

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08065

研究課題名(和文)放射線照射された細胞の有・低酸素環境への適応機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular biological mechanisms of irradiated cells cultured under normoxic or hypoxic conditions

研究代表者

劉 翠華 (Liu, Cuihua)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 重粒子線治療研究部・主任研究員

研究者番号：00512427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腎臓初代培養細胞は照射後低酸素濃度環境で培養した細胞のmiRNAは常酸素でよFold ChangeであるmiRNAが数多く見られた。特にmmu-miR-210-3pとmmu-miR-210-5p二種類のmiRNAは放射線の線質と関係なく常酸素環境での培養より2-7倍に多くとなった。これらのmiRNAsのmimic、inhibitorを細胞内導入して、調べた結果、miR-210-3pあるいはmiR-210-5pは細胞の放射線感受性や増殖など関係する事が示唆された。一方、神経膠芽腫U87MG細胞では同じ条件でfold changeしたmiRNAの数はマウスの腎臓初代培養細胞より少なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では生体内低酸素環境を模擬した実験系において、がん細胞ならびに正常組織細胞のmiRNA発現プロファイルを解析する。miRNA発現スクリーニングにより低酸素環境で培養した細胞の放射線抵抗性やNHEJ修復忠実度に関するメカニズムを明らかにする。これらの実験により、生体内を模擬した低酸素環境下でどのような因子が放射線応答に関わっているかを調べ、放射線治療生物学の重要な基礎データを蓄積する。そして新たな有・低酸素生体応答の研究基盤を構築する。

研究成果の概要(英文)： Many miRNAs in mouse kidney primary cultured cells cultured in a hypoxic condition were found to be changed by more than 2 times or less than 0.5 times compared with the cells cultured in a normoxic conditions after irradiation. Specifically, in the case of mmu-miR-210-3p and mmu-miR-210-5p, regardless of the quality of radiation, the fold changes was 2 to 7 times higher than those cells cultured in a normoxic conditions. After transfected the mimic or inhibitor of these two kinds of miRNA into mouse kidney primary cultured cells, the cell proliferation and radiation sensitivity were altered. The results showed that the miR-210-3p and miR-210-5p maybe associated with cell radiosensitivity or cell proliferation.

On the other hand, the numbers of fold-changed miRNAs in human glioblastoma cells (U87MG) was lower than that mouse kidney primary cells cultured under the same conditions.

研究分野：放射線生物影響

キーワード：放射線 重粒子線 低酸素培養 miRNA トランスフェクション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低酸素について酸素濃度は5%以下と定義されている (Yoshida Y et al. Cell stem cell . 2009)。1950年代以来、低酸素の研究特に放射線との生体応答についての研究結果が数多く得られていた。照射が大気下であることで、酸素が放射線の増感剤として作用し、細胞生存率は低酸素条件より低い事が明らかになってきた (Hirayama R et al. J. Radiat. Res. 2005)。ヒト神経膠芽腫 U87MG 細胞において、照射前に5日間1%酸素環境下で培養した細胞は、常酸素環境で5日間培養した細胞よりX線に対する細胞の生存率は高くなる事が報告された (Cowman S et al. BMC Cancer . 2019)。我々は有・低酸素が照射時だけでなく照射前後に細胞に対して何らかの影響を与え、放射線の効果を修飾することを見出した (未発表)。具体的にはマウスの腎臓初代培養細胞を用いて、X線や炭素イオン照射後、異なる酸素濃度環境下で培養した細胞の放射線感受性は高 LET の放射線を照射しても低酸素環境で培養した細胞は生存率が高い事が分かった。また染色体異常頻度を分析すると、照射後、低酸素環境で培養した細胞の染色体異常頻度は常酸素環境培養に比べて染色体の異常頻度が低いこともわかったがそのメカニズムの詳細については不明である。

### 2. 研究の目的

放射線生物研究では照射前ならびに照射中での低酸素影響研究が酸素効果の研究として主であった。しかし、生体内では生理酸素濃度は大気下よりもかなり低く、常に低酸素環境下におかれた状態での放射線応答が行われていると推測される。これまでに放射線照射後、低酸素環境で培養した細胞は放射線抵抗性になり、染色体異常頻度は低いことが明らかになり、その詳細メカニズムについては不明である。本研究では、ヒト神経膠芽腫 (U87MG) とマウス腎臓初代培養細胞を用いて、X線や炭素線照射後、異なる酸素濃度環境で細胞を培養して、1) 低酸素環境特異的な miRNA 発現の探索を行う。さらに照射後、異なる酸素濃度環境で培養した細胞の miRNA のプロファイリングを解析し、2) 低酸素環境特異的な miRNA 及びタンパク質の発現と細胞致死などの関連性について明らかにする。

これらの実験により、生体内を模擬した生理低酸素環境下でどのような因子が放射線応答に関わっているかを調べ、放射線治療生物学の重要な基礎データを蓄積する。そして新たな有・低酸素生体応答の研究基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) miRNA のプロファイリングの解析：

X線や高 LET 炭素線を用いて、マウス腎臓初代培養細胞及びヒト神経膠芽腫細胞 U87MG を照射し、照射された細胞はサブカルチャー後、異なる酸素濃度環境 (1%、3%、21%) で細胞を培養した。培養した細胞の microRNA を含むトータル RNA を抽出し、抽出した RNA をラベリングやハイブリダイゼーション後スキャンし、GeneChip miRNA Array で miRNA の検出し、網羅的解析を行った。

#### (2) miRNA の導入及び機能の検証：

マウス腎臓初代培養細胞について、常酸素環境より低酸素環境で2倍以上アップレギュレートされた mmu-miR-2103p, mmu-miR-210-5p の機能を解析するため、Lipofectamine RNAiMAX Reagent を用いて、二種類の miRNA の mimic、inhibitor を細胞内に導入した。トランスフェクションされた細胞は MTT 法やコロニー形成法など用いて、細胞増殖能などの実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) トランスフェクション結果の確認

Lipofectamine@R RNAiMAX Reagent を用いて、二種類の miRNA mimic あるいは miRNA inhibitor を細胞内に確実に導入されたことを確認された。二種類の miRNA (mmu-miR-210-3p, mmu-miR-210-5p) の mimic あるいは inhibitor の 5'-FAM を用いて、72 時間をトランスフェクションした。それから、顕微鏡で観察した結果、細胞核内に mmu-miR-210-3p また mmu-miR-210-5p の mimic や inhibitor を確実に細胞核内に存在することが確認された (図1)。

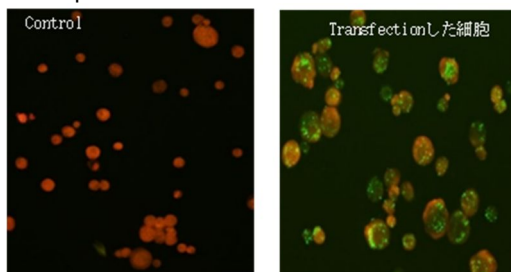


図1. トランスフェクションした細胞

(2). X線や炭素線に照射されたヒトの神経膠芽腫細胞 U87MG 及びマウス腎臓初代培養細胞の網羅的に miRNA の解析より低酸素環境で培養した細胞の miRNA の発現量と常酸素環境で培養した

細胞比較すると発現量が異なる miRNA は多数があった。

照射後 1 %、3 %の低酸素濃度環境で培養した二種類細胞 (U87MG 細胞及びマウス腎臓初代培養細胞) の miRNA 網羅的に解析を行った。その結果、常酸素環境で培養した細胞より 2 倍以上アップレギュレート、0.5 倍以下ダウンレギュレートという発現量を変化された miRNA 数は多く見られた。

マウス腎臓初代培養細胞は照射の有・無に関わらず常酸素環境より低酸素環境で変動した miRNA の数が多く見られた。照射しなかった細胞について、常酸素環境と比較すると、1 %低酸素濃度環境で培養した細胞は、変動された miRNA 数は 3%酸素濃度環境より倍以上多かった。変動した miRNA の数は酸素濃度に依存する事が示唆された。特に mmu-miR-210-3p と mmu-miR-210-5p は放射線の照射や線質など関係なく、常酸素環境で培養した細胞よりも 2-7 倍に高発現されたことがわかった。以上の結果から、X 線や高 LET の炭素線照射された細胞について、低酸素濃度環境で培養した細胞の miRNA の発現は常酸素環境で培養した細胞の miRNA の発現と異なることが示唆された。

ヒト神経膠芽腫細胞 U87MG では照射後低酸素培養した細胞は変動した miRNA の数はマウスの腎臓培養細胞より少なかった。また、高 LET 炭素線照射後 1 %酸素濃度環境で培養した細胞は X 線照射後 1 %酸素濃度環境で培養した細胞と比べて、変動した miRNA の数が倍以上多かった、LET 依存性が現れたが、3 %酸素濃度環境については変動した miRNA 数は殆ど一緒だった。

マウス腎臓初代培養細胞は照射の有無に関わらず、U87MG 細胞より低酸素環境下で変動した miRNA が数多く見られた。一方、U87MG では、変動した miRNA 数は少なく、酸素濃度による影響はマウス腎臓初代培養細胞より弱かったことがわかった。

これらの結果から、マウス腎臓初代培養細胞はヒト神経膠芽腫細胞 U87MG より酸素濃度の影響を受けやすい事が示唆された。

### (3) . Mmu-miR-210-5P;mmu-miR-210-5P の機能の検証

二種類の miRNA (mmu-miR-210-3p、mmu-miR-210-5p) の mimic や inhibitor を用いて、マウス腎臓初代培養細胞に transfection し、トランスフェクションした細胞を X 線で照射した。コロニー形成法や MTT 法などを用いて細胞の放射線感受性や増殖効果を調べた結果、常酸素環境で培養した細胞に対して、mmu-miR-210-3p mimic と mmu-miR-210-5p mimic をそれぞれ transfection した細胞は、非 transfection 細胞よりも多くのコロニー形成があった。一方、低酸素環境で培養した細胞では両者の違いは殆ど見られなかった。

また、mmu-miR-210-3p inhibitor を transfection した細胞は、X 線照射後、3%酸素濃度で培養することで生きている細胞の吸光度は非 transfection 細胞に比べ低減されたことがわかった。つまり、mmu-miR-210-3p inhibitor は低酸素環境での培養により放射線抵抗性が失われることが示唆された (図 2)。一方、mmu-miR-210-5p inhibitor を transfection した細胞は、3 %の酸素環境で培養した細胞だけ吸光度を低下した。

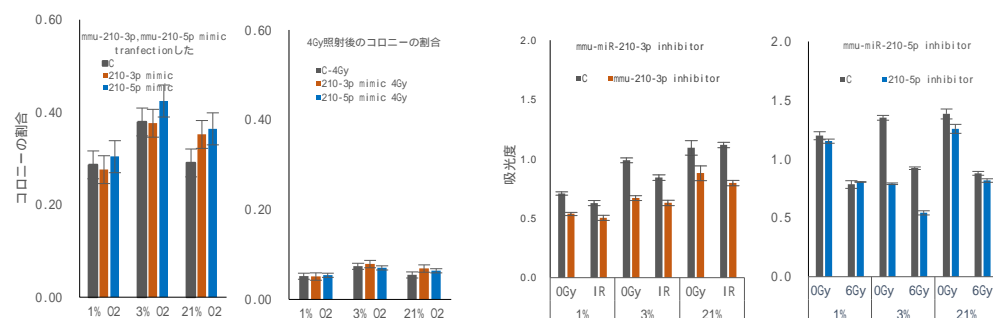


図 2 . マウス腎臓培養細胞に mir-210-3p 及び mir-210-5p transfection した細胞の増殖影響

以上の結果から、miR-210-3p, miR-210-5p のトランスフェクションより、マウス腎臓初代培養細胞の放射線感受性や細胞増殖能など関わる事が示唆された。今後は、低酸素環境下での mmu-miR-210-3p や mmu-miR-210-5p の機能のより詳細を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katsube Takanori , Wang Bing , Tanaka Kaoru , Ninomiya Yasuharu , Hirakawa Hirokazu , Cuihua Liu , Maruyama Kouichi , Guillaume Vares , Qiang Liu , Murakami Masahiro , Nakajima Tetsuo , Fujimori Akira , Neno Mitsuru:	4. 巻 882
2. 論文標題 Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosomal aberrations in mouse splenocytes at one- and two-months after total body exposure to iron-56 (Fe) ion particles or X-rays	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrgentox.2022.503548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Bing , Katsube Takanori , Tanaka Kaoru , Ninomiya Yasuharu , Hirakawa Hirokazu , Cuihua Liu , Maruyama Kouichi , Murakami Masahiro , Nakajima Tetsuo , Fujimori Akira , Neno Mitsuru	4. 巻 12 ( 4 ) 565
2. 論文標題 Enhanced Effects of Chronic Restraint-Induced Psychological Stress on Total Body Fe-Irradiation-Induced Hematopoietic Toxicity in Trp53-Heterozygous Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 life	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radmp.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cuihua Liu , Hirakawa Hirokazu , Katsube Takanori , YaQun Fang , Tanaka Kaoru , Neno Mitsuru , Fujimori Akira , Wang Bing	4. 巻 22(13)
2. 論文標題 Altered Induction of Reactive Oxygen Species by X-rays in Hematopoietic Cells of C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22136929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narongchai Autsavapromporn , Alisa Kobayashi , Cuihua Liu , Churdsak Jaikang , Tengku Ahbrizal Tengku Ahmad , Masakazu Oikawa , Teruaki Konishi	4. 巻 197(2)
2. 論文標題 Hypoxia and Proton microbeams: Role of Gap Junction Intercellular Communication in Inducing Bystander Responses on Human Lung Cancer Cells and Normal Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 122-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-21-00112.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cuihua Liu , Kaoru Tanaka , Takanori Katsube , Guillaume Vares , Kouichi Maruyama , Yasuharu Ninomiya , Zeenath Fardous , Chao Sun , Akira Fujimori , Stephanie G. Moreno , Mitsuru Neno , Bing Wang	4. 巻 18 (3)
2. 論文標題 Altered Response to Total Body Irradiation of C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dose Response	6. 最初と最後の頁 1,11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1559325820951332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Liu cuihua , Hirakawa hirokazu , Hirayama ryoichi , Fujimori akira
2. 発表標題 Biological responses are altered when mouse kidney cells are cultured in different oxygen concentrations after radiations
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 平山亮一、鶴沢玲子、高野勇貴、劉翠華、平野祥之、野口実穂、小西輝昭、長谷川純崇
2. 発表標題 X線ならびに高LET放射線におけるDNA断片化とその修復における低酸素の影響
3. 学会等名 日本量子医科学会第2回学術大会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平山 亮一  (Hirayama Ryoichi)  (90435701)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所・重粒子線治療研究部・研究統括    (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------