

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592093

研究課題名（和文） 頭頸部放射線治療による口腔粘膜障害低減を目指した内因性酸化ストレス抑制療法の確立

研究課題名（英文） Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Suppression of Apoptosis Induced by X-irradiation

研究代表者

馬嶋 秀行(MAJIMA HIDEYUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60165701

研究成果の概要（和文）：頭頸部放射線治療を行なうにあたり、最大の難関は口腔粘膜障害である。我々は、放射線により活性酸素が産生してアポトーシスになること、および MnSOD がその効果を抑制することを報告した (Motoori et al. Cancer Res. 2001)。本研究では、放射線誘導アポトーシスにおいて、MnSOD がミトコンドリア内に局在しなければその効果がないことを見だし、放射線誘導活性酸素、脂質過酸化およびアポトーシスにミトコンドリアが深く関与することを証明した。

研究成果の概要（英文）：Human cells were transiently transfected with normal human MnSOD and MnSOD without a mitochondrial targeting signal (MTS). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and apoptosis were examined as a function of time following 18.8 Gy X-ray irradiation. The results showed that the level of mitochondrial ROS increased and reached a maximum level 2 h after X-ray irradiation. Authentic MnSOD, but not MnSOD lacking MTS, protected against mitochondrial ROS, lipid peroxidation, and apoptosis. In addition, the levels of mitochondrial ROS were consistently found to always correlate with the levels of authentic MnSOD in mitochondria. These results suggest that only when MnSOD is located in mitochondria is it efficient in protecting against cellular injuries by X-ray irradiation and that mitochondria are the critical sites of X-ray-induced cellular oxidative injuries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：①頭頸部放射線治療 ②口腔粘膜障害 ③アポトーシス ④内因性酸化ストレス抑制療法

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部放射線治療を行なうにあたり、最大の難関は口腔粘膜障害である。放射線の細胞内標的は DNA であり、DNA 2 重鎖切断が増殖死、間期死を引き起こす。その他、1972年に Kerr はアポトーシスおよびネクローシスの概念を打ち出した。我々は放射線照射により

ミトコンドリアから活性酸素が産生され、アポトーシスがおこることを示した (Motoori et al., 2001)。

## 2. 研究の目的

本研究では放射線照射による [アポトーシス] がどのようにおこるかを明らかにし、ま

た、[アポトーシス]を抑制する内因性酸化ストレス抑制療法の確立を行なうことを目的として研究を行なった。

### 3. 研究の方法

すでに、我々は、2001年に MnSOD とランスマクションによるミトコンドリア発生スーパーオキシド抑制によるアポトーシス軽減を見いだしたが、その際、ミトコンドリア発生スーパーオキシドの重要性を確かめることとした。すなわち、MnSOD の放射線防護効果について、ミトコンドリアに局在する場合とそうではない場合を検討した。MnSOD には24個のアミノ酸により構成されるミトコンドリアに移行するシグナル(ミトコンドリアターゲティングシグナル: MTS)が本遺伝子上流に存在する。MTSを持たない MnSOD [MTS(-)]、と通常の MnSOD をトランスフェクトした細胞に X 線を照射し、活性酸素発生量 (HPF)、脂質過酸化量 (HNE) およびアポトーシスについて検討した。

### 4. 研究成果

我々は放射線照射によりミトコンドリアから活性酸素 (ROS) が産生され、アポトーシスがおこることを示した (Motoori et al., 2001)。本研究では [アポトーシス] を抑制する内因性酸化ストレス抑制療法の確立を行なうことを目的として研究を始めた。平成22年度から24年度を通じ、次のことを明らかにした。1) まず、18.8 Gy 1回照射に対する細胞の ROS 発現、脂質過酸化発現 (HNE) を調べた結果いずれも照射後3時間で有意に増加し、またアポトーシスをおこした。2) 照射前および照射後の Vitamin E 投与で、ROS、HNE の現象、およびアポトーシスが抑制された。照射後の Vitamin E 投与で、ROS、HNE、およびアポトーシスが抑制された。3) 細胞に、MnSOD 遺伝子ベクターをトランスフェクトした場合、ROS、HNE、およびアポトーシスが抑制された。4) MNSOD はミトコンドリアに誘導されるミトコンドリア標的シグナル (MTS) を有しミトコンドリア内マトリックスに誘導される。この MTS を除いた MnSOD 遺伝子ベクターをトランスフェクトし、細胞に X 線を照射したところ、3) で確認された ROS、HNE、およびアポトーシスの抑制が認められなかった (図1-3)。5) 細胞に、0.1、0.5、1.0、5 Gy を照射し、ミトコンドリア DNA (mtDNA) のコピー数の変化をしらべたところ、照射後3日時点の mtDNA コピー数の増加が放射線線量依存性に観察された。mtDNA は電子伝達系の13のタンパク質をコードしている。X 線照射により電子伝達系の傷害をきたすことが考えられ、これにより、電子伝達系の電子の漏れを生じこれと酸素から活性酸素が生じ、脂質過酸化を生じアポトーシスに進むことが理解された。照射後のアポトーシスはミトコンドリア発生 ROS を抑制すれば抑制できることが明らかとなった。

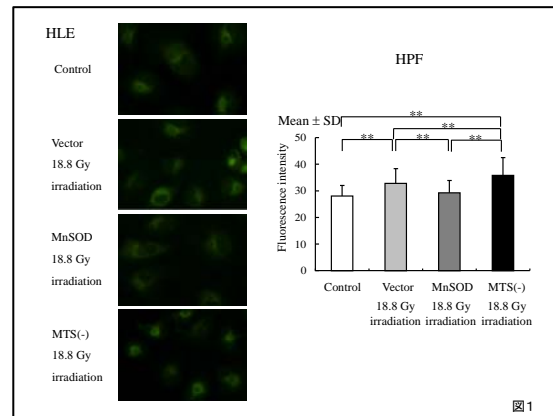


図1 志望照射後の活性酸素 (ROS) 発生測定結果。MnSOD ベクターをトランスフェクションの細胞では、ROS の発生が抑制されているのに対し、ミトコンドリアに局在しない MnSOD [MTS(-)] では、抑制されなかった。

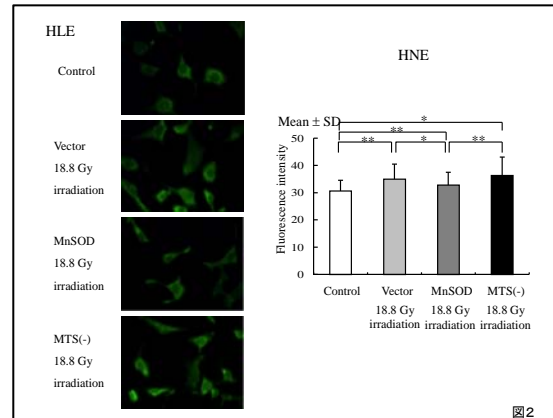


図2 脂質過酸化量 (HNE) 測定結果。MnSOD ベクターをトランスフェクションの細胞では、HNE の発生が抑制されているのに対し、ミトコンドリアに局在しない MnSOD [MTS(-)] では、抑制されなかった。

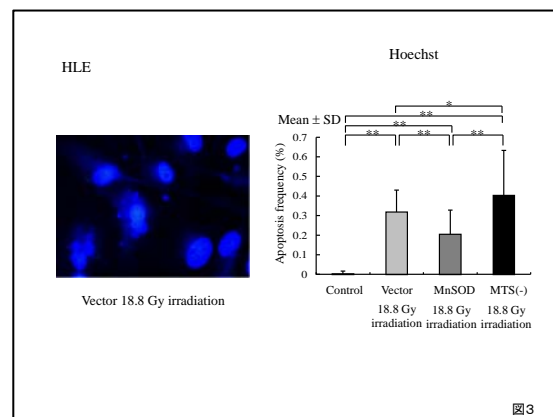


図3 アポトーシス測定結果。MnSOD ベクターをトランスフェクションの細胞では、アポトーシスの検出が抑制されているのに対し、ミトコンドリアに局在しない MnSOD [MTS(-)] では、抑制されなかった。

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 10 件)

1. Indo HP, Nakanishi I, Ohkubo K, Yen H-C, Nyui M, Manda S, Matsumoto K, Fukuhara K, Anzai K, Ikota N, Matsui H, Minamiyama Y, Nakajima A, Ichikawa H, Fukuzumi S, Ozawa T, Mukai C and Majima HJ: Comparison of in vivo and in vitro antioxidative parameters for eleven food factors. *RSC advances*. 3(14): 4535-4538, 2013.

[DOI:10.1039/C3RA22686G](https://doi.org/10.1039/C3RA22686G)

2. Yano S, Masuda D, Kasahara H, Omori K, Higashibata A, Asashima M, Ohnishi T, Yatagai F, Kamisaka S, Furusawa T, Higashitani A, Majima HJ, Nikawa T, Wakabayashi K, Takahashi H, Suzuki H, Shimazu T, Fukui K, Hattori A, Tanigaki F, Shirakawa M, Nakamura T, Yoshimura Y, Suzuki N, Ishioka N: Excellent Thermal Control Ability of Cell Biology Experiment Facility (CBEF) for Ground-Based Experiments and Experiments Onboard the Kibo Japanese Experiment Module of International Space Station. *Biological Sciences in Space*. 26(1): 12-20. August 2012.

<http://dx.doi.org/10.2187/bss.26.12>

3. Indo HP, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, Yen H-C, Kakinuma S, Matsumoto K, Nakanishi I, St Clair W, St Clair DK, Matsui H, Cornette R, Gusev O, Okuda T, Nakagawa Y, Ozawa T & Majima HJ: Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radical Research*, Vol. 46, No. 8: 1029-1043, August 2012.

[DOI: 10.3109/10715762.2012.698012](https://doi.org/10.3109/10715762.2012.698012).

4. Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Hirayama A, Tamura M, Nakamura Y, Kaneko T, Rai K, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I. Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induced lipid peroxidation by the manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression in gastrointestinal epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*. 63(2) 137-142. April 2012. [http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/04\\_12/pdf/137\\_04\\_12\\_article.pdf](http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/04_12/pdf/137_04_12_article.pdf)

5. Matsui H, Nagano Y, Shimokawa O, Kaneko T, Rai K, Udo J, Hirayama A, Nakamura Y, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I: Gastric acid induces mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation in gastric epithelial cells. *J Gastroenterol*. 46(10):1167-1176, 2011. Epub 2011 Jul 26, 2011. Epub ahead of print.

[DOI: 10.1007/s00535-011-0434-6](https://doi.org/10.1007/s00535-011-0434-6).

6. Majima, HJ, Indo, HP, Suenaga, S, Matsui, H, Yen, H-C and Ozawa, T: Mitochondria as Possible

Pharmaceutical Targets for the Effects of Vitamin E and its Homologues in Oxidative Stress-Related Diseases. *Curr Pharm Des* 17(21) 2190-2195, 2011.

[DOI: 10.2174/138161211796957490](https://doi.org/10.2174/138161211796957490)

7. Yen H-C, Li SH, Majima HJ, Huang YH, Chen CP, Liu CC, Tu YC, Chen CW: Upregulation of antioxidant enzymes and coenzyme Q10 in a human oral cancer cell line with acquired bleomycin resistance. *Free Radical Research* Jun;45(6):707-716, 2011. Epub 2011 Apr 12.

[DOI: 10.3109/10715762.2011.572969](https://doi.org/10.3109/10715762.2011.572969).

8. Rai K, Matsui H, Kaneko T, Nagano Y, Shimokawa O, Udo J, Hirayama A, Hyodo I, Indo HP, Majima HJ: Lansoprazole inhibits mitochondrial superoxide production and cellular lipid peroxidation induced by indomethacin in RGM1 cells. *J Clin Biochem Nutr*. Jul;49(1):25-30, 2011. Epub 2011 Jun 17.

[DOI: 10.3164/jcfn.10-133](https://doi.org/10.3164/jcfn.10-133).

9. Majima HJ, Indo HP, Suenaga S, Kaneko T, Matsui H, Yen H-C, Ozawa T: Mitochondria as Source of Free Radicals. Naito Y, Suematsu M, Yoshikawa T (eds): *Free Radical Biology in Digestive Diseases*, Front Gastrointest Res. Basel, Karger, vol 29, pp12-22, 2011.

10. Nagayama K, Suenaga S, Nagata J, Takada H, Majima HJ, Miyawaki S: Clinical significance of magnetization transfer contrast imaging for edematous changes in masticatory muscle. *J Comput Assist Tomogr*, 34(2): 233-241, 2010.

[DOI: 10.1097/RCT.0b013e3181bb2002](https://doi.org/10.1097/RCT.0b013e3181bb2002).

[学会発表] (計 15 件)

1. 馬嶋秀行、犬童寛子、小澤俊彦: ミトコンドリア由来活性酸素が X 線誘導アポトーシスをコントロールする、第7回臨床ストレス応答学会大会、東京、2012年11月24-25日。

2. 馬嶋秀行、犬童寛子: MnSODによるX線由来アポトーシスの抑制はそのミトコンドリア局在を必要とする、第57回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、横浜、2012年10月19-21日

3. 馬嶋秀行: 老化とミトコンドリア機能. 抗加齢医学会研修用講習会、千里ライフサイエンスセンター5F ライフホール、2012年10月14日。【招待講演】

4. 田村磨聖, 松井裕史, 長野由美子, 富田勉, 貞方久人, 馬嶋秀行, 兵頭一之介: がん浸潤に対するミトコンドリア由来活性酸素の関与. 日本癌学会, 札幌, 2012年9月19-21日。

5. 馬嶋秀行: ミトコンドリア由来活性酸素. フリー

ラジカルスクール in 館山2012. 館山,  
2012年8月7-9日.【招待講演】

6. 馬嶋秀行:ミトコンドリアから活性酸素がひきおこすサイトプロテクションと細胞死、新薬理学セミナー2012、徳島、2012年6月30日.【招待講演】
7. 馬嶋秀行, 犬童寛子, 小澤俊彦:ミトコンドリア由来活性酸素とアポトーシス, 第12回日本抗加齢医学会総会シンポジウム 9「身から出た錆」, 横浜, 2012年6月22-24日.【座長・シンポジスト】
8. 田村磨聖, 松井裕史, 長野由美子, 富田勉, 貞方久人, 犬童寛子, 馬嶋秀行, 兵頭一之介:ミトコンドリア由来活性酸素はがん浸潤を促進する, 第65回日本ストレス学会学術集会、徳島、2012年6月7-8日.【座長】.
9. 馬嶋秀行, 犬童寛子, 鈴木ひろみ, 石岡 憲昭, 稲波 修, 幸村 知子, 中川 靖一:X線照射によるアポトーシスはミトコンドリアが主体となりおこる. 日本放射線影響学会第54回大会、神戸、2011年11月17-19日.【座長・シンポジスト】
10. Ikuo Nakanishi, Hiroko P. Indo, Kei Ohkubo, Nobuo Ikota, Minako Nyui, Ken-ichiro Matsumoto, Kiyoshi Fukuhara, Shinichi Fukuzumi, Kazunori Anzai, Toshihiko Ozawa, Hideyuki J. Majima: Evaluation of Antioxidative Properties of Food Factors in Relation to Inhibitory Activity of Radiation-Induced Apoptosis. The joint conference of 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), 8th Conference for Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and the 11th Conference of the Society of Mitochondrial Research and Medicine in Japan (J-mit), Kagoshima, Japan, August31-September4, 2011.【学会主催会長】
11. Ken-ichiro B Matsumoto, Ikuo C Nakanishi, Hiroko P Indo, Hideyuki J. Majima: Increasing Melanin Radicals in Mouse Skin by Low-dose X-ray irradiation. The joint conference of 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), 8th Conference for Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and the 11th Conference of the Society of Mitochondrial Research and Medicine in Japan (J-mit), Kagoshima, Japan, August31-September4, 2011.【学会主催会長】
12. 馬嶋秀行:ミトコンドリア発生活性酸素が Nrf2-Keap1 を調節する. 第64回日本酸化

ストレス学会学術集会、ルスツ、2011年7月2-3日.(座長)

13. 馬嶋秀行, 竹内 亨, 嶽崎 俊郎, 秋葉澄伯, 犬童寛子, 富田和男, 岩下洋一朗, 市川寛, 南山幸子, 内藤 裕二, 吉川敏一, 小澤俊彦, 吉田浩己:長寿圏奄美におけるミトコンドリアDNA(mtDNA)コピー数、mtDNA突然変異率の解析. 第11回日本抗加齢医学会総会、京都、2011年5月27-29日.
14. Hideyuki J Majima, Hiroko P Indo, Mercy Davidson, Hsiu-Chuan Yen, and Toshihiko Ozawa : Mitochondrial DNA Damaged Cells Generate ROS from Mitochondria and Induce Apoptosis. International Symposium on Mitochondrial Biology and Medicine & the Chinese-Mit' 2011, Xi'an, China, April 7-10, 2011. (招待講演)
15. 馬嶋秀行:ヒト肝細胞癌細胞株 HLE におけるX線照射によるアポトーシスに対する MnSOD の役割. 第63回日本酸化ストレス学会学術集会、横浜、2010年6月24-25日(シンポジウム、座長)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬嶋秀行 (MAJIMA HIDEYUKI)  
鹿児島大学・歯学総合研究科・教授  
研究者番号：60165701

### (2) 研究分担者

犬童寛子 (INDO HIROKO)  
鹿児島大学・歯学総合研究科・助教  
研究者番号：00301391

富田和男 (TOMITA KAZUO)  
鹿児島大学・歯学総合研究科・助教  
研究者番号：60347094

岩下洋一朗 (IWASHITA YOUTIROU)  
鹿児島大学・歯学総合研究科・助教  
研究者番号：70168566

### (3) 連携研究者

末永重明 (SUENAGA SHIGEAKI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：00136889