

α 線治療のための He イオンマイクロビーム DNA 照射分析の基礎研究 PREPARATION FUNDAMENTAL RESEARCH ON DNA IRRADIATION ANALYSIS WITH He ION MICROBEAM FOR ALPHA RAY THERAPY

酒井雅哉^{#,A)}, 池田時浩^{B)}, 柴田淳史^{C)}, 竹本健人^{A)}, 上坂充^{A)}
Masaya Sakai^{#,A)}, Tokihiro Ikeda^{B)}, Atsushi Shibata^{C)}, Kento Takemoto^{A)}, Mitsuru Uesaka^{A)}

^{A)}Univ. Tokyo

^{B)}RIKEN

^{C)}Gunma Univ.

Abstract

Radiation therapy is one of the treatment methods for cancer, and particle therapy can minimize radiation exposure to normal tissues compared to photon radiation in vivo and can pinpoint cancerous lesions. However, the biological effects of heavy ion beams are often unknown. The purpose of this study is to measure radiation exposure and DNA damage to individual cells using glass capillary micro beam, which enables irradiation to individual cells and to analyze fate decisions. In this study, we will conduct visualization experiments of DNA damage with He 2+ glass capillary microbeam irradiation using a Pelletron accelerator. We visualize differences in macroscopic DNA damage distribution with microbeams having different LET using Mylar film, and perform time-lapse observation of the distribution of repair protein XRCC1. Based on this experiment, we will discuss the exact LET and DNA damage levels for DNA damaged individual cells and the subsequent cell fate determination.

1. はじめに

1.1 背景

がんの治療法の一つに放射線療法があり、粒子線治療は、生体内で光子線と比較して正常組織への被ばくを最小限に抑え、がんの病巣部にピンポイントで照射できるというメリットがある。その中でも最近、放射線内用療法の一つである放射免疫療法として、照射範囲の短い α 線放射核種を抗体に標識した α 線がん治療の研究が行われている[1]。(図 1) 現在、核医学業界では 211At、213Bi、223Ra、227Th といった α 線核種による治療法が研究されている。

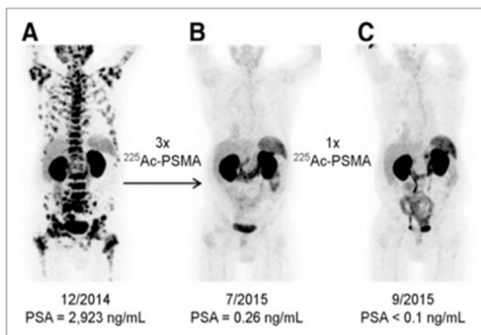


Figure 1: Treatment of castration resistant prostate cancer patients (Alpha irradiation from 225Ac to prostate cancer antigens).

その中でも、最近 At, Ac を使った α 線治療しかし、細胞が放射線を受けると細胞死やがん化といった影響が起こるまでに、多くの細胞内の応答機構が関与する複雑

な過程をたどるが、重粒子線によってこれらの生物影響がどのようにして発現するか、そのメカニズムが十分に理解されているとはいえない。重粒子線による生物影響を調べるためには、放射線が当たった細胞と当たっていない細胞を区別して、選択的にヒットする技術が必要である。このように、個々の細胞に個別に放射線を照射し、個別に効果を分析する手法が必要であり、それを可能にするのがガラスキャピラリーを用いたイオンマイクロビーム照射法である。(図 2) この照射方法により、真空領域であるビームダクトをできる限り標的(細胞核)の近くまで持っていくことが出来るため、エネルギー損失無しに細胞核付近にまで輸送することができ、かつイオンビーム径を数 μm まで細く絞り細胞単位で照射することが可能となる。本研究では、この照射法を用いて重粒子線による DNA 損傷の一本鎖切断と二本鎖切断の損傷修復を可視化する。その後、図 3 に示した東北大安井先生の UV レーザー照射による DNA 損傷修復の時間分解分析に基づき、 α 線を使用して 30 分刻みで SSB 修復(53BP1)、DSB 修復(γH2AX)の時分割結果を得る[2]。次に、タイムラプス顕微鏡と連動して動画像化を目指す。



Figure 2: Tapered glass capillary with an end window.

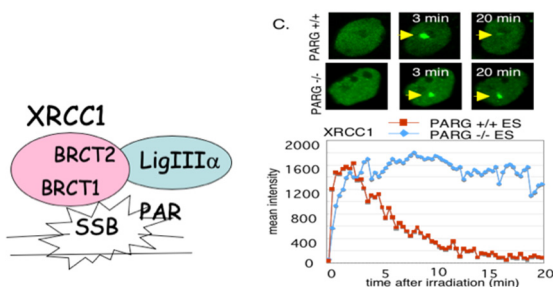


Figure 3: Time-resolved results of UV-laser irradiated DNA-SSB repair by GFP-XRCC1.

1.2 本研究の目的

本研究の目的は、1 つ 1 つの細胞に対する照射が可能である、ガラスキャピラリーマイクロビームを用いて個々の細胞に対する放射線被ばく量と DNA 損傷量を正確に測定し、細胞の DNA 修復分子動態・細胞運命決定を解析することである。ペレットロン加速器を用いた He2+ガラスキャピラリーマイクロビーム照射にて、DNA 損傷の可視化実験を実施する(図 4)。本実験に基づき、DNA 損傷された個々の細胞に対する正確な LET と DNA 損傷量を調べ、統計解析から生物的影響と α 線治療応用の考察を行う。

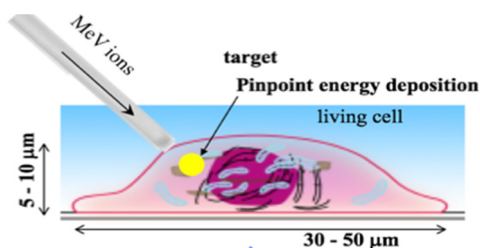


Figure 4: DNA irradiation by glass capillary [3].

2. 実験装置

2.1 タンデム加速器

理化学研究所のセシウムスパッタイオン源および RF イオン源が装備されたタンデム型の Pelletron 加速器 (ビームエネルギー1~4.5 MeV) を使用した。

2.2 ガラスキャピラリー光学系

ガラスキャピラリーはもともと生物分野で細胞用の注射針として知られていたが高知工科大学の成沢らにより、イオンビームのマイクロサイズ化への応用が始められた。作製したガラスキャピラリーにはテーパーが付いており、keV エネルギーのイオンビームに対してはガラス内壁表面の自己組織化帯電現象を利用して集束される(図 5)。一方、MeV エネルギーのイオンビームに対しては、ガラスキャピラリーの内壁に衝突するが小角散乱により前方に反射することで集束される。使用しているガラスキャピラリーの材質は borosilicate であり、puller を用いてガラス直管の中心付近をコイル状のヒーターで加熱しながら両端に張力をかけて切れるまで引き延ばすことで作製している。そして、microforge を用いて、必要な出口径に対応した長さに切断し、キャピラリー内を真空封じにするための薄いフタを出口に付ける。

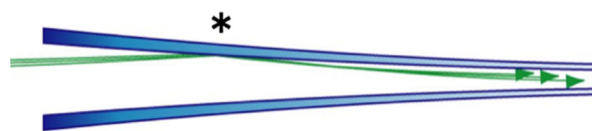


Figure 5: Schematic of focusing by small angle scattering [4].

3. シミュレーション

実験を行う前に細胞の DNA まで放射線が届くかを調べた。4.5 MeV の He2+イオンが 5.0 μm 厚のフタを経て大気中に引き出され、細胞まで照射される飛程を TRIM で求めた。細胞の届く際のビームエネルギーの LET は約 140 keV/ μm 程度となることが分かった。ただし、細胞は water として仮定し計算を行った。

4. 実験

4.1 密封 RI 照射実験

Am241 α 線による U2OS 細胞核内の DNA 照射実験を行い、修復タンパク (XRCC1) の集積の分布を照射前後で比較した。この実験の目的は、グローバル RI (Am-241) 照射による損傷した DNA 修復の可視化である。図 6 のようなディッシュのフタの外側に線源を貼り付けディッシュに逆さにして押し込むようなセットアップで 60 分間照射を行なった。細胞内に生じた DNA 単鎖切断損傷部に集積する修復タンパク XRCC1 とそれに融合させた緑色蛍光タンパク質 GFP により可視化した。また、DNA の二本鎖の切断部位に局在する γH2AX (リン酸化ヒストン H2AX) を免疫染色して、二重鎖切断のマーカーとして間接的にヒットポイントが見えるような工夫を施した。



Figure 6: Irradiation setup.

4.2 ガラスキャピラリーマイクロビーム照射実験

前回のグローバルな照射ではバックグラウンドの foci が多いため、イオンビーム照射による DNA 損傷なのか区別が付かなかった。したがって前回の実験結果に基づき、ペレットロン加速器を用いたガラスキャピラリーマイクロビーム照射法により、バックグラウンドが比較的少ない RPE 細胞 (網膜色素上皮細胞) で線状イオントラックの可視化実験を行なった(図 7)。ガラスキャピラリーの出口口を細胞の直前まで近づけ、細胞一つ一つに対して照射を行い、DNA 損傷された個々の細胞に対する正確な LET と DNA 損傷量を調べた。この際、ヒットポイントが見えるように 53BP1 に対する蛍光免疫染色を行い観察した。

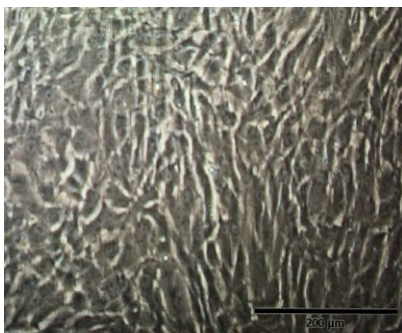


Figure 7: RPE cells on dish observed with a microscope.

図 8 は実験のセットアップで、実験手順を以下の(1)~(4)に示す。

(1)イオンカウンティングによってイオンビームをガラスキャピラリー(図 9)に通過させるために、軸を合わせる調整を行なった。この際、Si PIN フォトダイオード (PD) でカウントし、cps を測定した。

(2)XYZ ステージにメディアム(細胞の培養液)を抜いた dish をのせて照射を行なった。キャピラリーの射出口が dish に当たってビームが出なくなるように、dish をイオンビームに対して少し傾かせて設置し真上からの顕微鏡で確認できるように工夫した。また、照射中に dish にある細胞が極力乾燥しないようにするため、照射部分以外に Mylar フィルムを被せた。

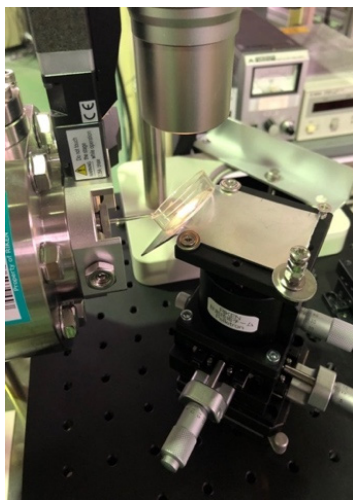


Figure 8: Irradiation setup.

(3)コントロールを含めて5つの dish に照射した。照射後、メディアムを入れて 30 分間インキュベーターに入れて、修復タンパクが集積するよう時間を置いた。今後はこの集積時間を変えて処理を行い、時間分割で修復機構の観察を行う予定である。

(4)30 分後に PFA (paraformaldehyde)を入れて、細胞を固定した。細胞固定は、組織あるいは細胞の生物学的な活動を停止させて、細胞構造の染色および観察を行ないやすくする為に行なう。また、死後変化に伴う細胞構造の破損・自己分解を抑制して、構造や組成などを一時的あるいは恒久的に保存する事により、生存状態を推察する為に行なうものである。

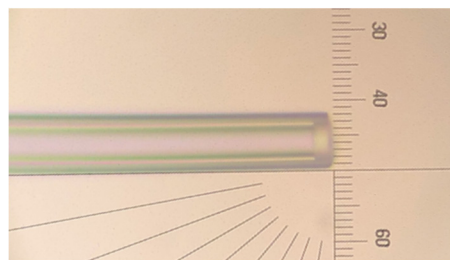


Figure 9: Glass capillary used in the experiment (Exit inner diameter 8.0 μm, lid thickness 5 μm).

5. 結果

5.1 密封 RI 照射実験

図 10 に蛍光免疫染色後の照射していない細胞(コントロール)と 60 分間照射を行なった細胞の GFP-XRCC1 と γ H2AX のフォーカスの画像を示す。これらにおいて、 α 線照射による GFP-XRCC1 と γ H2AX のフォーカスの増加は見られなかった。コントロールと 60 分照射細胞の間に本質的な差はなく、むしろ、照射による細胞の変形で、熱のような原因で細胞が潰れてしまう例が多数見られた。また、GFP-XRCC1 (DNA 単鎖切断のマーカ)と γ H2AX (二重鎖切断のマーカ)の分布は一致しなかった。コントロールの2列目には、多数の GFP-XRCC1 と γ H2AX のフォーカスが見られるが、この理由はまだ分かっていない。

したがって、細胞核内の DNA に損傷を生み出すのに十分な α 線が当たっていなかったと結論づけた。修正案としては、 α 線がどこまで到達しているのか(細胞膜を突き破っているが核内には入って来っていないなど)を判断するために、本実験に用いたものとは別の試薬などを用いて可視化出来るようにする必要があると考える。

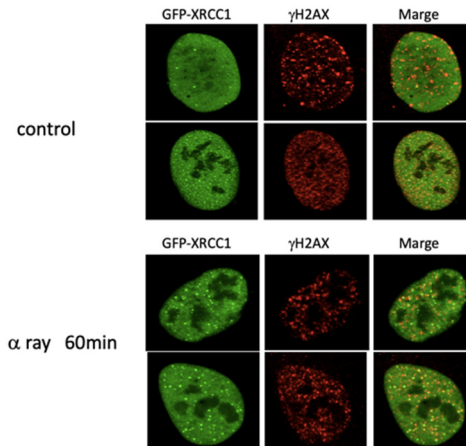


Figure 10: Comparison after immunofluorescent staining.

5.2 ガラスキャピラリーマイクロイオンビーム照射実験

細胞固定後の顕微鏡画像を図 11 に示した。Mylar フィルムを被せて乾燥の影響を極力少なくした部分が Area1 であり(図 12)、照射部分であるフィルムを被せなかった領域が Area2 である(図 13)。Area2 の細胞は乾燥に耐えられず水分がなくスカスカな状態で死んでいた。照射時の乾燥の影響で、細胞が死んでいると考えられ、染色を行うことができなかった。予備実験として、照射時

の乾燥の影響についてどのくらいの時間であれば乾燥に耐えうるのか検証実験を重ね、それらを考慮したセットアップを再検討する必要がある。

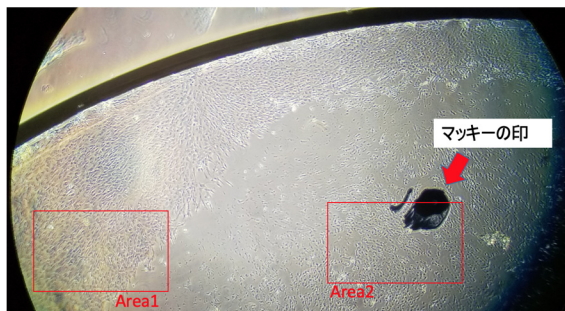


Figure 11: Microscopic image of irradiated cells.

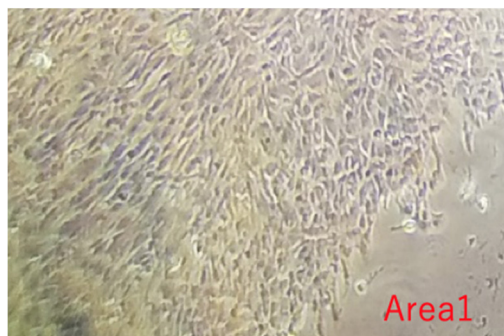


Figure12: Image where living cells are fixed.

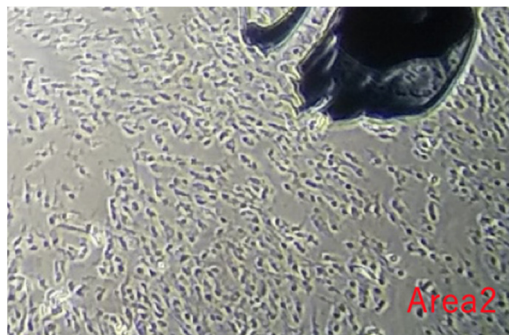


Figure 13: Microscope image judged from morphology that cells are dead.

6. まとめ

ガラスキャピラリーマイクロビーム照射法により個々の細胞に照射し、DNA 損傷された細胞に対する正確な LET と DNA 損傷量を細胞単位で調べることを試みている。解析には、OMX を用いて三次元的に解析を行う。現状、バックグラウンド損傷が少ない RPE 細胞をサンプルとして使用しているが、細胞固定後に dish から剥がれてしまうことが確認されたため、RPE 細胞とガラスの相性や照射時の乾燥の影響について検証実験を重ねる必要がある。それらを考慮したセットアップを再検討してまずは細胞核内の DNA 損傷・修復機構の可視化、その後は固定までの時間を細かく刻むことにより修復タンパクのタイムラプス観察を行う予定である。

7. 今後の予定

- GFP-53BP1 の分布のタイムラプス観察を行い、修復タンパクの修復速度を調べる。
- LET や照射時間を変えて DNA 損傷分布の違いをつくり、修復機構について比較を行う。
- 本研究室が取り組んでいる卓上マイクロイオン加速器のイオンビームによるイオントラックの可視化実験を行う。
- 密封 RI 照射実験では、 α 線がどこまで到達しているかを調べるようセットアップで再検討する必要がある。

参考文献

- [1] C. Kratochwil *et al.*, “ ^{225}Ac -PSMA-617 for PSMA-targeted α -radiation therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer”, *Journal of Nuclear Medicine* 57, 1941-1944 (2016).
- [2] A. Yasui, 東邦大学加齢医学研究所, private communication.
- [3] T. Ikeda *et al.*, “Focusing of Ion Beams with Glass Capillaries and Its Applications”, *RADIOISOTOPES*, 58, 617-628 (2009).
- [4] T. Ikeda *et al.*, “Production of a microbeam of slow highly charged ions with tapered glass capillary”, *Appl. Phys. Lett.* 89, 163502 (2006).