

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780037

研究課題名（和文） 昆虫細胞は放射線に耐性といえるのか？

研究課題名（英文） Effect of heavy-ion irradiation on insect cells

研究代表者

深本 花菜（FUKAMOTO KANA）

信州大学・繊維学部・アソシエイト研究員

研究者番号：40435607

研究成果の概要（和文）：

増殖死を指標として昆虫細胞への放射線照射の影響を調査した。その結果、低線量照射ではほとんど影響は認められなかった。それ以上の線量では線量依存的に細胞増殖率が減少したものの、高線量照射区でも細胞数の変化は認められず、死細胞数の増加も観測されなかった。生存率-増殖曲線から求めた各パラメータ値は予想より低いものの哺乳類細胞と比較して高く、改めて昆虫細胞が放射線に高い抵抗性を有することが証明された。

研究成果の概要（英文）：

Insect cells are considered to be more resistant to radiation compared with mammalian cells, but the detail mechanisms of this resistance have not been understood. To clarify the molecular mechanisms of radioresistance in insect cells to heavy ions, we investigated the effect of carbon ion ($^{12}\text{C}^{5+}$) irradiation on insect cells (Sf9). As a result, no effects of carbon ion irradiation on the viability of Sf9 cells were observed even at a dose of 400 Gy. However, the dose-dependent inhibition of cell proliferation was found. These results indicate the insect cells are relatively high resistant to radiation with mammalian cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：カイコ、昆虫細胞、重イオンビーム、障害修復、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

カイコを含む昆虫の細胞は放射線に対し

て耐性であると言われている。この高い放射線耐性は 昆虫細胞では DNA 損傷によるアポトーシスが起こりにくい、真皮細胞や脂肪体細胞など倍数化している細胞が多く、同じ遺伝子が全て損傷を受ける可能性が少ない、また特にカイコにおいては、分散型動原体であるため、放射線による染色体の 2 本鎖切断が完全に修復されず一部が切断されたままの状態であっても、細胞分裂において染色体の分配が可能である、などがその理由とされる。

一般に哺乳動物の細胞を用いた研究では、細胞の増殖停止または数回のみに分裂した後長時間生存する細胞死、すなわち「増殖死」が細胞死の基準とされる。しかし、これまでの昆虫細胞に対する放射線影響の研究では、照射直後に起こる、その後の細胞分裂を伴わない死、すなわち細胞の「間期死」を指標として論じられていることが多い。

すなわち昆虫ではこれまで「増殖死」を指標に放射線耐性（抵抗性）がほとんど論じられることはなく、生物間の放射線抵抗性を比較するに当たっての基準が必ずしも統一されていなかった。

筆者らはこれまでカイコの様々な組織に重イオンを照射し、その影響を調査してきた。その結果、カイコの真皮細胞は炭素イオンを 400Gy の線量で照射されても、顕著な細胞死や細胞の脱落が認められないこと等を明らかにしてきた。しかしその一方で、成虫期の鱗毛形成阻害や良性腫瘍のモデルであるカイコのコブ突然変異（*K*）の発現抑制など重イオン照射により真皮細胞の細胞分裂が抑制されたと思われる現象も観察されている。放射線生物学における細胞死は一般に細胞分裂の停止、すなわち増殖死を指標とする。よってカイコ真皮細胞も増殖死を指標とした場合、線量 400Gy で細胞死が誘導されたと見なせる可能性がある。

2. 研究の目的

昆虫細胞は放射線に対し高い抵抗性を示すと言われている。しかし、他の動物にも認められるように、同一個体内の細胞でも放射線に対する応答は画一的ではない。また、昆虫細胞においても、照射を受けた後、増殖を停止する細胞があることが知られている。本研究は、昆虫細胞は考えられているほど放射線に抵抗性ではないという立場に立ち、これまであまり着目されてこなかった「増殖死」の概念を取り入れた上で、昆虫細胞が真に放射線抵抗性であるかどうかを再評価することを目的としている。

3. 研究の方法

実験にはヨウトウガ卵巣由来の Sf9 培養細胞を用いた。培地はウシ胎児血清を 10% 加えた IPL-41 培養液を用いた。重イオン照射は日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の重イオン照射施設にある深度制御種子照射装置を用いた。イオン種は炭素イオンである。対数増殖期の細胞を 2.5×10^5 cells/ml に調整し、直径 35mm のシャーレに 4.5×10^5 cells/dish (1.8ml) となるように接種した。照射は線量 10-400Gy となるように行った。照射後、経時的に細胞を顕微鏡で観察し、形態の変化等を確認した。照射 96 時間後に細胞数を調査し、増殖に対する影響を調べた。また照射細胞の生存率はトリパンブルーを用いて調査した。照射細胞の増殖能は上述の方法で重イオンを照射し、24 時間後細胞を回収し 1%メチルセルロースを含む培地中に 2.0×10^4 cells/dish となるよう再度調整し、シャーレに播種し直した。144 時間後、それぞれの照射区におけるコロニー形成を調査した。

4. 研究成果

最初に様々な線量で重イオンを照射した Sf9 細胞の 96 時間後における細胞増殖を調査した。その結果、10Gy の線量で照射した区では実験操作のみで照射しなかった対照区 (0Gy) と有意差は認められず、増殖への影響は認められなかった。20-40Gy までは線量に応じて細胞数が減少し、50Gy 以上で照射した区では細胞数の増加が認められなくなった。トリパンブルーの取り込みを指標に照射 96 時間後における細胞の生存率を調査したところ、0-400Gy までの全ての照射区において有意差は認められず、照射による顕著な細胞死は確認されなかった。これらの結果は、400Gy までの線量の重イオンを Sf9 細胞に照射した場合、増殖は抑制されるが、細胞死（アポトーシス）は誘導されないことを示唆する。

そこで照射細胞のコロニー形成を調査した。その結果、10Gy 照射区はほとんど影響が認められなかったが、30Gy 照射区では顕著にコロニー形成が阻害され、100Gy 以上照射した区ではほとんどコロニーは形成されなかった。これは細胞増殖を調査した結果と矛盾しない。照射 144 時間後の生存率-増殖曲線から求めた各パラメータの値は、 $n=1.25$ 、 $Dq=18Gy$ 、 $Do=84Gy$ であった。これらの結果は、当初予想していたより値は低いものの、哺乳類の培養細胞と比較して極めて高い。

照射後の細胞を観察すると、50Gy 付近では照射 96 時間後では肥大し形態が異常になる細胞と比較的正常に見える細胞が混在した。しかし、240 時間後にはほぼ正常な細胞のみとなることから、昆虫細胞は哺乳類では

重複不可能となりアポトーシスする線量でも、修復し再び増殖を開始する可能性がある。

以上のように、本研究では増殖死を指標とした場合も昆虫細胞が重イオン照射に比較的耐性であることを確認した。同時に、一旦細胞死したと考えられる細胞も長期間培養後には障害を修復し再び増殖を開始する可能性を示した。昆虫細胞の障害修復能と放射線に対する耐性の関係について現在研究中である。

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6件)

Hino M, Hamada N, Tajika Y, Funayama T, Morimura Y, Sakashita T, Yokota Y, Fukamoto K, Mutou Y, Kobayashi Y, Yorifuji H. (2010) Heavy ion irradiation induces autophagy in irradiated C2C12 myoblasts and their bystander cells. *J. Electron Microsc.*, **59**, 495-501. 査読有

Furusawa T, Fukamoto K, Sakashita T, Suzuki E, Kakizaki T, Hamada N, Funayama T, Suzuki H, Ishioka N, Wada S, Kobayashi Y, Nagaoka S. (2009) Targeted heavy-ion microbeam irradiation of the embryo but not yolk in the diapause-terminated egg of the silkworm, *Bombyx mori*, induces the somatic mutation. *J. Radiat. Res.*, **50**, 371-375. 査読有

Hino M, Hamada N, Tajika Y, Funayama T, Morimura Y, Sakashita T, Yokota Y, Fukamoto K, Kobayashi Y, Yorifuji H. (2009) Insufficient membrane fusion in dysferlin-deficient muscle fibers after heavy-ion irradiation., *Cell Struct. Funct.*, **34**, 11-15. 査読有

Suzuki M, Sakashita T, Yanase S, Kikuchi M, Ohba H, Higashitani A, Hamada N, Funayama T, Fukamoto K, Tsuji T, Kobayashi Y. (2009) Effects of ionizing radiation on locomotory behavior and mechanosensation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Radiat. Res.*, **50**, 119-125. 査読有

Funayama T, Wada S, Yokota Y, Fukamoto K, Sakashita T, Taguchi M, Kakizaki T, Hamada N, Suzuki M, Furusawa Y,

Watanabe H, Kiguchi K, Kobayashi Y. (2008) Heavy-ion microbeam system at JAEA-Takasaki for microbeam biology., *J. Radiat. Res.*, **49**, 71-82. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

深本花菜・小林智史・土屋志織・舟山知夫・横田裕一郎・坂下哲哉・小林泰彦・木口憲爾・白井孝治：重イオン照射造血器官の崩壊・再生機構：血球前駆細胞の重イオンに対する応答、日本蚕糸学会第80回大会、平成22年4月3日、信州大学

白井孝治・福島壽斗・片桐千仍・深本花菜・木口憲爾：エビガラスズメ緑色幼虫の体色発現機構：色素顆粒中のINS凝集成分Xについて、日本蚕糸学会第80回大会、平成22年4月3日、信州大学

小林智史・深本花菜・白井孝治・木口憲爾・舟山知夫・坂下哲哉・小林泰彦：重イオン照射カイコ造血器官の崩壊・再生機構の解明-低線量照射における影響-、日本蚕糸学会中部支部第65回・東海支部第57回合同研究発表会、平成21年12月3日、名古屋大学

小林智史・土屋志織・白井孝治・木口憲爾・深本花菜・横田裕一郎・舟山知夫・坂下哲哉・小林泰彦：重イオン照射造血器官の崩壊・再生機構-崩壊期におけるeIF2 キナーゼ(BeK)の発現調査、日本蚕糸学会中部支部第64回・東海支部第56回合同研究発表会、平成20年11月26日、27日、信州大学

土屋志織・白井孝次・木口憲爾・深本花菜・横田裕一郎・舟山知夫・坂下哲哉・小林泰彦：昆虫培養細胞 Sf9 におけるバスタンダー効果の有無について、日本蚕糸学会中部支部第64回・東海支部第56回合同研究発表会、平成20年11月26日、27日、信州大学

〔その他〕

ホームページ

<http://bs.shinshu-u.ac.jp/BES/Staff.htm>

1

6. 研究組織

(1)研究代表者

深本 花菜 (FUKAMOTO KANA)

信州大学・繊維学部・アソシエイト研究員
研究者番号：40435607

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし