

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12220

研究課題名(和文) 低容量の慢性ストレスによる細胞内シグナル経路制御破綻の機構解明

研究課題名(英文) Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low-dose irradiated human fibroblasts

研究代表者

志村 勉 (Shimura, Tsutomu)

国立保健医療科学院・その他部局等・首席主任研究官

研究者番号：40463799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの解析から、長期の放射線照射では、ミトコンドリア由来の活性酸素による酸化ストレスの影響が大きいことを報告している。本研究では、活性酸素の標的酵素の一つとしてAKTの脱リン酸化酵素protein phosphatase 2A(PP2A)を同定し、放射線によるAKT恒常的活性化の原因であることを明らかにした。AKT恒常的活性化は、AKT経路の下流の細胞周期制御因子サイクリンD1の発現を亢進する。サイクリンD1の発現異常は、DNA複製阻害によるDNA損傷の形成で、ゲノム不安定性を誘導する。以上より、放射線によるゲノム不安定性誘導に関わるAKT/サイクリンD1経路異常の分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of repeated exposure to low-dose radiation in normal human fibroblasts. Long-term low dose fractionated radiation (FR) with 0.01 Gy/fraction or 0.05 Gy/fraction for 31 days caused persistent accumulation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS). Excess ROS promoted oxidative inactivation of protein phosphatase PP2A which in turn led to disruption of normal negative feed-back control of AKT/cyclin D1 signaling in cells treated with long-term FR. The resulting abnormal nuclear accumulation of cyclin D1 causes growth retardation, cellular senescence and genome instability in low-dose irradiated cells. The antioxidants provided protection against the harmful cell cycle perturbations induced by low-dose long-term FR. Our study highlights a specific role of mitochondrial ROS in perturbation of AKT/cyclin D1 cell cycle signaling after low-dose long-term FR.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ミトコンドリア 活性酸素 低線量放射線 サイクリンD1 AKT

1. 研究開始当初の背景

福島原発事故以降、人の放射線影響の社会的関心は高く、低線量・低線量率放射線被ばくによる健康への影響解明が求められている。これまで、広島・長崎原爆被爆者、チェルノブイリ原発事故被災者、高自然放射線地域の住民の疫学調査により、ヒトの放射線影響に関する重要な科学的知見が提供されている。しかし、低線量・低線量率の放射線影響については未解明な部分が多く、特に、長期間の放射線被ばくの影響については、その評価の元となるデータ自体が乏しいのが現状である。

我々はこれまでヒトがん細胞を用いて、1月間の長期放射線による細胞応答を解析し、細胞の生存に関わる AKT 経路の恒常的活性化と下流の細胞周期制御因子サイクリン D1 の発現亢進が、放射線治療で問題となるがん細胞の放射線耐性に関わることを明らかにした (Shimura et al. *Oncogene* 2010, 29:4826-4837)。このサイクリン D1 の発現亢進は長期低線量放射線照射したヒト正常細胞においても再現性良く観察された (Shimura et al. *Cell Cycle* 2014, 13:1248-1255)。サイクリン D1 は、DNA 合成期(S 期)に発現が低下する。しかし、長期放射線を照射した細胞では、S 期においてもサイクリン D1 の発現が観察され、DNA 複製を阻害し、DNA 損傷を誘導する (Shimura et al. *Cell Cycle* 2013, 12(5):773-782)。サイクリン D1 による DNA 損傷は、放射線によるゲノム不安定性の誘導に関与することが考えられる。以上のことから、長期放射線被ばく影響を理解する上で、AKT/サイクリン D1 シグナル経路の制御異常の分子機構の解明が重要であると考えられる。

活性酸素は、放射線照射直後や遅延的にミトコンドリアから活性酸素が増加することが知られている。活性酸素は、シグナル物質としての働きを持ち、細胞内のシグナル経路を制御している。一方、過剰な活性酸素は、脂質、タンパク質、DNA を酸化し、酸化ストレスを誘導し、発がん、老化、様々な疾病(糖尿病、メタボリックシンドローム、心疾患、神経疾患など)の原因となる。AKT の脱リン酸化酵素 protein phosphatase 2A(PP2A)は、活性酸素により活性化部位のシステイン残基が酸化され不活性化される。このため、PP2A が活性酸素の標的分子で、活性酸素による PP2A の不活性化で AKT の負の制御機構が働かないことが、AKT 恒常的活性化の原因であることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、長期放射線被ばくの影響を理解するため、AKT-サイクリン D1 シグナル経路異常の分子機構や放射線による酸化ストレスの生物影響の解明に取り組んだ。放射線による PP2A への影響を解析し、AKT の恒常的活性化に、PP2A が関与するかどうか

かを検討した。放射線照射後の酸化ストレスについて、ミトコンドリアによる活性酸素の生成と PP2A の酸化不活性化について解析を行った。以上により、AKT-サイクリン D1 シグナル経路に焦点をあて放射線照射後の初期過程の分子レベルの変化を捉え、放射線影響を予測する新たな評価の指標の同定と放射線影響の高感度検出に取り組んだ。

3. 研究の方法

3-1. 用いた細胞

ヒト胎児肺由来二倍体繊維芽細胞 (MRC-5, TIG-3) は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団から購入し、フラスコ内で、 α -MEM にウシ胎児血清を加えた培養液中で、培養した。

3-2. X 線照射

日立製 150-kVp X-ray generator (Model MBR-1505R2) で 0.5 mm Cu+0.1 mm Al フィルターを用いて、線量率 0.7 Gy/min で細胞に照射する。分割照射のスケジュールは 1 回あたり 0.01 Gy、または 0.05 Gy の X 線を 1 日 2 回、1 週間に 5 日のスケジュールで 31 日間、それぞれ総線量 0.46 Gy と 2.3 Gy を照射した。

3-3. 活性酸素の測定

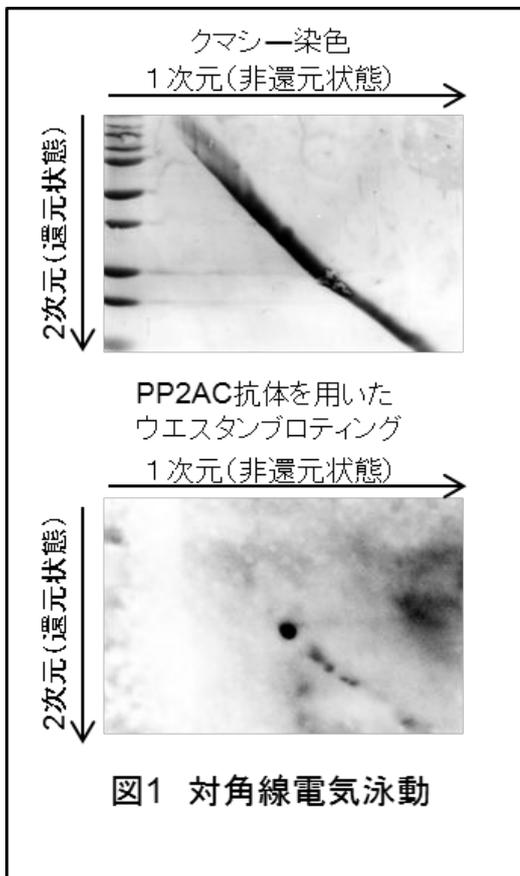
細胞内の活性酸素量を還元型 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) で染色し、活性酸素で酸化され蛍光を発する陽性細胞をフローサイトメーターで定量した。ミトコンドリアから発生するスーパーオキシド (O_2^-) を生細胞浸透性で、ミトコンドリアへの選択性を持つ MitoSOX™ Red 試薬で染色し、フローサイトメーターで定量した。

3-4. 放射線による AKT 恒常的活性化の分子機構の解析

PP2A の活性を、市販の PP2A detection kit を用いて、以下の方法で測定した。細胞の抽出液から PP2A 抗体で免疫沈降により PP2A タンパクを回収した。PP2A によって、合成ペプチドから遊離したリン酸の量をマイクロプレートリーダーで 620nm の吸収波長を測定し、PP2A の酵素活性を定量した。放射線により、PP2A の活性が低下するかどうかを検討した。

3-5. 2次元電気泳動を用いた分子間ジスルフィド架橋の検出

1 次元目を非還元状態、2 次元目を還元状態で、電気泳動し、PP2A の抗体を用いたウェスタンブロッティング法により PP2A 内のシステイン残基のジスルフィド架橋を解析し、PP2A の酸化を検出した (図 1)。



3-6. ミトコンドリア酸化損傷の検出
 ミトコンドリア DNA(mtDNA)を精製した後、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で DNA 酸化損傷指標である 8-oxoguanosine (8-OHdG)の量を定量した。もう一つの酸化損傷の指標である脱塩基部位 AP (apurinic/aprimidinic) site は、Nucleostain DNA damage quantification kit を用いて、定量した。
 膜電位の低下した機能不全のミトコンドリアは、parkin により標識され、選択的に分解される。このミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーにより、ミトコンドリアの質が保たれている。膜電位に依存して染色されるミトコンドリア染色試薬 MitoTraker Deep Red と parkin の二重染色で、健康なミトコンドリアと損傷を持つミトコンドリアをそれぞれ検出した。

3-7. AKT 恒常的活性化による生物影響の解析
 多くのがん細胞で AKT 経路の活性化が観察され、AKT の制御異常が発がんに関わることが知られている。長期放射線照射による AKT 恒常的活性化が正常細胞に及ぼす生物影響を、細胞増殖、微小核の形成、細胞死、細胞老化を指標に検討した。細胞死の解析は、アネキシン V 染色でアポトーシスの細胞を検出し、フローサイトメーターを用いて、陽性細胞を定量した。細胞老化は、Bio Vision 社 Senescence Detection Kit を用いて、

β -galactosidase (SA- β -Gal) 活性を指標に、老化細胞を組織化学的に検出した。

4. 研究成果

これまでのヒト正常線維芽細胞を用いた解析から、1か月の低線量放射線で、DNA 損傷と DNA 修復の指標である γ -H2AX と Rad51 のフォーカス形成が観察され、慢性的に DNA 損傷応答が誘導される。さらに、損傷応答に必要なエネルギーを供給するため、エネルギー生産の副産物としてミトコンドリアから持続的に活性酸素が発生することを明らかにした (Shimura et.al. Oncotarget 7 (3):3559-70, 2016)。活性酸素は、細胞内の抗酸化物質グルタチオンを消費し、長期放射線照射後にグルタチオン量が減少する。このため、細胞内の酸化還元(レドックス)制御機構が破綻し、長期低線量放射線照射細胞では、活性酸素の蓄積による酸化ストレスを誘導する (Shimura et.al. Oncotarget 7 (3):3559-70, 2016)。放射線による O_2 の増加は、近傍に存在するミトコンドリアを酸化し、照射細胞のミトコンドリアに酸化損傷を誘導すると考えられる。mtDNA の酸化損傷については、DNA の酸化損傷の指標である脱塩基部位と 8-oxoguanosine (8-OHdG)の量を測定して検討した。非照射細胞の mtDNA と比較して分割照射した細胞の mtDNA に脱塩基部位と 8-OHdG の量の増加が観察された。健康なミトコンドリアを MitoTraker Deep Red で、膜電位が低下したミトコンドリアを parkin でそれぞれ区別して検出し、放射線によるミトコンドリア酸化損傷の程度を検討した (図 2)。

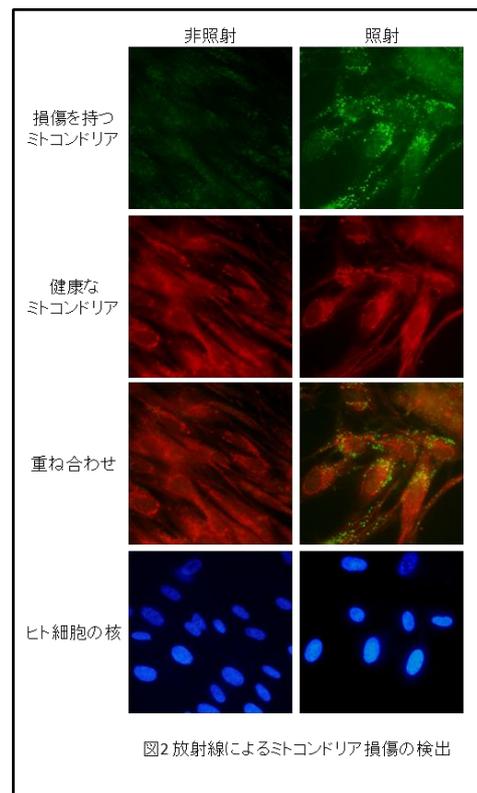


図2 放射線によるミトコンドリア損傷の検出

さらに、活性酸素の標的酵素として、PP2Aを同定した。活性酸素はPP2Aの活性化部位のシステイン残基を酸化し、不活性化する。このため、AKTの負の制御機構が機能せず、AKTが恒常的に活性化する。AKTシグナル経路の下流のサイクリンD1の分解が抑制される。サイクリンD1の発現異常は、DNA複製阻害を介したDNA損傷を誘導し、細胞老化やゲノム不安定性の誘導に関与する。抗酸化剤N-アセチルシステインを用いて、放射線照射後のPP2Aの不活性化とAKTの恒常的活性化を抑制することが可能である。以上のことから抗酸化剤は、放射線防護に役立つと考えられる。

これまで、低容量の慢性ストレスに対する細胞応答は、バックグラウンドのストレスの影響や反応が小さいことから、解析が困難であった。今後は、AKT経路の制御異常を指標に、低線量長期放射線による被ばく影響を高感度に検出し、放射線による健康影響の解明が期待される。また、活性酸素の発生源であるミトコンドリアは、酸化ストレスによる損傷を受けることが予想される。酸化ストレスによるミトコンドリア機能低下を検討し、長期低線量放射線影響を検討する必要がある。

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10件)

1. Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle* 16(6):565-573, 2017.
2. Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva EK, Kamiya K. Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level. *Carcinogenesis*. 38(5):570-578, 2017
3. Shimura T. Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2016 Dec 2:1-5.
4. Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Severe mitochondrial damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells. *Cell Cycle* 15(8):1099-1107, 2016
5. Shimura T, Kunugita N. Mitochondrial

reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1 *Cell Cycle* 15(11):1410-1414, 2016.

6. Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low-dose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget* 7 (3):3559-70, 2016
7. Kume K, Ishida K, Ikeda M, Takemoto K, Shimura T, Young L, Nishizuka SS. Systematic protein level regulation via degradation machinery induced by genotoxic drugs. *Journal of Proteome Research* 15(1):205-15, 2016.
8. Shimura T, Yamaguchi I, Terada H, Yunokawa T, Svendsen E.R., Kunugita N. Efficiency of excess monitoring for beef after the Fukushima accident. *Food Safety* 3:84-91, 2015.
9. Akita M, Tak YS, Shimura T, Matsumoto S, Okuda-Shimizu Y, Shimizu Y, Nishi R, Saitoh H, Iwai S, Mori T, Ikura T, Sakai W, Hanaoka F, Sugawara K. SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Scientific Reports*. 4;5:10984. doi: 10.1038/srep10984, 2015.
10. Fu H, Martin M, Regairaz M, Huang L, You Y, Lin C, Ryan M, Kim R, Shimura T, Pommier Y, Aladjem M. The DNA repair endonuclease Mus81 facilitates fast DNA replication in the absence of exogenous damage. *Nature Communications* doi:10.1038/ncomms7746, 2015.

[学会発表](計4件)

1. Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K and Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. The 1st international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science –Scientific underpinning for restoration from a radiation disaster; 2017.2. p.59.
2. Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Mitochondrial DNA damage responses in ATM- and NBS1-deficient cells. 第59回日本放射線影響学会; 2016.10. P.23
3. 志村 勉、笹谷 めぐみ、河合 秀彦、神谷 研二、櫻田 尚樹. 低線量長期放射線照射におけるミトコンドリア由来活性酸素の蓄積と酸化ストレスによる細胞周期制御機構への影響. 第59回日本放射線影響学会; 2016.10. P.24
4. Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. DNA damage signaling

guards against perturbation of cyclin D1 expression by low-dose long-term fractionated radiation. 15th International congress of radiation research; 2015.5.25-29. P.175.

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

志村 勉 (SHIMURA Tsutomu)

国立保健医療科学院・生活環境研究部・上席

主任研究官

研究者番号：40463799