

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861113

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能不全は放射線誘発遅延性神経細胞死に関与するか？

研究課題名(英文) Is mitochondrial dysfunction related to delayed neuronal cell death after radiation exposure?

研究代表者

小橋川 新子(菓子野新子)(KOBASHIGAWA, Shinko)

大分大学・医学部・研究支援者

研究者番号：70637628

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)：増殖期にない神経細胞の影響を調べるために、初代ラット大脳皮質由来神経細胞を用いてガンマ線照射後の軸索の長さを調べた。その結果、放射線照射により神経細胞の軸索の長さが長くなることがわかった。また、照射後のミトコンドリア形態変化を誘導するDrp1タンパク質の発現抑制を行った神経細胞においては照射後の軸索の変化が抑制されることもわかった。

以上のことから放射線照射後、ミトコンドリア形態変化により神経細胞の軸索の長さが伸びる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently it is reported that mitochondrial dynamics may contribute to function of the neuron. However, little is known about the radiation-induced mitochondrial fragmentation in these neurons, especially in axons. We examined the effects of radiation exposure on rat primary neuron. We found radiation exposure induced elongation of the axon. To study the effect of mitochondrial fission on shape of neuron after irradiation, we knock down central mitochondrial fission protein, Drp1 protein expression. The neuron knock down Drp1 expression did not elongate axon after gamma-irradiation.

As a result, promotion of mitochondrial fission after irradiation may effect on axon elongation after exposure.

研究分野：放射線生物学

キーワード：電離放射線 ミトコンドリア形態 神経変性 遅発性活性酸素種 Drp1タンパク質 神経軸索

1. 研究開始当初の背景

電離放射線の影響は、分裂が活発な細胞において感度よく現れ、細胞周期停止期における細胞は放射線に対して耐性であるということがよく知られている。これは組織の放射線感受性の度合いにも当てはまり、細胞分裂が活発である造血組織、腸上皮、皮膚などの組織は放射線に高感受性であり、細胞分裂があまり行われていないとされる神経組織は放射線耐性であるとされている。しかしながら、癌への放射線療法により脳が放射線照射を受けると、急性脳症、あるいは照射後数か月から数年後に現れる遅発性放射線障害といった神経系への障害が生じることがある。この神経系への障害が生じる過程については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

申請者は放射線照射細胞においてミトコンドリア形態変化に伴うミトコンドリア機能不全が生じることを発見した経験を基に、「神経細胞においても放射線照射により遅延的にミトコンドリア機能不全が誘導されるのではないかと仮説をたてた。本申請にて提案した研究は、放射線照射による遅延的ミトコンドリア機能不全が神経細胞死や神経変性を誘導する機構を解明することを主な目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず正常ラット神経アストロサイト (RNB) 細胞において放射線誘発遅延的活性酸素種の増加が生じるか検討した。続いて抗酸化剤である L-アスコルビン酸 2-グルコシド (AA-2G) により遅発性活性酸素種を抑制し、放射線照射による細胞死を抑制し得るか否かを検討した。さらに、このミトコンドリア由来活性酸素種増加のメカニズムに迫った。放射線照射細胞におけるミトコンドリア形態変化の誘導機構におけるカルシウムシグナル機構について検討した。

4. 研究成果

RNB 細胞にガンマ線を照射し、細胞内活性酸素種のレベルを調べた結果、照射 3 日後にかけて遅延的に活性酸素種が増加することがわかった (図 1)。ヒト線維芽細胞においてはこの遅発性活性酸素種を抗酸化剤である AA-2G 処理により抑制すると、放射線による細胞死の割合が減少することを確認した。そこで、次に RNB 細胞においても遅発性活性酸素種が放射線による細胞死に関与するか否かをコロニー形成法により調べた。遅発性活性酸素種のみを抑制するために、放射線照射 1 時間後からコロニー形成時の間 AA-2G を処理した。その結果、AA-2G を処理していない細胞においては 6 Gy のガンマ線照射により約 10% の生存率なのに対して、AA-2G を照射後に処理した場合約 11.4% に改善することが

わかった (図 2)。これは線維芽細胞に比べて効果が小さい。これらのことから、増殖期の神経アストロサイト細胞においては線維芽細胞の方よりも遅発性活性酸素種の影響を受けないということがわかった。

次に増殖期にない神経細胞における放射線の影響を検討した。ミトコンドリア形態変化に伴うミトコンドリア機能不全が神経細胞の形態に影響を及ぼすのか調べるために、照射後にミトコンドリア形態変化を誘導する Drp1 タンパク質を発現抑制した大脳皮質由来神経細胞 (sh-Drp1) を作製し、発現抑制していない神経細胞 (sh-EGFP) とで軸索の長さを比較した。結果、放射線照射により神経細胞の軸索の長さが長くなることがわかった (図 3)。Sh-Drp1 細胞においては照射による軸索の変化が抑制されることもわかった。

以上の結果より、正常ラット神経アストロサイト (RNB) 細胞においても照射により遅発性活性酸素種の増加が生じるが、これは細胞死にあまり関与していないことが明らかとなった。また、照射により神経細胞の軸索が長くなるが、これには照射に伴うミトコンドリア形態変化が関与していることが示唆された。

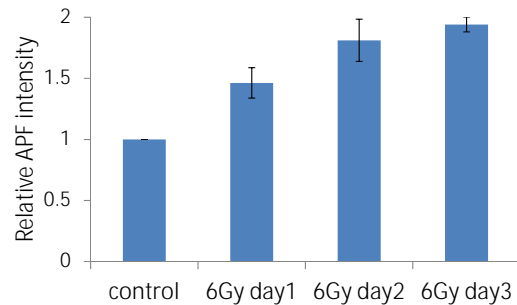


図1. ガンマ線照射によりRNB細胞で遅発性活性酸素種が増加した。

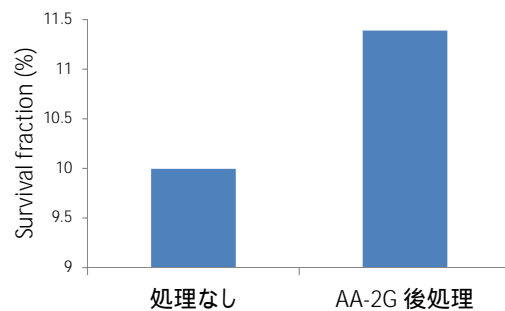


図2. ガンマ線6 Gy照射後のRNB細胞の生存率

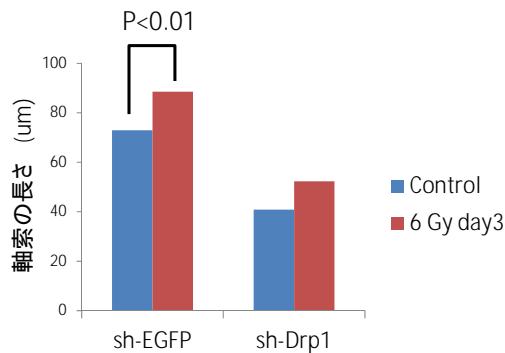


図3. ガンマ線6 Gy照射3日後の神経細胞における軸索の長さ

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)

Kashino G, Hayashi K, Douhara K, **Kobashigawa S**, Mori H., Comparison of the biological effects of (18)F at different intracellular levels. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有、2014 414(4), 795-800, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.136. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14017793>

Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, Mori H., Ionizing Radiation-induced Cell Death Is Partly Caused by Increase of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Normal Human Fibroblast Cells. *Radiat. Res.*, 査読有、2015, 183(4), 455-464, doi: 10.1667/RR13772.1. http://www.bioone.org/doi/10.1667/RR13772.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&

Kobashigawa S, Morikawa K, Kashino G, Mori H., Gemcitabine induces radiosensitization through inhibition of Rad51-dependent repair for DNA double-strand breaks. *Anticancer Res.*, 2015, 査読有、35(5):2731-7. <http://ar.iijournals.org/content/35/5/>

2731.long

Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, Mori H, Watanabe M., Relief of delayed oxidative stress by ascorbic acid can suppress radiation-induced cellular senescence in mammalian fibroblast cells. *Mech Ageing Dev.*, 査読有、2015 146-148, 65-71. doi: 10.1016 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637415000421>

〔学会発表〕(計 7 件)

小橋川新子, 菓子野元郎、森宣、アスコルビン酸誘導体による放射線防護効果、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日 ホテルクラウンパレス青森(青森県、青森市)

菓子野元郎、林和孝、堂原一将、**小橋川新子**、森宣、PET 薬剤による被ばくの影響、第 51 回放射線影響懇話会、2014 年 6 月 14 日、長崎大学(長崎県、長崎市)

菓子野元郎、**小橋川新子**、森宣、遅発性活性酸素種は放射線感受性に影響する、日本放射線腫瘍学会 第 52 回生物部会学術大会、2014 年 7 月 12 日、メルパルク京都(京都府、京都市)

小橋川新子、菓子野元郎、森宣、放射線誘発遅発性活性酸素種は細胞死を引き起こすか?、日本放射線影響学会 第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日~10 月 3 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県、鹿児島市)

菓子野元郎、**小橋川新子**、森宣、癌細胞のバイスタンダー効果を介した放射線抵抗性獲得機構、日本放射線影響学会 第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日~10 月 3 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県、鹿児島市)

Kashino G, Hayashi K, Douhara K, **Kobashigawa S**, Mori H., Analysis of the biological effects of 18F at different intracellular levels., 15th International Congress of Radiation Research., 2015 年 5 月 25 日~5 月 29 日、京都国際会議場(京都府、京都市)

Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, Mori H, Watanabe M., Radiation induced delayed oxidative stress is related to p53 dependent

senescence-like-growth arrest., 15th
International Congress of Radiation
Research., 2015年5月25日~5月29
日、京都国際会議場（京都府、京都市）

〔図書〕（計 0件）

なし

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/imaging/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小橋川 新子（KOBASHIGAWA, Shinko）

大分大学・医学部・研究支援者

研究者番号：70637628

(2) 研究分担者

なし（ 0）

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし（ 0）

研究者番号：