

# ヒト正常細胞に対するマイクロビーム核外照射の影響 Effects of cytoplasmic irradiation by microbeam in normal cells

菓子野元郎<sup>1</sup>, 小橋川新子<sup>1</sup>, 宇佐美德子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>奈良県立医科大学ラジオアイソトープ実験施設

〒634-0813 奈良県橿原市四条町 840 番地

<sup>2</sup>高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所,

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

Genro KASHINO<sup>1\*</sup>, Shinko KOBASHIGAWA<sup>1</sup>, Noriko USAMI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Radioisotope Center, Nara Medical University

840 Shijo-mach, Kashihara, Nara 634-0813, Japan

<sup>2</sup> Photon Factory, Institute of Materials Structure Science,

High Energy Accelerator Research Organization,

1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan

## 1 はじめに

放射線生物研究では、「DNA 標的」が重要な障害誘発の原因と画一的に考えられ、その結果、DNA 損傷応答の解明は進み、その機構が防護標的とされた。一方、「非 DNA 標的反応 (核外シグナル)」は、あまり研究されてこなかった。その中で、マイクロビームの技術革新により細胞内領域照射の精度が向上した結果、核外 (細胞質) 照射であっても遺伝子突然変異が増えることが報告された [1]。このことは、核外シグナルがゲノム安定性に影響し、細胞障害性にも関与することを示唆している。しかし、照射後の核外シグナルの詳細が十分解明されたとは言えない。また、放射線により生じることがよく知られる活性酸素は、一般的に免疫系の炎症反応における関与がよく知られている。放射線治療後の障害において、活性酸素が分泌性因子 (老化誘導 SASP 因子) を介して炎症反応を増幅させるメカニズムも提唱されている [2]。従って、現状としては、照射後の活性酸素が細胞障害の原因となるという現象論は受け入れられているが、分子機構はまだ十分に解明されていない段階にあると言える。照射後の DNA 標的による反応では、DNA 修復、細胞周期停止を促すため、ATM-p53 の活性化が引き起こされる。しかし、p53 活性が長期間維持される機構はよくわかっていない。ATM-p53 経路は、DNA 標的反応に依存せずとも酸化反応でも活性化することが報告され [3]、照射で生成した活性酸素が ATM-p53 活性維持に関わる可能性は高い。我々は、照射後数日間継続して発現するミトコンドリア由来の「遅発性活性酸素」が老化誘導に関与することを見出している [4-6]。遅発性活性酸素が ATM 活性化に関わる可能性が示唆されるが、照射後の核外シグナルの機構の中でどのような役割を果たすのかについてはわかっていない。以上のことから、放射線障害の機構解明において、

核外における遅発性活性酸素の生成と「核外シグナル」の関係やその役割を解明する必要があると思われる。今年度は照射条件の検討を行い、核外のみ照射される実験系で生成される遅発性活性酸素が細胞の致死に及ぼす影響について調べた。

## 2 実験

ヒト正常細胞である HE49 を用いた。照射前日 (照射 12~16 時間前)、2.5  $\mu\text{m}$  厚のマイラーフィルムのマイクロビームディッシュ中央に細胞を約 200 個になるように植え込み、照射直前に Hoechst33342 で細胞核を染色した。X 線マイクロビーム (5.35 keV) 照射は、26  $\mu\text{m}$  の遮へい帯で細胞核部分を遮へいして、40 x 40  $\mu\text{m}$  角のサイズで細胞質部分を照射した。細胞を一つずつスキャンし、位置情報と細胞数を把握した上で、約 3 Gy の吸収線量になるようにマイクロビーム照射した。照射後、トリプシン処理で細胞をはがし、細胞懸濁液をコロニー形成に用いた。コロニー形成は、2.5 mM アスコルビン酸 2 グルコシド (AA2G) 有りとなしとの培地を用意し、一つのマイクロビームディッシュから回収した細胞懸濁液を二つに分け、それぞれの培地でコロニー形成させた。14 日後、コロニーをメタノール固定し、ギムザ染色した。50 個以上の細胞からなるコロニーの数を数え、植え込んだ細胞数との比より、plating efficiency (PE) を算出した。未照射時の PE に対する 3 Gy 照射時の PE の比より、生存率を求め、AA2G 処理、すなわち遅発性活性酸素除去時における生存率の変化を調べた。

## 3 結果および考察

生存率の結果を図 1 に示した。3 Gy の核外照射時、生存率が約 75% であった。AA2G 処理時において、生存率の変化はほとんど見られなかった。従って、

核外照射時における遅発性活性酸素の致死への影響は見られない可能性が高い。今後、実験条件を合わせて、(1) 細胞核のみ照射、(2) 細胞全体照射、それぞれにおける遅発性活性酸素の致死への影響を調べて行きたい。また遅発性活性酸素の直接的検出は現在のところ不十分であったので、改良して実施する予定である。

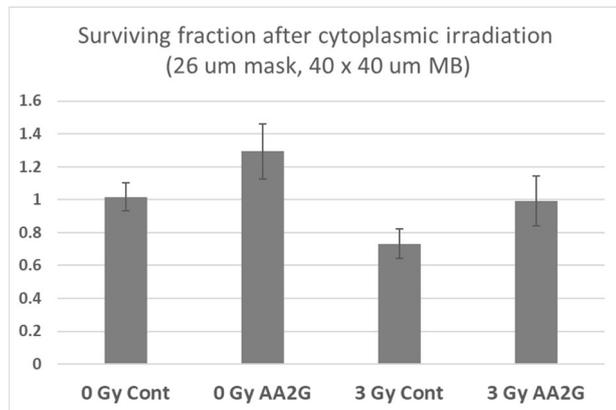


図1：核外マイクロビーム照射による生存率

#### 4 まとめ

ヒト正常細胞における核外（細胞質）照射の条件を確立できた。核外 3 Gy 照射時の生存率は下がることが分かったが、生存率低下において遅発性活性酸素の寄与はほとんど見られなかった。

#### 謝辞

本研究は基盤研究(C) (JP21K07736) の助成を受けた。

#### 参考文献

- [1] LJ Wu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4959 (1999).
- [2] J Chapman *et al.*, *FEBS lett* **593**, 1566 (2019).
- [3] Z Guo *et al.*, *Science* **330**, 517 (2010).
- [4] S Kobashigawa *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **414**, 795 (2011).
- [5] S Kobashigawa *et al.*, *Radiat Res* **183**, 455 (2015).
- [6] S Kobashigawa *et al.*, *Mech Ageing Dev* **146-148**, 65 (2015).

\* kashino@narmed-u.ac.jp