

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03377

研究課題名(和文)放射線影響評価の新たな指標としてのミトコンドリア損傷の検討

研究課題名(英文)Study of biological effects of ionizing radiation on mitochondria

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・上席主任研究官

研究者番号：40463799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：発がんにおいて、腫瘍組織に含まれる間質細胞の重要性が指摘されている。本研究は、ヒト線維芽細胞を用いた解析により、ミトコンドリア酸化ストレスによる線維芽細胞の活性化が、がん微小環境の形成を介して放射線発がんに関わることを明らかにした。さらに、放射線が生体内レドックスの恒常性を維持するグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)を不活性化することでミトコンドリアから発生する活性酸素が除去されず、酸化ストレスが誘導されることを明らかにした。本研究によりがん細胞以外の間質細胞の放射線影響を解析することで、従来の方法では解析困難であった放射線によるがんの発症メカニズムの解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、放射線発がんの発症機構の解明を目的としている。低線量放射線の健康影響の科学的解明は学術的に重要であるのみならず、福島事故で懸念されている健康影響評価においても必要である。さらに、得られた研究成果は、放射線リスク評価の科学的根拠として放射線に不安を持つ人々への対策に活用する。

研究成果の概要(英文)：Tumor stromal cells have an important role on tumor initiation and development. We here analyzed the role of human fibroblasts on radiation-related tumors. We revealed that radiation-induced mitochondrial reactive oxygen sepsis (ROS) activated fibroblasts to form tumor microenvironment. Furthermore, radiation prevented removal of mitochondrial ROS by inactivating glutathione peroxidase (GPx), leading to induction of oxidative stresses in the irradiated cells. Our findings will provide new insights in the mechanisms of oxidative stress associated with radiation-related tumor.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発がん ミトコンドリア 活性酸素 がんの微小環境 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

放射線被ばくが原因で将来がんになるかどうか、放射線の発がん影響が懸念されている。放射線被ばくによる健康不安を低減する対策として、放射線影響の解明に向けた取り組みは喫緊に必要な課題である。これまで放射線発がん研究では、放射線の標的である細胞核の DNA 上の放射線特異的な変異 (放射線のシグナチャー) の同定を目的に研究が進められている。しかし、現段階で放射線発がんの機序解明には至っていない。また、実験研究では主に数 Gy 以上の高線量の放射線が用いられており、東京電力福島第一原子力発電所事故 (福島事故) で問題となる 100 mSv 以下の低線量放射線を用いた解析が求められている。我々はこれまで独自の解析で、長期放射線照射では、慢性的な DNA 損傷とミトコンドリア損傷が誘導され、放射線影響評価の新たな指標としてのミトコンドリア損傷を明らかにした。(1, 2)。本研究では、ミトコンドリア損傷と酸化ストレスに着目して低線量放射線の影響の高感度検出と放射線発がんの影響評価を行った。

### 2. 研究の目的

発がんにおいて、腫瘍組織の微小環境を構成する結合組織(主に線維芽細胞)の重要性が指摘されている。放射線発がんにおけるがん微小環境の役割について、これまで得られた知見を整理して図示した(図1)。放射線傷害からの回復の過程で、照射後も残存する一部の線維芽細胞はミトコンドリア酸化ストレスを介して活性化され増殖因子を細胞外に放出し、周辺の細胞の増殖を促進する。増殖促進効果は、正常な細胞だけでなく、放射線が誘発する変異を持つがん細胞にも作用するため、がん細胞が増殖しやすい環境(がん微小環境)を形成して、発がんに関与することが考えられる(3)。以上より、がん組織に含まれる間質細胞への放射線影響という新たな視点で、従来の方法では解析が困難であった低線量放射線により発がん影響の解明に挑戦する。細胞や動物を用いた実験研究で得られた放射線による変化が、ヒト被ばく者においても観察されるかどうかを検討し、ヒトの放射線リスク評価に活用することを目的とする。我々以外に、がんの微小環境の役割に注目した放射線発がん研究は行われていない。

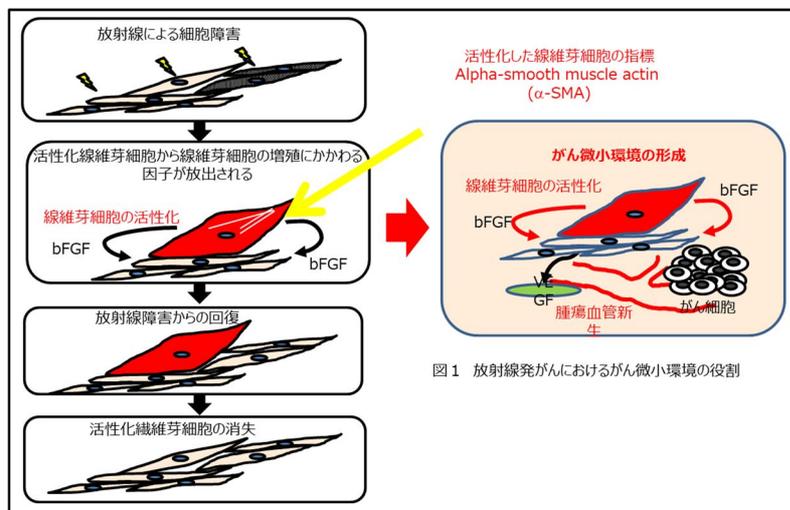


図1 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

### 3. 研究の方法

(1) 細胞と培養条件: ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 MRC-5 と TIG-3 は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団と理化学研究所の細胞バンクより購入した。細胞は、10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) 培養液を用いて、細胞培養用 T25 フラスコ内で、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  の条件で培養した。細胞は、飽和状態になる前に PBS(-) で洗浄した後に、トリプシンで処理して回収し、一部を希釈して新しいフラスコにまいて細胞増殖を維持した。

(2) 細胞の X 線照射: X 線照射装置 (日立、MBR-1505R2) または、 $\gamma$  線照射装置 (ガンマセル 40 エグザクタ) を用いて、高線量率 (0.7Gy/min) の急性照射と長期分割照射 (1 回当たり 0.01 Gy または、0.05 Gy の照射を週に 5 日間 1 か月間: 累積線量 0.46 Gy または、2.3 Gy) を行った。低線量率の慢性照射は広島大学原爆医学研究所の放射性セシウム 137 を線源とする  $\gamma$  線照射装置を利用し、25mGy または、625mGy/day の線量率で 4 日間行い 累積線量 0.1 Gy または、2.5 Gy の照射を行った。

(3) 蛍光免疫染色法: 照射から 24 時間後の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定して、膜透過、ブロッキングの処理をした後に、 $\alpha$ -SMA の抗体 (シグマ社) を用いて蛍光免疫染色を行い、陽性細胞を定量した。蛍光免疫染色したスライドガラスは、キーエンス社 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X700 で 100 個以上の細胞を観察し、 $\alpha$ -SMA で染色される陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。

(4) 統計処理: エラーバーは標準偏差を示す。全ての実験は、少なくとも3回以上の独立した試料を用いて繰り返し実験を行った。エクセル統計 2012 解析ソフトを用いて、一元配置ANOVA後に、Dunnett法を用いて多重比較検定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 放射線による線維芽細胞の活性化

ヒト正常線維芽細胞

MRC-5, TIG-3を用いて、放射線による線維芽細胞の活性化を平滑筋様アクチン(α-SMA)の発現を指標に蛍光免疫染色法で解析した。急性照射と分割照射の照射条件で線維芽細胞の活性化の放射線応答に違いがあるかどうかを

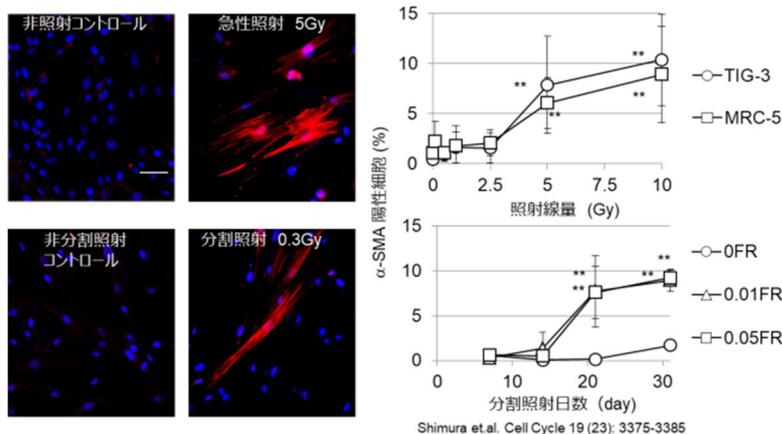


図2 急性照射と分割照射によるCAFの誘導

検討した。図2の赤色で示すようにα-SMAの染色は線維状に観察され、陽性細胞は扁形の形態で大きい細胞質を持つ特徴を示した。α-SMA陽性細胞の割合を目視により計測して求めた。非照射細胞をコントロールとして、2つの細胞では、5 Gy以上の急性照射で統計的に有意にα-SMA陽性細胞の割合が増加した。一方の分割照射では、1回の線量0.01 Gyまたは、0.05 Gyを1日に2回、21日間の照射で総線量が0.3 Gyまたは、1.5 Gyでα-SMA陽性細胞が誘導された。

##### (2) 急性照射と慢性照射による線維芽細胞の活性化

次に慢性照射と急性照射で活性化した線維芽細胞の誘導に違いがあるのかどうかを検討した。急性照射と比べて、慢性照射では、2.5 Gyの放射線照射でα-SMA陽性細胞が誘導された。その後、陽性細胞は、慢性照射を休止して7日目には消失した(データ非表示)。転写因子Nrf2は酸化ストレス下で活性化され細胞核に移行し、酸化ストレス応答に必要な遺伝子の発現を誘導する。急性照射と慢性照射の両方において、2.5 Gy以下の放射線照射では、統計的に有意なNrf2の活性化は観察されなかった。

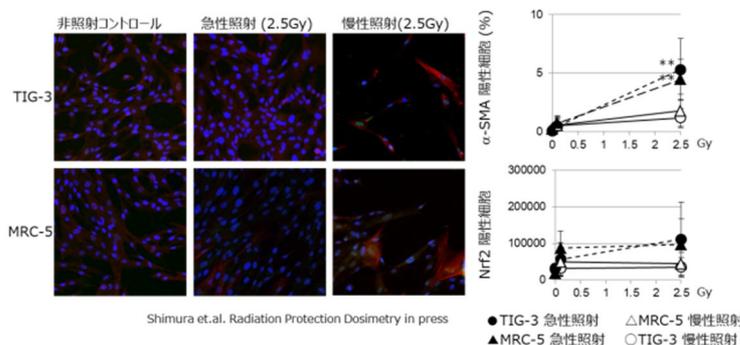


図3 急性照射と慢性照射による線維芽細胞の活性化

##### (3) DNA損傷応答

急性照射と慢性照射のDNA損傷応答について、DNA二本鎖切断(DSB)の指標であるγ-H2AXと、相同組換えDNA修復タンパク質Rad51のフォーカス形成(活性化)を検討した。以前に我々は、分割照射では、0.4 Gyでγ-H2AXとRad51のフォーカスが誘導されることを報告した(1)。0.1または2.5 Gyの線量でTIG-3細胞を照射し、24時間後に細胞を固定して蛍光免疫

染色を行った。2.5 Gy以下の急性照射では、2つの指標の放射線応答は観察されなかった。一方、慢性照射では、照射から24時間後においても線量依存的に $\gamma$ -H2AXとRad51のフォーカス形成が観察された。

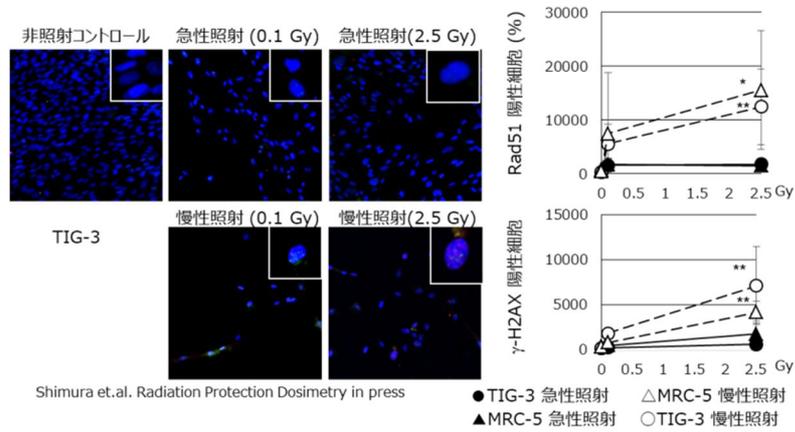


図4 急性照射と慢性照射によるDNA損傷応答

#### (4) ミトコンドリアの放射線応答

放射線によるミトコンドリアへの影響について、細胞内のミトコンドリア量の変化をミトコンドリアたんぱく質 Tom20 の染色により検討した。2.5 Gy以下の急性照射では、Tom20の発現量の変化は観察

されなかった。一方の慢性照射では、ミトコンドリア量が増加することを明らかにした。

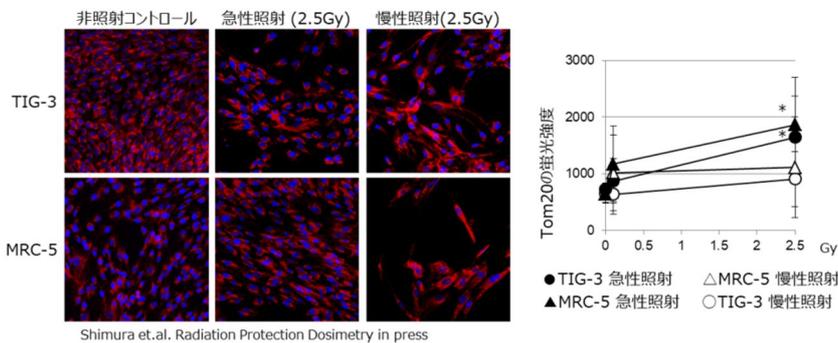


図5 急性照射と慢性照射によるミトコンドリアの応答

#### (5) 考察

これまで細胞実験やマウスを用いた動物実験の結果から、放射線照射後のミトコンドリアから発生する活性酸素が TGF $\beta$ シグナル経路の活性と下流の $\alpha$ -SMAの発現を介して線維芽細胞を活性化することを明らかにした。さらに、放射線により活性化した線維芽細胞ががん細胞との相互作用でがん関連線維芽細胞(CAF: Cancer Associated Fibroblasts)になることを明らかにした(4)。本研究では、照射条件をかえて放射線誘発CAFのしきい線量を検討した。本研究で得られた成果を表1にまとめた。急性照射では、高線量10 GyでDNA損傷応答とミトコンドリアの放射線応答が照射24時間後も持続的に観察された。一方で、分割照射と慢性照射では、より低いしきい線量で、DNA損傷とミトコンドリアの放射線応答が活性化して持続することを明らかにした。放射線による活性酸素酸化ストレスがCAFの誘導に重要である。ミトコンドリアで発生した活性酸素は、主にグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)の働きで、細胞

表1 照射条件によるミトコンドリアの放射線応答と線維芽細胞の活性化のしきい線量

	急性照射	慢性照射	分割照射
$\alpha$ -SMA (線維芽細胞の活性化)	10 Gy	0.4 Gy	0.3 Gy
Remaining $\gamma$ -H2AX and Rad51 focus formation (Existence of DSBs)	5 Gy	0.4 Gy	0.3 Gy
Tom 20 (ミトコンドリア放射線応答)	1 Gy	2.5 Gy	0.43 Gy

内の抗酸化物質還元型グルタチオン (GSH) を利用して除去される。我々は、急性照射と分割照射で活性酸素が増加するメカニズムが異なる原因として、GPx の発現抑制と不活性化が関与することを明らかにした(5)。急性照射では、酸化還元制御機構により活性酸素の蓄積が抑制され、CAF の誘導に 5 Gy 以上の照射線量が必要である。しかし、分割照射や慢性照射ではより低い線量で活性酸素が増加し CAF が誘導される。抗酸化剤は活性酸素を除去して CAF の形成を抑制し、放射線発がんを抑制することが期待される。GSH を増加させる N-アセチルシステインや、その他の抗酸化剤である茶葉に含まれるエピカテキンやアスコルビン酸は、放射線による CAF の形成を抑制することを報告した(4, 6)。また、エピカテキンは、マウスに経口投与することで X 線全身照射による血液細胞のミトコンドリア損傷を抑制し、酸化ストレスを抑えることを報告している(7)。これらの抗酸化剤は、放射線発がんの抑制効果を持つことが期待される。

本研究の成果により、放射線による活性酸素が、がん微小環境の形成に重要であることを明らかにした。急性照射、分割照射、慢性照射で、活性酸素の発生と CAF の誘導が異なることを明らかにした。抗酸化剤は放射線による酸化ストレスを抑制し、放射線防護効果が期待される。発がん研究では、がん細胞だけでなく、がん微小環境の形成についての解析も重要である。ミトコンドリア酸化ストレスは、がんを含む様々な疾病に関与することから、加齢に伴う疾患の発症機構の解明にもつながると考える。今後は、がん微小環境の形成におけるミトコンドリア酸化ストレスの役割を解明することが必要である。

#### 引用文献

1. Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, *et al.* ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle*. 2017; **16**(24): 2345-54.
2. Shimura, T, Sasatani, M, Kamiya, K, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget*. 2016; **7**(3): 3559-70.
3. Sotgia, F, Martinez-Outschoorn, UE, Lisanti, MP. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? *BMC Med*. 2011; **9**: 62.
4. Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, *et al.* Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGFbeta Signaling. *Mol Cancer Res*. 2018; **16**(11): 1676-86.
5. Shimura, T, Nakashiro, C, Fujiwara, K, *et al.* Radiation affects glutathione redox reaction by reduced glutathione peroxidase activity in human fibroblasts. *Journal of Radiation Research*. 2021; **63**(2): 183-91.
6. Shimura, T, Ando, T, Narao, M, *et al.* Mechanism of turnover or persistence of radiation-induced myofibroblast in vitro. *Cell Cycle*. 2020; **19**(23): 3375-85.
7. Shimura, T, Koyama, M, Aono, D, *et al.* Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. *FASEB J*. 2019; **33**(6): 6867-76.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimura T, Koyama M, Aono D, Kunugita N.	4. 巻 33
2. 論文標題 Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB J	6. 最初と最後の頁 6867-6876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201802246RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kunoh T, Shimura T, Kasai T, Matsumoto S, Mahmud H, Khayrani A, Seno M, Kunoh H, Takada J	4. 巻 -
2. 論文標題 Use of DNA-generated gold nanoparticles to radiosensitize and eradicate radioresistant glioma stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6528/aaedd5. Epub 2018 Nov 30..	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N	4. 巻 16
2. 論文標題 Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGF Signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular cancer research	6. 最初と最後の頁 1676-1686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-18-0321 Published November 2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimura Tsutomu, Nakashiro Chinami, Fujiwara Kazusi, Shiga Rina, Sasatani Megumi, Kamiya Kenji, Ushiyama Akira	4. 巻 63
2. 論文標題 Radiation affects glutathione redox reaction by reduced glutathione peroxidase activity in human fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 183 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrab122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimura Tsutomu	4. 巻 12
2. 論文標題 ATM-Mediated Mitochondrial Radiation Responses of Human Fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12071015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimura Tsutomu	4. 巻 62
2. 論文標題 The role of mitochondrial oxidative stress and the tumor microenvironment in radiation-related cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 i36 ~ i43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 志村 勉、山口 一郎、寺田 宙、温泉川 肇彦、牛山 明	4. 巻 70
2. 論文標題 トリチウムの生体への影響と低線量放射線影響研究の課題	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 保健医療科学	6. 最初と最後の頁 160 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20683/jniph.70.2_160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shimura T, Koyama M, Aono D, Kunugita N
2. 発表標題 Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells.
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、小林純也、小松賢志、櫻田尚樹
2. 発表標題 放射線誘発がん関連線維芽細胞は、活性酸素によるTGFbeta;シグナリング経路の活性化を介してがんの増殖を促進する
3. 学会等名 第61回日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimura T, Ushiyama A
2. 発表標題 Mitochondrial damage as a biological marker for dose assessment
3. 学会等名 EPR BioDose 2022 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimura T, Ushiyama A
2. 発表標題 The role of tumor microenvironment formation in radiation-induced tumor.
3. 学会等名 Proceedings of the 30th Anniversary International Symposium on the "Environmental Dynamics of Radionuclides and the Biological Effects of Low Dose-rate Radiation." (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimura T, Nakashiro C, Fujiwara K, Shiga R, Ushiyama A
2. 発表標題 Radiation-induced inactivation of glutathione peroxidase activity in human fibroblasts for disruption of glutathione redox homeostasis
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志村勉, 牛山明
2. 発表標題 放射線被ばく線量評価の新たな指標としてのミトコンドリア損傷の検討
3. 学会等名 第58回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shimura T, Yamaguchi I, Kunugita N	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 4884
3. 書名 Encyclopedia of Environmental Health, 2nd Edition.	

〔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
研究分担者	笹谷 めぐみ(豊島めぐみ)  (Sasatani Megumi)  (80423052)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授   (15401)	
研究分担者	稲葉 洋平  (Inaba Youhei)  (80446583)	国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官   (82602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------