

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461863

研究課題名(和文)遅発性活性酸素が関与する放射線抵抗性獲得機構の解明

研究課題名(英文)Acquisition of radioresistance involving delayed reactive oxygen species

研究代表者

菓子野 元郎(Kashino, Genro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：00437287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞培養環境における培地成分の中で、グルタミン酸代謝経路に関わる因子が放射線感受性亢進につながることを明らかにした。4日間培養後の培養上清処理による放射線感受性亢進は、数種のヒトがん細胞株で確認できたが、正常細胞では見られなかったため、がん細胞特異的である可能性が高い。機構として、グルタミン酸経路の抑制によるグルタチオン合成の低下、それともなう酸化度の増加が確認できた。この結果は、グルタミン酸代謝経路が放射線治療におけるがん殺傷作用の効果的標的となりうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We clarified that factors related to the glutamate metabolism pathway lead to radiation sensitivity enhancement among medium components in the cell culture environment. Enhancement of radiosensitivity by conditioned medium from culturing for 4 days could be confirmed in several types of human cancer cell lines, but because it was not seen in normal cells, it is highly likely to be cancer cell specific. As a mechanism, it was confirmed that the reduction of glutathione synthesis by the suppression of the glutamate pathway, and the increase of the oxidative stress accordingly. This result suggests that the glutamate metabolic pathway may be an effective target for cancer killing effects in radiotherapy.

研究分野：Radiation biology

キーワード：glutamate metabolism oxidative stress radiosensitivity

1. 研究開始当初の背景

電離放射線の生物影響は、活性酸素による間接作用が重要な役割を果たす。しかし、疎水性であると考えられる DNA 周辺環境において活性酸素がどの程度 DNA 損傷誘発に寄与するのかについては、生きている細胞のクロマチン構造を保持した DNA を解析しなければ明確にならない。我々は、放射線により生じる活性酸素が及ぼす影響を調べてきた。その中で、活性酸素を除去するジメチルスルフォキシド(DMSO)処理は、照射により生じる OH ラジカルを捕捉し間接作用を防護するとともに、照射後の DNA 二重鎖切断修復機構の効率を良くする働きがあることを初めて明らかにした (Kashino et al. J. Radiat. Res. 2010)。このことは、放射線照射により生じる活性酸素は照射時の一過的な作用のみならず、照射数時間後の細胞内応答にも影響を及ぼしていることを示している。我々はこの興味深い現象に着目し、活性酸素が照射後に「遅発的に生じる機構」について研究を進めてきた。これまで、すでに以下のような成果を上げつつある。

1) 生きている細胞群を ESR 法にて解析し、照射 24 時間後に存在するラジカル種「遅発性誘発長寿命ラジカル」を初めて検出した (投稿準備中)。

2) 照射後に DRP1 依存的なミトコンドリア断片化が亢進すること、それに伴い照射 72 時間後ピークとする「遅発性活性酸素」が生成することを初めて確認した (Kobashigawa et al. BBRC 2011)。

3) 放射線標的となる照射細胞を由来とする「分泌性因子」の作用を受けたバスタンダー細胞 (非照射) では、アスコルビン酸がバスタンダー効果の防護作用に有効であること (Harada et al. Int. J. Radiat. Biol. 2008)、分泌性因子 (サイトカイン類) の作用を受けた細胞では「遅発性誘発長寿命ラジカル種」が ESR で確認できること、その過程においてミトコンドリアの膜電位低下によるスーパーオキシドの増加が見られることを明らかにした (Kashino et al. Free Radic. Res. 2013)。

これらの発見は、照射細胞内で一過的に増える活性酸素の作用とは別に、照射後数日かけて少しずつ誘導される遅発性活性酸素が、放射線に対するホメオスタシス (恒常性維持) の一環として重要であることを示唆している。さらに、細胞は単独ではなく細胞集団として放射線応答しており、その応答においてはミトコンドリアに起因する遅発性活性酸素が抗酸化酵素系を亢進させるなどの役割を果たすことが示唆される。以上の考えに基づき、「照射細胞由来の分泌性因子の作用を受けた細胞では、遅発性活性酸素が誘導され、抗酸化酵素レベルの増加、DNA 修復の活性化などの防御反応が亢進し、その後の放射線や過酸化水素に対する感受性が変化する

のではないかと」の仮説を得るに至った。

そこで、放射線治療における分割照射において、放射線治療を困難にする原因になる「放射線抵抗性獲得細胞」の出現を抑える手法確立を目指して、遅発性活性酸素の生成が放射線抵抗性獲得につながるルートを標的と捉え、その機構解明を目指した研究を提案したい。この基礎研究は、放射線治療効果の改善につながると考える

2. 研究の目的

当初の予定では直接照射された細胞の遅発性活性酸素が放射線抵抗性獲得にする機構の解明を行う予定であったが、我々の研究進展の都合から、細胞集団の培養環境 (培地中成分) における因子の中で活性酸素の制御と放射線感受性に影響するものを探索し、その機構について解析した。当初の目的を解明する上でも深く関連する機構であると示唆される。今回、細胞培養中に放出されるサイトカイン類の因子の関与、及び細胞培養中に消費される栄養因子の関与に着目し、放射線感受性に及ぼす影響に関する結果を報告する。

3. 研究の方法

(1) 細胞

細胞は、ラット由来グリオーマ C6、ラト由来アストロサイト (非腫瘍) RNB、ヒト由来膵癌細胞 MiaPaca-2 および Panc-1、ヒト由来グリオーマ細胞 U251 および Becker, Marcus、ヒト由来正常線維芽細胞 BJ/hTERT を用いた。

(2) 培養上清処理による放射線感受性の変化

培養上清に含まれる成分のうち、放射線感受性に影響を及ぼす因子を明らかにするため、培地交換から 2 日 (48 時間) 後、3 日 (72 時間) 後、4 日 (96 時間) 後にそれぞれ培養上清を回収し、それらを別に用意した細胞へ 24 時間処理し、6Gy 照射時の生存率を調べた。

(3) 培養上清処理細胞によるメタボローム解析

培養 4 日後の C6 細胞の培養上清を 24 時間処理した細胞内での代謝機構の変化を網羅的に捉えるため、HMT 社の CE-TOFMS 及び CE-QqQMS による解析を委託した。測定対象は代表的代謝経路にて主要な役割を果たす 116 代謝物であった。

(4) 培養上清処理細胞における活性酸素レベルの解析

細胞内の活性酸素レベルを定量化するため、APF 蛍光色素を細胞に処理し、蛍光分光光度計にて蛍光量から酸化レベルを測定した。

(5) 培養上清処理細胞における放射線照射後の DNA 二本鎖切断の定量化

放射線による DNA 二本鎖切断の量を定量化するため、照射 15 分後、1 時間後、及び 2 時間後に細胞をホルマリン固定し、53BP1 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。核内に見られる 53BP1 フォーカスの数を照射後の DNA 二本鎖切断量の指標としてカウントし、放射線により生じる DNA 二本鎖切断量及び、短時間の修復動態を検討した。

4. 研究成果

(1) C6 の培養上清による放射線感受性の亢進

C6 の培養において、培地交換から 2 日 (48 時間) 後、3 日 (72 時間) 後、4 日 (96 時間) 後にそれぞれ培養上清を回収し、それらを別に用意した C6 細胞へ 24 時間処理し、6Gy 照射時の生存率を調べた。新鮮な培地を 24 時間処理した細胞を対照とした。その結果、4 日後の培養上清は対照に比べ、有意に 6Gy 照射時の生存率が低下していた (図 1)。

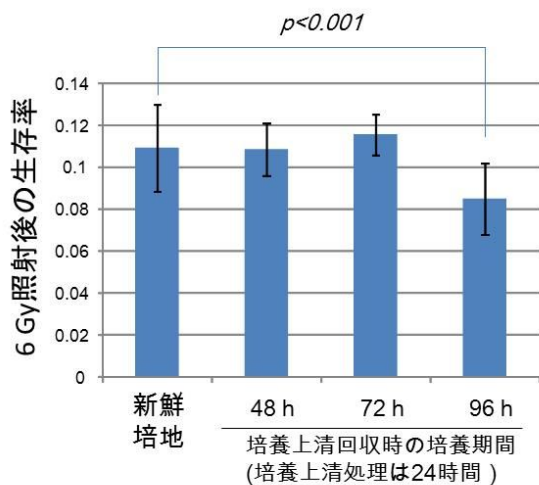


図1 C6細胞における6Gy照射後の生存率の結果。4日間培養上清を処理すると、放射線感受性が高くなることが分かった。

この条件 (培養 4 日後の培養上清回収) において、他の細胞株でも放射線感受性を調べたところ、がん細胞である MiaPaca-2 細胞で最も生存率の低下が大きかった (対照細胞の生存率の約 25%)。また、グリオーマ細胞 U251 でも同様の結果が得られた。一方、ラットアストロサイト由来細胞 RNB では 4 日間培養上清処理による放射線感受性の変化は見られず、ヒト正常線維芽細胞 BJ/hTERT でも見られなかった。これらの結果より、がん細胞は培養上清処理による放射線感受性の影響が出やすく、正常細胞はその影響が出にくいという可能性が示唆された。

C6 細胞の培養上清で分泌されているサイトカイン類 24 種類を網羅的に調べたところ、

VEGF が劇的に増えてくることが分かった。しかし、その誘導による作用を中和抗体で不正でも培養上清による放射線感受性の亢進は抑えられなかった。この結果から、サイトカインのような微量な成分の変化よりも影響因子の消費の方が培養上清処理による放射線感受性亢進の関わる可能性が高いと考え、次に網羅的代謝物解析を行った。

(2) C6 培養上清処理細胞におけるメタボローム解析

116 種の代謝物について、新鮮培地および 4 日間培養上清をそれぞれ 24 時間処理後の C6 細胞で調べた (メタボローム解析) 結果、グルタミン酸関連アミノ酸の量が培養上清処理により低下していた。この変動に関連し、グルタチオン合成経路が阻害されていることも確認された。そこで、詳細なグルタチオン定量化キットによる解析の結果、培養上清処理群では対照群に比べて有意にグルタチオン量の低下が明らかであった。一方、RNB 細胞では培養上清による放射線感受性の変化はみられなかったが、グルタチオン量の低下は C6 と同等にみられた (図 2)。このことから、代謝物の変化のうち、グルタミン酸関連アミノ酸の低下、それに伴うグルタチオン量の低下は、C6 の放射線感受性を説明するのに十分であるが、RNB 細胞では別の機構により放射線感受性の変化が抑えられている可能性が示唆された。

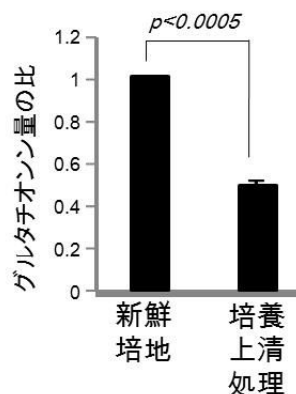


図2 C6における細胞内グルタチオン量の比。新鮮培地24時間処理に比べて、培養上清(4日後)24時間処理では約50%に量が低下している。

(3) 培養上清処理による細胞内酸化レベルの測定

C6 における培養上清処理により、APF の蛍光を指標とした酸化レベルを測定した結果、対照細胞に比べて増加することが分かった。このことはグルタチオン量の低下の結果と一致する。一方、放射線照射後の酸化レベルも培養上清処理細胞では対照細胞よりも高くなる傾向が見られた。このことから、培養上清処理による放射線感受性亢進の機構として、照射後の抗酸化能の低下による DNA 損

傷レベルの亢進が考えられた。次に DNA 損傷の中でも重篤な DNA 二本鎖切断の生成について調べた。

(4) 培養上清処理細胞における放射線照射後の DNA 二本鎖切断

照射 15 分後の 53BP1 フォーカス数を指標に DNA 二本鎖切断生成量を調べた結果、培養上清処理により 1Gy 照射後のフォーカス数が増える傾向が見られた。しかし、解析細胞数の数が不足しているため、今後さらなる解析（再現性の確認）が必要である。

以上の結果を総合的に考えると、培養 4 日間で消費された培地の栄養成分の中でグルタミン酸代謝に関わる成分の欠損は、がん細胞の放射線感受性を高める効果があることが強く示唆される。その機構は、グルタミン酸代謝の欠損によりグルタチオン合成量の抑制、それに伴う細胞内酸化レベルの亢進が関与する可能性が高い。そのような状態で放射線を照射されると、DNA 二本鎖切断が多くなり、結果として細胞死を多く起こすことになると考えられる。RNB 細胞のような非腫瘍細胞、またはヒト正常繊維芽細胞では、培養上清処理による放射線感受性への影響が少ないが、RNB においては、培養上清処理によるグルタチオン量の低下は C6 グリオーマ細胞と同程度引き起こされていた。このことから、正常細胞ではがん細胞と同様の機構でグルタミン酸欠損、グルタチオン量の低下が引き起こされるものの、グルタミン酸代謝による酸化ストレスの上昇をグルタチオン以外の抗酸化成分でうまく軽減でき、環境因子による酸化ストレスの変化を少なくする恒常性維持がうまく働いていることが示唆される。

これらの結果から、グルタミン酸代謝経路をがん治療の標的とすれば、正常細胞への影響を抑えつつ、放射線によるがんの殺傷作用を増感する効果がもたらされる可能性が高い。

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 6 件)

Tamari Y, Kashino G, Mori H, Acquisition of radioresistance by IL-6 treatment is caused by suppression of oxidative stress derived from mitochondria after γ -irradiation. *J Radiat Res.* 2017 Feb 13:1-9. (査読有)
doi: 10.1093/jrr/rrw084.

Ojima M, Iwashita K, Kashino G, Kobashigawa S, Sasano N, Takeshita A, Ban N, Kai M. Early and Delayed Induction of DSBs by Nontargeted Effects

in ICR Mouse Lymphocytes after In Vivo X Irradiation. *Radiat Res.* 2016 Jul;186(1):65-70. (査読有)
doi: 10.1667/RR14053.1.

Kobashigawa S, Morikawa K, Mori H, Kashino G. Gemcitabine Induces Radiosensitization Through Inhibition of RAD51-dependent Repair for DNA Double-strand Breaks. *Anticancer Res.* 2015 May;35(5):2731-7. (査読有)
<http://ar.iiarjournals.org/content/35/5/2731.long>

Kobashigawa S, Kashino G, 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.* 2015 Mar;146-148:65-71. (査読有)
doi: 10.1016/j.mad.2015.05.002.

Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, Yamashita S, Mori H. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells. *Radiat Res.* 2015 Apr;183(4):455-64. (査読有)
doi: 10.1667/RR13772.1.

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.* 2014 Nov 7;454(1):7-11. (査読有)
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.136.

〔学会発表〕(計 5 件)

菓子野元郎、がん細胞の放射線感受性に影響する環境因子の解明、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016 年 10 月 26~27 日、JMS アステールプラザ(広島県広島市)

菓子野元郎、小橋川新子、玉利勇樹、森宣、培養上清成分による放射線感受性の変化、日本放射線影響ワークショップ、2015 年 10 月 16 日、富山大学(富山県富山市)

Genro Kashino, Jun Kumagai, Hiromu Mori, Role of secreted factors on acquisition of radioresistance in rat glioma cells, 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 15~17 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

菓子野元郎、小橋川新子、森宣、がん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1~3日、かごしま県民交流センター（鹿児島県鹿児島市）

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1~3日、かごしま県民交流センター（鹿児島県鹿児島市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菓子野 元郎 (KASHINO Genro)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：00437287

(2) 研究分担者

熊谷 純 (KUMAGAI Jun)
名古屋大学・未来材料システム研究所・准教授
研究者番号：20303662

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