

特別講演

# わずかなエネルギー付与で細胞死を起こす放射線の特殊な作用 —放射線安全管理に向けた放射線生物学研究の重要性—

北海道大学大学院獣医学研究科

教授 桑原幹典

北海道大学大学院獣医学研究科の桑原と申します。私は今、北海道大学放射性同位元素等管理委員会委員長を務めており、北海道大学の放射線や放射性同位元素管理の責任者としていろいろなことに携わっています。実は先週金曜日に、北海道大学の放射線の取扱者、作業従事者に対する訓練・講習会をやったばかりで、そういう内容でお話したいと思っておりましたら、放射線基礎医学教室の近藤隆先生から、私自身の研究も含め、学術的な話をしてくださいと言われましたので、考えた末にこのようなタイトルをつけました。話の内容がはたして皆様方のご期待に添えるものになるか否か、甚だ自信はないのですが、私の研究とそれに関連したことをお話ししたいと思います。(スライド1)

## 1 放射線の生物作用の特徴

### 1.1 LETが異なる電離放射線の飛跡

<スライド2>

$\alpha$ 線のような放射線は、組織の中に入りますと電離(イオン化)を起こします。このような作用を有する放射線を電離放射線と言いまして、放射線障害を起こす放射線は電離する能力を持つことと定義され

ています。放射線が進む距離(単位長)当たりを与えるイオン化数がLET(Linear Energy Transfer)で、イオン化の数が多いものほどLETが高い放射線です。放射線医学総合研究所でHIMACと呼ばれる炭素線を使った放射線治療が行われておりますが、これはLETが非常に高いものです。

$\alpha$ 線について説明致しますと、イオン化したものが $\alpha$ 線の飛跡に沿ってつながっているため、飛跡は黒い線となって見えるわけです。陽子線(プロトン)を照射した場合も、やはりイオン化が飛跡に沿って重なって起こっています。1 MeVの電子線を照射したときは、陽子線とはだいぶ様相が違います。電子線のイオン化は飛び飛びになって、粒子状に飛跡が残っています。200 keVのX線、 $\gamma$ 線も同じですが、このような電磁放射線を照射した場合、X線自身は飛跡を作らず、コンプトン効果などでできた二次電子線が物質を動くときに飛跡を作ります。したがって、電子線照射と同じで、粒子状で、飛び飛びにイオン化が起こっています。

## わずかなエネルギー付与で細胞死を起こす放射線の特殊な作用

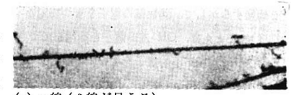
—放射線安全管理に向けた放射線生物学研究の重要性—

キーワード: スパー、ヒット、標的、DNA損傷、放射線感受性、細胞周期、DNA損傷修復、アポトーシス、ネクローシス、シグナル、p53遺伝子、Bcl-2ファミリー蛋白質、ミトコンドリア、デスリガンド、デスレセプター

スライド1

LETが異なる電離放射線の飛跡

1次粒子線による直接的電離(イオン化)



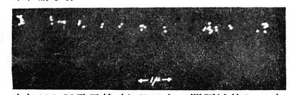
(a)  $\alpha$ 線( $\delta$ 線が見える)

1次粒子線による直接的電離(イオン化)



(b) 陽子線

1次電子線ならびに2次電子線による電離(イオン化)



(c) 1MeV電子線(クラスター間隔は約1 $\mu$ m)

2次電子線による電離(イオン化)



(d) 200KeV X線により生じた電子の飛跡

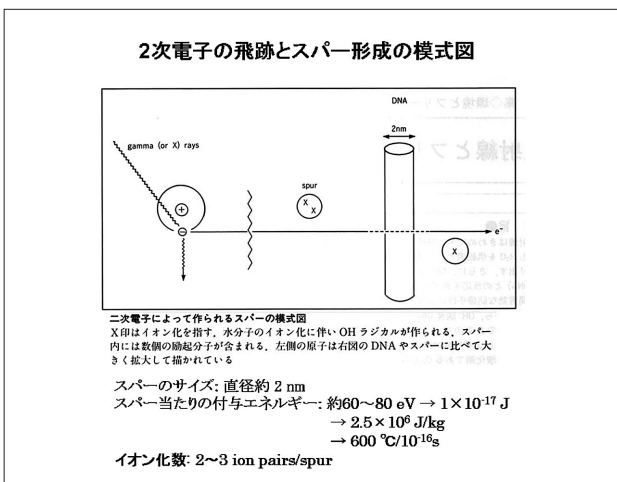
スライド2

## &lt;スライド3&gt;

それを模式図で書くと、スライド3のようになります。γ線、X線を当てて電子にエネルギーを与えると、電子が飛んでいきます。それが粒子状(＝スパー状、クラスター状)にエネルギーを付与していき、その途中には何もエネルギーを付与しません。この粒子状のエネルギー付与はクラスター(cluster)、あるいはスパー(spur)と表現されております。

このようなスパーのサイズは大体直径2 nm、付与エネルギーは60～80 eVで、ジュールに直すと $10^{-17}$ Jぐらいに相当します。したがって、ほんの僅かなのですが、2 nmの中に限って計算してみますと、水や組織だと $2.5 \times 10^6$  J/kgという非常に高いエネルギーになり、その値は生体組織の比熱を1と考えますと、600℃に相当します。つまり、2 nmという非常に小さい粒子の中で、600℃の温度上昇が、 $10^{-16}$ 秒以内に一瞬にして起こるわけです。それが時間的、空間的に分散した形で起こります。したがって、放射線のエネルギー付与は、コンロにやかんを載せてお湯を温めるときの対流のように均一にいくのではなく、スパー状(クラスター状)に、飛び飛びにエネルギーが付与されるということに特徴があります。

このスパー中に2～3個ぐらいのイオン対が生成されます。これが細胞内の重要でない部分に生じた場合、何もの障害が起こらないのですが、たまたま、DNA上あるいはその近傍にスパーが生成されると、そこにDNA障害が起こるわけです。DNAを桿状と考えるとその直径は2 nmで、スパーのサイズとほぼ同じなのも興味深いところです。



スライド3

## 1.2 電離放射線によるDNA切断のメカニズム

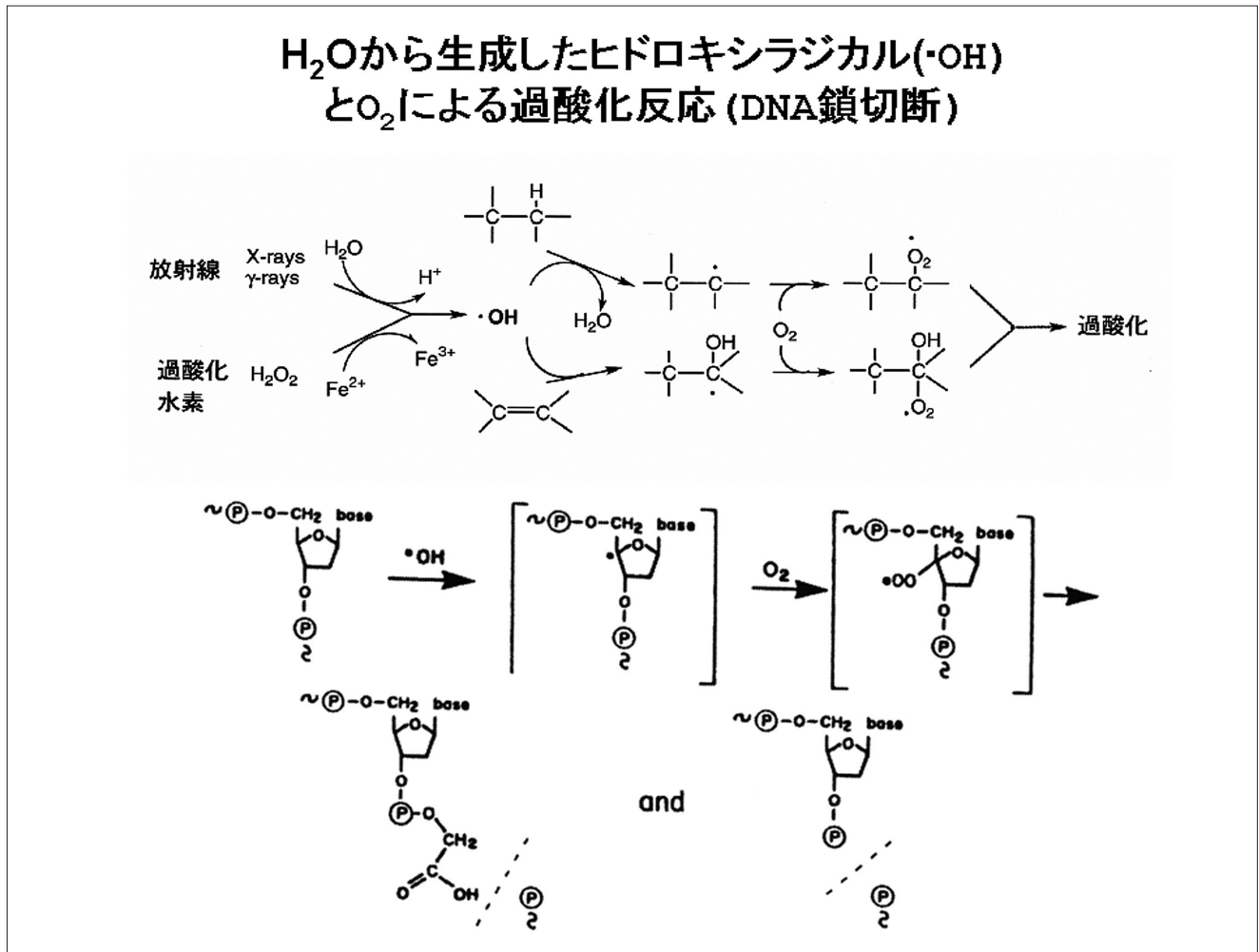
## &lt;スライド4&gt;

ヒドロキシラジカルは、通常、過酸化水素から作られるのですが、放射線のエネルギーが水分子をイオン化しますと、水分子は分解し、ヒドロキシラジカルになります。ヒドロキシラジカルは、現在知られている活性酸素の中で最も毒性が強いものですが、そういうものが生体にとっていちばん安全かつ必要な水が供給源となることができる、つまり、放射線のエネルギーがスパー状に付与されると、いきなり600℃の高温にさらされるために水分子が分解して、ヒドロキシラジカルになるわけです。

ヒドロキシラジカルは、炭素に結合している水素を引き抜き、その結果自分自身が水分子に戻る性質を有しております。反応を受けた方では、炭素に結合している水素がなくなります。水素がなくなった炭素に酸素分子が付加反応し、過酸化反応が起こります。一方、不飽和二重結合のところでは、ヒドロキシラジカルは二重結合の一つを切って、そこに酸素分子が付加して過酸化が起きます。いずれにしても、放射線が生体に吸収されると、水分子に吸収されてヒドロキシラジカルができ、それが生体物質と反応し、さらに酸素分子が付加し、過酸化反応が起こるわけです。

こういった反応が実際にDNAで起こった場合について説明致します。DNAは、デオキシリボースとリン酸が結合して主鎖ができております。このDNAの近傍に水があって、そこにスパーが生成されると、ヒドロキシラジカルができ、デオキシリボースの炭素1', 2', 3', 4', 5'のどこかの水素を引き抜きます。例えば、炭素4'の水素を引き抜き、そこにさらに酸素が付加すると、いくつかの反応経路を経てDNA鎖の切断が起こります。これが放射線によるDNA鎖切断のメカニズムで、そのスパーが効率よくDNAの二重鎖のところに付与されると、一気に2本のDNA鎖が切れ、それが染色体異常に結びつき、細胞死や突然変異、さらに癌化につながっていくわけです。

ですから、放射線の作用は、ヒドロキシラジカルと酸素の付加が基本的な反応で、放射線は容易に水からその反応を引き起こせるという特徴があります。その反応が生体中のDNAからかなり離れたところで起これば障害は少ないのですが、たまたまDNAの近傍で起こると生体にとって重要な反応が誘起されるわけです。



スライド 4

### 1.3 特殊な放射線の作用

<スライド5>

今、申し上げましたように、放射線作用の特徴は不均一なエネルギー付与でスパアの形成をすることです。スパア内への付与エネルギーは一定で、線量の増加はスパアの数を増やすだけです。つまり、放射線をたくさん与えることは、スパアの一個一個のエネルギーは60～80eVと決まっていますので、ただスパアの数を増やすだけということになります。さらに、水(H<sub>2</sub>O)が活性酸素ヒドロキシラジカルの供給源で、酸素の相助作用によって酸化的にDNA鎖切断が誘導されます。スパアがDNAに重なった(ヒットした)とき、効率よくDNA二本鎖の切断がもたらされます。すなわち、DNAの障害は、ヒットされるか、されないかという確率の問題になるわけです。ですから、どんなに低い線量であっても、ヒットされる確率はある、逆にどんな高い線量になっても、ヒットされない確率もあることになります。

現在、放射線障害を防止するため、100mSv/5年

### 特殊な放射線の作用

1. 不均一なエネルギー付与  
spurの形成 (spur内の付与エネルギーは一定、線量の増加はこの数を増やすだけ)
2. H<sub>2</sub>Oが活性酸素ヒドロキシラジカル( $\cdot$ OH)の供給源
3. ヒドロキシラジカル( $\cdot$ OH)と酸素(O<sub>2</sub>)の相助作用により酸化的DNA鎖切断が誘導される
4. spurがDNAと重なり合った(ヒット)とき、効率良くDNA2本鎖の切断がもたらされる。すなわち、DNAの傷害は確率事象として現れる

スライド 5

とか、50mSv/年という線量限度が決められていますが、この線量限度がどこから来るかというと、放射線は一定の確率でヒットすることになりますから、ここまでは安全、ここからは危険というように閾値を設けることができないことをまず考える必要があります。ですから、ある一定の線量限度を設定する

しか方法はありません。そこでメリット・デメリットを考えて、メリットの方が勝るとき、初めて設定できることとなります。100mSv/5年というのは20mSv/年になるのですが、これは一般職業人についての職業リスク $10^{-3}$ を下回るリスクとなっております。

50mSv/年というのは、皆さん分かりにくいと思うのですが、5年間で100mSv、ただし1年に限っては50mSvという意味です。2年間で $50 + 50 = 100$ mSvを被ばくしてしまったら、あと3年間はもう放射線業務に従事できないことになるという考え方です。50mSvになると一般職業リスクの1.25倍になりますので、100mSv/5年という値が設定されるわけです。決して根拠のない値ではないのですが、確率事象なので、線量限度を設けるしかないというのが基本的な考え方です。

## 2 放射線誘発アポトーシスの研究

### 2.1 放射線の標的(センサー)は本当にDNAか？

<スライド6>

今、DNAを標的あるいはセンサーとして私は勝手に決めていたのですが、本当に標的はDNAなのか、それともそれ以外にあるのかという問題になります。

#### 2.1.1 放射線・制癌剤に抵抗性を示す細胞はアポトーシス出現率が低い

<スライド7>

放射線とか制癌剤に対し抵抗性を示す癌細胞ではアポトーシス出現率が低いことが知られております。そこで、放射線でアポトーシスを誘導するにはどのような方法があるか、世界中で研究が行われてきましたが、それは臨床学的な要求から来ているのです。放射線安全管理ばかりやっても文科省の科研費はほとんど貰えませんし、どこからも研究費が来ま

## 放射線の標的あるいはセンサーは何か？

**DNA それとも  
DNA以外の何か？**

スライド6

## ◇放射線・制がん剤抵抗性細胞

→ アポトーシス出現率が低い

スライド7

せんので、私もほかの皆さんと同じようにアポトーシス研究に入り、放射線誘発アポトーシスを何らかの意義を見つけるための研究を行っております。

### 2.1.2 DNA損傷とデスレセプターから始まる2つのアポトーシス経路

<スライド8>

アポトーシス誘導には基本的に二つのシグナル伝達経路があるといわれています。一つは、DNAに損傷が生じると、そこからシグナルが発生し、アポトーシスにいく経路と、もう一つは、いわゆるデスレセプター(死のレセプター)を通してシグナルが発生し、アポトーシスにいく経路です。放射線はDNA損傷を与える典型的な物理的因子ですので、アポトーシスを誘発することがあります。したがって、これまで放射線誘発のアポトーシスについての研究が多く行われてきました。

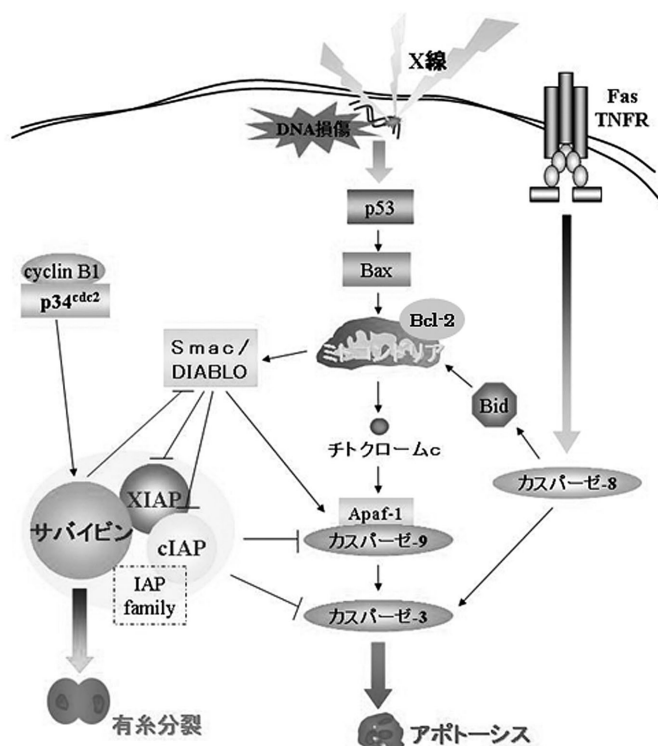
アポトーシスを研究するには、4つのコンポーネントが重要になります。まず、ミトコンドリアの役割です。X線のDNA損傷からp53蛋白質が活性化し、さらにBax蛋白質が活性化し、ミトコンドリア上でBcl-2蛋白質と結合します。Bcl-2は普通ホモダイマーとして機能しているのですが、Baxと結合し、ヘテロダイマーになって機能が中和されてしまうので、ミトコンドリアからチトクロームcが遊離してくることが知られています。チトクロームcは蛋白質分解酵素カスパーゼを活性化するように作用しますので、その結果アポトーシスが起こります。したがって、まずミトコンドリアでのBcl-2やBaxの役割を研究しなければなりません。次に、細胞表面のデスレセプターを経由したメカニズムの研究が必要です。それから、カスパーゼという蛋白質分解酵素がアポトーシスに関与していますので、カスパーゼの役割も研究する必要があります。



## DNA損傷とデスレセプターから始まる2つのアポトーシス経路

### アポトーシスメカニズムの4つのコンポーネント

1. ミトコンドリアの役割
2. Bcl-2ファミリーの役割
3. 細胞表面から始まるメカニズム
4. カスパーゼの役割



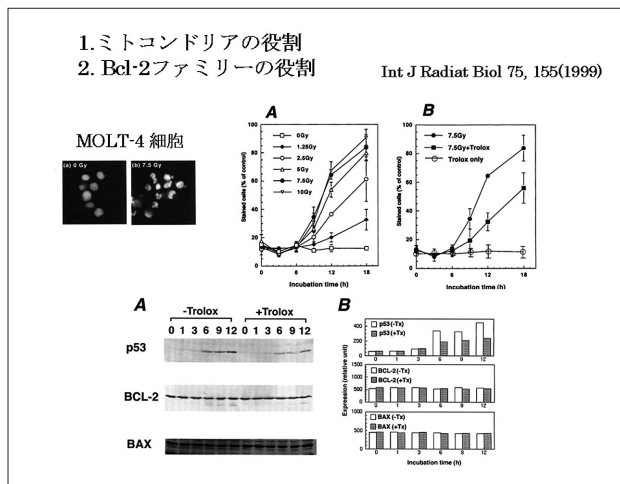
スライド 8

### 2.2 ミトコンドリアと Bcl-2 ファミリーの役割ー p53 遺伝子の正常な細胞と正常でない細胞との比較ー

#### 2.2.1 ミトコンドリアと Bcl-2 ファミリーの役割 <スライド9>

スライド9の左上の写真は、私が実験に用いた MOLT-4 というヒトのリンパ芽腫株化細胞です。放射線を当ててもほとんどの細胞はアポトーシスを起こさないのですが、アポトーシスを起こしやすいのがこの MOLT-4 細胞です。リンパ系の細胞は大抵アポトーシスを起こすのですが、実際に 7.5 Gy X線を照射すると、アポトーシスが観察されます。線量を上げれば上げるほど、高くなれば高くなるほど、アポトーシスが出現する時間が早まってきます。

照射したあとの細胞に Trolox というビタミン E 誘導体(水溶性の抗酸化物質)を入れると、アポトーシスの出現が抑制されます。照射前に入れておくのならまだ分かるのですが、照射した後、水の分解産物であるヒドロキシラジカルの反応や酸素付加反応などは  $10^{-6}$  秒ほどの間に終わっていますので、すでに DNA の切断が起こっているのですが、それにも係わ



スライド 9

らず抑制されているということで、早速先ほどの4つのコンポーネントについて調べてみました。そうすると、p53蛋白質は放射線によって確かに発現量は増し、Troloxで処理をすると減少するのですが、Bcl-2とBaxを調べてみますと、全く放射線によってもTroloxを入れても、変化はありませんでした。この結果から、p53蛋白質から下流にはアポトーシ

シグナルは伝わっていないと判断致しました。

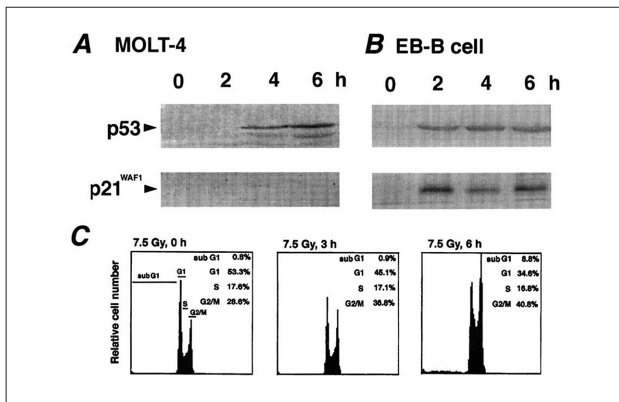
<スライド 10 >

これを確認するために、p53 蛋白質の下流に位置する蛋白質の発現、活性化について調べました。EB ウイルスをトランスフェクトし p53 遺伝子正常な B 細胞 (EB-B cell) で調べて見ますと、p53 蛋白質の下流の蛋白質の発現は正常であり、X 線を照射すると、p53 から p21 を経て、G1/S 期のところで細胞が停止してしまう現象が観察されました。ところが、MOLT-4 細胞だと全くそういった現象は見られず、やはり下流にシグナルが伝わっていないのではかと考えました。

2.2.2 DNA 二本鎖切断誘導とアポトーシス

<スライド 11 >

さらに確認するために行った実験がスライド 11 です。プロモデオキシウリジン (BrdU) を細胞培養液に入れると DNA に取り込まれ、X 線照射すると DNA の二本鎖切断数が有意に増えます。p53 遺伝子が正



スライド 10

常な HL-60 細胞では、DNA 二本鎖切断数の指標 (tail moment) が増加し、アポトーシスも増えるのですが、MOLT-4 細胞では DNA 切断数を増やしてもアポトーシスは何も増えません。したがって、MOLT-4 細胞では DNA というよりは、別のメカニズムによってアポトーシスが起きていることが推察されます。

<スライド 12 >

つまり、MOLT-4 細胞では二重鎖切断が起きて p53 蛋白質までシグナルは来るのですが、p53 遺伝子に変異か何かが起こっていて、特に Bax と Bcl-2 を調べるとミトコンドリアからカスパーゼへの下流の経路は全く伝わっておりませんので、やはり別の経路を考えなければならないということになります。

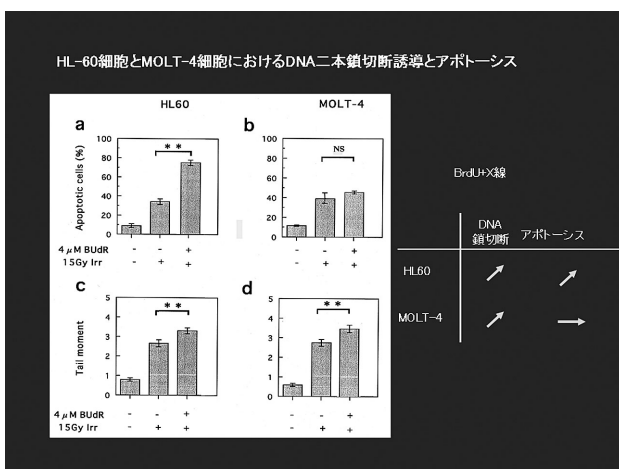
2.3 細胞表面から始まるメカニズム

2.3.1 X 線照射後のデスレセプター (Fas, DR5) の発現

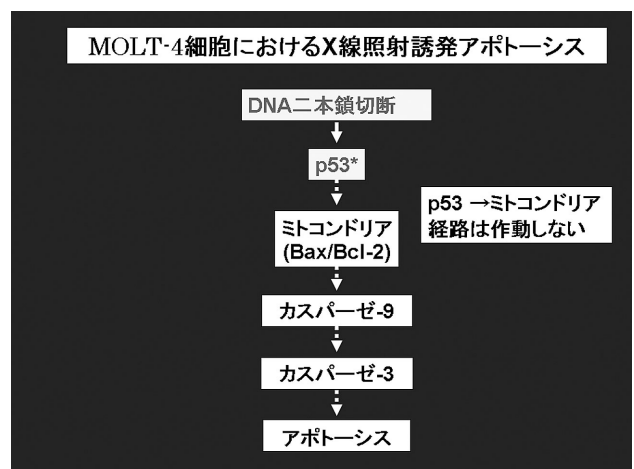
<スライド 13 >

そこで、今度は細胞表面で、デスレセプター (Fas, DR5) の発現はどうなっているかを調べました。このスライドは、デスレセプターの細胞表面での発現と全発現量を調べたものです。

調べた細胞は、MKN 45 (ヒト胃癌細胞で、p53 は野生型)、A549 (ヒト肺癌細胞で、p53 は野生型)、MKN 28 (ヒト胃癌細胞で、p53 に変異が起こっているもの)、DU145 (ヒト前立腺癌の細胞で、p53 に変異が起こっているもの) などです。いろいろな癌細胞を使って調べてみますと、例えば、MKN45 ではデスレセプターの発現量は放射線照射に伴い増加するのですが、前立腺癌の細胞 (DU145) は全く増加しません。DR5 では増加する場合もあれば、全く増加し



スライド 11



スライド 12

ないものもあつたりして、はっきりしません。しかしながら、細胞表面における発現量を調べますと、どの細胞もすべて細胞表面では増加していることが分かりました。

<スライド14>

このスライドはFasの細胞表面での発現を蛍光抗体にて観察したものです。

2.3.2 蛋白質合成阻害剤によるアポトーシスとデスレセプター発現抑制

<スライド15>

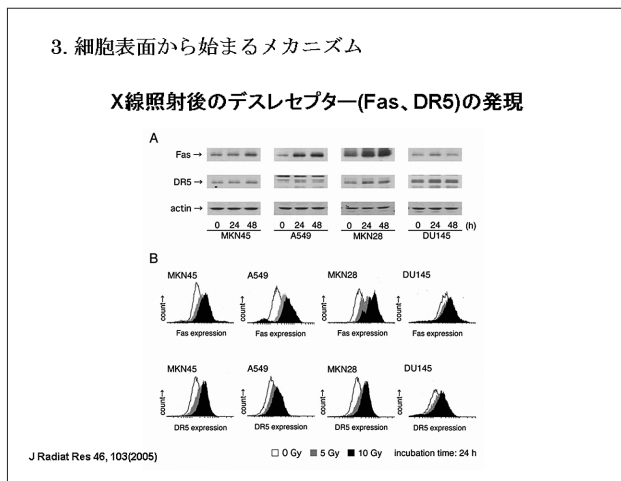
したがって、Fasは全発現量が増えなくてもX線照射によって細胞表面に移動してくることが分かりました。これまで、我々は放射線照射をする前に蛋白質合成阻害剤CHX(シクロヘキシミド)を入れておくと、アポトーシスが抑制されることを見つけておりますので、MOLT-4細胞に7.5GyのX線照射し、Fas発現に対するCHXの効果も調べてみました。時

間経過とともに増加していたデスレセプターの全発現量と細胞表面での発現量が強く抑制されることが観察されました。つまり、Fasの発現には新たな蛋白合成が必要であるということが判ったわけです。

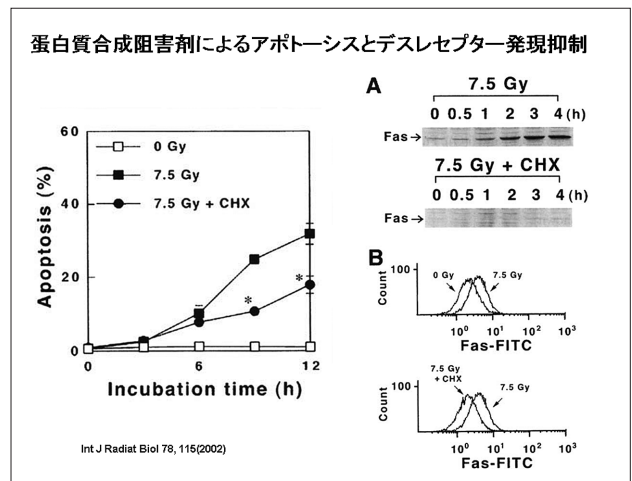
2.3.3 蛋白質合成阻害剤によるSAPK/JNK, c-Jun, AP-1形成抑制

<スライド16>

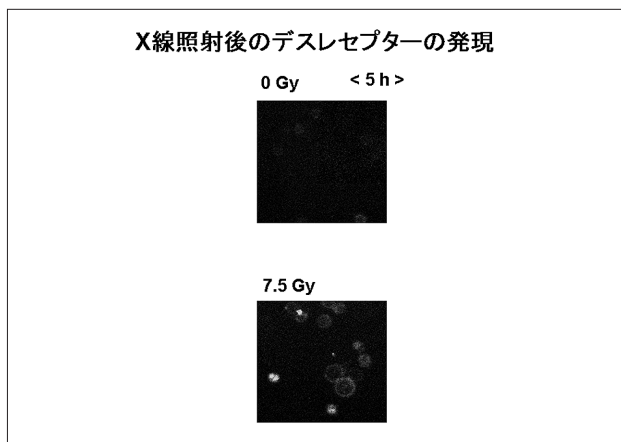
放射線で新たな蛋白合成が関係するとすれば、放射線を一種のストレスと考え、それに応答して活性化する酵素群が考えられます。MAPK(mitogen-activated protein kinase)がそれで、その一つであるSAPK(stress-activated protein kinase)、これはc-Junという転写因子のN末端をリン酸化する酵素で、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)ともいわれるリン酸化酵素等が考えられます。c-Junがリン酸化されると、c-fosとヘテロダイマーAP-1を構成し、転写が開始し、蛋白合成が行われます。先ほどのCHXという蛋



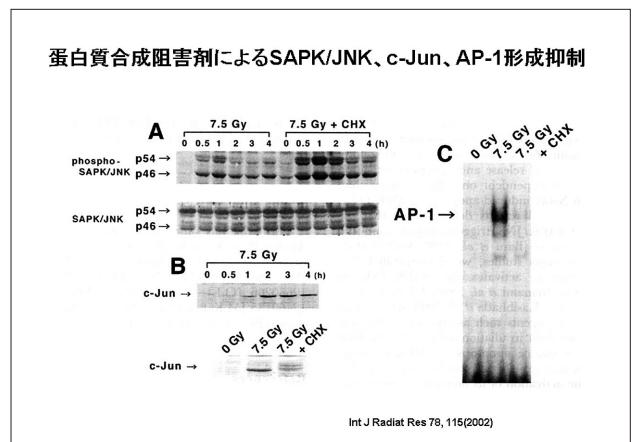
スライド13



スライド15



スライド14



スライド16

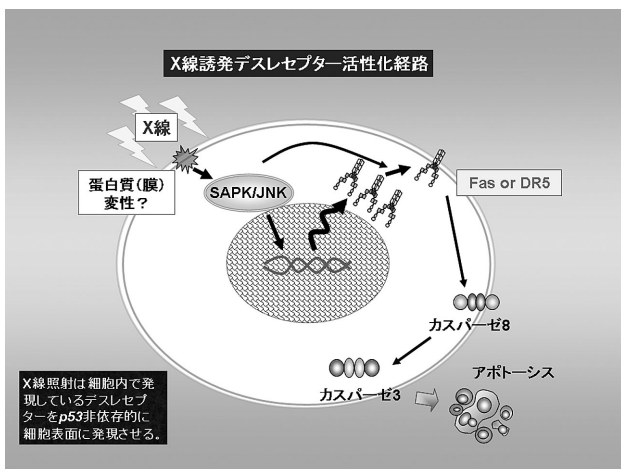
白質合成阻害剤を添加しますと、SAPK/JNK 活性化の抑制はないのですが、c-Jun のリン酸化(活性化)は明らかに抑制されます。

それから、c-Jun が c-fos と結合してヘテロダイマー AP-1 になると、コンセンサス DNA 配列に結合致しますので、それをゲルシフトアッセイ法で見ることができます。そこに CHX を入れるとゲルシフトが見られなくなりますので、これを見ても蛋白質合成阻害剤が c-Jun の活性化に大きく影響を与えていることが分かりました。

### 2.3.4 X線誘発デスレセプター活性化経路

<スライド17>

X線によるアポトーシス誘導に DNA 鎖切断以外の原因を考えますと、細胞のどこかがイオン化され、酸素が付加したあと SAPK が活性化し、c-Jun が AP-1 になり、さらに Fas の発現増加のメカニズムを考えなければなりません。AP-1 による転写開始が起こりますと、それにより c-Jun 自身の合成が進み、それがまたリン酸化され、自分自身で自分の生成をコントロールすることになります。それがある程度蓄積されますと、今度は Fas の発現あるいは Fas の細胞表面への移動に関係してくるのではないかと考えられます。そのため、CHX を入れると、c-Jun から Fas 発現の経路が遮断されるため、アポトーシスが抑制されたのではないかと考えられます。Fas や DR5 の発現量が増し、次いでカスパーゼ8、カスパーゼ3等のカスパーゼ経路を通してアポトーシスに行く、そういう DNA 非依存的な経路も放射線の場合あるのではないかと発表し続けています。



スライド 17

### 2.3.5 SAPK/JNK → Fas, DR-5 経路はレドックス制御を受ける

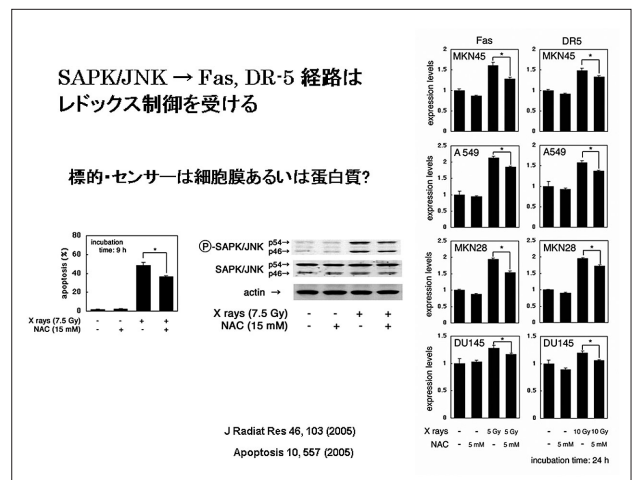
<スライド18>

もう一つ大変興味深いのは、この SAPK と Fas, DR-5 というデスレセプターのシグナル伝達経路がレドックス制御を受けるということです。N アセチルシステイン (NAC) という還元型グルタチオン濃度を高める薬物を放射線照射後に投与すると、明らかにアポトーシスが抑制され、さらにリン酸化(活性化)される SAPK の量も落ちてきます。いろいろな癌細胞で調べてみますと、程度の差はあるのですが、すべて NAC によって SAPK の活性化は抑制されます。このようにグルタチオンの酸化還元反応を介したシグナル伝達経路の制御をレドックス制御と言います。したがって、NAC などがレドックス制御する標的分子は、DNA 切断が起きてしまっておりますので、やはり細胞膜にある蛋白質などの酸化還元反応が関係していると考えられます。そんな複雑なシグナル伝達経路を通して細胞が死ぬのかと、いつも学会で質問されますが、事実は事実だと思っております。DNA からミトコンドリアへの経路がないことは確かなので、こういう経路も充分に存在すると思えます。

### 2.3.6 セラミド形成とアポトーシス

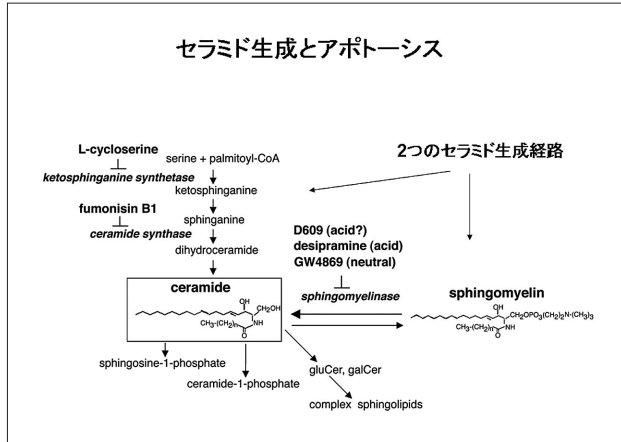
<スライド19>

もう一つよく言われるのは、セラミド合成が亢進を受けることによってアポトーシスが起きたのではないかということです。セラミドがアポトーシスを起こすことは良く知られております。セラミドは de novo 合成経路とスフィンゴミエリン(sphingomyelin)



スライド 18





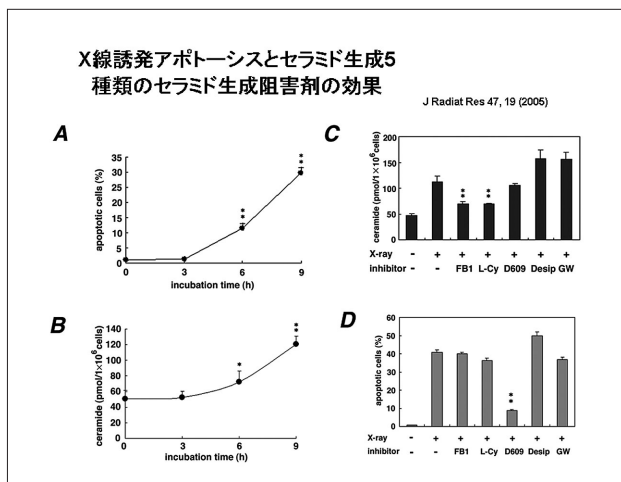
スライド 19

の代謝経路の2つの経路によって生成されます。放射線照射の場合、セラミドがアポトーシスを起こすという論文は多くあります。そこで、de novo 合成には、セラミド合成酵素 (ceramide synthase) などいろいろな酵素が関与しますので、その阻害剤であるフモンシン B1 (fumonisin B1) や L-シクロセリン (L-cycloserine), あるいはスフィンゴミエリンからの生成にはスフィンゴミエリン分解酵素 (sphingomyelinase) が関与しますので、その阻害剤 D609, デシプライン (desipramine), GW4869 で X 線照射後の細胞を処理し、その影響を見ることに致しました。

#### 2.3.7 セラミドはアポトーシス誘導には関与しない?

<スライド 20 >

X 線を当ててインキュベーションするとアポトーシスが現れますが、セラミドの生成も調べて見ますと、両現象とも 3 時間を過ぎてから同時に現れるの

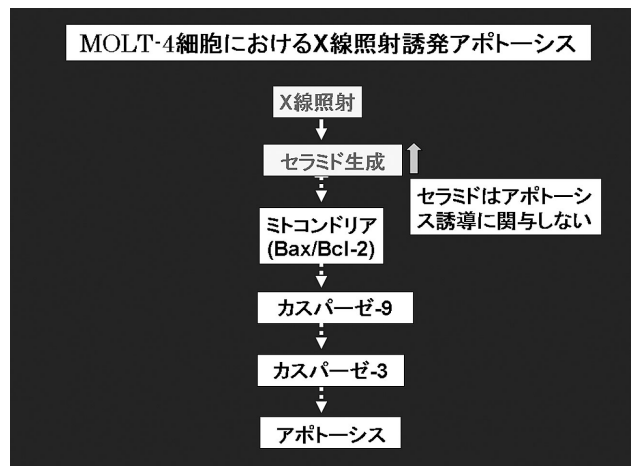


スライド 20

が観察されました。セラミドが原因であれば、少し早めに出てきて、その後アポトーシスが出てくるのが正常な現象だと思いますが、同時に出てきていますので、セラミドは関係ないのではないかと推察し、先ほどの阻害剤を入れてみました。そうすると、X 線照射によって促進されたセラミド生成がセラミド合成酵素阻害剤により抑制されましたが、スフィンゴミエリン分解酵素の阻害剤では抑制されず、一方、アポトーシス抑制効果は D609 のみにしか観察されませんでした。例えば、フモンシン B1 や L-シクロセリンなどはセラミド生成を抑制してもアポトーシスは抑制しません。やはりセラミド経路は関係ないのではないかという結論になりました。一方、その逆にセラミド生成を抑制しない D609 がアポトーシス誘導を強く抑制する結果も得られました。しかも、D609 がセラミド合成酵素の特異的阻害剤として論文に発表されておりましたので、当初、この研究の論文は受理されませんでした。ところが、ごく最近、セラミドがグルタチオンに類似した性質を持っていることが報告され、アポトーシスの抑制は、放射線防護剤としての性質により説明できることが明らかになりました。したがって、D609 によるアポトーシス抑制は、セラミド生成の抑制によるものではなく、放射線防護の結果であり、やはりセラミドの放射線誘発アポトーシスへの関与は低いと判断されました。

<スライド 21 >

結局、MOLT-4 では、X 線照射したあとセラミドは生成されるのですが、セラミドによるシグナル伝達経路は働いていないということで、セラミドの関与は低いと思われます。



スライド 21

## 2.4 カスパーゼの役割

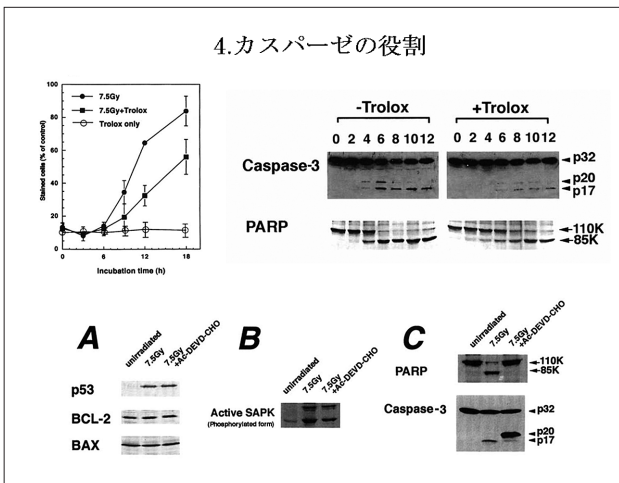
### 2.4.1 Trolox (ビタミンE誘導体)等によるカスパーゼ3活性化の抑制

<スライド22>

アポトーシス誘導には、さらにもう一つ、カスパーゼの役割があります。Troloxという抗酸化物質は、ビタミンEの水溶性誘導体なのですが、放射線照射後にこれで処理すると、アポトーシスが抑制されます。Troloxはアポトーシス実行因子で、ステインプロテアーゼであるカスパーゼ3の活性にも影響を与え、それを抑制します。

p17はプロカスパーゼ3がカスパーゼ-3に分解し、活性化フラグメントになったものですが、その活性化フラグメントp17の量がTrolox処理により明らかに低下しているのが分かります。また、その基質となるPARP (Poly-ADP Ribose Polymerase)の分解も抑えられますので、明らかにTroloxによってカスパーゼ3が抑制されているのが分かります。すなわち、これらは非常によく連動しているということです。

カスパーゼ3にカスパーゼ3の阻害剤を入れるというのも変なのですが、カスパーゼ3の特異的阻害剤Ac-DEVD-CHOで処理しますと、PARPの分解能が抑えられ、それからカスパーゼ3自身が自分自身を分解しますので、それ自身が抑制されるということで、p17のフラグメントも減少いたします。さらに、Ac-DEVD-CHOで処理したときのp53やBcl-2, BAXを調べてみても、当然カスパーゼ3の阻害剤ですから、これらに影響は出てくるわけはありません。そういうことで、やはりカスパーゼ3まではミトコンドリアとは別の経路から伝達されているということになります。



スライド22

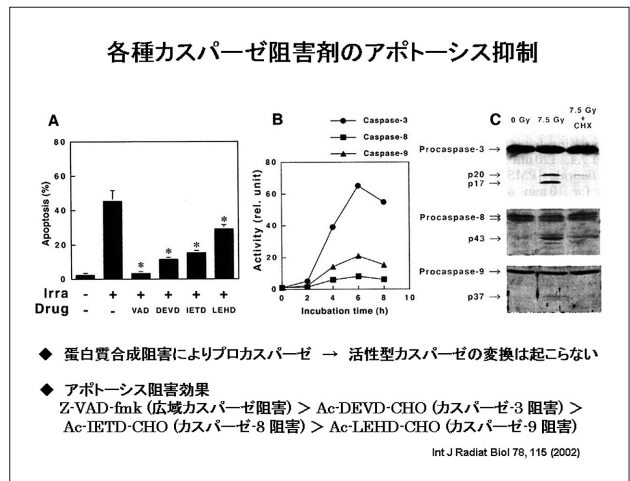
### 2.4.2 各種カスパーゼ阻害剤のアポトーシス抑制 <スライド23>

各種カスパーゼの阻害剤は分かっていますので、どんなカスパーゼが関係しているのか調べてみました。VADというのは、広域カスパーゼ阻害剤で、それで処理すると放射線誘発アポトーシスは強く抑えられる。つまり、全カスパーゼが抑えられてアポトーシスがほとんど出現しません。それから、カスパーゼ3、カスパーゼ8、カスパーゼ9それぞれの阻害剤で処理いたしますと、やや効果は悪いのですが、それでもアポトーシスは抑制されております。アポトーシス誘導に必要な蛋白質合成はこれらカスパーゼシグナル伝達の上流に位置しますので、CHXにより蛋白合成阻害を行いますと、カスパーゼの活性化フラグメントは現れません。

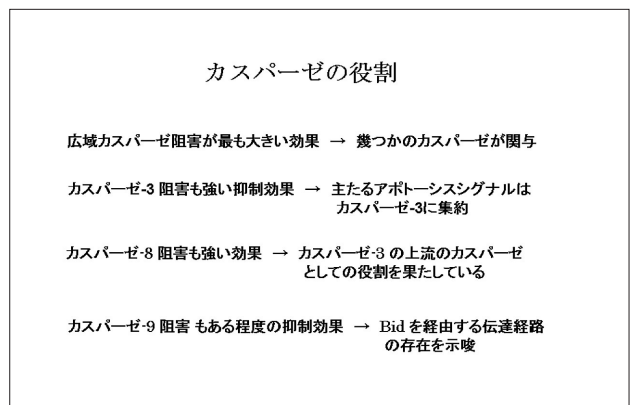
### 2.4.3 「カスパーゼの役割」のまとめ

<スライド24>

カスパーゼの効果を調べますと、広域カスパーゼ



スライド23



スライド24

阻害剤がいちばん抑制しております。次がカスパーゼ3→8→9の順で、アポトーシスがデスレセプターのほうから来ているとしますと、カスパーゼ3には最終実行因子として集約しますので、次にカスパーゼ3阻害剤が効き、その上流にあるカスパーゼ8はほぼ同じ程度に効きます。ここまでは理にかなっておりますが、カスパーゼ9の阻害剤も少し効いています。実は、このカスパーゼ8からBidを通してミトコンドリアにシグナルが伝達されることが知られておりますので、ミトコンドリアからのシグナル伝達がわずかに貢献しているのかも知れません。

**細胞の放射線感受性を決定する因子は何か？**

↓

**G2/S期ブロックとサバイビン**

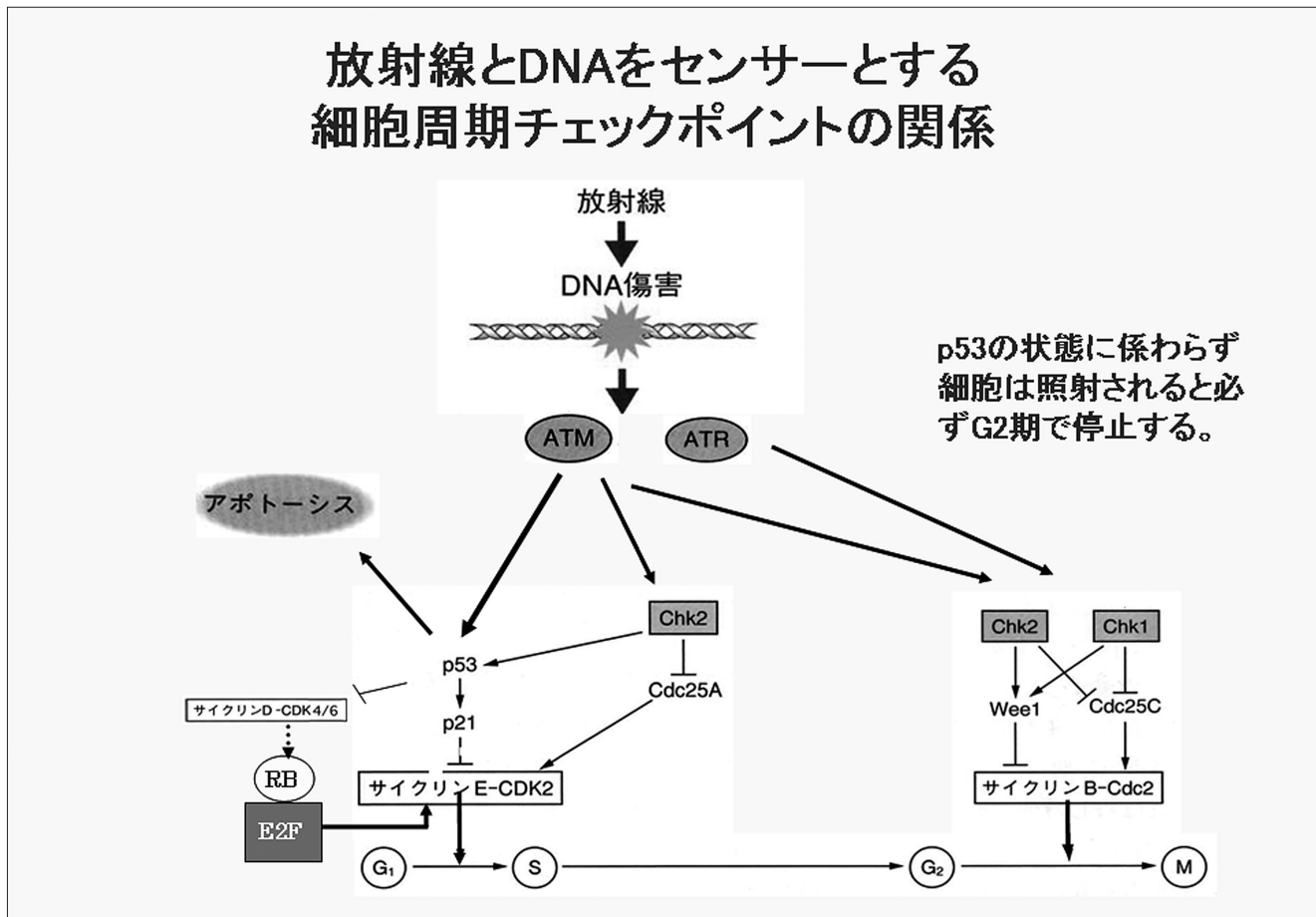
スライド 25

2.5 細胞の放射線感受性を決定する因子は何か？  
 <スライド 25 >

そうすると、細胞の放射線感受性を決定する因子は何かということになります。放射線に抵抗性を示す細胞はアポトーシスを起こしませんし、そういったことが何によって決まっているのかということになります。

2.5.1 放射線とDNAをセンサーとする細胞周期チェックポイントの関係  
 <スライド 26 >

p53 遺伝子が正常な細胞は、ミトコンドリアを通してアポトーシスが出やすいので、総じて放射線の感受性は高く、それを決定する因子はあまり考えることはなかったのですが、私共の研究のようにデスレセプターから細胞死が誘導される場合、細胞の放射線感受性を決定する因子が何かを決定しなければ

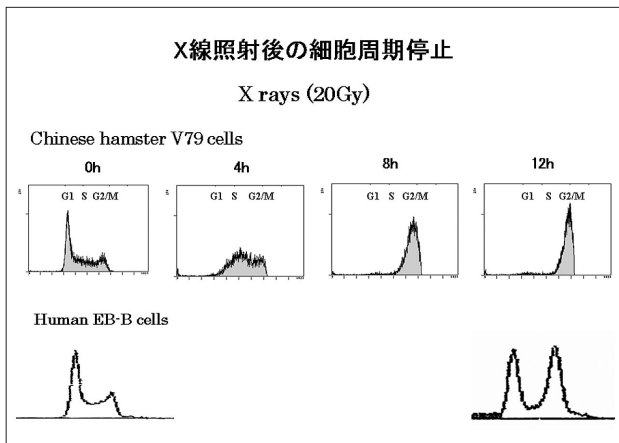


ならないということになります。そのときの鍵となるのがG2/S期ブロックとサイバピンという蛋白質です。放射線でDNAに二重鎖切断が起きると、一つはp53蛋白質を通して細胞周期のS期の前でG1/Sブロックといって、細胞がここから先へ進めなくなる現象が起こります。DNA合成が始まる前にDNA障害があるとまずいので、いったん止め、その間にDNA障害を修復するメカニズムが働くといわれています。照射線量が多く、DNAの障害が多くなると、修復するよりもアポトーシスを優先させます。もう一つは、p53蛋白質に依存せずにChk1とかChk2というキナーゼを通してM期の直前で細胞を止めてしまうG2/Mブロックが起きます。M期(有糸分裂期)に入る前に、やはりDNA損傷を修復するためにG2期にブロックが起こります。このようなことから、それぞれG1/S期チェックポイント、G2/M期チェックポイントと呼ばれております。

癌細胞をいくつか調べてみますと、p53遺伝子が異常の細胞ではG1/Sブロックが起きず、G2/Mのブロックだけしか起こりません。p53蛋白質の方からのアポトーシスはミトコンドリアを通して容易に行きますが、G2/M期ブロックの場合はp53には関係なく、したがって、細胞の放射線感受性を決定している因子が別にあるのではないかと想像されます。

2.5.2 X線照射後の細胞周期停止  
＜スライド27＞

細胞周期停止について例を示します。例えば、チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞V79で見ますとX線照射してもp53がnullですのでG1/S期ブロックは起きませんが、G2/M期ブロックは必ず起こります。フロサイトメーターで見ると確かにG2/M期の



スライド27

細胞が多くなっております。EBウイルスでトランスフェクトしたEB-B細胞では、p53が正常なので、X線照射するとG1/S期でブロックが掛かり、フロサイトメーターではG1/S期の細胞が多くなり、またG2/M期の細胞も多くなります。つまり、p53が正常であればG1/S期でのブロックも起きますが、正常でないとG2/Mだけのブロックになるということです。このように、このフロサイトメーターの実験でp53遺伝子が正常か異常かを知ることができます。

2.5.3 G2/M期停止、アポトーシス、放射線感受性  
＜スライド28＞

いろいろ調べてみますと、このG2/M期停止というのは、アポトーシスや放射線感受性に強く関係しているのではないかという論文が次々と出ています。細胞周期とアポトーシスを制御不能にして、アポトーシスも出にくくなった、細胞周期もおかしくなってしまった、先ほどのチェックポイントもおかしくなったという遺伝子変化を起こした細胞は必ず癌化と関連しています。また、そういう異常は、必ず放射線・制癌剤への感受性に影響を与えていますので、我々がアポトーシスを研究する意味がここにある訳です。

それから、放射線照射後のG2/M期停止はp53遺伝子の状態に関係なく起こりますが、この細胞周期の遅延は、照射後の細胞の生存に関わります。遅延が長ければ長いほど、放射線抵抗性です。ですから、G2期の停止の長さは放射線感受性に強く影響を与えております。それからアポトーシスはG2/M期に蓄積後、出現することが多いのです。したがって、放射線や制癌剤抵抗性の細胞はアポトーシス出現率が低いのです。

**G2/M期停止、アポトーシス、放射線感受性**

- ◇細胞周期とアポトーシスを制御不能細胞にした遺伝子変化
  - 細胞がん化と関連
  - 放射線・制がん剤への感受性に影響
- ◇放射線照射後のG2/M期停止
  - G2/M期の遅延は照射後の細胞の生存に係わる
  - アポトーシスはG2/M期に蓄積後、出現
  - G2/M期の停止の長さが細胞の放射線感受性を決定する因子
- ◇放射線・制がん剤抵抗性細胞
  - アポトーシス出現率が低い

スライド28



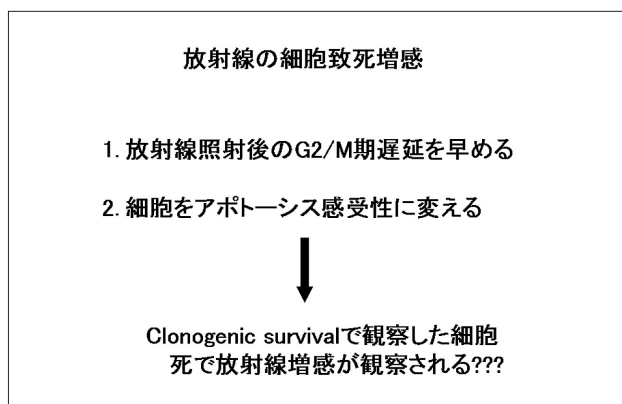
### 2.5.4 放射線の細胞致死増感

<スライド 29 >

そういう事実から私は、放射線照射後の G2/M 期遅延を早め、アポトーシスが出やすいように細胞を変えてやれば、細胞の放射線感受性が上がるのではないかと考えました。いわゆる clonogenicity (細胞の増殖能力) で評価した細胞死でも放射線増感が観察されるのではないかと考えました。

こういう研究を行っていて、放射線誘発アポトーシスでは増感が見られても、clonogenicity では差がないことがしばしば観察されます。つまり、アポトーシス増感を起こすよう処理しても、最終的には細胞死はネクローシスも含まれますので、clonogenicity という細胞のコロニー形成能によって死を判定した場合、アポトーシス増感が反映された結果がなかなか得られません。コロニー形成能を失えばそれが細胞死のエンドポイントになるという考えは、癌細胞を意識したもので、癌細胞は無限増殖能を持った細胞ですから、放射線照射によりその増殖能を失えば、制癌という立場から言えば細胞死と見ることができます。ですから、これは1個の細胞がコロニーを形成するというので clonogenic survival というのですが、それで細胞死を判定した場合、エンドポイントはほとんど変わりません。アポトーシス増感を起こしてやっても、結果を clonogenicity で見れば差がないので、アポトーシス増感の研究に意味があるのでしょうかと疑問が出てくる訳です。

そこで、G2/M 期ブロックが長く続き、アポトーシスが出にくい細胞は放射線や制癌剤に抵抗性なので、理由はよく分からないにしても、X線照射後の G2/M 期ブロックを解除すれば、細胞はアポトーシス感受性になり、さらに clonogenicity で見た細胞死の増感にも繋がるのではないかと考えました。



スライド 29

### 2.5.5 G2 チェックポイントとアポトーシス抑制 <スライド 30 >

先ほど言いましたように、G2/M 期ブロックは X 線照射後の DNA 損傷からきます。そして、サイクリン B1 という、細胞周期によって出現するサイクリンという蛋白質がありますが、そのサイクリン B1 と Chk1 等のキナーゼがリン酸化されて結合すると、それが不活性型になって G2/M 期ブロックが起こります。逆に、フォスファターゼでリン酸基が外されると今度は細胞周期が動くということで、このサイクリン B1 と Cdc2 (Cyclin-dependent kinase 2) の結合が細胞周期を止めたり進めたりします。このとき、アポトーシス感受性を左右するサバイビンという蛋白質が必ずそれとリンクしていて、Cdc2 やサイクリン B1 に、サバイビンが結合すると、これがカスパーゼに結合してカスパーゼの活性を抑制するためにアポトーシスでなくなるということがだんだん明らかになってきております。

### 2.5.6 サバイビンによるアポトーシス抑制のメカニズム

<スライド 31 >

サバイビンは、アポトーシスを抑制する蛋白の一つとして知られているのですが、このサバイビンに関しては多くの論文が出されております。サバイビンはアポトーシス蛋白質阻害因子 (IAP; inhibitor of apoptosis proteins) ファミリーの一員で、アポトーシスを抑制します。腫瘍細胞で過剰発現しておりますので、腫瘍細胞はアポトーシス抵抗性になっていますし、制癌剤・放射線抵抗性の一因にもなっています。発現量は細胞周期に依存し、G2/M をブロックするところで最大になっています。

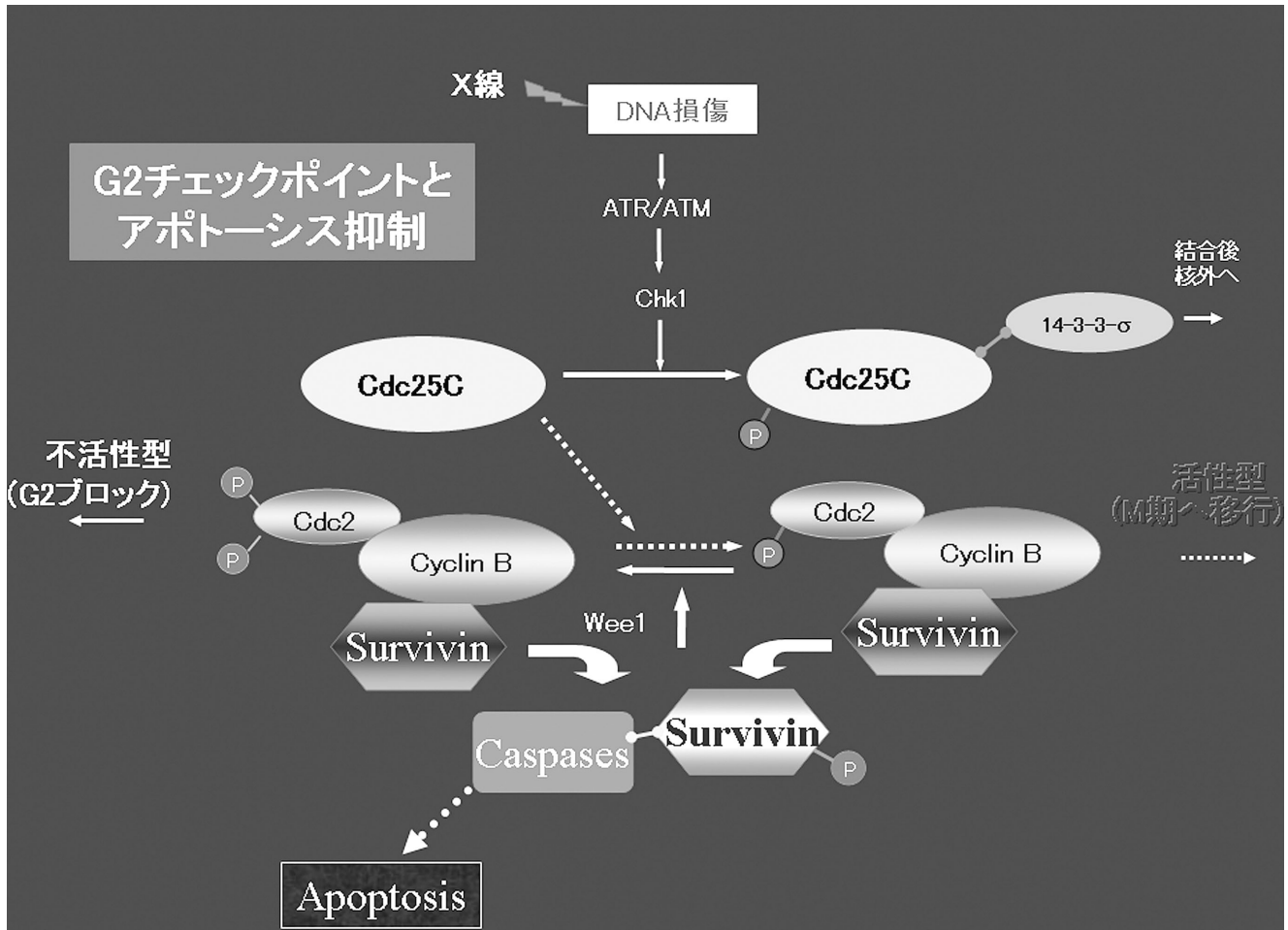
サバイビンによってアポトーシスを抑制するメカニズムは、カスパーゼに結合して直接抑制する経路と、ミトコンドリアからの経路を干渉する間接的な抑制経路がありますが、このサバイビンと G2/M 期ブロックが放射線抵抗性につよく関係していると考え、我々はそこに的を絞って研究を進めました。

### 2.5.7 放射線照射による G2 期細胞の増加

<スライド 32 >

放射線を当てますと、サバイビンが発現するとともに G2/M 期の細胞が増えます。

### 2.5.8 制癌剤エチニルシチジン (ECyd, TAS106) の化合構造とその活性化



スライド 30

**サバイビン**

- 1.inhibitor of apoptosis proteins (IAP)ファミリーの一員
- 2.アポトーシス抑制と有糸分裂の実行 [Altieri & Marchisio (1999) Lab Invest 79: 1327-33]
- 3.多くの腫瘍細胞で過剰発現 [Ambrosini, Adida & Altieri (1997) Nature Med 3: 917-21, Velculescu Vogelstein & Kinzler (2000) Trends Genet 16: 423-5]
- 4.制がん剤や放射線抵抗性の一因 [Li et al. (1998) Nature 396:580-4, Lu et al. (2004) Can Res 64: 2840-5]
- 5.発現は細胞周期に依存し、G2/M期で最大 [Li et al. (1998) Nature 396:580-4]

**サバイビンによるアポトーシス抑制のメカニズム**

1. 直接的アポトーシス抑制経路:  
cdc2lによる# 34スレオニンのリン酸化 [O' Connor et al. (2000) PNAS 97: 13103-7]  
#94システインを含むbaculoviral IAP repeat (BIR)ドメインを通してのカスパー1との結合阻害 [Li et al. (1998) Nature 396:580-4, Reed (2003) J Clin Invest 108: 965-9]
2. 間接的アポトーシス抑制経路:  
#53アスパラギン酸を通じた結合によるSmac/DIABLO の阻害 [Song, Yao & Wu (2003) J Biol Chem 278: 23130-40, Song et al. (2004) Mol Biol Cell 15: 1287-96]

スライド 31

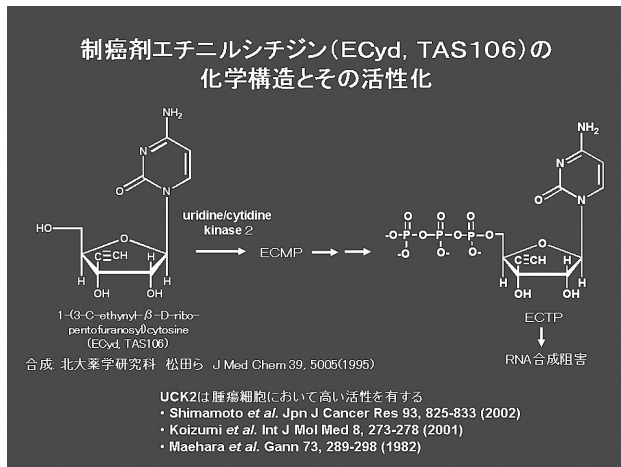
**放射線照射によるG2期細胞の増加**

スライド 32

<スライド 33 >

ここに示すヌクレオシド制癌剤エチニルシチジン (ECyd) は、癌細胞において高い活性を有する UCK2 (uridine/cytidine kinase 2) というキナーゼにより一リン酸化され、さらに別のキナーゼにより三リン酸化され、RNA 合成を干渉することにより最終的に蛋白質合成阻害を引き起こします。この化合物は、ヌク

レオシド抗癌剤の一つとして北海道大学大学院薬学研究所の松田彰教授により開発されたものです。このエチニルシチジンは転写レベルを抑制することにより制癌効果を発揮します。我々は、この化合物が RNA 合成阻害剤ですので、サバイビン始め、G2/M 期チェックポイントに関わる蛋白質の合成抑制をもたらし、それがアポトーシスや clonogenicity で見た細

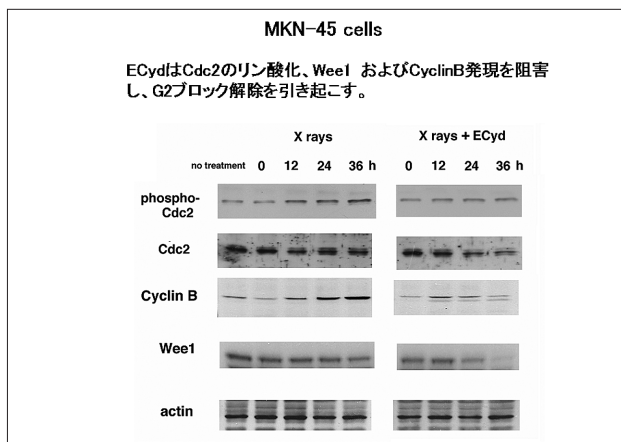


スライド 33

細胞死に何らかの影響を与えるのではないかと考え、実験を行いました。

**2.5.9 エチニルシチジンによる G2 ブロック解除**  
 <スライド 34 >

スライド 34 はヒト胃癌由来の培養細胞 MKN-45 に ECyd を加えたものです。エチニルシチジン (ECyd) はデオキシリボースがエチニル化されたもので、正確には 1-(3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl) cytosine と言い、別名 TAS-106 とも呼ばれております。MKN-45 細胞に X 線照射した後、ECyd で処理しますと、サイクリン B1 の発現量が抑制され、リン酸化 Cdc2 も減少致します。また、Wee1 という G2/M 期チェックポイントに関わる酵素の発現量も減少し、エチニルシチジンによる RNA 合成阻害効果が良く現れております。そこで、これなら G2/M 期ブロックが掛からず、すぐに M 期に入ってしまうだろうと考え、実験を続けました。



スライド 34

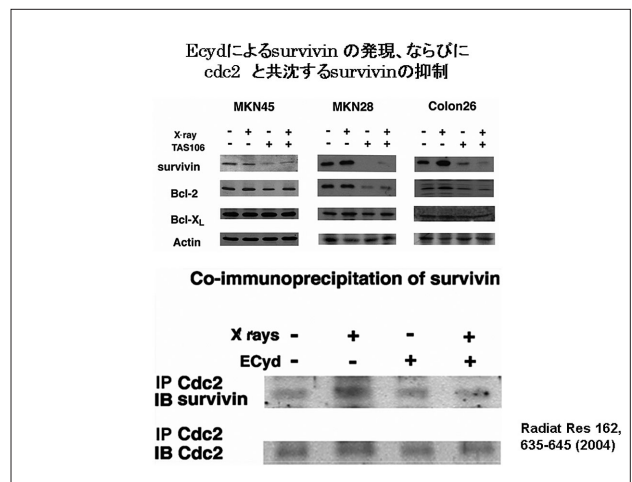
**2.5.10 エチニルシチジンによるサバイビンの発現並びに Cdc2 と共沈するサバイビンの抑制**  
 <スライド 35 >

エチニルシチジンにより、サバイビンの発現もやはり抑制されています。また、Cdc2 を免疫共沈降し、サバイビンのイムノプロットをした場合もやはりサバイビンは減少しております。このことは、G2/M 期ブロックが解除されるのみではなく、アポトーシスフラクションも増える可能性を示唆しております。調べてみますと、X 線照射だけでは全く観察されなかったアポトーシスが、エチニルシチジン添加により明確に観察されるようになりました。

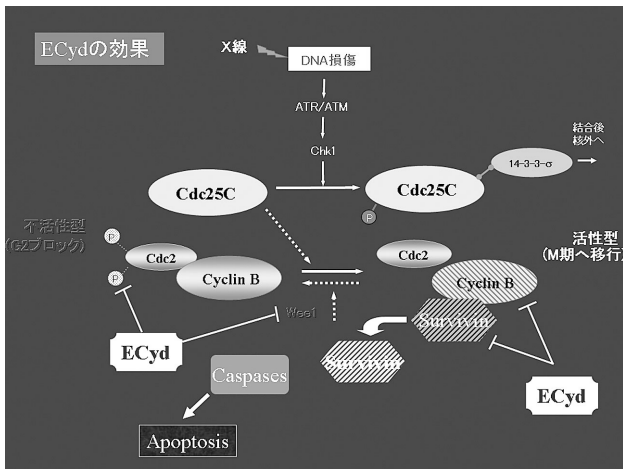
また、clonogenicity で細胞死を見ても増感が観察され、エチニルシチジンによるアポトーシス増感がコヒロニー形成率で見た細胞死の増感に繋がっていることが分かりました。アポトーシス増感が clonogenicity の増感にどの程度貢献しているかを検討するため、colon26 大腸癌株化細胞で、広域カスパーゼ阻害剤でアポトーシスを完全に抑制した場合での clonogenicity の増感を調べました。その結果、増感効果が未だ観察されたため、アポトーシス増感だけではなく、別のメカニズムによる増感もあると考えられました。

**2.5.11 エチニルシチジンの効果**  
 <スライド 36, 37 >

これらの結果から、スライド 36 の模式図で示すように、サバイビンによるカスパーゼ抑制がエチニルシチジンにより解除されたため、アポトーシスが起ったものと推察されました。X 線照射による G2/M 期遅延を薬物等で解除し、細胞をアポトーシス感受



スライド 35



スライド 36

性に変えると、clonogenicityにおいても放射線増感が起こることが分かりました。

### 3 最後に

これまでの我々の研究から、p53 遺伝子の異常により放射線に抵抗性になっている細胞でも、放射線シグナルによりデスレセプター発現を通じたアポトーシスシグナル伝達経路が活性化していること、このアポトーシスシグナルはG2/M期チェックポイントでサバイビンと連携して強く抑制されているが、エチニルシチジンなどのような制癌剤との併用でその抑制を排除し、アポトーシスを誘導すること、そのアポトーシス誘導はコロニー形成率で判定した細胞死の増感にも反映されることを明らかにしました。

1. 放射線照射後のG2/M期遅延を早める

2. 細胞をアポトーシス感受性に変える

↓  
clonogenic survivalにおいても  
放射線増感が観察される

- ・アポトーシスフラクションが一部寄与
- ・アポトーシス以外でECydが増感するフラクションが寄与

スライド 37

放射線から身体を防護する研究を行うにあたり、放射線の生物作用のメカニズムを詳しく知ることが重要と考え、放射線誘発細胞死およびその増感の研究を行って参りました。その結果が、本日お話ししましたように、放射線治療の基礎研究に繋がるような内容になりました。今後は、細胞死の防護の研究にも取り組む必要があると思っております。増感も防護も、放射線照射により誘導される細胞内シグナル伝達と関係しております。そのためには、今回お示したように分子レベルでの研究が鍵となります。一層のご鞭撻をお願い申し上げます。

どうぞご静聴ありがとうございました。

(平成18年7月5日に富山大学杉谷キャンパスで開催された安全講習会の特別講演の講演録)