

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510072

研究課題名(和文)細胞内活性酸素種の生理学的至適環境維持機構の解析とその生物影響評価

研究課題名(英文)Biological impact Mechanism maintenance and assessment of biological impact of intracellular reactive oxygen species produced by normal physiological reaction

研究代表者

田野 恵三 (Tano, Keizo)

京都大学・原子炉実験所・准教授

研究者番号：00183468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：SODは有害活性酸素種スーパーオキシドを過酸化水素に触媒する。高等真核細胞では細胞内局在性が異なる3種のSODが知られている。我々はニワトリDT40細胞のConditionalなSOD1, SOD2ノックアウト細胞を作成し、これら遺伝子産物の枯渇が細胞内活性酸素代謝にどのような異常をもたらし、どの抗酸化物質がそれら異常を抑制できるのかを明らかにするため、種々のROSプローブを用いて解析し以下のを得た。SOD1は細胞の生存に必須である。SOD2は細胞増殖機能には重要な役割を担っている。両遺伝子産物の枯渇によるいかなる細胞内異常もアスコルビン酸(APM)でしか抑制できない。

研究成果の概要(英文)：Superoxide dismutases (SODs) are antioxidant proteins converting superoxide to hydrogen peroxide. In vertebrate cells, SOD1 is present in the cytoplasm, with small levels found in the nucleus and mitochondrial intermembrane space. SOD2 is present in the mitochondrial matrix. We conditionally disrupted the SOD1 or SOD2 gene in DT40 cells and found that depletion of SOD1 caused lethality, while depletion of SOD2 led to growth retardation. The lethality in SOD1-depleted cells was rescued by ascorbic acid. We demonstrated that ascorbic acid offset growth defects observed in SOD2-depleted cells and lowered mitochondrial superoxide to physiological levels in both SOD1- or SOD2-depleted cells. Depletion of SOD1 or SOD2 resulted in the accumulation of intracellular oxidative stress. This oxidative stress was reduced by ascorbic acid. Our study suggests that ascorbic acid can be applied as an antioxidant that mimics the functions of cytoplasmic and mitochondrial SODs.

研究分野：放射線生物学

キーワード：活性酸素種 細胞内至適環境維持 ラジカルスカベンジャー

1. 研究開始当初の背景

細胞内因性活性酸素種 (ROS) は、ミトコンドリアや細胞外刺激 (増殖因子等) により絶えず生じている。抗酸化酵素や蛋白の作用で細胞内濃度と局在性が至適化された ROS は、シグナル伝達のメディエーターとして正常な生理機能を担っている。一方で、細胞内抗酸化機能の不全により ROS が異常増加すると、細胞内の高分子やオルガネラに損傷を与え、細胞死や癌化を引き起こす。内因性 ROS による細胞死や自然発癌の解明が待たれる中、これまでは酸化剤や放射線照射といった外的処理で副次的に損傷を発生させ、非特異的に ROS レベルを増加させる手法での解析しかなかった。

我々は、これら外的処理とは異なる手法での内因性 ROS 解析を試みるべく、Super Oxide (SOX) を H_2O_2 と O_2 に変換する酵素 Super Oxide Dismutase (SOD) のトリ DT40 細胞条件欠損株を作製した。この細胞は、ドキシサイクリン (DOX) 存在下でヒト SOD cDNA の発現を抑制し、放射線や環境因子に関わりなく細胞内 SOX 濃度を上げることで、内因性 ROS の評価が可能となる。この方法で、細胞質局在 SOD1 とミトコンドリアマトリックス局在 SOD2 の条件欠損細胞を作製したところ、DOX 処理によって SOD1 が欠損すると細胞致死となり、SOD2 が欠損すると細胞増殖遅延が起こることを見いだした。逆に、これら細胞死や細胞増殖遅延を抑制できる物質は、SOX に特異的な抗酸化作用があると考えられる。また、アスコルビン酸が SOD1 あるいは SOD2 欠損による細胞死や細胞増殖阻害を特異的に相補することを報告した。この結果は、SOD 条件欠損細胞が SOX に特異的な抗酸化物質のスクリーニングに対し極めて有用であることを示している。

さらに、SOD により SOX から変換された H_2O_2 を適正濃度に保つ酵素 Peroxiredoxin (PRDX1) の条件欠損細胞を作製して解析した結果、PRDX1 枯渇でも致死性を示した。これらは、内因性 ROS の濃度適正化が破綻するとシグナル伝達異常を介した細胞致死をもたらすことを示しており、細胞内の ROS を巡る至適環境維持の重要性を示唆する。

2. 研究の目的

脊椎動物細胞内の抗酸化酵素や蛋白遺伝子の条件欠損細胞を作製することで内因性 ROS を増加させ、その解析結果から内因性 ROS の生物影響評価とその至適環境維持機構の生物学的意味を明らかにすることを目的とする。自然環境に近い低レベル環境因子や低レベル放射線影響に対する基礎データを提供する。

(1) SOD1 及び SOD2 欠損で生じた内因的 ROS による複製鎖合成速度低下と内因性 ROS の局在性との関連性を検証する。また、損傷複製

に関わる他の複製酵素や染色体維持に関わる蛋白の遺伝子との多重変異を作り、内因性 ROS の遺伝的不安定性への関与を細胞レベルで検証する。

(2) SOD1, SOD2 条件欠損細胞に加え、PRDX1 条件欠損細胞においても酸化レベルが上昇することから、内因性 ROS のターゲットである非 DNA 損傷経路 ATM 経路が、ROS の増加に伴って働くかどうか、非 DNA 損傷誘発のシグナル伝達の機構について検証する。

(3) ミトコンドリアマトリックスに局在する SOD2 と機能不全ミトコンドリアの除去に関わる Parkin 遺伝子との多重変異株を作製し、内因性 ROS のミトコンドリア損傷誘導と機能不全ミトコンドリア除去システムとの相互作用について検証する。

(4) SOD1, SOD2 の条件欠損細胞を用いて、細胞内局在性が異なる SOX を特異的に抑制できる抗酸化物質のスクリーニングや既存の抗酸化剤の再評価を行う。さらに、マウス移植腫瘍系を用いた *in vivo* の評価を通じて、生体レベルでの ROS 維持機構の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) SOX 除去に関わる酵素 SOD1, SOD2 を主な実験対象とし、条件欠損細胞を利用した細胞生物学的解析とそれを利用したスクリーニング、得られた抗酸化物質の *in vivo* 解析、生体レベルでの解析とで実験を遂行する。この2つの遺伝子に加えて、 H_2O_2 を介したシグナル伝達にかかわる PRDX1 遺伝子についても同様な手法で条件欠損細胞を作成し、人為的な細胞内の活性酸素種のアンバランス状態を誘導し、それによって生じる表現型、致死性や増殖抑制の誘導を指標に細胞への影響を解析する。

(2) 活性酸素種が遺伝子 DNA 損傷を誘発するか否かを染色体分析で解析する。内因性 ROS が、染色体だけでなく細胞質も損傷の標的とする可能性について、アクチンなどの細胞骨格の異常を細胞組織染色で確認する。これら条件欠損細胞の表現型を相補できる抗酸化剤をスクリーニングすることにより、生理作用によって生じる活性酸素種のアンバランスの是正する新規の抗酸化剤の探索の系を作成する。

(3) SOD1, SOD2 及び PRDX1 欠損細胞の表現型に対する相補性を利用し、アスコルビン酸やメルカプトエタノール以外の物質について、抗酸化や類似作用のスクリーニングを行う。塩基損傷修復関連遺伝子 (FEN1 等) や染色体構造維持 (SMC) 関連遺伝子との二重破壊株、三重破壊株の作製を進める。SOD1, SOD2 欠損で生じた内因性 ROS による複製鎖合成速度の低下と ROS 局在性との関わりを検証する。

(4) *in vivo* 組織切片の ROS 分布の視覚化により造腫瘍性が確認されている系を用いて、これまでの生存率、小核テストとの結果、内

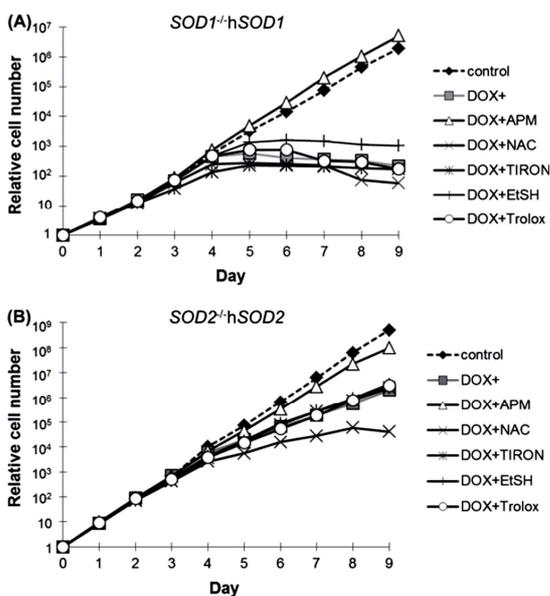
因性 ROS 分布との比較検証を行う。また、抗酸化剤の抗腫瘍性能への判断基準を決めるため、既存の抗腫瘍薬剤の効果とそれによる内因性 ROS の定量的変動比較を行い、ROS の腫瘍形成への関わりを検証する。

(5)スクリーニングで得られた抗酸化剤候補と既存の抗腫瘍薬剤の *in vivo* 評価を、ROS の定量的解析と視覚化解析から総括する。従来の小核テストに加えて、*in vivo* 組織スライドを用いたマーカー蛋白やアポトーシスマーカーのデータを加味し、抗酸化効果の *in vivo* における評価を行い、内因性 ROS の生体レベルでの生物影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 細胞質存在型 SOD1 枯渇による細胞致死性はアスコルビン酸で相補できる。

細胞質存在型 SOD1 の条件欠損 DT40 細胞が致死性であること、それと同時に染色体損傷、細胞内 ROS レベルの増加、細胞質とミトコンドリア分画のスーパーオキシドの増加が起きることを明らかにした。さらに、SOD1 枯渇状態で現れる上記一連の現象は、抗酸化剤アスコルビン酸により抑制できることを見出した (*Free Radical Res.*, 2013)。

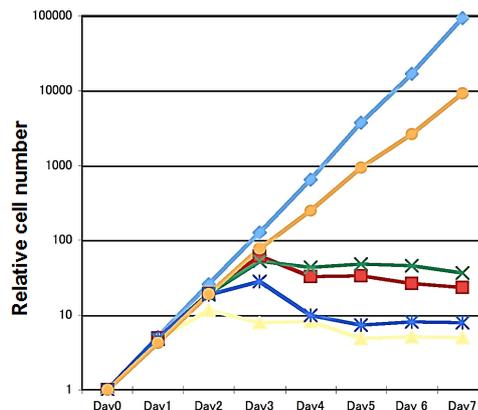


(図 1. SOD1 枯は細胞死、SOD2 枯渇は細胞増殖遅延は誘発する。これらはアスコルビン酸添加によってのみ相補することができる。)

(2) 尿酸は SOD1 枯渇による細胞死を抑制できないが、染色体損傷誘発を抑制できる。

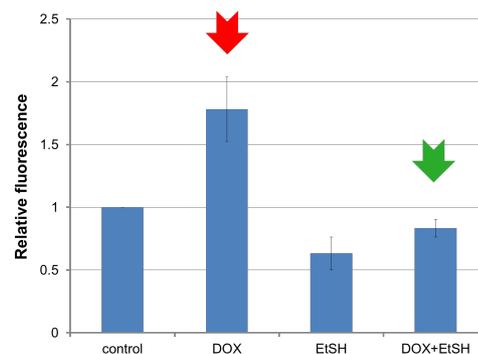
我々の条件欠損細胞システムを用いて、SOD1 枯渇による細胞死と染色体損傷を相補可能な抗酸化薬剤のスクリーニングを行った。N-アセチルシステインやタイロン、トロロックス、尿酸等の抗酸化剤はアスコルビン酸のような致死効果からの回復は見いだせなかった。しかしながら、尿酸は致死効果の抑制ができないにも関わらず、SOD1 枯渇による細胞内酸化度の増加に伴う娘染色損傷(娘

染色体交差と染色体断裂)の頻度を有意に減少させることを見出した。アスコルビン酸とは異なり、尿酸では細胞致死の回復はできなかったことから、細胞内酸化レベルの増加による細胞致死は、必ずしも DNA 損傷を経由しないことも暗示された。さらに、抗酸化蛋白 PRDX1 の条件欠損細胞を作成したが、この細胞も条件欠損で致死になることを見出した。



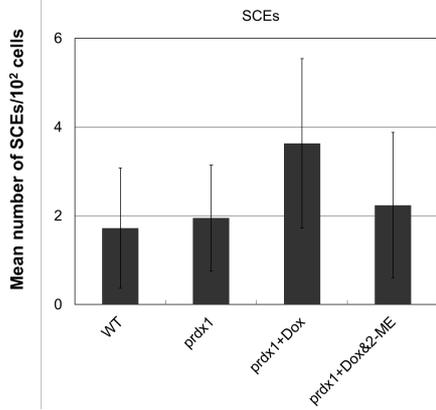
(図 2. PRDX1 は DT40 細胞の増殖に必須であり、PRDX1 枯渇による細胞死はメルカプトエタノールにより相補される。)

興味深いことに、PRDX1 枯渇下では細胞内 ROS の増加と細胞死は起こるが、染色体断裂は起こらなかった。この細胞死と染色体損傷はアスコルビン酸では相補されず、還元剤メルカプトエタノールで抑制された。この結果も、細胞内 ROS の恒常性の異常による細胞死が必ずしも DNA 損傷を経由しないことを示している (Gordon Research Conference; Genetic Instability, 2013)。



(図 3. PRDX1 が枯渇すると細胞内酸化度は上昇し、細胞内酸化度の上昇はメルカプトエタノールにより抑制される。)

さらに、PRDX1 条件欠損細胞を用いて条件変異型の PRDX1 変異蛋白の発現細胞のためのベクターの構築を行い、これら変異型蛋白を Tet-Off 型で発現する細胞のスクリーニングを行ったが、変異蛋白が PRDX1 の 2 量体立体構造を保てないためか、変異型細胞の分離はできなかった。Prdx1 枯渇による細胞死がメルカプトエタノールで回復することから、Prdx1 で還元される標的タンパク質のうち、還元化が細胞生存に必須のものかもしれないが、その特定には至らなかった。



(図4. PRDX1が枯渇してもSister Chromatid Exchange (SCE)の増加は無い。)

(3) BRCA1 と酸化損傷修復遺伝子産物 Pol の酸化損傷修復過程における作用機序の検証。

細胞内存在性 ROS の直接のターゲットの一つは染色体 DNA であり、主に塩基の酸化損傷であると考えられてきた。家族性乳がん原因遺伝子の一つである BRCA1 は DNA 二本鎖切断 (DSBs) に対する相同組換え (HR) 修復に加えて、酸化塩基損傷に関わると示唆されていたが、詳細は不明点が多かった。遺伝的均一性が確保できないヒト腫瘍由来細胞での解析の限界が認め、遺伝的に均一な DT40 細胞を用いて BRCA1 と塩基損傷修復に関わる DNA ポリメラーゼ (Pol) の二重欠損細胞を作成し細胞性粒学的、生化学的に検証を行った。細胞生物学的解析より、生化学解析よりこの両者は直接結合することは無いことを確認した。しかしながら、本来相同組換え修復に関わる BRCA1 が塩基所修復に関わる Pol を塩基損傷部位に維持することに関わっていることを示唆する結果を得た (*Pros One*, 2013)。

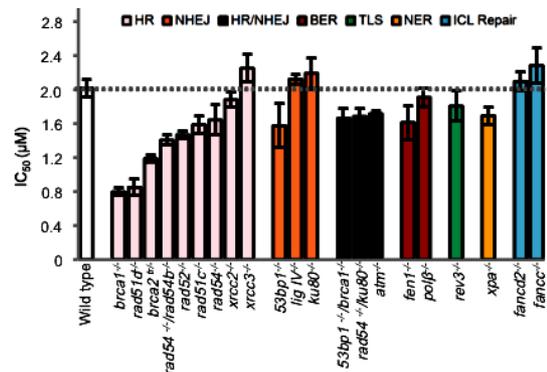
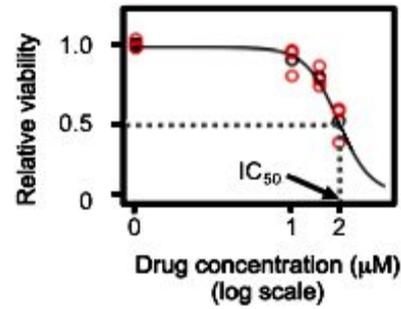
(4) ピペロングミンは染色体断裂を誘発すると共に HR 修復を抑制する。

細胞内 ROS バランスを攪乱する薬剤による生理効果についても解析を始め、腫瘍細胞特異的致死効果と細胞内 ROS 増加効果のあると報告されている薬剤ピペロングミンの作用機序について、DT40 修復遺伝子欠損細胞パネルを用いて解析した。

種々の DNA 損傷修復欠損細胞に対して感受性を示したが、予想に反して酸化塩基損傷の修復に関与する DNA ポリメラーゼ (Pol) やフラップエンドヌクレアーゼ I (FEN1) 欠損細胞に対しては、強い感受性は認められなかった。一方で相同組換え損傷修復関連遺伝子である RAD54, RSD51, BRCA1, BRCA2 等に対して強い感受性を示した。

さらに、ピペロングミンが DNA 二本鎖切断による染色体断裂を誘発することを見出した。このことは、ピペロングミンが直接染色体致死損傷を誘発することを示している。しかし、Ku80, DNAPKcs, あるいは LIGIV 等の

非相同末端修復遺伝子の欠損細胞では、ピペロングミンによる感受性を見いだせなかったため、この薬剤による DNA 二本鎖切断の修復は相同組換えによるものと結論づけた。



(図5. 種々の DNA 修復関連遺伝子欠損細胞に対するピペロングミンの感受性。主に相同組換え修復遺伝子欠損群に感受性を示すが、非相同末端結合修復遺伝子群には感受性を示さない。)

一方で、人為的 DNA 鎖切断導入プラスミドを用いたアッセイシステムを用いた解析から、導入された DNA 鎖切断の相同組換え修復を阻害するという予期せぬ結果を得たことから、ピペロングミンが染色体致死損傷のみならず、その相同組換え修復をも阻害するということが明らかになった。

また、BRCA1 欠損細胞がピペロングミンに抗感受性になることを見出した。BRCA1 変異型腫瘍細胞はポリ ADP リボースポリメラーゼ I (PARP1) 阻害剤に感受性になると知られていたが、PL と PARP1 阻害剤 Olaparib との同時処理で相加的な致死性を認め、ピペロングミンが BRCA1 変異型腫瘍への抗癌剤としての可能性を有することを強く示唆した (*Genes Cancer*, 2014)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Masunaga S, Sanada Y, Moriwaki T, Tano K, Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Kondo N, Narabayashi M, Watanabe T, Nakagawa Y, Maruhashi A and Ono K. Significance of Fractionated Administration of Thalidomide Combined With γ -Ray Irradiation in Terms of Local Tumor Response and Lung Metastasis. *World J.*

Oncol., **5**(4), 155-165, 2014, 査読有
DOI:10.14740/wjon855w

Okamoto S, Narita T, Sasanuma H, Takeda S, Masunaga S, Bessho T and Tano K. Impact of DNA repair pathways on the cytotoxicity of piperlongumine in chicken DT40 cell-lines. *Genes Cancer*, **5**(7-8), 285-292, 2014, 査読有
DOI:10.18632/genesandcancer.26

Kashino G, Tamari Y, Kumagai J, Tano K and Watanabe M. Suppressive effect of ascorbic acid on the mutagenesis induced by the bystander effect through mitochondrial function. *Free Radic. Res.*, **47**(6-7), 474-479, 2013, 査読有
DOI:10.3109/10715762.2013.791025

Masaoka A, Gassman NR, Horton JK, Kedar PS, Witt KL, Hobbs CA, Kissling GE, Tano K, Asagoshi K and Wilson SH. Interaction between DNA Polymerase and BRCA1. *PLOS ONE*, **8**(6), e66801(1-11), 2013, 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0066801

Masunaga S, Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Kondo N, Narabayashi M, Tano K, Maruhashi A and Ono K. Effect of tirapazamine and mild temperature hyperthermia on the recovery from radiation-induced damage in pimonidazole-unlabeled quiescent tumor cell population. *J. Canc. Ther.*, **4**(2), 521-528, 2013, 査読有
DOI:10.4236/jct.2013.42065

Tamari Y, Nawata H, Inoue E, Yoshimura A, Yoshii H, Kashino G, Seki M, Enomoto T, Watanabe M and Tano K. Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. *Free Radic. Res.*, **47**(1), 1-7, 2013, 査読有
DOI:10.3109/10715762.2012.734916

[学会発表](計10件)

森脇隆仁、岡本紗季、笹沼博之、永澤秀子、武田俊一、増永慎一郎、田野恵三、DT40細胞のDNA修復欠損細胞パネルを用いた酸素濃度に依存したチラパラザミンのDNA損傷誘発と細胞致死効果の解析、第68回日本酸化ストレス学会学術集会、かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市、平成27年6月11~12日

Moriwaki T, Okamoto S, Sasanuma H, Nagasawa H, Takeda S, Masunaga S and Tano K. Characteristics of differential cytotoxicity profile of tirapazamine between normoxia and

hypoxia. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, May 25-29, 2015

Masunaga S, Tano K, Sanada Y, Moriwaki T and Ono K. Characteristics of the response of intratumor quiescent (Q) cells to irradiation, referring to recruitment from Q to proliferating state. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, May 25-29, 2015

岡本紗季、別所忠昌、笹沼博之、武田俊一、増永慎一郎、田野恵三、PiperlongumineによるDNA損傷の誘発と相同組換えの抑制、日本放射線影響学会第57回大会、かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市、平成26年10月1~3日

Okamoto S, Narita T, Sasanuma H, Takeda S, Masunaga S, Bessho T and Tano K. Impact of DNA repair pathways on the cytotoxicity of piperlongumine in vertebrate cells. Gordon Research Conference on Genomic Instability, Hong Kong, China, July 7-11, 2014

Moriwaki T, Okamoto S, Yoshimura A, Inoue E, Seki M, Masunaga S and Tano K. The depletion of antioxidant enzymes resulted differential oxidative stress and induced cell death independent of DNA damage. Gordon Research Conference on Genomic Instability, Hong Kong, China, July 7-11, 2014

Okamoto S, Bessho T, Sasanuma H, Takeda S, Masunaga S and Tano K. Induction of double strand breaks and chromosomal aberrations by piperlongumine. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, Mar 23-26, 2014

岡本紗季、別所忠昌、笹沼博之、武田俊一、増永慎一郎、田野恵三、Piperlongumineによる二本鎖DNA切断の誘発と染色体断裂、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市、平成25年12月3~6日

田野恵三、吉村明、玉利勇樹、菓子野元郎、関政幸、榎本武美、増永慎一郎、細胞内酸化レベルの恒常性維持に関わるPRDX1の機能解析、第66回日本酸化ストレス学会学術集会、ウイנק愛知、愛知県名古屋市、平成25年6月13~14日

田野恵三、吉村明、玉利勇樹、菓子野元
郎、関政幸、榎本武美、渡邊正己、抗酸
化酵素 PRDX1 の細胞内恒常性維持に関わ
る機能の解析、日本環境変異原学会第 41
回大会、グランシップ、静岡県静岡市、
平成 24 年 11 月 29 ~ 30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/rb-rri/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田野 恵三 (TANO, Keizo)
京都大学・原子炉実験所・准教授
研究者番号：0 0 1 8 3 4 6 8

(2)研究分担者

増永 慎一郎 (MASUNAGA, Shin-ichiro)
京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号：8 0 2 3 8 9 1 4