

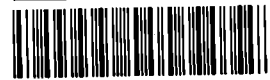
放射線肺繊維症における細胞増殖制御遺伝子の役割

課題番号 (09670925)

平成9年度~平成11年度科学研究費補助金
基盤(C)研究成果報告書

平成12年2月

研究代表者 木村 博
(滋賀医科大学医学部教授)



平成9年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤C）
研究成果報告書

- 1 課題番号 09670925
- 2 研究課題 放射線肺繊維症における細胞増殖制御遺伝子の役割
- 3 研究代表者 木村 博（滋賀医科大学教授）
- 4 研究分担者 なし
- 5 研究経費
- | | | |
|--------|-------|----|
| 平成9年度 | 1、300 | 千円 |
| 平成10年度 | 900 | 千円 |
| 平成11年度 | 1、200 | 千円 |
| 計 | 3、400 | 千円 |

6 研究発表

(1) 学会誌等

Nyaruba, M. M., Yamamoto, I., Ikebuchi, M., Kimura, H., Morita, R. Early changes in bone mineral content caused by acute irradiation are not observed after daily fractionation: A study by dual-energy X-ray absorptiometry. **J. Bone Miner. Metab.** **15**: 213-217 (1997).

Ikebuchi, M., Kimura, H. Recovery from sublethal damage is reversibly inhibited by hypertonic saline: The effects of 0.23 M sodium chloride. **Radiat. Res.**, **150**: 416-422 (1998).

Kimura, H., Takada, T., Shingu, Y., Kato, Y., Iyehara-Ogawa, H., Terado, T. Neocarzinostatin-induced mutations at the hprt locus in exponentially growing CHO cells, compared with spontaneous mutations. **Carcinogenesis**, **19**: 791-796 (1998).

Meng, H., Terado, T., Kimura, H. Apoptosis induced by X-rays and chemical agents in murine fibroblastic cell lines with a defect in repair of DNA double-strand breaks. **Int. J. Radiat. Biol.** **73**: 503-510 (1998).

Nyaruba, M. M., Yamamoto, I., Kimura, H., Morita, R. Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. **Acta Radiologica** **36**: 43-46 (1998).

Kitamura, K., Takayama, M., Hamajima, N., Nakanishi, M., Sasaki, M., Endo, Y., Takemoto, T., Kimura, H., Iwaki, M., Nonaka, M. Characterization of the human dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) Gene. **DNA research** **6**: 291-297 (1999).

(2) 口頭発表

Ikebuchi, M., Meng, H., Kimura, H. A study, using radiosensitive mutant scid cells, on cellular recovery processes and the role of their inhibition in radiation sensitization. **International Conference on Radiation Biology**, Shillong, India, 1998年4月7-11日

池淵誠、木村博 0.23MNaCl 高張液は亜致死損傷(SLD)回復を可逆的に阻害する 医学放射線学会生物部会第27回放射線制癌シンポジウム 豊中市 1997年8月8-9日

孟洪琪、寺戸勅雄、木村博 DNA 2本鎖切断修復欠損繊維芽細胞における放射線と化学薬物によるアポトーシス 医学放射線学会生物部会第37回大会 神戸 1998年4月8-9日

池淵誠、木村博 トポイソメラーゼ I 阻害剤(SN-38,カンプトテシン)によるDNA複製に依存的なPLD・SLD修復の阻害 第5回癌治療増感研究会 京都 1999年5月15日

(3) 出版物

Ikebuchi, M., Meng, H., Kimura, H. A study, using radiosensitive mutant scid cells, on cellular recovery processes and the role of their inhibition in radiation sensitization. In **Trends in Radiation and Cancer Biology**, Forschungszentrum Juelich GmbH, Germany, (1998).

7 研究成果

研究目的

肺がんや乳がん放射線治療が行われるようになって、放射線による肺障害が多く報告されるようになった。肺障害は急性の肺臓炎と晩期障害である肺繊維症とからなる。急性障害は、一般的にいて、放射線のエネルギーを高くすることで軽減される。以前は、放射線のエネルギーが低かったため、皮膚での吸収による急性障害が起こり、全治療線量が制限され、治療成績は必ずしもよいものではなかった。しかし、現在では、治療機器の技術の著しい進歩によって、非常に高いエネルギーをもった放射線が得られるようになり、この問題はほぼ解決された。一方、肺繊維症のような晩期障害は、よほど広範囲の照射を行わない限りとりあえず問題はない。しかし、最近では、治療成績が改善されてきた結果、患者の生存率も上昇してきた。そこで、治療後の患者のQOLを考えると、肺繊維症は今後の取り組むべき大きな問題であるといえる。この目的で、ハイパーフラクショネーションなどによる治療方法の改善が精力的に行われてきた。しかし、日本では特に人手の問題もあって、この方法が日常的に行われるというまでには至っていない。また、繊維症は骨髄移植のための全身照射の障害としてもクローズアップされてきている。

桑野らは突発性肺繊維症において、p 5 3 がん抑制遺伝子や p 2 1 の量が炎症部位の上皮に多く発現することを報告している。p 5 3 がん抑制遺伝子は、細胞に傷害が加わると、細胞をG1期で停止させ、修復のための時間を稼がせ、また、修復できない傷害に対してはアポトーシスを自ら起こさせることで、細胞集団に傷害がたまらないようにする働きがある。一方、p 2 1 のほうは、p 5 3 のシグナルを受け継ぎ、サイクリン-C d k 複合体に指令を与えることで、細胞周期をG1期で停止させる働きをもっている。桑野らは、p 5 3 の発現により上皮細胞がアポトーシスを起こし脱落すると、その空隙を繊維芽細胞が埋めることで、繊維症が誘発されると結論している。そこで、われわれは、p 5 3 ノックアウトマウスおよび放射線高感受性で知られるスキッドマウスが、放射線誘発肺繊維症になりやすいのか、あるいは、なりにくいのかを調べることを目的とし、実験を計画した。この実験によって、p 5 3 および p 2 1 遺伝子のアポトーシス誘導や肺繊維症における役割がさらに明確になるとともに、放射線誘発肺繊維症の発症メカニズムをさぐる上でも何かヒン

トが与えられるものと期待している。

上で述べたような大きな目的を達成するために、本科学研究補助金の期間内に次の2点を明らかにすることを計画した。①スキッドマウスおよびp53ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞を樹立し、これらの細胞が、放射線や抗がん剤に対してどんな感受性を持ち、また、アポトーシスを起こしやすいのかどうかを検証する。②スキッドマウス、p53ノックアウトマウスの肺での障害を調べる前段階として、皮膚での障害を組織切片の顕微鏡観察により調べる。

研究結果

培養系の樹立：スキッドマウス由来の繊維芽細胞およびp53ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞を、3T3プロトコールで樹立した（スキッ

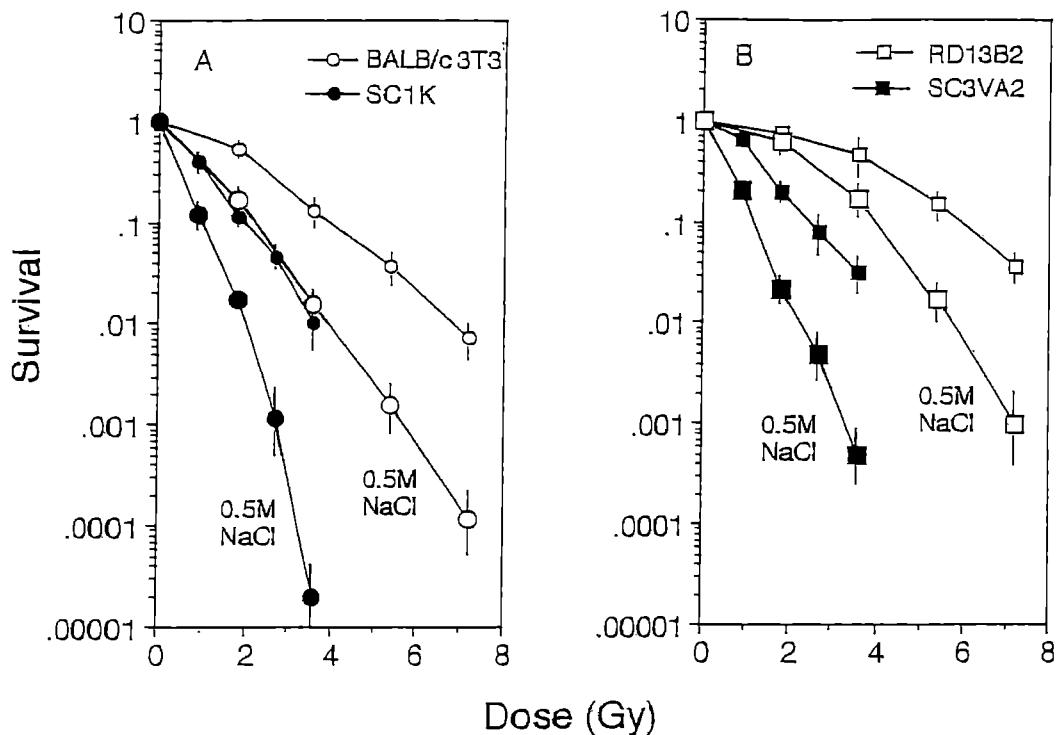


図1 修復能が正常な繊維芽細胞 (Balb/c3T3: 小さな白丸)、スキッド由来細胞 (SC1K: 小さな黒丸, SC3VA2: 小さな黒四角) とスキッド遺伝子を含む修復能が正常に回復したスキッド細胞 (RD13B2: 小さな白四角) の放射線感受性。スキッドで感受性が高いことがわかる。大きなシンボルは、どの場合にも、0.5MNaCl処理で増感されることを示している。

ドマウス由来の細胞は参考文献 1 に記載)。樹立には4-6ヶ月を要した。これらの細胞は、顕微鏡下の観察では悪性形質転換していなかった。DNA 2本鎖切断修復能が正常な繊維芽細胞として、スキッドマウスの近縁であるBalb/cマウス由来のBalb/c3T3細胞を用いた。

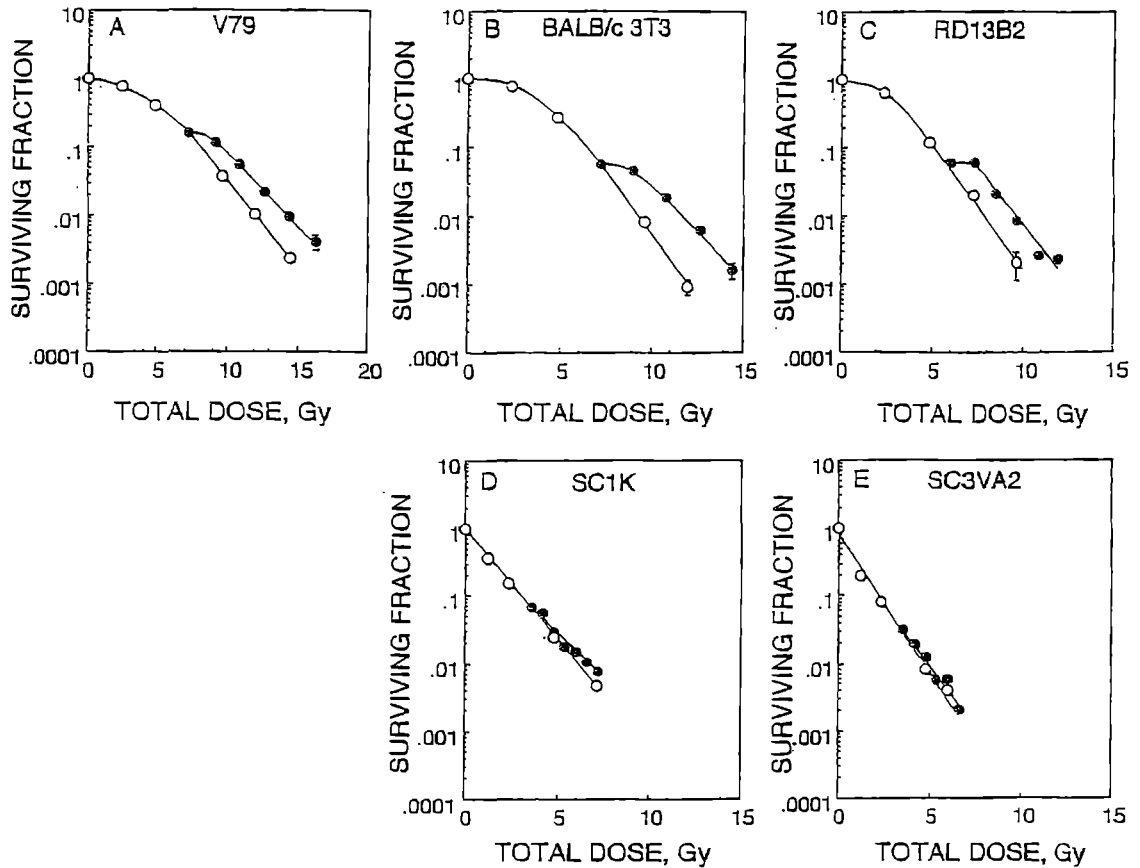


図2 修復能が正常な細胞と修復欠損細胞のSLD回復能。用いた細胞は図1と同じ。V79細胞はチャイニーズハムスター肺由来の繊維芽細胞である。白丸は、X線照射を一に行った場合の生存率を示す。黒丸は、最初、7 Gy(正常)か3.5 Gy(スキッド)照射し、時間をおいて次の照射を行った場合の生存率を示す。白丸に対し黒丸で生存率が上昇していれば、SLD回復があった証拠となる。

繊維芽細胞の放射線感受性と薬剤感受性：スキッド細胞の放射線感受性および放射線からの回復 (SLD回復とPLD回復) については、参考文献1-3にすでに報告済みである (図1-3)。今回は、スキッド細胞がX線

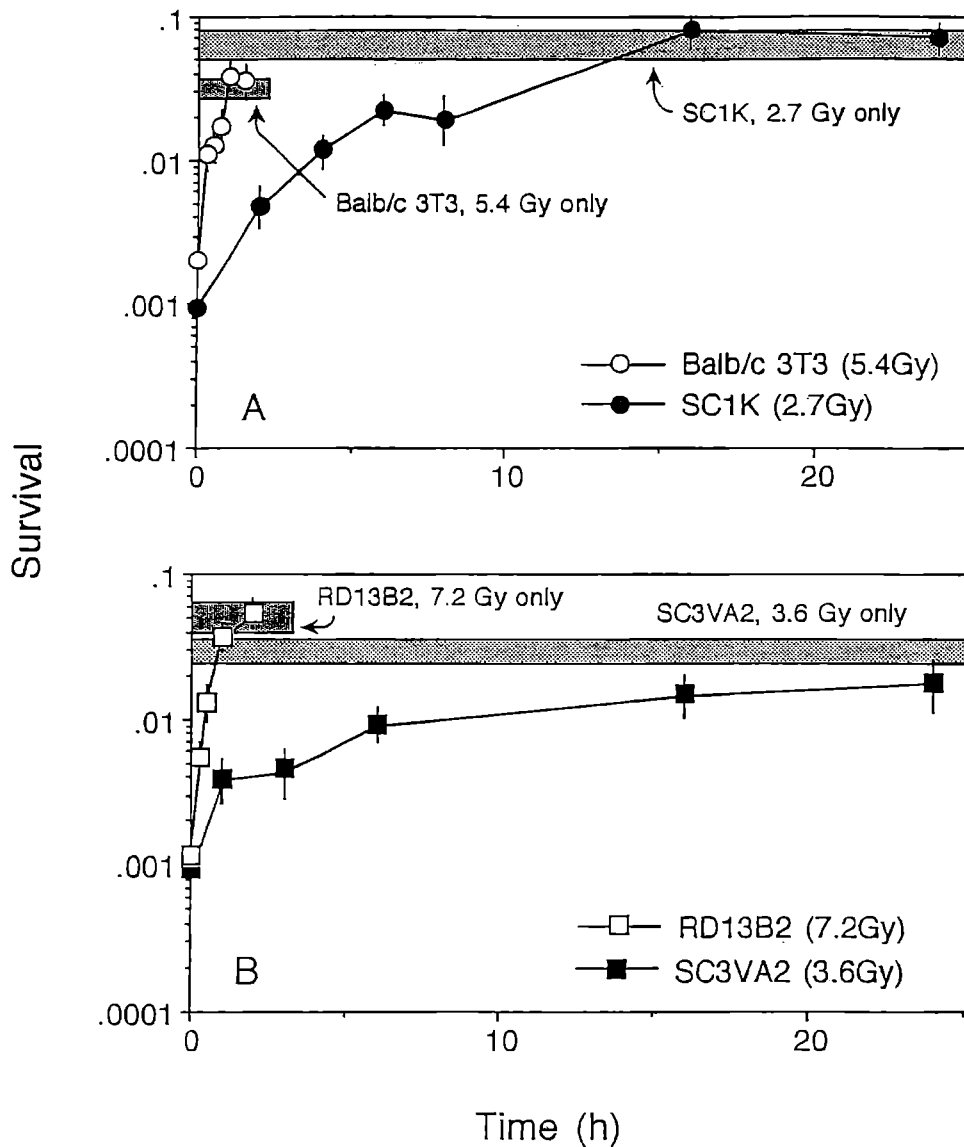


図3 修復能が正常な細胞と修復欠損細胞のPLD回復能。用いた細胞は図1と同じ。PLD回復は、照射後に細胞をある条件下に置くことで観察される回復。ここでは、0.5MNaClを用いている。修復能が正常な細胞ではPLD回復が1時間以内に終わっている（白丸、白四角）のに、スキッドでは6時間以上かかっている（黒丸、黒四角）のがわかる。

以外のDNA傷害を起こす薬剤について、どのような反応を示すかを調べた（参考文献4）。これは、スキッド遺伝子（DNA-PKの触媒サブユニットをコードすることがわかっている）がDNA上のどのような傷に対応しているのかを調べる目的で行った。図4に示されているように、スキッ

ド細胞は、X線タイプの傷を作ることで知られるブレオマイシンには感受性であったが、トポイソメラーゼによる2本鎖切断誘導（エトポシド）、DNA鎖間架橋（シスプラチン）およびピリミジン二量体（紫外線）には感受性ではなかった。これは、DNA-PKが関与するのはラジカルなどによるDNA切断の修復であって、これ以外の型の傷の修復には関与しないことを示している。なお、ラジカル形成によってDNAに傷害を与える薬剤がX線と同様な傷を作ることを示すため、塩基配列レベルの突然変異を指

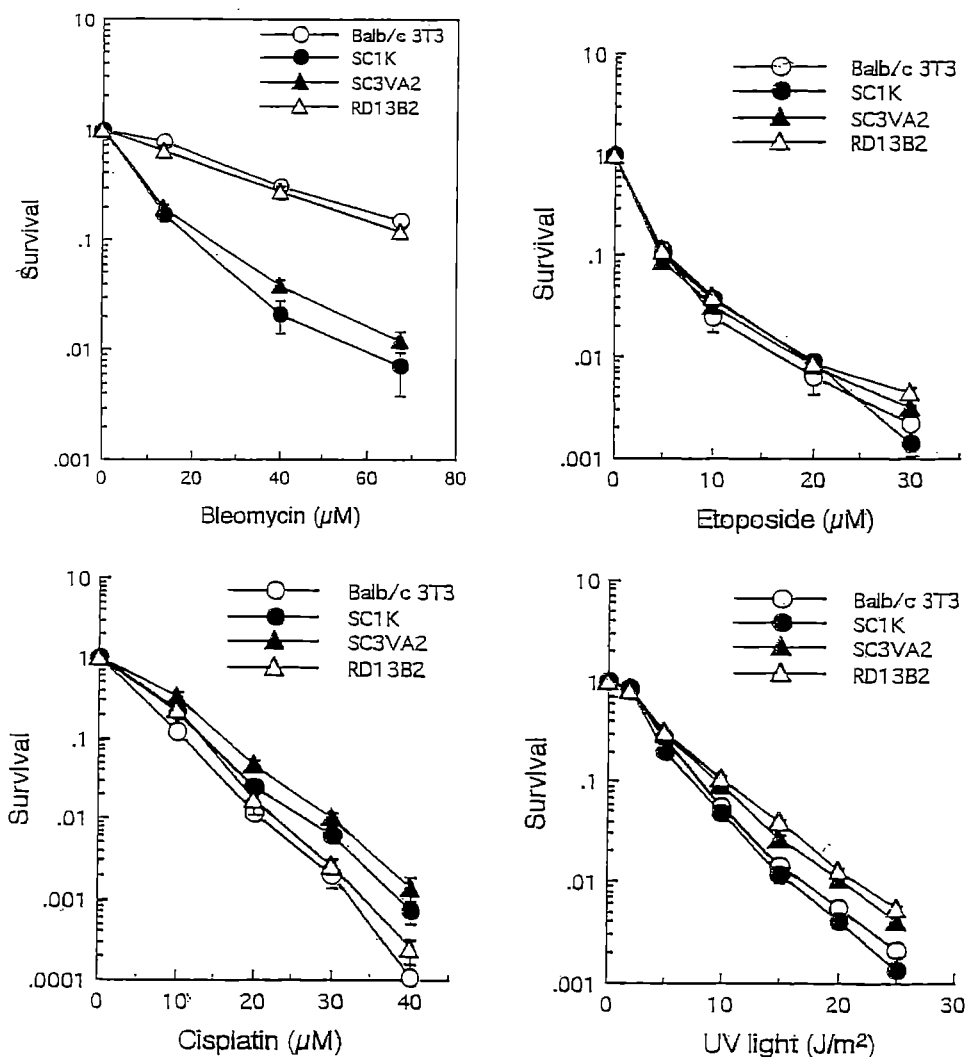


図4 X線以外のDNA傷害を与える薬剤に対する感受性。用いた細胞は図1と同じ。ブレオマイシンに対する感受性は、正常な修復能を有する細胞で低いのにに対し、スキッド細胞で高い。他の薬剤に対する感受性は、用いた細胞間でほとんど差がない。

標に実験を行ったところ、ネオカルチノスタチンにより、X線と同様な突然変異の起こることを観察した（参考文献4）。

p 5 3 ノックアウトマウス由来の細胞、N6について調べたところ、放射線感受性に差異は認められなかった（データは示していない）。

スキッド変異の細胞レベルの放射線障害からの回復におよぼす影響：放射線の障害からの細胞レベルの回復にはPLD回復とSLD回復の2種類が知られていて、PLD回復はさらに何種類かに分類されている。これらの回復のうちSLD回復と高張な液に感受性なPLD回復に対して、スキッド遺伝子が関与していることを示した（図2、3）。これらのことは、スキッド変異が関与する修復が、細胞レベルの回復に強く関与することを示唆するものである（参考文献1-3）。

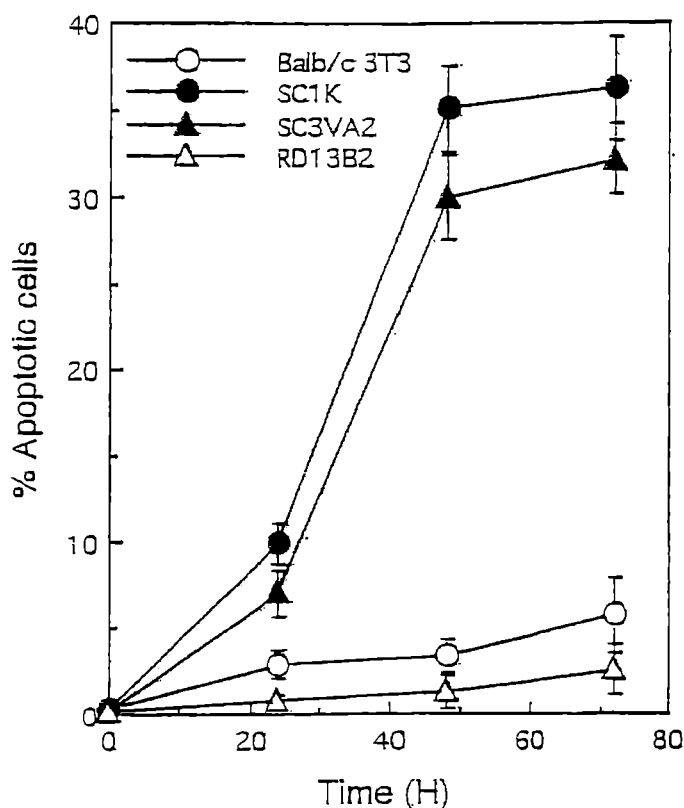


図5 X線（5 Gy）によるアポトーシス誘導の時間経過。用いた細胞は図1と同じ。修復の正常なBalb/c3T3とRD13B2（白丸と白三角）では48-72時間後に誘発されたアポトーシスが5%までなのに対し、スキッド（黒丸と黒三角）では30%を超えている。

繊維芽細胞におけるアポトーシス誘導：従来、繊維芽細胞において、アポトーシス誘導はほとんど起こらないとされていた。しかし、田内らによって、X線誘発のアポトーシスが起ることが示されて以来、この事実はいくつかのグループによって確認されてきた。われわれは、Balb/c3T3 繊維芽細胞を用いて、X線が10Gy当たり約10%のアポトーシスを誘導することを認めた(図5、6)。これがアポトーシスであることはTUNEL法でも確かめてある(図7)。われわれの示した繊維芽細胞でのアポトーシス誘導の割合は、基本的に田内らのものと同じであった。今まで、なぜ繊維芽細胞においてアポトーシスがほとんど報告されてこなかったについては、いくつかの原因があげられるが、特にわれわれの培養系においては、アポトーシスを起こした細胞が液中に浮いてしまい、観察対象からはずれていたことが重要だったと考えている。

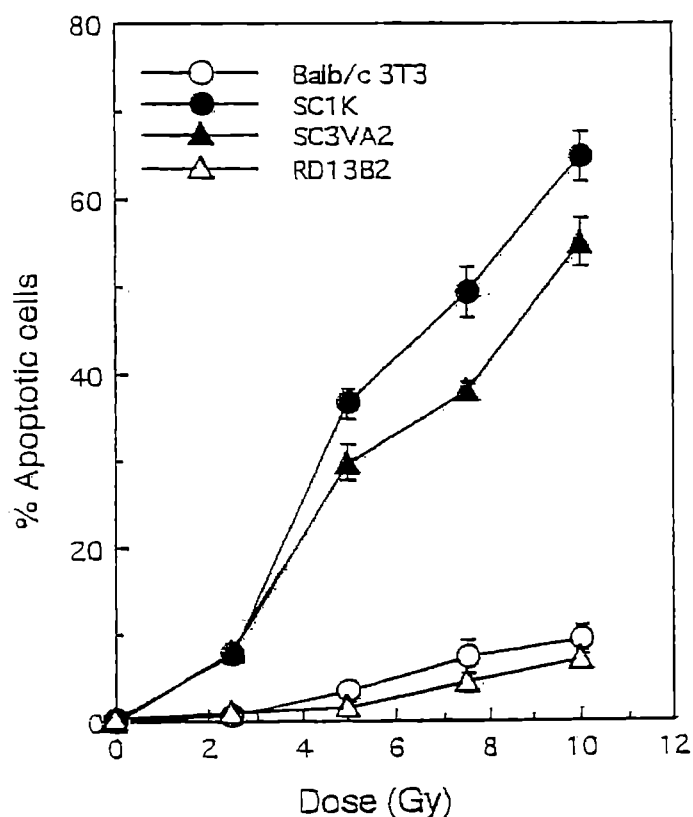


図6 アポトーシス誘導の線量依存性。用いた細胞は図1と同じ。照射後48時間で観察した。修復が正常な細胞(白丸と白三角)と修復欠損細胞(黒丸と黒三角)を比較すると、圧倒的に後者でアポトーシス誘導率が高い。

スキッド変異およびp 5 3変異がX線誘発アポトーシスに及ぼす影響:次に、スキッド細胞やp 5 3ノックアウト繊維芽細胞において、X線によりどの程度のアポトーシス誘導が起こるかを調べた。図5, 6に示してあるように、スキッド細胞において、X線10Gy当たり50-60%の細胞がアポトーシスを起こすことが観察された。スキッド細胞はBalb/c3T3細胞より放射線感受性が高いので(図1)、両方の細胞の生存率が同じになるように線量を選び、そのときのアポトーシス誘導率を調べてみた。その結果が表1に示してある。約4倍もの高い率でスキッド細胞にアポトーシスが起きていることがわかる。これは、修復欠損の結果、DNA鎖切断が残り、その結果、アポトーシスが増えるというふうに単純に解釈することはできないことを示している(議論を参照)。つまり、修復欠損によりプラスアルファのアポトーシス誘導が起こることを示唆してい

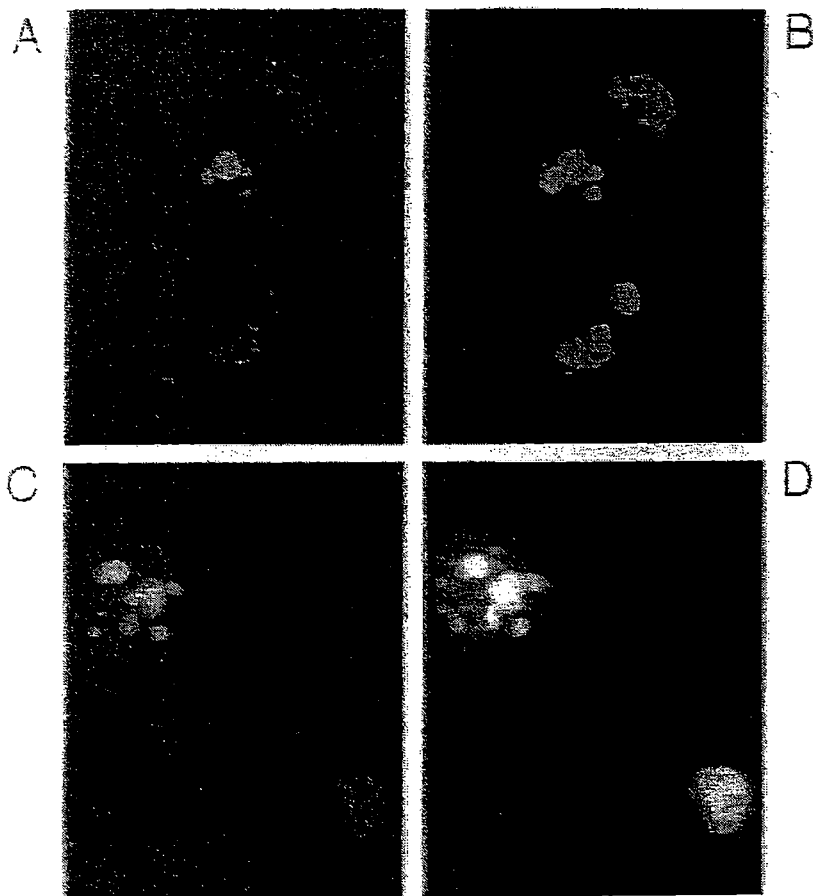


図7 SC1K (A,B) とBalb/3T3 (C,D) におけるX線誘発アポトーシスの顕微鏡像。B,DはPI染色で、DNAが染まっている。丸い核や分葉化した核がみられる。A,CはTUNEL法でアポトーシス核のみ染まっている。アポトーシス核は分葉核であることがわかる。

る。なお、スキッド細胞にDNA-PK触媒サブユニットをコードする遺伝子を含んだ染色体断片を取り込んで、X線損傷修復が正常に回復している細胞であるRD細胞においては、アポトーシス誘導率がBalb/c3T3のものと同様になっているので（図5, 6）、スキッド細胞でみられる高アポトーシス誘導率は、確かにDNA-PK欠損によるものと考えられる。

次に、p53欠損繊維芽細胞を用いて、X線アポトーシス誘導率を調べた。その結果、p53欠損細胞においては、X線によるアポトーシス誘導はBalb/c3T3細胞に比べ特に高いものではなかった。むしろ、わずかではあるが、誘導率は正常に比べ低かった（データは示していない）。また、最近、SSCP法で、本講座で樹立したスキッド細胞のp53遺伝子を調べたところ、塩基置換が起こっている可能性が示唆されたので、現在、PCR法（参考文献6）で、スキッド細胞のp53部位を増幅し、その配列決定を行っている。

X線型でないDNA損傷を起こす薬剤によるアポトーシス：前述のように、いくつかの薬剤を用いて、Balb/c3T3細胞とスキッド細胞の感受性を調べた結果、X線型でないDNAの傷についてはスキッド細胞の感受性はBalb/c3T3のものと同じである。一方、それぞれの薬剤について、同じ生存率を与えるように投与量を選び、アポトーシス誘導率を調べたところ（表1）、どの場合もわずかだけアポトーシス誘導率が上がることが観察された。このことは、議論で考察することになる。なお、スキッド細胞において、X線型の傷を作るブレオマイシンにより、X線の場合と同様、高率でアポトーシス誘導が起こることが示された（表1）。

表1 同じ生存率（ブレオマイシン、0.2；その他、0.01）を与える量によって起こるアポトーシス誘導率。

Cell line	X-rays	Bleomycin	Cisplatin	Etoposide	UV light
BALB/c 3T3	7.5 (8.0 Gy)	3.0 ± 0.5 ^a (63 μM)	9.5 ± 1.8 (21 μM)	9.5 ± 1.8 (17 μM)	6.5 ± 0.5 (17 J/m ²)
SC1K	23.2 (3.9 Gy)	23.8 ± 2.0 (13 μM)	15.8 ± 1.9 (28 μM)	13.7 ± 2.1 (19 μM)	9.5 ± 0.9 (16 J/m ²)
SC3VA2	26.3 (4.3 Gy)	18.0 ± 1.3 (14 μM)	13.6 ± 1.5 (30 μM)	15.2 ± 2.4 (19 μM)	7.8 ± 0.6 (20 J/m ²)
RD13B2	5.5 (8.8 Gy)	3.7 ± 0.8 (56 μM)	10.6 ± 0.8 (23 μM)	8.4 ± 0.3 (20 μM)	6.8 ± 0.3 (22 J/m ²)

a 平均±標準偏差（6視野）。括弧内は与えた量。用いた細胞は図1と同じ。

X線によるスキッドマウスおよびp53ノックアウトマウスの皮膚の病理変化：オスの6週令のマウスを用いた。それぞれの左下肢にX線を50 Gy照射し、45日後に皮膚組織を回収し、ブアン液で固定後、組織切片を作成した。これをMasson染色（マイヤー・ヘマトキシリン染色5分、one-step trichrome染色10分、1%酢酸洗浄10分後、脱水、封入）した。X線照射の方法は、基本的に、サイズを除けばラットで用いたもの（参考文献7, 8）と同じである。まず、p53ノックアウトマウスであるが、対照として用いたBalb/cマウスの場合に比べ明らかに潰瘍、癒痕化が著しかった（データは示していない）。次に、スキッドマウスを用いて、Balb/cマウスと比較した（図8-11）。照射されたスキッドマウスの皮膚（図9）は非照射のもの（図8）と比べ、全体的に表皮、真皮の肥厚を認めた。潰瘍化した部位は皮下結合組織まで及び、多核球の浸潤が認められた。潰瘍以外の部位では軽度のモノサイト、マクロファージの浸潤が見られた。また、中等度の繊維化を伴っていた。一方、Balb/cマウスの場合、非照射のもの（図10）に比べ、軽度の表皮、真皮の肥厚と繊維化が認められた（図11）。表皮内には細胞成分がやや増加していた。これらの結果は、スキッドマウスにおける照射の影響は、Balb/cマウスの場合と比較して、ずっと激しいものであり、中等度の繊維化を伴った、急性炎症性の変化であると結論できる。

考察

今回、培養繊維芽細胞を用いて、DNA-PKが細胞の放射線感受性を決定しているだけでなく、放射線誘導のアポトーシス率をも決めていることを示した。修復能が正常な細胞と比較した場合に、DNA-PK欠損細胞で、アポトーシスが、同じ生存率を与える線量によっても、高率に観察されることは特筆すべきである。つまり、単にDNA2本鎖切断が生存率やアポトーシス率の原因であるならば、修復欠損細胞における両者の率は変化しないと考えられる。このことは、アポトーシスが2本鎖切断によって引き起こされた後の過程で、DNA-PKがもう一度関与している可能性を示唆する。例えば、アポトーシスの過程におけるDNA鎖切断のほうにも、この酵素が関与していると考えられるのである。これをサポートするようなデータが表1に示されている。つまり、DNA鎖切断を起こさないような薬剤あるいは紫外線を使用した場合にも、修復欠損細胞において5割ほどアポトーシス誘導率が上昇していることである。これらの細胞では、最初DNA鎖切断が起きていないが、いったんDNAが壊され始め

ると、その切断に対し、DNA-PKが修復、非修復の指令を出しているとは考えられないだろうか。DNA-PKは修復系のシグナル伝達の上流で重要な役割を果たしていると考えられている。今後、この方向での研究をすすめることで、アポトーシス過程におけるDNA-PKの新たな役割が発見されるかもしれない。この意味でわれわれの今回示した結果は大変興味深いものであるといえる。

次に、繊維症のメカニズムについてであるが、こちらの研究は、完成にはまだいくつかの実験を行わなければならない。しかしながら、当初の目的であった、p 5 3 遺伝子やスキッド遺伝子がインビボでどのようにアポトーシスにかかわっており、それがどう繊維症に結びつくかについては、ある程度の成果を得たと考えている。つまり、スキッドでの皮膚の潰瘍や瘢痕化が、修復が正常なマウスに比べて強く起こるのはやや当然として、p 5 3 ノックアウトマウスで、同様に影響が強く出るという事実は大変に興味深いことである。一般に、培養系ではp 5 3 ノックアウト細胞はp 5 3 が正常な細胞と比べて、放射線感受性には大差がないとされている。つまり、p 5 3 マウスで見られる放射線高感受性は細胞の感受性を反映しているのではなく、例えばアポトーシスが起こりやすくなっていて、その結果、影響が強く出るのかもしれない。そうであるならば、がん治療の際のがん組織の感受性或正常組織の感受性に、この意味で、p53が強く関係する可能性がある。治療後の晩期障害である繊維症についてもしかりである。がん組織は高率にp 5 3 遺伝子を欠損している。将来的には、このことを利用して、がんの放射線治療の改善を目指したいと考えている。

図 8

上↑

Scid マウス 0 Gy

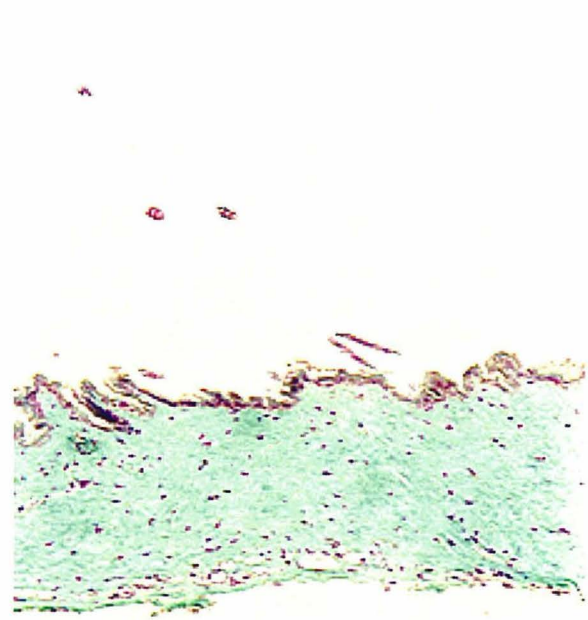
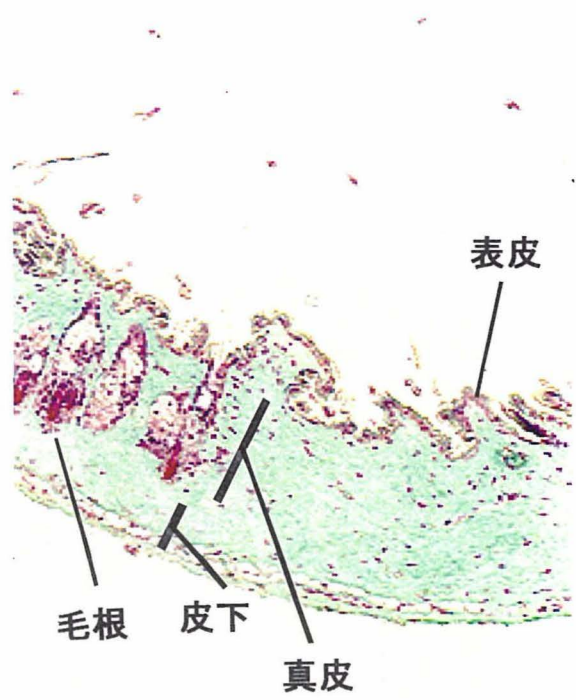
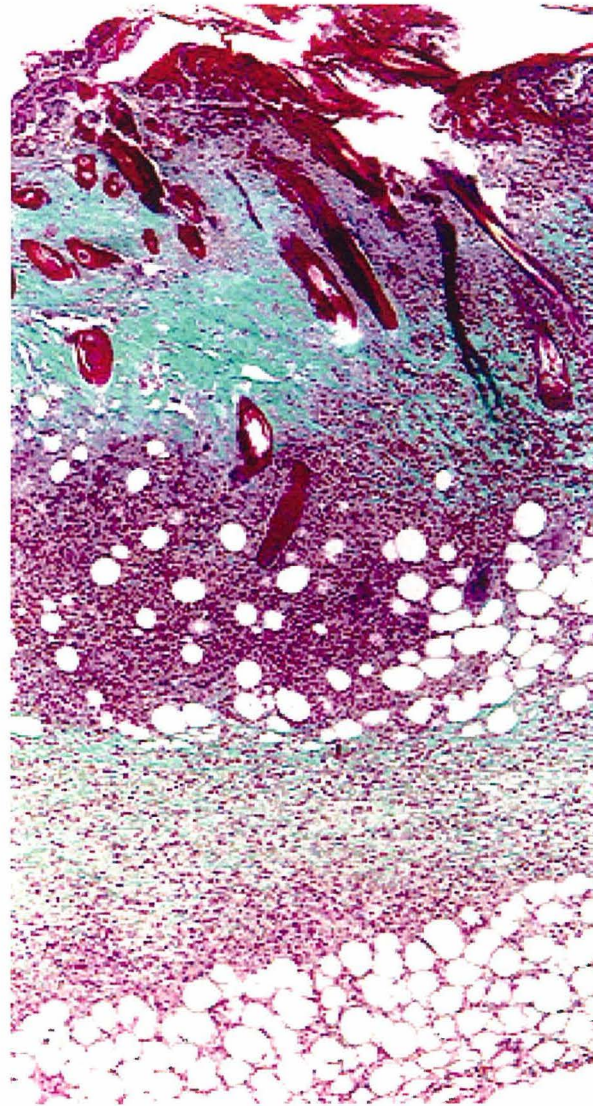
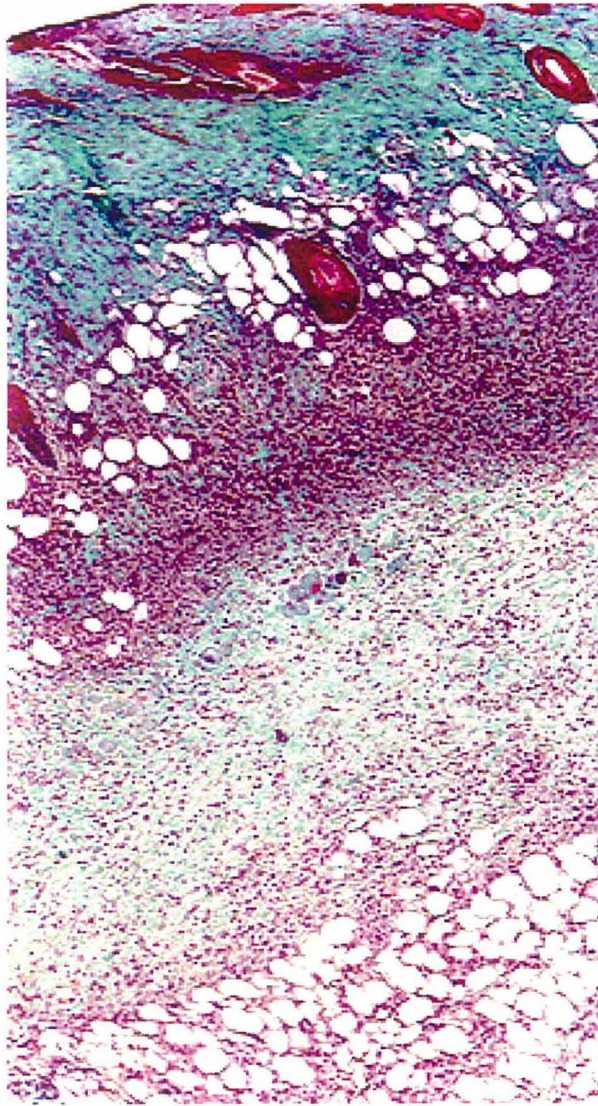


図 9



Scid マウス 50 Gy 45日後

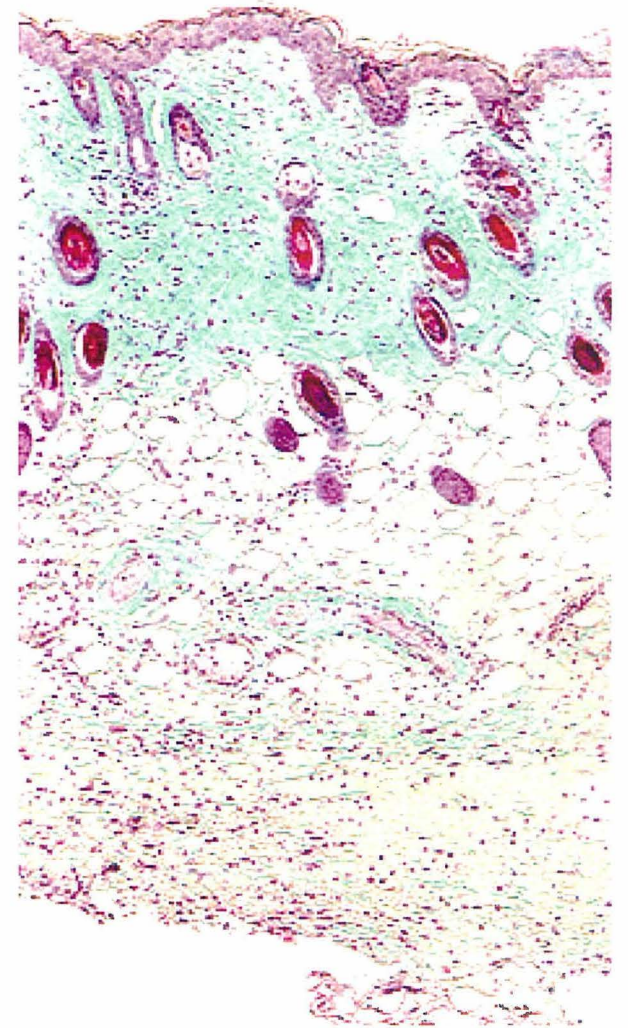


図10

上↑

Balb/c マウス 0 Gy

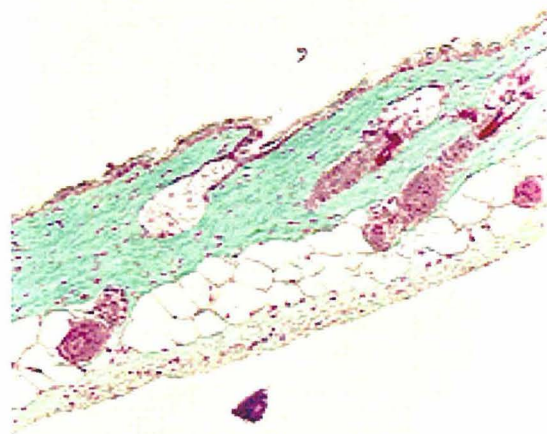
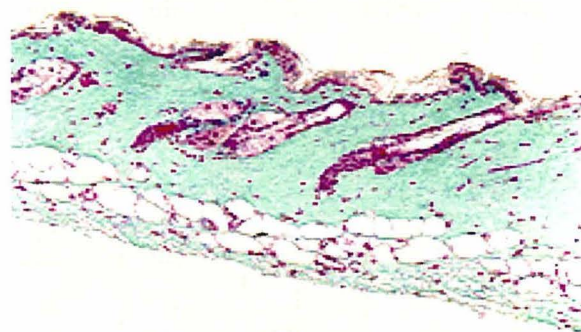
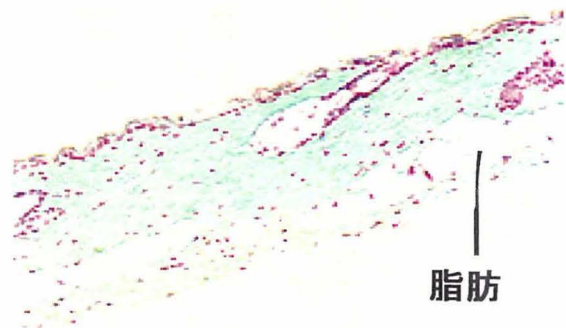


図 1 1

Balb/c マウス 50 Gy 45日後

