

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659594  
 研究課題名（和文）放射線が誘導する生存シグナル抑制機構の解明  
 研究課題名（英文）Depression mechanism of survival signals induced by radiation  
  
 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）：

*p53* の機能を失ったがん細胞は、低線エネルギー付与 (LET) 放射線 (X 線) によって誘発されるアポトーシス出現頻度が低く、放射線抵抗性を示すことを報告してきた。今回、重粒子 (高 LET) 放射線は細胞死シグナルが誘導されやすいのは、生のシグナル系に関連する Akt-mTOR Akt、リン酸化 Akt、mTOR、リン酸化 mTOR、rpS6、リン酸化 rpS6、Survivin いずれのタンパク質量およびそれらの活性が効率的に抑制されることによることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

Human gingival cancer cells (Ca9-22 cells) harboring mutated *p53* (*mp53*) gene were irradiated with 2 Gy of X-rays or Fe-ion beams. *Akt*-related protein levels decreased when cells were irradiated with high LET radiation. In addition, high LET radiation increased G<sub>2</sub>/M phase arrests and suppressed the progression of the cell cycle much more efficiently when compared to low LET radiation. These results suggest that high LET radiation enhances apoptosis and cell cycle arrest by suppressing *Akt*-related signals, even in the cancer cells bearing *mp53* gene.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：(1)放射線治療生物学 (2)重粒子線 (3)粒子線治療 (4)細胞死シグナル(5)生存シグナル (6)Akt

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞はがん化にともなう遺伝子変化などによって、生存シグナルの異常による細胞増殖の亢進や、細胞死シグナルの異常によるアポトーシス誘導の抑制が起こり、がん治療抵抗性になることが知られている。高 LET 放射線のアポトーシスが高頻度に誘導されることを示す論文は国内外多くあるが、我々は世界に先駆けて様々ながん細胞(舌がん、口腔がん、肺がんなど)を用いて、*p53* 遺伝子に関係なくアポトーシスを引き起こし、低 LET 放射線である X 線に比べてがん細胞に高

い殺細胞効果をもたらすことを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

放射線が誘導する生存シグナル抑制のしくみを明らかにすることを目的とし、特に、Akt を中心とした生存シグナルの抑制機構について調べる。「低 LET 放射線である X 線と高 LET 放射線である鉄線とを比較することにより、放射線照射後に誘導される生存シグナルに関わるタンパク質の細胞内蓄積量とその活性度合いを解析すること」を目的とした。

### 3. 研究の方法

*p53* 変異型保有ヒト歯肉扁平上皮がん細胞 (Ca9-22) を用い、低 LET 放射線である X 線 (1.7KeV/ $\mu$ m) および高 LET 放射線である鉄線照射 (200KeV/ $\mu$ m) を等線量の 2 Gy で照射し、照射後 1, 2, 3, 6 時間にサンプルを回収した。その後、タンパク質抽出した後、生存シグナル関連タンパク質 (Akt, phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>), mTOR, phospho-mTOR (Ser<sup>2448</sup>), p70S6K, phospho-p70S6K (Ser<sup>240/244</sup>), IKK  $\alpha$  /  $\beta$ , phospho-IKK  $\alpha$  /  $\beta$  (Ser<sup>176/180</sup>), I  $\kappa$  B, phospho-I  $\kappa$  B (Ser<sup>32/36</sup>), NF- $\kappa$  B, phospho-NF- $\kappa$  B (Ser<sup>933</sup>)) の蓄積量および活性の変動を、Western blot 法にて分析した。細胞周期は、X 線および鉄線の等線量 2 Gy と等生存率の X 線 7 Gy を照射し、フローサイトメトリーにて分析した。

### 4. 研究成果

高 LET 放射線は低 LET 放射線と同様に細胞死 (Cell death) シグナルを誘導することがわかった (図 1)。これまで高 LET 放射線によって細胞死 (Cell death) が効率よくもたらされるのは、細胞死シグナルが効率よく誘導されると考えていた。

今回、高 LET 放射線照射によって効率よく、生存シグナル (Cell survival signal) である Akt-mTOR シグナル系に関連するタンパク質量およびそれらの活性は照射後 2-3 時間にはいずれも減少していた (図 1)。X 線の場合よりも鉄線を照射した場合の方が Akt, リン酸化 Akt, mTOR, リン酸化 mTOR, rpS6, リン酸化 rpS6, Survivin いずれのタンパク質の量および活性が効率的に減少していた。一方、細胞周期は X 線 2 Gy 照射 24 時間後で細胞周期の停止が認められなかったが、鉄線 2Gy および X 線 7Gy 照射では共に同様の経時変化を示し、照射後 24 時間には G2/M 期停止が観察された。高 LET 放射線である鉄線が低 LET 放射線である X 線よりも効率の良い *p53* 非依存的

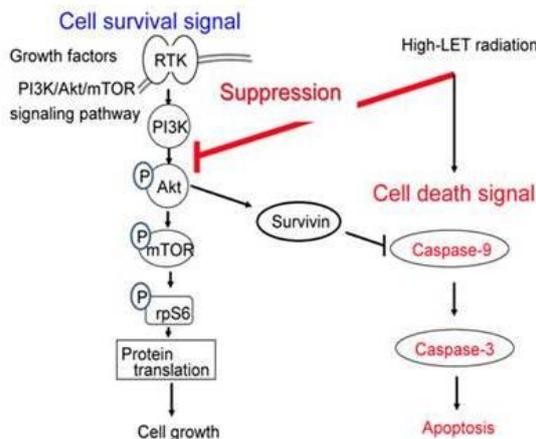


図1 放射線による細胞死シグナル・生存シグナルの誘導。→,促進; T,抑制。

アポトーシス誘導をもたらすしくみは、Akt 生存シグナル経路を効率的に抑制することによるもの (図 1) と考察され、がん治療効果をさらに高めるために貢献できると期待された。

### 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)

[原著論文] (計 11 件)

- (1) Nakagawa, Y., A. Takahashi, A. Kajihara, N. Yamakawa, Y. Imai, I. Ota, N. Okamoto, E. Mori, T. Noda, Y. Furusawa, T. Kirita & T. Ohnishi: Depression of *p53*-independent Akt-survival signals in human oral cancer cells bearing mutated *p53* gene after exposure to high-LET radiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、423(4)、2012、654-660  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.004
- (2) Takahashi, A., H. Suzuki, K. Omori, M. Seki, T. Hashizume, T. Shimazu, N. Ishioka & T. Ohnishi: Expression of *p53*-regulated proteins in human cultured lymphoblastoid TSCE5 and WTK1 cell lines during spaceflight. *J. Radiat. Res.*、査読有、53(2)、2012、168-175  
DOI: 10.1269/jrr.11140
- (3) Yatagai, F., M. Honma, A. Ukai, K. Omori, H. Suzuki, T. Shimazu, A. Takahashi, T. Ohnishi, N. Dohmae & N. Ishioka: 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、49(3)、2012、479-486  
DOI: 10.1016/j.asr.2011.10.015
- (4) Okamoto, N., A. Takahashi, I. Ota, K. Ohnishi, E. Mori, N. Kondo, X. Su, K. Yane, H. Hosoi & T. Ohnishi: siRNA targeted for *NBS1* enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Int. J. Hyperthermia*, 査読有、27(3)、2011、297-304  
DOI: 10.3109/02656736.2010.545365
- (5) Yatagai, F., M. Honma, A. Takahashi, K. Omori, H. Suzuki, T. Shimazu, M. Seki, T. Hashizume, A. Ukai, K. Sugawara, T. Abe, N. Dohmae, S. Enomoto, T. Ohnishi, A. Gordon & N. Ishioka: Frozen human cells can record radiation damage accumulated during space flight; mutation induction and radioadaptation. *Radiat. Environ. Biophys.*、査読有、50(1)、

2011、125-134

DOI: 10.1007/s00411-010-0348-3

- (6) Su, X., A. Takahashi, N. Kondo, Y. Nakagawa, T. Iwasaki, G. Guo & T. Ohnishi: Nitric Oxide Radical-induced Radioadaptation and Radiosensitization Are G2/M Phase-dependent. *J. Radiat. Res.*、査読有、52(5)、2011、609-615  
DOI: 10.1269/jrr.11026
- (7) Kondo, N., A. Takahashi, E. Mori, T. Noda, M. Z. Zdzienicka, L. H. Thompson, T. Helleday, M. Suzuki, Y. Kinashi, S. Masunaga, K. Ono, M. Hasegawa & T. Ohnishi: *FANCD1/BRCA2* Plays Predominant Role in the Repair of DNA Damage Induced by ACNU or TMZ. *PLoS One*、査読有、6(5)、2011、e19659  
DOI: 10.1371/journal.pone.0019659
- (8) Takahashi, A. & T. Ohnishi: Achievement of the first life science experiments in the Japanese Experimental Module "Kibo" of the ISS. *Int. Sym. Space Tec. Sci.*、査読無、Web paper Arch、2011、18-20
- (9) Ohnishi T. & A. Takahashi: Long-term stay against space radiation for human health. *Int. Sym. Space Tec. Sci.*、査読無、Web paper Arch、2011、14-16
- (10) Takahashi, A., H. Suzuki, K. Omori, M. Seki, T. Hashizume, T. Shimazu, N. Ishioka & T. Ohnishi: 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、47(6)、2011、1062-1070  
DOI: 10.1016/j.asr.2010.11.002
- (11) Noda, T., A. Takahashi, N. Kondo, E. Mori, N. Okamoto, Y. Nakagawa, K. Ohnishi, M. Z. Zdzienicka, L. H. Thompson, T. Helleday, H. Asada & T. Ohnishi: Repair pathways independent of the Fanconi anemia nuclear core complex play a predominant role in mitigating formaldehyde-induced DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、404(1)、2011、206-210  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.094

[総説] (計5件)

- (1) 大西武雄: 福島第一原子力発電所事故から学び、提案する. *食品・食品添加物研究誌 FFI ジャーナル*、査読無、217(2)、2012、189-197
- (2) Ota, I., N. Okamoto, K. Yane, A. Takahashi, T. Masui, H. Hosoi & T. Ohnishi: Therapeutic strategies for head and neck cancer based on *p53* status.

*Exp. Therap. Med.*、査読有、3(4)、2012、585-591

DOI: 10.3892/etm.2012.474

- (3) 大西武雄: 宇宙に挑む生命の力、環境と健康、査読無、24(2)、2011、151-157
- (4) 大西武雄: 地震と津波による福島第一原子力発電所で大事故発生: 大気・土壌・食料・水道水・海水の放射能による汚染、食品・食品添加物研究誌 FFI ジャーナル、査読無、216(3)、2011、250-257
- (5) 大西武雄: 放射線生物学の歴史に残る第一原子力発電所の重大事故、放射線生物研究、査読無、45(2)、2011、97-106

[国際学会特別講演] (計4件)

- ① Ohnishi T.: new aspect of space life science research in ISS、China-Japan-Korea Workshop on Microgravity Sciences Asian Microgravity Pre-Symposium、2012年11月1日、Ronghu Lake Hotel, Guilin, Guangxi, China
- ② Ohnishi T.: Fukushima-Daiichi nuclear power plant accident and the recent condition、7th Biennial Conf. of Indian Associat. Hyperthermia Oncol. and Med.、2012年2月4日、Indore, Public Lecture, Indore, India
- ③ Ohnishi T.: Disaster of Fukushima-Daiichi nuclear power plant (Japan) by earthquake, tsunami and RI-pollution、14th Int. Congr. Radiat. Res.、2011年8月28日、The Palace of Culture and Science, Warsaw, Poland
- ④ Ohnishi T.: Earthquake and tsunami hit Fukushima-Daiichi nuclear power plants in Japan; RI-pollution of air/food/water/seawater、Int. Natl. Symp. Radiat. Res. Med. Phys.、2011年5月31日、Shanghai Cancer Center, Fudan University, Shanghai, China

[国際学会シンポジウム] (計6件)

- ① Matsumoto, A. Takahashi & T. Ohnishi: Stress-induced, NO-mediated bystander responses for protecting cells themselves、11th Int. Congr. Hyperthermic Oncol. & 29th Jpn. Congr. Thermal Med.、2012年8月29日、Hyatt Regency Kyoto, Kyoto, Japan
- ② Ihara, M., Y. Okumura & T. Ohnishi: DNA-PK activity is involved in the fast repair of DNA double strand breaks during thermal radiosensitization、11th Int. Congr. Hyperthermic Oncol. & 29th Jpn. Congr. Thermal Med.、2012年8月29日、Hyatt Regency Kyoto, Kyoto, Japan

- ③ Kajihara, A., N. Okamoto, Y. Nakagawa, A. Takahashi, T. Kirita & T. Ohnishi: Enhancement of heat sensitivity by depression of DSB repair, 11th Int. Congr. Hyperthermic Oncol. & 29th Jpn. Congr. Thermal Med., 2012年8月29日、Hyatt Regency Kyoto, Kyoto, Japan
- ④ Takahashi, A., E. Mori, D.J. Chen & T. Ohnishi: ATM is the predominant kinase involved in the phosphorylation of histone H2AX after heating, 11th Int. Congr. Hyperthermic Oncol. & 29th Jpn. Congr. Thermal Med., 2012年8月29日、Hyatt Regency Kyoto, Kyoto, Japan
- ⑤ Ohnishi, T.: Recent condition of Fukushima-Daiichi nuclear plant accident in Japan, 2012年7月21日、39th COSPAR, Narayana Murthy Centre of Excellence (Infosys Training Centre), Mysore, India, 2012.
- ⑥ Ohnishi, T.: Molecular mechanism of heat sensitivity from a new aspect of DNA repair for DSBs, 7th Biennial Conf. of Indian Associat. Hyperthemia Oncol. and Med., 2012年2月4日、Indore, Public Lecture, Indore, India
- [国際学会一般発表] (計6件)
- ① Ohnishi, T.: A new aspect of space life science research in ISS, China-Japan-Korea Workshop on Microgravity Sciences Asian Microgravity Pre-Symposium, 2012年11月1日、Ronghu Lake Hotel, Guilin, Guangxi, China
- ② Takahashi, A. & T. Ohnishi: A priming heat treatment can induce the development of heat- and radio-resistance *via* HSPs regardless of *p53*-gene status, 11th Int. Congr. Hyperthermic Oncol. & 29th Jpn. Congr. Thermal Med., 2012年8月29日、Hyatt Regency Kyoto, Kyoto, Japan
- ③ Kondo, N., A. E. Takahashi, T. Mori, M. Noda, Z. Zdzienicka, L. H. Thompson, T. Helleday, M. Suzuki, Y. Kinashi, S. Masunaga, K. Ono, M. Hasegawa & T. Ohnishi: FANCD1/BRCA2 plays predominant role in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ, 14th Int. Congr. Radiat. Res., 2011年8月30日、The Palace of Culture and Science, Warsaw, Poland
- ④ Takahashi, A., H. Suzuki, O. Katsunori, M. Seki, T. Hashizume, T. Shimazu, N. Ishioka & T. Ohnishi: Space radiation effects on human cultured cells in an International Space Station at Kibo

- module, 2011年8月29日、14th Int. Congr. Radiat. Res., 2011年8月29日、The Palace of Culture and Science, Warsaw, Poland
- ⑤ Katsunori, M. Seki, T. Hashizume, T. Shimazu, N. Ishioka & T. Ohnishi: Space radiation effects on human cultured cells in an International Space Station at Kibo module, 14th Int. Congr. Radiat. Res., 2011年8月29日、The Palace of Culture and Science, Warsaw, Poland
- ⑥ Takahashi, A. & T. Ohnishi: Achievement of the first life science experiment “*Rad Gene*” in the Japanese, Experimental Module “Kibo” of the ISS, 28th Int. Symp. Space Tech. and Sci. Naha, 2011年6月10日、Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan, 2011.

[国内学会特別講演] (計15件)

[国内学会シンポジウム] (計6件)

[国内学会一般発表] (計14件)

[図書] (計2件)

- (1) 大西武雄: 丸善、化学物質・放射線. 理科年表, 国立天文台編、2012、1037-1038
- (2) 大西武雄: 講談社、人間はたくましい生きものなんだ. モーニング編集部 X 門倉紫麻編集, We are 宇宙兄弟, 宇宙を舞台に活躍する人たち, 2011、68-85

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大西 武雄 (Takeo OHNIHI)

研究者番号: 60094554

### (2) 研究分担者 なし