

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25514007

研究課題名(和文) 宇宙放射線組成線種・重粒子線によるDNA損傷とその修復機構

研究課題名(英文) DNA damage induced by space radiation including heavy-ion particles and its repair

研究代表者

大西 武雄(Ohnishi, Takeo)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60094554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：長期宇宙滞在での宇宙放射線による生物影響を明らかにするため、マウス個体に重粒子線の炭素線を全身照射し、小腸・精巣および骨髓幹細胞におけるアポトーシス誘導を解析した。高線量2.0 Gy照射したマウスの小腸および精巣において顕著にアポトーシス誘導が認められた。骨髓においては高線量5 Gyを照射しても、低線量0.5 Gy以下の照射でも1日後に超感受性が認められるものの、照射14日後では5 Gyを照射した場合でも生存率は回復した。これらから重粒子線誘導DNA損傷には相同組換え修復が優先的に働くと考えた。重粒子線を含む宇宙放射線の生物影響を軽減するためには、放射線防護のさらなる重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate how normal stem cells respond to low-dose heavy ion particles which are included in space radiations, the ICR mice were irradiated with carbon-ion beams at 0.01-5Gy. After irradiation, the apoptosis in small intestine and testis cells were observed dose-dependently even in the small dose range of 0.01 - 0.05 Gy. The hyper-radio-sensitivity at low-dose in the bone marrow stem and progenitor cells was observed 1 days after irradiation with the carbon-ion beams at less than 0.5Gy. The surviving curve at greater than 0.5Gy indicated the feature of linear quadratic model with a big shoulder. However, the reduction of surviving fractions was completely recovered in the bone marrow cells 14 days after irradiation at less than 1Gy. These findings suggest that homologous recombination repair may be preferentially functioned to heavy ion-induced DNA damage less than 1Gy. These results might contribute to protect space-radiation effects including heavy ion particles.

研究分野：放射線生物学

キーワード：宇宙放射線 重粒子線 DNA 損傷 DNA 修復 生物影響 細胞死 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

宇宙空間での人類の長期滞在を考える  
と、今後宇宙放射線、特に重粒子線の低線  
量・低線量率放射線の被ばくが大きな問題  
となる可能性がある。人類の月へ、さらに  
火星への宇宙への進出願望は、宇宙飛行士  
のみでなく、一般人の宇宙飛行の実現へと  
展開されつつある。宇宙ステーション(ISS)で  
の滞在は現在の半年としているのを一年に延  
長する予定である。被ばく線量も300mSv以  
上にもなる可能性がある。NASAでは宇宙放  
射線研究を宇宙研究の最重要課題としてい  
る。宇宙空間には地球と異なり、多種類の宇  
宙放射線が飛び交っており、相当量の宇宙放  
射線を被ばくすることになる(太陽活動によ  
るが、通常一日あたり約1mSv)。これまでの  
我々の研究成果から概算して、火星への往  
復には低線量率ではあるが、総線量で1 Sv近  
くもの宇宙放射線を被ばくすることになる。  
ヒトは放射線影響を軽減するしくみをもつ  
が、宇宙放射線が含むうちの高エネルギー  
(高LET)の線種である重粒子は低エネルギー  
(低LET)のX線と比較して、線量率効果が期  
待できない。したがって、放射線影響が大き  
くなる可能性が大である。

本研究申請者はこれまで数多くの宇宙放射  
線の生物影響研究を行ってきた。放射線によ  
って生成されるDNA損傷である二本鎖切断  
(DSB)の形状が低エネルギーのX線と高エネ  
ルギーの線種の重粒線では異なることを、  
DSBの免疫化学染色法で可視化することを見  
いだしている。1個の $\gamma$ H2AXのフォーカス形  
成が1個のDSBに対応するとされ、極めて高  
感度の方法とされている。放射線非照射細胞  
にはDSBを認識する $\gamma$ H2AXのフォーカスが  
殆ど観察されないが、X線によるDSB生成は

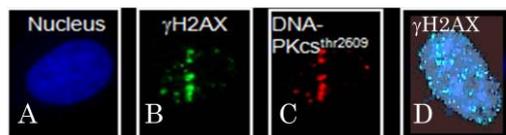


図1. 放射線照射後30分後培養した時のDNA損傷の観察。  
A, 非照射細胞; BとC, 重粒子(鉄)線照射細胞; D, X線照射細胞。

核内に散乱したフォーカス(散乱型)が観察さ  
れる。高LET鉄粒子では核に直線的な $\gamma$ H2AX  
フォーカス(直線型)が形成されること、またそ  
のDSBを修復しようとする修復酵素の一種  
であるDNA-PKcsの存在形式および位置まで  
全く一致することを発見した(*J. Radiat. Res.*  
**49**: 645-652, 2008)。さらに、これまでDNA修  
復能の正常型ヒト培養細胞におけるDSB認  
識 $\gamma$ H2AXのフローサイトメーターによる蛍  
光抗体の輝度を定量的に測定した結果、DSB  
生成効率には差が認められないが、低LET放  
射線X線照射によるDSBは素早く修復され  
るが高LET放射線の鉄線によるDSBは修復  
されにくく、修復されるのが遅いことを報告  
してきた(*Mutat. Res.* **669**: 8-12, 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究では宇宙放射線の線種である高LET  
放射線が生成するDNA損傷影響についてマ  
ウス個体を用いて分析する。マウスの小腸お  
よび精巣におけるアポトーシス誘導を解析す  
ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1. 低線量炭素線全身被ばくしたマウスの小  
腸および精巣におけるアポトーシス誘導

正常組織(小腸および精巣)の低線量粒子線  
に対する応答をTUNEL染色によるアポトー  
シス誘導動態によって精査した。ICRマウス

個体(雄、5週齢)に、0.01-2.0 Gy の炭素線(135 MeV/u, 25 keV/μm)を単回照射した。また c-PTIO(6.7 mg/kg)を照射 6 時間前から 2 時間間隔で 3 回腹腔内投与し、一酸化窒素(NO)の寄与を解析した。照射後 36 時間目にマウスから小腸および精巣を摘出し、アポトーシスの誘導を TUNEL 染色により検討した。

2. 正常組織幹細胞(骨髄幹細胞)の低線量粒子線に対する応答を骨髄幹細胞の生存率によって精査した。ICR マウス個体(雄、5週齢)に、0.01 - 5.0 Gy の炭素線(290 MeV/u, 13.3 keV/μm)を単回照射した。照射後 1 日目および 14 日目にマウスから大腿骨を摘出し、骨髄細胞分画を調製し、MethoCult 培養法により骨髄幹細胞の生存率を解析した。

#### 4. 研究成果

1. 低線量炭素線全身被ばくしたマウスの小腸および精巣におけるアポトーシス誘導 (図 1)

炭素線を全身に 2.0 Gy 照射したマウスの小腸および精巣において顕著に TUNEL 陽性細胞の誘導が認められた。小腸においては、何れの陽性細胞も小腸腺窩のパネート細胞の近傍に局在し、小腸幹細胞および前駆細胞に特異的にアポトーシスが誘導されていることが示唆された。精巣においては、何れの陽性細胞も精細管の精原細胞あるいは精母細胞が分布する最外層および第 2 層目に局在し、精子幹細胞および前駆細胞に特異的にアポトーシスが誘導されていることが示唆された。また、これらは c-PTIO の照射前投与により抑制された。

炭素線を全身に 0.01 - 0.1 Gy 照射したマウスの小腸および精巣においても顕著に TUNEL 陽性細胞の誘導が認められた。このような低線量の炭素線照射においても、小腸で

の TUNEL 陽性細胞は小腸腺窩のパネート細胞の近傍に局在し、小腸幹細胞および前駆細胞に特異的にアポトーシスが誘導されていることが示唆された。精巣でも TUNEL 陽性細胞は精細管の精原細胞あるいは精母細胞が分布する最外層および第 2 層目に局在し、精子幹細胞および前駆細胞に特異的にアポトーシスが誘導されていることが示唆された。また、これらは c-PTIO の照射前投与により抑制された。さらに低線量炭素線(0.01 - 0.05 Gy)においては小腸腺窩当あるいは精細管断面当たりの TUNEL 陽性細胞の個数に線量依存性が認められた。

以上の結果から、粒子線の高線量のみならず低線量被ばくによっても小腸および精巣の幹細胞および前駆細胞に特異的にアポトーシスが誘導されることが示唆された。つまり、低線量炭素線被ばくにより DNA 損傷が誘発された組織幹細胞および前駆細胞では DNA 損傷の修復が行われるのではなく損傷を持つ幹細胞および前駆細胞が主にアポトーシスにより組織から排除されること、およびこれらのアポトーシスの誘導には NO が関与してい

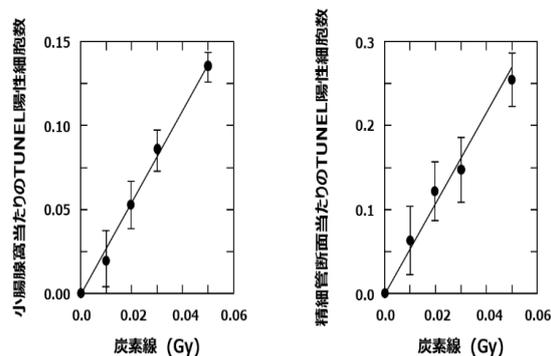


図 1. 小腸および精巣における炭素線(0.01 - 0.05 Gy) 誘発 TUNEL 陽性細胞の出現頻度が示唆された。

2. 低線量炭素線全身被ばくしたマウスの骨髄におけるアポトーシス誘導 (図2)

- (1) 照射1日後の骨髄幹細胞の生存率: 0.01-0.5 Gyを照射したマウスの骨髄幹細胞の生存率は、急激に約0.5まで減少し、低線量超感受性を示した。0.5 Gy以上を照射したマウスの骨髄幹細胞の生存率は、大きな肩を有する典型的な線形二次曲線モデル(LQモデル)を示した。
- (2) 照射14日後の骨髄幹細胞の生存率: 0.01~5 Gyを照射したマウスの骨髄幹細胞の生存率は、非照射マウスと変わらない値を示し、生存率はほぼ1.0であった。1 Gy以上を照射したマウスの骨髄幹細胞の生存率は徐々に減少し、5 Gyを照射したマウスで約0.8であった。

以上の結果から、骨髄幹細胞においても、低線量炭素線被ばくによりDNA損傷が誘発された場合にはDNA損傷の修復が行われるのではなく、速やかに細胞死によりそれらの細胞が排除されること、生残した骨髄幹細胞ではDNA損傷の修復は主に相同組換え修復機構により修復されること、排除された骨髄幹細胞は照射14日後までにほとんど回復することが示唆された。

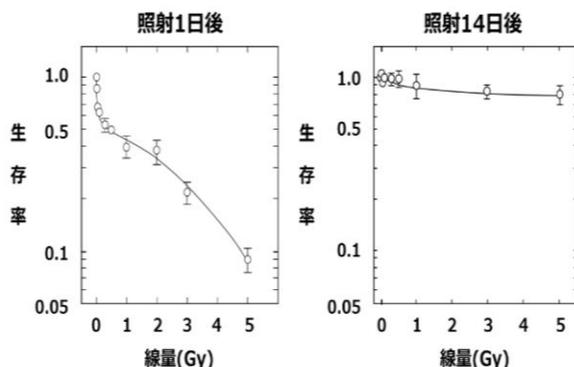


図2 炭素線全身照射後の骨髄幹細胞  
これらの結果は、宇宙環境において重粒子

線を低線量被ばくした正常組織の応答解析の重要性を示唆している。

5. 主な発表論文等  
[雑誌論文] (計4件)

- Ihara, M., S. Takeshita, K. Okaichi Y. Okumura & T. Ohnishi: Heat exposure enhances radiosensitivity by depressing DNA-PK kinase activity during double strand break repair. *Int. J. Hyperthermia*, 30, 102-109, 2014. doi: 10.3109/02656736.2014.887793.
- Nakagawa, Y., A. Kajihara, A. Takahashi, N. Kondo, E. Mori, T. Kiria & T. Ohnishi: The *BRCA2* gene is a potential molecular target during 5-fluorouracil therapy in human oral cancer cells. *Oncology Rep.*, 31, 2001-2006, 2014. DOI: 10.3892/or.2014.3080.
- Kondo, N., Y. Sakurai, Y. Hirota, H. Taknaka, T. Watanabe, Y. Nakagawa, M. Nakabayashi, Y. Kinashi, S. Miyatake, M. Hasegawa, M. Suzuki, S. Masunaga, T. Ohnishi & K. Ono: DNA damage induced by boron neutron capture therapy is partially repaired by DNA ligase IV. *Radiat. Env. Biophysics*, 16 Nov., 1-6, 2015. DOI: 10.1007/s00411-015-0625-2.
- Ohnishi, T.: Life science experiments performed in space in the ISS/Kibo facility and future research plans. *Journal of Radiation Research, Supplement-ICRR highlights*, pp. 1-6, 2016. doi: 10.1093/jrr/rrw020.

[学会発表] (計29件) 国際学会・シンポジウム等、一般演題を省く。

- Ohnishi, T.: The new five facilities for life science program in a Japanese module "Kibo" of the ISS. *Asian Congr. Radiat. Res.*

- May10-13, 2013, Beijing, China.
2. Nakagawa Y., A. Takahashi, Y. Furusawa, T. Kirita, T. Ohnishi: Depression of *p53*-independent *Akt*-survival signals in human oral cancer cells after exposure to high LET radiation. Asian Congr. Radiat. Res., May 10-13, 2013, Beijing, China.
  3. Takahashi A., H. Suzuki, K. Omori, M. Seki, T. Hashizume, T. Shimazu, N. Ishioka, T. Ohnishi: Space experiment of “Rad Gene” in ISS Kibo-Radiation effects in human cultured cells. Asian Congr. Radiat. Res. May10-13, 2013, Beijing, China.
  4. Takahashi A., H. Suzuki, K. Omori, M. Seki, T. Hashizume, T. Shimazu, N. Ishioka, T. Ohnishi: Space experiment of “Rad Gene” in ISS Kibo-Radiation effects in human cultured cells. Asian Congr. Radiat. Res., May10-13, 2013, Beijing, China,.
  5. Ohnishi, T., Akihisa Takahashi: Stress proteins are induced by space environment. 40th COSPAR, August 7, 2014. Moscow, Russia.
  6. Ohnishi, T., Y. Nakagawa, A. Takahashi: Depression of *p53*-independent *Akt*-survival signals after high-LET radiation in mutated *p53* cells. 40th COSPAR, August 4, 2014. Moscow, Russia.
  7. Ohnishi, T., T. Hosn: The planning of new Japanese facilities for life science in ISS. 40th COSPAR, August 2, 2014, Moscow, Russia.
  8. Ohnishi, T.: Completed, on-going and scheduled experiments of “Kibo” module in ISS and scheduled new facilities until 2020. 10<sup>th</sup> Asian Microgravity Symposium. October 29, 2014. Hotel President, Seoul, Korea.
  9. Ohnishi, T.: Synergistic effect by microgravity on *p53*-dependent gene expression induced by space radiation in human cultured cells in ISS. 10<sup>th</sup> Asian Microgravity Symposium-2014, October 30, 2014. Seoul, Korea.
  10. Ohnishi, T.: Stress proteins (Hsps) induced by environmental change promote cellular protection in human cultured cells and mice whole body; heat, X-ray, chemicals, space and psychological stresses. 8th Biennial Conf. of Indian Associat. Hyperthermia Oncol. Med., January 21, 2014. Bharatpur, Chitwan, Nepal,
  11. Hidema, J., and T. Ohnishi: Space Radiat. Symposium. Int. Congr. Radiat. Res., May 23-24, 2015. Osaka, Japan.
  12. Ohnishi, T.: Life science experiments performed in space in the ISS/Kibo facility and future plans. Int. Congr. Radiat. Res., May 25-29, 2015. Kyoto, Japan.
- 〔図書〕 (計 8 件)
1. 大西武雄: 化学物質・放射線.理科年表, 国立天文台編, 丸善, 東京, 1051-1054, 2016.
  2. 大西武雄 監修: 放射線医科学, 医療科学社, 東京, 印刷中, 2016.
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
大西武雄 (OHNISHI Takeo)  
奈良県立医科大学・医学部・放射線腫瘍  
医学講座・研究生  
研究者番号: 2 5 5 1 4 0 0 7