

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 7 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24710060

研究課題名(和文)放射線照射による脳機能障害の発生機序と防御機構の解明

研究課題名(英文)Research on the mechanism of radiation-induced brain dysfunction and the defense mechanism

研究代表者

秋本 頼子 (AKIMOTO, Yoriko)

九州大学・生体防御医学研究所・特別研究員

研究者番号：50613254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：放射線によるヌクレオチドの修飾がその生物影響にどのような役割を果たしているかは不明な点が多い。我々は、遊離ヌクレオシド、DNA、RNAへのX線照射により生成される様々な修飾ヌクレオシドをHPLC-PDAおよびLC-MS/MSシステムを用いて、包括的な定量解析を行い、一部の修飾ヌクレオシドは細胞へのX線照射によりヌクレオチドプール内で生成されることを見出した。X線照射によって様々な修飾ヌクレオシドが線量依存的に生成され、遊離ヌクレオシドはDNAやRNAと比べてX線による修飾を受けやすいことが明らかになった。さらに、マウス頭部へのX線照射は短期記憶の形成に影響を与えることを認めた。

研究成果の概要(英文)：It is largely unknown whether modification of nucleotides by radiation contributes to its biological effects. In the present study, we comprehensively analyzed modification of purine nucleosides caused by X-ray irradiation. Using HPLC-PDA and LC-MS/MS systems, various forms of modified purine nucleosides in free purine nucleosides, DNA and RNA exposed to X-ray were identified in quantitative manners, and some of them were confirmed to be formed in cellular nucleotide pools after X-ray irradiation. We found that various modified nucleosides are generated in free purine nucleosides, DNA and RNA by X-ray irradiation in a dose dependent manner and free purine nucleosides are most susceptible to modification by X-ray irradiation among those examined. In addition, we indicated that short-term memory is affected by cranial irradiation in mice.

研究分野：放射線影響学

キーワード：X線 修飾ヌクレオシド

## 1. 研究開始当初の背景

放射線療法による悪性腫瘍の治療では、腫瘍細胞に対して選択的な細胞死を誘導することが重要であるが、正常細胞への影響も考慮することが不可欠である。脳の悪性腫瘍に対する放射線療法の副作用として空間認知能力や学習機能の低下、認知症様の病態が報告されている。実験動物を用いた研究では、照射後1ヶ月以上が経過しても神経新生がほとんど回復しないことが報告されている。放射線障害の発生機序の解明と安全な放射線療法の確立にはDNA損傷と細胞死のメカニズムの詳細な解明が必要である。しかしながら放射線による脳機能障害の分子メカニズムはほとんど解明されていない。

ヌクレオチドは放射線の間接効果によって生成されるラジカルによって多様な化学修飾を受けると考えられ、様々な細胞障害の原因となっている可能性が高い。しかしながら、修飾ヌクレオチドが放射線生物影響においてどのような役割を果たしているかは不明である。生体にはヌクレオチドプールやDNA、RNA中に生成・蓄積した修飾ヌクレオチドに作用する多様な酵素群が存在する。ヌクレオチドプール中に蓄積したdGTP酸化体8-oxo-dGTPやdATP酸化体2-OH-dATP、8-oxo-dATPは酸化型プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素(MTH1)によって分解排除される。一方、DNA中に蓄積したグアニン酸化体8-オキソグアニン(8-oxoG)は8-oxoG DNAグリコシラーゼ(OGG1)などの酵素によって除去修復される。過去の報告から、放射線照射によってデオキシグアノシンの酸化修飾体8-オキソデオキシグアノシン(8-oxo-dGuo)の生成やMTH1の発現が誘導されることが明らかとなっており、放射線障害の原因としてヌクレオチドプールやDNA、RNAにおける異常修飾ヌクレオチドの生成と蓄積が示唆されるが、この問題はこれまでほとんど検討されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

放射線照射によって生成・蓄積する修飾ヌクレオチドやDNA・RNA損傷に対して、DNA・RNA修復酵素やヌクレオチドプール浄化酵素群が果たす役割に注目し、放射線による脳機能障害の分子メカニズムを解明する。

- (1) X線照射における損傷のターゲットとなるヌクレオチドを以下の研究より明らかにする。  
標準ヌクレオチド・DNA・RNA溶液へのX線照射  
遺伝子改変マウスと野生型マウスの胎児線維芽細胞(MEF)へのX線照射  
遺伝子改変マウスと野生型マウスへの頭部X線照射の短期的・長期的影響
- (2) X線照射のターゲットとなったヌクレオチドの酸化修飾体を野生型マウスへ投与し、放射線照射誘発の病態と同様の病理学的・行動学的影響が見られるかを明らかにする。

かにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 標準ヌクレオチド溶液へのX線照射  
標準プリンヌクレオチドとしてアデノシン(Ado)・デオキシアデノシン(dAdo)・グアノシン(Guo)・デオキシグアノシン(dGuo)の各種ヌクレオチド溶液を用いてX線(5, 10, 30, 50, 100 Gy)照射を行った。照射に用いたヌクレオチド溶液はすべてMilliQ-quality waterに溶解し、事前にHPLC-PDA(Waters 996, Waters)を用いて対象ヌクレオチドの分取精製したものをを用いた。X線照射には日立X線照射装置(MBR-1520R)を用いた。
- (2) DNAおよびRNA溶液へのX線照射  
生理食塩水を灌流後摘出し、液体窒素で凍結した10週齢のC57BL/6Jオスマウスの肝臓からDNAとRNAの抽出を行った。DNAの抽出にはDNA extractor®-TIS Kit(和光純薬工業)を用いた。DNA抽出時の修飾ヌクレオチドの生成を抑えるためにラジカルスカベンジャーのTEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)とアデノシンデアミネース阻害薬deoxycoformycinを加えて抽出を行った。またX線によって生成する修飾ヌクレオチドがラジカルを介した間接作用によるものかを明らかにするために、TEMPO・deoxycoformycin存在、非存在下における修飾ヌクレオチドの生成量の比較を行った。  
RNAの抽出はISOGEN(和光純薬工業)を用いて行い、DNA溶液の場合と同様に抽出時の修飾ヌクレオチドの生成を抑えるためにTEMPO・deoxycoformycinを加えて抽出したサンプルと加えず抽出したサンプルにX線照射し、修飾ヌクレオチドの生成量の比較を行った。
- (3) ヌクレオチドプールの抽出  
ヒト線維芽細胞株SH-SY5YにX線(1 Gy)を照射し、照射直後および24時間後に細胞を回収してトリクロロ酢酸によりヌクレオチドプールの抽出を行った。
- (4) 修飾ヌクレオチドの分析  
各実験における修飾ヌクレオチドの分析はHPLC-PDA( SPD-M20A, 島津製作所)および高感度トリプル四重極LC-MS/MSシステム(API3000, API3200: Applied Biosystems)により行った。修飾ヌクレオチドの同定は検出されたピークの保持時間、スペクトルパターンおよび分子量より行った。主に分析定量の対象としたのは(d)Adoの修飾体である8-oxo-(d)Ado、2-OH-(d)Adoおよび(d)Inoと(d)Guoの修飾体の8-oxo-(d)Guoである。DNA、RNA、ヌクレオチドプール中の修飾ヌクレオチドの検出には安定同位体標識した各種修飾ヌクレオチドを購入または作成して内部標準として用いた。

未同定のピークについては LC/MS/MS システムを利用した MRM スキャンもしくは MULDI-TOF MS(Autoflex, Bruker) によりの m/z 値の情報を得た。

(5) 遺伝子改変マウス頭部 X 線照射

MTH1 および OGG1 遺伝子二重欠損マウス(以下 TO-DKO マウス、10 週齢、オス)の頭部に麻酔下で X 線(10 Gy)照射した。頭部以外の部分は鉛で遮蔽した。行動学的解析として Passive avoidance 試験、モリス水迷路試験を行い、頭部 X 線照射が与える影響について評価した。Passive avoidance 試験は照射 24 時間後に訓練を行い、X 線照射 48、72、120、168 時間後に試験を行った。Cut-off time は 150 秒とした。モリス水迷路試験は照射 2 週間後と 4 週間後に実施した。水面下 1 cm の位置にプラットフォームを設置して訓練を行い、訓練 1 時間後の短期記憶と 24 時間後の長期記憶を確認した。試験はプラットフォームを取り除いて行き、プラットフォームが設置されていた場所に達するまでの時間(Escape Latency)をカウントした。また、5 日間連続の訓練を行って水面下 1 cm に設置したプラットフォームに達する時間をカウントして、訓練の繰り返しによる記憶学習獲得能力を比較した。Cut-off time は 60 秒とした。照射による目印およびプラットフォームの視覚的な認知能力には差がないことも併せて確認した。

4. 研究成果

(1) 標準ヌクレオシド溶液に X 線照射した結果、(d)Ado から 8-oxo-(d)Ado、2-OH-(d)Ado、(d)Ino が、(d)Guo の場合には 8-oxo-(d)Guo が生成されることが明らかになった。これらの修飾ヌクレオシドの生成には線量依存の効果が極めて高く、また(d)Ado からは 8-oxo-(d)Ado が最も生成されやすいということがわかった(図1)。8-oxo-(d)Adoの収量は100 μM 水溶液、100 Gy 照射時に約 1%であった。硫酸銅水溶液およびアスコルビン酸存在下において過酸化水素水に(d)Adoを暴露した場合の収量は 0.3 %程度であったので、8-oxo-(d)Ado の場合には化学的な処理よりも X 線照射によってより多く生成

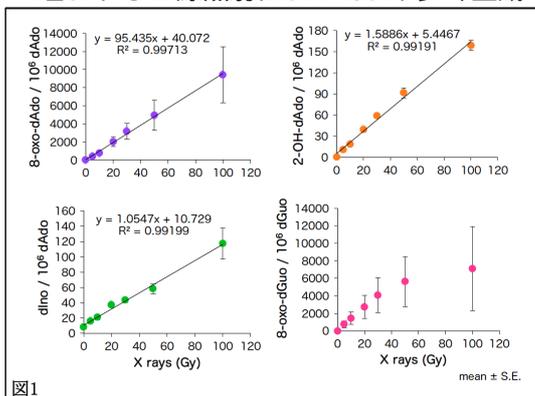


図1

し、X 線に特徴的な変化であることが示された。

また、8-oxo-(d)Guo の収量は 5~20 Gy の場合には線量依存的に増加するものの、高線量では収量の低下が見られた(図1)。そこで8-oxo-(d)Guo 水溶液に X 線を照射したところ、8-oxo-(d)Guo が線量依存的に減少していくことがわかった(図2)。

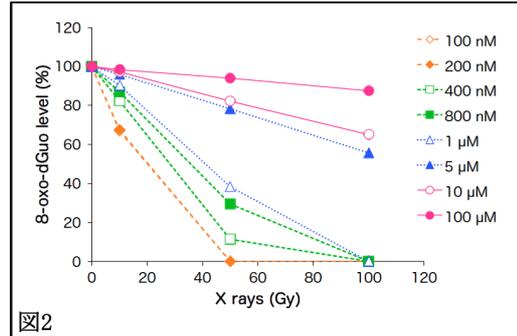


図2

次に (d)Guo への X 線照射によって 8-oxo-(d)Guo 修飾体の Oxazolone、Guanidinohydantoin、Oxaluric acid、Spiroiminodihidantoin、が生成することを MRM スキャンにより確認した。そのため (d)Guo への X 線照射では 8-oxo-(d)Guo が一旦生成するが、さらに修飾を受けて 8-oxo-(d)Guo の生成量が減少するということが明らかになった。

さらに、標準ヌクレオシド溶液の濃度が高くなるにしたがい 8-oxo-(d)Ado、2-OH-(d)Ado、(d)Ino、8-oxo-(d)Guo の生成率が低下し、間接作用の希釈効果が確認できた。また TEMPO 存在下では生成量が著しく減少していたことから(図3)、標準ヌクレオシドへの X 線照射により得られた修飾ヌクレオシドは水分子由来のラジカルを介した間接作用によるものであることを確認できた。定量分析した修飾ヌクレオシドの他にも様々な修飾ヌクレオシドを示すピークが検出され、スペクトルパターンから塩基部分が修飾されたヌクレオシドだけではなく糖部分の修飾が起こったヌクレオシドが検出された。これらの修飾ヌクレオシドも X 線線量依存的に増加しており、TEMPO 存在下では生成が抑えられることがわかった。

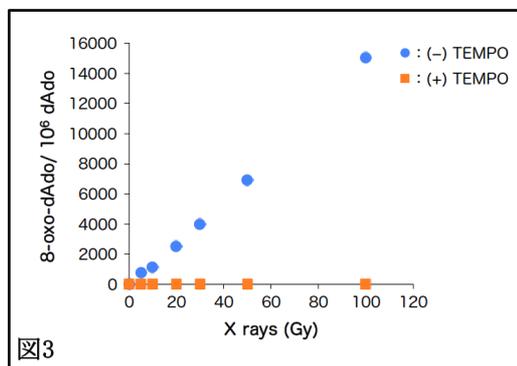


図3

(2) DNA 溶液への X 線(100 Gy)照射により、TEMPO・deoxycofornycin 非存在下では

8-oxo-dAdo、2-OH-dAdo、8-oxo-dGuo が有意に増加したが、存在下ではその生成が抑えられていた(図4)。

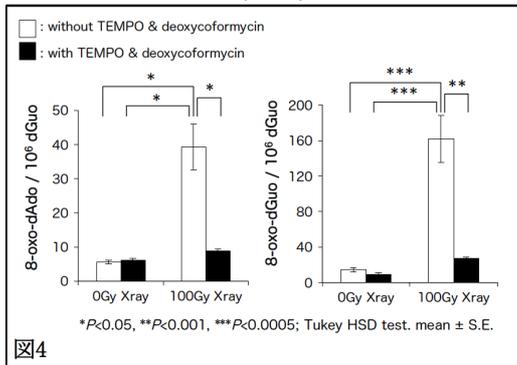


図4

RNA 溶液への X 線(100 Gy)照射によって、TEMPO・deoxycoformycin 非存在下では 8-oxo-Ado、8-oxo-Guo が有意に増加したが、存在下ではその生成が抑えられていた(図5)。

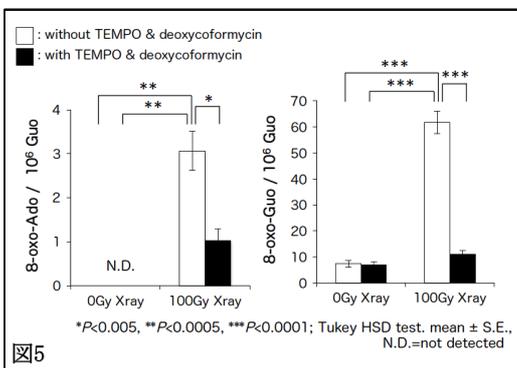


図5

以上の結果から、DNA および RNA 溶液への X 線照射によっても標準ヌクレオシド溶液を用いた実験と同様に修飾ヌクレオシドの生成が確認された。X 線により生成する主要な修飾ヌクレオシドは 8-oxo-(d)Ado と 8-oxo-(d)Guo であり、水分子由来のラジカルによる X 線間接作用によって生成したことが明らかになった。しかしながらその生成量は遊離状態の標準ヌクレオシド溶液と希釈効果を考慮して比較したところ 1/50~1/100 の生成量であった。遊離状態のヌクレオシドは周囲に水分子が多く存在するため水分子から生じたラジカルによる攻撃を受けやすいが、DNA や RNA 中に存在するヌクレオシドの場合にはこのような攻撃がされにくくなり生成量が減少したと考えられる。今回の研究によって生体中における遊離ヌクレオチドの供給源であるヌクレオチドプールが放射線障害の主要なターゲットであるということが明らかになった。ヌクレオチドプールから修飾ヌクレオチドが DNA 中に取り込まれ蓄積することによって様々な放射線障害を引き起こすことも考えられ、取り込み前のヌクレオチドプール浄化酵素と取り込み後の損傷修復酵素の段階的な作用が重要であることが示唆された。

(3) 当初の予定では培養細胞を用いたヌクレオチドプールの解析は計画に含まれていなかったが、標準ヌクレオシド・DNA・RNA 溶液への X 線照射によって引き起こされた修飾ヌクレオシドの生成が細胞中、特に放射線障害の主要なターゲットとして考えられるヌクレオチドプールにおいても見られるかを確認するためにヒト線維芽細胞株 SH-SY5Y を用いて研究を行った。

照射直後に細胞を回収、抽出したヌクレオチドプール中では X 線照射群、非照射群において明らかな差は認められなかった。一方照射 24 時間後ではヌクレオチドプール中の 8-oxo-dAdo、2-OH-dAdo、dIno が有意に増加していることを確認できた(図6)。一方、8-oxo-(d)Guo や Ado 由来の修飾ヌクレオシドの生成は確認できたが、X 線照射による有意な影響は検出できなかった。以上の結果から、X 線照射細胞から抽出したヌクレオチドプール中においても標準ヌクレオシド、DNA 溶液への照射と同様に 8-oxo-dAdo など dAdo 由来修飾ヌクレオシドの生成と有意な増加が確認できた。また照射直後にはこのような差異は認められなかったことから、X 線照射によって直接産生したラジカルによる反応によってではなく、二次的なラジカル産生による損傷がヌクレオチドプールをターゲットとして起こったことが示唆された。より詳細な解析が必要とされるが、X 線照射のこのような二次的な生物影響は放射線治療後の晩期症状と関連があると考えられる。

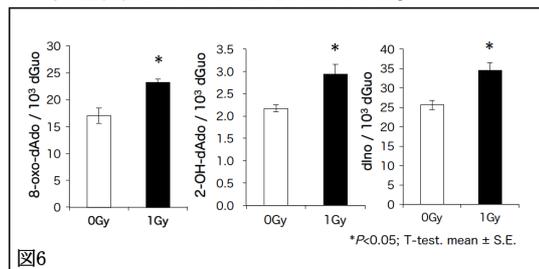


図6

(4) T0-DKO マウス頭部に X 線照射し行動解析実験を行った。T0-DKO マウスでは 8-oxo-dGuo が蓄積しやすく、事前実験において脳でも加齢によって自然蓄積することが確認できた。そのため X 線照射によって修飾ヌクレオシドが過剰に生成した場合には、その生物影響をより大きく受けると考えられる。照射後の経過時間によって行動への影響がどのように現れるのかを解析した。照射 24 時間後に実施した Passive avoidance 試験では、非照射群と照射群において有意な差は認められなかった。また照射 2 週間後に実施したモリス水迷路試験においても群間に有意な差は認められなかった。一方、照射 4 週間後に実施した水迷路試験では、訓練 1 時間後の試験において非照射群と照射群間に有意な差があった(図7)。24 時間後では有意な差がなかった。また連続

訓練による記憶学習獲得能力に有意な差はなかった。以上のことから、T0-DKO マウスにおいて頭部 X 線照射が照射 4 週間後の短期記憶の保持に影響を与えるということが明らかになった。このような影響は照射後の短い期間では認められなかったことから、頭部 X 線照射による生物影響は照射後の時間経過に伴って増大すると考えられる。

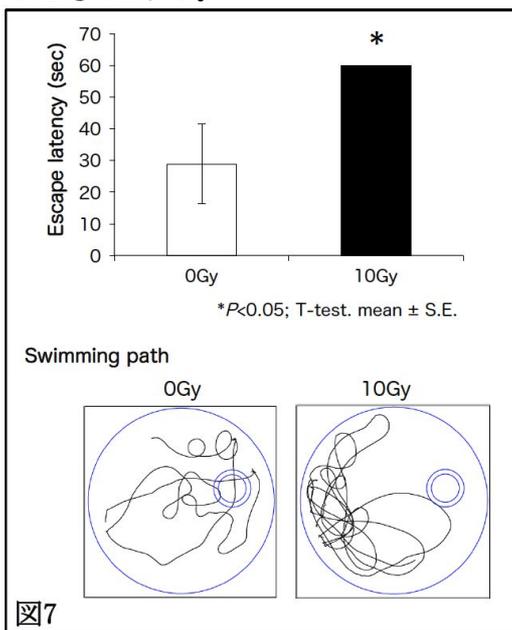


図7

しかしながらこれらのマウスでは遺伝子改変自体による行動への影響が大きいため野生型マウスとの明確な比較が困難であった。本研究では当初損傷ヌクレチド修復関連遺伝子改変マウスを用いて頭部 X 線照射後の行動学的解析を行い、その結果を基にした野生型マウスへのヌクレチド酸化修飾体投与を行う予定であったが計画を変更し、*in vitro* 実験を主に行い網羅的な解析を行って成果を得ることができた。過去の研究においてヌクレチド、DNA、RNA、ヌクレチドプールの全てを対象にし、包括的な解析をした研究はない。本研究の成果によって X 線照射による損傷の結果、主に 8-oxo-(d)Ado や 8-oxo-(d)Guo が生成され、特にヌクレチドが遊離状態にあることで影響をより大きく受けることが明らかとなった。さらに 8-oxo-(d)Ado は X 線で非常に効率良く生成されることも明らかとなった。8-oxo-(d)Ado に関しては蓄積の生物影響が過去の研究において明らかになっていない。そのため今後の放射線生物影響を考える上で非常に重要なターゲットであると考えられる。

## 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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

Yoriko Akimoto, Nona Abolhassani, Erika Castillo, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu, 「Comprehensive analysis of X-ray irradiation-induced modification of purine nucleosides」, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

秋本 頼子, Nona Abolhassani, Erika Castillo, 岡 素雅子, 土本 大介, 作見 邦彦, 中別府 雄作, 「放射線照射によって生成される損傷プリンヌクレオシドの同定と定量」, 第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Yoriko Akimoto, Sugako Oka, Julio Leon, Yusaku Nakabeppu, 「Quantitative detection of oxidative DNA damage in brains of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model」, AAIC2013、2013 年 7 月 15 日、ボストン(アメリカ合衆国)

秋本 頼子, 岡 素雅子, 中別府 雄作, 「アルツハイマー病モデルマウス脳における DNA の酸化ダメージの定量的検出」, 第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 22 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Yoriko Akimoto, Yusaku Nakabeppu, 「Identification and quantification of radiation-induced modified purine nucleosides」, The 8<sup>th</sup> 3R Symposium、2012 年 11 月 26 日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

秋本 頼子, 中別府 雄作, 「放射線照射によって生成されるプリンヌクレオシドの修飾体の同定と定量」, 日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 25 日、九州大学医学部百年講堂・同窓会館(福岡県・福岡市)

秋本 頼子, 中別府 雄作, 「放射線照射によって生成される修飾ヌクレチドの解析」, 第 35 回日本がん疫学分子疫学研究学会総会、2012 年 7 月 5 日、アステールプラザ(広島県・広島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋本 頼子 (AKIMOTO, Yoriko)

九州大学・生体防御医学研究所・特別研究員

研究者番号：50613254