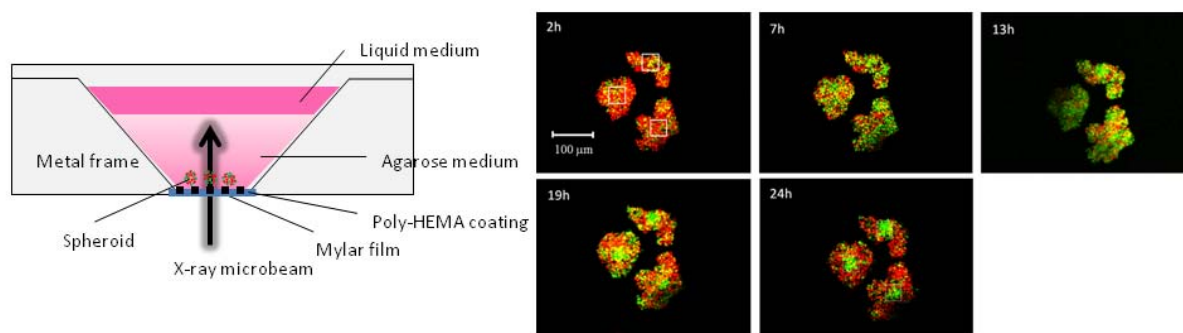


Fig. 3 三次元培養細胞集団(スフェロイド)に対するX線マイクロビーム照射とライブセル観察

左図： 照射試料セットアップの概念図。球状のスフェロイドが転がらないように、アガロースゲルで包埋し培養したものを照射試料とした。右図： スフェロイドに対して $40 \times 40 \mu\text{m}$ の矩形のX線マイクロビーム(27Gy)を照射し(四角で囲んだ領域)、一定時間毎に蛍光顕微鏡で撮影した写真画像。24h後には、照射エリアの細胞に顕著な細胞周期停止がG2期(緑)で起こっていることが分かる。

一方、細胞周期変調を計算機上でシミュレートするため、服部等はセルオートマトン法を用いて DNA 損傷を起点としバイスタンダーシグナルを交換し合う細胞集団のモデルを構築した (Fig. 4, [10])。放射線生物学では、非平衡系を扱うシステムバイオロジーの観点に立った理論研究の先駆けであり、今後バイスタンダー効果を含め様々な放射線低線量影響をシミ

ユレートするための基盤技術と期待される。特に、低線量の前照射により後の高線量照射に対する放射線耐性が獲得される現象である「放射線適応応答」は、低線量リスク評価においてバイスタンダー効果と共に重要な要因であることが ICRP により指摘されている[5]。本モデルで解析される放射線適応応答に関わる反応分子ネットワークを、放射光マイクロビームを用いた実験により検証することを予定している。

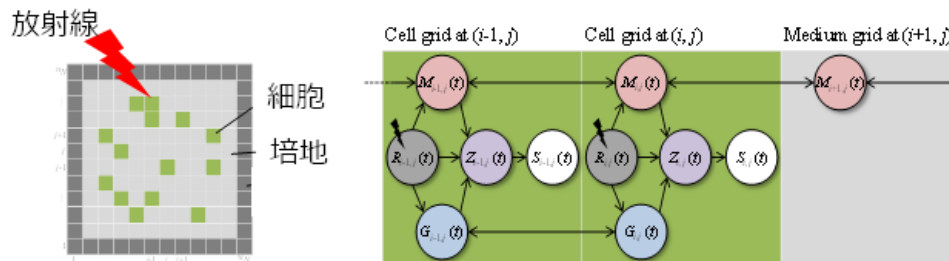


Fig. 4 照射細胞を含む細胞集団のバイスタンダー効果による細胞周期解析モデル

PF の BL27 の X 線マイクロビームは、スリットの形状を変えることで任意の形のビームにすることができる。このため細胞を特定するだけでなく、細胞内の一部に均一にビーム照射ができる、世界でも唯一の特徴を有する。現在、細胞質にあるミトコンドリアの機能変化に着目し、細胞質と細胞核それぞれにのみ照射した場合のミトコンドリアの ATP 産生活性の変化を調べている。その結果、細胞核に照射してから 48~72 時間の後には、顕著に ATP 産生が亢進したが、細胞質照射ではその亢進の程度は小さかった。細胞核中の DNA の損傷修復とその後のクロマチンの動態変化に多くのエネルギーが必要とされるためにミトコンドリア活性が高まるのに対し、細胞質に照射することでミトコンドリアが損傷し、ATP 産生が阻害される可能性が示唆された(Kaminaga et al. 投稿準備中)。

【DNA 修復とクロマチンのリモデリング】

放射線により損傷した DNA を修復するためには、まず染色体の構造が大きく変化する必要があることが指摘されている。上述したように、ATM タンパク質は広範囲に渡って DNA 損傷部位周囲のヒストンタンパク質をリン酸化することで後続の DNA 修復タンパク質の集積を促すが、リン酸化以外にもアセチル化など翻訳後 (epigenetic) 修飾と呼ばれる様々な化学修飾を受けることでヒストンとこれを含む染色体構造の動態が制御されていることが最近指摘されるようになった[11]。一方、放射光を用いたタンパク質の結晶構造解析技術とその応用が進んでいる今日であっても、多種の、また修飾部位も多岐に渡る DNA 修復タンパク質に関しては、化学修飾による構造変化は追跡し切れていない。細胞から抽出したタンパク質、特にヒストンなどの染色体を構成する因子や DNA 修復タンパク質の、翻訳後修飾による構造変化を迅速に見極めて行くことが重要な課題となりつつある。左右円偏光を用いた二色性スペクトル (CD) 測定は、原子の位置座標までは得られないものの、 α ヘリックスや β シートなどタンパク質の機能発現にとって重要な二次構造に関する情報を比較的簡便に与えてくれる分光手法として注目されている。泉らはフランス放射光施設 (SOLEIL) において、X 線を照射したヒト細胞 (HeLa) から抽出したヒストン H2A/H2B の真空紫外線 CD 測定を行った[12]。その結果、照射細胞から抽出したヒストンでは、 α ヘリックス構造の割合が明らかに増加し、またギブスエネルギーの変化が非照射細胞から抽出したヒストンに比べ小さく

なることが明らかになった。さらに最近、広島大学放射光施設（HiSOR）において照射細胞から抽出したヒストン H3/H4 についても同様な CD 測定を実施したところ、これらの中の α ヘリックス構造の割合は逆に小さくなることが分かった[13]。DNA 修復に先駆け、ヒストンコアを構成するタンパク質の構造が、ダイナミカルに変化していることをこれらの結果は示唆している。DNA の再結合修復を行うタンパク質の一つである、XRCC4 タンパク質についても、リン酸化による構造変化を調べる予定である。

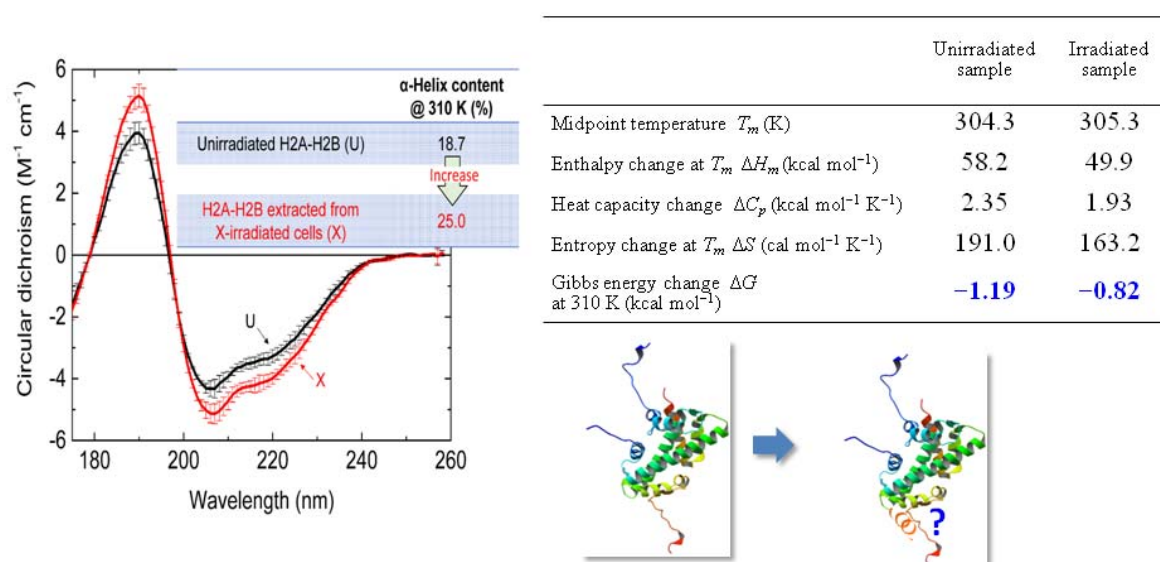


Fig. 5 X線照射した細胞から抽出したヒストンH2A/H2Bに対する円二色性スペクトル測定

【放射線生体影響研究における放射光利用の将来展望】 上述したように、PF・BL27 における放射線生体影響研究は、ライブセル観察などを導入することで新しいステージに達しつつある。コンピュータシミュレーションなど関連する論文を入れると、この2年間で10報以上が報告され成果の輩出が加速されている。KEK 将来計画にある KEK Light Source においてはさらにナノ領域を狙う新しいサイエンスとして深化し、放射線防護・リスク分野に貢献することが期待される。

一方、放射光 CD ビームラインは PF にはなく、国内では HiSOR に唯一あるだけである。ヨーロッパでは既に様々な放射光施設の CD ビームラインがネットワークとして機能するプラットフォームを構築しており、日本は残念ながらこの分野では後塵を拝している。KEK Light Source では、放射光 CD ビームラインを整備することが最重要課題の一つであると思われる。本稿では紙面の関係で触れていないが、SPring-8 における DNA 損傷の分光実験と共に[14]、タンパク質結晶構造解析分野とも相補しながら、放射線生物のみならず現代生命科学の進展に寄与して行くことが期待される。

【謝辞】 PF・BL27B におけるマイクロビームを用いたユーザー実験については、PF スタッフの宇佐美德子博士、小林克己博士に多大なサポートを頂いています。放射線適応応答は茨城大学の立花章先生との、また XRCC4 の抽出・精製については東工大の松本義久先生との共同研究として行っています。ヒストン H3/H4 の CD 実験は、松尾光一先生をはじめとする HiSOR スタッフのサポートを頂いています。SOLEIL におけるビームタイムは、原子力機構黎明研究制度を利用し、フランスとの共同研究として実施しました。これら共同研究者の皆

さまに、深く感謝いたします。また乳腺再構築細胞系に対するマイクロビーム照射実験は、放射線医学総合研究所の今岡達彦博士等と、科研費特設分野の課題「放射線生体ストレス応答のシステム生物学（H28～H30、代表：横谷明德）」として実施する予定です。

【References】

1. Fukunaga, H. and Yokoya, A. Low-dose radiation risk and individual variations in radiation sensitivity in Fukushima. *J. Radiat. Res.* **57**, 98-100 (2016).
2. Fukunaga, H., Yokoya, A. and Taki, Y. Now is the time to consider personalized effective dose. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **96**, 479-480 (2016).
3. 渡辺立子、低線量放射線の微視的エネルギー付与分布. *放射線生物研究* **47**, 335-346 (2012).
4. Nagasawa H, Little JB. 1992. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α -particles. *Cancer Research* **52**:6394-6396.
5. ICRP publication 99. Low-dose Extrapolation of Radiation-related Cancer Risk. *Ann. ICRP* **35**, 2005.
6. Maeda, M., Tomita, M., Usami, N. and Kobayashi, K. Bystander cell death is modified by sites of energy deposition within cells irradiated with a synchrotron X-ray microbeam. *Radiat. Res.* **174**, 34-45 (2010).
7. Maeda, M., Kobayashi, K., Matsumoto, H. and Usami, N. and Tomita, M. X-ray-induced bystander responses reduce spontaneous mutations in V79 cells. *J. Radiat. Res.* **54**, 1043-1049 (2013).
8. Kaminaga, K., Noguchi, M., Narita, A., Hattori, Y., Usami, N. and Yokoya, A. Cell cycle tracking for irradiated and unirradiated bystander cells in a single colony with exposure to a soft X-ray microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.* **In press**.
9. Sakamoto, Y., Kaminaga, K., Kanari, Y., Usami, N., Noguchi, M. and Yokoya, A. Live-cell imaging study of radiation effect on cell cycles of three-dimensional cultured cells exposed to synchrotron soft X-ray microbeam. *乳癌基礎研究* **24**, 21-27 (2015).
10. Hattori, Y., Yokoya, A. and Watanabe, R. Cellular automaton-based model for radiation-induced bystander effects. *BMC Systems Biol.* **9**, 90 (2015).
11. Soria, G., Polo, S.E. and Almouzni, G. Prime, repair, restore: The active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol. Cell* **46**, 722-734 (2012).
12. Izumi, Y., Fujii, K., Wien, F., Houée-Lévin, C., Lacombe, S., Salado-Leza, D., Porcel, E., Masoud, R., Yamamoto, S., Réfrégiers, M., Hervé du Penhoat, M. -A. and Yokoya, A. Structural transition from β -strand and turn to α -helix in histone H2A-H2B induced by DNA damage response. *Biophys. J.* **111**, 69-78 (2016).
13. Izumi, Y., Fujii, K., Yamamoto, S., Matsuo, K., Namatame, H., Taniguchi, M. and Yokoya, A. DNA damage response induces structural alterations of histone H3-H4. *J. Radiat. Res.* **In press**.
14. Yokoya, A., Fujii, K., Shikazono, N. and Ukai, M. Chapter 20. Spectroscopic study of radiation-induced DNA lesions and their susceptibility to enzymatic repair. In: *Charged particle and photon interactions with matter-recent advances, applications and interfaces*, Eds., Y. Hatano, Y. Katsumura, and A. Mozumder, CRC/Taylor & Francis Group, USA, pp543-574. (2011).