Title	X線照射後の細胞遊走と細胞周期依存性
Author(s)	清野, 良輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第15825号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15825
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91933
Type	doctoral thesis
File Information	Ryosuke_Seino.pdf

学 位 論 文

X 線照射後の細胞遊走と細胞周期依存性

清　野　　良　輔

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

２０２３年度

-概要-

今日の医療では診断・治療において放射線の利用が不可欠である。世界各国においてがんは主要な死亡原因の一つであり、放射線治療によるがん患者転帰の改善が喫緊の課題となっている。がんによって死亡に至る過程に着目すると、原発部位から腫瘍細胞が他部位へ血行性やリンパ行性に移動し、増殖する転移を防げるかどうかが生死を分ける一つの基準になっている。また、原発巣から周囲の組織や臓器に腫瘍細胞が広がっていく浸潤も増悪に寄与している。このようながん浸潤・増悪には、細胞がもとの場所から別の場所へ移動する「細胞遊走」が密接に関与している。

電離放射線が生体へ入射すると、生体組織へのエネルギー付与により DNA が損傷され、細胞死、遺伝子変異、染色体異常などが誘発される。従来研究から、被ばく時の細胞周期位相に応じて DNA 損傷に対する修復機構が異なり、修復効率に差異がみられることが明らかとなっている。すなわち、放射線照射時の細胞周期位相により、細胞の放射線に対する感受性が異なることは広く知られている。一方、がんの病勢進行を制御するために重要な浸潤・転移の初期段階にある細胞遊走に対する放射線影響や、その細胞周期との関連についての知見の蓄積は依然として乏しい。

そこで本研究では、放射線照射後の細胞遊走とその細胞周期依存性を明らかにすることを目的とした。本論文で、細胞周期同調法の一つである分裂期採集法の検証を前半に、X 線照射後の細胞遊走と細胞周期依存性に関する検討を後半に述べる。

細胞周期を同調させ、細胞周期に依存する現象を解析する手法は長年にわたって開発されてきた。それらの手法のうち、動物細胞の有糸分裂に伴い基質への接着が弱くなる性質を巧みに利用した「分裂期採集法」は、細胞代謝を阻害する試薬を用いないので生理的負荷が最小限で済むことが利点の一つである。また、この手法は複雑な工程を必要としないため、その再現が比較的容易である点も長所といえる。

本研究では、まずこの分裂期採集法による細胞周期同調の程度を検証するため、蛍光ユビキチン化ベースの細胞周期指標（FUCCI）を導入したヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞（HeLa-FUCCI 細胞）を用いて、分裂期細胞回収後の培養における細胞周期同調性を検討した。また、フローサイトメトリーで細胞内 DNA 含量を経時的に測定することで、各細胞周期位相の同調性について別角度から検討した。

その結果、分裂期採集法後の細胞周期は少なくとも 24 時間後までは細胞周期の同調が維持されていること、とくに細胞周期の 1 周する時間（最初の倍加時間）までは高度な同調性が維持されることが明らかになった。さらに、分裂期細胞回収、播種後 6-8 時間で G1 期が、約 12 時間で S 期が、約 14-16 時間で G2 期が優勢になることが示された。また、コロニー形成法による細胞周期依存的放射線感受性の定量の結果は従来の感受性に関する報告を支持するものであった。

次に、分裂期採集法にて細胞周期を同調させた細胞に X 線を照射し、タイムラプス撮影によりその後の細胞移動を経時的に測定した。明視野画像における細胞を追跡するため、細胞

セグメンテーションのために深層学習ベースのアルゴリズムである Cellpose を用いて細胞の輪郭を同定し、Fiji ImageJ の TrackMate プラグインを用いて細胞ひとつひとつの移動速度と移動方向を網羅的に解析した。

その結果、照射時 G1 期同調細胞の移動速度は線量依存的に減少傾向を示したが、G2 期同調細胞では速度が増加する傾向にあった。一方、細胞移動は、X 線の照射の有無および線量によらずいずれも二次元ランダムウォークのパターンを示した。したがって、HeLa-FUCCI 細胞のような細胞遊走の変化を示すがんの場合、細胞周期を G1 期または S 期で停止させる抗がん剤が細胞の浸潤や転移を阻害する上で有効である可能性が示唆された。また、細胞のセグメンテーションと追跡アルゴリズムを用いることで、照射後の細胞周期特異的な移動の放射線生物学的評価が可能であることが示された。今後、このようなアプローチによる細胞周期標的抗がん剤を用いた放射線治療の改善が期待される。

目次

第 1 章　緒言

1.1　細胞内の三次元ネットワーク

多細胞生物の組織や器官を構成する細胞は、その形態を絶えず変化させることで、集団としての機能を維持している。細胞の形態は「細胞骨格」と呼ばれる繊維状構造によって制御される。"骨格"という言葉の印象とは異なり、細胞骨格は固定された構造体ではなく、構成する分子が協働しながら、その構造を動的なものにしている。

細胞骨格は、細胞内で三次元的なネットワーク構造を形成し、その形態や極性を安定化させることで、細胞分裂や細胞移動、細胞内輸送、細胞シグナル伝達等、多くの動的なプロセスに必要な物理的力を発生させている[1]。これらの多様な機能を迅速かつ正確に実現するために、細胞骨格は細胞内で「自己集合」あるいは「自己組織化」している。G. Nicolis と I.Prigogin は、平衡系で起きる“静的”な秩序化のことを「自己集合」と定義した一方、エネルギーを消費して“動的”な秩序化が起こる非平衡開放系を散逸系とよび、散逸系での秩序形成を「自己組織化」と定義した[2]。

細胞骨格を構成する主要なポリマー群は、アクチンフィラメント、微小管、そして中間径フィラメントである（図 1−1）。これら 3 つのポリマーは、協働して細胞内でネットワークを形成し、前述の通り、細胞の形態や極性の維持に重要な役割を担っている。

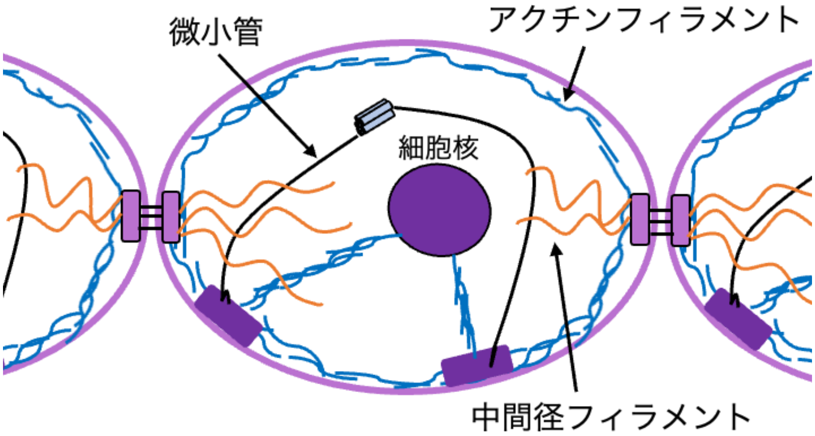


図 1-1 細胞内の細胞骨格分布の概略図。アクチンフィラメントのネットワークは、特定のコネクター・タンパク質によって細胞膜のすぐ下に帯状に存在し、細胞の構造や運動を機械的に支えている。タンパク質を含む小胞や他の細胞小器官などを輸送するための経路としてもはたらく。中間径フィラメントは細胞に構造的な安定性を与えるほか、隣接する他の細胞と結合を形成し、組織の強度を高めている。微小管は細胞分裂の際に各娘細胞に均等に分配されるように姉妹染色分体を分離する。そのほか、細胞内の形状、運動、輸送に関連している。

1.2　細胞骨格

1.2.1　アクチン

細胞内でアクチンは単量体の球状アクチン（globular actin ; G-アクチン）と糸状アクチン（filamentous actin; F-アクチン）の状態で存在している。アクチン細胞骨格の自己組織化は、G-アクチンと高分子の F-アクチンのバランスと、アクチン関連タンパク質によって制御されている[3]。アクチン細胞骨格は、細胞形状を維持するなどの静的な役割だけでなく、細胞分裂や遊走など動的な振る舞いにも重要な役割を果たしている[4、5]。

細胞質内にある単量体アクチンの多くは、ATP が結合した状態で存在している[6、7]。これらの ATP 結合型の G-アクチンが可逆的に重合し、1 ピッチ約 74 nm の右巻らせん構造のフィラメント（アクチンフィラメント）を形成する。アクチンフィラメントは極性を持っており、重合による成長側を+端、脱重合による消失側を−端と呼ぶ。

高分子鎖の柔軟性の指標として持続長（Persistence Length）が知られている。これは、フィラメントに沿った 2 つの接線間の相関が 1/e に低下する長さスケールをいう[8]。アクチンフィラメントの持続長は 15 μmであり、微小管（持続長 5200 μm）と比較して柔らかい。そのため、アクチンフィラメントは熱揺らぎによって能動的に曲げられ、フィラメントを伸ばす力に対して抵抗を生じる。アクチンは 3 つの細胞骨格タンパク質の中で最も動的で、数分の時間スケールで強い構造変化を起こすことができ、その結果として細胞運動性を担保することができる。

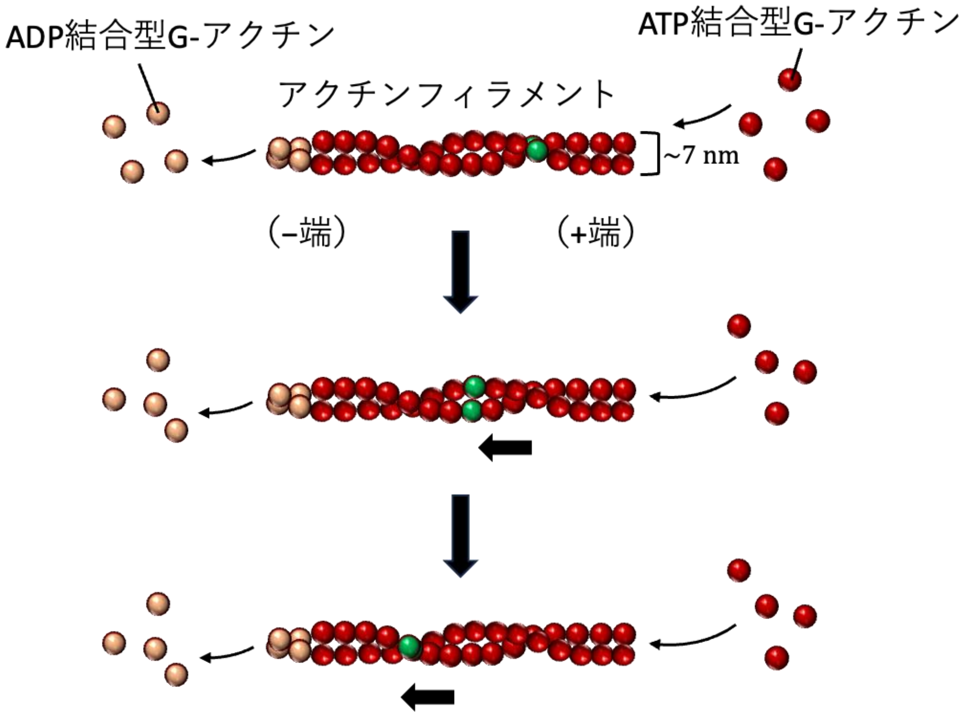


図 1-2 アクチンフィラメント形成のスキーム。アクチンは約 42 kDa の球状タンパク質である。生理的なイオン条件下では、1 分子の ATP と Mg^{2+}または Ca^{2+}と結合すると G アクチン同士が重合し、幅約 7 nm の 2 重らせん重合体であるアクチンフィラメントを形成する。らせん 1 ピッチの長さは約 36 nm である。+端に ATP 結合型アクチンが結合し、–端から ADP 結合型になって離脱する（トレッドミル）。

1.2.2　微小管

微小管は約 25 nm の管状の構造であり、主にαチューブリンとβチューブリンが結合したヘテロ二量体を基本単位として構成される。この二量体が繊維状に重合したものをプロトフィラメントと呼び、これが螺旋の形で 11–16 本程度集まって管状の構造を取ったものが微小管である。細胞中の微小管は主に 13 本のプロトフィラメントからなる。アクチンフィラメントと同様に、微小管には極性があり、重合が起こりやすい側を+端、脱重合が起こりやすい側を−端と呼ぶ。アクチンフィラメントと同様のトレッドミル機構を有しており、微小管の見かけ上の長さが変化しない場合でも、常に+端での伸長と−端での短縮が起こって平衡状態となっている。

チューブリン二量体の重合/脱重合が繰り返される性質は動的不安定性と呼ばれる。この性質によって、微小管は迅速に再編成され、それぞれの微小管が細胞内を素早く伸長することができる[9]。この動的不安定性はチューブリンのβサブユニットに結合する GTP 分子によって制御されている。遊離状態のチューブリン 2 量体には GTP が結合しており、これが伸長中の線維に付加されると安定な複合体を形成する。しかしその後、GTP が分解されて GDP になると、GDP 結合型チューブリンは線維内での安定性が低下する。GDP 結合型チューブリンが線維の末端にあると、分解過程が始まる。新たな GTP 結合型チューブリンが収縮中の末端に結合すると、微小管の収縮は止まって、再び伸長を始める。

微小管は 3 つのポリマーの中で最も硬く、ほぼ直線状のトラックを形成し、動物細胞の直径と同程度まで伸長できる。一方、微小管は細胞内の圧縮荷重で座屈することが知られている[10]。細胞が分裂の準備をする細胞周期の一部である間期には、この剛性を利用して、微小管の放射状アレイを形成し、細胞内分子伝達のハブや足場として機能する。細胞有糸分裂の間、微小管の束が複数集まって紡錘体と呼ばれる構造を形成する。真核細胞の分裂期において、紡錘体はゲノム染色体を 2 個の娘細胞に分配するために必要不可欠の役割を担う。紡錘体微小管は、複製された染色体の動原体部位(キネトコア、kinetochore)を接着して両極に引っ張ることで染色体を分配する。微小

管の接着が未完了の場合や、不適切な接着が起きた場合には、紡錘体形成チェックポイント(spindle assembly checkpoint)と呼ばれる監視機構が活性化して、すべての動原体が微小管によって正しく捕捉されるまで細胞周期を分裂中期に停止させる。

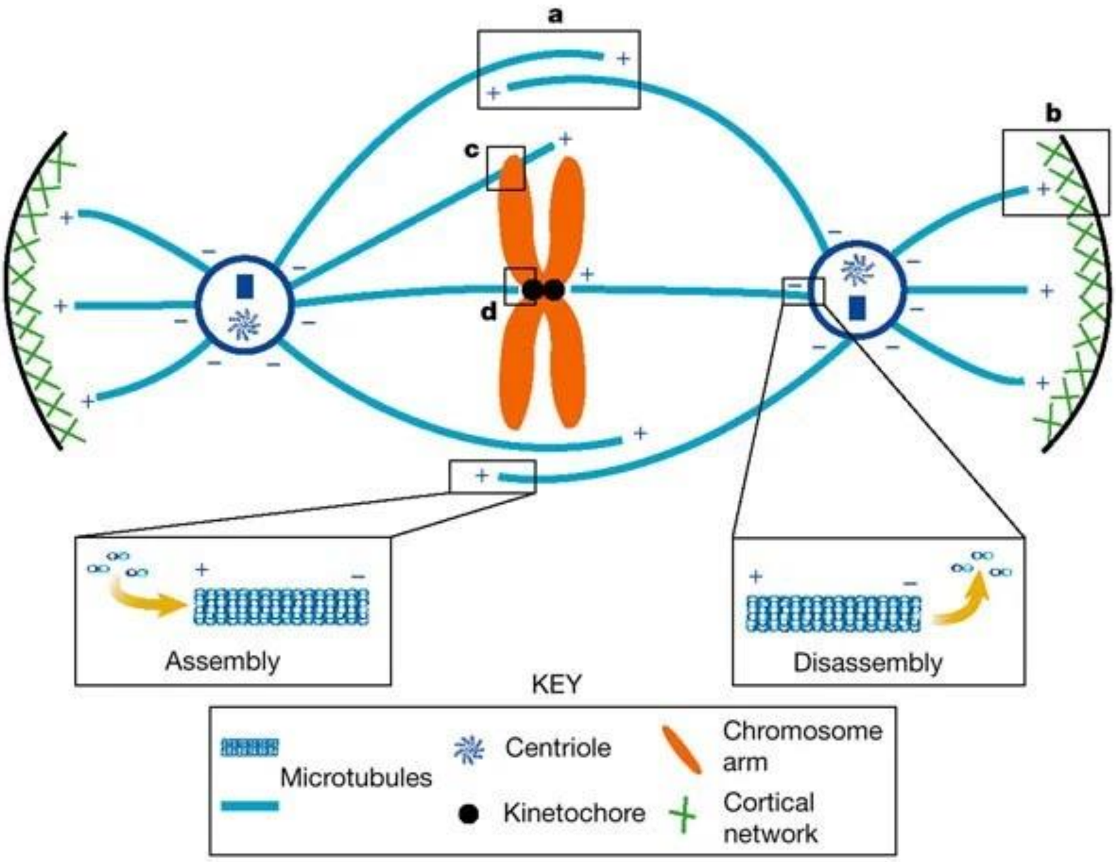


図 1−3 分裂期中期における微小管の構造と極性パターン[51]。紡錘体微小管は重合が進む+端が紡錘体極の遠位になるように配向している。a 微小管束は、反対側の紡錘体極を相対的に動かす力を駆動する。b 紡錘体極を細胞皮質に連結し、紡錘体極の分離と細胞皮質に対する紡錘体の位置決めに寄与する。c 中心体と染色体アームを連結する微小管束が存在する。d 動原体に紡錘体微小管が結合し、染色体を紡錘体極に対して動かす。紡錘体には、ATP 加水分解を利用して 4 組の紡錘体微小管すべてを動かす力を発生させる有糸分裂モーターが存在する。

1.2.3　中間径フィラメント

中間径フィラメントはアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの中間の太さ（約 10 nm）であることからこの名がついた。構成タンパク質が存在箇所により異なるポリマーであるため、アクチンフィラメントや微小管のように明確な構造は規定されていない。中間径フィラメントは最も剛性が低く、圧縮力への耐性は低いが、引張力に対して強い耐性があり、細胞の機械的強度を高める役割を持つ。また、デスモソームを介して他の細胞との結合を形成し、組織強度を高めている。他にも、広く発現している中間フィラメントのひとつである重合核ラミンは核膜を補強する役割を持っており、有糸分裂の初期にはサイクリン依存性キナーゼにより核ラミンのリン酸化核膜が破壊される[11]。微小管やアクチンフィラメントとは異なり、中間フィラメントは極性を持たず、分子モーターの方向性を持った運動をサポートすることはできない。また、重合に ATP や GTP を要さず、細胞質内で脱重合している成分は少ない。

1.3　細胞遊走

細胞遊走（cell migration）は、細胞が元にあった場所から他の場所に移動することを指し、細胞移動とも呼ばれる。例として、表皮にできた傷が治癒する創傷治癒の過程において、この細胞遊走が見られる。また、細胞が細胞外マトリックス（Extracellular Matrix; ECM）を越えて遊走し、その場所に定着することを細胞浸潤という。例えば、細菌やウイルスの感染によって炎症が起きた場合、好中球・リンパ球・マクロファージなどの炎症性細胞が炎症部位に向かって遊走し、炎症組織に浸潤する炎症細胞浸潤が生じる。この他に、がん細胞が周囲の組織や臓器に浸潤して広がっていくがん浸潤もある。

細胞遊走は、単細胞生物から多細胞生物に至るまで、生命活動にとって基本的なプロセスである。単純な生物では交尾と餌の探索において主な役割を持つが[12]、複雑な生物では細胞移動を介した組織・器官の形成や恒常性の維持に不可欠である[13]。

細胞遊走は環境により異なる様式を見せるが、現在では細胞の運動性は 1) swimming（遊泳運動）、2) gliding（滑走運動）、3) walking（歩行運動）、4) crawling（匍匐運動）、の 4 つのカテゴリーに大別される[14]。

swimming は細胞が水中を移動する手段である。真核生物、細菌、古細菌はすべて「鞭毛」と呼ばれる鞭のような構造を使って泳ぐ。真核生物の鞭毛（繊毛とも呼ばれる）は、微小管を中心に構築された複雑な膜結合型の構造であり、ダイニンとよばれるモータータンパク質によって前後にスライドさせられ曲がることで駆動力を得る[15]。

gliding は接着面積をほとんど変えないまま二次元表面上を移動する様式であり、真核細胞の場合は、鞭毛を固体表面に付着させ、鞭毛内モーターを利用して表面を移動する現象が知られている[16]。

walking は基質表面に細胞の一部を一過性に着脱する機構による運動である。

細胞は細胞骨格により構成されたポリマーネットワークのダイナミクスを利用して固体表面を這うこともでき、この運動は crawling と称される。胚発生、免疫、創傷治癒など、生物学の多くの局面で不可欠な機構であり、単に細胞遊走と呼ばれる場合はこの crawling の文脈で言及されることが多い。gliding や walking では細胞は一定の細胞形状を保つことができるが、crawling では、前方では細胞膜を押し出し、後方では引っ込めることによって、細胞形状を変形させて前方への運動を行う。通常、この運動はアクチンによって駆動されるが、他の細胞骨格を利用する細胞が存在することも報告されている[17]。

最も一般的に研究されている細胞遊走様式は、細胞の前縁に局在するアクチンフィラメントの重合によるものである。この細胞遊走様式は、1970 年代初頭に Abercrombie によって定義された[18]。CAR/WAVE 複合体のような核形成促進因子によって Arp2/3 複合体のアクチン核形成活性が活性化されると、Arp2/3 は既存のアクチンフィラメントの側面に結合し、その尖端から新しいアクチンフィラメントの伸長を促進し、既存

のフィラメントと～70°の角度を形成し、緻密で硬いアクチンフィラメントの樹状ネットワークが形成される[19]。細胞膜に接するネットワークにモノマーが加わり続けることで、細胞膜が外側に押し出される。その結果、仮足と呼ばれる、細胞の足として働くアクチンに富んだ先導縁が形成される。収縮性ミオシン II モーターにより、アクチン重合による前方へ仮足を突出させ、かつ細胞全体のバランスをとる。ミオシン II によって細胞後方へ引っ張られたアクチンフィラメントは脱重合され、アクチンモノマーは前縁のアクチンネットワークに再利用される。後方のミオシン II の収縮は、細胞の後部を引っ込める力をも生み出す。このようにして、細胞の前部を突出して仮足を構成し、細胞の後部を集めることで細胞は前方に移動する。こういった運動様式は間葉系遊走（mesenchymal migration）と呼ばれる。

一方、がん細胞が基底膜を破壊して ECM 内を遊走し（浸潤）、血管やリンパ管内へと侵入していくためには、ECM の細かい網目を潜っていく必要があり、このような環境下ではアクチンに裏打ちされた硬い仮足による移動は不向きである。これに対応する運動様式として、がん細胞はブレブ（bleb）と呼ばれるアクチンを持たない形質膜の突起を形成することが報告されている[20]。ブレブは、細胞膜がその下の細胞骨格ネットワークから急速に分離することによって生じる突出であり、細胞膜のすぐ下にあるアクチンの層であるアクチン皮質のミオシン II の収縮による細胞内圧によって起こる。アクチンで満たされた仮足よりもブレブのほうが狭く複雑な三次元環境をより容易に移動できるようにすることが示唆されている[21]。このような運動をアメーバ様遊走と呼ぶ。アメーバ様遊走によりがん細胞は ECM をかき分けて血管やリンパ管内へと侵入し、移行先の臓器で再び基底膜を破壊して組織内に侵入し増殖することで「転移（Metastasis）」が成立する。アメーバ様運動はがん細胞特異的ではなく、原始生殖細胞[22]、免疫細胞[23]、Entamoeba histolytica のようなアメーバ[24]など、幅広い細胞が採用している運動様式である。特に、細胞は間葉系遊走からアメーバ様遊走へ可逆的にスイッチすることができ、多様な細胞外環境に適した遊走を行うことが

できる[25、26、27]。この性質は、転移性がん細胞[28]、免疫細胞[29]、および自由生活性アメーバ[30]などに利用される。間葉系遊走からアメーバ様遊走への転換を MAT（mesenchymal to amoeboid transition）、その逆を AMT（amoeboid to mesenchymal transition）という。間葉系遊走を行う細胞にはアメーバ様遊走を司る因子である RhoA/ROCK シグナルの阻害の効果がないが[31]、逆にアメーバ様遊走を行う細胞には間葉系遊走に重要なタンパク質分解酵素である MMP の阻害剤の効果がなく、さらにその阻害剤は MAT を誘導することで知られている[31、32]。これらのことから、MAT や AMT は、がんの浸潤に関与する分子を標的とした抗がん剤の治療効果が限定的である要因の一つとして考えられている。

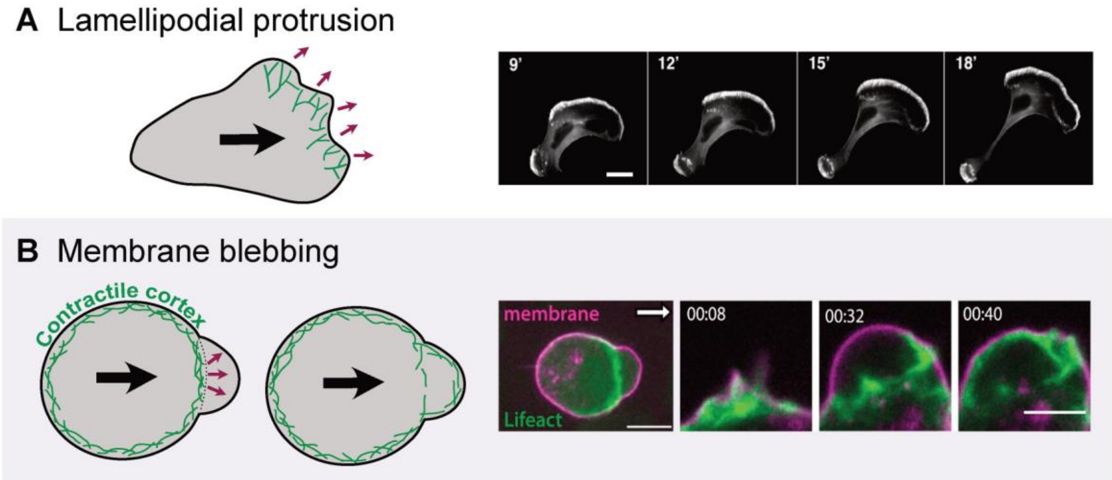


図 1-4 細胞遊走におけるアクチンフィラメントの局在[14]。A 左：ラメラ突起では、Arp2/3 複合体によって核形成された分岐したアクチンネットワークが前縁を押し進める[14]。右：EGFP β-アクチンを導入した B16 細胞が lamellipodial-based cell migration を起こしている画像（スケールバー＝10 μm）[33]。B 左：アメーバ様運動では、ミオシン II に依存した収縮力によって膜剥離が起こり、前縁の膜が前方に押し出され、下にある皮質から離れる。その後、アクチン皮質は膜の下に再生する[14]。右：アメーバ様運動をするゼブラフィッシュ始原生殖細胞を撮影したタイムラプスイメージングシーケンスの選択フレーム（スケールバー＝10 μm）[34]。

細胞は個々の遊走のみならず、他の細胞の運動と協調することで、集団レベルでの運動も生み出す。集団運動は多細胞生物の発生にも関与しており、たとえば特定の細胞群が協調して移動することで、組織や器官の形成が生じている[44]。集団移動は、さらに創傷治癒、組織再生、血管新生の際に起こり、腫瘍の浸潤・転移による拡大にも関与している[45]。集団運動の間、複数の細胞が同じ方向に同程度の速度で移動する。さらに、これらの細胞は環境に対する個々の細胞の反応にも作用し、本来であれば動かないか別の方向に移動するはずの細胞も、大局的な動きに従う方向に移動する。このように、集団的に移動する細胞群は、細胞が孤立している場合よりも効率的に移動するという特徴を持つ。

1.4　先行研究における細胞遊走シミュレーション

これまで述べたように、細胞遊走は非常に複雑なシステムから成立しており、細胞同士が相互作用することで集団的な挙動を実現している。個々の細胞レベルでは、細胞間の接着[35]、引力[36]、反発[37]など、様々なメカニズムが関与している。その他にも、細胞外の化学的勾配に反応して細胞が動く走化性も知られている。がんにおいては、走化性経路が腫瘍細胞の他臓器への播種に有利になるようにプログラムされている可能性がある[38]。加えて、移動が十分に長い期間にわたって起こる場合、細胞増殖と細胞死も重要な役割を果たすことがある[39]。このように個々の細胞の移動メカニズムが細胞集団全体の移動に与える影響を理解することは、疾患の起源を明らかにするだけでなく、効果的な新規治療アプローチを開発するためにも重要である。

過去数十年間に、細胞遊走のさまざまな側面についての理解が大きく進展した[40]が、その根底にあるメカニズムの多くは依然として明らかになっていない。特に、実験生物学において細胞遊走を研究する際には、測定と解釈が大きな問題となりうる。細胞遊走を包括的に制御し観察する実験系を構築することは今日においても困難である。また、一つの細胞の遊走に関連する数多の作用を考慮すると、微視的な細胞遊走から巨視的な現象までを結び付けて詳細に検討することは難解である。このような状況において、数学的なモデリングは一つの有用なアプローチであると考えられる[41]。

これまで数理モデルは、実験で得られた仮説を検証するためのツールの一つとして用いられてきた。さらに、ここ数十年の計算の進歩により、近年の数理モデルはより詳細で正確なパラメトリック化が可能になってきており、実験的に有用な仮説を生み出すまでに至っている[42]。初期状態やパラメータを変化させて繰り返しシミュレーションを行うことにより、初期状態の変動が実験結果に影響を与えるシステムの感度を定量化したり、特定のパラメータに対するシステムの感度を評価するのに役立つ。

細胞移動のモデル化には、関心のあるスケールによって、 大きく 2 つのアプロー

チが用いられている。個々の細胞のレベルでは、エージェントベースモデル（Agent-based model; ABM）を利用した離散モデルが一般的である。離散モデルは、個々の細胞間の段階的または離散的な相互作用を定義するために、実験的に導き出されたルールを採用する。各細胞は遊走、増殖、死などのパラメータを持つ一つの個体（エージェント）としてモデル化される。細胞集団の場合、単一または複数サイトのセルオートマトン[46、47]や、重なり合う球体[48]、変形可能な楕円体[49]、または動的境界として記述する[50]など、細胞は多様な形態で表現される。

ABM の利点は、細胞の表現型のうちどのような変化がシステム全体の挙動に最も大きな影響を及ぼすかを簡単に決定することができる点にある。個々のエージェントの振る舞いは集団的な細胞運動などの原動力となる一方、エージェントはシステムの巨視的な振る舞いを実現するようには動いていない。各々のエージェントが個々に課せられたルールに従い行動し、他のエージェントと相互作用を起こした結果として集団的な振る舞いが決定される。これにより、現象論的に解釈の難しい事象をミクロスケールでシミュレーションし再現することで、その根底にある機構を解釈することが可能となる。ABM のもう一つの利点は、現象の実装が直感的であることである。各細胞の行動は、対応するエージェントに適切なルールを実装することで、容易にモデルに組み込むことができる。これらのルールのもととなるパラメータは、現実の実験結果から推測することができ、ABM を実験データと関連付けることが比較的容易にできる。

これらのような利点がある一方、ABM には欠点もある。第一に、個々のエージェントにルールを設定し動作させるため、母集団のサイズが増大するにつれて計算負荷が大きくなり、必要なメモリ量や計算時間が大きくなる欠点がある。また、ルールの設定によっては細胞の形状が異なるため、モデルごとに得られた結果を単純比較できない可能性がある。例えば、格子状の細胞モデルと球状の細胞モデルでは細胞同士の相互作用が異なる可能性があり、これらのモデルが必ずしも同等の動作をするとは限

らない。したがって、目的とする現象を再現できるルールを必要十分なパラメータを用いて実装し、得られた結果と現実の実験データとの整合性を確認する工程が重要となる。

集団レベルでの細胞の集団移動をモデル化する場合には、多細胞の系において、個々の細胞を区別せずに連続体としてとらえ、流動や拡散現象のように偏微分方程式で系の時間変化を定式化する連続体モデルが一般的である。連続体モデルは離散モデルである ABM とは異なり、個々の細胞の記述が不要であり、母集団サイズの増加による計算負荷の増大が、ABM と比較して小さい。また、偏微分方程式を解くことでパラメータ解析を行うため、ABM よりも数学的解析がしやすいという利点がある。ただし、全体の系の記述により連続体を表現するため、個々の細胞の動作が全体の動作に過度に還元的になる可能性がある。

1.5　がんと放射線治療

現在、医療では画像診断やがん等への治療において放射線がよく用いられている。今日では、世界で 1,000 万件以上の診断において、電離放射線が患者の画像診断に使用されている[52]。加えて、がん患者の 50%以上が、腫瘍細胞を根絶または制御する目的で放射線治療を受けている[53]。

日本においては、令和 4 年の死因順位別死亡数では悪性新生物が 1 位で死亡者の 3.2人に 1人ががんによって死亡しており、2 位の心疾患と比較し約 2 倍の数字となっている[54]。日本政府はがん対策基本法の施行 (2007) やがん対策推進基本計画 (2007) の策定といった施策を講じているものの、がんの制圧は依然としてアンメット・メディカル・ニーズの一つとなっている。

がんの主な治療法は外科療法、化学療法、放射線療法の 3 つに大別される。外科療法では、患者体内の腫瘍病変を物理的に切除することで、がんの根治を目指すものである。化学療法は薬剤を用いてがん細胞の増殖や成長を抑え細胞死を誘発し、転移や再発を防ぐことを目的とした方法である。特に、白血病や浸潤性の高いがんは局所制御では治療ができないため、化学療法が選択される。放射線治療は放射線の電離作用を用いて腫瘍細胞の細胞死を誘発する非侵襲的な治療法である。放射線治療には、外科的処置を行わないので苦痛が少ない・患者の生活の質（Quality Of Life; QOL）が保たれるといった利点があり、比較的患者の肉体的負担が小さいことを特徴とする。

それぞれ異なる利点を有している一方で短所もある。外科治療は患者に麻酔をかけて手術を行うものの、身体的あるいは精神的に大きな負荷をかけてしまう上に、術後の疼痛、感染や、あるいは審美的・機能的な修復が必要となる有害事象のリスクもあ

る。化学療法は全身治療を可能とする一方、根治を目指す上で課題が残る。放射線療法は局所病変の根治を望める治療であるが、全身治療は技術的に困難である。したがって、今日の医療現場では化学療法と放射線治療を前後また並列に組み合わせる化学放射線療法など、それぞれ長所と短所を補い合う複合的治療手段が取られている。

1.6　電離照射線の生体影響

1.6.1　電離放射線の種類

放射線は、エネルギーが伝播する電磁波または粒子のことを指す。特に、放射線が物質中を通過するとき、原子や分子を直接的または間接的に電離できるエネルギーを有した放射線を電離放射線という[55]。電離放射線のうち、自身の電荷によって直接的に物質の原子および分子を電離できるものを直接電離放射線といい[55]、電荷を持たないが、物質との相互作用により二次電子を生成し、その二次電子が物質を電離するものを間接電離放射線という[55]。本研究で扱う X 線を含む光子線についてその特性を述べる。

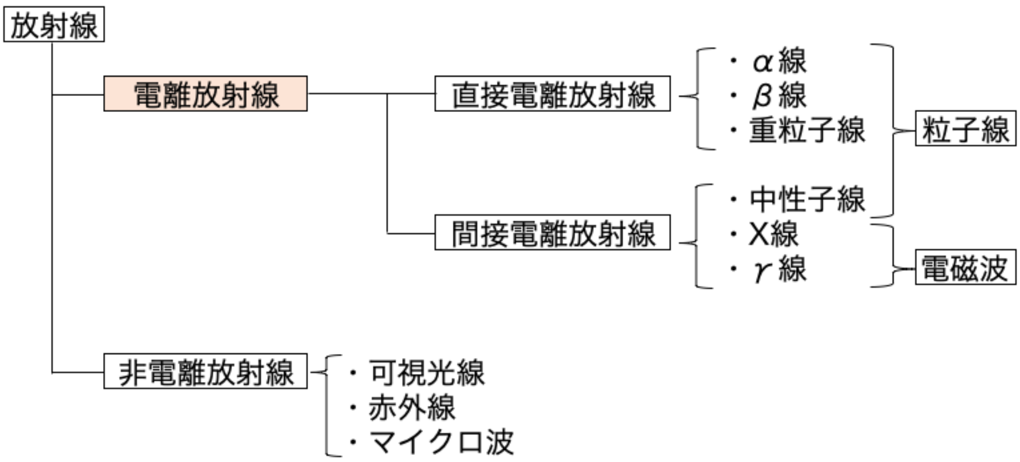


図 1-5　放射線の分類。放射線は物質の原子または分子を電離する能力の有無で分類される。さらに、電荷を持つ場合と持たない場合とで、直接および間接電離放射線に分類される。可視光線や赤外線などの電磁波は物質を電離するエネルギーは持たないため、非電離放射線とよばれる。

X 線および γ 線は光子線の 1 種である。両者の光子線は発生方法により区別される。

γ 線は放射線同位元素の壊変により、原子核のエネルギー準位が遷移する現象に起因して発生する。したがって、γ 線のエネルギーは発生源となる放射線同位元素により異なる。

一方、X 線は原子核の外側で発生する電磁波である。電子が物質へ入射した際、物質の原子核付近で曲げられるとそのエネルギーの損失分が電磁波として放出される。これを制動 X 線と呼ぶ。制動 X 線のエネルギーは、入射電子のエネルギーを最大値とした連続スペクトルをとる。また、入射電子によりターゲット原子軌道の内殻電子が放出され空軌道ができると、その空軌道に外殻電子が遷移し電子軌道のエネルギー差と等しいエネルギーをもった電磁波が特性 X 線として放出される。したがって、特性 X 線は単一のエネルギー（線スペクトル）をとる。

光子線と物質の相互作用には、物質にエネルギーを付与しない反応である弾性散乱（トムソン散乱、レイリー散乱）と、エネルギーを付与する反応である非弾性散乱（光電効果、コンプトン散乱、電子対生成）がある。各反応の発生確率（断面積）は、光子線のエネルギーや物質の原子番号に依存する[56]。

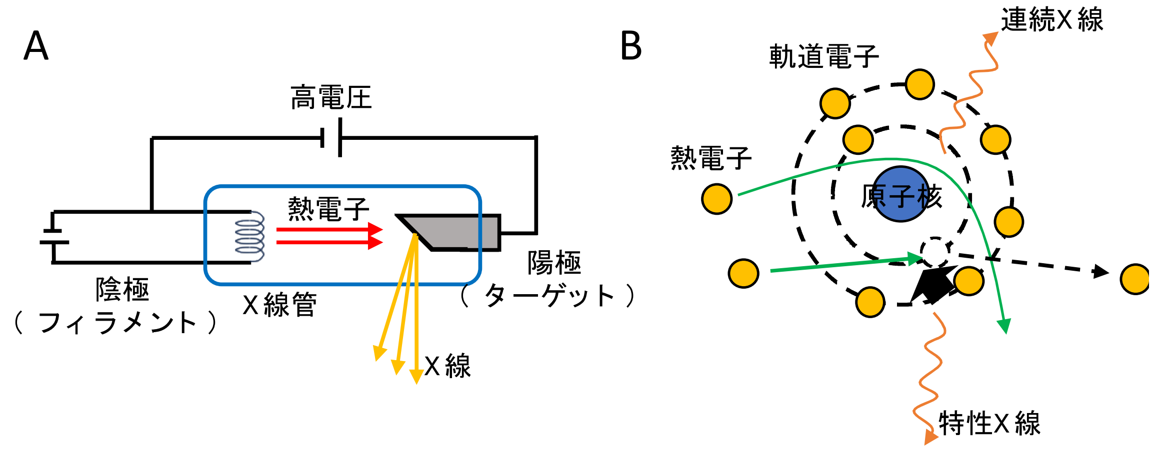


図 1–6 X 線の発生原理。A フィラメントに電流を流し、フィラメントを加熱するとフィラメントから熱電子が発生する。それを高電圧で加速させ、陽極のターゲットに衝突させる。B ターゲットの原子と熱電子が相互作用し、X 線が発生する。熱電子が原子核により曲げられた場合は制動 X 線が発生する。熱電子が軌道電子を弾き飛ばした場合は、外殻電子がその空位に遷移し、その軌道差分のエネルギーの特性 X 線を放出する。

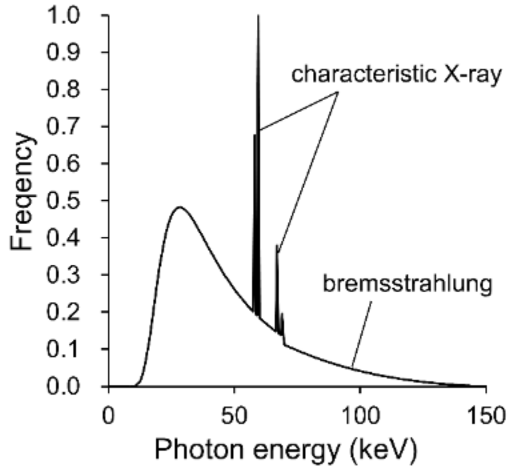


図 1-7 150 kVp X 線（付加フィルタ 1.0 mmAl）のスペクトル[56]。150 keV を最大値とした制動 X 線と、元素および結合状態に特有のエネルギーと強度を持った特性 X 線が放出されている。

1.6.2　光子線照射後に誘発される物理化学的反応

光子線（X 線、γ 線）が生体組織へ入射すると、様々な物理化学的反応を経て、最終的に生物学的な影響が生じる。

まず、光子線が生体組織中の原子と相互作用（光電効果、コンプトン散乱）を起こすことにより二次電子が発生する。二次電子は原子との衝突によりエネルギーを失いながら進むが、衝突反応の中でも電離や励起といった非弾性散乱によって生体分子は損傷を受ける。核酸やタンパク質、脂質等の生体分子のうち、特に DNA 構造に与える損傷が大きい。この過程は「物理学的過程」とよばれ、放射線照射後 10^{-15} 秒までの間に生じる。物理学的過程において生体組織が二次電子により直接損傷される場合を直接作用という。

また、生体組織内の水分子が電離・励起されることにより生成されるラジカルが DNA 構造と反応することでも損傷が生じる。ラジカルの反応を介して生体組織へ損傷を与える場合を間接作用と呼ぶ。哺乳類細胞株の場合、OH ラジカルが誘発する細胞死は全体の 62 %であると報告されており[57]、直接作用と比較して間接作用による損傷の方が細胞死への寄与が大きい。放射線照射後 10^{-15}–10^{-12} 秒でラジカルが生成され、その後 10^{-12}–10^{-6} 秒の間に拡散や反応が生じる。この過程を「化学的過程」という。

上記の過程において DNA が損傷した場合、後述する損傷の種類により異なる修復機構によって修復される。修復機構により正常に修復されない場合、染色体異常を経て細胞死が誘発される[59]。細胞死の主な機序にアポトーシス（apoptosis）が存在する。これは、細胞内部の異常（DNA 損傷等）や周囲の組織からのシグナルにより細胞膜の収縮、DNA 断片化を引き起こす細胞死である[60]。

また、放射線が照射された細胞（標的細胞）から照射されていない細胞（非標的細胞）へ放射線影響が波及するバイスタンダー効果（bystander effect）や、逆に非標的細胞から標的細胞へのシグナル伝達により標的細胞が放射線抵抗を獲得する（組織代償効果）といった現象が知られている[60]。

　これらの作用を経由し組織が損傷され、場合によっては後発的な影響としてがん化といった重篤な障害を誘発する[59]。物理学的過程、化学的過程の後で生物学的影響が発現するまでの長いスケールを「生物学的過程」という。

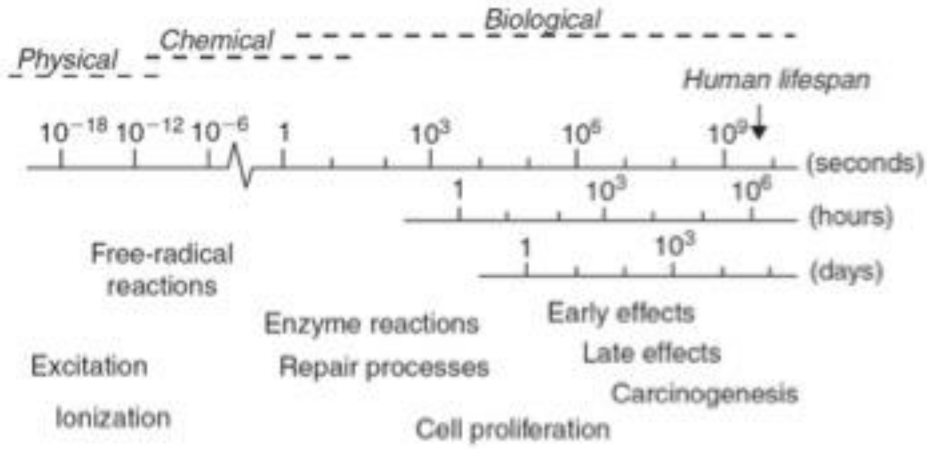


図 1-8 生体組織への放射線照射時に誘発される影響のタイムスケール[59]。

1.6.3　放射線照射により誘発される DNA 損傷

DNA は生命の遺伝情報を担っている。DNA は、二重らせん構造（DNA 鎖）を持ち、らせん間に塩基対を持つ。DNA の塩基にはアデニン（adenine）、シトシン（cytosine）、グアニン（guanine）、チミン（thymine）の 4 種類が存在し、これらの配列により遺伝子情報を表現する[61]。DNA 鎖はヒストンタンパク質に巻き付くように格納されており、この構造をヌクレオソームと呼ぶ。ヌクレオソームは凝縮され、染色体を形成する[62]。

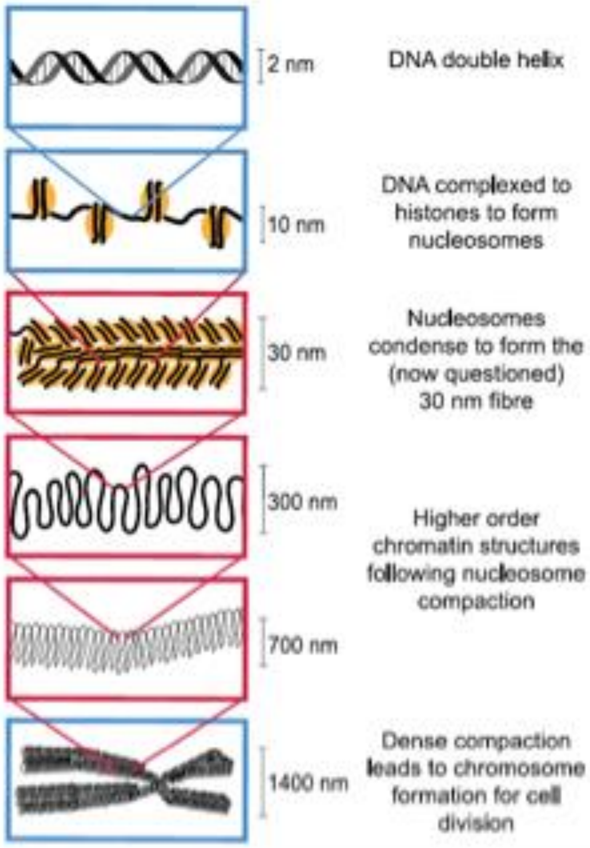


図 1-9 DNA が染色体まで格納される構造の概略図[62]。DNA は 4 種のヒストンタンパク質からなる複合体の周りに巻き付いて、ヌクレオソームという構造を形成する。このヌクレオソームが数珠状に連なり、さらにさまざまなタンパク質や RNA が結合してクロマチンが構築されている。クロマチンが凝縮し繊維状になったものがクロマチン繊維と呼ばれ、これがさらに折り畳まれて凝縮したものが染色体となる。

DNA 損傷は、電離放射線により生成される二次電子と生体組織分子との相互作用（電離・励起）により誘発される。DNA 損傷は、損傷箇所や損傷の個数によって分類され、DNA 鎖の一方に損傷のある場合を DNA 一本鎖切断（DNA single-strand breaks; SSB）、SSB から 10 塩基対内（3.4 nm 以内）の相補鎖に損傷のあるものを DNA 二本鎖切断（DNA double-strand breaks; DSB）という。塩基が損傷される場合を塩基損傷（DNA base damage; BD）という[63]。DNA 損傷の中でも、DSB は修復困難な複雑な損傷であり、追加の損傷の有無によってさらに分類される場合がある。単純な二本鎖切断を simple DSB、DSB の両端から 10 塩基対内にさらに 1 つの鎖切断がある場合 DSB+といい、DSB の両端から 10 塩基対内にさらにもう一つの DSB がある場合は DSB++とされる[64]。DSB+および DSB++は総称して complex DSB と呼ばれる。complex DSB の他にも、SSB より 10 塩基対以内に追加の BD が存在する損傷や、10 塩基対以内に複数の BD のある損傷も複雑な損傷として定義される[65]。これらの複雑な損傷は、simple DSB と比較して修復が困難である可能性が示唆されている[63]。

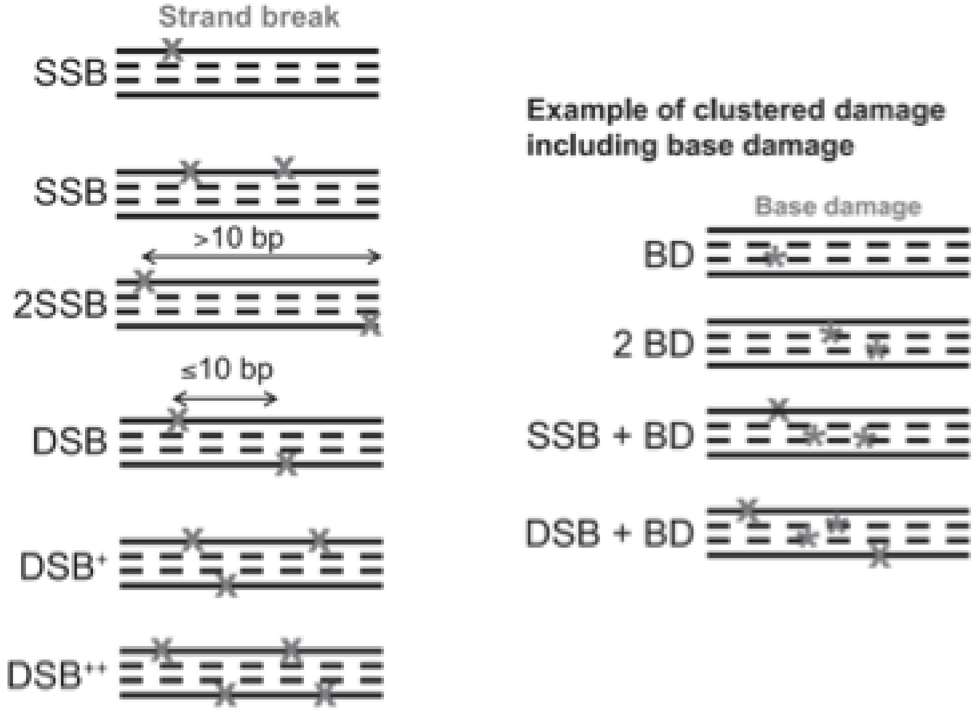


図 1-10 電離放射線等に起因するイベントによって誘発される DNA 損傷の構造。✕は、DNA 鎖切断または塩基損傷を示す[65]。DSB は修復困難な損傷として知られており、細胞の生存にとって致命的である。

1.6.4　DNA 二本鎖切断の修復過程

DNA 損傷は、その種類によって異なる修復経路により修復される。ここでは、放射線の生物学的影響を議論するうえで最もポピュラーな損傷である DSB の修復過程について解説する。

DSB が発生すると、ヒストンタンパク質の一種である H2AX（H2A histone family member X）がリン酸化される[66]。リン酸化された H2AX は γ-H2AX と呼ばれる。γ-H2AX は DSB の両端から 25 kb に渡り形成される[67]。γ-H2AX に MRN 複合体（MRE11/RAD50/NBS1）や MDC1、53BP1、BRCA1、NBS1 といったタンパク質が集積する[68]。さらにこれらのタンパク質が修復タンパク質の集積に寄与する。

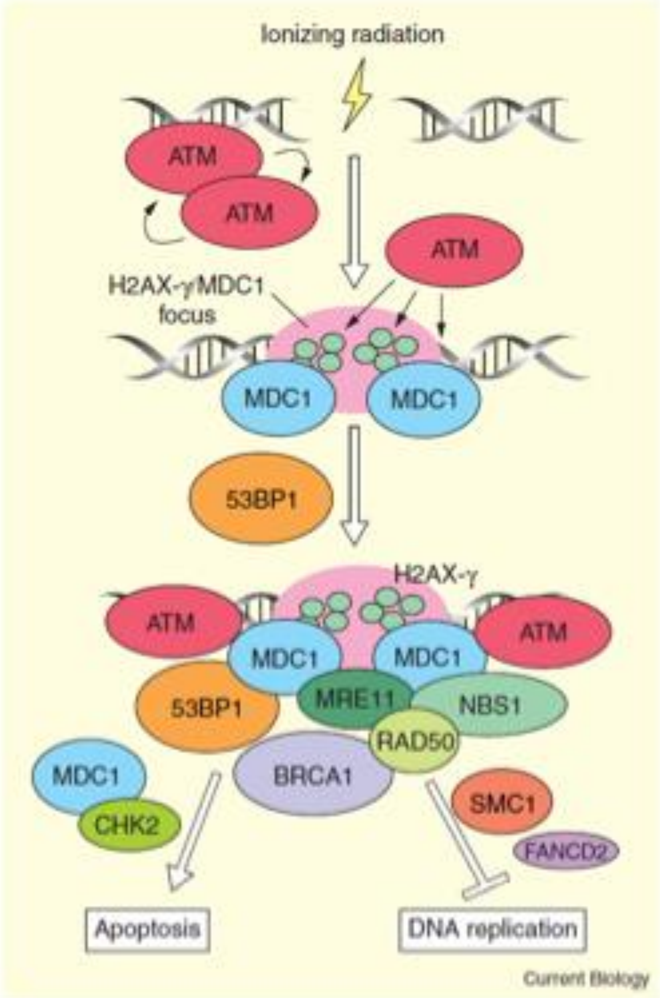


図 1-11 DSB 部位へのタンパク質発現の機序[68]。

DSB を修復する際の DNA 鎖の再結合方法は、相同組換え（homologous recombination; HR）および非相同組換え（non-homologous end-joining; NHEJ）、マイクロホモロジー媒介末端結合（microhomology mediated end-joining; MMEJ）の 3 種類である[69]。これらの修復過程は細胞周期に依存し、HR は S/G2 期、NHEJ は G1 期において発現する[70、71]。

・非相同組換え（non-homologous end-joining; NHEJ）

NHEJ では、切断の両端に Ku70/Ku80 ヘテロ二量体が結合し、損傷の末端を保護する。Ku ヘテロ二量体により、DNA 依存性プロテインキナーゼ（DNA-PKcs）の触媒サブユニットが誘導される。その後、Artemis により損傷の末端が処理され、リガーゼ IV および 2 種類のタンパク質（XRRC4、XLF）により切断された DNA 分子が連結される[71]。

・相同組換え（homologous recombination; HR）

HR は、姉妹染色分体（DNA 複製後に生成される同一の遺伝情報を持つ 1 対の染色体）を鋳型として使用するため、NHEJ と比較して正確な修復が可能である[71]。姉妹染色分体は S/G2 期の DNA 複製が終了した細胞にのみ存在するため、HR は S/G2 期に生じる修復機構である。CtBP 相互作用タンパク質 (CtIP)と共に、MRN 複合体により DNA 切断部位の末端が切除され一本鎖となる。一本鎖が自己結合し二次構造が形成されるのを防ぐため、複製タンパク質 A (RPA) によって保護される。BRCA2 は RAD51 によって RPA と置換され、姉妹染色分体上の相同配列を探索するための核酸タンパク質フィラメントを形成する。その後、姉妹染色分体上の相同配列を鋳型として DNA 末端が伸長する。塩基配列が復元された後、他方の切断部位と接合し修復が完了する[71]。

・マイクロホモロジー媒介末端結合（microhomology-mediated end-joining; MMEJ）

NHEJ による修復経路の初期に誘導される Ku70/Ku80 ヘテロ二量体が欠損等により誘導されない場合、Ku70/Ku80 ヘテロ二量体を必要としない経路により DSB の修復が行われる[72]。このような NHEJ 代替的な経路は、MMEJ または backup NHEJ、alternative NHEJ（alt-NHEJ）と呼ばれる[73]。この経路は、非同一性末端の DSB を結合するために微小な相同性配列（マイクロホモロジー）を利用する。MMEJ では、DSB の両断片において 5–20 bp 程度の相同性配列が出現するまで、PARP-1 により誘導された MRN および CtIP により切断部位の両端からマイクロホモロジー領域までの不一致領域が切除される。切断部位から切り取られた不一致領域が、マイクロホモロジーと相補的な塩基対を形成すると、これらの末端は LigIII‐XRCC1 複合体（LigIII/XRCC1）によって再連結される。MMEJ による修復は NHEJ や HR よりも相対的に効率が低く、NHEJ よりもさらに誤修復が多いことが示されている[69]。

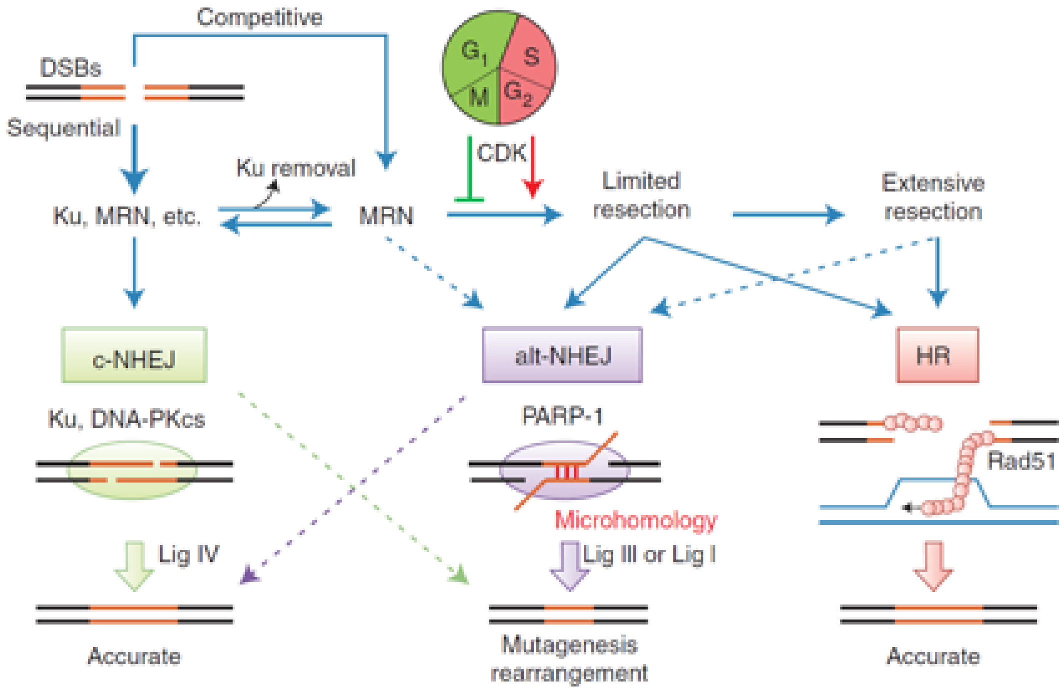


図 1-12 c-NHEJ、alt-NHEJ、および HR の修復機構の概略と、これらの修復経路間の DSB の配置に影響を与える要因との関係の概略図[69]。NHEJ は、損傷が発生した DNA の末端を直接結合するプロセスである。alt-NHEJ では DSB 末端を切除し接合するため、NHEJ に比べ修復が遅く誤修復が多い。HR は、S 期または G2 期に存在する相同な DNA 配列を利用して損傷を修復するプロセスであり、高い精度で修復できるが修復速度は遅い。

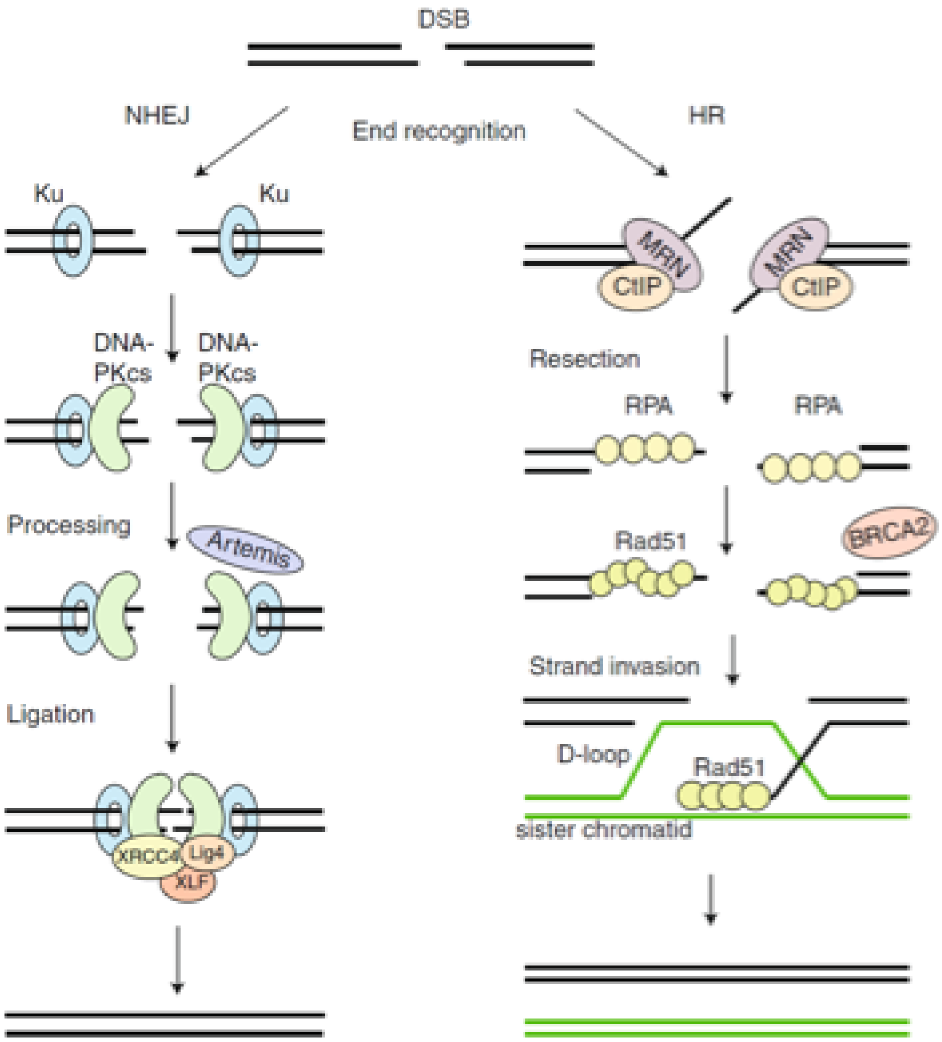


図 1-13 NHEJ と HR における修復過程の概略図[71]。修復タンパク質が損傷部位近傍に集積し、反応が連鎖して DSB を修復する。

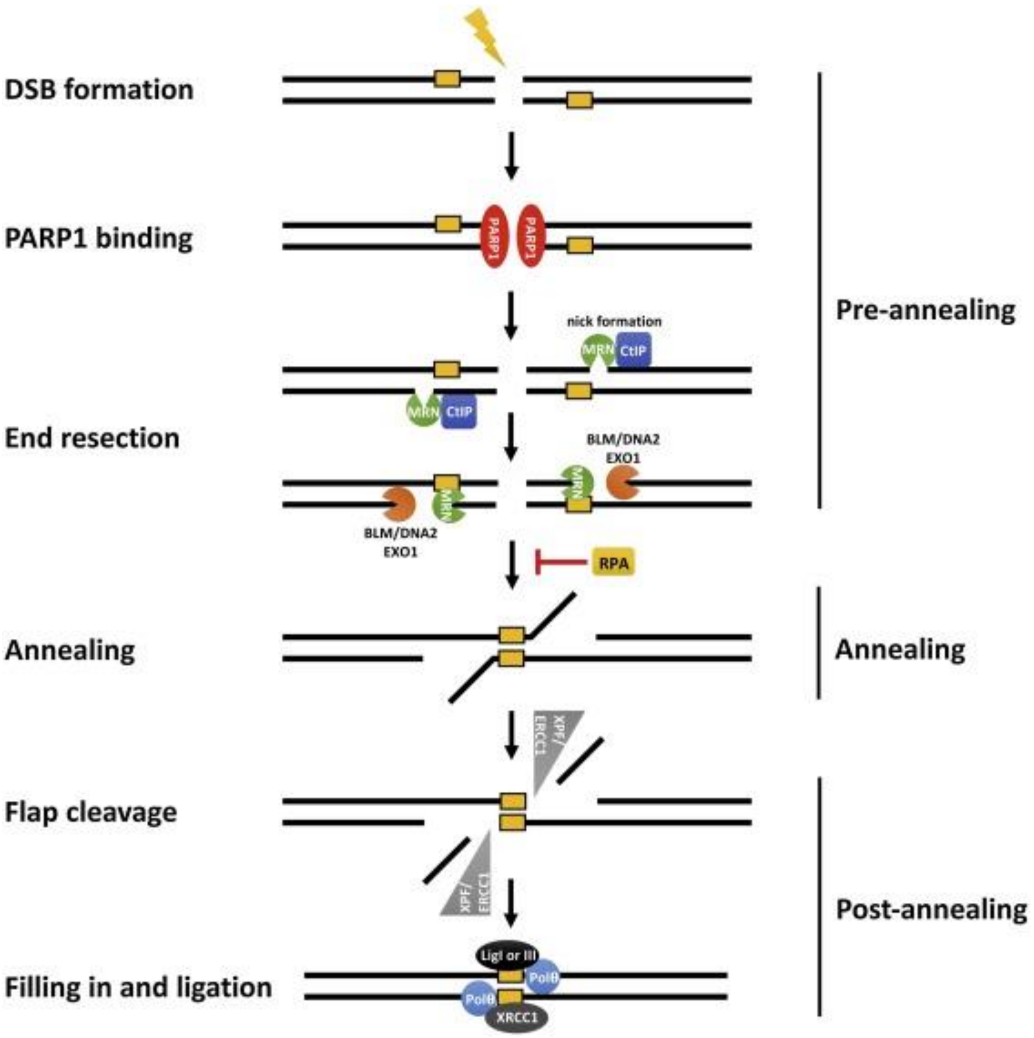


図 1-14 マイクロホモロジー媒介末端結合（microhomology-mediated end-joining）による DSB 修復[73]。

DSB の修復は前述の機構により行われることが知られている。これらの修復経路により修復されなかった細胞は、細胞周期チェックポイントを経てアポトーシスによる細胞死を誘発される。

1.6.5　放射線照射による細胞死

前述の通り、DSB 修復が正常に行われなかった細胞では細胞死が誘発される。細胞死のパターンは様々であり、例えばネクローシス、アポトーシス、オートファジーなどが知られている。また、放射線は細胞の老化を加速させる可能性がある。老化とは、細胞は生存可能であるが機能が変化し、もはや増殖能力がない状態である[77]。

細胞死の中でも放射線照射により主に引き起こされる細胞死はアポトーシスである。アポトーシスという用語は、1972 年に Kerr、Wyllie、Currie によって、ゲノム DNA の断片化を伴う細胞死の様式を表すために作られた[74]。アポトーシスはプログラム細胞死とも呼ばれ、正常組織から外来細胞、損傷細胞、感染細胞、あるいは形質転換細胞を除去するなど生体の恒常性維持に必要な細胞死であり[78]、その過程は高度に制御されている。アポトーシスは、DNA の断片化に加えて、細胞質の凝縮、核濃縮、クロマチンの凝縮、細胞のラウンディング、膜の剥離、細胞骨格の崩壊、膜結合アポトーシス小体の形成などの形態学的な特徴を持ち、免疫反応を活性化することなく、マクロファージや隣接細胞によって速やかに貪食・消化される[75]。アポトーシス経路のうち、外因性アポトーシスと内因性アポトーシスの二つの主要なアポトーシス経路が広く認知されている。外因性経路は、膜貫通型のデスレセプターによって伝達される細胞外シグナルによって活性化される。対照的に、内在性経路はミトコンドリアを介した細胞内部からのシグナル伝達経路によって開始される。

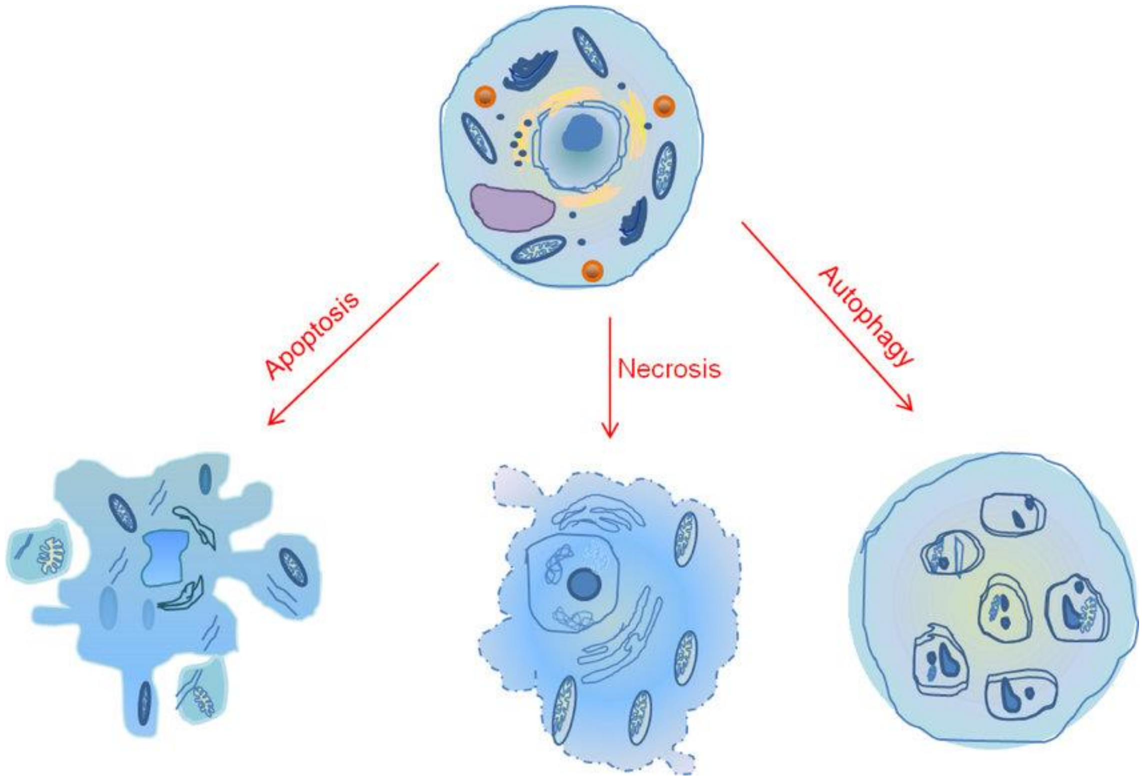


図 1-15 アポトーシス、ネクローシス、オートファジーを受けた細胞の形態。アポトーシス細胞は特徴的な細胞収縮と細胞小器官が密集したアポトーシス小体を生じる。ネクローシス細胞は、小分子に対する細胞膜の透過性の増加により、ミトコンドリアと細胞小器官の拡張を示す。オートファジー細胞は、ミトコンドリア、リボソームを含む細胞質内容物を封じ込めた二重膜結合オートファゴソーム液胞を示す[89]。

電離放射線により生じる DNA 損傷は様々な細胞内シグナル伝達を開始させることが知られているため、内在性経路が電離放射線誘発アポトーシスを媒介する主要なアポトーシス機構であると推測されてきた。内在性アポトーシスは、ミトコンドリア経路とも呼ばれ、ミトコンドリア外膜の透過（MOMP）とシトクロム c の放出を特徴とする[79、80]。細胞質シトクロム c はアポトーシス・プロテアーゼ活性化因子 1（Apaf1）およびプロカスパーゼ-9 と相互作用し、アポトソームを形成する[81、82] 。アポトソームの主な機能は、イニシエーターであるカスパーゼ-9 を活性化することであり、これがカスパーゼ-3 から始まるカスパーゼ活性化のカスケードを引き起こす[83、84]。内在性アポトーシスは、DNA 損傷に応答して活性化されるシグナル伝達経路によって開始される。DNA 切断は種々のタンパク質群によって感知されたのち、DNA 損傷反応を増幅する多くのキナーゼが活性化される。これらのキナーゼが、DNA 損傷が誘発する内在性アポトーシスの重要なメディエーターである癌抑制タンパク質 p53 をリン酸化する。

p53 は、染色体の安定性を維持し、DNA 損傷後の細胞の運命を決定する役割を担っている。一時的な細胞周期の停止による DNA 損傷修復か、さもなければアポトーシスによる細胞死を司る。p53 タンパク質の発現は、DNA 損傷直後に増加する。p53 タンパク質レベルの増加は、細胞内の DNA 損傷の程度に比例することが示されている[86]。p53 の活性化の程度によって、多様な経路が活性化される。細胞質内の p53 はミトコンドリアに局在することができ、ミトコンドリアの透過を直接促進する Bax と Bak に結合して中和することにより、ミトコンドリアからの MOMP とシトクロム c の放出を防ぐ。一方、p53 は細胞周期の停止を誘導している間はミトコンドリアに局在していない[86]。Bax の遊離と p53 との相互作用により、Bax と Bak のオリゴマー化が起こり、ミトコンドリア膜にチャネルを形成して、MOMP、シトクロム c の遊離、それに続くアポトソームの形成を誘導する[87]。p53 の発現レベルは、アポトーシスをするかどうかの決定に影響を与える可能性がある。放射線誘発アポトーシスに感受

性のある組織（脾臓、胸腺、精巣）では、放射線抵抗性のある組織（肝臓、腎臓）と比べて p53 タンパク質の増加がより急速であることが示されている[88]。

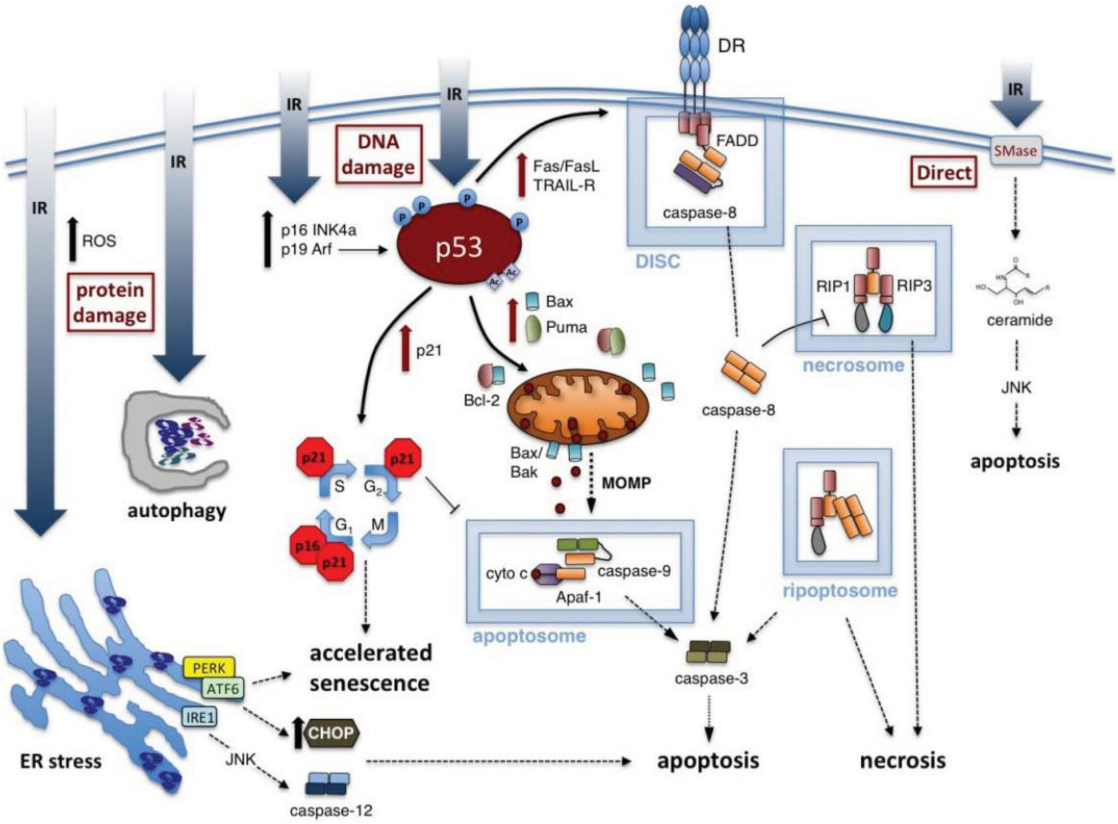


図 1-16 被ばく細胞における電離放射線に対する分子応答[76]。被曝細胞の線量と放射線感受性に応じて、IR はアポトーシスやネクローシスなどの細胞死を誘導したり、老化を促進させたりする。p53 の発現はリン酸化やアセチル化などの様々な翻訳後修飾と関連しており、IR 誘発 DNA 損傷に対する細胞応答における重要なステップである。老化の促進は、p53 依存的な p21/waf1 の誘導や、他の細胞周期抑制タンパク質のアップレギュレーションによって生じる。p53 の活性化は、内在性または外在性のアポトーシス細胞死を媒介するアポトーシス分子の合成を誘発する（赤矢印、p53 依存性）。内在性アポトーシスは、ミトコンドリア外膜透過性化（MOMP）を制御する Bcl-2 ファミリータンパク質によって支配され、一方、外在性アポトーシスは、Fas のようなデスレセプター（DR）を通してシグナル伝達される。いずれのアポトーシスも、アポトソームと死誘導シグナル伝達複合体（DISC）を含む大きな多タンパク質プラットフォームの集合に起因しており、これらの複合体はカスパーゼの活性化を促進する。RIP-1 および/または RIP-3 を含むタンパク質複合体（ネクロソームなど）は、特定の

条件下（例えば、カスパーゼ-8 の阻害）でプログラムされた壊死の引き金となる。IR は酸化タンパク質やミスフォールディングタンパク質の蓄積に応答して、ER ストレスやオートファジーを誘発し、アポトーシスを誘導する。

1.6.6　放射線照射による細胞死の定量手法

前述のように、電離放射線は DNA 損傷を生じさせ、細胞死を誘発する。この細胞死を定量する手法の一つに、コロニー形成アッセイ（clonogenic assay）がある。1956 年、Puck と Marcus が、適切な培地を用いて培養皿にプレーティングした単一哺乳類細胞のコロニー形成能力を評価するための細胞培養技術について記述した論文を発表した[90]。この方法が単一の細胞がコロニーに成長する能力を利用した *in vitro* 細胞生存アッセイとして今日でも用いられている。

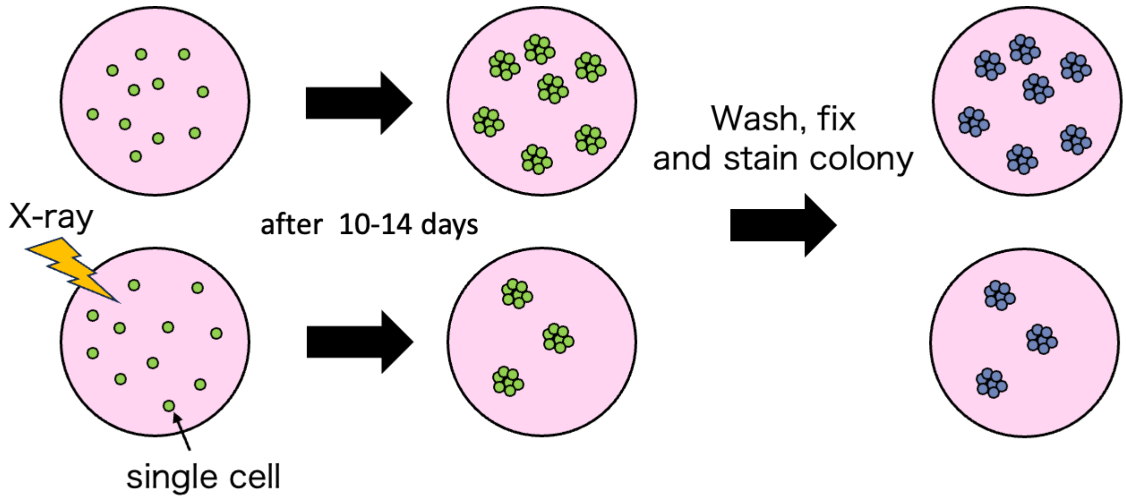


図 1-17 コロニー形成アッセイのプロトコル概略図。control と X 線照射群のサンプルを用意する。ここで、細胞は培養皿上に均一かつまばらに播種される必要がある。X 線照射群への照射後、2、3 日おきの培地の交換を行い、10–14 日後に細胞の固定と染色を行う。なお、コロニーは 50 以上の細胞の集まりと定義される。control におけるコロニー数/播種数を plating efficiency（PE）とよび、X 線照射群のコロニー形成率を PE で除することで細胞生存率（surviving fraction; SF）を計算することができる。

1.6.7　放射線誘発性細胞死の細胞周期依存性

DNA 損傷を受けた細胞周期位相によって DNA 損傷修復機構が異なることを前述した。ここで、DNA 損傷を受けた細胞周期位相が最終的な細胞生存に及ぼす影響について論ずる。

1960 年代後半から、細胞の年齢や細胞周期位相に対する放射線応答の依存性が調査されるようになった[91]。チャイニーズハムスターの細胞周期同調細胞を用いた研究では、照射時の細胞周期位相によって放射線に対する細胞の反応に差があることが示された[92]。一般に、M 期と G2 期に感受性が高く、G1 期では感受性が低く、S 期の後半では最も感受性が低い（図 1−16）。その後、様々な細胞株（HeLa 細胞、吉田肉腫細胞、マウス線維芽細胞、マウス L 細胞など）を用いた細胞周期同調研究において、細胞周期位相の影響が調べられた[93]。これらの実験においては、チミジン、血清飢餓、分裂期採集法（mitotic shake-off）、ヒドロキシ尿素を用いて細胞周期を同調が行われた。同調法の違いにかかわらず、放射線感受性は有糸分裂期に最大になり、抵抗性は S 期に上昇し、S 期の後半に最大に達することが見出されている。このような知見から、放射線に感受性のある細胞周期の相で腫瘍細胞を同調させることで、放射線治療の治療効果を高める可能性が示唆されている[94]。

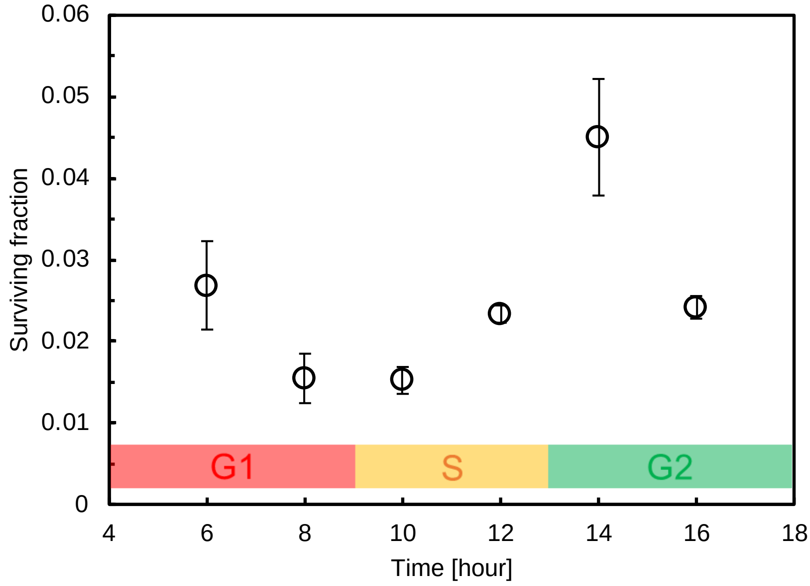


図 1-18 HeLa.S-Fucci 細胞の放射線感受性の細胞周期依存性のグラフ[97]。分裂期採集法を用いて細胞周期を同調させた HeLa.S-Fucci 細胞に対し、各細胞周期位相で X 線を 6 Gy 照射した場合の SF をコロニー形成法により定量した。G2 期に照射に感受性が高く、G1 期では感受性が低く、S 期の後半では最も感受性が低いという従来の知見と一致した。

1.6.8　化学放射線療法と細胞周期

抗がん剤の中には特定の細胞周期のチェックポイントで細胞を停止させることができるものがあるため、細胞周期の放射線感受性相（すなわち G1 および G2/M）で細胞を停止させるために、様々な抗がん剤の使用が検討されてきた。例えば、ビンブラスチンやビンクリスチンは放射線抵抗性の S 相で細胞を停止させ、パクリタキセルは細胞周期の放射線感受性 G2/M 相で細胞をブロックする[95]。ヒトリンパ芽細胞や神経膠腫細胞におけるパクリタキセルの効果を調べた in vitro 研究から、放射線による細胞毒性の程度は、パクリタキセルの処理期間と細胞周期における細胞の位置の両方に依存することが示されている[95]。パクリタキセルの濃度、培養時間、放射線分割、放射線スケジュール、パクリタキセル投与と RT の順序などの実験条件も細胞毒性効果に影響することが分かっており、パクリタキセルによる放射線増感には G2/M 期細胞の増加に加えて他のメカニズムも関与していることが示唆されている[96]。

1.7　本論文における研究目的

今日まで、放射線照射時の細胞周期と細胞応答について様々な研究が行われてきたものの、主な研究対象は DNA 修復と細胞生存であり、その他の細胞応答についての知見は依然として乏しい。特に、がん治療後の予後に関わる浸潤や転移に関与する細胞遊走の放射線応答に関してはほとんど報告がない。そこで本論文では、放射線照射後の細胞遊走能の変化とその細胞周期依存性について解析し、取得したデータをパラメータとして腫瘍組織からのがん細胞の遊走パターンをさまざまな条件下で予測可能な数理モデルを開発することを目的とした。とくに、細胞遊走について放射線応答を定量化することは、放射線照射後の生物学的影響のより正確な評価へ貢献することが期待される。

本論文では、細胞周期同調後の細胞集団の細胞周期変化および放射線応答についての研究成果を第 2 章に、放射線照射後の細胞遊走変化の細胞周期依存性の調査ならびに細胞遊走シミュレーションの開発についての研究成果を第 3 章に記述した。第 4 章では、本論文全体の総括と、2 課題に対する今後の課題を記述した。

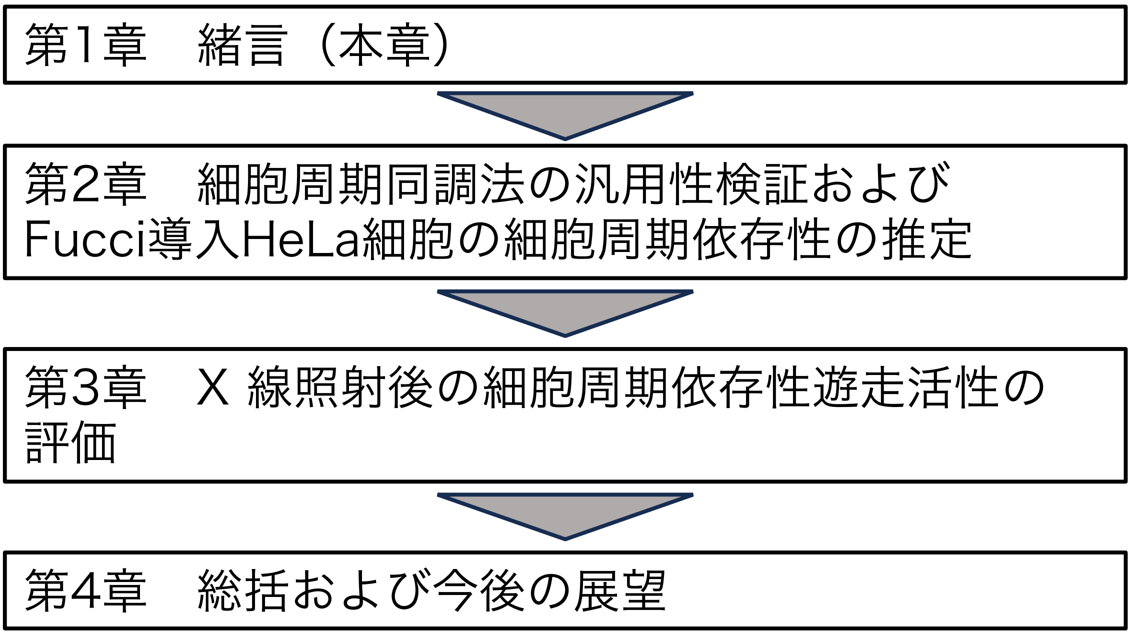

第1章　緒言（本章）
第2章　細胞周期同調法の汎用性検証および Fucci導入HeLa細胞の細胞周期依存性の推定
第3章　X 線照射後の細胞周期依存性遊走活性の評価
第4章　総括および今後の展望

図 1-19 本論文の構成

参考文献

1. Janmey, Paul A. "The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling." *Physiological reviews* 78.3 (1998): 763–781.
2. G. Nicolis and I Prigogine, Self-organization in nonequilibrium systems : from dissipative structures to order through fluctuations. New York : Wiley, 1977.
3. Hohmann, Tim, and Faramarz Dehghani. "The cytoskeleton—a complex interacting meshwork." *Cells* 8.4 (2019): 362.
4. G. Salbreux, G. Charras and E. Paluch, Trends. Cell Biol., 22, 536 (2012).
5. M. Murrell, P. W. Oakes, M. Lenz and M. L. Gardel, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 16, 486 (2015).
6. J. A. Cooper, "The Role of Actin Polymerization in Cell Motility," Annu. Rev. Physiol., vol. 53, no. 1, pp. 585–605, Oct. 1991.
7. S. Jansen, A. Collins, C. Yang, G. Rebowski, T. Svitkina, and R. Dominguez, "Mechanism of actin filament bundling by fascin," J. Biol. Chem., vol. 286, no. 34, pp. 30087–30096, 2011.
8. Wen, Qi, and Paul A. Janmey. "Polymer physics of the cytoskeleton." *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 15.5 (2011): 177–182.
9. Holy, Timothy E., and Stanislas Leibler. "Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.12 (1994): 5682–5685.
10. Brangwynne, Clifford P., et al. "Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement." *The Journal of cell biology* 173.5 (2006): 733–741.
11. Tsai, Ming-Ying, et al. "A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly." *Science* 311.5769 (2006): 1887–1893.
12. Manahan, C. L., Iglesias, P. A., Long, Y. and Devreotes, P. N. Chemoattractant signaling in dictyostelium discoideum. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 20(2004), 223–253.
13. Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709.
14. Fritz-Laylin, Lillian K., and Margaret A. Titus. "The evolution and diversity of actin-dependent cell migration." *Molecular Biology of the Cell* 34.12 (2023): pe6.
15. Mitchell, David R. "Evolution of cilia." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9.1 (2017): a028290.
16. Shih, Sheng Min, et al. "Intraflagellar transport drives flagellar surface motility." *Elife* 2 (2013): e00744.
17. Roberts, Thomas M., and Murray Stewart. "Nematode sperm: amoeboid movement without actin." Trends in cell biology 7.9 (1997): 368–373.
18. Abercrombie, Michael. "The Croonian Lecture, 1978-The crawling movement of metazoan cells." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 207.1167 (1980): 129–147.
19. Weaver, A. M., Young, M. E., Lee, W. L. and Cooper, J. A. Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Cell Biol* 15(2003), 23–30.
20. Paluch, Ewa K., and Erez Raz. "The role and regulation of blebs in cell migration." *Current opinion in cell biology* 25.5 (2013): 582–590.
21. Zhu, Jie, and Alex Mogilner. "Comparison of cell migration mechanical strategies in three-dimensional matrices: a computational study." *Interface focus* 6.5 (2016): 20160040.
22. Blaser, Heiko, et al. "Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow." *Developmental cell* 11.5 (2006): 613–627.
23. Grinnell, Frederick. "Migration of human neutrophils in hydrated collagen lattices." *Journal of cell science* 58.1 (1982): 95–108.
24. Maugis, Benoît, et al. "Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility." *Journal of cell science* 123.22 (2010): 3884–3892.
25. Sahai, Erik. "Mechanisms of cancer cell invasion." *Current opinion in genetics & development* 15.1 (2005): 87–96.
26. Sanz-Moreno, Victoria, and Christopher J. Marshall. "The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration." *Current opinion in cell biology* 22.5 (2010): 690–696.
27. Parri, Matteo, and Paola Chiarugi. "Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control." *Cell communication and signaling* 8 (2010): 1–14.
28. Bergert, Martin, et al. "Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.36 (2012): 14434–14439.
29. Renkawitz, Jörg, et al. "Adaptive force transmission in amoeboid cell migration." *Nature cell biology* 11.12 (2009): 1438–1443.

30. Yoshida, Kunito, and Thierry Soldati. "Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes." *Journal of cell science* 119.18 (2006): 3833–3844.
31. Sahai, Erik, and Christopher J. Marshall. "Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis." *Nature cell biology* 5.8 (2003): 711–719.
32. Wolf, Katarina, et al. "Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal–amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis." *The Journal of cell biology* 160.2 (2003): 267–277.
33. B allestrem, Christoph, Bernhard Wehrle-Haller, and Beat A. Imhof. "Actin dynamics in living mammalian cells." *Journal of cell science* 111.12 (1998): 1649–1658.
34. Olguin-Olguin, Adan, et al. "Chemokine-biased robust self-organizing polarization of migrating cells in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.7 (2021): e2018480118.
35. Niessen, Carien M. "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." Journal of investigative dermatology 127.11 (2007): 2525–2532.
36. Yamanaka, Hiroaki, and Shigeru Kondo. "Rotating pigment cells exhibit an intrinsic chirality." *Genes to Cells* 20.1 (2015): 29–35.
37. Carmona-Fontaine, Carlos, et al. "Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration." *Nature* 456.7224 (2008): 957–961.
38. Condeelis, John, Robert H. Singer, and Jeffrey E. Segall. "The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005): 695–718.
39. Mort, Richard L., et al. "Reconciling diverse mammalian pigmentation patterns with a fundamental mathematical model." *Nature communications* 7.1 (2016): 10288.
40. Friedl, Peter, and Darren Gilmour. "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." *Nature reviews Molecular cell biology* 10.7 (2009): 445–457.
41. Maini, R. N., et al. "Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate." *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 50.4 (2004): 1051–1065.
42. Tomlin, Claire J., and Jeffrey D. Axelrod. "Biology by numbers: mathematical modelling in developmental biology." *Nature reviews genetics* 8.5 (2007): 331–340.
43. Ariel, Gil, et al. "From organized internal traffic to collective navigation of bacterial swarms." *New Journal of Physics* 15.12 (2013): 125019.
44. Friedl, Peter, et al. "Classifying collective cancer cell invasion." *Nature cell biology* 14.8 (2012): 777–783.
45. Friedl, Peter, and Darren Gilmour. "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." *Nature reviews Molecular cell biology* 10.7 (2009): 445–457.
46. Graner, François, and James A. Glazier. "Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model." *Physical review letters* 69.13 (1992): 2013.
47. Deutsch, Andreas, and Sabine Dormann. *Mathematical modeling of biological pattern formation*. Birkhäuser Boston, 2005.
48. Drasdo, Dirk, and Stefan Höhme. "A single-cell-based model of tumor growth in vitro: monolayers and spheroids." *Physical biology* 2.3 (2005): 133.
49. Palsson, Eirikur, and Hans G. Othmer. "A model for individual and collective cell movement in Dictyostelium discoideum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.19 (2000): 10448–10453.
50. Schaller, Gernot, and Michael Meyer-Hermann. "Multicellular tumor spheroid in an off-lattice Voronoi-Delaunay cell model." *Physical Review E* 71.5 (2005): 051910.
51. Sharp, David J., Gregory C. Rogers, and Jonathan M. Scholey. "Microtubule motors in mitosis." *Nature* 407.6800 (2000): 41–47.
52. United Nations. Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *Report*. United Nations., 1988.
53. Chmil, Vojtěch, Alžběta Filipová, and Aleš Tichý. "Looking for the phoenix: the current research on radiation countermeasures." *International Journal of Radiation Biology* (2023): 1–19.
54. 厚生労働省: "令和 4 年(2022)人口動態統計月報年計（概数）の概況, https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai22/dl/kekka.pdf
55. Nikjoo, H., Uehara, S. & Emfietzoglou, D. 2. Basic Knowledge of Radiation. In: Nikjoo H, Uehara S, Emfietzoglou D. *Interaction of radiation with matter*. Boca Raton: *CRC Press*; 15–34 (2012).
56. Nikjoo, H., Uehara, S. & Emfietzoglou, D. 7. Interaction of Photons with Matter. In: Nikjoo H, Uehara S, Emfietzoglou D. *Interaction of radiation with matter.* Boca Raton: *CRC Press*; 89–102 (2012).
57. Chapman, J. D., Reuvers, A. P., Borsa, J., Greenstock, C. L. Chemical radioprotection and radiosensitization of Mammalian cells growing in vitro. *Radiat Res.* 56: 291–306 (1973).
58. Wouters, B. G. and Begg, A. C. Irradiation-induced damage and the DNA damage response. In: Joiner M. C. and van der Kogel A. J. (eds). *Basic Clinical Radiobiology*. London: Edward Arnold; p. 11–26 (2009).

59. Joiner, M. C., van der Kogel, A. J. and Steel, G. G. Introduction: the significance of radiobiology and radiotherapy for cancer treatment. In: Joiner M. C. and van der Kogel A. J. (eds). *Basic Clinical Radiobiology.* London: Edward Arnold; p. 1–10 (2009).
60. Wouters, B. G. Cell death after irradiation: how, when and why cells die. In: Joiner M. C. and van der Kogel A. J. (eds). *Basic Clinical Radiobiology.* London: Edward Arnold; p. 27–40 (2009).
61. Alberts, B. et al. Introduction to the cell. In: Alberts, B. et al. Molecular biology of the cell (5th edition). NY. USA: Taylor & Francis; p. 1–125.
62. Miriklis EL, Rozario AM, Rothenberg E, Bell TDM, Whelan DR. Understanding DNA organization, damage, and repair with super-resolution fluorescence microscopy. *Methods Appl. Fluoresc.* 9(3): 032002 (2021).
63. Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutat. Res.* 589(2): 111–35 (2005).
64. Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D. T., Terrissol, M. Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *Int. J. Radiat. Biol.* 71(5): 467–83 (1997).
65. Watanabe R, Rahmanian S, Nikjoo H. Spectrum of Radiation-Induced Clustered Non-DSB Damage - A Monte Carlo Track Structure Modeling and Calculations. *Radiat. Res.* 183(5): 525–40 (2015).
66. Rogakou, E. P.; Boon, C.; Redon, C.; Bonner, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146: 905–916 (1999).
67. Bhogal, N., Jalali, F. and Bristow, R. G. Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues. *Int. J. Radiat. Biol.* 85(9): 732–746 (2009).
68. Canman, C. E. Checkpoint mediators: relaying signals from DNA strand breaks. *Curr. Biol.* 13(12): R488–490 (2003).
69. Chirucella, K. K., Liang, Z. and Wilson, T. E. Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5: a012757 (2013).
70. West, S. C. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(6): 435–445 (2003).
71. Brandsma, I. and Gent, D. C. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.* 3(1): 9 (2012).
72. McVey M, Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 24(11): 529–38 (2008).
73. Seol, Ja-Hwan, Eun Yong Shim, and Sang Eun Lee. "Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 809 (2018): 81–87.
74. Kerr, John FR, Andrew H. Wyllie, and Alastair R. Currie. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics." *British journal of cancer* 26.4 (1972): 239–257.
75. Wyllie, A. H., J. F. R. Kerr, and A. R. Cut-tie. "Cell death: the significance of apoptosis. mt." *Rev. Cytol* 68.
76. Panganiban, Ronald-Allan M., Andrew L. Snow, and Regina M. Day. "Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells." *International journal of molecular sciences* 14.8 (2013): 15931–15958.
77. Verheij, Marcel, and Harry Bartelink. "Radiation-induced apoptosis." *Cell and tissue research* 301.1 (2000): 133–142.
78. Sinha, Krishnendu, et al. "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis." *Archives of toxicology* 87 (2013): 1157–1180.
79. Weber, Gregory F., and A. Sue Menko. "The canonical intrinsic mitochondrial death pathway has a non-apoptotic role in signaling lens cell differentiation." *Journal of Biological Chemistry* 280.23 (2005): 22135–22145.
80. Jürgensmeier, Juliane M., et al. "Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.9 (1998): 4997–5002.
81. Riedl, Stefan J., and Guy S. Salvesen. "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nature reviews Molecular cell biology* 8.5 (2007): 405–413.
82. Galluzzi, L., et al. "No death without life: vital functions of apoptotic effectors." *Cell Death & Differentiation* 15.7 (2008): 1113–1123.
83. Galluzzi, L., et al. "No death without life: vital functions of apoptotic effectors." *Cell Death & Differentiation* 15.7 (2008): 1113–1123.
84. Srinivasula, Srinivasa M., et al. "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." *Molecular cell* 1.7 (1998): 949–957.
85. Levine, Arnold J. "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." *cell* 88.3 (1997): 323–331.
86. Vaseva, Angelina V., and Ute M. Moll. "The mitochondrial p53 pathway." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1787.5 (2009): 414–420.

87. Chipuk, Jerry E., et al. "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis." *Science* 303.5660 (2004): 1010–1014.
88. Vaseva, Angelina V., and Ute M. Moll. "The mitochondrial p53 pathway." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1787.5 (2009): 414–420.
89. Chilakamarthi, Ushasri, and Lingamallu Giribabu. "Photodynamic therapy: past, present and future." *The Chemical Record* 17.8 (2017): 775–802.
90. Puck, Theodore T., and Philip I. Marcus. "Action of x-rays on mammalian cells." *The Journal of experimental medicine* 103.5 (1956): 653–666.
91. Sinclair, W. K., and Richard A. Morton. "Variations in X-ray response during the division cycle of partially synchronized Chinese hamster cells in culture." *Nature (London)* 199.4899 (1963).
92. Sinclair, W. K., and R. A. Morton. "X-ray and ultraviolet sensitivity of synchronized Chinese hamster cells at various stages of the cell cycle." *Biophysical journal* 5.1 (1965): 1–25.
93. Terasima, Toyozo, and L. J. Tolmach. "Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle." *Biophysical journal* 3.1 (1963): 11–33.
94. Zoli, Wainer, et al. "Schedule-dependent interaction of doxorubicin, paclitaxel and gemcitabine in human breast cancer cell lines." *International journal of cancer* 80.3 (1999): 413–416.
95. p53." *Strahlentherapie und Onkologie* 175 (1999): 2–6.
96. Dey, Swatee, et al. "Low-dose fractionated radiation potentiates the effects of Paclitaxel in wild-type and mutant p53 head and neck tumor cell lines." *Clinical cancer research* 9.4 (2003): 1557–1565.
97. Seino R, Uno H, Prise KM, Fukunaga H. Cell Cycle Dependence of Cell Survival following Exposure to X-rays in synchronous HeLa Cells expressing Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicators. *Biomed Res*, 45(2024): 25–31.

第 2 章
細胞周期同調法の汎用性検証及び Fucci 導入 HeLa 細胞の細胞周期依存性の推定

2.1　緒言

1951 年、オートラジオグラフィーの技術を開発した Pelc と Howard は、細胞には分裂周期の間に DNA 合成の期間（今日では S 期として知られている）があることを実験的に証明した[1]。この発見をきっかけとして、今日では「細胞周期」の概念が確立されている。

培養細胞における細胞周期の同調は、放射線生物学分野での大きな進歩を支えてきた実験技術といえる。実際、細胞の有糸分裂に伴う培養皿との接着の後退を利用した分裂期収集法は、1960 年代に Terasima と Tolmach によって確立され[2]、放射線感受性が細胞周期位相に依存して変化するという歴史的発見につながった[3]。この方法の最大の利点は、細胞代謝を阻害する試薬を用いる方法とは異なり、細胞への生理的影響が最小限であることである。さらに、この手法は複雑な工程を必要としないため容易に再現できる。

2008 年に開発された蛍光ユビキチン化ベースの細胞周期指標（FUCCI）は、生細胞における細胞周期の進行をリアルタイムで観察できる蛍光プローブを形成する[4]。Geminin は M 期と G1 期にユビキチン化されプロテアソームで分解され、Cdc10 dependent transcript 1 (Cdt1)は S 期と G2 期にユビキチン化されプロテアソームで分解される。S/G2 期に発現する Geminin と G1 期に発現する Cdt1 を、それぞれ緑色蛍光タンパク質（単量体 Azami-Green1（mAG1））と赤色蛍光タンパク質（単量体 Kusabira-Orange2（mKO2））と組み合わせることで、細胞周期位相により異なる蛍光波長で可

視化することができる。このイメージング法により、培養細胞の構造変化や行動変化における細胞周期の時間的あるいは空間的なパターンを探索することが可能になる[5]。

本研究の目的は、FUCCI を発現するヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞を用いて[4]、分裂期採取法の汎用性を検証するとともに、細胞周期に依存する放射線感受性の変化を調べることである。まず、FUCCI 発現細胞を蛍光顕微鏡下で観察することにより、分裂期採取法の有用性、すなわち細胞集団の細胞周期同調率の経時変化を評価した。また、フローサイトメトリーによる細胞内 DNA 含量の測定により、細胞集団の各細胞周期位相の割合を定量した。さらに、放射線照射後の細胞生存率の評価にはコロニー形成アッセイを用いた[6]。我々の知る限り、これらの方法を組み合わせて HeLa-FUCCI 細胞の放射線感受性とその細胞周期性を検討したのは本研究が初めてである。

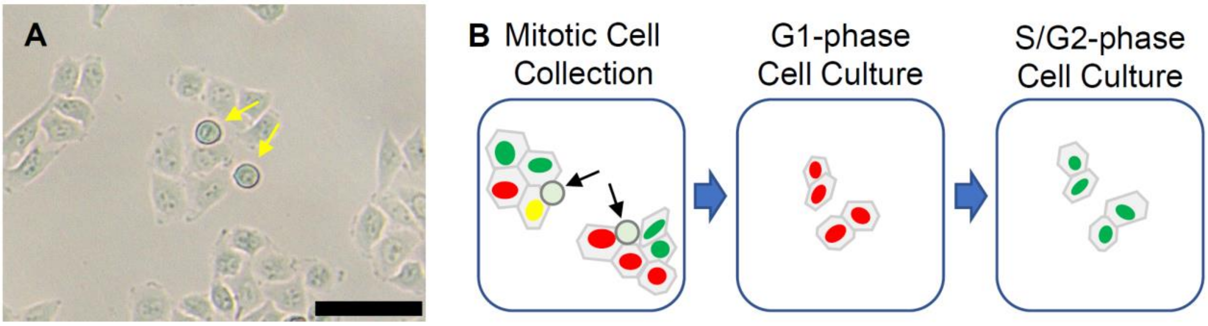


図 2-1 分裂期採集法の概要[15]。A 分裂期細胞（矢印）の光学像。スケールバーは 50 μmを示す。動物細胞の多くは分裂期に丸い形状となり、ディッシュとの接着が弱くなる。この状態の細胞を mitotic rounding cell という。B 分裂期採集法の手順。培養した HeLa-FUCCI 細胞集団中の有糸分裂細胞（矢印）のみを回収し、細胞周期の同調した集団を得る。新しいディッシュでは、細胞周期が G1 期から S/G2 期に進むにつれて、蛍光顕微鏡下で細胞核が赤色から緑色に変化する。

2.2　方法

2.2.1　培養細胞および培養方法

HeLa-FUCCI 細胞のサブラインである HeLa.S-FUCCI[5]（RCB2812, BioResource Center, Japan）を使用した。10% fetal bovine serum（Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX, USA）および 1% penicillin/streptomycin（P4333, Sigma, USA）を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA)を使用し、環境気温 37 ℃および 5% CO2 条件下で培養した。細胞の継代には、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline; PBS）にて細胞を洗浄した後、0.25w/v% Trypsin-1mmol/L EDTA 4Na Solution with Phenol Red（209-16941, Fujifilm Wako, Japan）にて細胞を単離した。培地の添加にて Trypsin の反応を停止させ 1.2×10^3 rpm で遠心後、上澄みを除去し新たな培地にて作成した細胞懸濁液を培養容器に播種した。

2.2.2　分裂期採集法

先に述べたように、培養細胞集団の数%を占める分裂期細胞を採取することで、細胞周期の同調を高度に維持しながら培養することができる（図 2-1）。通常、表面に接着して成長する培養動物細胞は、有糸分裂の際に丸くなり、表面への接着がかなり弱くなることが多い。この接着の後退を利用して、ランダムに分裂する動物細胞集団から分裂期細胞を選択的に採集することができる[2]。

具体的な手順として、まず、分裂期細胞を採集する 4 時間前に培地を交換し、死細胞を取り除いた。次に、採集時に再度培地を交換した後、細胞を培養した直径 150 mm のディッシュの底を軽く叩き、底に薄く付着した分裂期細胞を培地中に浮遊させた。分裂期細胞を含んだ培地を回収し、2.2.3 の画像解析に際しては 12 mm のガラスベースディッシュ（IWAKI, Sayama-shi, Japan）に播種した。2.2.4 のフローサイトメトリーでは直径 60 mm のディッシュに播種した。

なお、コンフルエンス率がおよそ 80%以上の場合は、分裂期細胞の採集時に分裂期以外の細胞も剥がれやすい傾向があったため、2.2.1 の方法で継代を行う際は、分裂期

採集法実施時にコンフルエンス率が 50–60%となるようにした。

2.2.3　画像解析

蛍光顕微鏡は All-in-One BZ-9000（KEYENCE, Osaka, Japan）を用いた。励起波長と発光波長は緑では 470 nm と 535 nm、赤では 540 nm と 605 nm であった。蛍光顕微鏡では、G1 期にある細胞の核は赤色、S/G2 期にある細胞の核は緑色で観察できる。両者の発現が重なる S 期初期は黄色である。非照射（コントロール）細胞および分裂期採集法後の細胞サンプルについて、2 時間ごとに 120 個以上の細胞を観察した。

統計学的解析はカイ二乗（χ^2検定）検定を用い、有意水準を $P < 0.05$ とした。

2.2.4　フローサイトメトリーによる DNA 含量解析

ヨウ化プロピジウム (PI) 染色を利用して、細胞周期の位相分布を評価した。 分裂期採集法により細胞周期を同調させた細胞を、0.05w/v% Trypsin-EDTA で処理することで剥がし、99.5 %エタノールに懸濁し 4 ℃で一晩固定した。次に、細胞を PBS で洗浄し、PI/RNase 染色溶液（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を添加して、暗所、室温で 30 分間インキュベートした。細胞の DNA 含有量と細胞周期プロファイルを、Acoustic Focusing フローサイトメーター（Thermo Fisher Scientific)）によって評価した。

2.2.5　照射条件

X 線発生装置 MBR-1520R-4（Hitachi Power Solutions Co., Ibaraki, Japan）を用い、固有フィルタ 1.6-mm Be および付加フィルタ 1.0-mmAl の条件下で 150 kVp の X 線を 1.83 Gy/分で細胞に照射した。線量は 0, 2, 4, 6, 8 Gy とした。空気中の吸収線量は、照射中にサンプルの隣に設置した指頭型電離箱でモニターした。

2.2.6　コロニー形成アッセイ

コロニー形成アッセイには 60 mm ディッシュ（SPL Life Sciences, Pocheon-si, South

Korea）を用いた。分裂期の細胞を播種し、6 時間以上培養しディッシュに接着させた。室温で照射後、コロニー（50 個以上）が形成されるまで培養し、Giemsa azur eosin methylene blue solution（Merck, Darmstadt, Germany）で染色した。目視でコロニーを計数した。

PE はコロニー数/播種細胞数で計算し、SF＝実験 PE/対照 PE の式により算出した。Linear-Quadratic（LQ）モデルは、(1)1 回のヒット（投与量に線形に関係）と(2)2 回のヒット（投与量に二次関数的に関係）により生じる DNA 二本鎖切断の確率により照射後の細胞生存をモデリングしている[7]。コロニー形成アッセイにより得られた SF データに対し、LQ モデル$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$を用いて最小二乗法でフィッティングした。フィッティングにより得られたパラメータαとβから、α/βを計算した。

2.3　結果と考察

2.3.1　細胞周期同調法の汎用性検証

HeLa-FUCCI 細胞の分裂期採集法後、ほぼ全ての細胞がディッシュの底に接着するのに少なくとも 6–8 時間かかった。ディッシュに接着した細胞の蛍光画像から、細胞周期の進行を観察した。図 2-2A が示すように、分裂期採集法 8 時間後と 14 時間後の蛍光顕微鏡像では、細胞周期の同調が明瞭に見られた。図 2-2B は、蛍光画像において分裂期細胞採集後の細胞集団における細胞核の色を計数し、色の割合を算出したものである。赤のピークは 6 時間後、緑のピークは 14 時間後であった。これらの割合は、コントロール群と同調群で有意に異なっていた。ただし、上述したように、6 時間の時点では、接着していない細胞がまだ多く存在した。16 時間後には明瞭な M 期細胞が出現し、倍加時間は約 18–20 時間であった。少なくとも 24 時間は細胞周期の同調が維持されていたが、倍加時間の 2 倍以上である 44 時間後には、コントロール群と比較して蛍光の割合に有意差は見られなかった。この観察結果から、細胞周期の 1 周目のサイクルでは、ある程度の細胞周期の同調が維持されていることが確認され

た。

HeLa 細胞では、細胞集団の細胞周期を同調化させる細胞間相互作用は確認されておらず、先行研究によれば、細胞周期を標的としたバイスタンダー効果は検出されていない[8]。したがって、放射線照射の有無によらず少なくとも 24 時間までは細胞周期の同調が維持され、その後は個々の細胞が持つ細胞周期のランダム性により同調が崩れていくものと考えられる。

この方法には多くの技術的限界がある。例えば、先に指摘したように、有糸分裂後の各細胞の G1 期の長さには多様性がある[9]ため、細胞周期の同調は 1 周期で破綻することが多い。 また、赤色細胞は G1 期のみ、緑色細胞は S 期と G2 期が混在しているとみなすことができるため、色と細胞周期は一対一に対応していない。したがって、細胞周期のすべての過程を色で区分することはできない。しかし、蛍光顕微鏡で細胞周期の同調を簡単に確認できるメリットは、こうした技術的制限のデメリットよりも大きいであろうと考えられた。

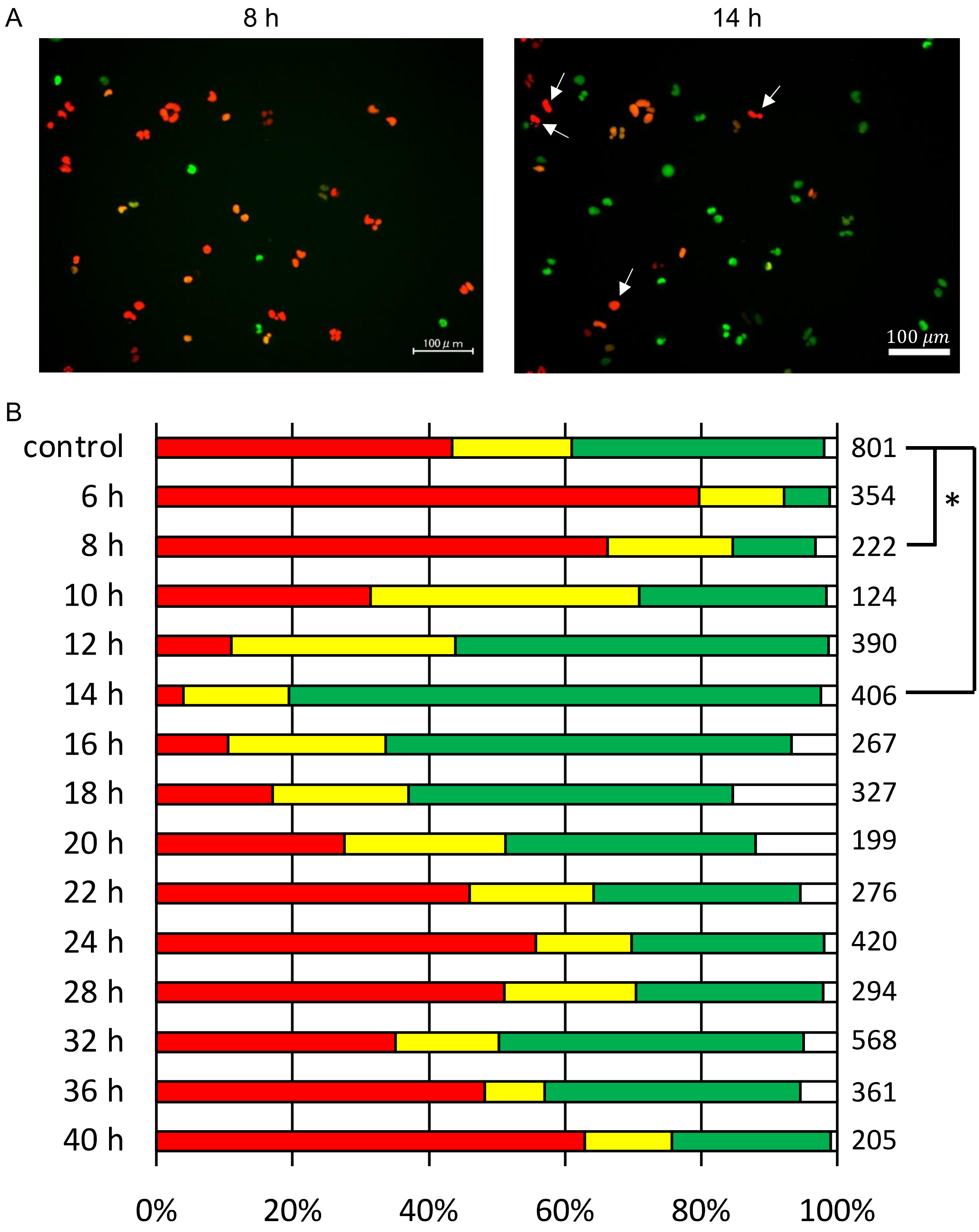


図 2-2 HeLa-FUCCI 細胞の細胞周期同調[14]。A 分裂期採集法後 8 時間（左）と 14 時間（右）の HeLa-FUCCI 細胞の蛍光顕微鏡像。14 時間後の G1 期にある細胞を赤（矢印）で示す。スケールバーは 100 μmを示す。B コントロール群と細胞周期同調群の HeLa-FUCCI 細胞における蛍光分布のまとめ。帯の色は細胞核が示した蛍光色を示す。*は P < 0.001（χ^2検定）を示す。

2.3.2　Fucci 導入 HeLa 細胞の細胞周期依存性の推定

図 2-3 は、分裂期細胞採集後 0–24 時間の DNA 含量分布を示す。図から、S 期の割合は分裂期採集法後約 12 時間でピークに達した。このように、FUCCI プローブでは技術的に区別が困難であった S 期（分裂期採集法後約 12 時間）と G2 期（約 14-16 時間）を明確に分離できた。

これらの結果は、HeLa-FUCCI 細胞は 6–8 時間で G1 期のピークに達し、約 12 時間で S 期のピークに達し、14–16 時間で G2 期のピークに達し、分裂期採集法後 18–20 時間で再び有糸分裂に入ることを示している。HeLa 細胞では、細胞採取後の各細胞の G1 期の長さに多様性がある。さらに、細胞集団の細胞周期を同調させる細胞間相互作用は確認されておらず、前述の通り放射線による細胞周期へのバイスタンダー効果も検出されていない[8]。したがって、同調した HeLa-FUCCI 細胞では、個々の細胞が各々の細胞周期で進行する可能性がある一方で、細胞周期の 1 周期までは高度な同調性が維持されうることがこの結果からもわかる。

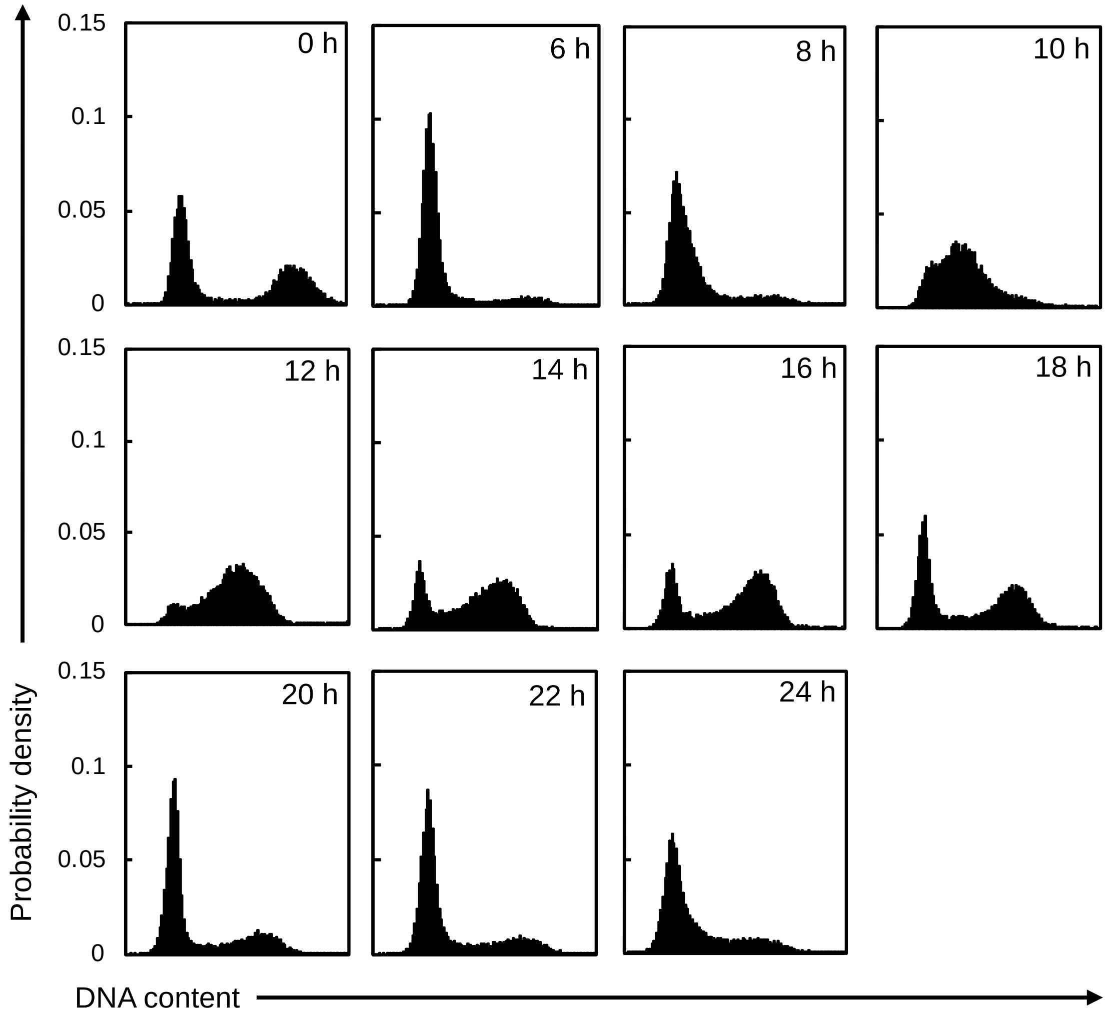
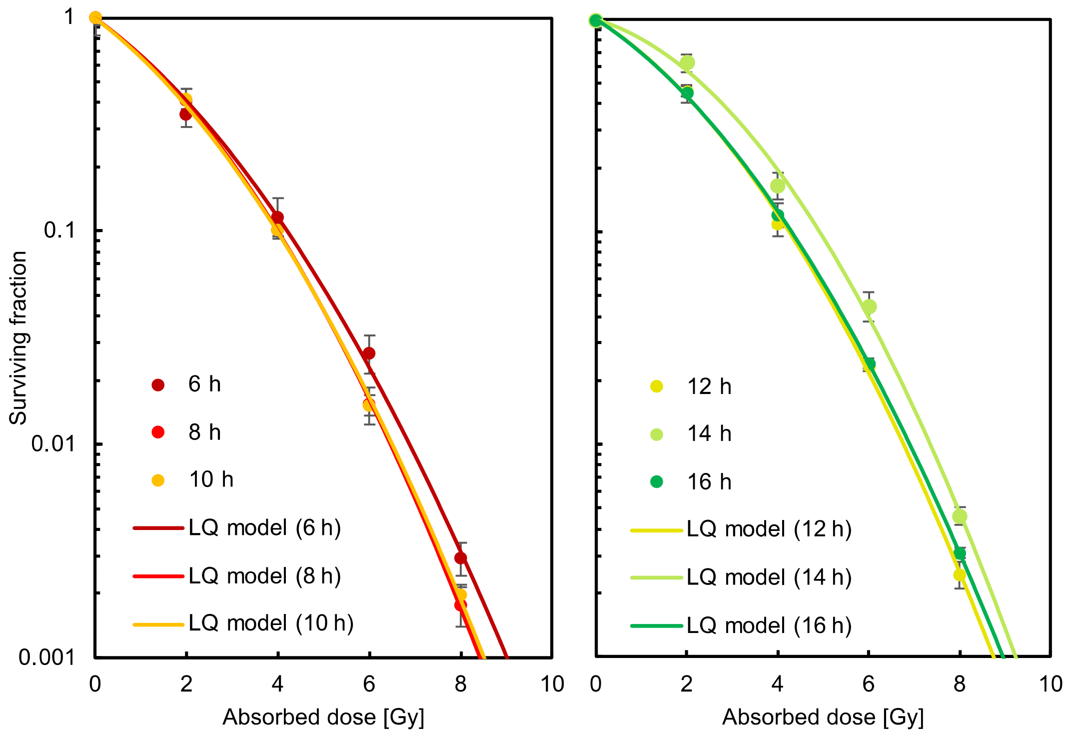


図 2-3 細胞周期同調後の HeLa-FUCCI 細胞の DNA 含量の分布[]。DNA content の最大値と最小値の間を 100 分割しヒストグラム化した。各 DNA 含量の細胞数を全体の細胞数で除することで確率密度に変換した。

コロニー形成アッセイにおいて、2–8 Gy の線量範囲で細胞放射線感受性を定量した（図 2-4）。図 2-4A に示すように、SF は 14 時間群が最も放射線抵抗性であり、8 時間群または 10 時間群が最も放射線感受性であることを示している。図 3B は、それぞれの生存曲線から計算した PE とα/βを示している。図 4 は 6 Gy X 線照射後の SF を示しており、HeLa-FUCCI 細胞は G1 期（分裂細胞収集後 6 時間）で抵抗性、S 期初期（8–10 時間）で感受性、S 期後期（12–14 時間）で急速に抵抗性、G2 期（14–16 時間）で再び感受性となることを示している。

この結果は、HeLa 細胞では G1 期初期に抵抗性を示し、その後の S 期を通して感受性を示し、G2 期で抵抗性を示したという Terasima and Tolmach による初期の報告[3]を概ね支持するものであった。さらに、その後の Djordjevic と Tolmach による G2 期における感受性の報告[10]によると、G2 期優勢群には放射線耐性を示す S 期後期の細胞が含まれるため、G2 期における放射線感受性の評価が困難であることを示唆されている。本研究では、フローサイトメトリーを用いて S 期と G2 期をより明瞭に区分しようと試みた結果、分裂期採集法後 16 時間の SF から G2 期の放射線感受性の詳細を検出することもできた。

A



B

	Plating Efficiency	*α*	*β*	*α*/*β*
6 h	0.360 ± 0.043	0.355 ± 0.049	0.046 ± 0.007	7.800 ± 1.642
8 h	0.512 ± 0.023	0.354 ± 0.017	0.055 ± 0.002	6.405 ± 0.415
10 h	0.534 ± 0.023	0.372 ± 0.029	0.052 ± 0.004	7.213 ± 0.813
12 h	0.562 ± 0.009	0.308 ± 0.031	0.055 ± 0.005	5.602 ± 0.729
14 h	0.453 ± 0.021	0.149 ± 0.050	0.065 ± 0.007	2.290 ± 0.805
16 h	0.541 ± 0.020	0.317 ± 0.012	0.051 ± 0.002	6.253 ± 0.319

図 2-4 同調 HeLa-FUCCI 細胞における X 線照射後の SF[15]。A 分裂期細胞採集後 6、8、10 時間（左）および 12、14、16 時間（右）に採取した HeLa-FUCCI 細胞の SF を 2-8Gy の放射線量範囲に対してプロットしたもの。 B 分裂期細胞採集後 6-16 時間に採取した細胞の生存曲線の LQ モデルフィッティングによる推定パラメータ。

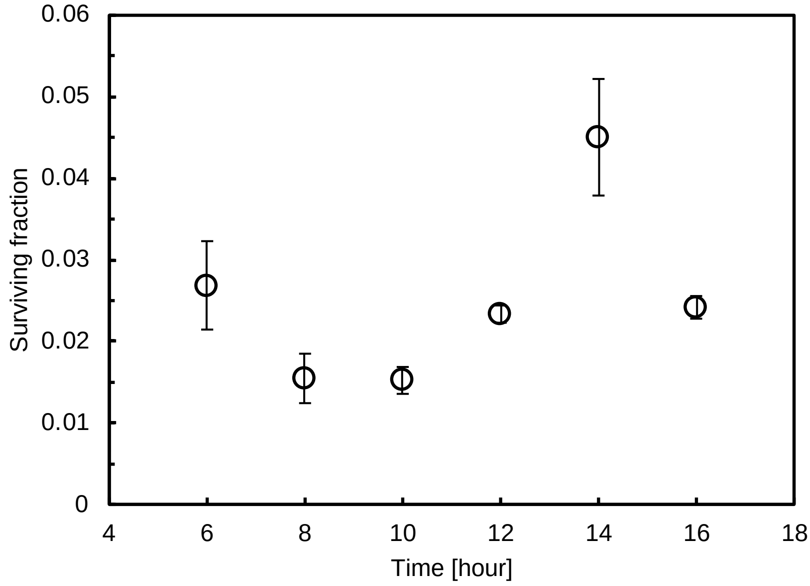


図 2-5 同調 HeLa-FUCCI 細胞における 6Gy X 線被曝後の生存率の経時的変化[15]。

本研究では、非同調集団で個々の細胞の生存を追跡できるリアルタイムイメージングによるアプローチと比較すると、技術的な限界がある。最新の FUCCI 技術である FUCCI(CA)を導入することで、従来の光学顕微鏡とともに蛍光シグナル分布を観察することにより、M 期も含めた 4 つの細胞周期すべてを光学的に分離できる[13]。今後は、放射線感受性の細胞周期依存性を明らかにするために、新しい技術をさらに活用することが必要である。加えて、本研究で採用した分裂期採集法では、細胞周期が完全に同調した細胞集団は得られない。今後、より正確な細胞周期選択法が必要となる。

細胞周期の進行は、サイクリン依存性キナーゼ（Cdks）とその制御サイクリンサブユニットによって媒介される。一方、細胞周期は様々な Cdk-サイクリン複合体の活性を制御する成長因子主導のシグナル伝達経路により進行する[11]。この細胞周期の進行とチェックポイントは、いくつかの抗がん剤の作用機序に関与しているため、これらの薬剤を併用した放射線治療の効果の殆どが細胞周期に依存している。本研究の結果は、化学療法で S 期中期から後期の核酸合成を阻害することによって、放射線治療において S 期初期の感受性を利用した治療効果の向上が可能であることを支持するものである。例えば、核酸代謝拮抗剤であるゲムシタビンは、放射線増感作用を持つことで知られているが[12]、そのメカニズムには細胞周期依存性の感受性も関与している可能性がある。より多様ながん細胞において、細胞周期の各相の放射線感受性とそのメカニズムがさらに解明されれば、細胞周期特異的な抗がん剤を併用した放射線治療の改善に関する新たな知見が得られるであろう。

参考文献

1. Howard A and Pelc SR (1951) Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature* 167, 599–600.
2. Terasima T and Tolmach LJ (1963) Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp Cell Res* 30, 344–362.
3. Terasima T and Tolmach LJ (1961) Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature* 190, 1210–1211.
4. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, et al. (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132, 487–498.
5. Sakaue-Sawano A and Miyawaki A (2014) Visualizing dpatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progressions with Fucci technology. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, pdb. prot080408.
6. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J and van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315–2319.
7. Steel GG and Peacock JH (1989) Why are some human tumours more radiosensitive than others? *Radiother Oncol* 15, 63–72.
8. Fukunaga H., Butterworth KT, McMahon SJ and Prise KM (2021b) A brief overview of the preclinical and clinical radiobiology of microbeam radiotherapy. *Clin Oncol* 33, 705–712.
9. Terasima T and Tolmach LJ (1963) Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp Cell Res* 30, 344–362.
10. Djordjevic B, Tolmach LJ (1967) X-ray sensitivity of HeLa S3 cells in the G2 phase comparison of two methods of synchronization. *Biophys J* 7, 77–94.
11. Wang Z (2021) Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells* 10, 3327.
12. Latz D, Fleckenstein K, Eble M, Blatter J, Wannenmacher M, Weber KJ (1998) Radiosensitizing potential of gemcitabine (2’,2’-difluoro-2’-deoxycytidine) within the cell cycle in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 41, 875–882.
13. Sakaue-Sawano A, Yo M, Komatsu N, Hiratsuka T, Kogure T, Hoshida T, Goshima N, Matsuda M, Miyoshi H, Miyawaki A (2017) Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle. *Mol Cell* 68, 626–640.e5.
14. Seino R, Uno H, Fukunaga H (2023) Validation of mitotic harvesting method with human cervical carcinoma HeLa cells expressing fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicators for radiation research. *Biomed Re*s 44, 181–186.
15. Seino R, Uno H, Kevin, Fukunaga H (2024) Cell Cycle Dependence of Cell Survival following Exposure to X-rays in synchronous HeLa Cells expressing Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicators. *Biomed Res* 45, 25–31.

第 3 章　X 線照射後の細胞周期依存性遊走活性の評価

緒言

3.1.1　がんの浸潤・転移と細胞遊走

がん細胞の重要な特徴として、発がんに至る過程で浸潤・転移能が活性化されることが挙げられる[1]。実際、がん患者の死亡原因の約 90%を占めるのは転移であるため[2]、腫瘍細胞の浸潤と転移を制御することは、がん治療において重要な課題である。

がんの浸潤と転移には細胞遊走が密接に関連している[3]。浸潤と転移は、個々の細胞が原発巣から解離し、血流やリンパ流に乗って離れた臓器に到達し増殖する現象と従来考えられてきた[4]。しかし、最近の研究では、浸潤と転移を誘発する因子として、腫瘍細胞周囲の微小環境の重要性も示されている[5]。いずれにせよ、浸潤と転移を制御する詳細な分子メカニズムは依然としてまだ十分に解明されていないものの、その初期段階における細胞の遊走を制御することは浸潤と転移を抑制するために重要である。

細胞周期を標的とする抗がん剤の殺細胞作用のメカニズムに関する研究は、ここ数十年で大きく進められた[6]。対照的に、浸潤と転移を抑制するメカニズムについては依然として明らかになっていない。もし放射線照射時の細胞周期位相による遊走能の違いを明らかにすることができれば、がん細胞の浸潤・転移を抑制するという観点から、最適な細胞周期標的抗がん剤を選択することが可能になると期待される。すなわち、放射線治療後の細胞周期と細胞遊走に関する基盤的知見の蓄積から、化学放射線療法の治療成績を改善するための重要な知見を得られることが期待される。

3.1.2　細胞のトラッキングとセグメンテーション

細胞遊走を検出・追跡する際、画像上の細胞の形状と位置を正確に測定する必要がある。これらの情報を個々の細胞から得るには、まず、画像上の細胞をセグメン

テーションする必要がある。図 3-1 のように、セグメンテーションとは、画像内の特定の対象領域をピクセルレベルで識別することである。細胞セグメンテーションには、完全手動のラベリング[29]、ユーザーが定義したパラメーターを用いた一連の画像変換手法[30]、大規模な訓練データセットからパラメーターを推定したディープニューラルネットワークに基づく完全自動化手法[31]など様々なものがある。近年では、画像内の対象領域を自動的にセグメンテーションするアルゴリズムが AI 分野で次々と開発されている[28]。本研究で用いた Cellpose 2.0 [10]は、細胞質と核のセグメンテーションに特化した深層学習アルゴリズムの一つである。

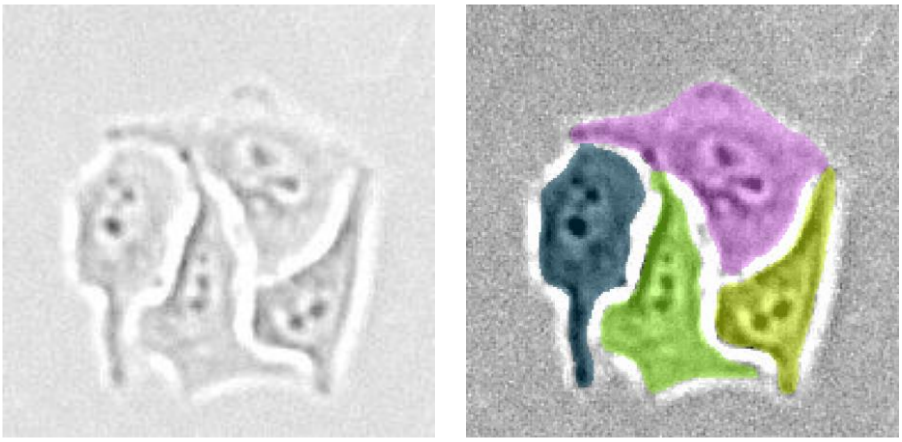


図 3-1 細胞セグメンテーションの例[37]。左：細胞の明視野画像。細胞辺縁が歪んでいるため、手動でのセグメンテーションは膨大な労力を要する。右：深層学習アルゴリズムである Cellpose 2.0 を用いて左図のセグメンテーションを行った図。境界が不鮮明な細胞質の辺縁をわずかにマスクできていない箇所があるが、細胞のほとんどの領域を ROI として認識できている。

深層学習は、複数の層を持つニューラルネットワークがデータからパターンを学習する手法のひとつである。ニューラルネットワークは「ウェイト（重み）」と呼ばれるパラメータを持っている。複数のデータセット（訓練データ）によるトレーニングを経て、ウェイトを更新・最適化することで、学習モデルは画像の複雑な特徴を学習し、訓練データとは異なる新規の画像（テストデータ）の特徴を識別できるようになる。

Cellpose 2.0 の学習モデルには、Olaf らによって生物医学のために開発されたセグメンテーション用のモデルである U-Net[32]が利用されている。図 3-1 のように、U-Net はエンコーダとデコーダから成るモデルである。エンコーダでは、入力画像を複数回畳み込み、その画像の特徴を抽出する。エンコーダには、ResNet[33]などの画像分類で優れた成果を収めているモデルの構造をほぼそのまま活用できる。畳み込み処理を使って画像のサイズを圧縮しながら、チャネル数を増やしていく工程をダウンサンプリングという。デコーダでは、エンコーダによって抽出された特徴を受け取り逆畳み込み(deconvolution)を行い、入力画像と同じサイズの確率マップを出力する。逆畳み込みによって、特徴マップを大きくすることをアップサンプリングといい、小さな特徴マップを大きな特徴マップにする処理である。単純なアップサンプリングでは物体の位置情報をうまく捉えることができないため、U-Net では、各階層においてエンコーダの特徴マップをデコーダの特徴マップに連結させることで、エンコーダ側の大きな特徴マップの情報がデコーダ側に入る。この処理により、物体の位置情報を捉えやすくしている。Cellpose 2.0 は、ダウンサンプリングとアップサンプリングがそれぞれ 4 つの空間スケールで構成され、各スケールはフィルターサイズ 3×3 の残差ブロック 2 個で構成されている。このような学習アルゴリズムを用いることで、細胞のセグメンテーション予測が可能になる。

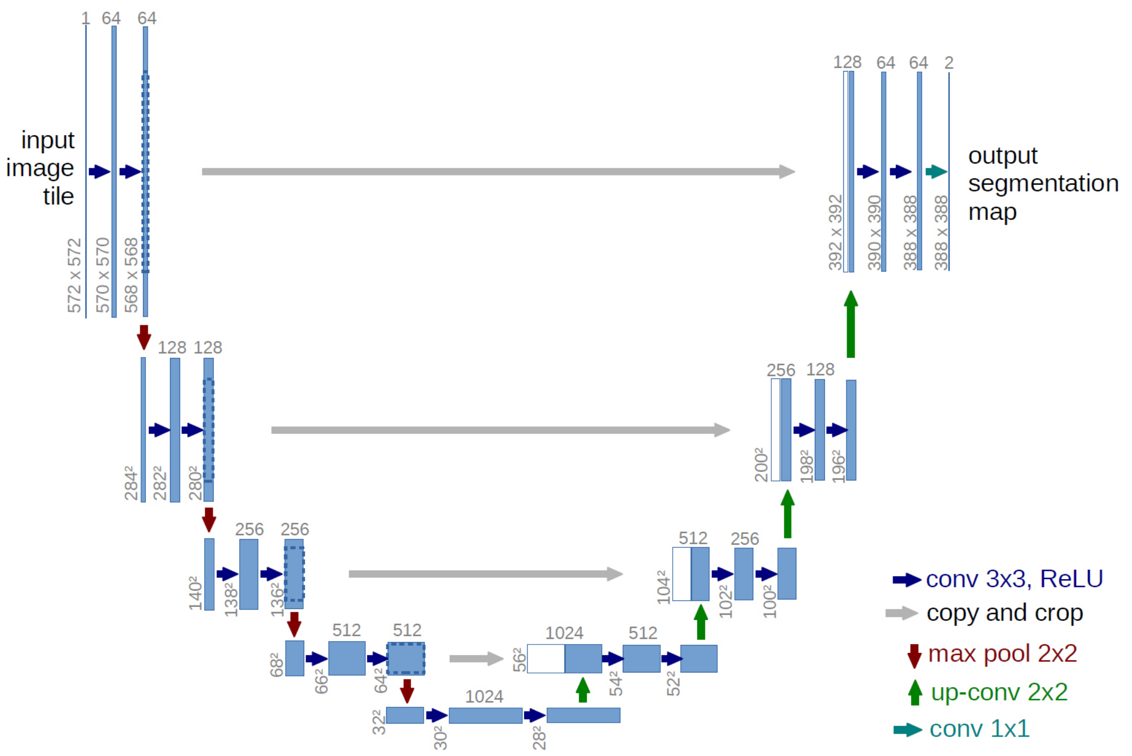


図 3-1 U-net アーキテクチャ（最低解像度の 32x32 ピクセルの例）[32]。各青枠はマルチチャンネル特徴マップに対応する。チャネルの数はボックスの上部に示されている。x-y サイズはボックスの左下端に記載されている。白いボックスはコピーされた特徴マップを表す。矢印は異なる操作を示す。

一方、深層学習においては予測モデルが訓練データに対して過度に適合してしまい、未知のデータに対してはうまく汎化できなくなる「過学習」という現象が知られている。この過学習を防ぐための手法の一つとして「正則化」がある。正則化は、モデルの学習過程にペナルティを課すことで、パラメータの訓練データへの過度な最適化を軽減する手法である。

深層学習には「ハイパーパラメータ」と呼ばれる、手動で設定する必要のあるパラメータもある。例えば、Cellpose 2.0 においては、以下のハイパーパラメータが用いられる。

1. バッチサイズ（batch size）：計算コストや計算リソースの低減のため、訓練データからランダムに一部のデータを抜き出し、最適化計算に用いる。抜き出したデータ群をバッチという。バッチサイズはいくつのデータを抽出するかを表す。
2. エポック数（epoch）：エポック数は、訓練データを何回学習させるかを指す。エポック数が少なすぎると、モデルが適切に学習できない可能性がある。逆に、エポック数が多すぎると過学習のリスクが大きくなる。
3. 学習率（learning rate）：学習率は、モデルのパラメータを更新する際にパラメータをどれだけ変化させるかを制御する。大きな学習率は、計算時間が短くなる一方で、収束が不安定になる可能性がある。小さな学習率は、収束を安定させる一方で、学習が遅くなりうる。
4. weight decay:パラメータが大きな重みを持つことにペナルティを課すことにより、モデルの過学習を抑制する正則化手法の一つである。weight decay が小さいと、過学習の可能性が大きくなるが、weight decay が大きいとモデルが訓練データにうまく適合できない未学習の問題が発生しうる。

これまで述べたようなアルゴリズムを用いることで、画像上の大量の細胞のセグメンテーションを比較的容易にかつ正確に行い、細胞の動きを追跡することができる。

3.1.3　本研究の目的

本研究の目的は、細胞セグメンテーションと追跡アルゴリズムを用い、放射線照射後の細胞周期と細胞遊走の相関を確認することである。また、採取したデータをパラメータとする細胞遊走シミュレーションにより原発巣からの細胞遊走距離についても明らかにしたい。

ここで、細胞周期モニタリングのためのプローブとして、蛍光性ユビキチン化ベースの細胞周期指標 FUCCI を発現させた HeLa 細胞の移動を測定し定量化するアプローチについて述べる[7、8]。まず、X 線照射後の Fucci 導入 HeLa 細胞の明視野顕微鏡画像から細胞の輪郭を抽出するために、前述の Cellpose 2.0 と、再訓練した Cytoplasm 2.0 モデルを使用した[9、10]。次に、セグメンテーションされた細胞を複数枚の二次元画像上で認識し追跡できる TrackMate 7 を使用した[11、12、13]。そして、細胞周期位相を G1 期もしくは G2 期に同調させた HeLa-FUCCI 細胞集団に放射線を照射し、その後の細胞移動を追跡した。最後に、得られた細胞移動データをパラメータとして、ABM を用いた細胞遊走シミュレーションモデルを構築し、原発巣から解離する照射後細胞の移動距離を推定した。

3.2　方法

3.2.1　X 線照射時の細胞周期と細胞遊走に関する in vitro 実験

3.2.1.1　使用細胞および培養方法

細胞は HeLa.S-FUCCI [7]（RCB2812, BioResource Center, Japan）を使用した。10% fetal bovine serum（Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX, USA）および 1% penicillin/streptomycin（P4333, Sigma, USA）を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA)で培養した。倍加時間は約 18–20 時間で、コンフルエント率 20–80%を維持するように細胞を継代した。環境気温 37℃および 95%空気および 5% CO_2 の加湿インキュベーター内で培養した。

3.2.1.2　分裂期採集法による細胞周期同調

前章で分裂期採集法による細胞集団の細胞周期同調率を検証した結果、分裂期細胞の播種後 24 時間程度までは高度な同調性が維持できること確認している。

まず、死細胞を除くため分裂期細胞を回収する 4 時間前に培地を交換した。次に、再度の培地交換の後、細胞を培養したコンフルエント率 50–60%の直径 150 mm のディィッシュから分裂期細胞を培地中に浮遊させた。細胞懸濁液を直径 60 mm のディッシュに播種し培養した。HeLa.S-FUCCI 細胞の細胞周期同調の程度は、励起波長および発光波長がそれぞれ 470 および 535 nm（緑）、540 および 605 nm（赤）のオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000（KEYENCE, Osaka, Japan）を用いて確認した。

前章での分裂期採集法による細胞周期分布の時間変化の解析から、分裂細胞採集から培養 8 時間後のサンプルを G1 期同調群、14 時間後のサンプルを G2 期同調群と定義した。

3.2.1.3　照射条件

3.2.1.2 の方法で G1 期または G2 期に同調させた細胞に対し、X 線発生装置 MBR-1520R-4（Hitachi Power Solutions Co., Ibaraki, Japan）を用い、固有フィルタ 1.6-mm Be

および付加フィルタ 1.0-mmAl の条件下で 150 kVp の X 線を 1.83 Gy/min で細胞に照射した。線量は 0, 0.5, 2 Gy とした。空気中の吸収線量は、照射中にサンプルの隣に設置した指頭型電離箱でモニターした。

3.2.1.4　タイムラプス撮影

タイムラプス顕微鏡 WSL-1800（ATTO, Tokyo, Japan）を用いて、X 線を照射した同調細胞の移動を可視化した。3.2.1.3 の照射後、照射細胞と非照射細胞（control）の明視野画像を 15 分ごとに 24 時間取得した。撮影条件は露光時間 4 ms、倍率 4 倍とし、環境気温 37℃および 95%空気/5%CO_2 の加湿インキュベーター内で撮影した。

3.2.1.5　細胞遊走解析

本研究では、学習モデルのベースに事前学習済みモデル Cytoplasm 2.0 [7]を使用し、1 枚あたり 100–200 個の細胞が描画された 10 枚の画像を訓練データとして用いた。この学習の流れを図 3-3 に示す。訓練データの撮影条件は 3.2.1.4 と同様にした。バッチサイズは 8 とし、3 つのミニバッチをランダムに作成した。エポック数は 100 とした。学習率および weight decay は 0.1 および 0.0001 とした。これらのハイパーパラメータにより再学習させた学習モデルを用いて、Python Anaconda 23.3.1 により Cellpose 2.0 を実行した。

平均二乗変位（mean square displacement; MSD）は、粒子移動の分析に用いられ、運動の大きさを表す指標となる。確率過程$x_i(t)$が与えられると、$MD(t)$は以下のように計算される[17]；

$$MSD(t) = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}[x_i(t) - x_i(0)]^2.$$

ここで、N は粒子の総数、$xi(i)$は時間tにおける粒子iの位置、$xi(0)$は初期時間における粒子iの位置である。二次元以上の任意の次元において、ランダムウォークする粒子の MSD は、長い時間スケールでは時間に対して線形である[18]。MSD は各時点での細胞の変位から計算され、細胞のランダムウォーク性を MSD の線形性から推定した。MSD の直線性は、データと直線フィッティングから得られた決定係数（R^2）によって決定した。

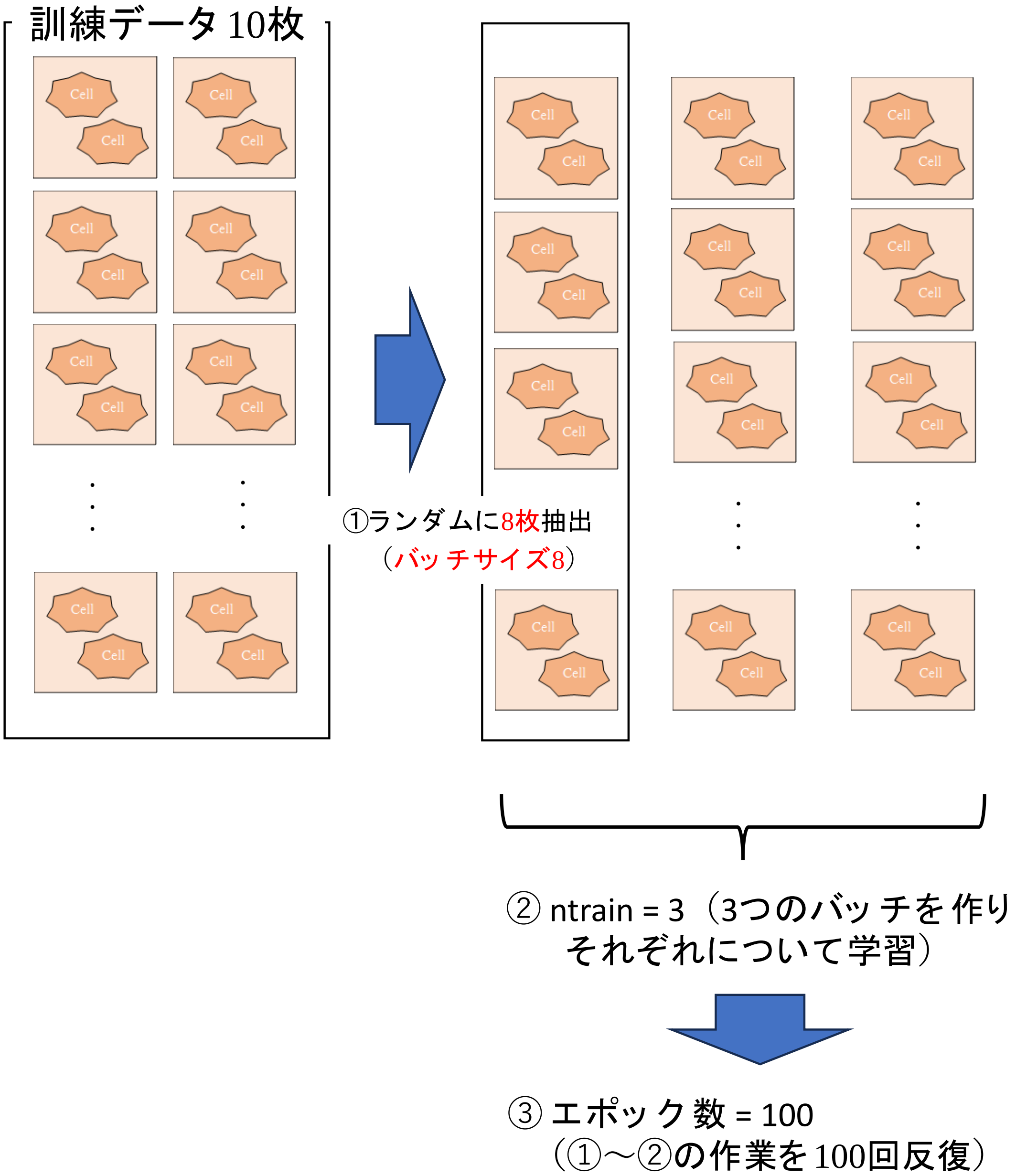


図 3-3 学習済みモデルの再学習の概念図。訓練データからいくつかデータを抽出し複数のバッチを作り、それぞれのバッチについて学習させた。この作業をさらに複数回行うことで、学習モデルを本研究で使用したタイムラプス画像に適応させた。

3.2.1.6　統計解析

3 回以上の独立した実験から、0.5 Gy および 2 Gy の X 線照射群と非照射群（control）で各 30 個以上の細胞を観察した。また、0–24 時間の細胞速度について、6 時間間隔で 4 つ（0–6 時間、6–12 時間、12–18 時間、18–24 時間）に分割し、各時間帯において統計処理を行った。各時点での非照射群と照射群の比較には Kruskal-Wallis 検定を用い、事後検定として Steel-Dwass 検定を用いた。統計的有意性は有意水準 0.05 で評価し、P 値が 0.05 未満の場合を統計的に有意とみなした。統計解析には Python Anaconda 23.3.1 を使用した。

ここまでの実験の流れの概略を図 3-4 に示した。

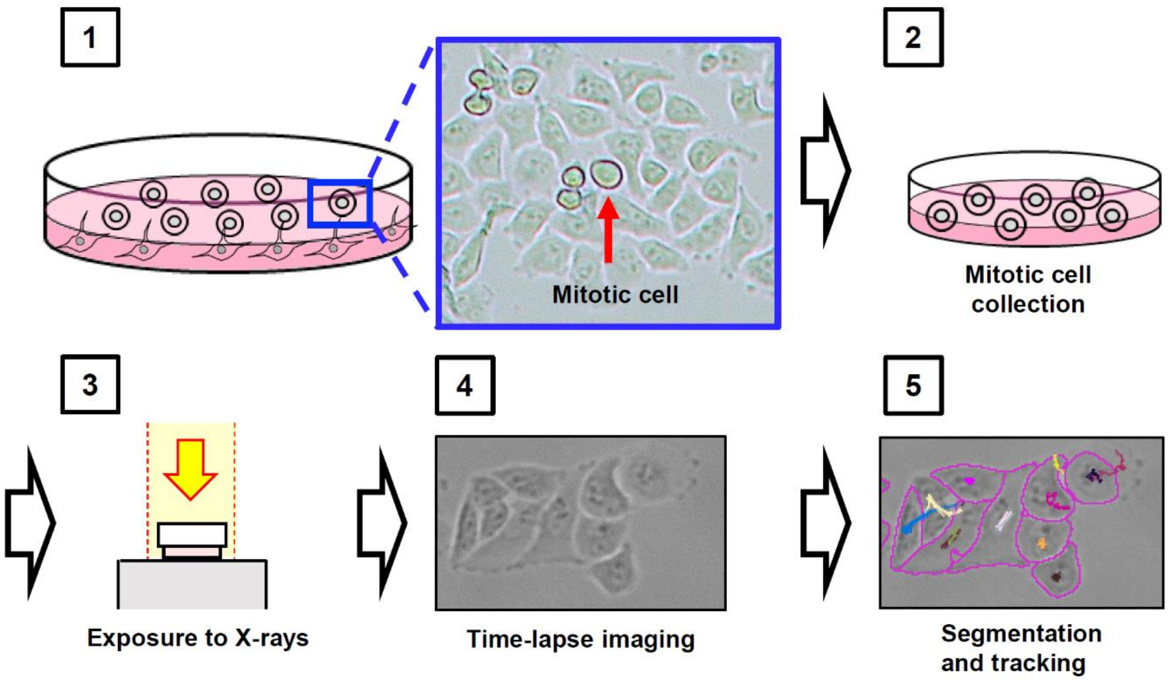


図 3-4 細胞周期ごとの放射線照射後細胞遊走の定量解析法のまとめ[38]。1. 分裂期細胞が丸くなり、ディッシュとの接着が弱くなっている様子。 2. 分裂期細胞を選択的に採集し、新たな別のディッシュに適切な密度で播種した。3. G1 期と G2 期の細胞集団に対し、それぞれ X 線照射を行った。4. X 線照射ののち、タイムラプスイメージングを行った。 5. Cellpose 2.0 でのセグメンテーションと TrackMate による追跡により、細胞の移動距離を測定した。

3.2.2　原発巣からの細胞遊走シミュレーション

がんの血行性転移は、原発巣からの離脱→周囲組織（間質）への浸潤→血管内への侵入→標的臓器の血管内皮細胞との接着→血管外への脱出→標的臓器での再増殖、という複数の過程を経て成立する[35]。すなわち、原発巣からのがん細胞の離脱が、浸潤・転移の初期プロセスにおいて重要な役割を担っている。したがって、がん細胞の原発巣からの移動距離は、浸潤・転移を制御するうえで重要な指標の一つである。

細胞移動においては、ランダム性が細胞の軌跡と運命を決定する上で重要な役割を果たすことがあるため、細胞の移動を確率的過程としてモデリングする研究が広く行われている[34]。モデリングによく利用されているのは、細胞をエージェントとし、その位置を予め定義されたルールに従って時空間的に確率的に変化させるモデルである。これらのモデルは第 1 章で論じたエージェントベースモデル（ABM）あるいは個体ベースモデル（IBM）として知られている。

本研究では、個々の細胞遊走のランダム性が移動距離に及ぼす影響を調査するため、個々の細胞を離散的なエージェントとして表せる ABM を採用した。化学放射線療法を想定し、G1 もしくは G2 期のがん細胞が X 線照射を受けた場合に、照射後 24 時間後の原発巣からの移動距離を生成するシミュレーションを行った。本シミュレーションの概念図を図 3-5 に示した。

3.2.2.1　細胞遊走環境のルール設定

3.2.1 のセグメンテーションから細胞の平均面積を算出し、細胞のサイズを直径 27.6 μmの粒状とした。原発巣として直径 4 cm のがんを想定し、原発巣は初期位置から移動しないものとした。細胞は原発巣の辺縁を初期位置とし、以下に述べる細胞移動距離を決定したあと、移動方向を 360° 以内からランダムに決定し移動する。このとき、細胞同士が重なる方向もしくは細胞と原発巣が重なる方向に移動するときは、細胞の移動方向を再度決定し直すこととした。遊走する細胞の数は 100 個とし、10000 回の計算を行った。原発巣から最も離れたときの距離を各細胞について記録し、ヒストグラムを作成した。

3.2.2.2　シミュレーションの時間スケール

3.2.1 の in vitro 実験に対応させるため、15 分おきに細胞移動距離と移動方向をランダムに決定し、これを 24 時間内で繰り返すこととした。

3.2.2.3　細胞移動距離の決定

3.2.1 で取得した細胞移動データを、細胞移動の確率密度分布に変換し、この分布からランダムにサンプリングすることで、細胞移動距離を決定した。取得した細胞移動データは左側から最頻値にかけて急激に上昇し、右に行くに連れてなだらかになる対数正規分布の形状を示した。したがって、細胞速度データを対数変換し、正規分布のフィッティングから$\ln$(細胞速度)の確率密度分布を求めた。確率密度分布からのランダムサンプルを指数変換し、これを細胞移動距離とした。

3.2.2.4　統計処理

シミュレーションにより得られた10^6通りの最大移動距離について、非同調（コントロール）群と照射群の比較には Dunnett の検定を用いた。統計的有意性は有意水準 0.0001 で評価し、P 値が 0.0001 未満の場合を統計的に有意とみなした。統計解析には Python Anaconda 23.3.1 を使用した。

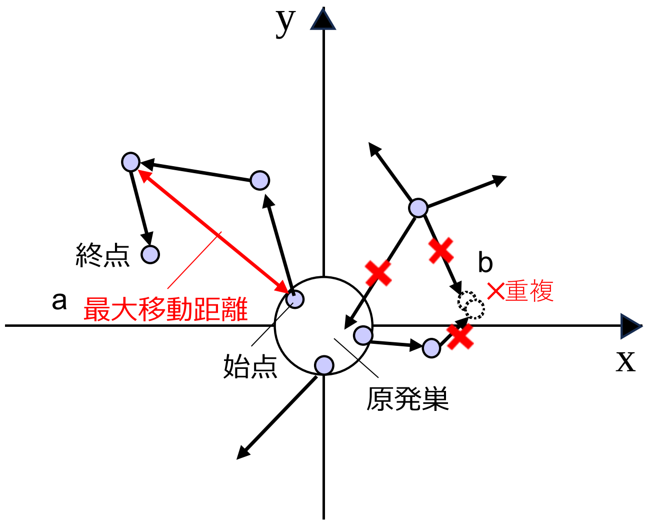


図 3−5 原発巣からの細胞遊走シミュレーションの概念図。a 細胞は原発巣の辺縁を始点とし、ランダムな距離と方向で動く。細胞が始点から最も離れた点を最大移動距離として記録する。 b 細胞は細胞同士が重なる方向、もしくは原発巣と重なる方向には移動できない。移動先で重なる場合、重なりの生じない方向への移動が再計算される。

3.3　結果と考察

3.3.1　細胞周期と細胞速度およびランダムウォーク性の評価

照射後の細胞移動の最も重要な特徴の一つは、2 次元における細胞速度（$\mu m/h$）である。細胞周期非同調の HeLa-FUCCI 細胞に 0.5 Gy もしくは 2 Gy の X 線を照射した後の細胞速度を調べた（図 3-6A）。2 Gy 照射後 24 時間内のすべての時間で細胞速度は有意に抑制された。さらに、図 3-6B に示すように、MSD と時間の関係は全群で線形であったことから、細胞の移動パターンは線量に依存せずランダムウォークであることが示された。

次に、0.5 Gy と 2 Gy の X 線照射後の G1 期同調 HeLa-FUCCI 細胞の細胞速度を調べることによって、X 線照射時の細胞周期により細胞移動が変化するかどうかを調べた（図 3-7A）。照射細胞では、細胞速度が低下する傾向があった。照射後 12 時間までは 2 Gy 照射群よりも 0.5 Gy 照射群で有意に低下したが、照射後 12 時間から 24 時間までは 0.5 Gy 照射群よりも 2 Gy 照射群でより低下した。さらに、図 3-7B に示すように、24 時間スケールでは細胞遊走パターンは全群でランダムウォークであり、線量依存的な変化は認められなかった。ただし、決定係数から直線性は推定されたものの、非同調群と比較して MSD はシグモイド関数状を示した。

また、同様に X 線照射後の G2 期同調 HeLa-FUCCI 細胞の細胞速度を評価した（図 3-8A）。G1 期同調群とは対照的に、照射細胞では細胞速度が増加する傾向があった。2 Gy 照射群では、照射後 24 時間まで細胞速度が非照射群より有意に高かった。また、0.5 Gy 照射群の細胞速度は、照射後 18-24 時間のみ非照射群より有意に高かった。さらに、図 3-8B に示すように、24 時間スケールでは細胞移動パターンは全群でランダムウォークであり、線量依存的な変化は認められなかった。ただし、決定係数から直線性は推定されたものの、非同調群と比較して MSD はロジット関数状を示した。

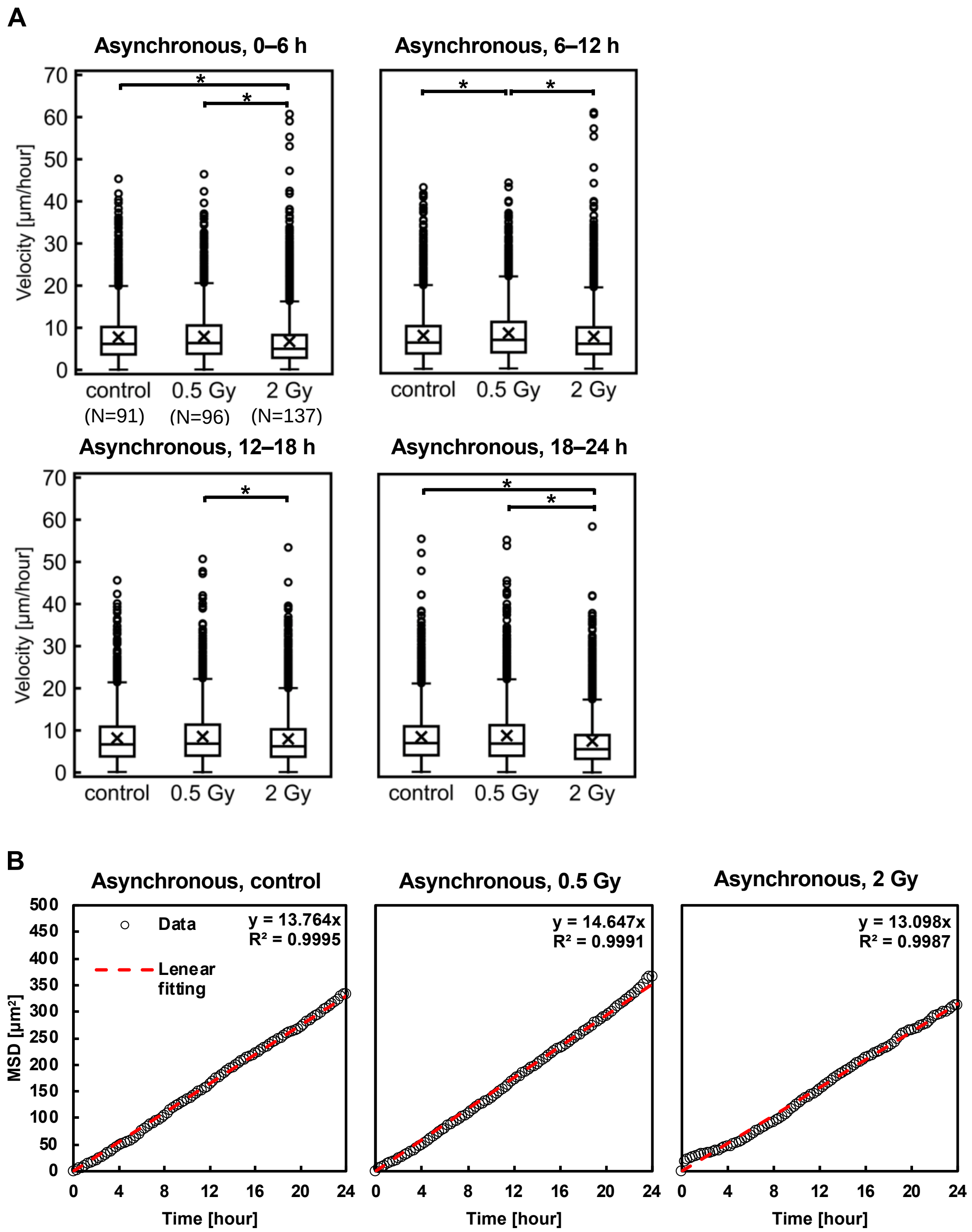


図 3-6 非同調群における X 線照射後の HeLa-FUCCI 細胞の移動[38]。A X 線照射後の非同調培養における細胞移動速度の分布を示す箱ひげ図。*は $p<0.05$ を示す。B 照射後の時間と平均二乗変位（MSD）の相関。MSD は、照射後少なくとも 24 時間はすべての群において直線的であった。

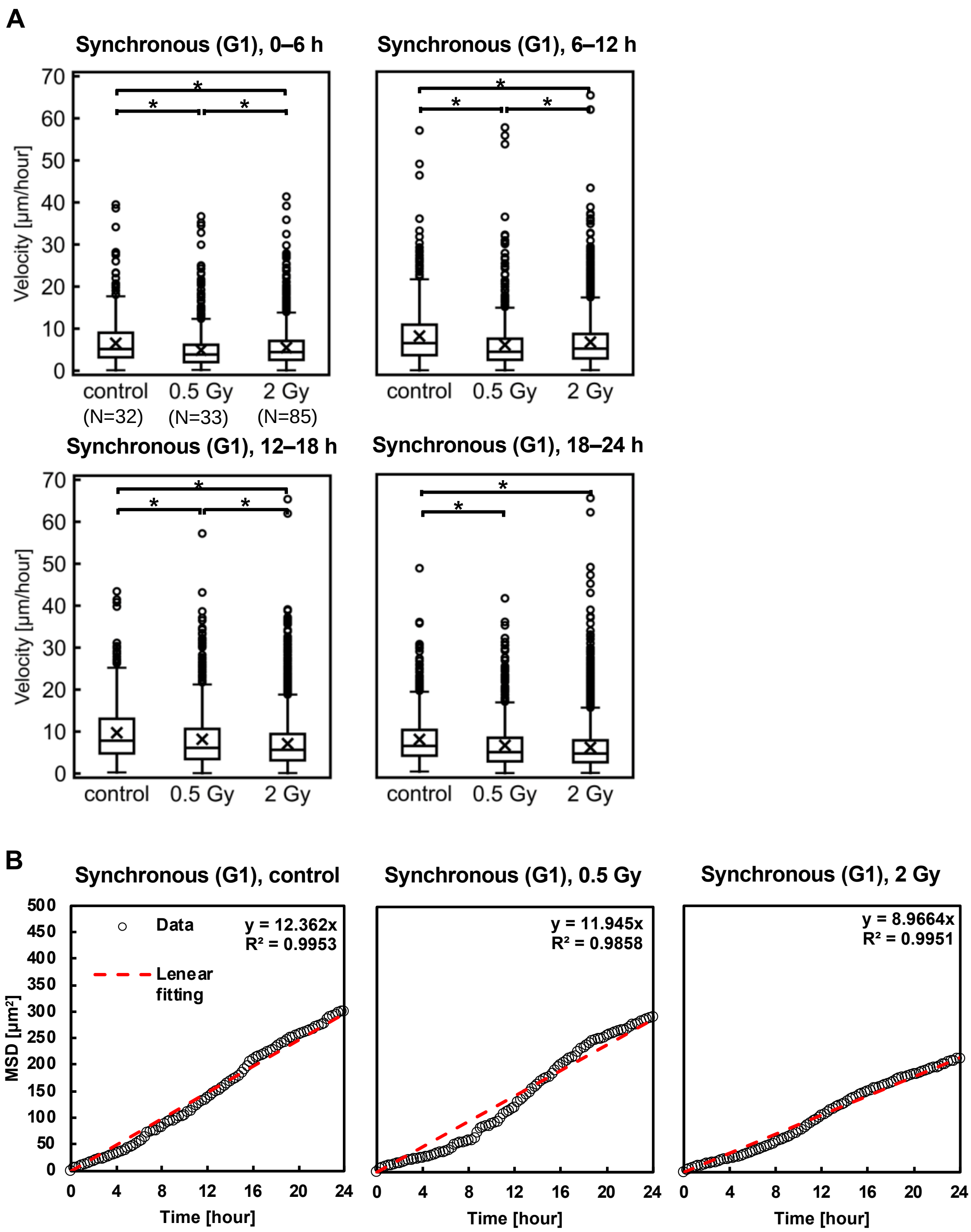


図 3-7 G1 期同調群における X 線照射後の HeLa-FUCCI 細胞の移動[38]。A G1 期同調培養における X 線照射後の細胞移動速度の分布を示す箱ひげ図。*は $p<0.05$ を示す。B 照射後の時間と平均二乗変位（MSD）の相関。MSD は、照射後少なくとも 24 時間はすべての群において直線的であった。

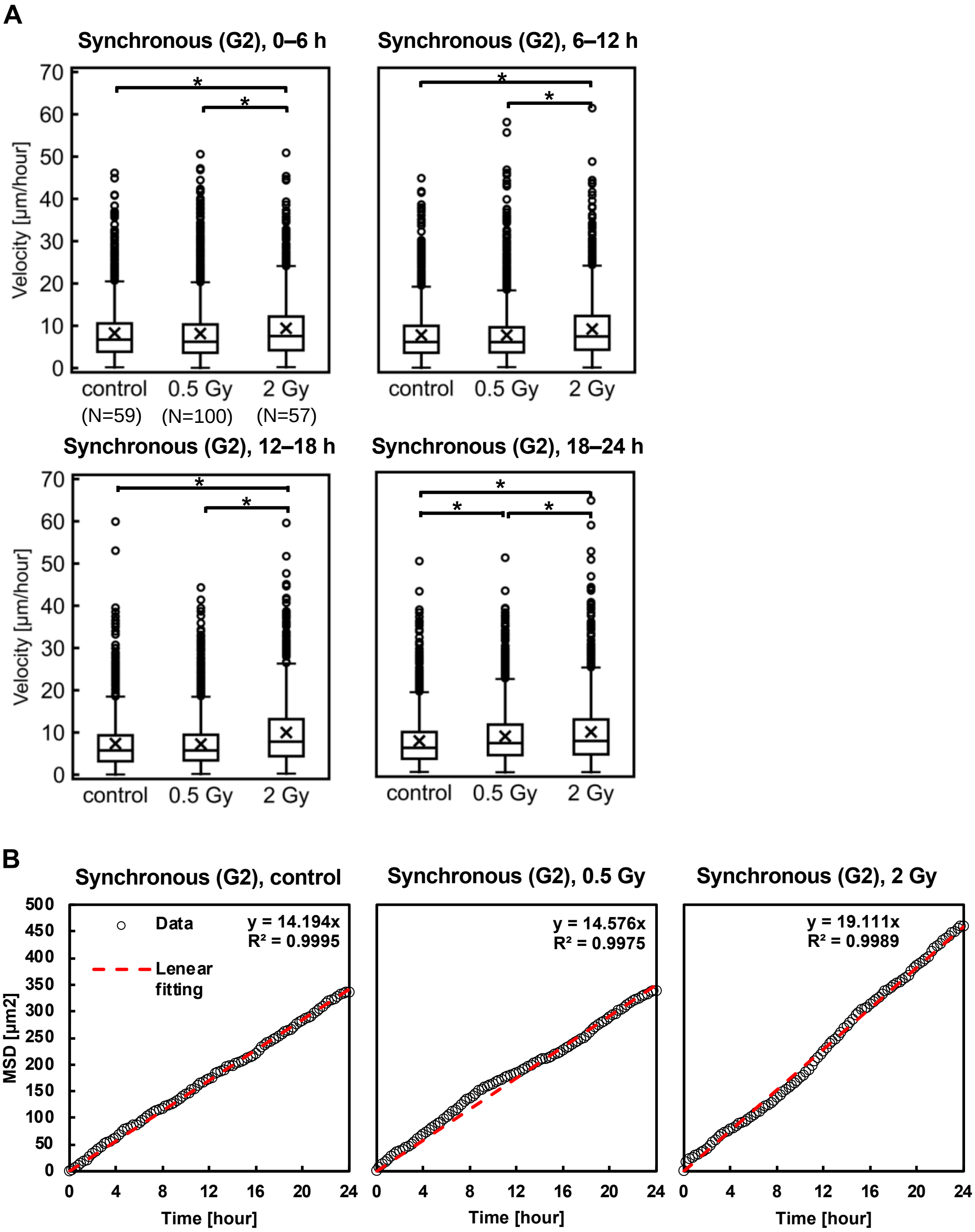


図 3-8 G2 期同調群における X 線照射後の HeLa-FUCCI 細胞の移動[38]。A G2 期同調培養における X 線照射後の細胞移動速度の分布を示す箱ひげ図。*は $p<0.05$ を示す。B 照射後の時間と平均二乗変位（MSD）の相関。MSD は、照射後少なくとも 24 時間はすべての群において直線的であった。

ここまでの結果から、放射線照射時の細胞周期位相によってがん細胞の移動傾向が異なることが示唆された。本研究において、HeLa-FUCCI 細胞における 2 Gy X 線照射後の G1 期の細胞速度が低下する傾向があったが、G2 期では逆の傾向がみられた。一方、0.5 Gy 照射群ではそのような逆転は明らかではなかった。線量の違いにより細胞移動反応の差異が生じたメカニズムを解明するためには、細胞遊走のメインプレーヤーであるアクチンの細胞内分布の定量などの追加検討が必要である。また、X 線照射後の移動変化が、特定の細胞株に固有の傾向であるのか、広く共通の細胞現象であるのかを検証するために、他のがん細胞株や正常細胞株における評価が必要である。

一方、線量にかかわらず、非同調群の照射後の細胞遊走パターンは 24 時間までランダムウォークであったことから、細胞遊走に作用するような細胞間相互作用は照射によって生じない、あるいは非常に弱い可能性が考えられた。ただし、X 線照射後の G1 期の MSD はシグモイド関数状を示し、G2 期の MSD はロジット関数状を若干ながら示したことから、照射時の細胞周期位相による細胞間相互作用の発生は否定できない。今後、より短い時間スケールでの MSD 解析や、個々の細胞に着目した遊走能の評価が必要である。本研究で設定した 2 Gy という線量は、放射線治療の分割照射における一般的な線量であり、本研究の結果により細胞周期標的抗がん剤を用いた集学的治療の最適化に貢献できる可能性がある。

深層学習ツールを用いた解析を行った点も本研究の意義であるといえる。近年、深層学習アルゴリズムは、効果的な薬剤とその作用機序の同定を迅速に行えるツールとして創薬において有望視されている[19]。Cellpose は明視野顕微鏡画像の細胞セグメンテーションも可能であり、TrackMate と組み合わせることで幅広い応用の可能性がある。今後、深層学習により細胞生物学分野における解析手法がさらに発展することが期待される。

抗がん剤は細胞周期の複数の段階に作用し、細胞静止または細胞毒性を示すことがある[20]。本研究の知見は、照射後の細胞移動が抑制される G1 期に集中的に化学放

射線療法を行う根拠となると考えられる。例えば、放射線増感作用がよく知られているゲムシタビン[21]は DNA 合成を阻害するため、照射による細胞遊走の抑制に適していることが予想される。細胞周期の各段階における細胞の遊走活性を、他の種のがん細胞においてもさらに解明すれば、化学放射線療法の改善に貢献することが期待できる。ただし、本研究において用いた HeLa.S-FUCCI 細胞の FUCCI 導入前である HeLa 細胞は、機能的な p53 タンパク質を欠くため、G1/S チェックポイントが応答しないことが報告されている[39]。したがって、HeLa 細胞の DNA 合成阻害による G1 期への滞留の可能性については追加の検討が必要である。

本研究の技術的限界について以下に述べる。ひとつは、本研究で採用した分裂期採集法では、すべての細胞の細胞周期を同調させることができないことである。例えば、各細胞の細胞周期を確認しながら細胞の移動を追跡できる蛍光タイムラプス解析の方がより望ましいかもしれないが、本研究で用いた HeLa.S-Fucci は分裂期の直後には蛍光を発さないため、蛍光による細胞核の追跡が困難である。今回、Cellpose と TrackMate により、この欠点に対処し、これにより明視野での迅速な細胞セグメンテーションと追跡解析を可能であることを示すことができた。もう一つの限界は、二次元環境で培養された細胞を用いた in vitro 実験の結果を、臨床研究に直接反映できないことである[22]。例えば、細胞と細胞外マトリックス間の複雑なシグナル交換は、二次元細胞培養では再現できない[23]。したがって、今後の研究では、より生体内の生理的環境に近い三次元細胞培養を採用する必要があると考えられる。さらに、本研究ではすべての細胞にほぼ一様に X 線を照射した。空間的にも時間的にも不均一な照射条件下での細胞や細胞集団レベルの反応は、二次元培養における均一な照射条件下で見られる反応とは異なる可能性があるため、不均一照射における研究をさらに進める必要がある[24、25]。強度変調放射線治療[26]やマイクロビーム放射線治療[27]のような空間的に不均一な放射線治療を受けると、細胞間シグナル伝達による細胞遊走への影響はより大きくなる可能性がある。

3.3.2　放射線照射後細胞遊走シミュレーション

がん細胞の原発巣からの離脱現象が浸潤および転移における最初期のプロセスを担っていることを踏まえると、がん細胞の始点からの移動距離は重要な指標となる。そこで細胞のランダムウォークをシミュレーションし、24 時間で最も始点から離れた座標の始点からの距離（すなわち最大移動距離）を計算した。ランダムウォーク細胞の始点からの移動距離は、非同調細胞では 0.5 Gy、2 Gy 照射群のいずれも最大移動距離が非照射に対して有意に減少した（図 3−9A）。G1 期細胞でも照射群はいずれも有意に減少した（図 3−9B）。一方、G2 期細胞の照射群では 0.5 Gy 照射群では非照射群との有意差がみとめられなかったが、2 Gy 照射群では有意に増加した（図 3−9C）。具体的には、X 線照射により最大移動距離の平均値が G1 期の 0.5 Gy 照射群で 5.53 μm、2 Gy 照射群で 6.65 μm減少し、G2 期の 2 Gy 照射群で 8.15 μm増加した。これらの結果は、放射線照射時の細胞周期位相による細胞移動変化が、浸潤や転移の初期段階である原発巣からのがん細胞の遊走に大きく影響しうることを示唆している。がん細胞は生存に酸素と栄養を必要とするため、血管からの酸素の拡散限界である 100～200 μm以内に位置している[36]。がんは血管内皮増殖因子である VEGF の制御能の欠失などにより、既存の血管系から新しい血管や毛細血管を伸長し新たな血管網を形成する血管新生を促進する[36]。これらのことから、放射線治療時の細胞周期位相に応じた細胞遊走活性の変化は浸潤・転移能にも影響する可能性が考えられる。

留意すべき点として、本研究においては、細胞外の間質や他の細胞との生物物理学的相互作用を考慮していないことが挙げられる。実際のがん細胞は周囲が細胞や間質に覆われた 3 次元マトリックス中を移動する。したがって、細胞の浸潤や転移を評価するには、3 次元組織をがん細胞が形状変化ないしは破壊を伴って移動していく過程を実装することが望ましい。また、放射線照射後の細胞遊走変化の細胞周期依存性における知見の蓄積が不足しているため、分子機構や生物物理学的変化を考慮した、より詳細なシミュレーションモデルの構築は依然として難しい。したがって、今後の研

究では、細胞遊走変化の線量依存性の調査やその分子機構についてのより詳細な実験を行う必要があるだろう。

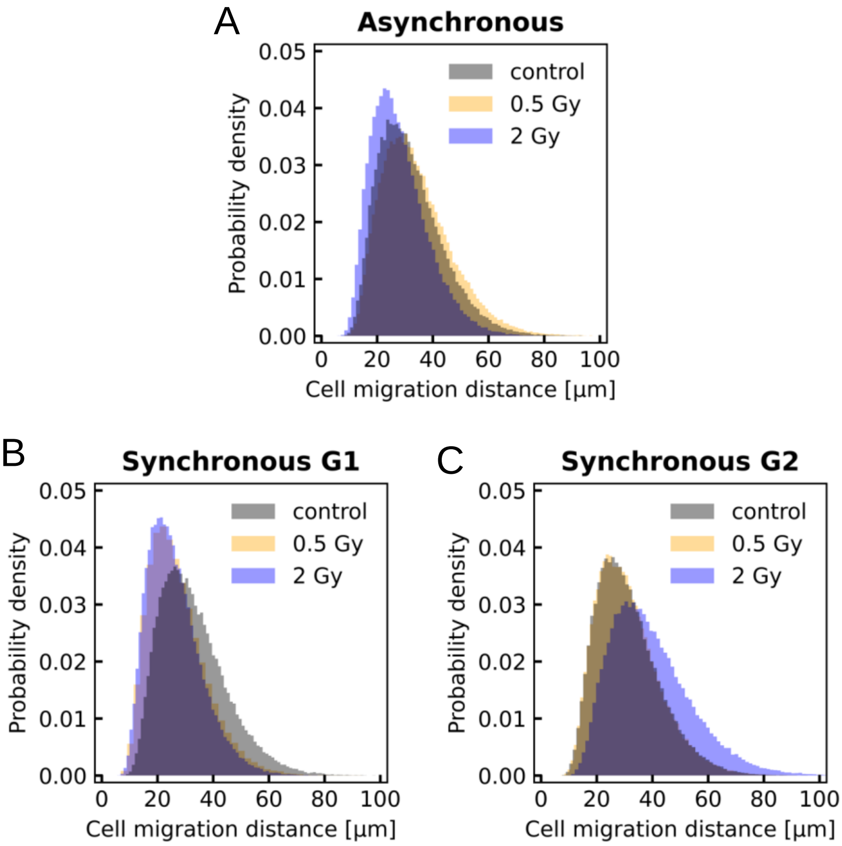


図 3-9 X 線照射後の HeLa-FUCCI 細胞の原発巣からの遊走シミュレーション。A 非同調細胞群の原発巣からの最大移動距離のヒストグラム。 B G1 期同調群の原発巣からの最大移動距離のヒストグラム。 C G2 期同調群の原発巣からの最大移動距離のヒストグラム。

参考文献

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022;12:31–46.
2. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011;331:1559–64.
3. Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol cell Biol* 2016;17:97–109.
4. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362–74.
5. Sleeboom JJF, Amirabadi HE, Nair P, et al. Metastasis in context: modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. *Dis Model Mech* 2018;11:dmm033100.
6. Moding EJ, Kastan MB, Kirsch DG. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:526–42.
7. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, et al. Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. 241 *Cell* 2008;132:487–98.
8. Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progressions with Fucci Technology. *Cold Spring Harb Proto* 2014;2014:pdb.prot080408.
9. Stringer C, Wang T, Michaelos M, et al. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* 2021;18:100–6.
10. Pachitariu M, Stringer C. Cellpose 2.0: how to train your own model. *Nat Methods* 2022;19:1634–41.
11. Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, et al. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* 2017;115:80–90.
12. Dobson ETA, Cimini B, Klemm AH, et al. ImageJ and CellProfiler: Complements in Open-Source Bioimage Analysis. *Curr Protoc* 2021;1:e89.
13. Ershov D, Phan MS, Pylvänäinen JW, et al. TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. *Nat Methods* 2022;19:829–32.
14. Terasima T, Tolmach LJ. Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature* 1961;190:1210–1.
15. Terasima T, Tolmach LJ. Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp Cell Res* 1963;30:344–62.
16. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676–82.
17. Qian H, Sheetz MP, Elson EL. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two dimensional systems. *Biophys J* 1991;60:910–21.
18. Fisher DS. Random walks in random environments. *Phys Rev A* 1984;30:960.
19. Krentzel D, Shorte SL, Zimmer C. Deep learning in i 264 mage-based phenotypic drug discovery. *Trends Cell Biol* 2023;33:538–54.
20. Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest* 1999;104:1645–53.
21. Latz D, Fleckenstein K, Eble M, et al. Radiosensitizing potential of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine) within the cell cycle in vitro. *Int J Radiat* Oncol Biol Phys1998;41:875–82.
22. Yeager M, Machiela MJ, Kothiyal P, et al. Lack of transgenerational effects of ionizing gradiation exposure from the Chernobyl accident. *Science* 2021;372:725–9.
23. Anton D, Burckel H, Josset E, et al. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci* 2015;16:5517–27.
24. Fukunaga H, Prise KM. Non-uniform radiation-induced biological responses at the tissue level involved in the health risk of environmental radiation: a radiobiological hypothesis. *Environ Heal* 2018;17:93.
25. Fukunaga H. Stem Cell Migration: A Possible Mechanism for the Tissue-Sparing Effect of Spatially Fractionated Radiation. *Radiat Res* 2021;196:680–5.
26. Mohan R. Intensity-modulated radiation therapy - you can have your cake and eat it too! *Med Phys* 2023;50 Suppl 1:74–9.
27. Fukunaga H, Butterworth KT, McMahon SJ, et al. A Brief Overview of the Preclinical and Clinical Radiobiology of Microbeam Radiotherapy. *Clin Oncol* 2021;33:705–12.
28. Van Valen, D.A., Kudo, T., Lane, K.M., Macklin, D.N., et al., Deep Learning Automates the Quanti-tative Analysis of Individual Cells in Live-Cell Im-aging Experiments, *PLoS Comput Biol*, 2016;12, e1005177.
29. Schindelin, Johannes, et al. "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nature methods* 2012;9.7:676–682.

30. Carpenter, Anne E., et al. "CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes." *Genome biology* 2006;7:1–11.
31. Yi, Jingru, et al. "Object-guided instance segmentation for biological images." *Proceedings of the AAAI Conference on Artificial Intelligence*. Vol. 34. No. 07. 2020.
32. Ronneberger, Olaf, Philipp Fischer, and Thomas Brox. "U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation." *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention–MICCAI 2015: 18th International Conference, Munich, Germany, October 5–9, 2015, Proceedings, Part III 18*. Springer International Publishing, 2015.
33. He, Kaiming, et al. "Deep residual learning for image recognition." *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*. 2016.
34. Glazier, James A., and François Graner. "Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells." *Physical Review E* 1993;47.3: 2128.
35. Labelle, Myriam, and Richard O. Hynes. "The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host–tumor cell interactions during hematogenous dissemination." *Cancer discovery* 2012;2.12:1091–1099.
36. Carmeliet, Peter, and Rakesh K. Jain. "Angiogenesis in cancer and other diseases." *nature* 2000;407.6801: 249–257.
37. 清野良輔, 福永久典. X 線被ばく後の細胞接着面積の変化と細胞周期依存性—深層学習に基づく画像解析の放射線生物学への応用—. *RADIOISOTOPES*. 2024;73(1):61–67.
38. Seino R, Fukunaga H. Evaluation of cell cycle–dependent migration activity following X-ray exposure: A radiobiological approach for optimization of radiotherapy with cell cycle–targeting agents. (Under review)
39. Wahl, A. F., Donaldson, K. L., Faircnild, C., Lee, F. Y., Foster, S. A., Demers, G. W., & Galloway, D. A. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nature medicine* 1996;2(1):72–79.

総括および今後の展望

4.1　総括

本研究では、がんの浸潤や転移にかかわる細胞遊走の放射線影響、とくに照射時の細胞周期位相による影響に着目した。

第 2 章では、細胞周期の進行を可視化できる蛍光プローブ FUCCI を導入したヒト子宮頸がん HeLa 細胞の蛍光観察とフローサイトメトリーを用いた細胞内 DNA 含量の定量により、分裂期採集法で回収した細胞の細胞周期分布の時間変化を検証した。さらに、被ばく時の各細胞周期位相における放射線感受性についてコロニー形成法で検討し、G1 期初期と G2 期の抵抗性ならびに S 期の感受性という従来知見を今日的観点から評価した。これらの結果から、化学放射線療法で S 期中期から後期の核酸合成を阻害するなど、今後の化学放射線治療への臨床応用の可能性について論じた。

第 3 章では、細胞周期の進行とチェックポイントをターゲットとした抗がん剤と放射線治療との集学的治療を想定し、放射線照射による細胞遊走と細胞周期位相の関係について検討した。具体的には、深層学習アルゴリズムを用いて、培養皿上を遊走する細胞画像から細胞移動速度を定量した。そして、G1 期同調細胞における照射後細胞速度の有意な低下と、G2 期同調細胞における照射後細胞速度の有意な上昇を確認した。また、放射線照射後における細胞のランダムウォーク性の維持も確認し、細胞遊走に寄与する照射後の細胞間相互作用は弱いか存在しないことを明らかにした。さらに、細胞遊走による原発巣からの細胞の離脱をシミュレーションし、照射時の細胞周期位相により細胞が原発巣から離れる最大距離の分布に差が生じることを示した。これらの結果から、化学放射線療法のがんの細胞遊走への影響を考察した。

4.2　今後の展望

本研究で得られた結果から、次のような事項が今後の課題として挙げられる：

・本研究で採用した分裂期採集法では、すべての細胞の細胞周期を同調させることはできない。したがって、細胞の放射線感受性や細胞遊走変化の細胞周期依存性について、目的の細胞周期位相以外の細胞が含まれた影響を定量している。細胞遊走解析に際しては、各細胞の細胞周期を確認しながら細胞の移動を追跡できる蛍光タイムラプス解析の方がより望ましい。一方、本研究で用いた HeLa.S-Fucci では分裂期の直後には蛍光を発さないため、蛍光による細胞核の追跡が困難であった。このような画像処理上の問題を解決するには、より正確な細胞周期同調法を選択するか、画像処理上の問題を回避できるアルゴリズムを開発する必要があるだろう。

・がんの浸潤や転移は、細胞-細胞間相互作用や細胞-細胞外マトリックス間相互作用の結果として生じる。しかし、これらの複雑なプロセスを 2D 細胞培養では再現できない。したがって、今後の研究では、より生体内の生理的環境に近い 3D 細胞培養を採用し、3D 培養における細胞遊走ないしは浸潤を定量する手法の開発が必要である。

・本研究では X 線を細胞に一様照射した。しかし、実際の強度放射線治療や、マイクロビーム放射線治療のような空間的に不均一な照射体系においては細胞集団レベルでの生物学的応答が異なる可能性がある、したがって、今後、時空間的に不均一な照射条件下での実験が必要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教員として直接ご指導を賜りました北海道大学大学院保健科学研究院准教授 福永久典先生に厚くお礼申し上げます。また、副指導教員である北海道大学大学院保健科学研究院助教 堤香織先生には多くのご助言・ご指導を頂きましたことを深謝致します。同大学院教授 伊達広行（当時。2022 年 8 月逝去）には当時の指導教員としてご指導・ご鞭撻を賜りましたことを感謝致します。本論文の執筆にあたり、主査および副査としてご助言を賜りました同研究院教授 神島保先生、同研究院准教授 福永久典先生、北海道大学大学院医理工学院教授 石川正純先生に心より感謝致します。

本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2119 の支援を受けたものです。ここに深く感謝申し上げます。

業績リスト

【原著論文】

1. Seino R, Uno H, Fukunaga H. Validation of mitotic harvesting method with human cervical carcinoma HeLa cells expressing fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicators for radiation research. *Biomed Res*. 2023;44(5):181–186.

2. Seino R, Uno H, Prise KM, Fukunaga H. Cell Cycle Dependence of Cell Survival following Exposure to X-rays in synchronous HeLa Cells expressing Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicators. *Biomed Res*. 2024;45(1):25–31.

3. 清野 良輔、福永 久典. X 線被ばく後の細胞接着面積の変化と細胞周期依存性—深層学習に基づく画像解析の放射線生物学への応用—. *RADIOISOTOPES*. 2024;73(1):61–67.

【国際会議】

1. Seino R, Date H. A model analysis of cell survival after irradiations considering on repair probabilities of the lesions as time elapses. 6th Educational Symposium on Radiation And Health (ESRAH) by Young Scientists. September 13-14, 2019 (Hirosaki, Japan). (poster)

2. Seino R, Date H. Bayesian Inference Based on Image Analysis for Mechanical Interaction Among Cells after Irradiation. The 5th FHS International Conference. September 17-18, 2021 (Online). (poster and 1-min oral)

3. Seino R, Date H. Bayesian estimation of the difference in the cellular growth mechanics between normal and cancer cells. The 8th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists. November 12-13, 2021 (online). (poster and 1-min oral)

4. Seino R, Yoshikawa M, Tsutsumi K, Kamishima T. The Time dependence of Radiation-Induced Rescue Effect on cell survival and γH2AX foci. The 9th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists. December 3-4, 2022 (online). (poster)

5. Seino R, Fukunaga H. Investigation of Radiation Effects on Cell Migration using Time-Lapse Imaging. The 10th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists. September 23-24, 2023 (Hirosaki, Japan). (poster and 1-min oral)

6. Seino R, Fukunaga H. Cell cycle dependence of changes in cell motility after exposure to ionizing radiation. The 5th FHS International Conference. October 20, 2023 (Hokkkaido, Japan). (poster and 1-min oral)

【国内学会】

Seino R, Yachi Y, Mori H, Date H. A model analysis of radiation-induced damage considering repair probabilities of the lesions as time elapses. 日本放射線影響学会第 64 回大会、2021 年 9 月 22-24 日 (オンライン).（口頭発表）

【社会活動】

1. Committee member, The 6th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2019). September 14, 2019 (Hirosaki, Japan).

2. Chairperson, Educational Lecture 3, The 6th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2019). September 14, 2019 (Hirosaki, Japan).

3. Committee member, The 8th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2021). November 12-13, 2021 (online).

4. Chairperson, Educational Lecture 4, The 8th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2021). November 12, 2021 (online).

5. Committee member, The 9th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2022). December 3-4, 2022 (online).

6. Chairperson, Short presentation section 3, The 9th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2022). December 3, 2022 (online).

7. Committee member, The 10th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2023). September 23-24, 2023 (Hirosaki, Japan).

【競争的資金】

1. 北海道大学 DX 博士人材フェローシップ（JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム Grant No. JPMJSP2119）採択期間 : 2021.10-2024.3 研究奨励費 年間 2160,000 円, 研究費 年間 400,000 円