

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791317

研究課題名(和文) 分泌性因子がもたらすミトコンドリア機能変化と放射線抵抗性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Radioresistance by secreted factors from irradiated cells through mitochondrial functions

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) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射時に生じる分泌性液性因子がミトコンドリアへ及ぼす作用に着眼し検討した。その結果、4 Gyの放射線照射されたCHO細胞において、照射24時間後の培養上清を回収し、非照射CHO細胞へ処理したところ、ミトコンドリア膜透過性が亢進し、膜電位が低下することがわかった。さらに活性酸素の増加、HPRT遺伝子の突然変異が増加することが分かった。一連の反応は、アスコルビン酸処理により抑制した。このような作用によるミトコンドリアへの影響は、がん細胞U251細胞において、放射線抵抗性を獲得することにつながっており、放射線抵抗性獲得機構として分泌性因子を介した代謝経路の変化が関連する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanism of bystander effect through the secreted factors. We focused on the action of secreted factors to be involved in the mitochondrial function. After irradiation, conditioned medium containing secreted factors was transferred to another unirradiated cell and analyzed effects of these cells. We found the stimulation of permeability of mitochondrial membrane, which results in the reduction of the mitochondrial function, increase of reactive oxygen species, and gene mutation. These responses were suppressed by the treatment of ascorbic acid. In U251 cells but not MCF-7 cells, cells became radioresistant by the treatment of conditioned medium from irradiated cells. We concluded that the effects of secreted factors from irradiated cells can modulate mitochondrial function and this effect results in the change to the responses against further irradiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学 バイスタンダー効果 ミトコンドリア 活性酸素 アスコルビン酸 SOD2

1. 研究開始当初の背景

これまでに、放射線照射細胞から分泌される「放射線誘発分泌性因子」が、「バスターンダー効果」として周囲の細胞へ影響を及ぼすことを明らかにしてきた。一方、放射線抵抗性の獲得にはミトコンドリアからの活性酸素種や抗酸化機能の亢進が関与することが示唆されている。そこで、放射線誘発分泌性因子がミトコンドリアの機能を変化させる機構、及びそれに引き続く放射線抵抗性の獲得機構を解明したい。この機構は、繰り返し照射における放射線抵抗性の原因である可能性が高く、本研究を進展させることにより、治療効果の改善が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 放射線照射された培養細胞株の培養上清に含まれる成分を別に用意した非照射細胞へ処理した際、ミトコンドリアの機能変化、活性酸素種の生成、またはゲノム不安定性が誘発されるか否かを明らかにすること、その機構の解明を目的とした。

(2) 放射線照射された培養細胞株の培養上清に含まれる成分を別に用意した非照射細胞へ処理した際、放射線抵抗性を獲得するか否かを明らかにし、その機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 放射線誘発分泌性因子の影響を見るため、メディウムトランスファー法を利用した。この手法により、CHO (チャイニーズハムスター由来細胞) に 4 Gy を照射後の培養上清を回収し、別に用意した非照射 CHO 細胞へ処理し、その後のミトコンドリア機能の変化を調べた。ミトコンドリアの機能は、膜電位測定 (JC-1 による蛍光強度の測定)、ミトコンドリア内 O₂-レベルの測定 (MitoxRed による蛍光強度の測定)、ミトコンドリア膜透過性の変化 (カルセイン AM 法) により調べた。また、この細胞へミトコンドリア局在型スーパーオキシド消去酵素 (SOD2) を導入した細胞を作成し、ミトコンドリア機能変化におけるスーパーオキシドの関与を調べた。さらにこれらの手法を用いて、アスコルビン酸による抗酸化能が同処理によるミトコンドリア機能変化を抑制するか否かを調べた。

(2) ヒト由来がん細胞 (子宮頸癌細胞 HeLa、グリオーマ細胞 U251、乳がん細胞株 MCF7) で分泌性因子がミトコンドリア機能に影響を及ぼすか否かを確認した。放射線照射されたこれらの細胞を 3~4 日間培養後、培養上清を別の非照射細胞へ 24 時間処理し、細胞数測定により増殖能の変化を調べた。また、同処理細胞において線照射に対する生存率

が対照と比較して高くなるか否かをコロニー形成法で調べた。分泌性因子により代謝変化が誘発されていることを分子レベルで確認するため、AMP dependent kinase (AMPK) の Thr172 のリン酸化を Western blot で調べた。

4. 研究成果

(1) 線照射 24 時間後、CHO 細胞の培養上清を回収し、別の CHO 細胞へ処理したところ、対照 (未照射 CHO の培養上清処理) に比べてミトコンドリア膜電位の低下が認められた。また、ミトコンドリア膜透過性の亢進も認められ、照射細胞に含まれる分泌性因子によりミトコンドリア機能に影響が及ぼされることが分かった。ミトコンドリア内スーパーオキシドの量も増加したことから、ミトコンドリア機能低下により、細胞内活性酸素が増加することが明らかとなった。照射細胞由来分泌性因子を処理した CHO 細胞において、*HPRT* 遺伝子の突然変異頻度が高くなることが過去の研究でわかっている。そこで、SOD2 を過剰発現した CHO 細胞を用いて調べたところ、この細胞では照射由来分泌性因子による突然変異誘導が抑制されることがわかった。このことから、放射線照射による突然変異誘発は分泌性因子の放出、それが作用した細胞におけるミトコンドリア機能の変化を介して活性酸素が生成し、その影響が核内へ及ぼされ、結果として突然変異が生じると考えられる。さらに、アスコルビン酸はミトコンドリアへ効率よく取り込まれ抗酸化能を発揮することから、分泌性因子によるミトコンドリアへの影響がアスコルビン酸処理により抑制されるか否かを調べた。その結果、アスコルビン酸処理により、分泌性因子によるミトコンドリア機能の変化や *HPRT* 遺伝子突然変異誘発は抑制された。アスコルビン酸によるミトコンドリア膜透過性を調べたところ、アスコルビン酸単独で膜透過性は亢進し、膜電位が低下することが分かった。これはアスコルビン酸がミトコンドリア内のプロトン勾配を消失させることによると考えられ、アスコルビン酸の抗酸化作用は単にラジカル消去のみならず、ミトコンドリア機能を抑制することによりもたらされる可能性が示唆された。以上の結果より、放射線照射により生成する分泌性因子の作用はミトコンドリア機能低下をもたらす、活性酸素の生成を通じて、核内の遺伝子突然変異の誘発につながるという機構が明らかとなった。

(2) 放射線照射後の培養上清を照射 4 日後に非照射細胞へ 24 時間処理したところ、U251 においては対照 (未照射培養上清処理) に比べて約 1.2 倍増殖能が高くなることがわかった (図 1)。しかし、この現象は MCF7 では全く見られなかった (図 1)。用いた細胞種毎に代謝経路のバランスは異なるため、照射後の

代謝経路のバランスの変化も細胞種毎に異なり、分泌性因子の質的な違いがある可能性を示唆している。

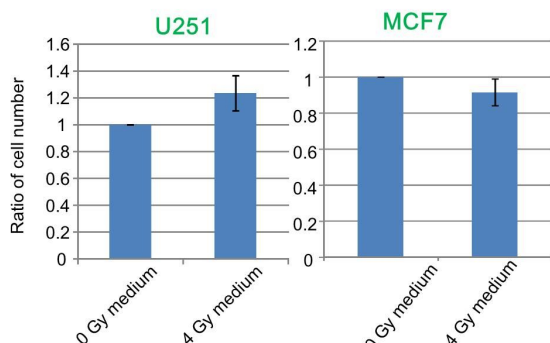


図1 照射4日後の培地を回収し、24時間処理した細胞における細胞数の相対値

また、同処理後、放射線 8 Gy を照射し生存率を調べたところ、U251 において、生存率が対照に比べて有意に高くなることが分かった(図 2)。このことは、照射由来分泌性因子の作用により、放射線抵抗性が獲得したことを表している。CHO を用いた上述(1)の研究結果において、照射由来分泌性因子はミトコンドリアの機能変化をもたらしている

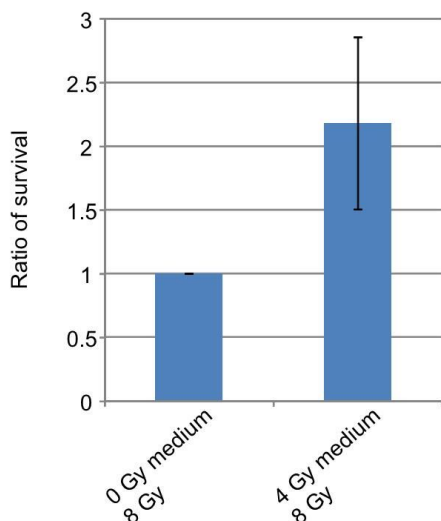


図2 照射4日後の培地を回収し、24時間処理した細胞における8Gy照射後の生存率

ことが分かった。このことから、ミトコンドリア依存的なエネルギー産生を低下させ、代替経路によるエネルギー産生が亢進している可能性が考えられる。従って、放射線により生じる分泌性因子の作用により放射線抵抗性が獲得する機構は、代謝経路の変化が関与する可能性が示唆される。その点を確認するため、細胞内 AMP をセンサーとするキナーゼである AMPK の活性化が照射由来分泌性因子により変化するか否かを調べたところ、Thr172 のリン酸化はほとんど変化しなかった。微細な変化である可能性もあるので、今後さらなる検討が必要であると考えている。

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)

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

2. Kashino G, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M, Prise K. Increased susceptibility to delayed genetic effects of low dose X-irradiation in DNA repair deficient cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 89:295-300, 2013 (査読有)

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

4. Nishiura H, Kumagai J, Kashino G, Okada T, Tano K, Watanabe M. The Bystander Effect is a Novel Mechanism of UVA-Induced Melanogenesis. *Photochem. Photobiol.* 88:389-397, 2012 (査読有)

[学会発表](計 4 件)

1. Genro Kashino, Jun Kumagai, Hiromu Mori Mitochondrial modulation in radiation induced bystander effect in human cells, 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌・ホテルロイトン札幌

2. 菓子野元郎、堂原一将、森宣 ¹⁸F-フルオロデオキシグルコース処理細胞における放射線影響評価、日本放射線影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 8 日、仙台・東北大学川内北キャンパス

3. 菓子野元郎、堂原一将、森宣 ¹⁸F-フルオロデオキシグルコース(¹⁸F-FDG)処理細胞における生物学的影響評価、第 52 回日本核医学会学術総会、2012 年 10 月 12 日、札幌・ホテルロイトン札幌

4. Genro Kashino, Keiko Morikawa, Hiromu Mori Mechanism of the radiosensitization induced by gemcitabine in pancreatic cancer cells, 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、横浜・パシフィコ横浜

5. 菓子野元郎、林和孝、堂原一将、小橋川新子、森宣 フッ素 18 の細胞内取り込みレベルと被ばく影響の評価、日本放射線影響学

会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日、青森・
ホテルクラウンパレス青森

6. 菓子野元郎、林和孝、堂原一将、小橋川
新子、森宣、PET 薬剤の細胞内取り込みレベ
ルと被ばく影響の解析、第 53 回日本核医学
会学術総会、2013 年 11 月 8 日、福岡・福岡
国際会議場

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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.med.oita-u.ac.jp/imaging/>

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：