

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592774

研究課題名(和文) 28日間宇宙環境に暴露された細胞は細胞死に対し抵抗性を獲得するか？

研究課題名(英文) Are SK-N-SH cells after space radiation exposure (space cells) radioresistance or not?

研究代表者

犬童 寛子 (INDO, HIROKO)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00301391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：宇宙放射線から戻ってきた細胞を用い、放射線抵抗性獲得の有無、その機序解明を行った。宇宙細胞では、明らかな細胞増殖速度の増大、活性酸素発生の増大および、ミトコンドリアに局在する活性酸素除去酵素MnSODの増大が認められた。宇宙細胞ではMnSODはSurvivinの発現を促進し、Beclin1の発現を抑制することで、オートファジーの発現を減少させていることが示唆された。またMnSODがアポトーシス抑制遺伝子であるBcl-2の発現を誘導し、それによって細胞死を抑制させ、放射線抵抗性を獲得することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Radiation exposure dose in space accounts for 0.2～10 mSv per day. We previously suggested that low dose radiation as well as microgravity may cause intracellular oxidative stress and result in different types of cell death. We sent the SK-N-SH cells to International Space Station, at Japan Experimental Module, in 2010, and cells were cultured in JEM. Cells were frozen and came back to ground. After that, cells were thawed up and have been re-cultured (space cells). We examined whether space cells are radioresistance or not? Space cells were generated more intracellular ROS and MnSOD activity. Space cells after 10Gy X-irradiation induced survivin expression and reduced Beclin1, resulting in inhibit autophagy. On the other hands, MnSOD overexpressed space cells after 10Gy x-irradiation induced Bcl-2 expression compared with control cells. The results suggest that SK-N-SH cells after space radiation exposure (space cells) are radioresistance on X-ray induce cell death.

研究分野：放射線生物学

キーワード：radioresistance cell death autophagy

1. 研究開始当初の背景

我々は放射線照射によりミトコンドリアから出てくる活性酸素とアポトーシスが関連することを明らかにしてきた。(Indo et al., FRR, 2012)。一方、宇宙実験としては、これまで地上において宇宙環境に近い線量、微小重力の環境を想定し、ヒト神経芽細胞腫であるSK-N-SH細胞を用い、宇宙環境が及ぼす影響を調べてきた。我々は宇宙環境が及ぼす影響は遺伝子に直接的に影響を及ぼすだけではなく、細胞内に活性酸素を発生させ、この活性酸素が細胞の機能低下や老化を引き起こすことが考えられることをすでに報告している(Majima et al., Biological Sciences in Space, 2009)。

2. 研究の目的

本研究では宇宙放射線をあび、地上に戻ってきたヒト神経芽細胞腫(SK-N-SH細胞)を用い、多くの腫瘍細胞に発現し、カスパーゼを抑制することでアポトーシスを抑制することが知られている survivin に注目し、survivin とアポトーシスおよびオートファジーとの関連性を調べるにより放射線抵抗性の新たな機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

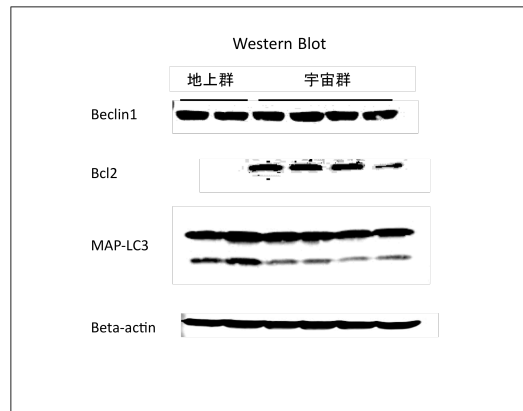
- (1) 宇宙から戻ってきたSK-N-SH細胞にX-ray10Gyを照射し、アポトーシスおよびオートファジーの検出を行い、放射線抵抗性の有無を調べる。
- (2) コントロール細胞および宇宙から戻ってきた細胞を用い、アポトーシス抑制タンパク質survivin、Bcl 2、オートファジー関連蛋白 Beclin1の効果調べる。
- (3) 宇宙から戻ってきたSK-N-SH細胞にMnSODを過剰発現させ、10Gy照射した時のsurvivin、Bcl 2、Beclin1の発現を検討する。
- (4) MnSODを過剰発現細胞株にさせ、オートファジーを検出し、MnSOD とsurvivinとの関連性について検討する。

4. 研究成果

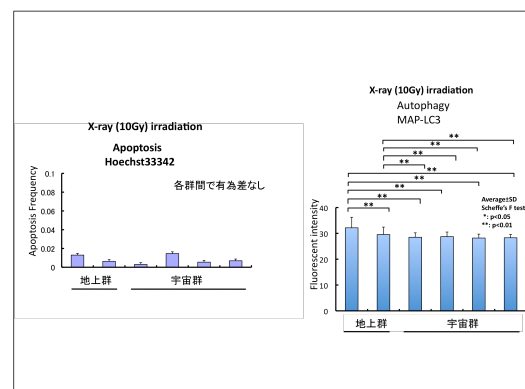
宇宙細胞では、明らかな細胞増殖速度の増大、活性酸素発生の増大および、ミトコンドリア局在 MnSOD の増大が認められた。コントロール細胞と宇宙細胞を用い、オートファジー関連遺伝子 Bcl-2 の発現についてはコントロール細胞に比べて宇宙細胞では明らかに発現は増大していたが、Beclin 1 の発現についてはほとんど差が見られなかった(図1)。また Survivin の発現についても有為な差が認められなかった。次に、X線10Gy照射後の細胞において、アポトーシスには変化が認められず、オートファジーの減少が認められることが明らかとなった(図2)。これらの結果から MnSOD 活性とオートファジーとの関連性が浮かび上がってきた。従って、オートファジー関連遺伝子発現について検

討した。

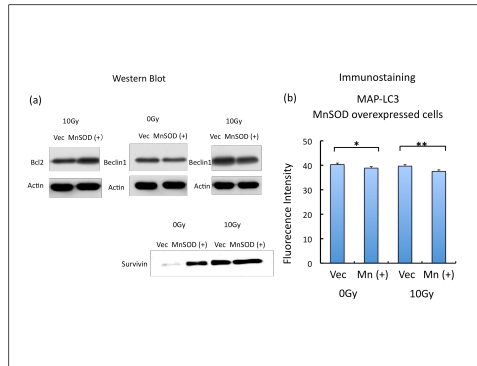
MnSOD を過剰発現した細胞に、X線10Gyを照射したとき Bcl-2 の発現についてはコントロール細胞に比べて細胞では明らかに発現は増大していたが、Beclin 1 の発現は有意に減少していた(図3-a)。また Survivin の発現は有意に増加していた。一方、オートファジーは MnSOD を過剰発現した細胞では10GY照射後、発現が低下していた(図3-b)。以上の結果から、宇宙細胞では MnSOD は Survivin の発現を促進し、Beclin 1 の発現を抑制することで、オートファジーの発現を減少させていることが示唆された。また MnSOD がアポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現を誘導し、それによって細胞死を抑制させているから、放射線抵抗性を獲得することが示唆された。



(図-1) 細胞死関連遺伝子の発現 (ウエスタンブロット)



(図-2) X線10Gy照射後の細胞死の検出アポトーシスの検出(左)とオートファジーの検出(右)



(図-3) MnSOD 過剰発現細胞に x 線 10Gy 照射後の細胞死関連遺伝子の発現 (a) とオートファジーの検出

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 11 件)

1) Indo HP, Tomiyoshi T, Suenaga S, Tomita K, Suzuki H, Masuda D, Terada M, Ishioka N, Gusev O, Cornette R, Okuda T, Mukai C and Majima HJ: MnSOD downregulation induced by extremely low 0.1 mGy single and fractionated X-rays and microgravity treatment in human neuroblastoma cell line, NB-1. J Clin Biochem Nutr. 査読有, 2015 (in Press).

2) Indo HP, Matsui H, Chen J, Zhu H, Hawkins CL, Davies MJ, Yarana C, St Clair DK, Majima HJ: Manganese superoxide dismutase promotes interaction of actin, S100A4 and Talin, and enhances rat gastric tumor cell invasion. J Clin Biochem Nutr. 査読有, 2015 (in Press).

3) Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, Matsui H, Gusev O, Cornette R, Okuda T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Suenaga S, Oki M, Sato T, Ozawa T, Clair DK, Majima HJ. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. J Clin

Biochem Nutr. 査読有, 2015 Jan;56(1):1-7.

4) Ito H, Tamura M, Matsui H, Majima HJ, Indo HP, Hyodo I: Reactive oxygen species involved cancer cellular specific 5-aminolevulinic acid uptake in gastric epithelial cells. J Clin Biochem Nutr. 査読有, 2014, 54(2):81-5.

5) Tamura M, Matsui H, Tomita T, Sadakata H, Indo HP, Majima HJ, Kaneko T, Hyodo I: Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion. J Clin Biochem Nutr. 査読有, 2014, 54(1):12-7.

6) Indo HP, Nakanishi I, Ohkubo K, Yen H-C, Nyui M, Manda S, Matsumoto K, Fukuhara K, Anzai K, Ikota N, Matsui H, Minamiyama Y, Nakajima A, Ichikawa H, Fukuzumi S, Ozawa T, Mukai C and Majima HJ: Comparison of in vivo and in vitro antioxidative parameters for eleven food factors. RSC advances. 査読有, 2013, 3(14): 4535-38.

7) Haraguchi M, Indo HP, Iwasaki Y, Iwashita Y, Fukushige T, Majima HJ, Izumo K, Horiuchi M, Kanekura T, Furukawa T, Ozawa M: Snail modulates cell metabolism in MDCK cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 2013, 432(4):618-25.

8) Nakanishi-Ueda T, Majima HJ, Watanabe K, Ueda T, Indo HP, Suenaga S, Hisamitsu T, Ozawa T, Yasuhara H, Koide R: Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. Free Radic Res, 査読有, 2013, 47(10):774-780.

9) Tamura M, Matsui H*, Nagano YN, Kaneko T, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I: Salt is an

oxidative stressor for gastric epithelial cells. J Physiol Pharmacol. 査読有, 2013, 64(1):89-94.

10) Indo HP, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, Yen H-C, Kakinuma S, Matsumoto K, Nakanishi I, St Clair W, St Clair DK, Matsui H, Cornette R, Gusev O, Okuda T, Nakagawa Y, Ozawa T & Majima HJ: Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. Free Radic Res, 査読有, 2012, 46(8):1029-43.

11) Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Hirayama A, Tamura M, Nakamura Y, Kaneko T, Rai K, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I: Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induced lipid peroxidation by the manganese superoxide dismutase (MnSOD) overexpression in gastrointestinal epithelial cells. J Physiol Pharmacol. 査読有, 2012, 63(2) 137-42.

{ 学会発表 } (計 8 件)

1) Hiroko P. Indo, Chizuru Tsuruoka, Shizuko Kakinuma, Hirofumi Matsui, and Hideyuki J. Majima, Rho0 cells are susceptible to X-irradiation-induced cellular injury, SFRBM'S 21th Annual Meeting, Nov 22nd 2014, Seattle USA.

2) Shigeaki Suenaga, Hiroko P Indo, Hsiu-Chuan Yen, Hirofumi Matsui, Toshihiko Ozawa, Hideyuki J Majima, Induction of mitochondrial ROS and cell death by cytokines and its prevention by estrogen in rheumatoid arthritis, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Mar 25th 2014 Kyoto Japan.

3) Hiroko P. Indo, Chizuru Tsuruoka, Shizuko Kakinuma, Masao Suzuki, Ken-ichiro Matsumoto, Ikuo Nakanishi, Hsiu-Chuan Yen, Hirofumi Matsui, Toshihiko Ozawa, and Hideyuki J. Majima, Rho0 cells are susceptible to X-irradiation, The 32nd Annual Meeting of the Japanese Society for Cytoprotection & Cytobiology, Mar 23rd 2014, Kyoto Japan.

4) Hiroko P. Indo, Hirofumi Matsui, Hsiu-Chuan Yen, Toshihiko Ozawa, Aaron K Holly, Daret K St. Clair and Hideyuki J. Majima, Quercetin Induced Starvation-like Condition Followed by Autophagy in Rat Gastric Tumor Cells, SFRBM'S 20th Annual Meeting, Nov 21st 2013, San Antonio USA.

5) Hideyuki Majima, Ken-Ichiro Matsumoto, Hiroko Indo, Yoshihiro, Kawabata, Tomoko Fukushima, Takuro Kanekura, Akihito Tanimoto, Masahiro Terada, Akira Higashibata, Noriaki Ishioka, Aiko Nagamatsu, Hiromi Suzuki, Daisuke Masuda, Yoshinobu Ohira, Betty Nusgens, Shin Yamada, Hiroshi Ohshima, Chiaki Mukai, Effects of Space Environment on cells of the outer sheath of mouse skin hair: A comparison with the effects of x-irradiation, 19th IAA Humans in Space Symposium, July 9th 2013, Cologne Germany.

6) Hiroko P Indo, Sompong Sriburee, Samlee Mankhetkorn, Hsiu-Chuan Yen, Hirofumi Matsui, Toshihiko Ozawa, and Hideyuki J Majima, Quercetin

Induced Autophagy by Starvation
Simulated Condition in Rat Gastric
Tumor Cell Line, RGK-1., The 16th
Biennial Meeting of the Society for Free
Radical Research – International, Sep
8th 2012, London UK.

研究者番号： 60347094

- 7) Hiroko P. Indo, Hideyuki J. Majima,
Quercetin induces starvation like
condition followed by autophagy in rat
gastric mucosal cells, 第71回日本癌学会
学術総会, 2012年9月20日, 札幌市教育
文化会館(北海道、札幌).
- 8) 犬童寛子, 石岡憲昭, 鈴木ひろみ, 永松愛
子, 島津徹, 矢野幸子, 谷垣文章, 榎田大
輔, 袁部悦子, 亀山正樹, 馬嶋秀行, 宇宙
放射線および微小重力が哺乳細胞に及ぼ
す影響, 第30回 Cytoprotection 研究会,
2012年3月9日, メルパルク京都(京都
府、京都).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

犬童 寛子 (HIROKO P. INDO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号： 00301391

(2) 研究分担者

馬嶋 秀行 (Hideyuki J. Majima)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号： 60165701

(3) 連携研究者

富田 和男 (Kazuo Tomita)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教