

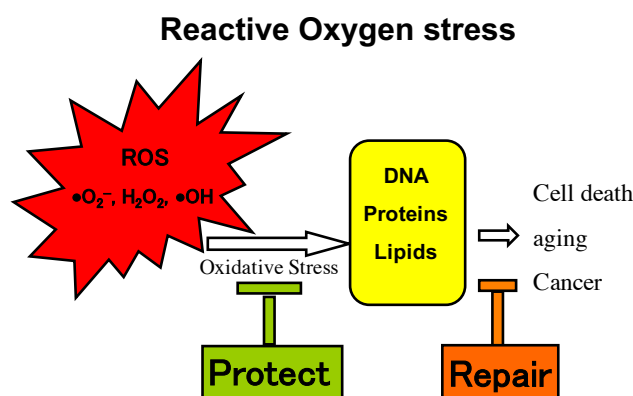
細胞の放射線応答・防御-活性酸素の観点から

秋山(張)秋梅、Zhao TingYi、松井亜子

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻

はじめに

電離放射線は細胞成分に直接損傷を与える作用と、大量に生成する活性酸素種 (ROS) の反応によって細胞に強い酸化反応を引き起こす作用がある。放射線照射や ROS は DNA 鎖切断、様々な塩基酸化体、タンパク質や脂質の酸化を生じさせる。細胞には活性酸素の除去、酸化された分子の還元、損傷 DNA の修復などの防御機構が備

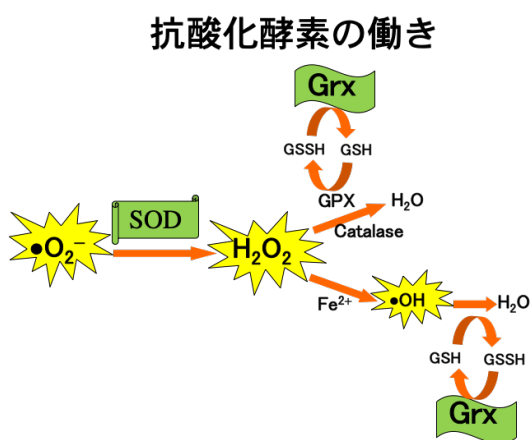


わっている。これらの機構が破綻すると、細胞死、突然変異、がん化、早期老化、発生異常や神経疾患などの様々な病態が起こる。これまでに放射線誘発二重鎖切断に関わる因子についての多くの研究が報告されているが、放射線に対する細胞応答の機構、とくに低線量(率)放射線の生物影響の分子機構、細胞内防御のネットワークについては未解明の部分が多い。

本報告書では、下記の2つの側面から放射線の影響を明らかにした内容の論文を紹介させていただきます(1, 2)。

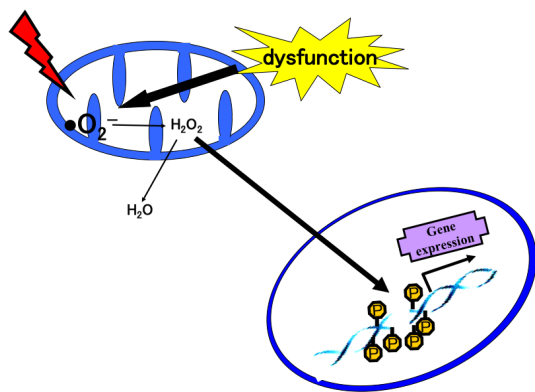
1. ミトコンドリア局在型スーパーオキシドジスムターゼ (SOD2) は放射線抵抗性と放射線ストレス応答を調節する

ROS は、電離放射線による細胞障害の媒介物質として作用する。以前の研究では、MnSOD (SOD2)が哺乳動物細胞における電離放射線に対する防護において重要な役割を果たすことが示されていた (3-5)。本研究では、SOD2 による放射線防護の基礎となるメカニズムを解明するために、SOD2 を過剰発現する2種類の安定的な HeLa 細胞株、HeLa S3 / SOD2 と T-REx HeLa / SOD2 を構築した(1)。ミトコンドリア



アにおける SOD2 過剰発現は、 γ 線照射後の HeLa S3 および T-REx HeLa 細胞の生存を

増強した。二本鎖切断の指標としての γ H2AX のレベルは、HeLaS3/ SOD2 および T-Rex HeLa S3/SOD2 細胞では対照細胞と比較して有意に減少した。 MitoSoX TM Red アッセイによって、両方の系統の SOD2 発現細胞で、ミトコンドリアにおけるスーパーオキシド生成が抑制されることが示された。さらに、蛍光プローブ (2', 7'-ジクロロフルオロセイン) を用いたフローサイトメトリー解析では、照射後の培養中に、HeLa S3 細胞において ROS の細胞レベルが増大することが明らかにされたが、その増大は HeLa S3 / SOD2 細胞において著しく減衰した。遺伝子発現について DNA マイクロアレイ法で分析すると、分析した 47,000 プローブセットのうち、117 および 166 プローブが、対照および HeLaS3 / SOD2 細胞においてそれぞれ 5.5Gy の γ 線照射後に 2 倍を超える変化を示すことが明らかになった。

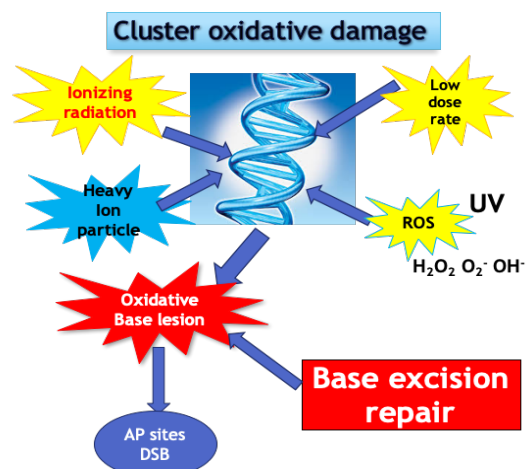


経路分析からは、照射された対照細胞と照射された SOD2 過剰発現細胞において異なる発現プロファイルが明らかになった。これらの結果は、SOD2 がミトコンドリアで生成された ROS によって引き起こされる照射細胞の酸化ストレスを抑制すること、および電離放射線に対する防護において重要な役割を果たす遺伝子の発現を調節することによって、 γ 線の細胞作用から HeLa 細胞を防護することを示している(1)。

まとめ: ミトコンドリアは細胞内エネルギー代謝を司るとともに、 O_2^- を産生する器官でもある。 O_2^- 消去酵素 SOD2 をミトコンドリアで過剰発現する細胞は放射線抵抗性を示すこと、その分子機構としてはミトコンドリアの機能維持が重要で、その破綻から漏出した活性酸素が細胞核に至ることによって細胞死を引き起こす要因になることが分かった。

2. 低線量率放射線は活性酸素を誘導するのか?

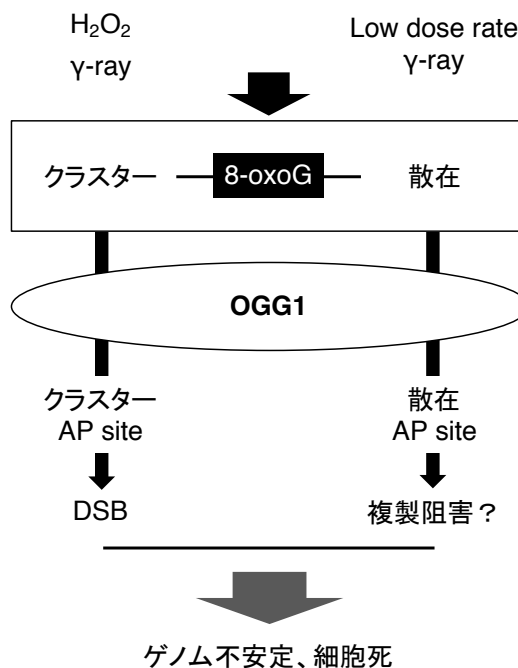
X線および γ 線のような電離放射線は直接的または間接的に DNA にクラスター化または多数の損傷を生じさせることがある。以前の研究は、大腸菌およびヒトリンパ芽球細胞における DNA グリコシラーゼの過剰発現が、 γ 線およびX線照射に対する感受性を増加させることを明らかにしている(6-8)。しかし、低線量率放射線、重イオ



ンビーム、過酸化水素 (H₂O₂) では、その影響とメカニズムはまだよく分かっていない。本研究では、ヒト 8-オキソグアニン (8-oxoG) -DNA N-グリコシラーゼ 1 (hOGG1) タンパク質を安定的に過剰発現する HeLaS3 細胞株を構築した(2)。紫外線、重イオンビーム、γ線、H₂O₂に曝された HeLaS3 と HeLaS3 / hOGG1 細胞の生存率を調べた。結果は、hOGG1 を過剰発現している HeLaS3 細胞は、対照 HeLaS3 よりも、γ線、OH (•)、および H₂O₂ に対してより高感受性であることを示した。さらに、DNA 中の γ- H2AX フォーサイ形成を検出することによって、8-oxoG フォーサイおよび染色体二本鎖切断 (DSB) のレベルを決定した。その結果、γ線および H₂O₂ の両方が、HeLaS3 細胞において 8-オキソグアニン (8-oxoG) フォーサイ形成を誘導することを実証した。hOGG1 過剰発現細胞は、HeLaS3 対照細胞と比較して、γ- H2AX フォーサイの量が増加し、8-oxoG フォーサイの量が減少した。これらの結果は、過剰な hOGG1 が DNA の酸化損傷である 8-oxoG をより効率的に除去し、その結果としてより多くの DSB を生成することを示唆する。微小核形成もこの結論を支持した。さらに、低線量率の γ線効果も調べた。本研究は最初に、hOGG1 の過剰発現も低線量率 γ線照射に対する感受性の増大を引き起こすことを見出した。微小核形成率は、低線量率照射がゲノム不安定性を増大させるという考えを支持した(2)。

まとめ：放射線や過剰な活性酸素が DNA にクラスター損傷を引き起こす。その損傷部位で生成した酸化塩基 8-oxoG の過剰修復が二重鎖切断を産生し、細胞死を導いたと考えられる。この仮説は 8-oxoG を修復する酵素 OGG1 の過剰発現細胞を用いても証明できた。さらに、低線量率放射線の細胞への影響は不明な点が多いが、OGG1 過剰発現細胞が低線量率放射線にも高い感受性を示したことから、酸化 DNA 損傷が低線量率放射線によっても生じていることが実証できた。

我々は、ミトコンドリア→細胞核に及ぶ ROS の影響、およびそれに対する防御ネットワークの機構解明を目指してさらに研究を進めている。とくに低線量率放射線影響の検出・解析を進め、細胞の防御機構について明らかにしたいと考えている。



引用文献

1. Hosoki A, Yonekura S, Zhao QL, Wei ZL, Takasaki I, Tabuchi Y, Wang LL, Hasuike S, Nomura T, Tachibana A, Hashiguchi K, Yonei S, Kondo T, Zhang-Akiyama QM. Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells. *J Radiat Res.* 2012. 53(1):58-71. (2014 JRR terajima award)
2. Yoshikawa Y, Yamasaki A, Takatori K, Suzuki M, Kobayashi J, Takao M, Zhang-Akiyama QM. Excess processing of oxidative damaged bases causes hypersensitivity to oxidative stress and low dose rate irradiation. *Free Radic Res.* 2015. 49(10):1239-48. doi: 10.3109/10715762.2015.1061186.
3. Motoori S, Majima HJ, Ebara M, Kato H, Hirai F, Kakinuma S, Yamaguchi C, Ozawa T, Nagano T, Tsujii H, Saisho H. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. *Cancer Res.* 2001. 61(14):5382-8.
4. Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Weydert C, Longmate JA, Huang TT, Spitz DR, Oberley LW, Li JJ. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol.* 2003. 23(7):2362-78.
5. Epperly MW, Bernarding M, Gretton J, Jefferson M, Nie S, Greenberger JS. Overexpression of the transgene for manganese superoxide dismutase (MnSOD) in 32D cl 3 cells prevents apoptosis induction by TNF-alpha, IL-3 withdrawal, and ionizing radiation. *Exp Hematol.* 2003. 31(6):465-74.
6. Blaisdell JO, Wallace SS. Abortive base-excision repair of radiation-induced clustered DNA lesions in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98(13):7426-30.
7. Chang PW, Zhang QM, Takatori K, Tachibana A, Yonei S. Increased sensitivity to sparsely ionizing radiation due to excessive base excision in clustered DNA damage sites in *Escherichia coli*. *Int J Radiat Biol.* 2005 Feb;81(2):115-23.
8. NingYangM. AhmadChaudhry. Susan S.Wallace. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: A two edged sword in the processing of DNA damage in γ -irradiated human cells. *DNA Repair.* 2006, 5(1):43-51

「放射線の生体影響解明への分野横断による挑戦 研究会」

2019年5月23-25日京都大学