

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15586

研究課題名(和文) マイクロビームを用いた細胞核・細胞質照射における防御細胞応答の解析

研究課題名(英文) Studies on defensive cellular response by nucleus and cytoplasm targeted irradiation using microbeam

研究代表者

小西 輝昭 (Konishi, Teruaki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線障害治療研究部・主任研究員(定常)

研究者番号：70443067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：放射線による細胞質損傷とその細胞応答を明らかにすることを目的とした。陽子線マイクロビームSPICEにおける細胞核・質の打ち分け技術を確立した。ヒト肺正常細胞の細胞核、質、またはその両方に陽子線を照射して、それぞれに対する生物効果を評価した。その結果、細胞質への照射では、放射線の直接的な作用でDNA二本鎖切断(DSB)は誘発されないが、ミトコンドリア損傷などの間接的な要因からDSBが誘発されることを示唆した。また、酸化ストレス応答の転写因子NRF2が活性化し、その標的遺伝子が発現し、そして、DSB修復も促進する。よって、細胞質損傷も防御的な細胞応答が開始するトリガーであることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、放射線によって誘発される細胞質損傷を起因とする細胞応答は、DNA損傷の修復過程を促進するという結果を報告した。放射線による生物効果の第一ターゲットはDNAであるとした古典的な放射線生物学に対して、本研究では、第二ターゲットとして細胞質が存在し、それは放射線に対して防御的に働くことを示したことは学術的に重要であり、放射線以外の基礎生物学分野においても発展性が大きいと考える。そして、細胞の放射線感受性を左右するであろう細胞質損傷応答およびその経路は、放射線リスク推定とモデル化、並びに放射線がん治療においても、重要なファクターになり得ることからその社会的な意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to clarify the radiation induced cytoplasmic damage and its cellular response. Taking advantage of the advanced technology of SPICE-NIRS microbeam, we were able to precisely target the nucleus and cytoplasm. Experimentally, human lung normal cells were microbeam targeted in the nucleus, cytoplasm, or both to investigate the site-specific cellular response. As result, cytoplasmic irradiation induced DNA double strand breaks as a result of cellular response of mitochondria damage and not because of direct energy deposition by the proton beam. In addition, we found that activation of NRF2, a transcriptional factor of anti-oxidative response gene, and upregulation of responsible target genes. Altogether, we demonstrated that cytoplasmic damage triggers defensive cellular response against radiation, that were followed by activation oxidative response pathway and also DSB repair pathway.

研究分野：放射線生物学

キーワード：マイクロビーム 細胞質 ミトコンドリア 酸化ストレス応答 NRF2 DNA修復 Mito-Sox

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

放射線に対するターゲットは、細胞核内 DNA であり、また、その細胞致死の主因は細胞核内 DNA に誘発された DNA 二本鎖切断 (DSB) であるというのが古典的放射線生物学の根幹にある。しかし、近年、細胞核内 DNA 損傷だけでなく、放射線の細胞質への影響について研究が進められている。例えば、細胞質照射によって活性酸素が誘導され、それが原因となり核 DNA で点突然変異が誘導されることを報告している。また、 γ 線照射によって **Dynamin-related protein 1 (DRP-1)** というタンパク質がミトコンドリアに局在することが知られており、この **DRP-1** はミトコンドリアの断片化に関与しているという報告がある。そして、細胞質照射によって、豊富に存在するミトコンドリアの電子伝達系の機能が低下したため、活性酸素がミトコンドリア内で誘導されたことを報告されている。このように、細胞質への照射は、“非 DNA 損傷”が標的またはトリガーとなって、細胞の防御細胞応答の活性化を誘導している可能性がある。このような細胞質損傷を起因とした細胞応答を体系的に説明するモデルはない。また、このような細胞応答は、生命の生存戦略の根幹であり、詳細なメカニズムの解明が重要な課題であると考えた。

しかし、一般的な照射実験は、平坦な線量分布を有する照射野（ブロードビーム）を用いられ、細胞は、細胞核・細胞質の両方に線量が不均一に付与される。このような一般的な照射条件下では、細胞核内に誘発された DNA 損傷と、細胞質への線量付与によって誘導されたであろう細胞応答を区別して解析することは困難である。

陽子線マイクロビーム細胞照射装置 **SPICE**（放医研 **SPICE**）の高度化と安定的な稼働が必要である。本研究課題における **SPICE** 装置性能・特性の最適化が無くして、実現不可能である。申請者は、これまでに、**SPICE** の開発とその高度化を推進し、世界トップレベルの装置性能を実現した。具体的には、1) 陽子線 1 個から任意の数にまで照射粒子数を設定可能であり、その正確性は、99.7%以上である。2) 照射速度は、1 分間におよそ 400 個の細胞を照射することが可能な高速性を実現した。また、3) マイクロビームのビームサイズは約直径 $2 \mu\text{m}$ であり、細胞核・細胞質への狙い撃ち照射が可能である。4) 照射細胞への照準から照射完了までのプロセスがほぼ自動化されており、非常にハイスループットな装置となった。

SPICE を最大限に活用し、放射線誘発 DNA 損傷を起因とする古典的な放射線生物学では説明できなかった事象について、詳細な知見を蓄積し、非 DNA 損傷由来の放射線細胞応答に関する放射線生物学の体系化を図ることを目標とした。

2. 研究の目的

放射線誘発細胞応答のトリガーは、本当に DNA 損傷なのか。細胞質または非 DNA である別のトリガーが存在するのか。そして、これらの照射された細胞は周辺の非照射の細胞によって影響を受ける可能性について解析を行う。具体的には、1) 細胞質内における損傷を起因とした細胞応答経路の解析、および、2) 細胞質損傷を起因とした細胞核内 DNA 損傷修復経路などの経路の活性化についての解析、3) 周辺の照射細胞と非照射細胞間における双方向シグナリングによる DNA 損傷修復経路の活性化の有無について解析を進める。細胞核・細胞質の打ち分けが可能な、放射線医学総合研究所が保有する **SPICE** の性能を最大限に活用する。

3. 研究の方法

本研究課題における細胞核・細胞質への照射をさらに高精度・高効率に行うための **SPICE** の高度化を進めた。（図 1）そして、このマイクロビーム照射技術を活用し、①細胞核、②細胞質またはその③両方への照射による細胞応答を解析する。

まずは、細胞核内 DNA への DSB 誘発をヒストンタンパク質 **H2AX** のリン酸化 (γ **H2AX**) を指標した。また、DSB 修復において、非相同末端結合に関わる **XRCC4** ならびに相同組み換え修復経路に関わる **RAD51** についても細胞質照射による発現の増減を測定した。次に、非 DNA 損傷応答経路として、酸化ストレス応答経路の一つである **Keap1-NRF2** 経路にも着目した。**NRF2** は転写因子であり、一般的には **Keap1** と結合して細胞質に存在する。ストレス応答として、**NRF2** は **Keap1** と解離し、細胞核内に移行し、**HO-1**、**NQO1** などの遺伝子の発現を誘導する。この **NRF2** の細胞核内への移行量ならびに、標的遺伝子である **HO-1** についても免疫蛍光染色法によってその増減を測定した。また、細胞質には、ミトコンドリアが敷き詰められたように存在する。そこで、細胞質照射によるミトコンドリアの断片化を測定し、さらには、細胞質損傷を起因として産生する **Mito-SOX**（スーパーオキシド）の影響についても、検証した。

これらの細胞応答について、照射量依存性ならびに経時変化について解析した。

4. 研究成果

4-1: 細胞質損傷を起因とした細胞核内 DNA 二本鎖切断修復の促進

細胞核にマイクロビーム照射すると、細胞核内にビームサイズとほぼ同じサイズの直径数 μm の領域に DSB が誘発され、 γ **H2AX** に対する免疫蛍光染色を行うと、蛍光スポットとして確認できる。（図 2-1）細胞核にマイクロビーム照射し、照射 1 時間後の γ **H2AX** 量 (DSB 量) を測定した結果、マイクロビームの照射粒子数に依存して増加した。これと同様に、細胞核に照射

するのに加えて、細胞質に 500 個、ないし 1000 個の陽子線を照射したところ、細胞核にのみ照射した結果と全く同様であった。つまり、細胞質照射では、放射線のエネルギー付与などの直接的な影響で細胞核に DSB を誘発しないことを意味する。しかし、照射後の残存 γ H2AX 量の減少は、細胞核・細胞質の両方照射した細胞の方が速いといった結果を得た。つまり、細胞質損傷が DSB 修復機構を活性化するトリガーになっていることを示唆した。(図 2-2)

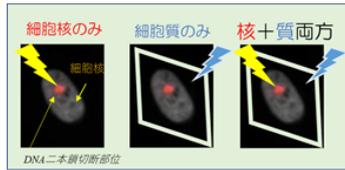


図 1. 陽子線マイクロビーム細胞照射装置 SPICE は、細胞核の中心位置、または細胞質のみ、または細胞核と細胞質の両方への照射の自動化を実現した。

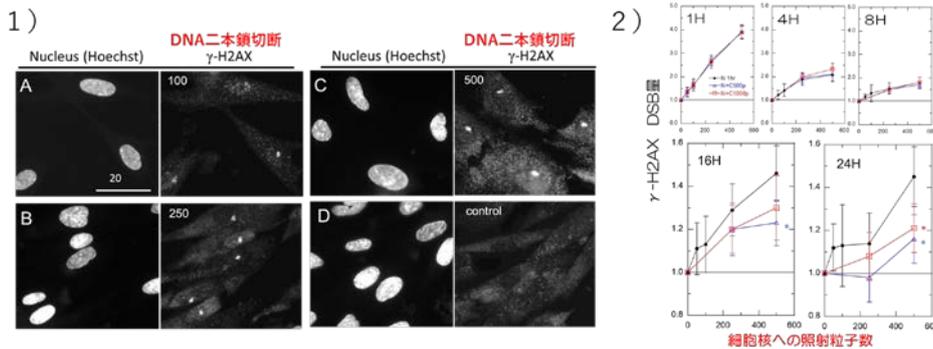


図 2. 細胞核にのみマイクロビーム照射した。A-C は、細胞核当たり 100、250、500 個の陽子線を照射し、照射 1 時間後に固定した。細胞核中心部に γ H2AX 蛍光スポットを確認できる。蛍光スポット強度は照射粒子数に依存して増加した。D は非照射細胞である (2-1)。細胞核のみと細胞核・細胞質の両方照射による DSB 誘発量とその経時変化を示した。(●に対する有意差 * : $p < 0.05$) (2-2)

4-2: 細胞質照射による DSB 誘発とその照射量依存性

細胞質のみに、マイクロビーム照射し、照射粒子数ならびに照射後の経時変化に対する誘発される DSB 量を測定した (図 4)。その結果、照射 1 時間後では非照射細胞の γ H2AX との有意な差は見られなかった。つまり、放射線の細胞質へのエネルギー付与によって直接的に細胞核内に DSB を誘発していないことを示した。しかし、照射後 4 時間後において、細胞質への照射量依存的に有意な増加を確認した。このことから、細胞質損傷量に依存して、何らかの細胞応答経路が介在して間接的に細胞核内に DSB を誘発したことを示唆している (図 3)。

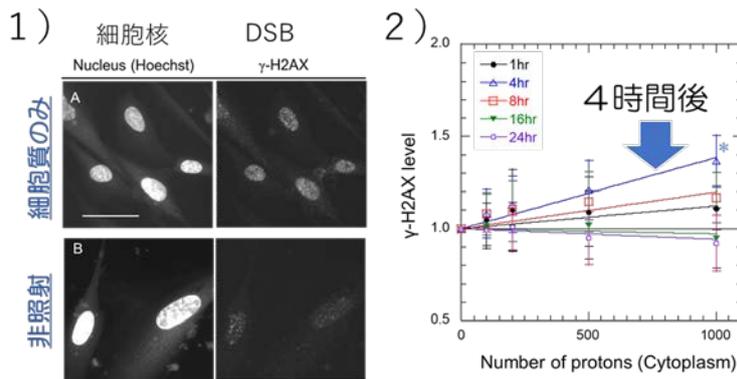


図 3. 細胞質にのみマイクロビーム照射し、細胞核内 DSB を γ H2AX に対する免疫蛍光染色によって可視化した (図 3-1)。細胞蛍光画像より γ H2AX 蛍光量を数値化し、照射量および経時変化を測定した (図 3-2)。

4-3: 細胞質照射による Keap1-NRF2 酸化ストレス応答経路の活性化および DSB 修復経路の活性化

細胞質照射によって NRF2 転写因子の細胞核移行および標的遺伝子である HO-1、NQO-1 の発現を可視化した (図 4-1)。その結果、照射量依存的な増加を確認した。また、非相同末端結合に関わる XRCC4 ならびに相同組み換え修復経路に関わる RAD51 についてもその発現量の増加を確認した (図 4-2)。つまり、細胞質照射によって誘発された細胞内損傷によって、酸化ストレス応答経路と DSB 修復経路が活性化することを明らかにした。

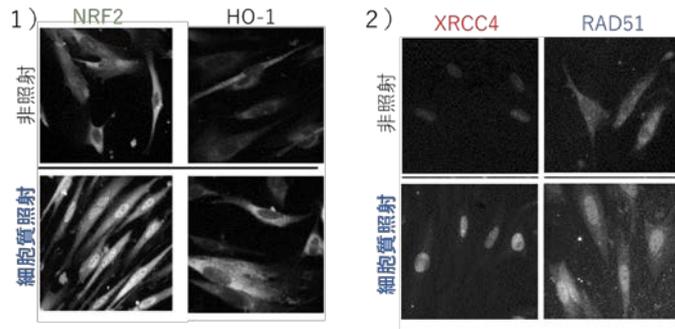


図4. 細胞質照射し、NRF2、HO-1、
に対して、免疫蛍光染色画を行
った。NRF2の核移行、またその
標的遺伝子である HO-1 の発現
の増加を確認した(4-1)。細胞
質照射し、XRCC4、RAD51 対
して、免疫蛍光染色画を行っ
た。発現の増加を確認した(4-
2)。

4-4: 細胞質照射によるミトコンドリア断片化および MitoSOX 産生

これら防御な細胞応答のトリガーとなっているものとして、細胞質内に敷き詰められたように分布するミトコンドリアに着目した。その結果、細胞質照射によって、ミトコンドリアが断片化されること、またその後、Mito-SOX が産生されることを確認した(図5-1)。また、この Mito-SOX の産生を抑制すると、NRF2 の活性化が抑えられ、また、細胞核内への DSB 誘発も軽減されたことから、細胞質照射を起因とする細胞応答のトリガーは、ミトコンドリア断片化による Mito-SOX 産生が大きく関わっていることを突き止めた(図5-2)。

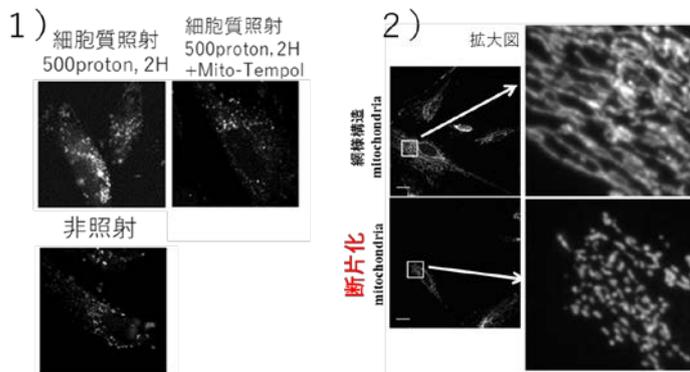


図5. 細胞質照射によって
産生された MitoSOX を可視
化した。(図A) Mito-tempol
によって産生が阻害された
(5-1)。細胞質照射によ
ってミトコンドリアの断片
化を検出した(5-2)。

4-5: 細胞質照射に対する p53 の役割

一般的に、p53 は細胞周期制御や DNA 損傷修復機構に大きく関わっており、DNA 損傷に対して活性化され、発現量が増加すると考えられている。しかし、本研究において、細胞質照射後、4 時間後では、p53 タンパク質量は減少していた(図10)。そこで、p53 タンパク質を pifithrin にて抑制すると、NRF2 の核移行並びに HO-1 発現も減少し、さらには、ミトコンドリアの断片化量も減少していた。この結果より、p53 はミトコンドリアの断片化と融合に大きく寄与しており、また、間接的にはあるが、NRF2 の働きに対しても関与していることを示した。

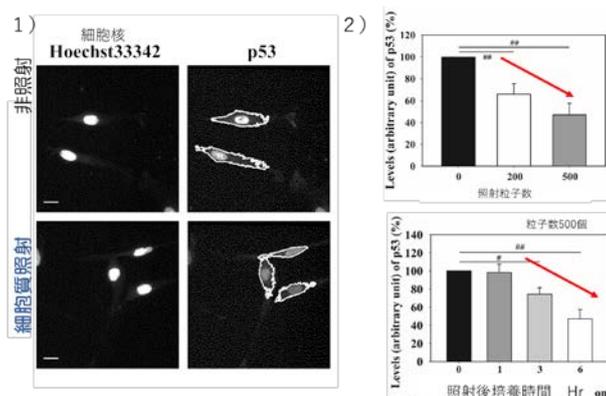


図6. 細胞質照射による細
胞内 p53 タンパク質量を細
胞蛍光画像より解析(図6
-1)。細胞質照射によ
って照射量依存的かつ経時
的に減少した(図6-2)

まとめ:

マイクロビーム細胞照射技術を活用することで、細胞核、細胞質、細胞核・質の両方へ独立して損傷を誘発することを可能にした。また、細胞質損傷は、細胞内唯一の細胞核を防御するシステムを活性化する。本研究課題では、酸化ストレス応答 Keap-Nrf2 経路ならびに DSB 修復経路の両方が、細胞質損傷のうちミトコンドリアの断片化をトリガーとして、産生される MitoSOX の影響によって、活性化されること明らかにした。

一方で、DSB 経路と NRF2-Keap1 経路が双方に依存的に働いているかはわかっていない。また、p53 発現量の減少についても今後、詳細な解析を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Daisuke Ohsawa, Yoshiya Furusawa, Alisa Kobayashi, Masakazu Oikawa, Teruaki Konishi, Analysis of SPICE microbeam size using fluorescent nuclear track detector (FNTD). Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. 453, (2019) 9-14. (査読有)
2. Jun Wang, Teruaki Konishi, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 antioxidative response mitigates cytoplasmic radiation-induced DNA double-strand breaks. Cancer Science, 110(2), (2019) 686-696. (査読有)
3. Teruaki Konishi, Alisa Kobayashi, Tengku Ahbrizal Farizal Tengku Ahmad, Jun Wang, Enhanced DNA double strand break repair triggered by microbeam irradiation induced cytoplasmic damage. Journal of Radiation and Cancer Research. 9(4) (2018) 183-186. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

- ① 小西輝昭、SPICE-NIRS マイクロビームが先導する放射線生物学・医科学研究。ビーム物理研究会(若手の会)、2018、11月(招待講演)
- ② Daisuke Ohsawa, Yoshiya Furusawa, Alisa Kobayashi, Masakazu Oikawa, Teruaki Konishi, Analysis of SPICE microbeam profile using fluorescent nuclear track detector (FNTD). 16th International conference on nuclear microprobe technology and applications, 2018
- ③ 小西輝昭、小林 亜利紗、大澤 大輔、及川 将一、Narongchai Autsavapromporn、Tengku Ahbrizal Farizal Tengku Ahmad、Jun Wang、SPICE-NIRS マイクロビームが先導する放射線生物学 (Single Cell Radio-Biology)、量子生命科学研究会第2回学術集会、2018、5月
- ④ 大澤 大輔、古澤 佳也、小林 亜利紗、及川 将一、小西 輝昭、FNTDを用いたSPICE マイクロビームサイズの高精度評価方法の開発。量子生命科学研究会第2回学術集会、2018、5月
- ⑤ Jun Wang, Teruaki Konishi, Alisa Kobayashi, Yoshiya Furusawa, Masakazu Oikawa, Daisuke Ohsawa, Narongchai Autsavapromporn, Tengku Ahbrizal Farizal Tengku Ahmad, Study on cytoplasmic radiation induced defensive signaling using NIRS-SPICE microbeam. 量子生命科学研究会第2回学術集会、2018、5月
- ⑥ Teruaki Konishi, Masakazu Oikawa, Alisa Kobayashi, Daisuke Ohsawa, Shino Homma-Takeda, Yoshiya Furusawa, Tsuyoshi Hamano, SPICE-NIRS microbeam: A focused vertical system for proton irradiation of a single cell for radiobiological research. 1st QST International Symposium "Quantum Life Science", 2017
- ⑦ Teruaki Konishi, SPICE-NIRS microbeam: Current developments and radiobiological studies. 15th Chinese Biophysics Congress, Biophysical Society of China, 2017(招待講演)
- ⑧ 小西 輝昭、小林 亜利紗、古澤 佳也、劉 翠華、及川 将一、Tengku Ahbrizal Farizal Tengku Ahmad、Narongchai Autsavapromporn、Jun Wang, Microbeam induced cytoplasmic damage triggers activation of DNA double-strand break repair. 日本放射線影響学会第59回大会、2016年10月

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 小林 亜利紗

ローマ字氏名: (KOBAYASHI, Alisa)

研究協力者氏名: 大澤 大輔

ローマ字氏名: (OHSAWA, Daisuke)

研究協力者氏名: 及川 将一

ローマ字氏名: (OIKAWA, Masakazu)

研究協力者氏名: 古澤 佳也

ローマ字氏名: (FURUSAWA, Yoshiya)

研究協力者氏名: ワン ジュン

ローマ字氏名: (WANG, Jun)

研究協力者氏名: アウサバポロンポーン ナロンチャイ

ローマ字氏名: (AUTSAVAPROMPORN, Narongchai)

研究協力者氏名: テンクーアマード テンクーアブリザルファリザル

ローマ字氏名: (Tengku Ahmad, Tengku Ahbrizal Farizal)