

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15571

研究課題名(和文)正常機能を有するミトコンドリアDNAは放射線耐性に必要か

研究課題名(英文)Is mitochondrial DNA with normal function necessary for cellular radioresistance?

研究代表者

福本 学 (Fukumoto, Manabu)

東京医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：60156809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：X線2Gy/日の分割照射でも増殖を続けるCRR細胞の形質へのミトコンドリア(mt)の役割を解析した。10Gy急照射後、親株ではmt由来のROSが検出されたがCRR細胞では検出されず、mitDNAコピー数、ATP合成量は減少していた。臭化エチジウムによるmtDNA欠失 〇細胞樹立はCRR細胞からは困難であった。維持照射を休止したHepG2-CRRから唯一樹立できた 〇細胞はCRR形質が消失した。親株に比して 〇細胞の抗酸化酵素群の発現は一定の傾向を示さなかったがH2O2に対して却って感受性であった。細胞膜電位低下によってH2O2の細胞内流入が早まることが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of mitochondria (mt) on the phenotype expression of CRR cells that continue to proliferate under fractionated irradiation of 2 Gy/day x-rays. Reactive oxygen species (ROS) derived from mt was detected in the parent cells after acute irradiation with 10 Gy, but was not detected in CRR cells, and the mitDNA copy number and ATP amount were decreased. Using ethidium bromide, mtDNA deleted 〇 cells could be established from parental cells but was impossible from CRR cells. Only one 〇 cells could be established from HepG2-CRR to which maintenance irradiation paused. Expression of the antioxidant enzyme group in 〇 cells showed no specific tendency compared to the parental cells but was rather sensitive to H2O2. It was suggested that the influx of H2O2 is accelerated by the decrease in cell membrane potential of 〇 cells.

研究分野：放射線病理学

キーワード：がん細胞 放射線療法 化学療法 交叉耐性 ミトコンドリア ミトコンドリア欠失細胞 分割照射

1. 研究開始当初の背景

化学療法や手術療法と並び、がんの三大治療法の一つである放射線療法の適応例は増加している。しかし、耐性細胞の出現は予後を左右する。我々は、標準的な放射線療法である 2Gy/日の X 線分割照射を 30 日以上続けても増殖する培養細胞を臨床的放射線耐性 (clinically relevant radioresistant; CRR) 細胞と定義し、由来の異なる複数のヒトがん細胞株から CRR 細胞の樹立に成功した。CRR 細胞の樹立は世界初であり、ゲノム背景が同一の親細胞とすることによって種々の知見を得た。CRR 細胞は分割照射ばかりでなく、高線量 1 回照射の X 線 (10Gy) にも耐性を示し、親株に比べて DNA 修復能が高く、オートファジー細胞死の誘導が抑制されていた [1]。ヌードマウス皮下へ移植した CRR 細胞由来の腫瘍も 2Gy/日の X 線照射に耐性を示した。組織学的に、CRR 腫瘍は親株腫瘍に比べて腫瘍内血管密度が高かった。オートファジーを誘導する mTOR 阻害剤と X 線分割照射併用によって、親株に比べて CRR 腫瘍の縮小が有意であったが、この縮小効果は血管内皮の障害による虚血が主因であった [2]。さらに、低酸素下で培養すると、CRR 細胞は親株に比べて顕著に細胞死が起こることを見出した。これらは、CRR 細胞は親株細胞よりも酸素要求性が高いことを示している。好氣的条件下では放射線による ROS 生成が増強する (酸素効果) ため、CRR 細胞が放射線から生き残るためには不利なはずである。それにも拘わらず、CRR 形質の維持に mt における好氣的な酸化リン酸化による ATP 供給が必要であると示唆される。

一方、CRR 細胞における放射線耐性のメカニズムを明らかにするために、作用機序の異なる複数の抗がん剤に対する感受性を解析した。その結果、全ての CRR 細胞は微小管脱重合阻害剤であるドセタキセル (DTX) に耐性を示すことが分かった。DTX 耐性には、 β -tubulin や MDR1 などの過剰発現の関与が報告されているものの [3]、CRR 細胞においては否定された。近年の研究から、mt が DTX 耐性に関与していることが報告されている [4]。X 線照射あるいは DTX 処理後に親株では、ミトコンドリア (mt) 由来の活性酸素種 (ROS) の増加がみられたが、CRR 細胞では mtROS 上昇が検出されなかった。

2. 研究の目的

CRR 細胞は単回照射にも耐性である一方、今までに単回照射に抵抗性でも内因性に CRR である細胞株は見つかっていない。本研究では、CRR 細胞がなぜ好氣的でなければいけないのか、同一線量でも分割照射と単回照射ではどう細胞影響が異なるのかについて mt 機能の関与から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

CRR 細胞における mt 機能の検討を行い、さらに mtDNA を排除することによってミトコンドリア機能不全となった $\rho 0$ 細胞を樹立して放射線耐性への mt 機能の関与を検討した。

ヒトがん細胞株 HeLa, HepG2, SAS と、それらから樹立した CRR 株を用いた。 $\rho 0$ 細胞の樹立には臭化エチジウム法を用いた。細胞の放射線感受性は modified high density assay を用いた。mt の膜電位 ($\Delta\Psi_m$) は JC-1 染色で観察した。X 線照射後及び DTX 処理後の mt 由来の活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は MitoSOX red 染色で観察した。

4. 研究成果

親細胞に比較して CRR 細胞では、mtDNA コピー数と ATP 量の減少、さらに mt の鉄輸送に預かる mitoferrin の発現減少がみられた。これらは、量的或いは質的に mt 機能が低下していることが CRR 細胞において放射線と薬剤耐性に深く関与していることを示唆している。臭化エチジウム処理によって SAS 及び HeLa 細胞から $\rho 0$ 細胞を樹立することに成功した。なお、HepG2 では mtDNA の消失誘導は不可能であった。また、それぞれの CRR 細胞から、 $\rho 0$ 細胞の樹立を試みたところ、いずれから $\rho 0$ 細胞の樹立には至らなかった。しかし、形質維持のため 2Gy/日の X 線を半年以上照射していない HeLa-R 細胞から、 $\rho 0$ 細胞を樹立することに成功した。HeLa- $\rho 0$ と SAS- $\rho 0$ 細胞で ATP 量が減少していることも明らかとなった。

親株に比べて $\rho 0$ 細胞は、X 線単回照射及び DTX に抵抗性を示した。しかし、2Gy/day の X 線分割照射では、1 月以内に死滅した。すなわち CRR 細胞としての形質を示さなかった。また、HeLa-R より樹立した HeLa-R- $\rho 0$ も X 線単回照射に抵抗性を示したが、2Gy/日の分割照射では死滅した。これらの結果から、mt 機能を完全に抑制してしまうと、X 線単回照射には抵抗性になるものの、X 線分割照射には感受性が増加することが明らかとなった。CRR 形質の維持に、ROS を産生しないがある程度以上の ATP を合成する mt 機能が不可欠であることが明らかとなった。

$\rho 0$ 細胞では、mt に局在し抗酸化作用を有する MnSOD 遺伝子の発現亢進が明らかとなった。しかし、MnSOD 以外の抗酸化酵素群の遺伝子発現については一定の傾向を示さなかった。酸化ストレスに対する感受性を調べたところ、過酸化水素に対して $\rho 0$ 細胞が親細胞株に比べて高感受性を示した。ところが、 H_2O_2 を分解するカタラーゼ活性は $\rho 0$ 細胞の方が親株よりも高かった。また、ATP のエネルギーを用い細胞膜上のイオン交換に関与する ATPase の発現にも変化が見られた。そこで、細胞膜の膜電位を測定したところ、 $\rho 0$ 細胞においては細胞膜電位が減少していた。 H_2O_2 処理後の細胞内 H_2O_2 量の動きを HYDROP にて解析したところ、親株に比べ、

ρ0 細胞の内在性 H₂O₂ 量の上昇するタイミングが早いことが判明した。以上から、ρ0 細胞における酸化ストレスに対する感受性の増加は、内在性のカタラーゼ活性よりも細胞膜状態の違いによることが明らかとなった。なお、CRR 細胞と ρ0 細胞の異同を下表に示す。

CRR細胞と ρ0細胞の比較		
	CRR cell	ρ0 cell
mtDNA コピー数	減少	欠失
ATP 量	減少	減少
酸化ストレス(H ₂ O ₂)耐性	耐性	感受性
カタラーゼ酵素活性	低下	活性化
細胞膜ポテンシャル	低下	低下
H ₂ O ₂ 取り込み (¹⁸ O)	SASでは低下	増加
H ₂ O ₂ 取り込み (HYDROP)	低下	増加

分割照射は照射と照射の間に回復や DNA 修復が起こると考えられているが、細胞応答が単純に急性反応の積み重ねとは考えられない。CRR 形質発現・維持には複数の要素が複雑に関わっていると考えられたため、CRR 形質発現に関わって制御される遺伝子群を探索するために、マイクロ RNA のアレイ解析を行ったところ、CRR 細胞において miR7-5p の発現亢進を認めた。miR7-5p の標的遺伝子を検索したところ、mitoferrin を含む複数の mt 関連遺伝子が含まれていた。現在、これらの遺伝子群の中で CRR 形質と mt 機能を結び付けるような遺伝子の組み合わせを探索している。

<引用文献>

1. Fukumoto M. Pathol Int (2014) 64:251,2014.
2. Kuwahara Y et al. (2014) Cancer Med 3:310,
3. Mizumachi T et al. Oncogene (2008) 27(6), 831-838
4. Bruno R, Sanderink GJ (1993) Cancer Surv 17:305-313.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Kuwahara Y, Roudkenar MH, Urushihara Y, Saito Y, Tomita K, Roushandeh AM, Sato K, Kurimasa A, Fukumoto M. Clinically relevant radioresistant cell lines: a simple model to understand cancer radioreistance. Med Mol Morphol. 査読有 . (2017) 50:195-204.
2. Kuwahara Y, Roudkenar MH, Urushihara Y, Saito Y, Tomita K, Roushandeh A M, Sato K, Kurimasa A, Fukumoto M. X-Ray Induced Mutation Frequency at the Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase Locus in Clinically Relevant Radioresistant Cells. Int J Med Phys Clin Engin Radiat Oncol. 査読有 . (2017) 6:377-391.
3. Tomita K, Kuwahara Y, Takashi Y, Tsukahara T, Kurimasa A, Fukumoto M, Nishitani Y, Sato T. Sensitivity of mitochondrial DNA depleted ρ0 cells to H₂O₂ depends on the plasma membrane

Status. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 . (2017) 490:330-335.

4. Fujita T, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Liu Y, Itoh K, Sakurai T, Kojima T, Kandori S, Nishiyama H, Fukumoto M, Fukumoto M, Shibasaki K, Fujita J. TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well as CIRP and RBM3. Sci Rep. 査読有 . (2017) 7:2295.

5. Tomioka A, Toda Y, Manucatc NB, katsu H, Fukumoto M, Kono N, Arai H, Kioka N, Uedaa K. 査読有 . Lysophosphatidylcholine export by human ABCA7. BBA - Mol Cell Biol Lipids. 査読有 . (2017) 1862:658-665.

6. 桑原義和, 富田和男, 漆原佑介, 齋藤陽平, 佐藤友昭, 栗政明弘, 福本学. 2Gy/日の X 線分割照射に抵抗性を示すがん細胞の樹立と解析 . 東北医科薬科大学研究誌 . 査読有 . (2017) 64:39-48.

7. 富田和男, 桑原義和, 高裕子, 並河英紀, 西谷佳浩, 漆原佑介, 山西沙祐里, 古川みなみ, 宮脇正一, 栗政明弘, 福本学, 佐藤友昭 . ミトコンドリア障害細胞における酸化ストレス感受性と細胞膜動態 . 東北医科薬科大学研究誌 . 査読有 . (2017) 64:49-55.

8. Kuwahara Y, Roudkenar MH, Suzuki M, Urushihara Y, Fukumoto M, Saito Y, Fukumoto M. The Involvement of Mitochondrial Membrane Potential in Cross-Resistance Between Radiation and Docetaxel. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 査読有 . (2016) 187:556-565.

9. 福本学. 低線量・低線量率放射線影響は解明できるか . 日本原子力学会誌 . 査読有 . (2016) 58:41-44.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 福本学. 放射線病理学：トロトラスト内部福本 学被ばく発がんから福島原発事故被災動物まで . アイソトープ放射線薬学研究会 . 2017.

2. 富田和男, 桑原義和, 高裕子, 並河英紀, 塚原飛央, 古川みなみ, 田中康一, 漆原佑介, 北中純一, 北中順恵, 栗政明弘, 西谷佳浩, 宮脇正一, 西山信好, 竹村基彦, 福本学, 佐藤友昭 . 治療耐性ががん細胞における過酸化水素耐性メカニズムの解析 . 第 70 回日本薬理学会西南部会 . 2017 .

3. 富田和男. 桑原義和. 高裕子 . 五十嵐健人 . 漆原佑介 . 山西沙祐里 . 宮脇正一 . 栗政明弘 . 西谷佳浩 . 福本学 . 佐藤友昭 . CRR 細胞における過酸化水素耐性メカニズムの解析 . 第 3 回治療耐性ががん細胞研究協議会セミナー . 2017.

4. Fukumoto M. The mechanisms of carcinogenesis induced by internally deposited radionuclides: thinking from Thorotrast cases. Workshop: Mn-56 experiments and the results-Possibility of the small particle effects-. 2016.

5. 福本学 . 低線量放射線の健康影響に関する
国内関連学会における研究の現状とこれか
らの連携のあり方 . 第 53 回アイソトープ・
放射線研究発表会 . 2016 .

〔図書〕(計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://byouri.wixsite.com/manabufukumoto>(放
射線病理学ページへようこそ!)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福本 学 (FUKUMOTO, Manabu)
東京医科大学・医学部・特任教授
研究者番号 : 60156809

(2)研究分担者

桑原 義和 (KUWAHARA, Yoshikazu)
東北医科薬科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00392225

鈴木 正敏 (SUZUKI, Masatoshi)
東北大学・災害復興新生研究機構・助教
研究者番号 : 60515823

富田 和男 (TOMITA, Kazuo)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教
研究者番号 : 60347094