

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19510058
 研究課題名 (和文) 上皮-間質細胞間クロストークによる放射線 DNA 損傷の軽減：新機構の
 解明
 研究課題名 (英文) Elucidation of a novel mechanism of epithelial-mesenchymal cells
 cross-talk leading to the reduction of radiation-induced DNA damage.
 研究代表者
 Vladimir Saenko (ウラジミール サエンコ)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：30343346

研究成果の概要：本研究では、放射線影響下における正常上皮-間質細胞間の相互作用について明らかにすることを目的とし、両細胞の相互作用を反映する *in vitro* 実験系を確立し、一方又は双方における放射線誘発 DNA 損傷の変化について詳細に検討した。放射線照射前に上皮及び間質細胞を混合培養、又は互いのコンディションメディウムを交換したところ、DNA 二重鎖切断の指標として知られるリン酸化 H2AX のフォーカス数が有意に減少した。このことから、正常上皮細胞と正常間質系細胞の間には、互いの DNA を放射線ストレスから防護するパラクライン機構が存在することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学、放射線影響学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・科学物質影響科学

キーワード：放射線、DNA 損傷、リン酸化 H2AX、上皮/間質細胞間相互作用、パラクライン因子

1. 研究開始当初の背景

人体組織は、上皮細胞や間質細胞を含む多種多様な細胞から形成されている。これらの細胞は、細胞間ギャップ結合による情報交換や細胞外基質との相互作用を持ち、各種オートクラインやパラクライン等による複雑なネットワークを構成して生体のホメオスタシスを維持している。このことから、組織レベルでの放射線応答は非常に複雑であると考えられる。

放射線治療を行う際のがん細胞と共に正常な細胞までも放射線に暴露されることはもちろん、治療を行う医療技術者や放射線関連の

作業員、また環境中で無意識のうちに起こる被ばく等、ヒトが放射線に曝される機会は思いのほか多い。しかしながら、放射線ストレス下における異なる種類の正常細胞間での相互作用は、まだほとんどわかっていない。生体への放射線影響をより正確に理解するためには、複数の正常細胞間の複雑な放射線応答を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

ヒト正常上皮細胞及び間葉系細胞間の相互影響について、放射線誘発 DNA 損傷量の変化を指標に検討する。細胞間の相互作用を調

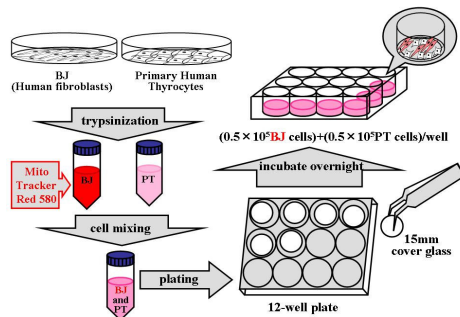
べるため、各細胞の混合培養またはコンディショニングメディウムの置換を行った。さらに、以下のことに関して詳しく検討した。

- ヒト正常上皮細胞とヒト正常線維芽細胞を単独培養あるいは混合培養した場合の放射線誘発 DNA 損傷修復のカイネティクス
- ヒト正常上皮細胞及び間質細胞における放射線誘発 DNA 損傷低減へのギャップ結合の関与
- ヒト正常上皮細胞及び間質細胞における放射線誘発 DNA 損傷低減への液性因子(パラクライン因子又はオートクライン因子)の関与
- 誘導された DNA 防護作用のカイネティクス
- 細胞間相互作用による DNA 防護に関与すると考えられる因子の性質
- ヒト癌上皮細胞とヒト正常間質細胞間における液性因子の影響

3. 研究の方法

① 単独培養と混合培養

1 種類の細胞のみの単独培養、及び 2 種類の細胞を混ぜ合わせる混合培養を行った。混合培養では、正常ヒト初代培養甲状腺細胞(primary thyrocytes: PT)と正常ヒト線維芽細胞(BJ)を 1 対 1 の割合で混ぜ合わせ、PT 又は BJ の培地で培養した。顕微鏡で観察する際、PT 細胞と BJ 細胞を識別するため、BJ 細胞はあらかじめ Mito Tracker Red 580 (Invitrogen Corporation, USA) で標識した。

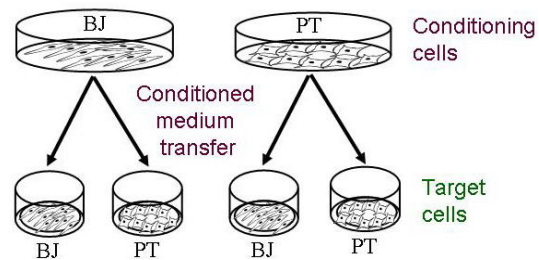


② コンディショニングメディウムの置換

上皮又は間質細胞を一晩培養して条件付けた培地(コンディショニングメディウム)を作製し、次の日、標的細胞として別に準備した上皮又は間質細胞に、各コンディショニングメディウムを与えた。コンディショニングメディウムは、そのまま使用するか、又は 0.22µm フィルターを通してから標的細胞に与えた。標的細胞をコンディショニングメディウムで 1 時間培養した後、放射線照射を行った。

③ 放射線照射及び免疫蛍光染色

細胞はカバーグラス上で培養し、0-5 Gy の γ 線(PS-3100SB 型, 線源 ¹³⁷Cs, 1 Gy/min, Pony, Japan)を照射後、37°C で 30 分間培養した。固定後、抗リン酸化 H2AX (Ser139)



(Upstate Biotechnology, USA)、抗リン酸化 ATM (Ser1981) (Rockland, USA)、抗 53BP1 (Bethyl Laboratories, USA)、抗 RPA (anti-replication protein A, Oncogene Research Products, USA) の各種抗体を用いた免疫蛍光染色を鈴木らの方法(Rad Res, 2006)で行った。2 次抗体として、Alexa Fluor 488-labeled anti-mouse IgG (Molecular Probes, USA)を用いる際、10µg/ml RNase A (Qiagen, Germany)を加えた。最後に、TO-PRO-3 iodide (Invitrogen Corporation, USA) 又は DAPI (Invitrogen, USA) で核を染色し、GEL/MOUNT medium (Biomedica, USA) で封入した。LSM510 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, Germany)で、各実験項目あたり少なくとも 100 個の細胞画像を取得し、細胞核あたりのフォーカス数を、Image-Pro Plus ver.4.5 (Media Cybernetics, Inc., USA)の「Count/Size procedure」を用いて計測し、損傷数を解析、評価した。

④ コンディショニングメディウムの熱処理と trypsin ビーズ処理

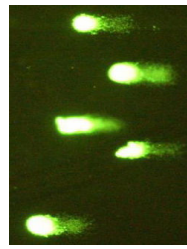
コンディショニングメディウム中の各種因子を熱処理によって不活化するために、PT と BJ のコンディショニングメディウムを 37°C 又は 56°C で 30 分間処理し、標的細胞に与えて 1 時間培養した後、1Gy の γ 線照射を行った。

また、コンディショニングメディウムを trypsin ビーズで処理することによるタンパク質分解実験も行った。この実験では、FBS 等の添加物を加えない DMEM を使用するため、予備実験として PT と BJ 細胞を何も添加しない DMEM で 24 時間培養し、細胞の形態に変化が見られないことを確認した。ビーズ処理は、1ml のコンディショニング DMEM と PBS で洗浄した 130-140mg の minicolumn-spun BSA ビーズ (BrCN- 活性型セファロース 4B (Amersham Biosciences, Sweden)を用いて自作したもの)又は TPCK-Trypsin ビーズ(Pierce, USA)を 37°C で 3 時間インキュベーションした。遠心によりビーズを除去したメディウムを標的細胞に与え、1 時間培養した後、1Gy の γ 線照射を行った。

⑤ コメットアッセイ

PT 及び BJ 細胞を 60mm プレートにコンフルエントにまき、それぞれの細胞で条件付けたコンディショニングメディウムを各細胞に与

え、1時間培養した後、1Gyの γ 線照射を行った。照射後すぐにPBSで洗浄し、rubber policemanで細胞を回収した。本実験では、Comet Assay Kit (Trevigen, USA)を使用し、DNA損傷の程度を評価した。具体的には、電気泳動を1 V/cm、250 mAで30分間行った後、70%エタノールに5分間浸し、空気乾燥後、SYBR Green I dyeで染色した。観察には、CCDカメラを装備したEclipse TE2000-U 蛍光顕微鏡 (Nikon, Japan)を使用し、各実験項目あたり少なくとも200個の細胞を観察し、CometScore software (TriTek Corp., USA)を用いて解析した。



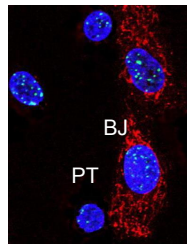
⑥統計学的処理

t-testもしくはANOVAとTukey's多重比較(post-hoc test)を用いて比較検討した。 p 値が0.05未満の場合を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

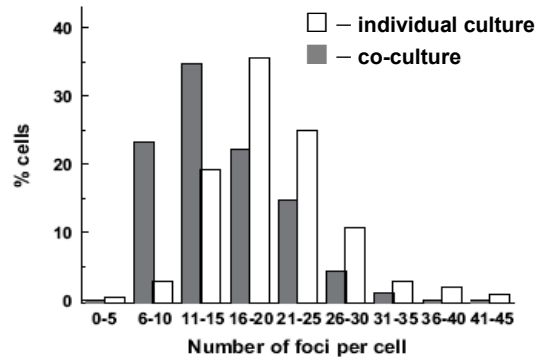
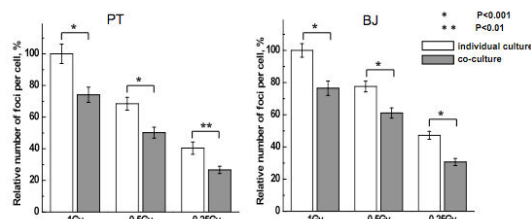
①PT及びBJ細胞の単独培養または混合培養におけるリン酸化H2AXフォーカス数

混合培養では、PT細胞とBJ細胞を判別するため、BJ細胞をMito Trackerで染色した(右図)。



PTとBJ両細胞ともに、単独培養及び混合培養のいずれの培養方法でも、 γ 線照射後リン酸化H2AXのフォーカス数は急増し、30分から1時間後にピークに達した。その後、フォーカス数は時間とともに減少し、24時間後にはコントロールレベルに戻った。また、どちらの培養方法でもフォーカス数には線量依存効果が確認された。

単独培養と混合培養において放射線照射後のリン酸化H2AXフォーカス数の変動が同じであることから、両者のDNA二重鎖切断誘発及び修復のカイネティクスは同じであると考えられた。さらに、PTとBJ細胞を混合培養した場合、いずれの細胞においてもリン酸化H2AXフォーカス数が単独培養よりも有意に少なかった(下図)。



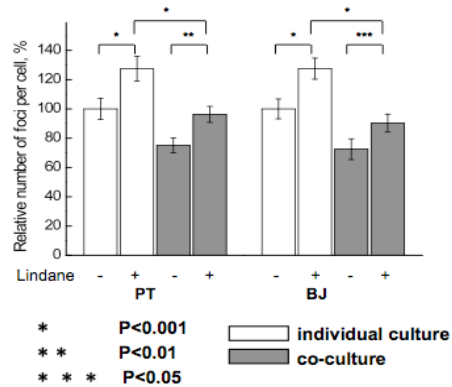
加えて、上図で見られるように、単独培養に比べて混合培養では全体的にフォーカス数が少ない方へシフトしており、混合培養することで放射線誘発DNA損傷が全般的に減少することが考えられた。

以上のことから、PTとBJの細胞間にDNAを防護する相互作用の存在が示唆された。

②ギャップ結合の放射線誘発DNA損傷防護作用への関与

PTとBJいずれの細胞においても、ギャップ結合を阻害するLindane (1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane, Wako, Japan)を加えることで、混合培養と単独培養双方のリン酸化H2AXフォーカス数が増加した。しかし、Lindaneを加えた混合培養のフォーカス数は、Lindaneを加えた単独培養のそれに達するほどには増加しなかった(下図)。

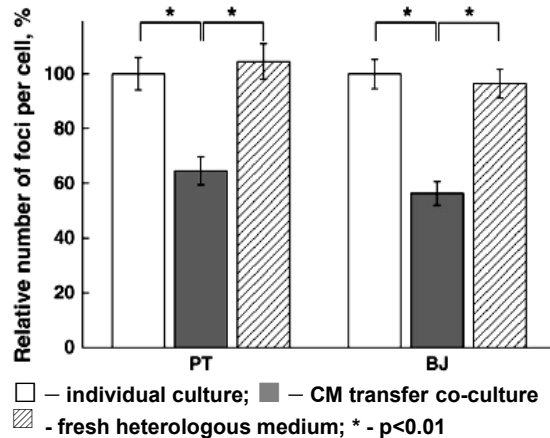
ギャップ結合阻害時にも防護効果が確認されたことから、ギャップ結合はこの防護作用に関わる主要な経路ではないと考えられた。



③液性因子の放射線誘発DNA損傷防護作用への関与

液性因子の関与については、コンディショニングメediumの置換を用いて検討した。PTとBJそれぞれの細胞を、自身のコンディショニングメedium (ホモコンディショニングメedium: homo-CM)、他方の細胞のコンディショニングメedium (ヘテロコンディショニングメedium: hetero-CM)、もしくは何の細胞も培養し

ていない新しいメディウム (fresh heterologous medium) で培養し、1 時間後に 1Gy の γ 線照射を行った。リン酸化 H2AX のフォーカス数は、いずれの細胞においてもヘテロコンディションメディウムを与えた場合、有意に減少した。

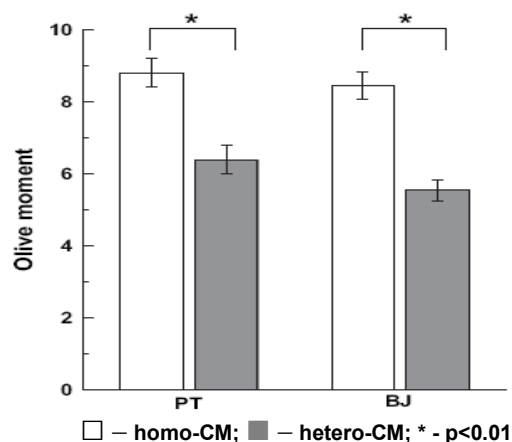


このコンディションメディウム置換実験では、混合培養実験に比べ、放射線誘発 DNA 損傷の減少効果がより顕著に現れた (上図)。

ヘテロコンディションメディウムによる放射線誘発 DNA 損傷の低減を別の手法でも証明するため、コメットアッセイを用いることとした。

コメットアッセイにおいても、ホモコンディションメディウムに比べて、ヘテロコンディションメディウムでは、DNA 損傷量の指標である Olive tail moment が有意に減少した (下図)。以上の結果より、放射線誘発損傷から DNA を防護する作用は、パラクラインを介していると推察された。

さらに、この防護作用はコンディションメディウムを標的細胞に与えてからわずか数分で確認されたことから、遺伝子発現の変化に伴う蛋白合成を介さない細胞内の生化学的な変化によるものと推測された。

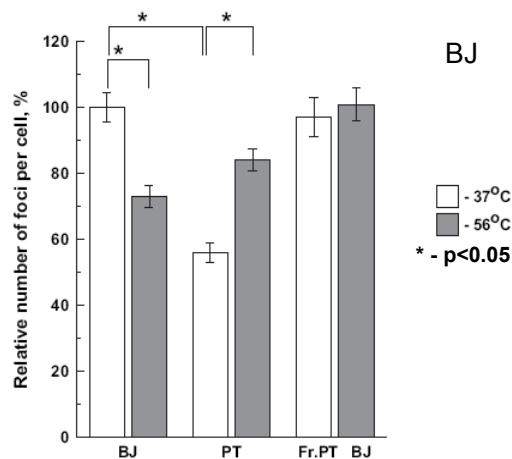


④熱処理あるいはタンパク質分解処理による液性因子由来防護効果の変化

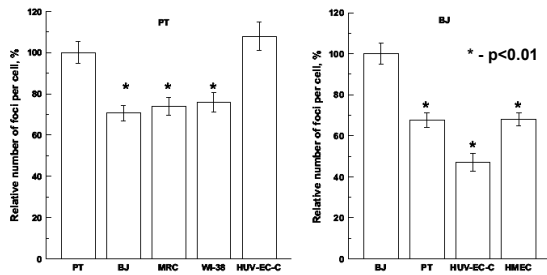
放射線照射前に、熱処理したヘテロコンディションメディウムを与えると、処理なしのものに比べて有意にリン酸化 H2AX のフォーカス数が増加した (下図) ことから、ヘテロコンディションメディウムによる放射線誘発 DNA 損傷の低減は、熱処理によって失われることが示された。つまり、DNA を防護している液性因子は、熱に不安定であると考えられた。加えて、ヘテロコンディションメディウムを trypsin ビーズ処理すると、部分的ではあるが有意に防護効果が減少した。このことより、防護に関わる因子はペプチドである可能性が示唆された。

⑤様々なヒト正常細胞におけるコンディションメディウムによる防護効果

放射線誘発 DNA 損傷の低減が、PT と BJ 以外の上皮-間質細胞間でも観察されるか調べるため、正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC)、正常ヒト肺線維芽細胞 (MRC-5, WI-38)、正常ヒト血管内皮細胞 (HUV-EC-C) を用いて、コンディションメディウムの置換実験を行った。



PT 細胞において、線維芽細胞系である MRC-5 と WI-38 のコンディションメディウムと置換した場合でも、BJ 細胞と同様の防護効果が観察された。しかし、内皮系の HUV-EC-C 細胞のコンディションメディウムでは防護効果は確認されなかった (次ページ上左図)。一方 BJ 細胞においては、上皮系の HMEC のコンディションメディウムで防護効果が認められた。さらに、内皮系の HUV-EC-C 細胞のコンディションメディウムでも、HMEC 以上の効果が観察された (次ページ上右図)。また、HUV-EC-C 細胞において、BJ 細胞からのコンディションメディウムでは防護効果が確認されたのに対して、PT と HMEC からのコンディションメディウムでは確認されなかった。



以上をまとめると、ヘテロコンディションメディウムによる防護効果は、正常上皮-線維芽細胞(PT と MRC-5、PT と WI-38、HMEC と BJ)間及び正常内皮-線維芽細胞(HUV-EC-C と BJ)の間では認められたが、正常上皮-内皮細胞(PT と HUV-EC-C、HMEC と HUV-EC-C)間では確認されず、細胞の種類に特異的な作用であることが示唆された。

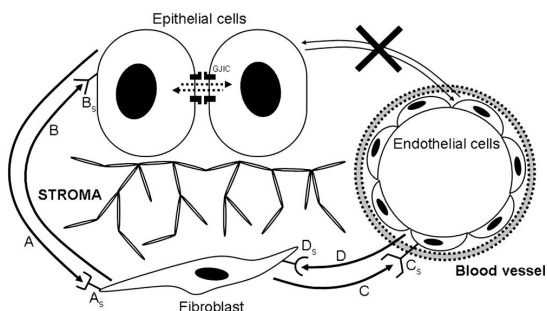
⑥ヒト正常線維芽細胞とヒト癌細胞間におけるコンディションメディウムの影響

BJ 細胞といくつかのヒト癌細胞を用いて、各々のコンディションメディウムの影響を検討した。正常甲状腺あるいは正常乳線上皮細胞を用いた場合と異なり、癌細胞のコンディションメディウムでは、BJ 細胞の放射線誘発 DNA 損傷を減少させる効果は得られなかった。逆に、BJ 細胞において、放射線照射後のリン酸化 H2AX フォーカスの数が増大した。また、BJ 細胞のコンディションメディウムも、がん細胞の放射線誘発 DNA 損傷を低減させることは出来なかった。

以上のように、上皮由来の癌細胞と正常間葉系細胞の間では防護作用が観察されなかったことから、癌細胞では遺伝子発現等の異常により、防護因子の産生及び受容伝達に変化が生じていると推測された。

⑦各種の正常細胞間の相互関係

上皮細胞と間質系細胞は、パラクライン様の作用によって、互いの DNA を相互に防護していることが示された。実験結果から、正常細胞には下記のような防護因子(A, B, C, D)と、それを感知するセンサー(A_s, B_s, C_s, D_s)が存在することが考えられるが、詳細を明らかにするためには更なる検討が必要である。



本研究では、正常細胞が外的ストレスから DNA を防護する本質的な防御機構の一端を解き明かした。今後、この防護作用に関わる物質の同定が進めば、新たな放射線防護剤の開発と治療への応用が期待される。

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)

- ①Akulevich N, Saenko V, Mitsutake N, (他 6 名): Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 印刷中, 2009, 査読有
- ②Pushkarev VM, Starenki DV, Saenko VA, (他 5 名): Effects of low and high concentrations of antitumor drug taxol in anaplastic thyroid cancer cells. *Exp Oncol* 31(1): 16-21, 2009, 査読有
- ③Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, (他 5 名): Mutation analysis of RAPI gene in papillary thyroid carcinomas. *Endocr J* 56(1): 161-164, 2009, 査読有
- ④ Meng Z, Mitsutake N, Nakashima M, Starenki D, Matsuse M, Takakura S, Namba H, Saenko V, (他 3 名): DHMEQ, a novel NF- κ B inhibitor, enhances antitumor activity of taxanes in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology* 149(11): 5357-5365, 2008, 査読有
- ⑤Pushkarev VM, Starenki DV, Saenko VA, (他 5 名): Differential effects of low and high doses of taxol in anaplastic thyroid cancer cells: possible implication of the pin 1 prolyl isomerase. *Exp Oncol* 30(3): 190-194, 2008, 査読有
- ⑥ Makino S, Mitsutake N, Nakashima M, Saenko VA, (他 5 名): DHMEQ, a novel NF- κ B inhibitor, suppresses growth and type I collagen accumulation in keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci* 51(3): 171-180, 2008, 査読有
- ⑦Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, (他 5 名): Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci* 99(6): 1147-1154, 2008, 査読有
- ⑧Nakazawa Y, Saenko V, Mitsutake N, (他 4 名): Reciprocal paracrine interactions between normal human epithelial and

mesenchymal cells protect cellular DNA from radiation-induced damage. Int J Radiat Oncol Biol Phys 71(2): 567-577, 2008, 査読有

- ⑨ Nakashima M, Suzuki K, Saenko V, (他 9 名): Foci formation of P53-binding protein 1 in thyroid tumors: activation of genomic instability during thyroid carcinogenesis. Int J Cancer 122(5): 1082-1088, 2008, 査読有
- ⑩ Matsuse M, Saenko V, Sedliarou I, Mitsutake N, (他 5 名): A novel role for thyroid hormone receptor beta in cellular radiosensitivity. J Radiat Res 49(1): 17-27, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Vladimir Saenko: Paracrine interactions between normal, but not cancer epithelial and normal mesenchymal cells attenuate radiation-induced DNA damage. The First International Symposium on Establishment of a new discipline "Medical Care for Hibakusha", 2008/1/31-2/4, Nagasaki
- ② 光武範吏: 甲状腺未分化癌に対する抗癌剤と分子標的治療薬の併用効果. 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 2008 年 5 月 16-18 日, 青森
- ③ 光武範吏: 甲状腺未分化癌細胞に対する NF-kappaB 阻害剤 DHMEQ とタキサンとの併用効果の検討. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋
- ④ Norisato Mitsutake: DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, enhances anti-tumor activity of taxanes in anaplastic thyroid cancer cells. 2008/11/08-12, Rio de Janeiro, Brazil
- ⑤ ウラジミール サエンコ: Preoperative evaluation of thyroid nodules by molecular analysis of FNAB materials. 第 51 回日本甲状腺学会, 2008 年 11 月 21-23 日, 宇都宮
- ⑥ サエンコ ウラジミール: Efficacy of molecular tests in preoperative diagnosis of thyroid nodules. 第 50 回日本甲状腺学会, 2007 年 11 月 15-17 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Vladimir Saenko (ウラジミール サエンコ)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 30343346

(2) 研究分担者

難波 裕幸 (NAMBA HIROYUKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 80237635

光武 範吏 (MITSUTAKE NORISATO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 50404215