

新博士紹介

1. 氏名 神長輝一 (国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構)
2. 論文提出大学 茨城大学
3. 学位種類 博士 (理学)
4. 取得年月 2018年3月
5. 題目 X線マイクロビームを照射した細胞に対するライブセルイメージングによる不均一な放射場が与える生体影響の研究
6. 使用施設 KEK/PF BL-27B 生物ステーション

7. 要旨

不均一な放射場における線量付与

福島第一原子力発電所での事故以降、社会の注目を集めている低線量放射線による被ばく影響の最大の特徴はその線量分布の不均一性にある。低線量域では放射線がヒットする細胞は全体の一部のみに留まり、被ばく範囲内において放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する。このような環境では放射線がヒットしていないはずの細胞にまでもヒットした細胞と同様な放射線被ばく影響が観察される。この現象は放射線誘導バイスタンダー効果 (Radiation Induced Bystander Effect: RIBE)¹⁾と呼ばれ、その効果の大きさは線量依存的ではなく、むしろ照射した細胞や溶媒の種類に依存している。これは、放射線のヒットを直接受けた細胞から何らかのシグナルが周囲に放出され、そのシグナルを周囲の非照射細胞 (バイスタンダー細胞) が受け取ることで誘発されると考えられる。この線量への非依存性は低線量放射線被ばくによる影響の評価を困難にしている要因の一つになっている。

放射線誘発バイスタンダー効果が細胞周期に与える影響

放射線誘発バイスタンダー効果によって染色体異常、細胞死等が誘発されることが明らかにされてきたが²⁾、細胞が規則的に分裂をするタイミング (細胞周期) にも何らかの影響を与えるのか否かについては未解明のままであった。また、細胞死が誘発されることはこれまでに明らかにされているが、その細胞がどのような細胞周期の進行を経て細胞死に向かうのか、あるいは同一の親細胞を由来とする細胞集団中にどの程度細胞死が誘発されるのかは明らかになっていない。バイスタンダー効果による何らかのシグナルを得たタイミングから細胞死に至るまで注目している細胞の継時観察を行い、細胞分裂系付図を作成しバイスタンダー効果による細胞死のタイミング、頻度の解明を試みた。細胞周期をリアルタイムで特定するために細胞周期を可視化するための蛍光タンパク質を発現する遺伝子が導入された Fucci 化細胞 (Fig. 1)³⁾を試料とし、タイムラプスイメージングによって1細胞の細胞周期の継時変化を観察する条件を決定した。

さらにこの細胞の集団に対して KEK/PF BL27B 生物ステーションの X 線マイクロビーム⁴⁾を照射し、放射線が直接ヒットした細胞とヒットを受けないバイスタンダー細胞を混在させる環境を設定した。このエネルギーの X 線は二次電子の飛程が数 μm 以下であり、照射野と非照射野を細胞 1 個レベルで分けることができる。照射細胞の場合ほぼ全てが数回細胞分裂した後に細胞死が誘発された。これに対してバイスタンダー細胞の細胞周期ダイナミクスと細胞分裂系譜を調べたところ、約20%の割合で Fig. 2 に示すようなバイスタンダー細胞の娘、孫、ひ孫細胞のいずれかに細胞死が誘発されることが明らかになり、また、細胞死至る前に細胞周期の遅延が見られた⁵⁾。この現象は同一の親細胞由来の娘や孫、ひ孫細胞において高頻度に観察され、バイスタンダー効果は細胞分裂を数回経た後に起こる遺伝的不安定性をも誘発することが示唆された。

ミトコンドリアへの放射線影響

低線量被ばくでは細胞核あるいは細胞質にのみ放射線のトラックが通過する状況も生じうる。従来は放射線の生物影響の主要なターゲットは DNA だけであると考えられてきたが、細胞質にはミトコンドリアなど重要な細胞小器官が多数存在しており、それぞれが正常に機能し連携するこ

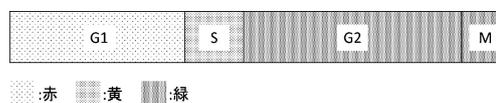


Fig. 1 Schematic image of Fucci cell

The cell nuclei indicate red, yellow (red + green) and green fluorescence in G1, S and G2-M phase, respectively.

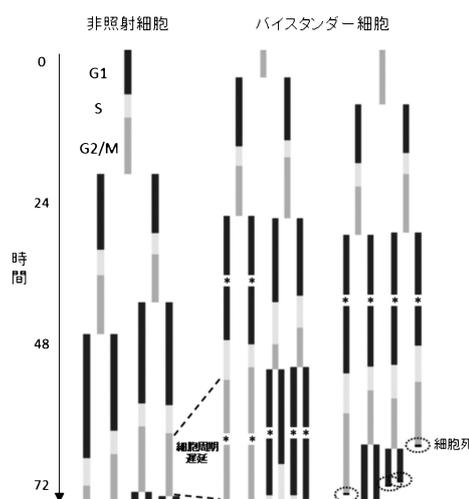


Fig. 2 cell pedigree tree images of unirradiated and bystander cells. The cell cycle progression and cell division have shown as pedigree tree that reflect Fucci system for 72h.

Asterisk (*) indicate extension of the duration time of cell cycle phase. Round dotted line indicates cell death.

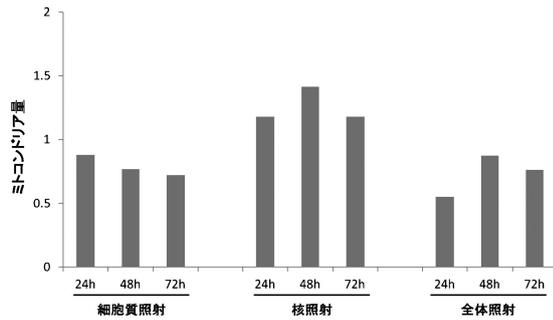


Fig. 3 Chronological changes of mitochondrial mass
Each bar shows relative mitochondrial mass compare with unirradiated cells.

とて細胞内の恒常性が保たれていることから、細胞質への放射線影響も無視できない。そこで、放射光 X 線の特徴である高い平行性を利用した任意形状のマイクロビームを用いて、細胞質あるいは核のみに X 線を照射し、ライブセルイメージングを行うことで、生命活動に必須なミトコンドリアの高膜電位部位の相対面積を指標とした照射部位特異的な放射線影響の解明を試みた。細胞質のみへの X 線照射は、光軸中に Au 製 ($22\ \mu\text{m}\phi$) の微小ロットを挿入することでビーム中心部の X 線を遮蔽し、遮蔽領域が細胞核の場所に重なるように調整することで行った。その結果、細胞質あるいは細胞全体への照射ではコントロールと比較してミトコンドリア量が減少したのに対し、細胞核に X 線を照射した場合には、照射 24, 48 時間後にミトコ

ンドリアの面積が増加することが明らかになった (**Fig. 3**)。これまでに細胞全体への照射によってもミトコンドリア量が増加することが報告されているが⁶⁾、今回の結果は照射によるミトコンドリア面積の増加の原因が、核 (DNA) 損傷に起因する損傷応答である可能性を示唆している。ミトコンドリアの活性変化は、放射線ストレスを与えられた細胞の部位に依存することが明らかになった。

終わりに

本研究を通して、ライブセルイメージングにより個々の細胞を区別して追跡したイメージングを行った。これにより、これまでの細胞集団の平均的な挙動の解析では明らかにできなかった、個々の細胞の応答の違いを明確にしつつ細胞周期やミトコンドリアの変化の解析が可能となった。本研究で用いたタイムラプスイメージングによる放射線誘発バースタnder効果の研究はエンドポイントにも応用可能であり、これを利用することで低線量放射線の生物影響の解明が加速すると期待される。

参考文献

- 1) H. Nagasawa and J. B. Little: *Cancer Res.* **52**, 6394 (1992).
- 2) M. Tomita and M. Maeda: *J. Radiat. Res.* **56**, 205 (2015).
- 3) H. Sakaue-Sawano: *Cell.* **132**, 487 (2007).
- 4) K. Kobayashi: *Nucl. Instrum. Meth. A* **467-468**, 1329 (2001).
- 5) K. Kaminaga: *Int. J. Radiat., Biol.* **92**, 739 (2016).
- 6) T. Yamamori: *J. Radiat. Res.* **58**, 292 (2017).