

低線量率放射線生物影響における酸化ストレス・ミトコンドリア応答の役割

小林純也

京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター

生物の遺伝情報が納められているゲノム DNA は紫外線、放射線、活性酸素種 (ROS) など様々な環境ストレスにより絶えず障害を受けている (DNA 損傷)。特に高線量放射線に曝露すると DNA 二本鎖切断損傷 (double-strand break: DSB) が誘発され、それら DSB 損傷が少数でも残存すると細胞死、遺伝子変異・発がんへとつながりうることから、細胞は DSB 損傷を検知し、細胞周期チェックポイントで細胞周期進行を停止し、DSB 損傷を修復する機構を備えている。高線量放射線曝露は一方、ROS の細胞内蓄積も誘導することが知られている。ROS 蓄積の一経路としては、ガンマ線や X 線などの低 LET 放射線に曝露した場合、水分子にエネルギーを与えられることにより励起を誘導し、それで生じたヒドロキシラジカルが酸素分子と反応して、ROS の一種を生成するが、 10^{-5} 秒未満で細胞構成分子とさらに反応するため、その存在時間は非常に短い。一方、高線量放射線では急照射で曝露数時間後以降に細胞内 ROS が一過的に増加することが知られているが、その時間変化と相関してミトコンドリア形態や膜電位への影響が見られる。放射線によるミトコンドリアへの影響と ROS 増加の関係を明らかにするために、Zhang らはアルファ線マイクロビーム照射装置を用いて、細胞核あるいはミトコンドリアが存在する細胞質、それぞれで局所照射を行い、ミトコンドリアの形態変化 (断片化) 及びミトコンドリア性 ROS (スーパーオキシド) の一過性の増加を観察し、放射線のミトコンドリアの損傷が ROS 増加の起因であることを示した。損傷したミトコンドリアはミトコンドリア内で生成する ROS を細胞質へ漏えいさせ、生体構成成分に酸化損傷を引き起こしうることから、このような損傷ミトコンドリアがオートファジーで除去されることが近年知られるようになった (ミトファジー)。高線量放射線曝露でもミトファジーの活性化が報告されており、放射線はミトコンドリアに損傷を引き起こして、ROS の漏えい・細胞内蓄積を誘導するが、そのような損傷ミトコンドリアはミトファジー機構で除去されるため、ROS の増加は一過性になると考えられている。

一方、低線量率放射線長期曝露 (緩照射) では、ROS 蓄積、ミトコンドリアへの影響についてはほとんど研究されていない。1Gy の急照射条件では 1 細胞核あたり 40 程度生成する DSB 損傷は、緩照射ではごく少数の生成が想定され、ROS 蓄積による酸化ストレスによる細胞影響の方が緩照射においては相対的に高まることが示唆される。それ故、我々は低線量率放射線長期曝露の細胞影響、を明らかにしてしたいと考え、以

下の検討を行ってきている。①低線量（率）被ばくにおける ROS 蓄積とそのメカニズム（ミトコンドリアのかかわり）を明らかにする。②低線量（率）被ばくにおける DNA 損傷応答と酸化ストレス応答の相互作用を明らかにする。③低線量（率）被ばくで ROS 蓄積依存的に誘発されるマーカー因子を探索する。なお、これらの研究には京都大学大学院生命科学研究所附属放射線生物研究センターが所有する低線量放射線長期照射装置（ ^{137}Cs 線源でガンマ線低線量率照射、線量率 1 mGy/min）および急照射装置であるガンマセル（ ^{137}Cs 線源でガンマ線高線量率照射、線量率 900 mGy/min）を用いて行っている。

ヒト正常繊維芽細胞 48BR 及び骨肉腫由来 U2OS 細胞で低線量率および高線量率照射で ROS 特異的蛍光プローブで染色して検討すると、低線量率照射では正常繊維芽細胞でのみミトコンドリア性 ROS の増加がみられ、その増加は照射終了 1 日後でも持続した。一方、高線量率照射（0.9 Gy/min）では正常繊維芽細胞、U2OS 細胞ともに ROS の増加は観察されなかった。このとき、ヒト正常繊維芽細胞で低線量率照射時には酸化ストレス応答が活性介していること、DSB マーカーである γH2AX の増加が見られないことが、ウェスタンブロット解析で明らかとなった。さらに、PI 染色法でフローサイトメーターにより細胞周期分布解析を行うと、高線量率照射では正常細胞、U2OS 細胞ともに G2 期への蓄積が観察されたが、低線量率照射では正常細胞でのみ照射終了時 G1 期への蓄積が見られ、終了 1 日後もその蓄積は持続していた。

次にミトトラッカー染色液でミトコンドリアを可視化すると、非照射時にはミトコンドリアが鎖状に連結したファイバー構造が細胞核周辺から 2 方向で細胞質内で広がる顕微鏡像が観察されるが、正常細胞を低線量率照射したときにはファイバー構造の短小化（断片化）およびファイバー構造の広がりが多方向化する変化が見られた。次にミトトラッカー染色後にフローサイトメーターを用いて検討すると、細胞あたりのミトコンドリア量が正常細胞では低線量率照射終了時に増加し、1 日後もその増加は持続していたが、U2OS 細胞では増加自体観察されず、高線量率照射では両細胞ともに増加しなかった。このようなミトコンドリアの変化はミトコンドリア性 ROS 蓄積の増加と関連しており、ヒト正常繊維芽細胞では低線量率慢性照射によりミトコンドリアが損傷し、継続的にミトコンドリア性 ROS が漏えい・蓄積すると考えられる。これまでの高線量率照射影響の解析では、損傷ミトコンドリアはミトファジーで除去すると考えられているが、低線量率慢性照射では継続的にミトコンドリアが損傷を受け、何らかの影響でミトファジーの活性に異常をきたし、その結果、残存した損傷ミトコンドリアが継続的に ROS を漏えいしていることが考えられる。低線量率照射のミトファジー機構への影響を、今後詳細に明らかにする必要がある。

ATM は放射線高感受性遺伝病の原因遺伝子として 1995 年に同定された遺伝子である。ATM を欠損した遺伝病 (ataxia telangiectasia : AT) は患者由来細胞は放射線高感受性、放射線抵抗性 DNA 合成、染色体不安定性を示し、臨床症状では進行性小脳失調、免疫不全、高発がん性を呈する。原因遺伝子産物 ATM はタンパク質リン酸化酵素であり、放射線などで DSB 損傷が発生すると速やかに活性化し、癌抑制遺伝子 p53 をはじめ、様々なタンパク質のリン酸化を通して、細胞周期チェックポイントの活性化に機能することが明らかとなり、このような DSB 損傷発生に依存したタンパク質リン酸化酵素機能の欠損が AT の細胞学的特徴につながると考えられている。一方、臨床学的特徴である進行性小脳萎縮の要因は長年不明であったが、脳組織の元となる神経幹細胞では ROS に高感受性であることから、ATM が酸化ストレス応答に機能することが予想されてきた。2010 年に Gao らによって ATM が過酸化水素処理など酸化ストレス誘導で活性化しうることが明らかにされた。また、ATM はミトコンドリアやペルオキシソームなどの細胞質内で酸化損傷が蓄積しやすい細胞器官に存在することが報告され、ATM はこのような細胞器官で酸化損傷の蓄積を防ぐ役割を持つことと考えられている。われわれは低線量率照射時の細胞影響に対する ATM の役割を明らかにするために、ATM タンパク質リン酸化酵素特異的阻害剤 KU55933 を培地に添加して低線量率照射を行って検討すると、阻害剤添加による酸化ストレス応答が増加することが観察され、低線量率放射線曝露状況下で ATM が酸化ストレスへの対抗機能を持つことが示唆された。放射線や酸化ストレス (過酸化水素処理) は微小核 (染色体断片、あるいは異常分離して細胞質に取り残された染色体が、間期に形成する細胞質内の小核) が誘導されることが知られるので、低線量率照射時で検討すると ATM 阻害剤添加時にのみ、顕著な微小核形成が観察された。以上の結果から、低線量率放射線曝露ではミトコンドリア障害に端を発した細胞質への ROS 漏えいが細胞影響につながる可能性が考えられ、その防御機構として ATM が重要な役割を果たす可能性が示唆される。

参考文献

1. Kawamura K, Kobayashi J, et al. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. J Radiat Res 59(suppl_2):ii91-ii97, 2018.
2. Nishigori C, Sugawara K, Kobayashi J, et al. DNA repair disorder, Springer, 2019.
3. Kobayashi J, et al. Increased oxidative stress in AOA3 cells disturbs ATM-dependent DNA damage responses. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 782, 42-50, 2015.