

令和元年6月13日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10409

研究課題名(和文) X線ならびに炭素線照射後の生体応答に対する低酸素環境の役割に関する基礎研究

研究課題名(英文) Biological response to hypoxic condition after radiation with X rays or carbon ions

研究代表者

劉 翠華 (Liu, Cuihua)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・主任研究員(任非)

研究者番号：00512427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腎臓初代培養細胞およびヒト脳腫瘍細胞を用いて、X線や炭素線照射後の培養時における酸素環境の違いによって、細胞致死、染色体異常、細胞周期および相同組み換えなどの生体応答を調べた。X線や高LET炭素線で細胞を照射後、異なる酸素環境で培養した結果、常酸素環境と比較すると低酸素環境では、マウス腎臓初代培養細胞のみ生存率が上昇し、染色体異常頻度(異常細胞頻度、染色体交換、染色体断片)は低下する結果となった。この現象に相同組み換えが関与していると考えたが、低酸素培養では相同組み換え頻度が低下する結果となった。よって、低酸素培養による生存率の上昇と相同組み換え修復の直接的な相関は少ないように見える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

X線特に高LET放射線に対する照射後の低酸素ストレス応答についての研究報告はほとんどされていなかったため、本課題では生体内低酸素環境を模擬した実験系において、細胞の放射線応答を明らかにした研究である。長時間による低酸素環境での放射線応答、染色体損傷修復および相同組換え修復効率についての知見を初めて取得することができた。生体の放射線応答を考える上、生体内酸素濃度の重要性を明らかにすることができ、今まで考慮されなかった“生体内酸素濃度”を放射線がん治療や宇宙科学研究に組み込むことで、放射線の効果を最大限に活かした放射線健康科学に本研究の新知見が活かされると考える。

研究成果の概要(英文)：Mouse kidney primary culture cell and human glioblastom cell lines were used in this study. Cell lethality, chromosome aberration, cell cycle distribution and homologous recombination were estimated when cells cultured in normal oxygen (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic conditions (1%, 3% O<sub>2</sub>) after radiations. Compared to a normal oxygen condition, as a result of culturing in different oxygen conditions, the survival fractions of primary cultured mouse kidney cells are increased and chromosomal abnormal frequencies (abnormal cells, exchange, fragments) are decreased when cells cultured in hypoxic conditions after X-rays or high LET carbon ion radiation; those phenomenon was thought to be related to homologous recombination but there was lower frequencies of homologous recombination when cells cultured in a hypoxic condition. Therefore, may be there no direct correlation between increased survival fraction and homologous recombination frequency when cells cultured in hypoxic conditions.

研究分野：放射線生物

キーワード：低酸素応答 低酸素培養 放射線 染色体異常 相同組換え

## 1. 研究開始当初の背景

放射線特有の生物応答である酸素効果は、放射線照射直前ならびに照射中に照射試料が酸素存在下にあることで、酸素が放射線の増感剤として作用し、低酸素環境下と異なる生物応答を導く現象である<sup>(1)</sup>。また我々は酸素が照射時だけではなく、照射後に低酸素環境下で再培養することで、通常の大気環境下とは異なる生体応答を示すことを発見し、その生体応答は特に高 LET 放射線よりも低 LET 放射線に対して顕著であったことを明らかにした(データ未発表)。低酸素培養における酸素濃度は、遺伝子発現をはじめとする様々な生理状態に影響を与えることは知られているが、一般的には常酸素環境下 (~21% O<sub>2</sub>) で実験が行われている。がん組織だけではなく、正常組織内の酸素濃度も数%程度であり、生体内を模擬した低酸素環境下でどのような因子が放射線応答に関わっているかを調べるのが今後の放射線治療生物学の展開に極めて重要である。X 線などの低 LET 放射線を用いた研究から、低酸素ストレス刺激が様々な DNA 修復遺伝子の発現を低下することが示唆されているが<sup>(2, 3)</sup>、炭素線などの高 LET 放射線に対する DNA 損傷修復応答に与える低酸素ストレス刺激についてはほとんど明らかになっていない。

放射線照射された細胞は抗酸化機能の一因子である Nrf<sub>2</sub> (Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2) を発現させると、放射線照射に対する細胞防護効果があることが報告されている<sup>(4, 5)</sup>。これは酸素効果で示されるように、損傷の酸化反応(酸素固定)を防ぐことで細胞防護効果が現れたと考えられる。実際、Nrf2 は、BARD (Nrf2 の活性化剤) によって Nrf2 を活性化し、放射線によって誘発された染色体異常を減少させ、生存率を上昇させることも報告されている<sup>(6)</sup>。また Jayakumar らはがん細胞において、Nrf2 が相同組換え修復経路を介して放射線による DNA 損傷の修復を促進すると報告<sup>(7)</sup>しており、相同組換え修復が重要といわれる高 LET 放射線誘発 DNA 損傷に対しても Nrf<sub>2</sub> の関与が推測できる。

今までの報告から、未だ完全には明らかにされていない異なる酸素濃度で培養されたがん細胞ならびに正常組織細胞に対する高・低 LET 放射線照射の生体応答を明らかにする。

## 2. 研究の目的

放射線生物影響研究は殆ど常酸素環境下で実験が行われてきた。しかし、生体内の酸素濃度はこれよりもかなり低いことが知られているため、放射線照射後の低酸素応答研究は極めて重要と思われる。本研究では、ヒトがん細胞・正常組織細胞、マウス腎臓初代培養細胞(相同組換えが起こると GFP 発光する)を用いて、X 線ならびに高 LET 炭素線照射前後における異なる酸素濃度環境下での培養による細胞応答を調べる。

X 線と炭素線を用いて異なる細胞種を照射し、放射線種および照射前後の酸素濃度が及ぼす放射線に対する感受性を明らかにし、細胞生存に関連する細胞周期の進行、染色体修復効率・精度、相同組換え頻度ならびに Nrf<sub>2</sub> による防護・増感効果を指標に機構解明を進め、まだ明らかになっていない生体酸素影響の基礎知見を取得し、新たな放射線がん治療へと展開するための研究基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

：X 線ならびに炭素線に対する細胞生存率測定ならびに酸素影響の定量解析

低酸素環境下(1 および 3% O<sub>2</sub>) ならびに通常の酸素濃度(大気下: 21% O<sub>2</sub>) で異なる細胞種を培養し X 線や炭素線を用いて照射を行い、コロニー形成法で異なる酸素環境で細胞の放射線感受性を調べた。

：照射後の -H2AX や細胞周期分布ならびに酸素影響の分析

照射後、異なる酸素濃度培養条件で培養した細胞を固定・免疫染色後、顕微鏡やフローサイトメトリー(FACS)で -H2AX や細胞周期分布を分析した。

：染色体異常頻度ならびに酸素影響

細胞照射後、異なる酸素濃度で細胞培養し、正常細胞では、染色体に蛍光プローブをハイブリダイゼーションして(FISH 法)、染色体修復の正確さを調べ、染色体修復の精度(正確さ)を明らかにした。脳腫瘍細胞では微小核の頻度を染色体異常頻度として評価した。

：相同組換え因子および相同組換え細胞頻度ならびに酸素影響の解析

RaDR マウス腎臓初代培養細胞を照射後、異なる酸素濃度のインキュベーターで培養し、24 時間後および一週間後、相同組換え頻度や相同組換え関連する因子 Nrf<sub>2</sub> を分析した(図 1)。

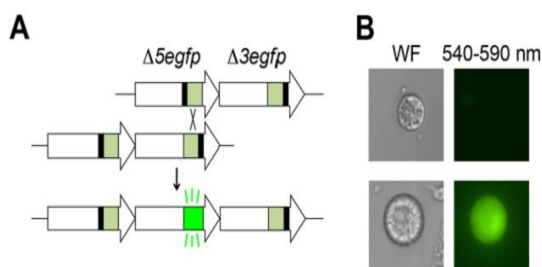


図 1. RaDR トランスジェニックマウス; 並列する変異 GFP 遺伝子構造体(図 1A) がゲノム(Rosa26 座位)に一つコピー挿入された正常モデルマウス(C57/BL6)。GFP 遺伝子配列間で相同組換え(HR)が起こると、発現する GFP が野生型に復帰し、緑色蛍光を発する(図 1B)<sup>(8)</sup>。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞生存率測定ならびに酸素影響の確認

マウス腎臓初代培養細胞およびヒト脳腫瘍細胞株を照射する前に、常酸素環境 (21%, O<sub>2</sub>) 或いは 1% 酸素環境で 3 日間培養して、X 線や高 LET の炭素線で照射後異なる酸素環境で (1, 3, 21%, O<sub>2</sub>) 生存率実験を行った結果: コロニー形成率 (PE) は異なり、コロニーサイズについて、マウス腎臓初代培養細胞は 1 および 3% 酸素濃度の低酸素環境で培養した細胞は常酸素よりコロニーサイズが大きく、コロニー数も多かった。二種類の脳腫瘍細胞では、3% 低酸素環境で培養したコロニーサイズが最も大きかった。

生存率について、図 2 に示されたように X 線や炭素線照射後とも、マウスの腎臓初代培養細胞では 1 および 3% 低酸素環境でのコロニー生存率は常酸素環境での生存率より高いことがわかった (図 2)。照射後の培養酸素濃度を変えても、生物学的効果比 (RBE) は酸素濃度に大きく依存せず一定の値であった。

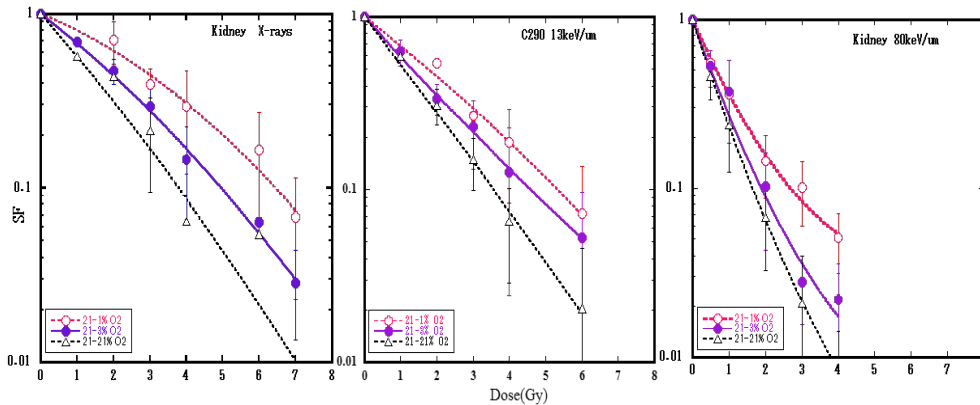


図 2. X 線や炭素線照射後、異なる酸素濃度環境で培養したマウス腎臓初代培養細胞の生存率

また二種類のヒト脳腫瘍細胞 (T98, U87) では、照射後の酸素濃度を変化させても、その後の細胞生存率に大きな違いは見られなかった (図 3)。

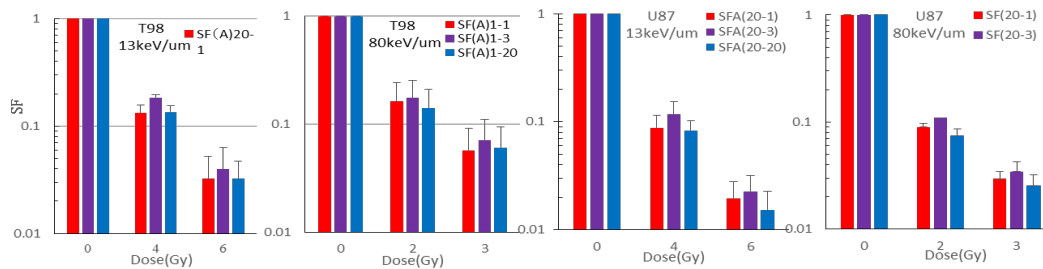


図 3. 炭素線照射されたヒト脳腫瘍細胞の生存率

さらに他の脳腫瘍細胞株 (U20S, A172) やヒト肺由来正常繊維芽細胞 (HFL-1) においても、照射後の酸素濃度を変化させても細胞生存率に違いは観察されなかった (データを省略)。

##### (2) 細胞周期分布ならびに酸素影響

照射後の酸素濃度の影響を最も受けたマウス腎臓初代培養細胞において、X 線 (4Gy) や炭素線 (13 keV/μm: 4Gy)、高 LET 炭素線 (80 keV/μm: 3Gy) 照射 24 時間と 36 時間後の細胞周期分布を調べた。低酸素環境での培養では常酸素培養に比べ、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期細胞の割合は低く、G<sub>2</sub>/M 期の細胞の割合は高いことがわかった。

##### (3) FISH 法による染色体異常頻度ならびに酸素影響

常酸素環境で培養したマウスの腎臓初代培養細胞を、X 線や炭素線照射後に異なる酸素濃度で培養すると、染色体異常頻度が異なることがわかった (図 4)。具体的には、低酸素環境 (1 および 3%, O<sub>2</sub>) で培養した細胞は 21% O<sub>2</sub> の常酸素環境で培養した細胞より染色体異常細胞頻度が低く、また染色体交換ならびに修復されずに残された染色体断片も常酸素培養環境より頻度が低いことがわかった。

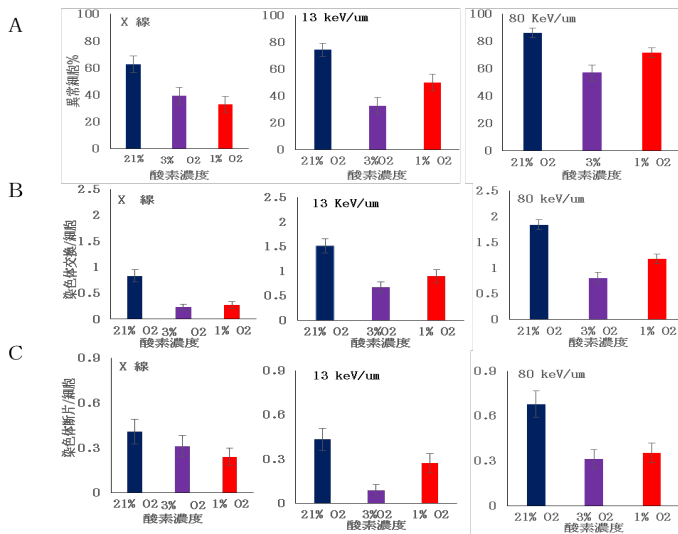


図4. X線(4Gy)や13 keV/μm(4Gy), 80 keV/μm(3Gy)炭素線照射後、異なる酸素濃度環境で培養した細胞の染色体異常細胞頻度頻度(A)、染色体交換(B)、染色体断片(C)

ヒト脳腫瘍細胞株(T98,U87)では、X線や炭素線照射後の3%酸素環境で培養すると、1および21%の酸素環境で培養した細胞より微小核頻度が低いことがわかった(データ省略)。この3%酸素環境で染色体異常が最も低く生じた理由については、現段階では明らかにできていない。

(4) 相当組換えならびに酸素影響

DNA修復経路は主に非相同末端結合、相同組換えの二種類の修復経路が知られており、ここでは相同組み換え頻度に着目し、異なる酸素濃度環境で一週間培養したRaDRマウス腎臓培養細胞の相同組み換え頻度を調べた。その結果、非照射細胞は低酸素環境(1および3%, O<sub>2</sub>)で培養すると常酸素環境で培養した細胞より相同組換えを行った細胞頻度が低いことがわかった(図5)。さらに照射した細胞においても、低酸素環境で培養した細胞では相同組換え頻度が低い傾向が示された。今後、追加実験を行い統計的な解析をすすめる予定である。

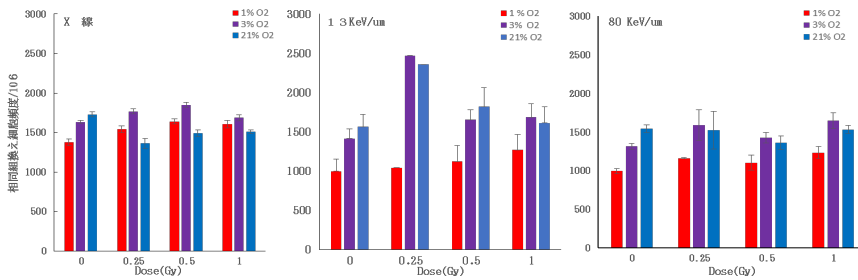


図5. X線や炭素線照射後、異なる酸素濃度環境で培養した細胞の相同組換え細胞頻度

また相同組換えの修復で重要なファクターであるNfr<sub>2</sub>タンパク質の発現量について、異なる酸素濃度で照射後24時間培養し、ウェスタンブロッティングでNfr<sub>2</sub>タンパクを定量した。結果は、異なる酸素濃度での培養によるNfr<sub>2</sub>タンパクの発現量には、明確な差は認められなかった。今後は継続して解析を行い、データの信頼性を高める予定である。

これらの結果をまとめると、マウスの腎臓初代培養細胞では照射後の異なる酸素濃度で培養をすることで細胞の生存率が大きく変化することが示唆された。この現象は、染色体異常細胞頻度の低下、さらに染色体交換ならびに修復されずに残された染色体断片の現象によるものと推測できた。しかし、照射後のG<sub>2</sub>/M期の増加により相同組換え頻度が増加したと予想したが、予想に反して低酸素環境では相同組換え頻度が減少するというデータが得られた。今後は低酸素濃度による相同組換え頻度減少が、どのような放射線生物学的な意味を持つか、調べる予定である。また、ヒト脳腫瘍細胞株では照射後の低酸素環境による培養では細胞生存率の上昇が見られなかった。この細胞種依存的な酸素影響についても研究を続ける予定である。

< 引用文献 >

- Hirayama *et al.* J. Radiat. Res. 46, 2005, 325-332  
Norman Chan *et al.* Mol Cancer Res. 12, 2014, 1407-15.  
Yuan *et al.* Cancer Res.60, 2000, 4372-6.  
Mcdonald *et al.* Cancer Res. 70, 2010, 8886-95.  
Yoshino *et al.* Radiat. Prot. Dosimetry 152, 2012, 104-8.  
Kim *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 109(43) 2012, E2949-55  
Jayakumar *et al.* Mutat. Res.779, 2015, 33-45.  
Sukup-Jackson *et al.* PLOS genetics 2014

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- 1 . Cuihua Liu, Hirokazu Hirakawa, Kaoru Tanaka, Fazliana Mohd saaya, Mitsuru Neno, Akira Fujimori, Bing Wang:Reduction of Delayed Homologous Recombination by Induction of Radioadaptive Response in RaDR-GFP Mice (Yonezawa Effect): An Old Player with A New Role, Dose Response,2019, 査読有 doi: 10.1177/1559325819833840
- 2 . Narongchai Autsavapromporn , Cuihua Liu, Alisa Kobayashi, Masakazu Oikawa , Nahathai Dukaew , Jun Wang , Teruaki Konishi *et al.*: Emerging Role of Secondary Bystander Effects Induced by Fractionated Protons Microbeam Irradiation, Radiation Research, 191(2), 211 - 216, 2019, 査読有 DOI:10.1667/RR15155.1
- 3 . Bing Wang,Kaoru Tanaka, Yasuharu Ninomiya , Kouichi Maruyama, Guillaume Varès , Takanori Katsube , Masahiro Murakami , Cuihua Liu , Akira Fujimori , Kazuko Fujita , Qiang Liu , Kiyomi Kasai , Mitsuru Neno: Increased Hematopoietic Stem Cells Measured as Endogenous Spleen Colonies in Radiation-Induced Adaptive Response in Mice (YonezawaEffect) Dose-Response, 16(3), 2018, 査読有 DOI:10.1177/15593258187901524.
4. Anqing Wu , Wentao Hu , Jian Zhang , Guo Ziyang , Cuihua Liu , Takanori Katsube , Kaoru Tanaka , Jing Nie , Bing Wang , Guangming Zhou: Mouse intestinal Lgr5+ stem cells are more sensitive to heavy ion irradiation than Bmi1+ stem cells Acta Biochimica Biophysica Sinica., 51(3), 338-340, 2018, 査読有 DOI: 10.1093/abbs/gmy158
5. Narongchai Autsavapromporn, Cuihua Liu, Teruaki Konishi: Impact of Co-Culturing with Fractionated Carbon-Ion-Irradiated Cancer Cells on Bystander Normal Cells and Their Progeny. Radiation Research, 188(3), 335- 341, 2017-09, 査読有 DOI:10.1667/RR14773.1
6. Hailong Pei , Jian Zhang, Ryoichi Hirayama, Cuihua Liu, Bingyan Li, Tom K Hei, Guangming Zhou *et al.*: RAC2-P38 MAPK-dependent NADPH oxidase activity is associated with the resistance of quiescent cells to ionizing radiation. Cell cycle, 16(1), 113 - 122, 2017-01, 査読有 DOI:10.1080/15384101.2016.1259039
7. Shigeaki Sunada, Hideki Kanai, Younghyun Lee, Takeshi Yasuda, Hirokazu Hirakawa, Cuihua Liu, Akira Fujimori, Mitsuru Uesaka, Ryuichi Okayasu: Nontoxic concentration of DNA-PK inhibitor NU7441 radio-sensitizes lung tumor cells with little effect on double strand break repair. Cancer science, 107(9), 1250 - 1255, 2016, 査読有 DOI:10.1111/cas.12998

[学会発表](計 6 件)

- 1 . 劉 翠華, 平川博一, 平山亮一, 藤森 亮: X 線や炭素線照射後の生体応答に対する低酸素環境の役割に関する研究 日本放射線影響学会第 61 回大会, 2018-11-08
- 2 . 劉 翠華, 平川博一, 藤森 亮, 平山亮一: X 線照射後の生体応答に対する低酸素環境の役割に関する研究 日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017-10-27
- 3 . C.Liu , N. Ausavapromporn, A. Fujimori : Mechanism of cell lethal effect in mesothelioma by high LET carbon-ion beams. The 5th International Symposium on space radiation and particle radiotherapy, 2017-5-24
4. 藤森 亮 , 平川 博一 , 劉 翠華: Visualization of In Vivo DNA damage responses to galactic cosmic radiation ISSRPRT 2017, World Hotel Grand Dushulake Suzhou, 2017-05-24
- 5 . 劉 翠華、平川博一、王 冰、中島徹夫、勝部孝則、二宮康晴、田中 薫、根井 充、藤森 亮: 放射線誘発マウス胸腺腫およびゲノム不安定性の検討 放射線影響学会第 59 回大会, 2016-10-25
- 6 . Narongchai Autsavapromporn , Teruaki Konishi , Cuihua Liu , Edourd I Azzam , Ianik Plante , Tomoo Funayama , Masao Suzuki: Late Effects in the Progeny of Bystander Human Cells after Carbon Ions are Dependent on Radiation Quality: The Relevance to Cancer Risk International Nuclear Science and Technology Conference 2016, 2016-08-05

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：平山 亮一  
ローマ字氏名： Hirayama Ryoichi  
所属研究機関名：国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構  
部局名：放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部  
職名：主任研究員（定常）  
研究者番号（8桁）：90435701

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：藤森 亮  
ローマ字氏名：Fujimori Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。