

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791201

研究課題名（和文）癌治療における放射線誘発非アポトーシス型細胞死の重要性と  
その分子機序の解明研究課題名（英文）Elucidation of pathway and molecular mechanism of radiation-induced  
non-apoptotic cell death mode in human solid carcinoma cell

研究代表者

鈴木 正敏（スズキ マサトシ）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号：60515823

研究成果の概要（和文）：放射線がヒト固形腫瘍由来細胞へ誘発する細胞死形態を生細胞イメージングにて解析した結果、放射線を照射した細胞周期に依存せず、G1 期で長期間の細胞周期停止が誘導されることを示した。特に G2 期照射の場合では、p53 存在下で分裂期を介さずに G2 期から G1 期へ直接細胞周期を進行させることが確認されたため、タキソールを併用する放射線化学療法が p53 機能を欠損したがん細胞に対して有効な治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Live-cell imaging of mammary carcinoma cell line revealed prolonged cell cycle arrest as a predominant cell death mode induced by ionizing radiation. Regardless cell cycle phase that exposed to ionizing radiation, prolonged cell cycle arrest was induced in G1 phase. Particularly, direct cell cycle progression from G2 to G1 phase without mitosis was observed by G2-irradiation in presence of p53, suggesting that radiochemotherapy combined with taxane-treatment increases the treatment-sensitivity for p53-depleted carcinoma cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：放射線治療生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線、細胞死、老化様増殖停止、生細胞イメージング、

## 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスが主要な放射線誘発細胞死形態であると一般的に考えられており、放射線治療における感受性評価の指標、あるいは放射線増感法の開発において利用されてきた。造血系腫瘍細胞ではアポトーシスと放射線感受性の相関関係が認められる一方で、固

形腫瘍細胞株においてはアポトーシス誘導能が低いことも報告されている。そのため、固形腫瘍細胞における放射線誘発細胞死形態は非アポトーシス型が主要な形態であると予想されるようになった。放射線抵抗性を示すがん細胞への放射線増感法として、がん細胞で不活化されている細胞死を適切に誘

導することが必要である。そのため、放射線によって誘導される細胞死形態を正確に理解し、その分子機構を解明することが放射線増感法の開発に対して重要な知見となることが予想される。

## 2. 研究の目的

固形腫瘍由来細胞における放射線誘発細胞死形態の解析と、その分子機構解明が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究全体を通じて、10 Gy の X 線を照射した乳がん由来細胞株 MCF-7 を用いて検討を行った。

### (1) 放射線誘発細胞死経路の解析

生細胞イメージングを X 線照射後から 5 日間にわたって行い、個々の細胞における細胞増殖状態や形態的变化から、誘導される細胞死を判定した。

#### ① 老化様増殖停止誘導の判定

非アポトーシス型細胞死経路に属する老化様増殖停止の判定において、細胞老化特異的な形態変化を生細胞イメージングにて確認するとともに、老化細胞の生化学マーカーである老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ (SA- $\beta$ -gal) の検出を併せて行った。

#### ② アポトーシス誘導の判定

生細胞イメージングによるアポトーシス特異的な形態変化の観察に加えて、アポトーシスの指標として切断型 PARP を特異的に認識する抗体を用いた蛍光免疫染色を併せて行った。

#### (2) 非アポトーシス型細胞死経路に関与する分子機序の解明

##### ① 老化様増殖停止経路の解明

細胞周期依存的に細胞核内で蛍光が検出される細胞周期マーカー (FUCCI) を導入した MCF-7 を用い、生細胞イメージングにおいて放射線照射後の細胞周期解析を行った。また、生細胞イメージング後に細胞を固定し、蛍光免疫染色を行うことによって細胞動態と分子動態をカップリングさせた解析も行った。

##### ② マイトティック・カタストロフィの分子機構解明

$\beta$ 、 $\gamma$  チューブリン抗体を用いた蛍光染色法により、分裂極数の解析を行った。また、GFP-H2B を導入した MCF-7 を用いた生細胞イメージングにより、分裂期細胞における染色体分配の観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 生細胞イメージングによる放射線誘発細胞死経路の解析

10 Gy 照射後 5 日間にわたる生細胞イメージングにより、放射線によって誘導される細胞

死形態の判定と、細胞死が誘導されるまでに生じた変化を継時的に解析する細胞系譜解析を行った。その結果、照射細胞の約 60% は一度も分裂期へ進行せず、細胞形態の巨大化が観察された。残りの 40% は分裂期へ進行したものの、細胞分裂時に異常な細胞核分配様式を示すマイトティック・カタストロフィが必ず生じ、加えて、その約 90% は、分裂後に子孫細胞同士の細胞融合が起こった結果、多数の細胞核を持つ細胞が形成された。このような細胞融合の有無に関わらず、細胞分裂後の子孫細胞は再び分裂期へ進行せずに長期間にわたって増殖を停止し続けた。その他、分裂期進行の有無に関係なく、巨大化した細胞の中からネクロシス様、あるいはアポトーシス様の特徴を示す細胞が約 10% ずつ観察された。アポトーシスの指標として切断型 PARP を特異的に認識する抗体を用いた蛍光免疫染色法により、照射 5 日後までの間に 10% 以内の細胞で切断型 PARP が検出され、生細胞イメージングによる解析と類似した結果が得られた。また、細胞老化マーカーである SA- $\beta$ -gal 染色の結果から、照射後に分裂期へ進行しなかった細胞のみならず、マイトティック・カタストロフィ誘導細胞でもその発現が認められた。加えて、ネクロシス様、あるいはアポトーシス様の特徴を示した細胞でも SA- $\beta$ -gal に対して陽性を示した。以上の結果から、放射線誘発老化様増殖停止が乳癌細胞の主要な細胞死形態であることが示された。また、細胞死形態として分類されてきた老化様増殖停止、アポトーシス、ネクロシス、マイトティック・カタストロフィはそれぞれ独立して誘導されると考えられてきたが、今回の細胞系譜解析結果はマイトティック・カタストロフィに引き続く老化様増殖停止の誘導、あるいは老化様増殖停止に引き続くアポトーシス、またはネクロシスの誘導など、同一細胞で複数の細胞死形態が引き続いて誘導されることを示している。また、マイトティック・カタストロフィは細胞死形態の 1 つとして定義されてきたが、細胞核の異常分配によって細胞死が誘導される理由は明らかにされてこなかった。本解析結果より、マイトティック・カタストロフィ誘導細胞で老化様増殖停止が誘導されるという事実から、マイトティック・カタストロフィは細胞核分配異常を示すもので、細胞死の特徴であるコロニー形成能の喪失は老化様増殖停止に起因していると考えられる。

### (2) 放射線誘発細胞分裂異常機構の解明

(1) における細胞系譜解析から、放射線照射後に細胞分裂を経たがん細胞では① 必ずマイトティック・カタストロフィが誘導される、② 細胞分裂後には高頻度に子孫細胞同士の細胞融合が生じる、という 2 つの異常が観

察された。マイトティック・カタストロフィは細胞分裂時の分裂極形成に重要な役割を果たす中心体の過剰複製によって形成されることが指摘されていたため、放射線照射後の分裂中期細胞で観察される分裂極数を指標として中心体の過剰複製を評価した。そのため、 $\beta$ チューブリン、あるいは $\gamma$ チューブリン染色によって紡錘糸、あるいは中心体を可視化することで分裂極数を調べた。放射線照射後に出現する分裂期細胞の割合は、照射6時間後ではその出現頻度はほとんどなくなるが、その後照射24時間までの間に出現頻度は回復し、照射24-30時間で非照射時のおよそ2倍の頻度で分裂期が観察された。その後、出現頻度は急激に減少し、照射7日後までその頻度は0.1%以下に低下していた。分裂期出現頻度がピークを迎える照射後24-30時間では、3個以上の過剰な分裂極をもつ分裂中期細胞は1%未満で、ほぼ全ての分裂中期細胞では正常な分裂極数が検出された。そこで、緑色蛍光タンパク質 (GFP) でラベルされたヒストン H2B タンパク質を導入し、染色体分配の様子を生細胞イメージングで解析した。正常な分裂極数を示した分裂期細胞由来の子孫細胞でマイトティック・カタストロフィが観察されたため、中心体の過剰複製以外の機構がマイトティック・カタストロフィ誘導に関与していることが示唆された。マイトティック・カタストロフィは子孫細胞内に多数の微小核を形成することを特徴とするが、GFP-H2B イメージングは同時に、分裂中期の赤道面に集積しなかった染色体が直接、微小核形成の原因となっていることを示した。加えて、染色体の赤道面への集積時において必須の役割を果たす動原体に特異的に局在するヒストンタンパク質 CENP-A の蛍光染色を行うと、分裂中期で赤道面に集積されなかった染色体のみならず、細胞分裂後の子孫細胞でみられた微小核でも検出されなかった。すなわち、放射線により生じる DNA 二重鎖切断が修復されないうちに分裂期へ進むことで、動原体をもたない染色体断片が原因となるマイトティック・カタストロフィが誘導されることが示唆された。

一方、赤道面に集積した染色体群がそれぞれの分裂極へ分配される分裂後期細胞において、両方向の分裂極から引かれることによって分配された染色体間で観察される染色体架橋が検出された。この染色体架橋は DAPI 染色によって細胞分裂後の子孫細胞間を連結する染色体架橋としても観察される。このような染色体架橋は細胞質分裂が行われた子孫細胞間のみならず、細胞融合した細胞においても観察された。そのため、染色体架橋をもつ子孫細胞対の頻度と染色体架橋を持つ融合細胞頻度の相関を調べた。分裂期出現頻度がピークを示す照射後24-30時間後では

融合細胞は観察されず、一方で染色体架橋を持つ子孫細胞のペアが約80%観察された。この割合はその後の時間経過とともに徐々に減少していったが、その減少と相反して融合細胞の出現頻度が増加した。染色体架橋を持たない子孫細胞の頻度は照射後の時間経過によって大きな変化を示さず、ほぼ一定であった。以上の結果は、染色体架橋をもつ細胞で優先的に細胞融合が誘導されていることを示唆する。

以上の解析結果より、赤道面に集積しなかった染色体、あるいは染色体架橋として示される染色体断片、あるいは二動原体染色体のように古典的に知られている染色体異常が、マイトティック・カタストロフィ、あるいは子孫細胞同士の細胞融合に寄与していることが示された。また、前項で述べたマイトティック・カタストロフィ誘導細胞では、染色体断片として示される未修復の DNA 二重鎖切断が老化様増殖停止を誘導する原因となっていることが考えられる。

### (3) 老化様増殖停止誘導機構の解明

生細胞イメージングの結果より、放射線照射によって長期間の増殖停止が誘導されることが明らかとなった。そこで、細胞周期マーカーを導入した MCF-7 を用いてがん細胞における老化様増殖停止に寄与する細胞周期停止機構の解明を試みた。照射直後に検出される細胞周期マーカーをもとに、G1 期あるいは G2 期照射ごとの細胞系譜解析を行った。その結果、G1 あるいは G2 期照射に関わらず、最終的には G1 期で増殖を長期間にわたって停止した。G1 期照射では、照射後そのまま G1 期に留まる場合と、細胞周期を進行した場合では、分裂期でマイトティック・カタストロフィが誘導された後の次の G1 期で増殖停止が誘導された。G2 期照射では一過的に G2 期の進行が遅延するが、その後分裂期、G1 期へと進行した後に増殖停止した場合と、分裂期特異的な形態を示さずに細胞周期マーカーの検出において G1 期を示す状態へと変化した後に増殖停止が誘導された経路が観察された。特に後者においては生細胞イメージングにおいてそのような細胞を特定後、蛍光免疫染色法により G1 期特異的な細胞核内への蓄積を示すサイクリン E が検出された。このサイクリン E の核内蓄積は、細胞分裂後に G1 期でとどまっている細胞と同様に観察されたことから、分裂期を介さない G2 期から G1 期への細胞周期移行、いわゆる分裂期のスキッピングが明確に示された。分裂期をスキッピングした細胞でも老化様増殖停止の誘導が確認されたが、p21 の誘導は G2 期照射後に分裂期をスキッピングした細胞の4割程度であった。そこで、放射線照射5日後までに分裂期へ進行しなかった細胞を対象に p21 の

発現量と G1 期停止時に p21 依存的にリン酸化が抑制されることが知られている Rb タンパク質のセリン 807/811 部位のリン酸化状態の相関関係を蛍光免疫染色によって評価した。p21 が誘導されている細胞で Rb の脱リン酸化が観察された一方で、p21 の発現量が低い細胞においても Rb が脱リン酸化されている場合や、逆に p21 が十分に誘導されている細胞において Rb の高レベルなリン酸化が観察された。p53 が放射線照射後の p21 発現誘導に関与していることから、野生型 p53 をもつ MCF-7 に対して p53 配列特異的な shRNA を導入することによって X 線照射後においても p53 の発現と p21 の誘導が十分に抑制された細胞を用い、放射線照射後の細胞増殖の様子を生細胞イメージングによって解析した。p53 の発現抑制によって G2 期照射後に分裂期の出現頻度が著しく増加したが、細胞周期マーカーを用いた解析により、p53 の発現抑制によって分裂期のスキッピング頻度が減少する一方で、分裂期への進行が促進されたことを示した。すなわち、p53 の抑制による分裂期出現頻度の上昇は増殖停止からの解除に起因していないことを意味する。また、細胞分裂を終了した子孫細胞の 75%程度が G1 期で細胞周期を停止することも同時に示された。そこで、p53 に変異を持つがん細胞を用いて X 線照射後の SA-β-gal 陽性細胞の割合を調べると、その陽性率は野生型 p53 をもつがん細胞と類似していた。以上の結果を総合すると、MCF-7 における老化様増殖停止誘導には古典的に知られている p53-p21 経路依存的な G1 期停止機構に加えて、非依存的な経路も併せて G1 期停止に関わっている可能性が示された。

(4) 本研究の解析結果は、がん細胞に対する高線量照射によって、特に G2 期照射時には分裂期をスキップすることで直接 G1 期へ進行した後に老化様増殖停止が誘導される経路の存在を初めて示した。この結果は分裂期細胞を標的とするタキソールを用いた放射線化学療法に対する感受性が低下する要因として考えられる。一方で、分裂期のスキッピングが p53 存在下において観察され、その発現抑制によって分裂期への進行が促進されることから、高線量放射線照射後のタキソールを用いた化学療法は p53 が機能していないがん細胞に対してより効果的に作用する可能性を示唆している。

(5) 今後の展望として、①分裂期のスキッピングに関与する分子機構、特に p53 がどのように分裂期のスキッピングの誘導に関与しているかを解明することが求められる。この分子機構が解明されることによって②がん細胞でみられる様々な p53 変異のうち、欠失

以外の p53 変異で分裂期のスキッピングを回避して、分裂期への進行を促す変異を調べるとともに、③ *in vivo* 実験による高線量放射線照射後のタキソール処理によって p53 を欠失しているがん細胞や②で特定される p53 変異を持つがん細胞特異的な放射線化学療法に対する感受性の増感を検討することはトランスレーショナルリサーチとして重要な知見を得ることになると考えられる。

#### 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 5 件)

1. Suzuki K, Yamauchi M, Oka Y, Suzuki M, Yamashita S: Creating localized DNA double-strand breaks with microirradiation. *Nat. Protoc.* 6(2): 134-139, 2011. 査読有
2. Suzuki K, Takahashi M, Oka Y, Yamauchi M, Suzuki M, Yamashita S: Requirement of ATM-dependent pathway for the repair of a subset of DNA double strand breaks created by restriction endonucleases. *Genome Integr.* 1(1): 4, 2010. 査読有
3. Suzuki K, Yamauchi M, Oka Y, Suzuki M, Yamashita S: A novel and simple micro-irradiation technique for creating localized DNA double-strand breaks. *Nucl. Acids Res.* 38 (12): e129, 2010. 査読有
4. 鈴木正敏、鈴木啓司、山下俊一: がん細胞における放射線誘発細胞死の系譜、*広島医学*、63(4): 334-336、2010、査読無
5. 鈴木啓司、鈴木正敏: 放射線による細胞致死の分子メカニズムとその生物学的意義、*放射線生物研究*、44: 11-18、2009、査読無

[学会発表] (計 5 件)

1. 鈴木正敏、鈴木啓司、山下俊一: FUCCI システム導入ヒト乳癌細胞を用いた生細胞ライブイメージングによる老化様増殖停止誘導過程における細胞周期解析、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年 10 月 22 日、京都
2. 鈴木正敏、鈴木啓司、山下俊一: Comprehensive pedigree analysis of cell death pathway in mammary carcinoma cell line exposed to ionizing radiation. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 23 日、大阪
3. 尾関あゆみ、鈴木正敏、小澤寛樹、鈴木啓司、山下俊一: 放射線照射による神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導

促進機構、Neuro 2010、兵庫、2010年9月2～4日

4. 鈴木正敏、鈴木啓司、山下俊一：放射線照射がん細胞における老化様増殖停止の誘導と非アポトーシス型細胞死の系譜、日本放射線影響学会第52回大会、2009年11月13日、広島
5. Masatoshi Suzuki, Keiji Suzuki, Shunichi Yamashita: Ionizing Radiation-induced non-apoptotic cell death, Stress-Induced Premature Senescence (SIPS). Asian Congress of Radiation Research, May 2009. Seoul.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 正敏 (SUZUKI MASATOSHI)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・研究員  
研究者番号：60515823

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし