

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K16131

研究課題名(和文)放射線誘発オートファジーによる細胞死回避システムの解明

研究課題名(英文)Clarification of cell death avoidance system by radiation-induced autophagy

研究代表者

野口 実穂(Noguchi, Miho)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・主幹研究員(定常)

研究者番号：40455283

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)：放射線照射を受けた細胞では損傷タンパク質や細胞小器官の蓄積により生理機能が阻害されアポトーシスが誘導されることを防ぐため、オートファジーを活性化させているのではないかと仮定し、その解明に向けて様々な実験を行ってきた。20GyのX線を照射されたヒト線維芽細胞は照射8日目にはほぼすべての細胞で老化することが分かった。また、照射後のLC3-IIタンパク質の発現量からオートファジー活性も上昇することが分かった。このことから、照射で生じた損傷タンパク質や細胞小器官はオートファジーにより除去され、オートファジーが細胞の生理的機能の維持に大きな役割を担っていることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は細胞死による組織の縮小や発ガンを回避することが可能である一方、様々な加齢性疾患と関係があることが近年明らかになってきている。しかし、放射線治療を主眼とした放射線の細胞影響は主に細胞分裂能の喪失により評価されてきたことから、放射線照射を受けた細胞が細胞分裂能は喪失したものの老化して生存している場合の細胞の機能的評価ははまだ少ない現状にある。放射線誘発老化細胞は放射線治療後の晩期障害の発生とも大いに関係すると考えられる。そのため、放射線誘発老化細胞の生理機能の一つとして、オートファジーの活性について明らかにした成果は学術的、社会的に大きく貢献できる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that in irradiated cells, autophagy may be activated to avoid induction of apoptosis triggered by accumulation of the damaged proteins and dysfunctional organelles. Therefore, we investigated activity of autophagy in normal human diploid cells, hTERT BJ-5ta cells, exposed to 20 Gy X-rays. We found that irradiated cells gradually induced senescence and almost of those cells showed senescent state at 8 days post-irradiation. We also found that activity of autophagy was increased in response to X-irradiation from the results of LC3-II levels. These results suggested that induction of autophagy after irradiation may be involved in the elimination of damaged proteins and organelles.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 老化 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が放射線を浴びるとDNAだけでなくタンパク質や細胞小器官も損傷を負う。近年、照射により増殖能は失ったがアポトーシスを免れ固体中で“生存”し続ける細胞が多数存在することが明らかになり、このような細胞では照射によって生じた異常タンパク質や機能低下した細胞小器官が細胞自身の生存に大きな影響を与えると推測される。機能低下した細胞小器官や異常タンパク質の蓄積は細胞の機能を阻害して後発的なアポトーシスを誘導する可能性がある。アポトーシスによる細胞の除去は組織の物理的なサイズの縮小を意味しており、生体にはこのような危機的状況を回避するためのなんらかのシステムが存在するはずである。

本研究では、放射線照射により生じた異常なタンパク質や細胞小器官を除去するために「細胞内浄化システム」の活性が亢進し、アポトーシスが回避されているのではないかと考え、凝集したタンパク質や細胞小器官などの細胞質成分を含めて分解することができるオートファジーに着目した。オートファジーが異常タンパク質や機能低下した細胞小器官の蓄積によるアポトーシスを回避するための役割を担っていると仮定し、オートファジーの活性が放射線照射によりどのように変化し、どのようにアポトーシスの回避に働いているのかを明らかにすることを目指す。

2. 研究の目的

オートファジーが放射線照射を受けた細胞を生存させるために、どのような役割をはたしているのかについて明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではすべての実験でヒト不死化線維芽細胞 hTERT BJ5-ta 細胞 (以下 BJ-5ta 細胞) を使用し、X線 20Gy (線量率 1Gy/min) を照射後、測定時間までインキュベーター内 (37℃、5%CO₂) で培養した。

(1) 放射線照射による細胞増殖の停止、および老化誘導の確認実験

Edu 取り込み実験

Edu はチミジンの類似体で S 期の細胞に取り込まれる。放射線照射後の BJ-5ta 細胞を Edu 含有培地で培養し、Edu を取り込んだ細胞を適当時間ごとに蛍光顕微鏡にて観察し、経時的な Edu の取り込み量の変化を調べた。

SA- ガラクトシターゼ染色による老化細胞の検出

放射線照射後、細胞を SA- ガラクトシターゼ (以下 SA- Gal) で処理し、酸性条件下で培養後に青色に呈色する細胞を老化細胞として検出した。

-H2AX フォーカス数の計測

放射線照射した細胞を -H2AX 抗体により免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にてフォーカス数を計測した。

(2) オートファジー活性の測定 (LC3-II タンパク質の相対的濃度測定)

オートファジーの誘導はオートファゴソームの形成と正の相関を示す LC3 タンパク質の発現量をウェスタンブロットティングにて経時的にモニタリングすることで確認した。LC3-II とローディングコントロールとの比を測定し、オートファジーの活性を評価した。さらに、オートファジー誘導経路で LC3 の上流にある Utk1、およびリン酸化 Utk1 (Ser638) についてもその発現量をウェスタンブロットティングにて経時的に調べた。

(3) 放射線照射による異常タンパク質の増減の確認

オートファジーで分解されるべきタンパク質や細胞小器官にはポリユビキチン鎖が付加される。ポリユビキチン化タンパク質はリン酸化 p62 タンパク質と結合しているため、X線照射後のリン酸化 p62 (Ser403) タンパク質の経時的な発現量をウェスタンブロットティングで調べた。

4. 研究成果

(1) 放射線照射による線維芽細胞の老化

Edu 取り込み実験により細胞増殖能を調べたところ、X線 20Gy を照射された BJ-5ta 細胞は照射 2 日目には Edu 取り込み細胞数が 2% 以下となり、15 日経過後においても細胞数の増加がみられなかったことから、細胞は照射により増殖を停止したことが分かった (図 1)。また、放射線照射により細胞が老化したかどうかを SA-Gal 染色により調べたところ、SA-Gal 陽性細胞数は照射後徐々に増加し、照射後 8 日目には 90% 以上の細胞が陽性を示し (図 2)、細胞の形態も大きく、扁平状に変化した。

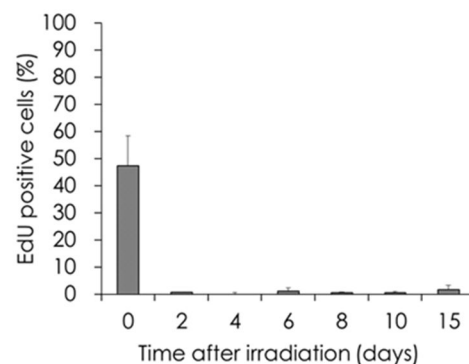


図1 20GyX線照射後のEdu取り込み細胞数

さらに、老化誘導の必須条件である DNA 損傷応答の持続について、照射後 30 日までの各細胞あたりの -H2AX のフォーカス数を調べたところ、30 日後にもほぼすべての細胞でフォーカスが観察されたことから、照射細胞では DNA 損傷応答が持続していることを確認することができた。これらの結果から、X 線 20Gy 照射によりほぼすべての細胞が老化状態で生存し続けることが明らかとなった。

(2) 放射線照射後のオートファジー誘導
続いて放射線照射後のオートファジー関連タンパク質の発現量を調べた(図3、4)。LC3-II の発現量は照射後急激に増加し、照射後 1 日で最大量に到達した。しかし、その後は徐々に減少し、照射後 6 日目にはコントロールレベルまで低下した。その後再び増加し、照射後 30 日目には 1 日目の最大発現量まで上昇した。また、オートファジー誘導経路で LC3 の上流に位置する ULK1 についてもその発現量を調べたところ、ULK1 の発現量は照射後 30 日まで変化は見られなかったが、リン酸化 ULK1 (Ser638) の発現量は照射後 2 日目までは減少し、その後 6 日目までは上昇したが、10 日目以降再び減少した。この発現変動は LC3-II と負の相関が認められた。これらの結果から、放射線照射によりオートファジーが顕著に誘導されることが明らかとなり、その活性は一時的に減少したものの、照射後 30 日目まで持続することが示された。

(3) 放射線照射後の p62 タンパク質の経時的発現
アダプタータンパク質である p62 はポリユビキチン化タンパク質と結合した後 LC3 との特異的結合を介して、オートファゴソームに運ばれて恒常的に分解される。放射線照射を受けた細胞内には放射線により損傷を受けたタンパク質が多数存在し、これらの損傷タンパク質はオートファジーにより分解されると予想された。しかし、本実験で得られた結果では、p62 タンパク質は照射の有無によらずほぼ一定の発現量を示し、ポリユビキチン化タンパク質との親和性上昇の指標となる Ser403 リン酸化 p62 の発現量も照射による変化は認められなかった。

(1)(2)(3)の結果から、X 線照射を受けた線維芽細胞はアポトーシス等の細胞死を起こすことなく細胞分裂を永続的に停止し、老化が誘導されることが明らかとなった。X 線照射直後からオートファジーが誘導されていることから、細胞が老化する前に X 線照射によって生じた損傷した細胞小器官をオートファジーで除去し、その結果アポトーシス等の細胞死が回避されていることが示唆される。さらに、老化後もオートファジーの活性は高く維持されており、これは老化細胞の活発な生理機能の維持と何等かの関係があると考えられる。また、X 線照射後の p62 の発現変動は見られなかったことから、照射により生じた損傷タンパク質はオートファジー以外の分解系で除去されたと考えられる。X 線照射により生じる主なタンパク質損傷は DNA 損傷と同様に酸化的な損傷である可能性があり、オートファジーで分解されるような凝集したタンパク質にはなりにくいことが考えられる。酸化タンパク質は 20S プロテアソームにより分解されやすい(A.M. Pickering, et al, 2012)ことから、損傷タンパク質の分解経路としてオートファジーよりもプロテアソームが優位に働き、そのため p62 の発現に変化が見られなかったと考えられる。

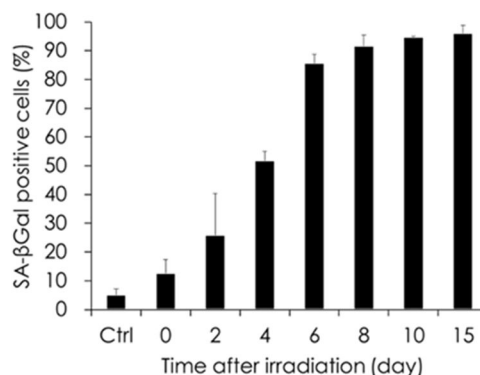


図2 20GyX線照射後の老化細胞数

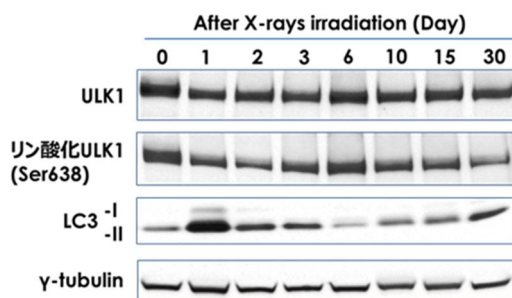


図3 20GyX線照射後のオートファジー関連タンパク質の発現量

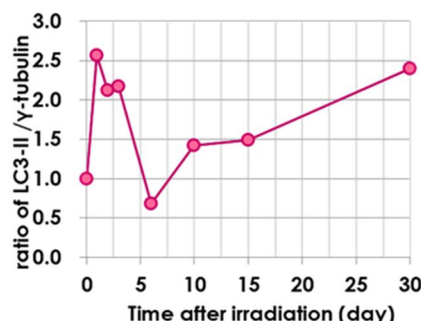


図4 LC3-IIタンパク質の経時的発現変化

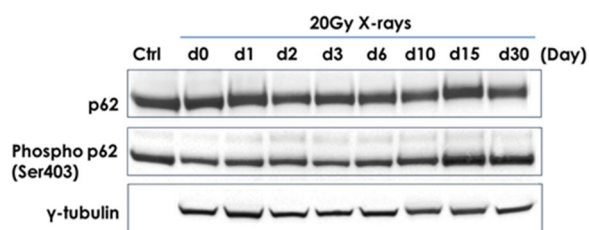


図5 20GyX線照射後のp62タンパク質の発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miho Noguchi, Tomokazu Ihara, Akinari Yokoya
2. 発表標題 Molecular processes of Radiation induced autophagy and senescence of a normal human fibroblast
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomokazu Ihara, Miho Noguchi, Akinari Yokoya
2. 発表標題 Changes of intracellular environment and autophagy activity during senescence induction after X-ray exposure.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomokazu Ihara, Miho Noguchi, Akinari Yokoya, Ryuji Igarashi, Kiichi Kaminaga
2. 発表標題 Autophagy activity during senescence revealed by protein expression dynamics and using NV-nano-diamonds on a trial basis
3. 学会等名 第3回QST国際シンポジウム「Quantum Life Science」(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊原智一、野口実穂、横谷明德
2. 発表標題 放射線による老化誘導とオートファジーの相関
3. 学会等名 若手放射線生物学研究会専門研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊原智一、野口実穂、横谷明德
2. 発表標題 放射線がもたらす細胞老化とオートファジーの関係
3. 学会等名 第一回量子生命科学会若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊原智一、野口実穂、横谷明德
2. 発表標題 放射線照射ストレスによる細胞老化過程と細胞内環境変化
3. 学会等名 量子生命科学会第1回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口実穂、伊原智一、横谷明德
2. 発表標題 正常ヒト線維芽細胞における放射線照射後の老化誘導に伴うオートファジー活性の変動
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野口実穂、横谷明德、鈴木啓司、藤井健太郎
2. 発表標題 Exposure to X-rays enhances autophagy in human fibroblast cells
3. 学会等名 15th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----