

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07736

研究課題名(和文)放射線障害に関わる遅発性活性酸素と核外シグナルの機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism between delayed ROS and extra-nuclear signal involved in radiation effects

研究代表者

菓子野 元郎 (Kashino, GENRO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00437287

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)：放射線照射後の遅発性活性酸素がどのように核内におけるDNA損傷応答に関わるのかについて調べた。まず核外のみX線マイクロビームで照射された場合、3Gy照射で生存率の低下が見られたが、遅発性活性酸素をアスコルビン酸誘導体(AA2G)で抑制した場合においても生存率は未処理の場合と変わらなかった。細胞全体照射ではAA2Gによる生存率の上昇が見られたため、遅発性活性酸素は核でヒットした後のDNA損傷を起点とするシグナルを補助的に増幅する役割を担っていることが示唆された。遅発性活性酸素は、核内におけるATM-p53シグナルを照射3日後以降でも維持する役割を担い、細胞死、老化誘導に寄与することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線障害を引き起こす細胞内の機構の一部を解明することができた。この研究により、放射線障害を抑制する方法の探索が前進するものと期待される。特にアスコルビン酸のような抗酸化剤は放射線障害を抑制する上で役立つが、その処理は照射前からでなく、照射後からでも効果が期待される可能性が高いことが分かった。さらに新たな放射線防護剤の開発においても、今回明らかにした機構が指標として使える可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We investigated how delayed reactive oxygen species after radiation exposure are involved in the DNA damage response in the nucleus. First, when only the outside of the nucleus was irradiated with an X-ray microbeam, a decrease in survival rate was observed with 3 Gy irradiation, but even when delayed reactive oxygen species were relieved, the survival rate was not different from that of the untreated control. When the whole cell was irradiated, an increase in survival rate was observed with AA2G, suggesting that delayed reactive oxygen species play a role in auxiliary amplification of signals originating from DNA damage after hitting the nucleus. It was found that delayed reactive oxygen species play a role in maintaining the ATM-p53 signal in the nucleus even after 3 days from irradiation, and contribute to the induction of cell death and senescence.

研究分野：放射線生物学

キーワード：活性酸素 ATM p53 細胞老化 放射線

1. 研究開始当初の背景

放射線治療において、照射装置の革新に伴う正常組織への線量軽減策が進化する一方で、生物学的な障害誘発機構に立脚した防護法の確立はうまくいっていない。そのことは照射線量の制限につながり、がんの治療効果に影響する。放射線生物研究では、「DNA 標的」が重要な障害誘発の原因と画一的に考えられ、研究が「DNA 損傷シグナル」の機構解明に集中した。その結果、DNA 損傷応答の解明は進み、その機構が防護標的とされた。しかし、放射線で即発的に誘発される DNA 損傷は、がん細胞でも正常細胞でも同様に生じるので、そのシグナルを防護標的とするのは、物理的な線量軽減による DNA 損傷量を軽減する策と変わらず、生物学的機構の特性が生かされていないと言える。一方、「非 DNA 標的反応 (核外シグナル)」は、あまり研究されてこなかった。その中で、マイクロビームの技術革新により細胞内領域照射の精度が向上した結果、核外 (細胞質) 照射であっても遺伝子突然変異が増えることが報告された (Wu et al. 1999)。このことは、核外シグナルがゲノム安定性に影響し、細胞障害性にも関与することを示唆している。しかし、照射後の核外シグナルの詳細が十分解明されたとは言えず、核外シグナルが放射線防護の標的となりうるか否かもまだわからない。また、放射線により生じることがよく知られる活性酸素は、一般的に免疫系の炎症反応における関与がよく知られている。照射後の晩期障害において、活性酸素が分泌性因子 (老化誘導 SASP 因子) を介して炎症反応を増幅させるメカニズムも提唱されている (Chapman et al FEBS let 2019)。従って、現状としては、照射後の活性酸素が細胞障害の原因となるという現象論は受け入れられているが、分子機構はまだ十分に解明されていない段階にあると言える。照射後の DNA 標的による反応では、DNA 修復、細胞周期停止を促すため、ATM-p53 の活性化が引き起こされる。しかし、p53 活性が長期間維持される機構はよくわかっていない。ATM-p53 経路は、DNA 標的反応に依存せずとも酸化反応でも活性化することが報告され (Guo et al Science 2010)、照射で生成した活性酸素が ATM-p53 活性維持に関わる可能性は高い。我々は、照射後数日間継続して発現するミトコンドリア由来の「遅発性活性酸素」が老化誘導に関与することを見出している (Kobashigawa et al. 2015)。遅発性活性酸素が ATM 活性化に関わる可能性が示唆されるが、照射後の核外シグナルの機構の中でどのような役割を果たし、老化誘導に結びつくのかについてはわかっていない。以上のことから、放射線障害の機構解明において、遅発性活性酸素、及び ATM-p53 が「核外シグナル」の中で果たす役割を解明する必要性があると思われる (Figure 1)。

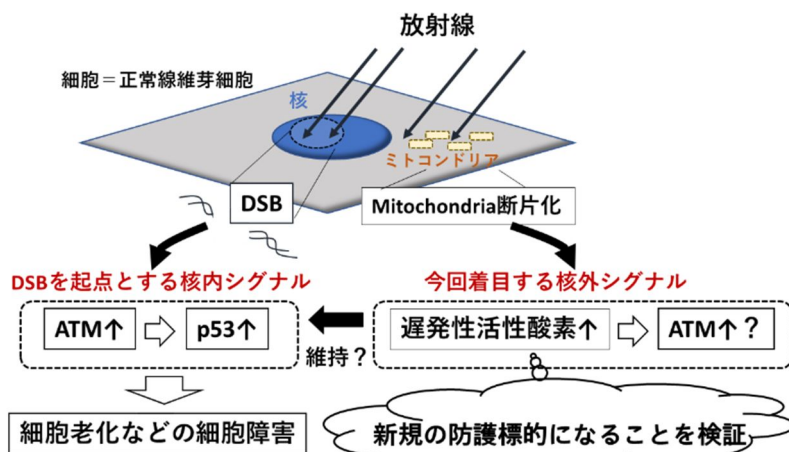


Figure 1 放射線による細胞障害に核外シグナルが関与するモデル図。核におけるイベントはDNA損傷に由来するのに対し、核外シグナルはミトコンドリアを起点とし、遅発性活性酸素がシグナルの鍵となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「遅発性活性酸素が ATM-p53 活性化を介して細胞の老化誘導する機構」を解明することである。従来の放射線防護研究において、「活性酸素は照射後に DNA 損傷を誘発するもの」「DNA 損傷依存的に細胞障害が生じる」といった考えが基盤になるものが多くみられた。これに対して、我々は照射数日後のミトコンドリア形態変化を起点とする活性酸素の生成に着目し、核外で生成した遅発性活性酸素が老化誘導における細胞周期停止シグナルに関わると考えている (Figure 1)。細胞内領域を核内と核外に分けてマイクロビーム照射する手法を用い、細胞内領域ごとに「電離作用から活性酸素生成に至る経路」を調べることを試みる。

3. 研究の方法

(1) X線マイクロビーム照射による実験

X線マイクロビームは、高エネルギー加速器研究機構の放射光(X線)マイクロビームを利用した。細胞はヒト正常細胞であるHE49を用いた。照射前日(照射12~16時間前)、2.5 μm厚のマイラーフィルムのマイクロビームディッシュ中央に細胞を約200個になるように植え込み、照射直前にHoechst33342で細胞核を染色した。X線マイクロビーム(5.35 keV)照射は、26 μmの遮へい体で細胞核部分を遮へいして、40 x 40 μm角のサイズで細胞質部分を照射した。細胞を一つずつスキャンし、位置情報と細胞数を把握した上で、約3 Gyの吸収線量になるようにマイクロビーム照射した。照射後、トリプシン処理で細胞をはがし、細胞懸濁液をコロニー形成に用いた。コロニー形成は、2.5 mMアスコルビン酸2グルコシド(AA2G)有りとなしの培地を用意し、一つのマイクロビームディッシュから回収した細胞懸濁液を二つに分け、それぞれの培地でコロニー形成させた。14日後、コロニーをメタノール固定し、ギムザ染色した。50個以上の細胞からなるコロニーの数を数え、植え込んだ細胞数との比より、plating efficiency (PE)を算出した。未照射時のPEに対する3 Gy照射時のPEの比より、生存率を求め、AA2G処理、すなわち遅発性活性酸素除去時における生存率の変化を調べた。

(2) HIMAC 照射実験

HIMAC(量研機構放医研)より生成されるLETの異なる2種の炭素線(13 keV/μmと73 keV/μm)を用いて、HE49に照射した。本学にあるX線照射装置による照射後の影響を対照とし、炭素線照射後の遅発性活性酸素の誘導、老化誘導、各種タンパク質発現変化を比較した(照射対象はT25フラスコに培養したHE49細胞、N=3で実施)。各放射線6 Gy照射3日後と7日後における活性酸素の量をOxiorangeによる蛍光値で評価し、遅発性活性酸素の誘導能を調べた。照射3日後と7日後のタンパク質を抽出し、p53、p21、及びリン酸化KAP1のレベルをWestern blotで調べた。さらに、照射細胞の生存率をコロニー形成法で調べ、照射10日後の老化細胞頻度をSPIDER β-Gal法で調べた。遅発性活性酸素の抑制には、照射終了後に2.5 mMアスコルビン酸2グルコシド(AA2G)処理を用いた。

(3) 細胞分画におけるATM活性化

遅発性活性酸素によるATM活性化する場所を調べるため、放射線照射後のHE49細胞の分画を核、細胞質、ミトコンドリアに分けてタンパク抽出し、ATMのセリン1981リン酸化をwestern blotで調べた。

4. 研究成果

(1) X線マイクロビーム照射による実験

生存率の結果をFigure 2に示した。3 Gyの核外照射時、生存率が約75%であった。AA2G処理時において、生存率の変化はほとんど見られなかった。従って、核外照射時における遅発性活性酸素の致死への影響は見られない可能性が高い。

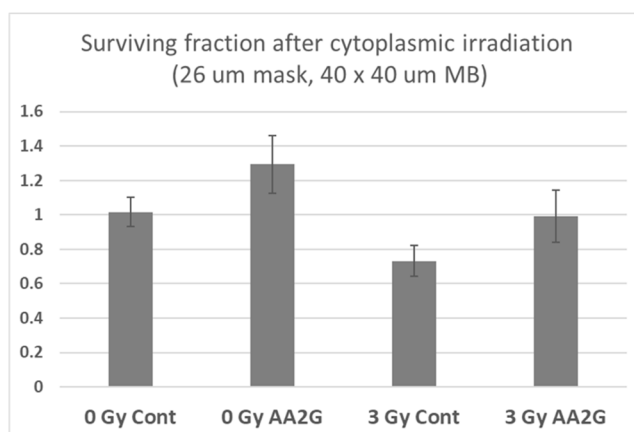


Figure 2: 核外マイクロビーム照射による生存率

一方で、細胞全体を照射した後、AA2Gを処理すると、未処理時に比べて有意に生存率が高くなる。このことから、AA2Gによる放射線防護効果は、核におけるDNA損傷が起点となる細胞死に関わることが強く示唆される。今後、X線マイクロビームによる「細胞核のみ照射」において、AA2Gが防護効果を示すか否かを明らかにしていきたい。

(2) HIMAC 照射実験

同一吸収線量(6 Gy)で比較した場合、遅発性活性酸素の生成量、及び致死効果は X 線 < 13 keV/mm 炭素線 < 74 keV/mm 炭素線の順であった (Figure 3,4)。AA2G による防護効果は 74 keV/mm (高 LET) ではほとんど見られず、老化誘導抑制効果も小さかったことから、遅発性活性酸素の細胞障害への寄与は高 LET では少ないと示唆される。74 keV/mm 炭素線では照射 3 日後にみられる KAP-1 活性化が高く、クロマチン損傷が長期に渡り残存している可能性が示唆された。以上の結果より、遅発性活性酸素は p53 を長期間維持する働きにより老化誘導を促進している可能性が示唆された。高 LET 照射では、これらの経路に依存しない核損傷だけで p53 活性を維持し、老化を誘導している可能性が示唆される。

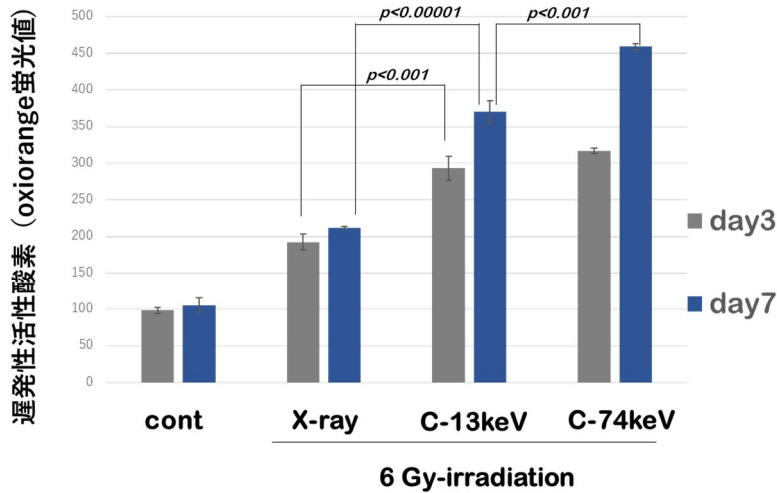


Figure 3 遅発性活性酸素の生成量。照射3日後と7日後の結果。細胞はHE49細胞。

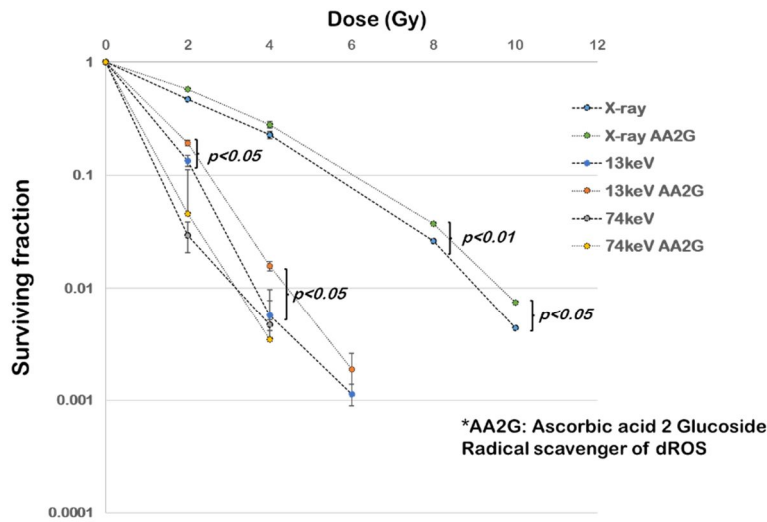


Figure 4 X線、炭素線照射後の生存率、及びAA2G処理後の防護効果。細胞はHE49細胞。

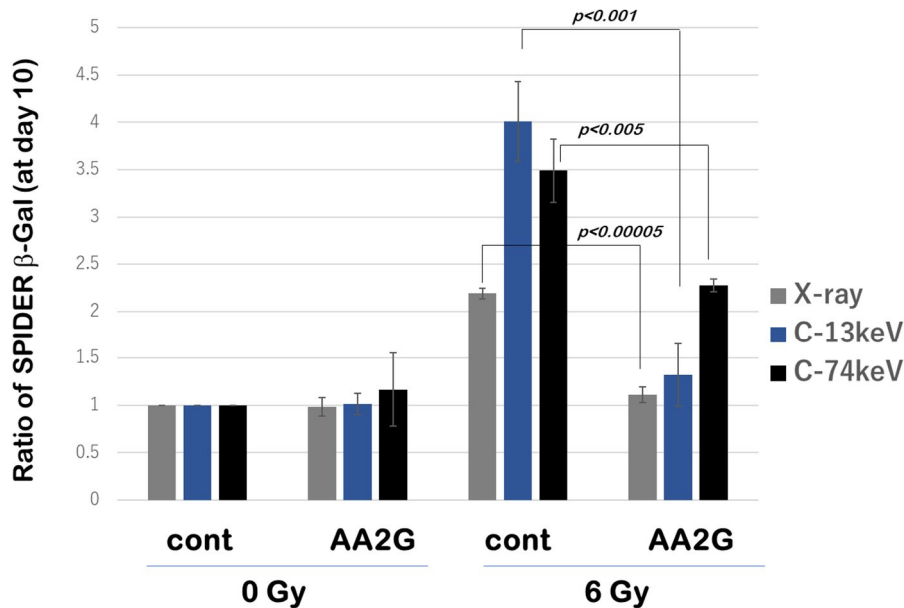


Figure 5 X線、炭素線照射後の老化誘導の比較。細胞はHE49細胞。

(3) 細胞分画における ATM 活性化

HE49 細胞において、6 Gy 照射後の ATM リン酸化を調べた。照射直後から 2.5 mM AA2G を継続的に処理し、照射 3 日後に細胞分画を抽出した。その結果、核分画では顕著にリン酸化 ATM が検出されたが、細胞質分画とミトコンドリア分画では検出されなかった。核分画でのリン酸化 ATM は AA2G 処理により抑制されていたので、遅発性活性酸素はミトコンドリアで生じるが、核における ATM 活性化に寄与することが示唆された。今後、どのように ATM を活性化しているのかについて解明していきたい。

以上の (1) ~ (3) の結果より、放射線による DNA 二本鎖切断を起点とした老化誘導や細胞死において、遅発性活性酸素は ATM-p53 の活性を維持する働きにより障害を促進している。高 LET 照射時は DNA 損傷応答シグナルが長期間強く維持されるので、遅発性活性酸素の働きは少なくなると示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 菓子野元郎、小橋川新子	4. 巻 58
2. 論文標題 放射線による細胞内活性酸素誘導機構の再考察	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 238-249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kashino Genro, Kobashigawa Shinko, Uchikoshi Aoki, Tamari Yuki	4. 巻 62
2. 論文標題 VEGF affects mitochondrial ROS generation in glioma cells and acts as a radioresistance factor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiation and Environmental Biophysics	6. 最初と最後の頁 213 ~ 220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00411-023-01021-8	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 菓子野元郎、熊谷純、有吉健太郎、小嶋光明	4. 巻 56
2. 論文標題 放射線誘発バイスタンダー効果およびレスキュー効果の実態と今後の展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 19-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 小橋川新子、菓子野元郎	4. 巻 57
2. 論文標題 放射線によるATM活性化機構について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 50-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔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 Genro Kashino, Shinko Kobashigawa
2. 発表標題 Mechanism of radiation-induced mutagenesis through the mitochondrial ROS generation
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Genro Kashino, Shinko Kobashigawa, Masao Suzuki
2. 発表標題 Contribution to delayed ROS generation and induction of cellular senescence by carbon beam irradiation
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 Shinko Kobashigawa, Genro Kashino
2. 発表標題 Mitochondrial ROS by ionizing radiation induce cellular senescence through ATM activation
3. 学会等名 日本放射線影響学会第 6 4 回大会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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