

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506022

研究課題名(和文) 光を用いた放射線(宇宙線)耐性の獲得法

研究課題名(英文) The acquisition methods for radiation-resistance by means of light irradiation.

研究代表者

榭原 学 (Sakakibara, Manabu)

東海大学・工学部・客員教授

研究者番号：10135379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線、宇宙線を連続して照射すると、細胞内にストレスが生じ、活性酸素が発生する。これが細胞損傷、遺伝子異常を誘発し細胞死につながる。一方、様々な光線を間歇的に照射すると、細胞内に分子シャペロンが形成される。この分子シャペロンは細胞内タンパク質の損傷部位を修復し、結果としては放射線、宇宙線に対する耐性が生まれる。分子シャペロンの一つにヒートショック・タンパク質70(HSP70)があり、このタンパク質の活性化には細胞内のカルシウム濃度が関与し、TRPチャネルの活性化がもたらされる。この機構をヒト皮膚由来培養細胞と、がん細胞を対照として、光線照射の効果をHSP70の働きとして本研究で詳細にした。

研究成果の概要(英文)：Succeeding irradiation of radioactive or cosmic ray induces intracellular reactive oxygen species (ROS). ROS production promotes cellular and genetic oxidative damages, thus apoptosis has occurred. On the other hand intermittent light irradiation even though the total radiation energy is identical as the succeeding irradiation, produces intracellular molecular chaperons which is effective on restoration of the cellular protein damages. This process produces the radiation-resistant characteristics. Heat shock protein-70 (HSP-70) is the one of the molecular chaperon, activated through the elevation of intracellular calcium then activating transient receptor potential (TRP). This working hypothesis has been examined with human primary keratinocytes and human dermal fibroblasts.

研究分野：生物物理学、神経科学

キーワード：ROS TRPチャネル 分子シャペロン HSP-70

#### 1. 研究開始当初の背景

物理的、化学的、生物学的な様々なストレス負荷は細胞に活性酸素種 (ROS) を発生させ、タンパク質障害をもたらし、これが老化に結びつく。これに対して細胞内の分子シャペロン (ヒートショックタンパク質: HSP) はタンパク質障害を回復するが、これがどのような機構によるのか明らかでなかった。

#### 2. 研究の目的

我々は、このタンパク質修復機構を細胞内イオンチャンネルに注目して、分子シャペロン発現機構を検討した。

#### 3. 研究の方法

本機構を考える上で、その端緒となったのは、培養細胞を対象として、致死的な連続的放射線暴露も、間歇的であれば培養細胞は数パーセントは生き残るというエルキンド回復則を拠所としている。そこで皮膚の培養細胞 (ケラチノサイト) と、そのがん化した細胞に対して、生体に有害な UVB を照射し、ヒートショックタンパク質を発現させ、その効果を正常ケラチノサイトと、細胞障害を受けているがん化細胞を比較検討した。そのために3年間の実験計画を以下のように定めた。

(平成 26 年度)

環境電磁波の照射が ROS を発生させるかを検討する。

(平成 27 年度)

ROS の発生には温度感受性の TRP (transient receptor potential) チャンネルの開閉が関与し、ミトコンドリア内のカルシウム増加が ATP と ROS の増加をもたらすかを検討する。

(平成 28 年度)

細胞内機能タンパク質の損傷と修復用分子シャペロンがどのようなメカニズムで効果を発揮するかを検討する。

#### 4. 研究成果

(平成 26 年度)

UVB が ROS 発現の要因であり、臨床的にそれを軽減する治療薬を用いて以下のように細胞レベル、動物の個体レベルで観察した。

UVB は細胞毒性が強く、遺伝子異常を発現させ、そのため皮膚障害から老化発現の要因となることが知られている。そこでは細胞内  $Ca^{2+}$  量を増加させ、活性酸素種 (ROS) を増やすと想定されている。一方、臨床的にはデリナット (sodium deoxyribonucleate) は ROS が関与する疾患の免疫変調作用のある治療薬として使われているが、その作用機序は明らかでなかった。今回デリナットが UVB 照射により引き起こされる細胞内 ROS 産生、シクロゲネース (COX - 2) 発現、DNA 損傷を抑制することを培養細胞で検討した。さらにマウスを用いて UVB に対するデリナットの作用を観察した。その結果、デリナットは TRP チャンネルのひとつである TRPC チャンネル活動を阻害することを  $Ca^{2+}$  イメージングで観察した。TRP チャンネル活性化の阻害は細胞内 ROS 産生を抑制し、ひいては DNA 障害の発生を抑えることを意味した。

これらの詳細は次の論文で報告した。

Wei-Li Hsu et al., *Derinat protects skin against ultraviolet-B (UVB)-induced cellular damage*, *Molecules*, 20, 20297-20311, 2015.

(平成 27 年度)

大量の ROS 産生が起こると、細胞老化と短寿命化が急速に促進され、その際急激な細胞内カルシウム濃度上昇が予測される。TRP チャンネルの細胞ごとに発現するチャンネルは一樣ではないため、対象をケラチノサイト細胞、ヒト平滑筋細胞、Hela 細胞として細胞内の  $Ca^{2+}$  動員量を計測した。原理的にはひとたび開放した TRP チャンネルは還元状態にしないと閉じないため、種々の薬剤 (アドレナリン、イソプロテレノール、フォルスコリン) 投与により内因性の  $Ca^{2+}$  放出をコントロールした。ケラチノサイト細胞へ UVB 照射後ミトコンドリア DNA (Dloop, ND2) の突然変異を観察した。照射量を 0、10、50、100、200、500、1000 mJ の 7 段階として照射直後と照射後 1 日培養したものを比較した。その結果 Dloop, ND2 のいずれも突然変異は観察されなかった。さらに同じ条件でヒト大動脈平滑筋細胞株についても検討したが、同じく突然変異は見られなかった。このような条件下では突然変異は生じないと結論付けた。

除  $Ca^{2+}$  培地で培養した Hela 細胞株、平滑筋細胞株に 5 日間 UVB を 200mJ 照射した。その後 Array Scan を使い、アドレナリン (AD: 50, 500  $\mu$ M)、イソプロテレノール (IP: 0.25, 2.5 mM)、フォルスコリン (FK: 50, 500  $\mu$ M) を投与し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を観察した。その結果、平滑筋細胞では、UV 照射した後 IP を投与すると  $Ca^{2+}$  濃度上昇を観察した。Hela 細胞では、50  $\mu$ M の AD 投与により  $Ca^{2+}$  濃度の低下を観察したが、500  $\mu$ M 投与後には上昇するという対照的な結果を得た。この実験事実の詳細の研究は未解決である。

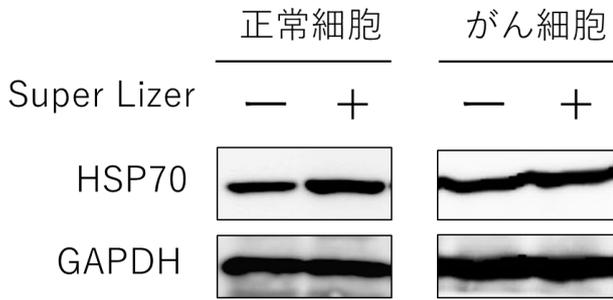
(平成 28 年度)

300mJ の UVB 照射後 1 日経過すると細胞の生存率が 5 割となるが、間歇的照射では HSP 産生による参加によるタンパク質の構造変化により生存率が伸びる。刺激となる UVB 照射に替えて近赤外線照射でも HSP が産生される。これが参加の促進されたがん細胞と正常細胞の間で細胞生存率に差があるかを検討した。がん細胞はヒト扁平上皮がん細胞を、正常細胞はヒト表皮角化細胞 (ケラチノサイト細胞) を用いて検討した。

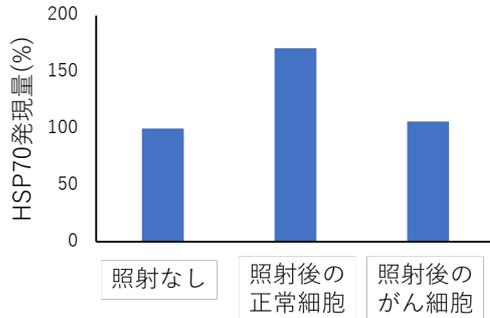
刺激の近赤外線 (NIR) はスーパーライザー 2200 を用いて照射した。スーパーライザーから中心帯域  $1000 \pm 200$  nm、エネルギー量 3.5 KJ /  $m^2$  の近赤外線を照射した。培養細胞はタンパク質を回収後、ウエスタンブロットイングし、HSP の発現量を検討し、さらに培養細胞をトリパンブルーで染色し、細胞数を計測した。

細胞内タンパク質として、HSP70 とその対照として GAPDH を正常細胞とがん細胞で比較検

討した。その結果を下图に示した。

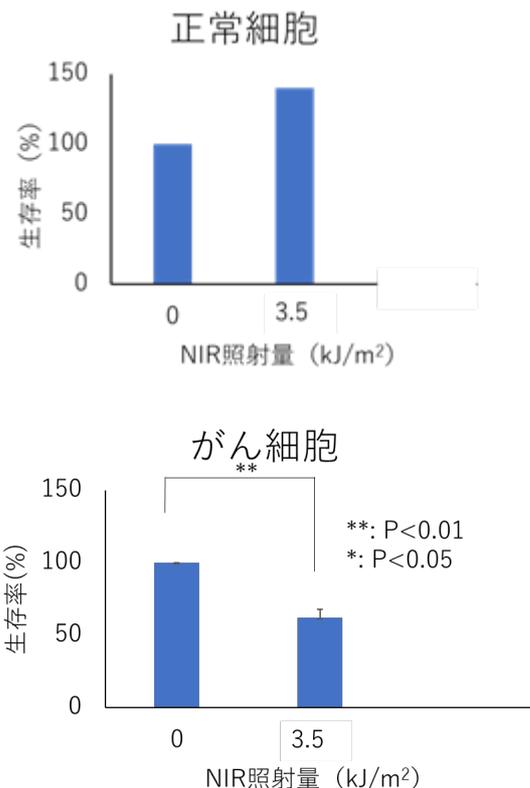


HSP70発現量(%)の比較

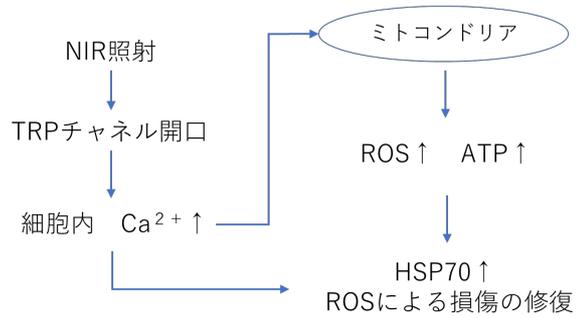


正常細胞では近赤外線照射により HSP70 タンパク質のバンドが太くなり、タンパク質量がほぼ6割増加したことを示したが、がん細胞では変化はなかった。

ついで細胞数の計測から、近赤外線に対する正常細胞とがん細胞の生存率を比較した。上図から正常細胞では近赤外線により HSP70 が発現誘導され、細胞死から保護されたが、がん細胞では HSP70 の発現誘導はなく、細胞死が促進された。



これらの実験結果を次の図のようにまとめた。



### 5. 主な発表論文

(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 2 件)

1. Wei-Li Hsu, Jian-He Lu, Mami Noda, Ching-Ying Wu, Jua-dai Liu, Manabu Sakakibara, Ming-Hsien Tsai, Hsin-Su Yu, Ming-Wei Lin, Yaw-Bin Huang, Shian-Jang Yan, Tohru Yoshioka, Derinat protects skin against ultraviolet-B (UVB)-induced cellular damage, *Molecules*, 20, 20297-20311, 2015.
2. Wei-Li Hsu, Tohru Yoshioka, Role of TRP channels in the induction of heat shock proteins (Hsps) by heating skin, *BIOPHYSICS*, 11, 25-32, 2015.

〔学会発表〕(計 1 件)

嶋レイ、向後由貴、伊藤悦朗、吉岡亨、正常ヒト表皮角化細胞とヒト扁平上皮がん細胞における近赤外線照射による Heat Shock Protein 70 (HSP70)発現誘導効果の検討、日本生物物理学会東京地方会(平成 29 年 3 月 13、14 日)

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

榊原 学 (Sakakibara Manabu)  
東海大学・工学部・客員教授  
研究者番号：10135379

##### (2) 研究分担者

吉岡 亨 (Yoshioka Tohru)  
早稲田大学・理工学部・名誉教授  
研究者番号：70046027

小見山 智義 (Komiya Tomoyoshi)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：60439685

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )