

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710062

研究課題名(和文) 未熟及び成熟甲状腺濾胞上皮の放射線感受性とオートファジーの関与

研究課題名(英文) Radiosensitivity and Radiation-Induced Autophagy in Thyroid Follicular Epithelial Cells of Immature and Adult Rats

研究代表者

松山 睦美(松鷲睦美)(Matsuyama, Mutsumi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：00274639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：小児期の放射線被ばくは甲状腺発がんの危険因子である。甲状腺濾胞上皮の放射線感受性の年齢影響を調べるため、X線8 Gy全身照射後72時間までの未熟(4週齢)及び成熟(8ヶ月齢)ラットの甲状腺濾胞上皮の組織変化、細胞死、増殖細胞、DNA損傷応答分子、オートファジーの誘導を比較した。両群共アポトーシスは誘導されず、Ser15リン酸化p53発現と53BP1核内フォーカス数は増加した。未熟ラットでは空胞化細胞の増加、増殖細胞数の低下、オートファジー像及びLC3-IIとp62の発現増加、オートファジー関連遺伝子の発現増加が認められたが、成熟ラットでは誘導されなかった。

研究成果の概要(英文)：Exposure to ionizing radiation (IR), especially during childhood, is a well-known risk factor for thyroid cancers. To evaluate the radiosensitivity of different age rat thyroid follicular epithelial cells, we analyzed the histological alterations, induction of apoptosis, cell proliferation, expression of DNA damage response molecules, and induction of autophagy in immature (4 W) and adult (8 M) rat thyroid glands up to 72 h after 8Gy X-ray irradiation.

IR-induced apoptosis was not detected, and phosphorylated p53 at Ser15 expression and 53BP1 nuclear foci were increased irrespective of age. The vacuolated alteration of the cytoplasm in thyroid follicular cells was observed in 4W. The Ki67-positive cells in 4W were significantly decreased after irradiation. The autophagosomes were observed in 4W cells but not 8M. The expression of LC3-II and p62, and the genes regulate d autophagy was increased in 4W but not 8M. IR induced autophagy in immature but not in adult rat thyroid.

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 ラット 甲状腺濾胞上皮 細胞死 オートファジー 年齢依存性

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌は放射線との因果関係の知られる代表的固形がんである。チェルノブイリ原発事故や原爆被爆者での疫学研究から、小児期の甲状腺濾胞上皮は放射線に高感受性で、放射線被曝は小児甲状腺癌の危険因子であることが知られている。一方、被爆者の大部分を占める成人被曝での放射線外照射に対する感受性は未だ明確には証明されていない。

私たちは放射線を照射したラット成熟甲状腺の組織解析で、濾胞上皮細胞に細胞死は誘導されないこと、照射後 DNA 損傷応答マーカーである 53BP1 の核内フォーカス形成と FISH 法による転座型遺伝子異常が照射後 2 時間より観察され、7 日までに減少するが照射後 6 カ月より増加傾向を示すことを報告した (蔵重智美ら、日本病理学会会誌 2010, 99:329)。この結果は、放射線被曝により、成熟甲状腺濾胞上皮に晩発性 DNA 損傷応答の亢進、すなわちゲノム不安定性が惹起されることを示唆する。

放射線照射に対する甲状腺濾胞上皮の細胞障害の種類や細胞応答の詳細は明らかにされていない。私たちは Western blot 法で放射線照射後甲状腺濾胞上皮において、成熟・未熟共にリン酸化 p53 の発現増加を認めたが、p21, cleaved caspase3 の発現に変化は見られなかったこと、細胞質の膨化空胞化変性を認め、未熟群に顕著であったことを報告した。また、電子顕微鏡による解析で細胞質にオートファジーが誘導されることを見出した (松山睦美ら、日本病理学会会誌 2011, 100: 423)。オートファジーは細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを非選択的に分解する経路である。近年オートファジーは発がんにも関与しており、オートファジーの不全は腫瘍増殖に促進的に働くと考えられている。照射後誘導される甲状腺濾胞上皮細胞のオートファジーについて、発癌の感受性が異なる未

熟及び成熟ラットで詳細に検討することで、放射線誘発甲状腺発癌機構の解明につながることを期待される。

2. 研究の目的

小児期の放射線被曝は甲状腺癌の危険因子であることが知られている一方、成人期の放射線外照射の発癌への影響は不明である。これまでに放射線照射後未熟及び成熟ラット甲状腺濾胞上皮にアポトーシスは誘導されないが DNA 損傷応答が起きていること、オートファゴソームが誘導されることを見出した。本研究では甲状腺濾胞上皮の放射線感受性に対する年齢の影響を評価するために、放射線外照射後の未熟及び成熟ラットの甲状腺の分子病理解析をオートファジーの関与を中心に行う。具体的に未熟・成熟ラットの甲状腺組織を用い以下の点について解析する。(1) 放射線照射後甲状腺濾胞上皮細胞の組織変化と電子顕微鏡によるオートファゴソーム/オートリソソームの形態変化、(2) 放射線細胞応答としての増殖停止や細胞死の関与、(3) 照射後オートファジー関連蛋白の発現解析、(4) 照射後オートファジー関連遺伝子発現解析。

3. 研究の方法

甲状腺濾胞上皮細胞の放射線感受性の年齢の影響について調べるため、4 週齢(4W)、7 週齢(7W)、及 8 ヶ月齢(8M)雄性ウイスターラットに 8 Gy X 線全身照射後、0,3,6,24,48,72 時間後の甲状腺組織を採取し、片葉をホルマリン固定後パラフィン包埋し、組織切片を作成した。一部電子顕微鏡観察のため、グルタールアルデヒド固定後超薄切片を作成した。片葉はウェスタンブロットと RNA 抽出のため、-80 に保存して以下の解析を行った。

1. 放射線照射後甲状腺濾胞上皮細胞の組織変化と電子顕微鏡によるオートファゴソーム/オートリソソームの形態変化の観察

2. 放射線細胞応答としての増殖停止、細胞死、DNA 損傷応答分子の関与 (Ki67 免疫染色、TUNEL 染色、53BP1 免疫染色)
3. オートファジー関連蛋白の発現解析 (LC3-II, p62 のウェスタンブロットによる発現)
4. オートファジー関連遺伝子の発現解析 (Autophagy PCR array による解析)

4. 研究成果

(1) 放射線照射後の甲状腺濾胞上皮細胞の組織変化を調べたところ、4 週齢では細胞質が膨化した空胞化変性が 24 時間で有意に増加していた。一方 7 週齢、8 ヶ月齢では照射後の変化は見られなかった (図 1)。

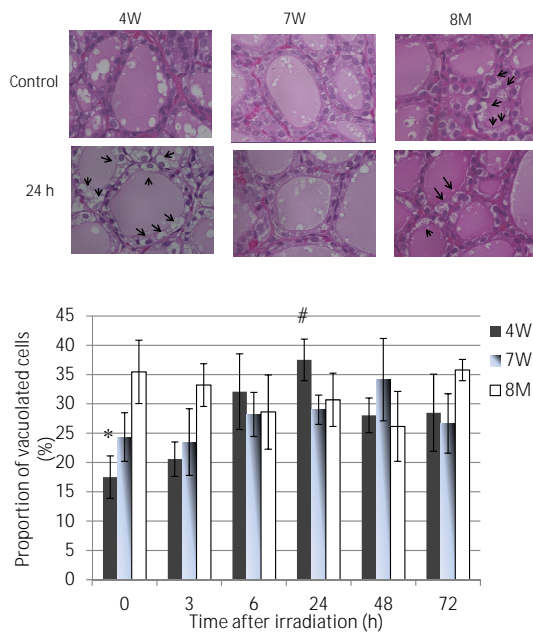


図 1 . 照射後 24 時間後の甲状腺濾胞上皮の HE 像と空胞化細胞の割合 (平均値 ± 標準誤差, n=3-7) # p<0.05 vs 0 h, * p<0.05 vs 8M rats.

(2) 照射後の電子顕微鏡像では、図 2 の黒四角で囲んだオートファジー像が 4 週齢では 6 時間から 72 時間まで見られたが、8 ヶ月齢ではほとんど見られなかった。また、4 週齢、7 週齢ラットの甲状腺濾胞上皮細胞で小胞体の拡張、ミトコンドリアの膨化、分泌物の貯留が観察された。

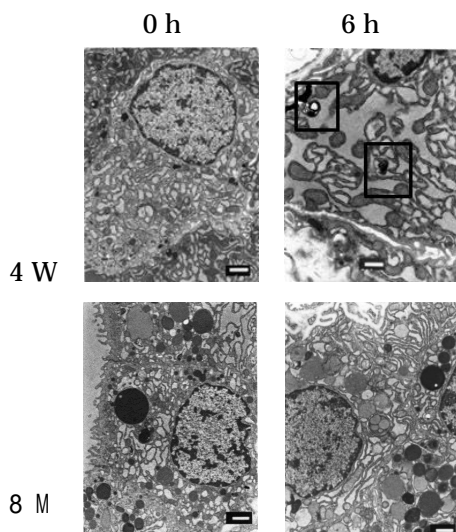


図 2 . 8 Gy 全身照射後ラット甲状腺濾胞上皮細胞の電子顕微鏡像 (バーの長さ 左上 1 μm, 右上 500nm, 左下 1 μm, 右下 1 μm)

(3) 増殖マーカーである Ki-67 陽性細胞は、非照射の甲状腺濾胞上皮では 4 週齢で約 11%, 7 週齢で 4%, 8 ヶ月齢では 0.2% 発現しており、照射後 72 時間で 4 週齢は 1%, 7 週齢は 0.3% と有意に減少したのに対し、8 ヶ月齢では 0.5% で不変であった (図 3)。

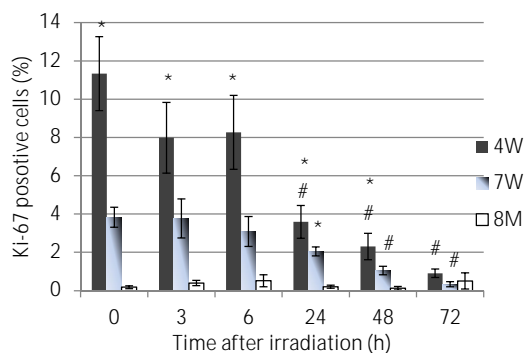


図 3 . 甲状腺濾胞上皮の Ki-67 陽性細胞の割合 (平均値 ± 標準誤差, n=3-8) # p<0.05 vs 0 h, * p<0.05 vs 8M rats.

(4) アポトーシスによる細胞死は、TUNEL 染色を行い 400 倍で 5 視野から濾胞上皮細胞あたりの陽性細胞数をカウントすることで評価した。図 4 に示すように、TUNEL 陽性細胞は照射後各週齢でほとんど増加が見られなかった。

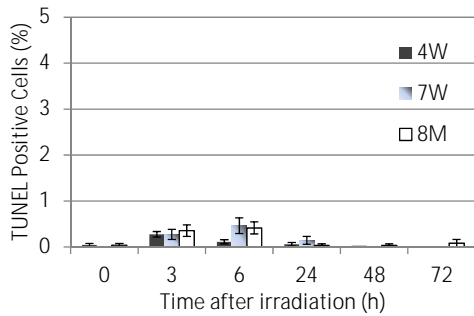


図4 . 甲状腺濾胞上皮の TUNEL 陽性細胞数の割合 (平均値 ± 標準誤差, n=3-7)

(5) DNA 二重鎖切断の指標である 53BP1 核内フォーカス数は、いずれの週齢においても 3 時間、6 時間で増加が見られ、72 時間まで減少し、週齢による差異は見られなかった(図 5)。

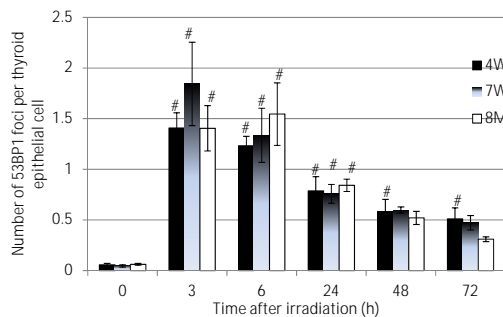


図5 . 甲状腺濾胞上皮細胞あたりの 53BP1 核内フォーカス数 (平均値 ± 標準誤差, n=3-7) # p<0.05 vs 0 h

(6)オートファジー関連蛋白である LC3-II と p62 の発現をウェスタンブロットにて調べ、非照射に対する発現量の変化を図 6 にグラフ化した。照射後の LC3-II/LC3-I 比は、4 週齢で 3 時間と 24 時間後に有意に増加したが、8 ヶ月齢では変化が見られなかった。また、p62 の発現量も 4 週齢では 24 時間、48 時間後に有意に増加したが、8 ヶ月齢では増加が見られなかった。

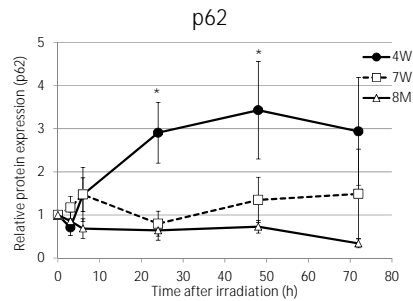
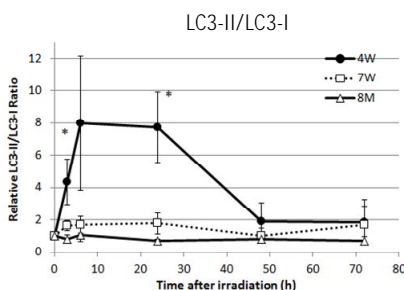


図6 . 放射線照射後甲状腺の LC3-II と p62 の発現(平均値 ± 標準誤差, n=3-7) *p<0.05 vs 8M

(7) キアゲンのオートファジーPCR Array により、4 週齢と 8 ヶ月齢の照射後 24 時間の甲状腺におけるオートファジー関連遺伝子の発現を調べた。非照射に対する照射後のオートファジー関連及びアポトーシス関連遺伝子の発現変化を図 7 に示している。4 週齢では、オートファジー関連遺伝子である Atg16l2, Atg9a, Irgm, Maplc3a の発現増加が見られたが、8 ヶ月齢では見られなかった。Ctss と Wipi1 は両週齢で有意に増加しているが、4 週齢の方が高い発現を示した。アポトーシスに関連する遺伝子である Fas,Dapk1,Casp3 の発現とミトコンドリアの機能に關与する Pink1 の発現増加が両週齢で見られた。

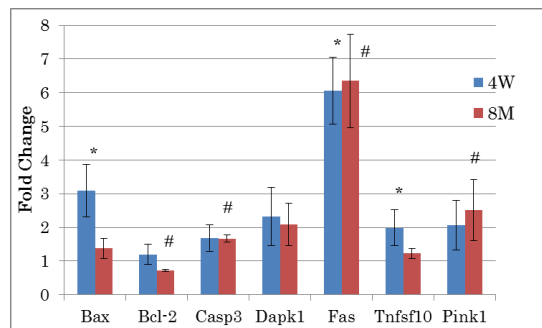
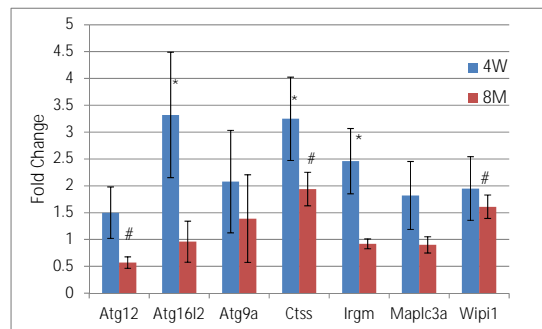


図7 . PCR array におけるオートファジー関連遺伝子の発現 (上 : オートファジー関連遺

伝子、下：アポトーシス関連遺伝子)

平均値 ± 標準誤差(n=3)*p<0.05 vs 4W 0Gy,
#p<0.05 vs 8M 0Gy

放射線照射後 4 週齢の甲状腺では、オートファジー関連遺伝子の発現、オートファジー関連蛋白の発現が 8 ヶ月齢の甲状腺よりも高く、放射線によりオートファジーが誘導されることが示唆された。一方両週齢共アポトーシス関連遺伝子の発現は増加しており、DNA 損傷応答分子の増加は起きるもののアポトーシスの誘導は見られないことから、甲状腺濾胞上皮ではいずれかの経路がブロックされ、放射線誘発アポトーシスが誘導されない可能性が示唆された。

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 5 件)

松山睦美、徳永瑛子、蔵重智美、七條和子、松田勝也、三浦史郎、関根一郎、中島正洋、ラット甲状腺濾胞上皮の放射線誘発腫瘍に対する年齢影響とオートファジーの関与、広島医学、査読無、67巻、2014、347-351

松山睦美、七條和子、蔵重智美、三浦史郎、ムサジャノワ ジャンナ、中島正洋、ラット甲状腺濾胞上皮のDNA損傷応答と放射線誘導オートファジーに対する年齢の影響、長崎医学会雑誌 原爆特集号、査読無、87巻、2012、269-272

松山睦美、七條和子、蔵重智美、岡市協生、三浦史郎、中島正洋、未熟および成熟ラット甲状腺濾胞上皮の放射線感受性とDNA損傷応答分子の解析、広島医学、査読無、65巻、2012、305-307

七條和子、高辻俊宏、福本 学、松山睦美、Mussazhanova Zhanna、三浦史郎、蔵重智美、関根一郎、中島正洋、長崎

原爆被爆者の剖検・パラフィン標本を用いた被曝と遺伝子損傷について、広島医学、査読無、65巻、2012、283-284

ムサジャノワ ジャンナ、三浦史郎、蔵重智美、松山睦美、七條和子、中島正洋、甲状腺にみられた放射線治療関連 Calcitonin陰性神経内分泌癌、広島医学、査読無、65巻、2012、311-312

〔学会発表〕(計 5 件)

松山睦美、徳永瑛子、蔵重智美、七條和子、松田勝也、三浦史郎、関根一郎、中島正洋：ラット甲状腺濾胞上皮の放射線誘発腫瘍に対する年齢影響とオートファジーの関与 第 54 回原子爆弾後障害研究会 2013 年 6 月 1 日広島国際会議場

松山睦美、七條和子、松田勝也、三浦史郎、関根一郎、中島正洋：ラット甲状腺濾胞上皮の放射線応答に対する年齢影響 第 56 回日本放射線影響学会 2012 年 10 月 18 日 ホテルクラウンパレス青森

松山睦美、七條和子、蔵重智美、三浦史郎、ムサジャノワ ジャンナ、中島正洋：ラット甲状腺濾胞上皮の放射線誘導オートファジーと年齢依存性解析 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 28 日東京京王プラザホテル

松山睦美、七條和子、蔵重智美、三浦史郎、ムサジャノワ ジャンナ、中島正洋：ラット甲状腺濾胞上皮の DNA 損傷応答と放射線誘導オートファジーに対する年齢の影響 第 53 回原子爆弾後障害研究会 2012 年 6 月 3 日長崎原爆資料館

松山睦美、七條和子、蔵重智美、岡市協生、三浦史郎、ムサジャノワ ジャンナ、中島正洋：ラット甲状腺濾胞上皮の放射線応答に対する年齢影響の分子病理学的解析 第 16 回日本内分泌病理学会学術総会 2012 年 10 月 12 日

仙台 民陵会館

〔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

[http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/pat
hology/index.html](http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/pat
hology/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山睦美 (MATSUYAMA Mutsumi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：00274639

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：