

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：24601  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21310040  
 研究課題名（和文） 放射線適応応答の分子機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of Radioadaptation

研究代表者 大西 武雄（Takeo OHNIHI）  
 奈良県立医科大学・医学部・特任教授  
 研究者番号：60094554

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト培養正常型*p53*細胞をあらかじめの低線量放射線後に、高線量で照射した場合、明らかに放射線抵抗性と放射線誘導染色体異常出現頻度抑制に関する放射線適応応答を示した。あらかじめのNOラジカル発生剤を低濃度で処理することでもこの現象が観察された。また、ある特定の細胞周期の間に起こることを明らかにすることができた。一方、変異型*p53*細胞ではいずれの条件でも認められなかった。ネズミ個体をあらかじめ低線量放射線照射すると、後の水浸拘束ストレス誘発胃粘膜障害およびアポトーシスを軽減することを発見した。実際、そのとき、胃にHsp70の誘導が観察された。また、ヒト培養正常型*p53*細胞に宇宙放射線に対しても放射線適応応答があることがわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to examine biological effects of nitric oxide (NO) on radioadaptation such as the induction of radioresistance and the depression of chromosomal aberration from the cell cycle phase and *p53* gene status in human cancer cells. This radioadaptation effect was observed during a clearly shortened G<sub>2</sub>/M phase and a slightly prolonged S phase. By pre-irradiation with low dose or mild-heat treatment, we found that water-immersion stress (RWIS)-induced stomach ulcer and apoptosis in stomach cells were depressed though the induction of heat shock proteins. To clarify the biological effects of space environment, especially space radiations, a space experiment of “Rad Gene” was performed as the first life experiment with two human lymphoblastoid cell lines bearing wild-type *p53* gene (*wt-p53*) and mutated *p53* gene *mp53* in an International Space Station (ISS) for 133 days. The space flown cells at frozen state were cultured and then exposed to challenging X-ray-irradiation. All of the radioadaptive responses of cell killing, apoptosis, chromosomal aberrations and mutations were found only in *wt-p53* cells, but not in the *mp53* cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000

総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000
----	------------	-----------	------------

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：(1) 放射線適応応答 (2) p53 (3) NO ラジカル (4) 放射線感受性 (5) 染色体異常 (6) 水浸拘束マウス (7) ストレス (8) 宇宙放射線

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は低線量放射線に被ばくしたことを記憶する。その現象の一つとして放射線適応応答が知られている。放射線適応応答とは、あらかじめの低線量域(window)の放射線被ばくと次の高線量の放射線被ばくまでの特定な時間間隔(interval)に応答する種々の分子の相互作用により、細胞が放射線抵抗性を一時的に獲得する現象である。我々は p53、Hdm2、iNOS が放射線適応応答に重要な役割を担っていることを、ヒト培養細胞を用いることによって明らかにしてきた。また、マウス個体を用いて、脾臓には放射線適応応答があることを確認していた(Matsumoto *et al*, 2007, Takahashi *et al*, 2008)。

### 2. 研究の目的

適応応答にはあらかじめの放射線の特定な線量域(window)と、そのあらかじめの放射線被ばくから次の放射線被ばくまでに特定な時間間隔(interval)が必要である。一体、細胞の放射線被ばくの記憶装置とは何か？この現象を担う遺伝子を明らかにすることをめざしてきた。がん抑制遺伝子 p53のみ異なるヒト培養細胞を持ingることにより、放射線適応応答のしくみを明らかにする。また、あらかじめのストレスが後にくる放射線をはじめとする他のストレスにも強くなる現象が細胞、マウス個体で起こるかもあわせて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

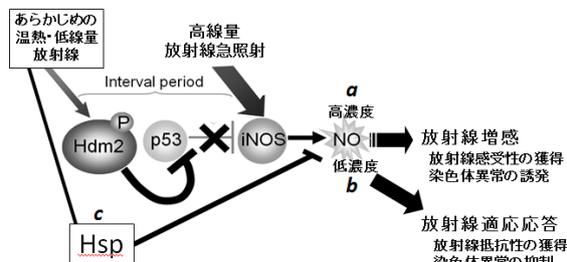
ヒト肺がん培養 p53 欠損細胞株に正常型 p53 遺伝子または変異型 p53 遺伝子を導入することによって、p53 遺伝子のみ異なる細胞株を製作し用いた。また、正常ヒトリンパ芽球 TK6 細胞由来の正常型 p53 細胞 TSCE5 および変異型 p53 細胞 WTK1 を用いた。放射線適応応答に関して p53 遺伝子が果たす役割を明らかにするために、細胞の放射線感受性はコロニー形成能で、アポトーシスは細胞形態・DNA 分解・アポトーシス関連タンパク質の免疫組織的分析またはウエスタンブロットで、遺伝子不安定性は染色体異常または突然変異誘発率で測定した。あらかじめ低線量放射線または後の高線量放射線の急照射は X 線発

生装置で行った。放射線による遺伝子損傷の二本鎖切断(DSB)を  $\gamma$ H2AX の抗体で染色し、可視化した。DSB 生成量、アポトーシス頻度および細胞周期分布をフローサイトメトリーで定量した。重粒子線が核に DSB を連続的なトラック状に起こすことを可視化すること、宇宙放射線の生物学的線量測定に成功した。培養細胞に温熱ストレスを与える方法として、恒温水槽に培養ボトルを沈めて、細胞を温熱処理した。

マウスは、C57BL/6 N、8 週齢、雄を使用した。温熱処理には、空気穴を開けた段ボール製の箱にマウスを入れ、インキュベーターによって指定の各温度で 30 分処理した。また、各温度につき、水浸ストレスを与えない群、水浸ストレス 3 時間処理群に分けて比較した。マウスを飼育容器に入れた状態で、37°C インキュベーターにて 30 分間保温した。コントロール群の水浸拘束非処理群は、給餌なしで 3 時間処理した。あらかじめの HSP 誘導剤(GGA)投与による処理は、200 mg/kg で 2 回/日、ストレスを与える前の 1 週間の間、経口で与えた。GGA の投与は、5%のアラビアゴムと 0.008%のトコフェロールを用いた乳剤として調整し、ピペットにて直接経口で与えた。水浸拘束ストレスを与える方法として、剣状突起の位置まで水に浸かるように、穴をあけた 50ml の遠心管にマウスを拘束し、25°C の恒温槽にて水浸した。水浸拘束ストレス処理後、取り出した胃壁を撮影した後、胃潰瘍の出現率を求めた。

### 4. 研究成果

ヒト培養正常型 p53 細胞(H1299/wt p53)にあらかじめの低線量放射線(0.02 Gy)照射の6時間後に高線量(6 Gy)を急照射した場合、高線量の単一照射と比べて明らかに放射線抵抗性と放射線誘導染色体異常(二動原体)出現頻度を抑制する放射線適応応答を示した。一方、変異型 p53 細胞(H1299/mp53)では同様の条件でも放射線抵抗性および染色体異常誘発の抑制は認められなかった。適応応答はがん抑制遺伝子 p53 依存的であることを示した。あらかじめの放射線の代わりに、あらかじめの NO ラジカル発生剤を低濃度(5  $\mu$ M)で処理することで、放射線感受性が抵抗性になり、アポトー



### 放射線適応応答の分子機構モデル

シス出現頻度が減少した(図b)。さらに、染色体異常の出現頻度も減少した(図b)。一方、高濃度(500 μM)NOラジカル発生剤処理することで放射線による生存率が感受性になり(図a)、アポトーシス出現頻度が増加した。さらに、染色体異常の出現頻度が増加した(図a)。この現象が細胞周期のG<sub>2</sub>/M期の短縮とS期の遅延の間に起こることを明らかにすることができた。一方、あらかじめの高線量の放射線照射や高濃度NOラジカル発生剤の処理による増感および誘導染色体異常発生の促進はG<sub>2</sub>/M期の延長とS期の短縮の間に観察された。したがって、放射線適応応答機構にNOラジカル発生が大きく関与していることを明らかにした。これに対して、変異型mp53細胞ではNOラジカル発生剤処理による放射線感受性および染色体出現頻度の変化は認められなかった。正常型p53遺伝子を有する細胞にのみ、NOラジカルは濃度の違いによって二相性の放射線感受性と染色体異常の出現頻度を示した。正常型p53細胞で見られる放射線適応応答はNOラジカルスカベンジャー(cPTIO)やHsp90阻害剤(AAG)で抑制された(図c)。一方、変異型p53細胞ではAAGの添加によって放射線感受性になった(図a)。この感受性は正常型p53細胞の同線量の放射線照射したときとほぼ同じであった。

ネズミ個体をあらかじめ低線量放射線照射すると、後の水浸拘束ストレス(RWIS)誘発胃粘膜障害を軽減することを発見した。対照実験としてあらかじめHsp誘導剤処理による胃粘膜障害とアポトーシス発現頻度の関わりと、さらにあらかじめの低線量放射線照射によるHspの蓄積について調べた。あらかじめの低線量放射線照射はHspを胃の細胞に誘導することによってRWIS誘発胃粘膜障害を軽減させたものと我々は考えた。実際に、我々は胃にHsp70およびHsp90が高発現していることを確認した(図b)。

2009年に実施された宇宙国際ステーション(ISS)での宇宙実験を解析した。ヒトリンパ芽球TK6細胞由来の正常型p53細胞TSCE5および変異型p53細胞WTK1を用いた。ISSのフリーザーで133日間保存させ宇宙放射線に曝露させたサンプルの細胞死・アポトーシス・染色体異常・突然変異・LOH(染色体異常の一種)誘導の抑制率を測定した。低線量のX線を照射させたものを地上コントロールとした。宇宙

放射線の物理測定では約45mSvであった。放射線適応応答が測定できる線量のWindow(線量域)であった。正常型p53細胞にのみこれらの放射線適応応答が観察された。また、世界で初めて生きた細胞を用いて、宇宙放射線の生物学的線量測定に成功した。物理的線量よりも約30%高い測定値を得た。

また、宇宙環境で1g環境、微小重力環境、地上コントロールでこの2種の細胞を培養して、合成または抑制されるタンパク質を宇宙放射線影響、微小重力環境影響、宇宙環境影響に分けて、遺伝子発現を解析した。これらのすべての成果を論文として発表した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 43 件)

うち査読付論文 計 (35) 件

[図 書] (計 6 件)

[学会発表] (計 125 件) 略

特別講演 28 件、国際会議 26 件

シンポジウム 27 件、一般演題 44 件

[雑誌論文]

- ① Ohnishi, T. The Disaster at Japan's Fukushima-Daiichi Nuclear Power Plant after the March 11, 2011 Earthquake and Tsunami, and the Resulting Spread of Radioisotope Contamination. *Radiat Res.* 2012、査読有、177、1-14.
- ② Takahashi, A. 他 6 名 & T. Ohnishi Expression of p53-regulated proteins in human cultured lymphoblastoid TSCE5 and WTK1 cell lines during spaceflight. *J Radiat Res.* 査読有、2012、53、168-175.
- ③ Yatagai, F. 他 10 名の内 8 番目 Preliminary results of space experiment: Implications for the effects of space radiation and microgravity on survival and mutation induction in human cells. *Adv Space Res.* 査読有、2012、49、125-134.
- ④ Yatagai, F. 他 15 名の内 13 番目 Frozen human cells can record radiation damage accumulated during space flight; mutation induction and

- radioadaptation. *Radiat Environ Biophys*, 査読有、2011、50、125-134。
- ⑤ Su, X. 他6名の内6番目 Nitric oxide radical induced radioadaptation and radiosensitization is G<sub>2</sub>/M phase-dependent. *J Radiat Res*, 査読有、2011、52、609-615。
- ⑥ Takahashi, A. 他7名の内7番目 Expression of *p53*-regulated genes in human cultured lymphoblastoid TSCE5 and WTK1 cell lines after spaceflight in a frozen state. *Adv Space Res*, 査読有、2011、47、1062-1070。
- ⑦ Takahashi, A. 他9名の内9番目 *p53*-Dependent adaptive responses in human cells exposed to space radiations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 査読有、2010、78、1171-1176。
- ⑧ Takahashi, A. 他7名の内7番目 The expression of *p53*-regulated genes in human cultured lymphoblastoid TSCE5 and WTK1 cell lines during spaceflight. *Int J Radiat Biol*, 査読有、2010、669-681。
- ⑨ Su, X. 他7名他7名の内7番目 Biphasic effects of nitric oxide radicals on radiation-induced lethality and chromosome aberrations in human lung cancer cells carrying different *p53* gene status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 査読有、2010、559-565、77。
- ⑩ 大西武雄 他11名 国際宇宙ステーション Kibo 利用宇宙実験「Rad Gene」の成果報告、放射線生物研究、査読無、2010、45、103-126。
- ⑪ Ohnishi, T 他6名 Detection of space radiation-induced double strand breaks as a track in cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、2009、390、485-488。
- ⑫ Yamagata, R 他4名の内4番目 Restraint plus water-immersion stress (RWIS)-induced stomach ulcers in mice are depressed by a conditioning heat treatment. *Thermal Med*, 査読有、2009、25、81-87。
- ⑬ Ohnishi, T 他5名 Expression of *p53*-regulated genes in cultured mammalian cells after exposure to a space environment. *Biol Sci Space*, 査読有、2009、23、3-10。
- ⑭ Yatagai, F. 他10名の内9番目 LOH analyses for biological effects of space radiation: human cell culture in “Kibo” of International Space Station. *Biol Sci Space*, 査読有、2009、23、11-16。
- ⑮ Takahashi, A. & T. Ohnishi A priming heat treatment can induce the development of heat- and radio-resistance *via* HSPs, regardless of *p53*-gene status. *Thermal Med*, 査読有、2009、25、13-23。
- ⑯ Takahashi, A. & T. Ohnishi A low dose pre-irradiation induces radio- and heat-resistance via HDM2 and NO radicals, and is associated with p53 functioning. *Adv Space Res*, 査読有、2009、43、1185-1192。
- ⑰ Ohnishi, T., A., E. Mori & A. Takahashi DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutat Res*, 査読有、2009、669、8-12。
- [図書] (計6件)
- ① Ohnishi, T., A. Mori & A. Takahashi

Encyclopedia of Cancer ( $\gamma$  H2AX),  
Springer-Verlag、査読有、2009、総  
ページ数 3。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大西 武雄 (Takeo OHNISHI)

**奈良県立医科大学・医学部・特任教授**

研究者番号：60094554

### (2) 研究分担者

高橋 昭久 (Akihisa TAKAHASHI)

**群馬大学・准教授**

研究者番号：60275336