

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間： 2007～2009
課題番号：19710054
研究課題名 (和文) 放射線による細胞膜応答と低線量超放射線感受性の関係
研究課題名 (英文) Relationship between radiation induced membrane response and low dose hyper-radiosensitivity
研究代表者 和田 成一 (WADA SEIICHI)
北里大学・獣医学部・獣医学科・講師
研究者番号：50370490

研究成果の概要 (和文)：

低線量放射線の細胞応答は高線量域のデータから推察されてきた。しかし、この高線量域から低線量域への外挿データでは説明のつかない現象、放射線超感受性現象が広く知られてきた。この現象のメカニズムはバイスタンダー効果と生物学的機能不全によると考えられているが詳細は明らかにされていない。

本研究では、この現象を誘導する引き金は放射線による細胞膜応答であり、細胞膜応答から細胞外に細胞膜応答分子のスフィンゴミエリナーゼが分泌され、この分子によって細胞は DNA 修復不全に陥るため、放射線超感受性が誘導されることを明らかにした。つまり、放射線超感受性現象は細胞膜応答によりバイスタンダー効果と生物学的機能不全が連動していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Cellular response by low dose irradiation was calculated from response by high dose irradiation. Recently hyper-radiosensitivity response, that did not fitted to data calculated from response by high dose irradiation, was discovered. It was considered that hyper-radiosensitivity was due to bystander effect or biological dysfunction, however, it was not elucidated in detail.

In this study, it was elucidated that radiation-induced membrane response was trigger of hyper-radiosensitivity, signal molecular mediated by membrane response was extracellularly transmitted and dysfunction of DNA repair mediated by this signal molecular induced cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	750,000	3,950,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響

キーワード：放射線、細胞死、細胞膜、スフィンゴミエリナーゼ、DNA修復

1. 研究開始当初の背景

近年の宇宙ステーション計画などから宇宙放射線による低線量・低線量率の放射線に対する生物影響評価が重要視されている。これまで明らかにされてきた放射線に対する生物現象は、中線量から高線量域の放射線に対するものであり、低線量域での生物効果は高線量域からのデータから外挿することによって見積もられてきた。しかし、最近の個々細胞を正確に評価する解析技術により低線量域の放射線に対する生物影響には、高線量域からの外挿によって説明できない反応、つまり、低線量照射したとき、予想よりも高い細胞致死効果が得られる現象(放射線超感受性現象)が広く認識されてきた。この放射線超感受性現象の誘導メカニズムは大きく2つに大別される。1つはバイスタンダー現象でもう1つは生物学的機能不全現象である。バイスタンダー効果とは放射線照射された細胞から放射線照射されていない細胞に何らかのシグナルが伝達され、このシグナルに作用して非照射細胞に細胞死が誘導されることである。一方、生物学的機能不全は低線量照射ではDNA損傷シグナルが非常に微弱であるため、DNA修復機構が機能せず、軽度のDNA損傷でも修復されず細胞致死に陥り、低線量域での放射線感受性が増加することである。

しかしながら、放射線超感受性現象を誘導するバイスタンダー効果や生物学的機能不全のメカニズムは未だ詳細には明らかにされていない。

2. 研究の目的

低線量超感受性現象の原因なるバイスタンダー効果や生物学的機能不全の誘導には放射線によるDNA損傷からのシグナルでは説

明できないと交付者は考え、この現象の引き金は放射線による細胞膜応答と推察した。

そこで、放射線照射による細胞膜応答から低線量超感受性現象を解明するため、以下の3つのテーマについて研究を行った。

- (1)放射線による細胞膜応答の生物学的意義を調べるため、細胞膜への選択的な損傷付与の後に観察される細胞膜応答(細胞膜応答を担うスフィンゴミエリナーゼ応答)と生物現象(細胞死)を解析する。
- (2)細胞膜応答と放射線超感受性現象の関係を検証するため、超感受性現象の要因であるバイスタンダー効果におけるスフィンゴミエリナーゼの関与を解析する。
- (3)放射線超感受性現象のもう1つ要因である生物学的機能不全についてDNA修復、特に細胞死に関与するDNA2本鎖切断修復酵素の分子状態を解析し、細胞膜応答を引き金とする放射線超感受性現象を解明する。

3. 研究の方法

- (1)マイクロビームは細胞の局所領域に放射線損傷を付与できるので、マイクロビームを用いて細胞膜・細胞質のみを照射する。
 - ①細胞膜・細胞質のみの照射によって誘導されるアポトーシスをタネル法によって調べる。
 - ②細胞膜・細胞質照射によって細胞膜応答を調べるため、スフィンゴミエリナーゼの反応物質のセラミドを免疫染色によって解析する。

(2)腫瘍細胞では細胞間シグナル伝達機構は液性因子を介した伝達が優位に機能しているため、液性因子によるバイスタンダー現象を解明するため、培養液交換実験を行う。

- ①照射された細胞の培養液交換実験によって非照射細胞に誘導される細胞死をコロニー形成法によって解析する。さらに、スフィンゴミエリナーゼの関与を解析するため、阻害剤処理による薬理学的手法によって培養液交換実験を行う。
- ②シグナル伝達物質の同定を行うため、照射細胞の培養溶液中のスフィンゴミエリナーゼ活性を解析する。

(3)培地交換実験によりバイスタンダー因子の作用を受けた細胞に誘導される生物学的機能不全現象を調べる。

- ①バイスタンダー因子によって生成されるDNA2本鎖切断を免疫染色によって解析する。
- ②バイスタンダー因子の作用を受けた細胞におけるDNA2本鎖切断修復酵素のATMの分子状態をウェスタンブロットによって解析する。

4. 研究成果

(1)マイクロビームを用いて細胞質のみを照射したとき、照射 72 時間後にアポトーシスが誘導された (図 1)。

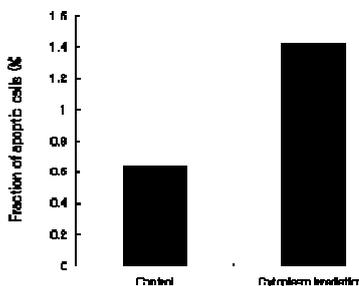


図 1. マイクロビームを用いた細胞膜照射によるアポトーシスの誘導

さらに、マイクロビーム照射による細胞膜応答では、粒子線が細胞膜にヒットした領域において、スフィンゴミエリナーゼによってスフィンゴミエリンの分解産物であるセラミドが局在することが観察された (図 2)。

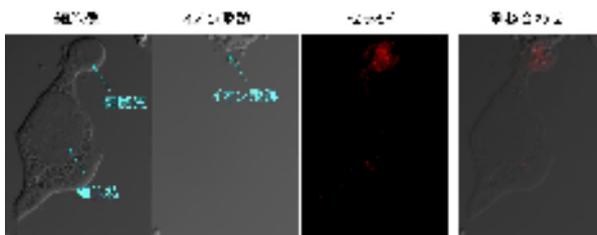


図 2. 細胞質照射による細胞損傷部位におけるスフィンゴミエリナーゼの応答

これらの結果は細胞膜も放射線応答を引き起こす重要なターゲット分子でありことを示唆している。

(2)バイスタンダー効果とバイスタンダー効果誘導へのスフィンゴミエリナーゼの関与を検討した。低線量の X 線 0.1Gy を照射したときの細胞死とさらに 0.1Gy 照射した細胞の培養液を非照射細胞に添加したときに誘導される細胞死を観察し、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤による細胞死の変化を観察した (図 3)

0.1Gy 照射したときの生存率は 0.8 となり、生存率の低下が観察され、放射線超感受性現象が確認された。さらに、培地交換実験においても、0.1Gy 照射と同程度の生存率を示した。さらに、いずれの生存率もスフィンゴミエリナーゼ阻害剤を処理することによって生存率の低下が抑制され、コントロールの同レベルまで回復した。これらの結果から 0.1Gy 照射時に観察された放射線超感受性現象はほぼバイスタンダー効果の液性因子が優位に起こっていることが考えられ、このバイスタンダー効果の誘導にはスフィンゴミエリナーゼが強く関与し、細胞膜応答が引き金として重要であることを示唆している。

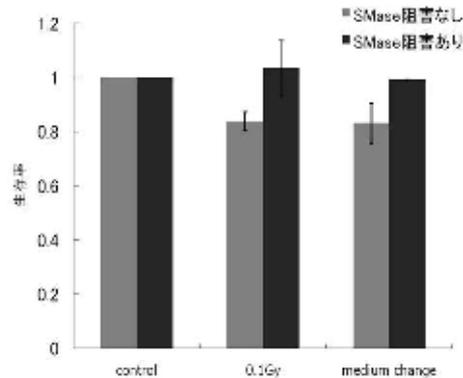


図 3. 0.1Gy 照射による細胞死と培地交換実験による細胞死の変化およびスフィンゴミエリナーゼの関与。

次にバイスタンダー因子について細胞膜応答分子のスフィンゴミエリナーゼ自身が伝達因子として作用するか検討するため 0.1Gy 照射細胞の培養上清のスフィンゴミエリナーゼ活性を経時的観察した (図 4)。

スフィンゴミエリナーゼ活性は照射 15 後に活性が増加することが観察された。この結果は照射 5 分から 15 分後に活性化したスフィンゴミエリナーゼが細胞外に分泌され、スフィンゴミエリナーゼ自身がバイスタンダー因子として作用する可能性が示唆された。

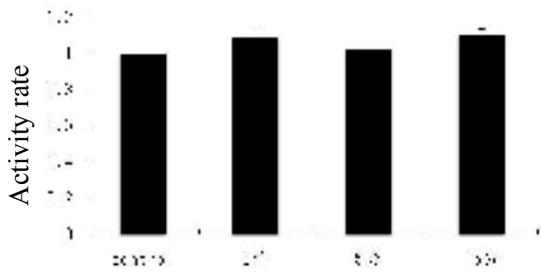


図4. 0.1Gy 照射細胞の培養上清のスフィンゴミエリナーゼ活性の経時的変化

(3) 非照射細胞の培地交換による細胞死誘導機構の解析のため、細胞死の主たる原因である DNA2 本鎖切断の生成を γ H2AX を検出することによって観察した。さらに、照射細胞をスフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理することによって、細胞膜応答と DNA 損傷生成の関係を解析した (図 5)。培地交換後の 30 分～60 分までは DNA 損傷は生成されなかったが、60 分～90 分頃にかけて DNA 損傷が観察された。また、この DNA 損傷生成はスフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理により抑制された。これらの結果から培地交換によって非照射細胞に DNA 損傷がされ、この DNA 損傷の上流にはスフィンゴミエリナーゼが関与することが示唆された。

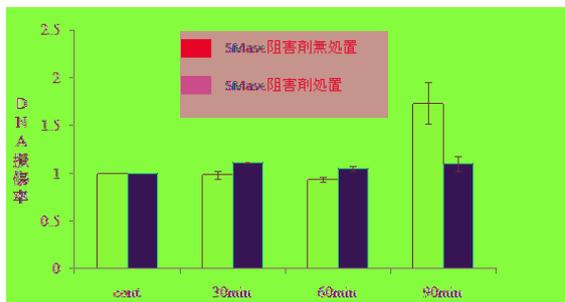


図 5. 培地交換実験により生成される DNA 損傷とスフィンゴミエリナーゼの関与。

図 5 で培地交換 90 分後に DNA 損傷が観察されたが、生成された DNA 損傷は非常に微量であった。この微量の DNA 損傷によって細胞死が誘導される要因として生物学的機能不全が考えられたので、DNA 修復分子の ATM の分子状態について解析をした (図 6)。培地交換後の細胞の ATM を観察したところ、培地交換 5 分頃から 150 kD にバンドが検出され、交換後 30 分後に濃いバンドが検出された。この結果は培地交換後に ATM が徐々に分解され、交換後 30 分後ごろから細胞は DNA 修復不全となることを示唆している。

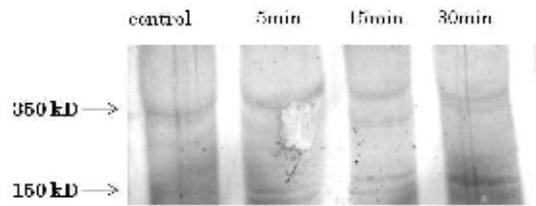


図 6. 培地交換後の細胞内の ATM の分子変化。

これらの結果より放射線超感受性と細胞膜応答が非常に密接に関与することが明らかになった。放射線超感受性を引き起こす主たる原因は細胞外への液性因子の分泌によるバイスタンダー効果が大きく寄与しており、この引き金となるのは細胞膜応答であると考えられた。さらに、バイスタンダー因子として細胞膜応答分子のスフィンゴミエリナーゼが関与しており、スフィンゴミエリナーゼが作用した非照射細胞には DNA 損傷が生成され、さらに ATM が機能不全に陥る ATM 分子分解が引き起こされ、DNA 修復不全となる生物学的不全現象が誘導されることが分かった。つまり、放射性超感受性現象はバイスタンダー効果と生物学的機能不全が細胞膜応答を出発点として連動して起きていることを明らかにした。

この成果は、バイスタンダー効果にスフィンゴミエリナーゼが関与することを始めて明らかにした研究であり、生物学的機能不全現象も軽微な DNA 損傷では DNA 修復分子の反応が誘導されないのではなく、DNA 修復分子が分解され、機能不全に陥っていることを明らかにした初めての研究である。

今後、本研究で明らかにしたことを基に放射線の細胞膜応答の詳細な解析やスフィンゴミエリナーゼの分泌機構をすることによって、より効果的な放射線治療へ応用や細胞膜応答が盛んな脳神経系のシグナル伝達機能等の解明へとつながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 和田成一

東北地域における放射線治療

平成 21 年度獣医師年次学会

2010 年 1 月 31 日

宮崎県 宮崎市 ワールドコンベンションセンター

(2) 和田成一

グリオーマ細胞における低線量イオンビーム照射

による細胞致死効果の増強の解析

第 4 回高崎量子応用研究シンポジウム

2009 年 10 月 9 日

群馬県 高崎市

高崎シティーギャラリー

(3)和田成一
北里大学獣医学部放射線治療装置による放射線治療の現状
第1回獣医がん学会
2009年7月12日
神奈川県 相模原市
麻布大

(4)和田成一
低線量放射線照射によるバイスタンダー効果誘導機構の解析
第15回NMCC共同利用研究発表会
2009年5月16日
岩手県 盛岡市 岩手医大

(5)和田成一
粒子線トラック構造とDNA損傷分布について
第51回日本放射線影響学会
2008年11月21日
福岡県 北九州市
西日本総合展示場

(6)和田成一
イヌ自然発症黒色腫の粒子線に対する細胞致死効果の解析
第3回高崎量子応用研究シンポジウム
2008年10月10日
群馬県 高崎市
高崎シティーギャラリー

(7)和田成一
グリオーマにおける低線量放射線照射による細胞致死効果の解析ーバイスタンダー効果と微量元素との関連ー
第14回NMCC共同利用研究発表会
2008年5月12日
岩手県 盛岡市
岩手医科大学

(8)和田成一
放射線照射による細胞膜損傷からのアポトーシス誘発機構の解析
第50回日本放射線影響学会
2007年11月15日
千葉県 千葉市
幕張メッセ国際会議場

〔図書〕(計1件)

(1)和田成一
ファームプレス
北里大学獣医学部放射線治療装置による放射線治療の現状
2009
pp24-27

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 成一 (WADA SEIICHI)
北里大学・獣医学部・獣医学科・講師
研究者番号：50370490