

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710066

研究課題名（和文）

放射線耐性細胞ではなぜオートファジーが誘導されにくいのか？

研究課題名（英文）

X-ray induced autophagy in radioresistant cells

研究代表者

桑原 義和 (KUWAHARA YOSHIKAZU)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00392225

研究成果の概要（和文）：標準的放射線療法である 2Gy/日の X 線を照射し続けても増殖する臨床的放射線耐性(CRR)細胞を樹立した。CRR 細胞では、X 線照射で autophagy 細胞死が誘導されにくいことを明らかにした。X 線照射後、CRR 細胞の細胞質では活性酸素種(ROS)の上昇が見られなかった。CRR 細胞において、X 線照射で autophagy 細胞死が誘導されにくいのは、細胞質に生じた ROS の排除機構が備わっているためだと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Efficient removal of reactive oxygen species from cytoplasm of clinically relevant radioresistant cells leads to low incidence of autophagic cell death of those cells after X-ray exposure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境解析学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線耐性・活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

放射線療法は手術療法や化学療法と並ぶがんの三大治療法の一つである。しかし、放射線耐性細胞の出現や存在といった解決すべき課題が残っている。より有効な放射線療法を開発するため、また、細胞が放射線に耐性を示すメカニズムを明らかにするために、標準的な放射線療法である 2Gy/日の X 線を 30 日以上照射し続けても増殖する臨床的放射線耐性(clinically relevant radioresistant cell; CRR)細胞の樹立を試み、HepG2、HeLa をはじめとする複数のヒトがん細胞細胞株

からその樹立に成功した。

CRR 細胞は、2Gy/日の X 線分割照射に耐性を示すばかりではなく、高線量の X 線単回照射にもその親株と比べて耐性を示すことが分かった。

X 線照射によって apoptosis をはじめとする様々な細胞死が誘発される。また、X 線照射で新しい細胞死の形態である autophagic cell death が誘発されることも知られてきた。X 線照射後の細胞死を解析すると、親株である HepG2 細胞では apoptosis 及び autophagy 細胞死が誘発されるものの、CRR

細胞である HepG2-8960-R 細胞では、その誘発が抑えられていることを明らかにした。この傾向は、他の全ての CRR 細胞株でも同様であった。CRR 細胞に mTOR の阻害剤である rapamycin を処理すると、X 線感受性はその親株と同程度になり、X 線照射で autophagy の誘発頻度が上昇することを明らかにした。また、autophagy 誘導の阻害剤である、3-methyladenine 処理すると親株は放射線に耐性になることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、親株に比べてなぜ CRR 細胞では X 線照射で autophagy が誘導されにくいのかを明らかにしようとした。X 線照射後、細胞内には活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が生じることが知られており、この ROS が放射線による二本鎖切断などの DNA 損傷に関与していることが知られている。本研究では、X 線照射後に生じる ROS が autophagy の誘導にも関与しているのではないかと考え、解析を進めた。

## 3. 研究の方法

WST (Water soluble Tetrazolium salts) assay 及び High density survival assay で、細胞の過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) への感受性を解析した。X 線照射後に生じる細胞内の ROS は蛍光色素を用いて解析した。遺伝子発現は、RT-PCR で解析した。また、siRNA を用いることで、catalase の発現を抑制した。 $H_2O_2$  耐性細胞の樹立は、培地中の  $H_2O_2$  濃度を徐々に増加しながら細胞を順応させることで樹立した。

## 4. 研究成果

細胞内の ROS を蛍光色素で検出すると、非照射の親株では ROS は検出されないのに対し

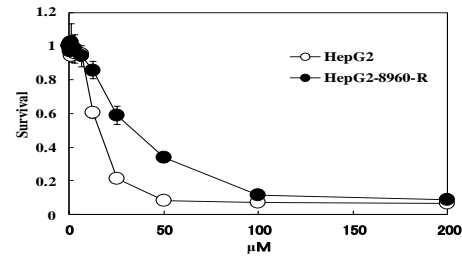


図 1 WST assay による  $H_2O_2$  感受性の解析。

て、CRR 細胞では検出された。CRR 細胞はその形質の維持のために 2Gy/日の X 線を照射しているためだと考えられる。10Gy の X 線照射後、継続的に細胞内の ROS を蛍光色素で検出すると、親株では照射 4 時間後から ROS の発生が認められたのに対して、CRR 細胞では基底値以上の発生は見られなかった。さらに、ミトコンドリア由来の ROS を特異的に検出することのできる蛍光色素を用いて解析すると、X 線照射後に親株では ROS の発生が見られたが、CRR 細胞では見られなかった。以上から、X 線照射後に生じる ROS はミトコンドリア由来であることを明らかにした。CRR 細胞には X 線照射後に ROS の発生が見られないことから、CRR 細胞にはなんらかの ROS の排除機構が存在しているのか、ミトコンドリアの機能が親株とは異なっているのではないかと示唆された。

CRR 細胞にはなんらかの ROS の排除機構が存在しているのかを明らかにするために、CRR 細胞は ROS に耐性であるのかを解析した。本研究では、ROS の代表的な一つである  $H_2O_2$  に CRR 細胞は耐性を示すのかを解析した。WST assay で、 $H_2O_2$  への感受性を解析すると、全ての CRR 細胞は  $100 \mu M$  以下の濃度で、その親株に比べて明らかに  $H_2O_2$  に耐性を示した (図 1)。

そこで、CRR 細胞では、X 線照射で生じた

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が速やかに除去されるのではないかと考えた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の代謝に関与していることが知られているカタラーゼ (catalase) の発現を RT-PCR で解析すると、全ての CRR 細胞はその親株に比べて mRNA の発現量が高いことが分かった。

そこで、siRNA でカタラーゼの発現を抑制して、CRR 細胞の放射線感受性に変化がみられるのかを解析した。その結果、カタラーゼの発現を抑制しても、CRR 細胞の X 線感受性に変化は見られなかった。また、親株に関しても放射線感受性に変化は見られなかった。

次に、低濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有培地で細胞を培養して、徐々に培地中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を上げていくことで、複数の細胞株から H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性細胞の樹立を試みた。樹立した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性細胞の X 線感受性を解析すると、全ての H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性細胞はその親株に比べて X 線に耐性を示すことはなかった。以上から、CRR 細胞が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に耐性を示すのは、CRR 形質の一つであり、放射線耐性との関連は否定された。また、CRR 細胞の X 線耐性にはカタラーゼは関与していないことが示唆された。

オートファジーは、細胞内の ROS の上昇によって誘導されることが知られている。CRR 細胞では、X 線照射後に ROS の上昇が見られないためオートファジーが誘導されないのではないかと考えられる。

## 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 4 件)

(1) Fukuda T, Kino Y, Abe Y, Yamashiro H, Kuwahara Y, Nihei H, Sano Y, Irisawa A, Shimura T, Fukumoto M, Shinoda H, Obata Y, Saigusa S, Sekine T, Isogai E, Fukumoto M.

Distribution of artificial radionuclides in abandoned cattle in the evacuation zone of the Fukushima Daiichi nuclear power plant. PLoS One. 2013;8(1):e54312. doi: 10.1371/journal.pone.0054312. (査読有)

(2) Kobayashi T, Saito Y, Ohtake Y, Maruko A, Yamamoto Y, Yamamoto F, Kuwahara Y, Fukumoto M, Fukumoto M, Ohkubo Y. Effect of aging on norepinephrine-related proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012 Oct;303(7):G861-9. doi: 10.1152/ajpgi.00081.2012. (査読有)

(3) Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Takahashi A, Fukumoto M. Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. Oncogenesis. 2012 Jun 4;1:e12. doi: 10.1038/oncsis.2012.12. (査読有)

(4) Kuwahara Y, Oikawa T, Ochiai Y, Roudkenar MH, Fukumoto M, Shimura T, Ohtake Y, Ohkubo Y, Mori S, Uchiyama Y, Fukumoto M. Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. Cell Death Dis. 2011 Jun 30;2:e177. doi: 10.1038/cddis.2011.56. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ①被災家畜における放射性物質の動態及びと畜前推定技術の検証 山城秀昭、阿部靖之、福田智一、木野康志、桑原義和、福本基、小林仁、篠田壽、関根勉、磯貝恵美子、福本学 放射性物質汚染と食の安全—被災地の畜産業復興を願って— 2013年3月16日 東京
- ②臨床的放射線耐性細胞はなぜドセタキセ

ルに耐性を示すのか？桑原義和、福本基、福本学 第101回日本病理学会総会 2012年4月26日～28日 東京

③臨床的放射線耐性細胞がなぜドセタキセルに耐性を示すのか？ 桑原義和、福本基、福本学 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日～21日 札幌

④臨床的放射線耐性細胞がなぜドセタキセルに耐性を示すのか？ 桑原義和、福本基、福本学 日本放射線影響学会第55回大会 2012年9月6日～8日 仙台

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 義和 (KUWAHARA YOSHIKAZU)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00392225

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者