

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16832

研究課題名（和文）プロテオーム解析を基軸として多分化能からアプローチする放射線感受性の要因解析

研究課題名（英文）Analysis of factors in radiosensitivity from the perspective of pluripotency and proteomes

研究代表者

石川 純也（Ishikawa, Junya）

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：70707215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、放射線感受性である造血幹/前駆細胞の多分化能を評価指標に、放射線誘発タンパク質損傷が多分化能や細胞死にどのように関与するのか、遺伝子の網羅的解析とも併せて検討した。その結果、より詳細な検討が必要であるものの、クローン増殖能喪失機構は複合的であり、細胞老化や炎症だけでなく、タンパク質も含む様々な因子への酸化損傷が関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、放射線による造血幹/前駆細胞のクローン増殖能喪失に細胞老化や炎症だけでなく、タンパク質も含む様々な因子への酸化損傷が関与している可能性を明らかにした。これに関与する因子は、放射線感受性の個体差が生じる機序の解明に向けた道標となることで、被ばく医療や放射線治療の個別化への応用発展の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed that radiation-induced dramatically decline of clonogenic potential in hematopoietic stem/progenitor cells may be due not only to cellular senescence and inflammation, but also to oxidative damage to various factors, including proteins. The factors involved in these processes are expected to serve as a guidepost for elucidating the mechanisms behind individual differences in radiosensitivity, thereby contributing to the development of strategies for radiation emergency medicine and individualization for radiotherapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：造血幹細胞 クローン増殖能 酸化損傷

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

放射線被ばくに伴う生物学的応答の重要な指標は細胞死であり、その標的は遺伝物質 DNA であるとされてきた。生涯に渡り血球を生み出す造血幹/前駆細胞は放射線に高い感受性を示すが、細胞死より低い線量 (<0.5 Gy) で分化・増殖能を喪失する。これには、一般的な放射線誘発細胞死とは異なる作用機序が考えられる。また、放射線によるタンパク質損傷が、加齢やそれに伴う疾患の根底にあるとする報告がある。即ち、放射線損傷からの細胞回復のボトルネックは情報 (DNA) ではなく機能 (プロテオーム) である可能性が指摘されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、放射線感受性である造血幹/前駆細胞の多分化能を評価指標に、放射線誘発タンパク質損傷が多分化能や細胞死にどのように関与するのか、遺伝子の網羅的解析とも併せて検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 生存細胞数及びクローン増殖能の評価

ヒト CD34<sup>+</sup>細胞へ 0~2 Gy の X 線を照射し、これらの生細胞数をトリパンブルー色素排除法にて計数することで生存細胞数を、50 個以上の細胞からなるコロニーをメチルセルロース法にて計数することでクローン増殖能を、それぞれ評価した。同様に、C57BL/6J マウスへ 0~4 Gy の X 線を全身照射し、大腿骨由来骨髓細胞より磁気ビーズ法を用いて Lin<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup> (LSK) 細胞を単離し、生細胞数とクローン増殖能を評価した。

### (2) 酸化損傷の評価

ヒト CD34<sup>+</sup>細胞または単離されたマウス LSK 細胞をそれぞれ酸化ストレス検出用蛍光試薬である HPF 等で染色し、フローサイトメトリー法にて蛍光強度を測定することで、細胞内に生じた活性酸素種 (ROS) を評価した。さらに、免疫蛍光染色法により gamma-H2AX foci を蛍光顕微鏡下で計数することで DNA2 本鎖切断頻度を評価した。一方、酸化損傷タンパク質の指標としてカルボニル化について ELISA 法による検出を試みた。

### (3) 遺伝子発現及びタンパク質発現の評価

ヒト CD34<sup>+</sup>細胞または単離されたマウス LSK 細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析からアノテーション情報を利用した発現変動遺伝子の機能的特徴解析を実施した。一方、質量分析法を用いて酸化損傷タンパク質の同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) X 線照射と生細胞数及びクローン増殖能の関連性

0, 0.5, 2 Gy の X 線を照射したヒト CD34<sup>+</sup>細胞の生存細胞数は、照射後 24 時間までに非照射群と比較し 50%程度にまで減少した。一方、生存細胞のクローン増殖能は、照射群で照射後 24 時間までに非照射群と比較し 20%未満にまで急激に低下し、照射後 48 時間までに大きな変化は見られなかった。

0, 2, 4 Gy の X 線を全身照射したマウス的大腿骨由来 LSK 細胞の生存細胞数は、照射後 12 時間までに非照射群と比較し 30%程度にまで減少した。一方、生存細胞のクローン増殖能は、4 Gy 照射群で照射後 3 時間までに非照射群と比較し 5%未満にまで急激に低下し、照射後 24 時間までに大きな変化は見られなかった。このとき、2 Gy 照射群は照射後 3 時間までに非照射群と比較し 70~80%程度のクローン増殖能を維持し、照射後 24 時間でも 60%程度を維持していた。

放射線照射は、ヒト CD34<sup>+</sup>細胞とマウス LSK 細胞の両方で、24 時間以内に生存細胞数減少をもたらすが、より早い時期に急激なクローン増殖能の低下を引き起こすことが明らかになった。

### (2) クローン増殖能喪失と酸化損傷応答の関連性

X 線による生体影響は主に細胞内 ROS に関連していることがよく知られているため、照射による変化を評価したところ、ヒト CD34<sup>+</sup>細胞とマウス LSK 細胞の両方でクローン増殖能が急激に失われた照射後 3 時間において細胞内 ROS の急激な増加を認めた。このとき、DNA2 本鎖切断頻度の指標である gamma-H2AX foci も同様に顕著な増加を認めた。一方、酸化損傷タンパク質の指標としてカルボニル化を評価したところ、照射後の変化が認められたものの、ばらつきが大きく、そのデータ解釈は慎重に検討する必要がある。これらの結果は、一部で細胞内 ROS や DNA2 本鎖切断といった酸化損傷がクローン増殖能喪失に関与していることを示唆するものだが、カルボニル化のようなタンパク質の酸化損傷がその責任の一端を担うのか、今後のさらなる検討が必要とされる。

(3) クローン増殖能喪失と遺伝子発現及びタンパク質発現の関連性

放射線照射から早い段階でクローン増殖能喪失が生じることが明らかになったため、照射後 6 時間における放射線応答遺伝子の機能的特徴を解析したところ、放射線照射により発現変動する遺伝子には細胞老化や炎症に関与する因子が多く含まれていた。さらに、放射線による細胞老化マーカーのタンパク質発現を評価したところ、照射後 24 時間までに SA-beta-Gal や p21 の発現が非照射群と比較し増加しており、これらは放射線によるクローン増殖能喪失の一因として細胞老化が関与していることを示唆している。一方、質量分析により酸化損傷タンパク質が生じていることは確認できたものの、クローン増殖能の喪失に対して責任の一端を担うようなタンパク質を同定するためには、今後のさらなる検討が必要とされる。

(4) 結論

放射線による造血幹/前駆細胞のクローン増殖能喪失は、速やかにかつ劇的に生じる。その機構は複合的であり、タンパク質も含む様々な因子への酸化損傷が関与していると考えられる。しかしながら、その責任をもつタンパク質の同定には、さらなる研究が必要とされる。今後は、それらの同定や詳細な機序解明により、被ばく医療の発展や放射線治療の副作用低減に資する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugawara K, Ishikawa J	4. 巻 78
2. 論文標題 Exploration of Indole Compounds as Candidate for Radiation Mitigators	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiological Technology	6. 最初と最後の頁 1295 ~ 1305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.6009/jjrt.2022-1283	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川純也, 菅原かや
2. 発表標題 3,3'-diindolylmethane がもつ放射線緩和作用とその作用機序の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原かや, 石川純也
2. 発表標題 X線照射したヒト正常細胞株における3,3'-diindolylmethaneの作用に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川純也, 菅原かや
2. 発表標題 3-(Dimethylaminomethyl)indoleはX線照射したヒト正常線維芽細胞株の生存細胞数減少を和らげる
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	柏倉 幾郎  (KASHIWAKURA Ikuo)		
研究協力者	山口 平  (YAMAGUCHI Masaru)		
研究協力者	山内 可南子  (YAMANOUCHI Kanako)		

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
---------	---------