

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19836

研究課題名(和文)放射線による晩期炎症における遅発性活性酸素種の関与

研究課題名(英文) Suppression of delayed ROS rescue normal human fibroblasts after radiation exposure.

研究代表者

小橋川 新子(菓子野新子)(Kobashigawa, Shinko)

京都大学・複合原子力科学研究所・研究員

研究者番号：70637628

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)：放射線照射により、正常細胞においてもがん細胞においても遅発性の活性酸素種が増加することがわかった。しかしながら、がん細胞においては遅発性の活性酸素種が増加しても細胞老化が誘導されないのに対して、正常細胞においては細胞老化が誘導されることがわかった。細胞老化誘導に關与するタンパク質をウェスタンブロット法により確認したところ、正常細胞ではp53タンパク質、及びその下流のp21タンパク質の発現が遅発性活性酸素種により増加されることがわかった。驚くべきことに、p53野生型の大腸がん細胞であるRKO細胞においては遅発性活性酸素種によってp53の発現レベルの増加がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの放射線治療は臓器をそのまま残すことができるという利点があるが、がんの種類によって治療効果や副作用の起こり方も様々である。よってがんの種類による各々の影響について調べる必要があるが、本申請において着目しているのは口腔癌である。口腔癌においても放射線治療が選択されることがあるが、放射線照射により正常組織にも影響が現れ、口が渇く、飲み込みにくい、口内炎などの晩期合併症により治療継続が困難になることがある。放射線照射によりもたらされた正常細胞への変化が後々表現型として現れるという点から、その誘導機構を解明し抑制することにより、がんの治療効果を下げることなく、晩期合併症を防げることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed that radiation induces delayed increase of reactive oxygen species (ROS) in both normal cells and tumor cells. However, delayed ROS is required for induction of cellular senescence only in normal cells but not in tumor cells. We then analysed the expression of proteins related to senescence. The expression of p53 and p21 are increased with delayed ROS in normal cells. Surprisingly, the suppression of delayed ROS did not reduce the expression of p53 in RKO cells, even RKO cells have the wild type p53. We are now exploring the upstream target for delayed ROS.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 細胞老化 SASP 遅発性活性酸素種 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がんの放射線治療は臓器をそのまま残すことができるという利点があるが、がんの種類によって治療効果や副作用の起こり方も様々である。放射線照射により正常組織にも影響が現れ、口が渇く、飲み込みにくい、口内炎などの晩期合併症により治療継続が困難になることがある。放射線照射によりもたらされた正常細胞への変化が後々表現型として現れるという点から、その誘導機構を解明し抑制することにより、がんの治療効果を下げることなく、晩期合併症を防げることが期待される。申請者は電離放射線を照射された正常ヒト線維芽細胞において、遅発性にミトコンドリア由来活性酸素種の増加、膜電位の低下が生じることを見出し、さらにこれらの現象が、「ミトコンドリア形態が細かく分裂することで起こる」ということを初めて明らかにした (Kobashigawa et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011)。抗酸化剤であるアスコルビン酸誘導体を照射 1 時間後から処理することによりこの遅発性活性酸素種を抑制すると、正常ヒト線維芽細胞においては処理していない細胞と比べて細胞生存率が 6Gy 照射でおよそ 2 倍程度に改善した。さらに放射線照射前からアスコルビン酸誘導体を処理し、照射時の活性酸素種と遅発性活性酸素種の両方を抑制した場合は処理していないときと比べて生存率が 6Gy 照射で約 4 倍程度に改善した (Kobashigawa et al. Radiat. Res. 2015)。しかしながら SV40 遺伝子を導入し、p53 遺伝子が機能しない細胞においては同様の実験を行っても生存率にあまり変化はみられなかった。これらの結果より正常細胞においては放射線照射によりミトコンドリア機能異常が生じることにより遅発性活性酸素種が増加し、これが晩期合併症を引き起こしている可能性が考えられる。多くのがん細胞においては p53 遺伝子に異常があり、解糖系が亢進し、もともとミトコンドリア膜電位が低いために、遅発性活性酸素種の影響があまりないことが考えられる。そこで遅発性活性酸素種をターゲットに正常細胞の防護を行えば、癌細胞へあまり影響を及ぼすことなく、放射線治療による晩期合併症を抑制できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

申請者は放射線照射により、放射線による活性酸素種とは別に、ミトコンドリアの異常から生じる遅発性活性酸素種が生じることを見出ししている。この遅発性活性酸素種が照射後の正常組織における遅延的な細胞死の誘導、また遅発性の炎症を引き起こしている可能性が考えられる。特に最近、老化細胞からの炎症性サイトカイン、ケモカインの分泌 (Senescence Associated Secretory Phenotype; SASP) が知られるようになり、放射線誘発細胞老化を抑制することにより、老化細胞から分泌される SASP 因子を抑制することが可能と考えられる。そこで遅発性活性酸素種を抑制することにより、放射線治療効果を落とすことなく、細胞老化を抑制し、正常組織への損傷軽減が可能か検証することが本研究の目的である。よって、本研究では、「放射線は正常細胞におけるミトコンドリアの膜構造の変化、ミトコンドリアの機能不全、活性酸素種産生の増加、細胞老化、遅発性炎症」という仮説を立て、この「遅発性活性酸素種の抑制」により正常細胞を防護し、老化細胞の減少、炎症性サイトカイン分泌の抑制が可能か否かについての検討を行う。

## 3. 研究の方法

**細胞:** 正常ヒト胎児由来細胞 (HE49、HE23) 及びヒト線維芽細胞 (BJ-h TERT)、ヒトがん細胞 (MiaPaca-2, RK0, H1299, HT1080) を用いた。培養にはヒト正常細胞 (HE49, HE23, BJ-h TERT 細胞) では Eagle's MEM (和光)、がん細胞では DMEM (和光) を用い、それぞれ 10% FBS を添加し、37 度、5% CO<sub>2</sub> インキュベータを用いた。活性酸素種の抑制には抗酸化剤である L-アスコルビン酸 2-グルコシド (AA-2G) を処理した。

**ミトコンドリア由来活性酸素種の測定:** MitoSox 試薬 (Invitrogen) を PBS+ で希釈し、これを 30 分間 37 度 CO<sub>2</sub> インキュベータで処理したのち、その蛍光強度を、蛍光高度計を用いて測定した。

**細胞増殖曲線:** HE23 細胞に 5mM AA-2G を処理した細胞としていない細胞をそれぞれ培養し、継代ごとに細胞数を測定し、活性酸素種が細胞老化に関与しているかどうか検討した。

**照射後の生存率:** コロニー形成法、細胞増殖試験、BrdU の取り込み頻度を測定した。

**遅発性活性酸素種による細胞老化の誘導:** 老化関連タンパク質発現 (p53, p21, リン酸化 Rb, p38, p16, PKC $\delta$ ) をウェスタンブロット法にて調べた。また老化細胞の頻度を SA- $\beta$ -gal 染色により調べた。

**DNA 二重鎖切断数:** 53BP1 タンパク質の蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて画像を取り込み、核当たりのフォーカス数を計測した。

## 4. 研究成果

放射線照射により、正常細胞においてもがん細胞においても遅発性の活性酸素種が増加することがわかった。しかしながら、がん細胞においては遅発性の活性酸素種が増加しても細胞老化が誘導されないのに対して、正常細胞においては遅発性活性酸素種が増加することにより細胞老化が誘導されることがわかった。

活性酸素種が通常の細胞老化にも関与しているのか調べるために、5 mM AA-2G を処理した HE23 細胞としていない HE23 細胞とを継代培養し、細胞増殖を調べた。図 1 に示した通り、AA-2G を処理した HE23 細胞においては細胞老化が大幅に延期され、細胞分裂数が多くなったことがわか

った。このことから、通常の細胞老化においても活性酸素種が寄与している部分があることがわかった。

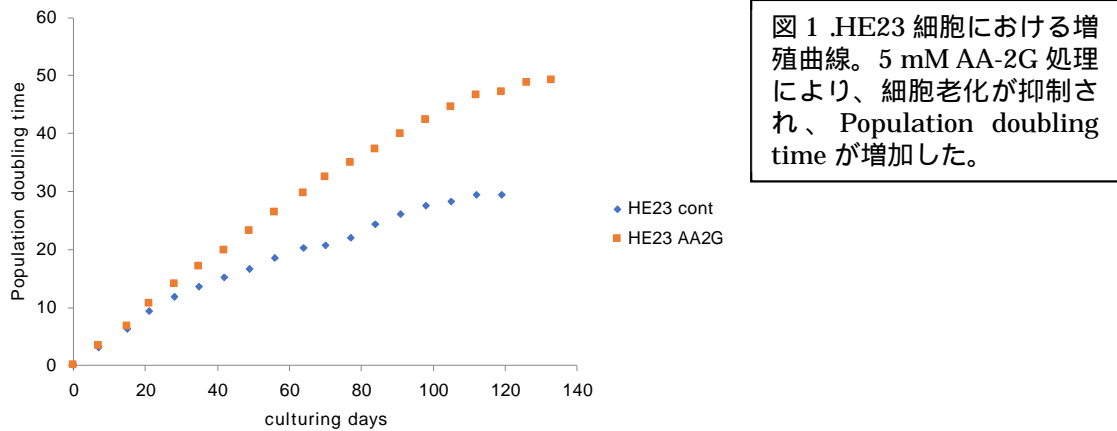


図1 .HE23 細胞における増殖曲線。5 mM AA-2G 処理により、細胞老化が抑制され、Population doubling time が増加した。

細胞老化誘導に關与するタンパク質をウェスタンブロット法により確認したところ、正常細胞 (BJ- hTERT 細胞) では p53 タンパク質、及びその下流の p21 タンパク質の発現が遅発性活性酸素種により増加されることがわかった。また、リン酸化 Rb タンパク質の発現量は照射により減少するが、アスコルビン酸誘導体処理により遅発性活性酸素種を抑制した細胞においてはリン酸化 Rb タンパク質の増加が観察された。驚くべきことに、p53 野生型の大腸がん細胞である RKO 細胞においては遅発性活性酸素種によって p53 の発現レベルの増加がみられなかった。このことから、活性酸素種が直接 p53 の発現を誘導しているのではなく、DNA 損傷応答機構など、その上流に作用していることが考えられる。今後、その上流が何か明らかにしていきたいと考えている。

遅発性活性酸素種を抑制した時と、していない時でコロニー形成率を比較すると、がん細胞においては変わらないのに対して、正常細胞ではコロニー形成率が遅発性活性酸素種を抑制することにより高くなることがわかった。この結果はがん細胞においては細胞老化が誘導されない結果と一致した。

照射後のミトコンドリアの機能的変化を、細胞外フラックスアナライザーを用いて計測したところ、6 Gy 照射 3 日後の BJ- hTERT 細胞ではミトコンドリアにおける基礎的酸素消費量、及び最大酸素消費量が増加していることがわかった (図 2)。また、プロトンリークも照射により増加することがわかった。このことから、照射により、ミトコンドリアの機能異常が生じることにより、遅発性に活性酸素種が生じていることがわかった。

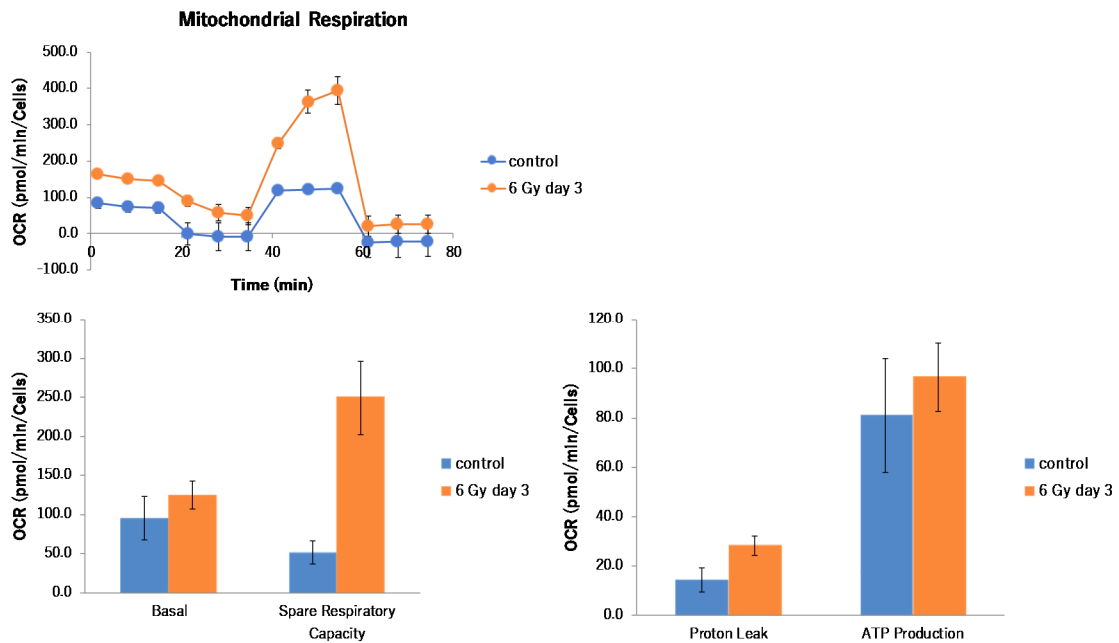


図 2 .フラックスアナライザーを用いて、照射後のミトコンドリア機能を測定した。6 Gy 照射 3 日後の細胞では Spare Respiratory Capacity、及び、Proton Leak が増加していることがわかった。

また、放射線照射 3 日後に残存する DNA 損傷数を 53BP1 タンパク質の蛍光染色にて確認したところ、正常細胞においては遅発性活性酸素種を抑制した細胞において優位に DNA 損傷数が減

少していることがわかった。がん細胞（RK0、MiaPaca2）において遅発性活性酸素種の抑制による DNA 損傷数の減少は観察されなかった。

以上の結果より、照射、もしくは細胞老化の過程において、ミトコンドリアの機能異常が生じ、これが活性酸素種が増加する原因となっていることが示唆された。また増加した活性酸素種は p53 タンパク質の発現維持などに関与することで細胞老化誘導に寄与していることが示された。近年、老化細胞は長期に渡って組織内にとどまり、Senescence-associated secretory phenotype（SASP）と呼ばれる炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素などの様々な因子を分泌し、炎症作用や発がんに関与することが考えられるようになってきた（Coppe et al. PLoS Biol 2008）。本研究により遅発性活性酸素種は正常細胞でのみ細胞老化を誘導することから、SASP 因子の分泌に関与していることが考えられる。遅発性活性酸素種が SASP 因子の分泌を介して、正常組織での炎症に寄与するのか検討を進めているところである。

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. グルコピラノシリアスコルピン酸の照射後処理による放射線感受性の変化 ~ 正常細胞 とがん細胞の比較 ~  
小橋川新子、菓子野元郎、真田悠生、田野恵三、増永慎一郎  
日本放射線影響学会第 61 回大会 2018 年 11 月 7 日
2. 放射線による細胞老化は遅発性活性酸素種が関与する  
小橋川新子、菓子野元郎、真田悠生、田野恵三、増永慎一郎  
日本放射線影響学会第 60 回大会 2017 年 10 月 25 日
3. 放射線による不可逆的の老化様細胞増殖停止への遅発性活性酸素種の関与  
小橋川新子、菓子野元郎、真田悠生、田野恵三、増永慎一郎  
日本放射線腫瘍学会 第 46 回放射線による制癌シンポジウム・第 55 回生物部会学術大会  
2017 年 6 月 16 日
4. 遅発性活性酸素は放射線誘発細胞死に寄与する  
小橋川新子、菓子野元郎、森宣、鈴木啓司、山下俊一  
日本放射線影響学会第 59 回大会 2016 年 10 月 27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.mirai-nmu.com/>

## 6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。