

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K12207

研究課題名(和文) 低線量放射線が誘発する上皮間葉転換のメカニズム研究による被ばくリスク評価

研究課題名(英文) Low-dose radiation risk assessment through investigating the mechanisms of low-dose radiation induced EMT

研究代表者

神谷 研二 (Kamiya, Kenji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：60116564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低線量被ばくのリスクは全人類の解明すべき課題である。低線量被ばくでは、TGF を介した上皮間葉転換(EMT)が促進される事が報告されている。EMTは発生などに加え、そのシグナルが腫瘍化に關与する重要な生命現象である。そこで、低線量被ばくのリスクを明らかにするために、本研究では低LET放射線による生物作用の主因である活性酸素種により、TGF を介したEMTが促進される可能性を検討した。その結果、過酸化水素処理により、TGF を介したEMTの促進現象が観察された。以上のことから、低線量被ばくによるTGF を介したEMT促進現象では、活性酸素種が重要な役割を演じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Estimating the risk of low-dose radiation is the important issue for humans. It has been reported that low-dose radiation exposure facilitated transforming growth factor (TGF-) mediated Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT). EMT, which are involved in many important biological process, is also known to be involved in tumorigenesis. To better understand the risks by low dose radiation exposure, we investigated whether reactive oxygen species (ROS) can facilitate TGF- mediated EMT. We observed that hydrogen peroxide could facilitate TGF- mediated EMT. These results suggested that ROS played an important role in the facilitation of TGF- mediated EMT by low-dose radiation exposure.

研究分野：放射線生物学

キーワード：上皮間葉転換 低線量放射線 腫瘍増殖因子(TGF-beta) 過酸化水素

1. 研究開始当初の背景

2011年に発生した東京電力福島第一原子力発電所事故を契機に、改めて低線量放射線のリスクは日本国民のみならず全人類の解明すべき課題であることが再認識された。低線量放射線のリスクは原爆被爆者の疫学調査でも統計学的な有意差は示されておらず、高線量でのリスクを外挿する形で求められている。近年、次世代シーケンサやハイスループットイメージアナライザーなどの分子生物学的解析技術の進歩により、遺伝子発現変化などの、これまでに観察されなかった、ごく低線量の放射線被ばくによる影響の検出が可能となった。これらのことから、100 mSv以下の低線量被ばくでは、明らかな臨床症状は引き起こされないが、生体内では様々な変化が引き起こされていることが明らかにされている。従って、低線量被ばくのリスクを明らかにするためには、このような低線量放射線被ばくで引き起こされる現象の発生メカニズムを明らかにすることが必要である。

低線量放射線被ばくで引き起こされる現象の中で、腫瘍増殖因子 (TGF-beta) を介した上皮間葉転換 (EMT) が促進される事が報告されている (Andarawewa KL et al., Cancer Res., 2007, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2011)。EMT が関与する現象は、発生期、線維症や創傷治癒、がん転移の3種類に分類され、生命現象の重要な地位を占めている。これらの重要な役割に加え、特に最近、EMT を引き起こすシグナル (Snail, Slug, Twist 遺伝子等の活性化) が脱分化と呼ばれる細胞の可塑性を促進し、さらにがん抑制遺伝子 p53 経路を負に調節する作用などにより、がん発生過程にも深く関与する事が報告されている (Puisieux A et al., 2014)。しかしながら、低線量放射線被ばくで促進される TGF-beta を介した EMT のメカニズムについては不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では低線量被ばくによるリスクを解明することを目標に、低線量放射線で促進される生命現象の一つである EMT のメカニズムを明らかにすることを目的としている。ガンマ線などの低 LET 放射線による生物作用の主因は、水の放射線分解で発生する活性酸素種であると理解されていることから、活性酸素種の一員である過酸化水素を用いた TGF-beta を介した EMT が促進される可能性を検討した。そして EMT を引き起こすシグナル分子の動態ならびに脱分化についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 過酸化水素による TGF-beta を介した EMT 促進現象の検討

ガンマ線などの低 LET 放射線の主要な作用因子である活性酸素種による間接作用が本

現象を引き起こすと仮定し、過酸化水素でも同様の現象を引き起こすか検討する。本実験系は Andarawewa らの方法に従う (Cancer Res. 2007)。具体的には不死化した乳腺上皮細胞株 MCF-10A に対し、過酸化水素処理を1時間行い、組換えヒト TGF-beta1 を 50 pg/ml から 400 pg/ml の濃度で作用させる。TGF-beta を含む培養液を 48 時間ごとに交換し、細胞がコンフルエントになるまで培養する (6 日程度)。EMT の評価は上皮マーカーとして知られている E-cadherin の損失により行う。

(2) 過酸化水素による TGF-beta を介した EMT 促進現象における catalase 等の作用の検討

過酸化水素による TGF-beta を介した EMT 促進現象に対し、種々の抗酸化物質を用いることで、細胞内外での活性酸素の除去がどのように作用するか、検討する。具体的には細胞外で作用する catalase や細胞内外で作用する N-acetyl-L-cysteine などを用いる。

(3) 本現象のメカニズムとその意義の検討

TGF-beta による EMT では Smad 経路が重要な役割を演じていることがよく知られている。一方で、Smad 経路を介さず、別の因子が関係することも知られている。これまで前述の Andarawewa らの報告では Erk シグナルの重要性が示唆されているが、ほとんど明らかになっていない。また、前述の通り EMT は幹細胞の自己複製や脱分化とも関連があると言われており、TGF-beta を介した EMT を放射線が促進することは、幹細胞の動態にも影響があると示唆される。乳腺は luminal と basal の二種類の分化した乳腺上皮細胞からなっている。それぞれ cytokeratin18 (CK18) と cytokeratin14 (CK14) を発現している。CK14 と CK18 の共局在は多能性の前駆細胞を示すものとして報告 (Villadsen R et al., 2007) されていることから、これらのマーカーを用いて検討を行い、その分布への影響を検討する。

4. 研究成果

過酸化水素 100~250 microM の濃度で1時間、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10A 細胞に処理した後、細胞を播種しなおし、TGF-beta (10~400 pg/ml) を含む培養液で培養した。約1週間後、E-cadherin や N-cadherin などを用いた蛍光免疫染色を行った。その結果、TGF-beta 存在下での過酸化水素処理でも放射線と同様に、不溶性 E-cadherin の減少と N-cadherin の増加が観察された。この過酸化水素による TGF-beta を介した EMT 促進は catalase 処理により完全に抑制されたが、N-acetyl-L-cysteine ではその効果が観察されなかった。過酸化水素による TGF-beta を介した EMT の促進現象の分子メカニズムを明らかにするために、EMT に関与することが報告されているタンパク質についてウエスタンブロット法で検出を行った。その結果、Smad 経路の活性化は明確には確認されなかった。Smad 経路に依存しない EMT の経路があ

ることが報告されていることから、今後、これらについて検討する必要があると考えられる。CK14 ならびに CK18 の発現を蛍光免疫染色で観察したところ、TGF-beta 存在下で過酸化水素処理を行う群で共局在する細胞が増加することが示唆された。

これらのことから、低線量放射線による TGF-beta を介した EMT 促進現象では、活性酸素種が重要な役割を演じていることが示唆された。今後、さらに詳細な分子メカニズムを検討する予定である。

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7件)

1. 曹麗麗, 河合秀彦, 稲葉俊哉, 鈴木文男, 神谷研二: 線照射環境での細胞運命決定とその制御因子の同定. 広島医学, 査読有, in press.
2. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺への影響とそのメカニズムについて. 広島医学, 査読有, in press.
3. Iizuka, D., Yoshioka, S., Kawai, H., Okazaki, E., Kiriyama, K., Izumi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Kamiya, K., Suzuki, F.: Hecpudin-2 in mouse urine as a candidate radiation-responsive molecule. J. Radiat. Res., 査読有, 57, 2016, 142-9. doi: 10.1093/jrr/rrv098. Epub 2016 Jan 28.
4. 神谷研二: 放射線の人体への影響について~3.11からの福島の状態をふまえて. 福山医学, 査読有, 22, 2015, 1-9.
5. Abe, Y., Miura, T., Yoshida, M., Ujiie, R., Kurosu, Y., Kato, N., Katafuchi, A., Tsuyama, N., Ohba, T., Inamasu, T., Shishido, F., Noji, H., Ogawa, K., Yokouchi, H., Kanazawa, K., Ishida, T., Muto, S., Ohsugi, J., Suzuki, H., Ishikawa, T., Kamiya, K., Sakai, A.: Increase in dicentric chromosome formation after a single CT scan in adults. Sci. Rep., 査読有, 5, 2015, 13882. doi: 10.1038/srep13882.
6. Kamiya, K., Ozasa, K., Akiba, S., Niwa, O., Kodama, K., Takamura, N., Zaharieva, E.K., Kimura, Y., Wakeford, R.: Long-term effects of radiation exposure on health. Lancet, 査読有, 386, 2015, 469-478. doi: 10.1016/S0140-6736(15)61167-9.
7. Tsuyama, N., Mizuno, H., Katafuchi, A., Abe, Y., Kurosu, Y., Yoshida, M., Kamiya, K., Sakai, A.: Identification of low-dose responsive metabolites in X-irradiated human B lymphoblastoid cells and fibroblasts. J. Radiat. Res,

査読有, 56, 2015, 46-58. doi: 10.1093/jrr/rru078.

[学会発表](計13件)

1. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 過酸化水素による TGF-beta を介した EMT 促進現象とそのメカニズムについて. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会(BMB2015), 2015.12.1, 神戸ポートアイランド(神戸).
2. 河合秀彦, 曹麗麗, 金井昭教, 稲葉俊哉, 神谷研二, 鈴木文男: ハイスループット解析技術による放射線照射環境での細胞応答の研究. 第 1 回放射線ワークショップ「未来に繋ぐ放射線研究」, 2015.10.17, 富山大学黒田講堂(富山).
3. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量被ばくで増加する乳腺幹細胞頻度の系統差とそのメカニズム. 第 1 回放射線ワークショップ「未来に繋ぐ放射線研究」, 富山, 2015.10.16, 富山大学黒田講堂(富山).
4. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 放射線を受けた乳腺における幹細胞の動態は系統により異なる. 第 158 回日本獣医学会, 2015.9.7, 北里大学(十和田).
5. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺幹細胞頻度増加の系統差. 第 24 回乳癌基礎研究会, 2015.9.5, スパリゾートハワイアンズ(いわき).
6. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺幹細胞頻度への影響解析. 第 40 回中国地区放射線影響研究会, 2015.7.17, 広島大学(広島).
7. 神谷研二: 特別講演 5 福島原発事故と低線量放射線の健康影響. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 2015.6.30, 石川県立音楽堂(金沢).
8. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺への影響とそのメカニズムについて. 第 56 回原子爆弾後障害研究会, 2015.6.7, 広島国際会議場(広島).
9. 曹麗麗, 河合秀彦, 稲葉俊哉, 鈴木文男, 神谷研二: 線照射環境での細胞運命決定とその制御因子の同定. 2015.6.7, 広島国際会議場(広島).
10. Cao L, Kawai H, Inaba T, Suzuki F, Kamiya K: The function of Chromatin Remodeling Complexes in Cell-fate Decision in Response to Chronic Ionizing Irradiation. 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.28, Kyoto International Conference Center (Kyoto).
11. Kawai H, Cao L, Shimizu N, Matsui H,

- Kanai A, Hirouchi T, Inaba T, Kamiya K, Suzuki F.: An Integrated Approach Using High-throughput Sequencing and Imaging Technologies to the Study of Cellular Responses to Low Dose Radiation. 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.28, Kyoto International Conference Center (Kyoto).
12. Iizuka D, Sasatani M, Barcellos-Hoff M.H., Kamiya K.: The Strain-dependence of the Increase of Mammary Stem Cell Self-renewal by Radiation Exposure. 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.28, Kyoto International Conference Center (Kyoto).
13. Kamiya, K.: ICRR Special Lecture; Health Effects of the Fukushima Nuclear Accident and Research on Low Dose Radiation. 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.27, Kyoto International Conference Center (Kyoto).

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/bunshi12/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 研二 (KAMIYA KENJI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：60116564

(2) 研究分担者

飯塚 大輔 (IIZUKA DAISUKE)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：00455388

笹谷 めぐみ (豊島めぐみ) (SASATANI MEGUMI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：80423052