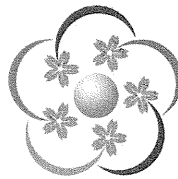


研究課題名:放射線の非がん影響の解明

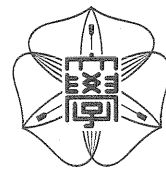
- 1)「放射線による循環器障害に関する分子機構の解明」
富山大学大学院医学薬学研究部 放射線基礎医学講座 近藤 隆
- 2)「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索」
弘前大学大学院保健学研究科 放射線生命科学分野 柏倉 幾郎
- 3)「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割」
北海道大学大学院獣医学研究科 放射線学教室 稲波 修



富山大学



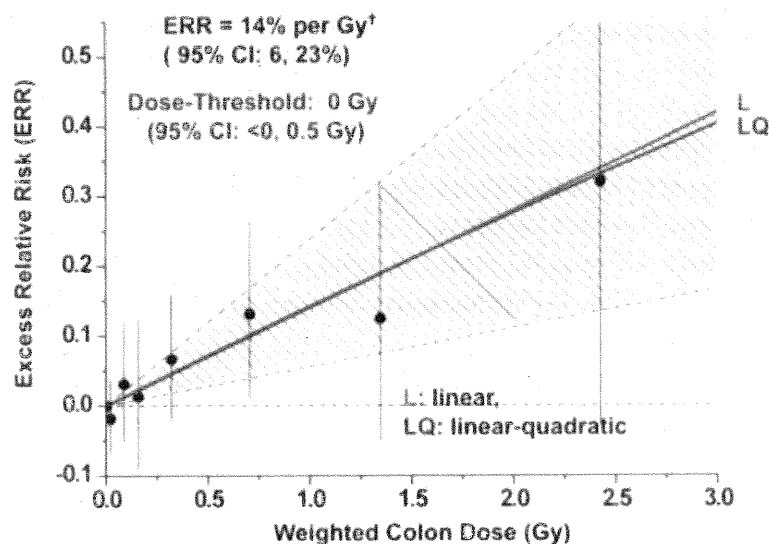
弘前大学



北海道大学

Radiation effects on heart disease mortality

Heart Disease Mortality

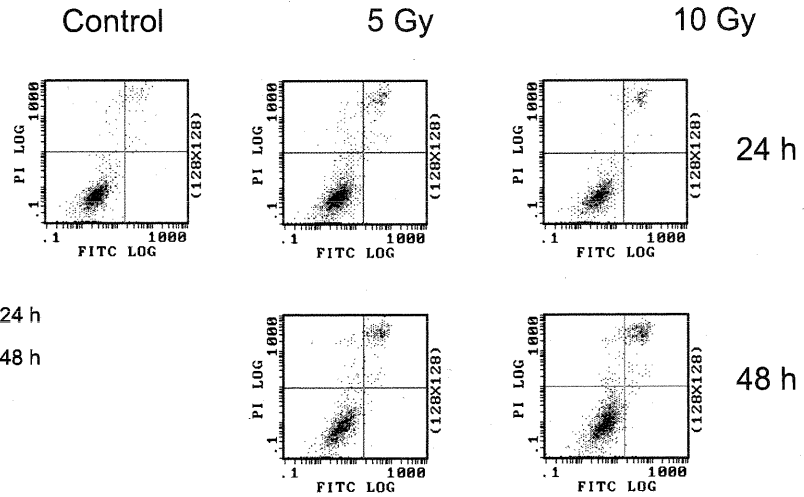
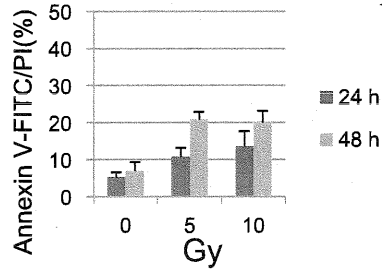


(Shimizu et al, *Br Med J*, 2010)

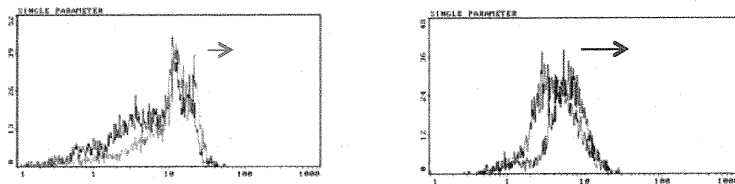
[†] Adjusted for gender, age at exposure, attained age, diabetes

Annexin V-FITC/PI FCM Apoptosis Assay

HUVEC
(Human Umbilical
Vein Endothelial
Cells)



ROS Detection by HE (O_2^-) and HPF (OH^\cdot , $ONOO^-$)

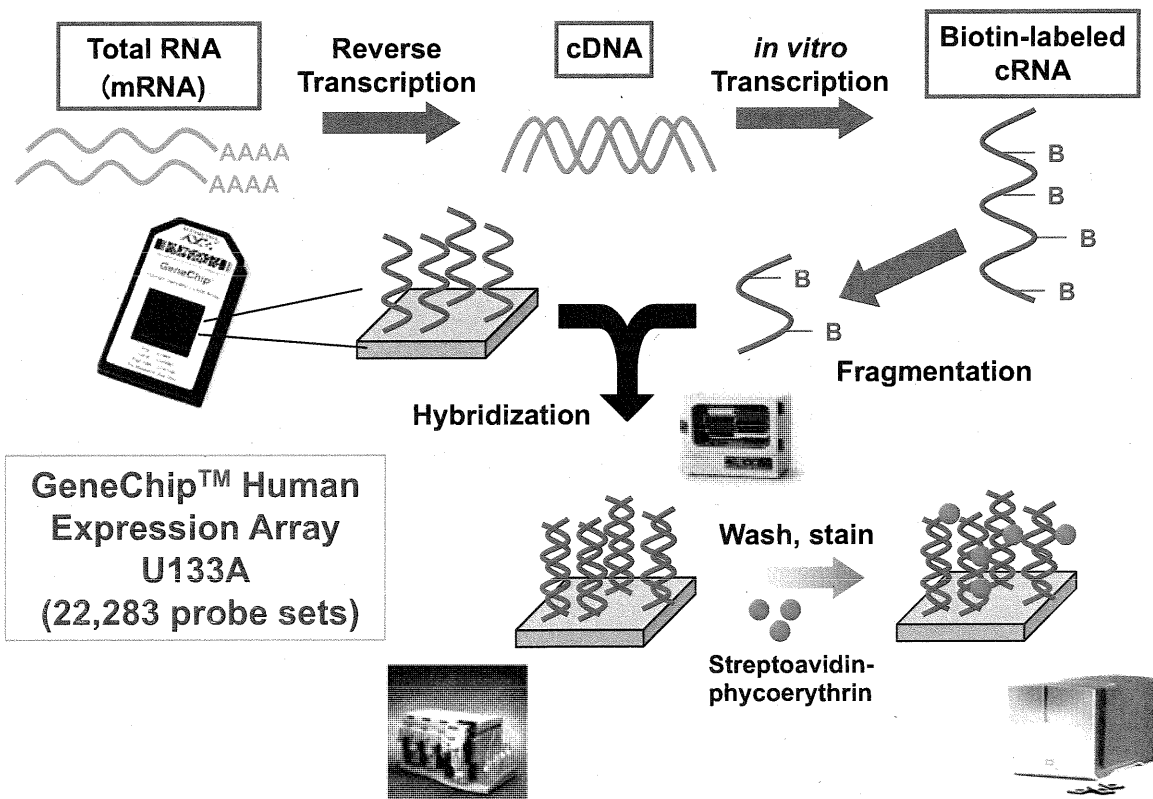


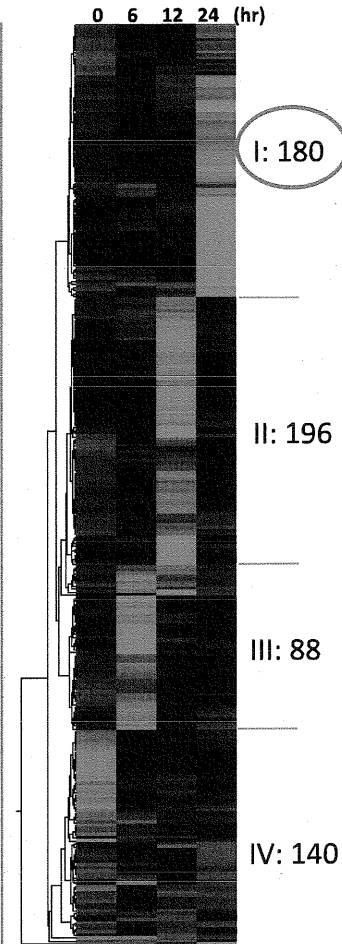
Control vs 10 Gy, 12 h

HE

HPF

Experimental Procedures for Gene Expression Analysis





階層解析と機能解析 (Cluster I)

Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cell Cycle	6.58E-13 - 4.32E-02	38
Cellular Assembly and Organization	1.14E-09 - 4.32E-02	29
DNA Replication, Recombination, and Repair	1.14E-09 - 4.32E-02	40
Gene Expression	3.01E-05 - 4.32E-02	32
Cellular Movement	3.56E-04 - 3.63E-02	8

Top Tox Lists		
Name	p-value	Ratio
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	4.49E-04	4/49 (0.082)
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	2.5E-02	4/151 (0.026)
Glutathione Depletion - CYP Induction and Reactive Metabolites	8.45E-02	1/12 (0.083)
Cholesterol Biosynthesis	1.11E-01	1/16 (0.062)
Cardiac Fibrosis	1.51E-01	2/94 (0.021)

Cardiotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Cardiac Stress Response	7.33E-03 - 7.33E-03	1
Cardiac Hyperplasia/Hyperproliferation	1.46E-02 - 1.46E-02	1
Cardiac Regeneration	1.46E-02 - 1.46E-02	1
Cardiac Fibrosis	3.61E-02 - 1.43E-01	2
Cardiac Necrosis/Cell Death	1.05E-01 - 1.05E-01	1

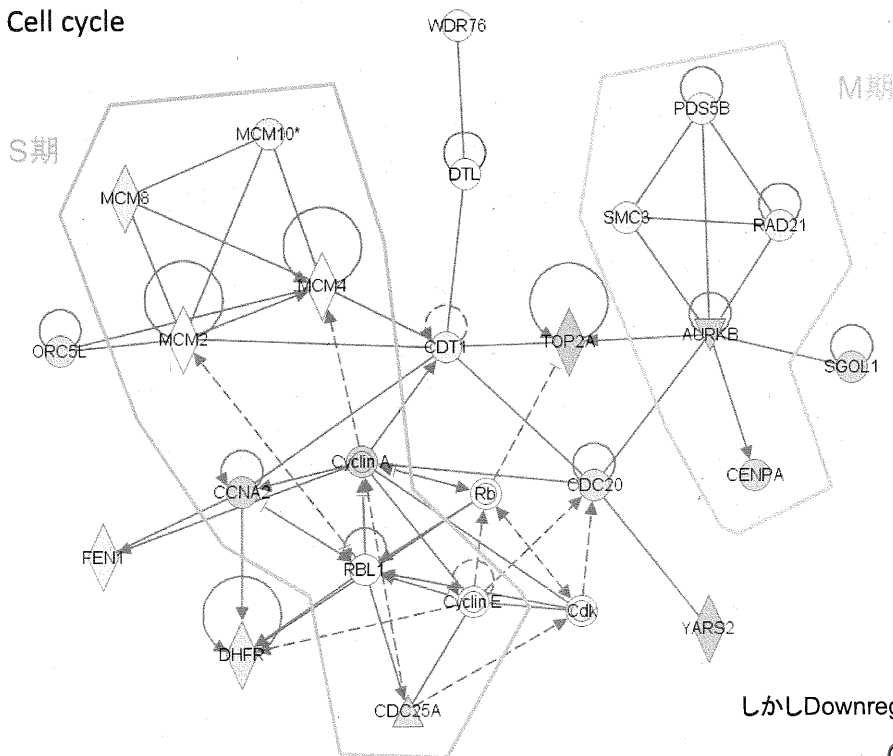
Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair, Cancer	54
2	Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair, Cellular Assembly and Organization	46
3	Cellular Assembly and Organization, Gene Expression, Lipid Metabolism	31
4	Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair	28
5	Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair	23

Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Cancer	2.52E-08 - 4.32E-02	55
Gastrointestinal Disease	1.01E-07 - 3.61E-02	27
Genetic Disorder	1.01E-07 - 3.67E-02	32
Respiratory Disease	2.37E-05 - 2.51E-02	14
Reproductive System Disease	1.42E-04 - 4.32E-02	26

発現減少が認められるCluster I の分子群は細胞周期に関連する

発現減少した遺伝子群におけるネットワーク解析

Cluster I : Cell cycle



しかしDownregulationは

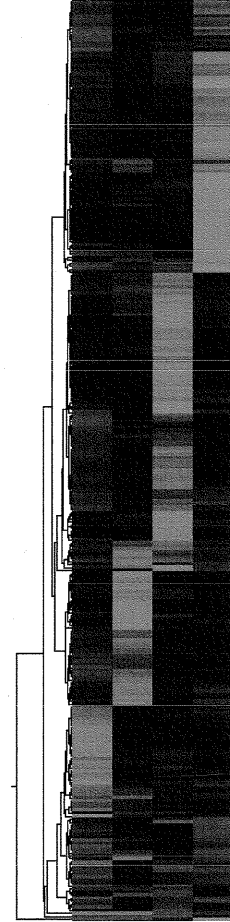
○結果

×原因

放射線照射によるG1期、G2期チェックポイントの活性化の結果、S期およびM期に発現する分子の減少が見られたと推測される

Upregulationに関する検討要

0 6 12 24 (hr)



I: 180

II: 196

III: 88

IV: 140

階層解析と機能解析 (Cluster IV)

Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cell Death	1.59E-05 - 4.50E-02	15
Cellular Development	1.25E-04 - 4.50E-02	15
Cellular Growth and Proliferation	1.25E-04 - 4.50E-02	14
Cellular Assembly and Organization	2.06E-04 - 4.39E-02	12
Cell Morphology	4.31E-04 - 4.16E-02	13

Top Tox Lists		
Name	p-value	Ratio
Liver Proliferation	1.03E-03	4/97 (0.041)
Increases Transmembrane Potential of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	2.21E-02	2/50 (0.04)
Decreases Permeability Transition of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	2.28E-02	1/5 (0.2)
Cardiac Necrosis/Cell Death	2.78E-02	3/142 (0.021)
Renal Necrosis/Cell Death	3.11E-02	2/60 (0.033)

Cardiotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Cardiac Damage	4.60E-03 - 4.60E-03	1
Cardiac Hypertrophy	1.37E-02 - 2.08E-01	3
Cardiac Necrosis/Cell Death	1.56E-02 - 6.68E-02	3
Cardiac Dysfunction	1.01E-01 - 1.01E-01	1
Cardiac Dilatation	1.53E-01 - 1.53E-01	1

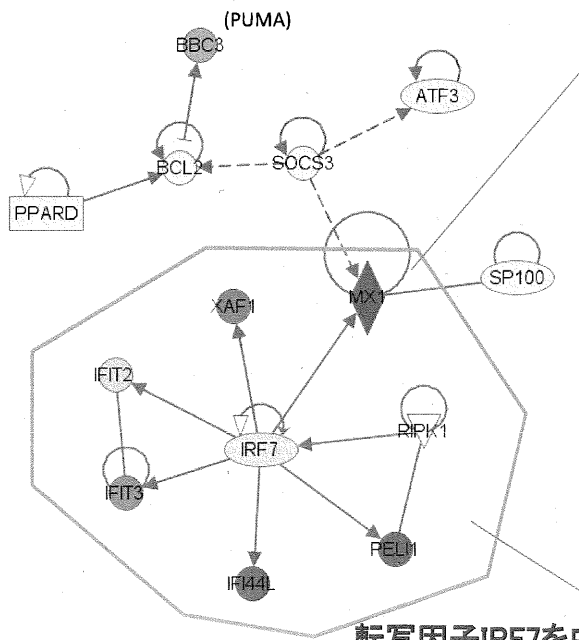
Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cell Death, Cellular Assembly and Organization, Cell Morphology	37
2	Cellular Growth and Proliferation, Tumor Morphology, Cellular Compromise	30
3	DNA Replication, Recombination, and Repair, Cell Cycle, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	22
4	Nervous System Development and Function, Gene Expression, Genetic Disorder	22
5	Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Carbohydrate Metabolism	16

Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Hypersensitivity Response	3.46E-03 - 3.46E-03	3
Inflammatory Response	3.46E-03 - 4.44E-02	7
Cancer	3.75E-03 - 4.23E-02	25
Genetic Disorder	3.75E-03 - 4.45E-02	44
Hematological Disease	3.75E-03 - 3.68E-02	5

発現上昇が認められるCluster IV の分子群は細胞死、炎症に関連する

発現上昇した遺伝子群におけるネットワーク解析

Cluster IV : Cell death & Inflammatory response



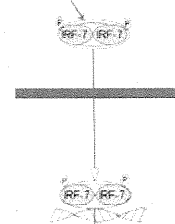
Top Canonical Pathways

Name

Interferon Signaling

- Induction of Apoptosis by HIV1
- Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors
- Complement System
- Type I Diabetes Mellitus Signaling

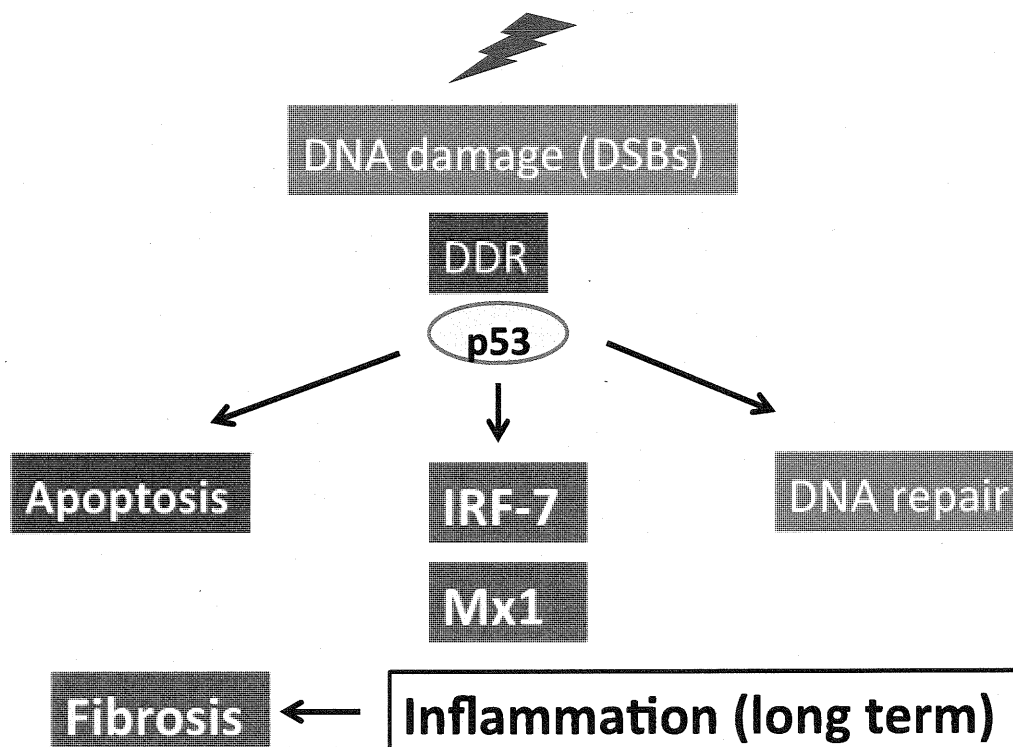
Interferone
Viral Infection



Inflammatory response
Immune response

転写因子IRF7を中心としたInterferon Signalingの活性化

Tentative Mechanism



IRF-7:interferon regulatory factor-7, Mx1:Interferon-induced GTP-binding protein Mx1

総括・展望

・網羅的遺伝子解析とqPCR法を用いることで、2 Gy照射時にHUVEC細胞においてp53>>>IRF7 >>>Mx1を中心とした炎症応答が活性化することが判明した。



・低線量照射時(0.5 or 1 Gy)に,IRF7やその下流の分子であるMx1が発現上昇するか、また、正常ヒト冠状動脈内皮細胞を用いた場合の影響について検討する。

・今後、より低線量率で長時間照射した場合に発現変化する遺伝子を検討することで、低線量率放射線の血管内皮細胞における影響を分子水準で検討する。

「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索」

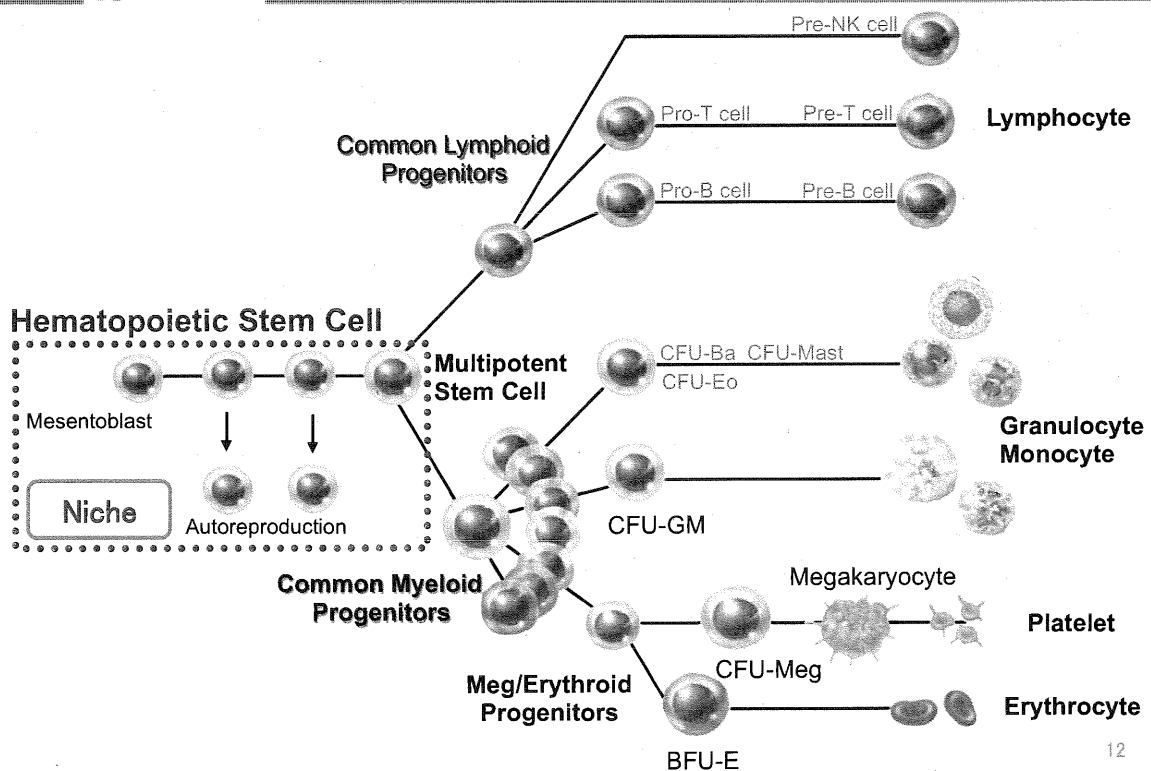
弘前大学 柏倉 幾郎

本研究課題の目的

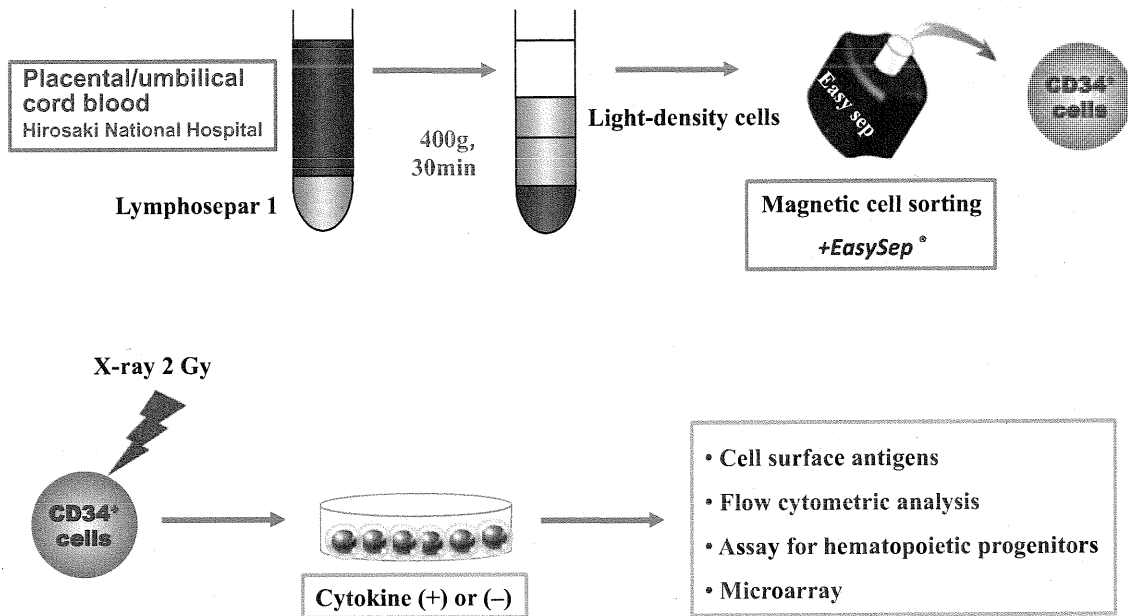


放射線に対して感受性が高い造血システムを評価モデルとして、標的となるヒト造血幹細胞の発現因子及び遺伝的特徴を解明し、これらが個体差感受性とどう関わっているか、個々の感受性を左右する因子は何であることを解明し、最終的には放射線感受性の予測診断や新たな治療方法への応用へと繋げる。

造血幹細胞の自己複製と分化

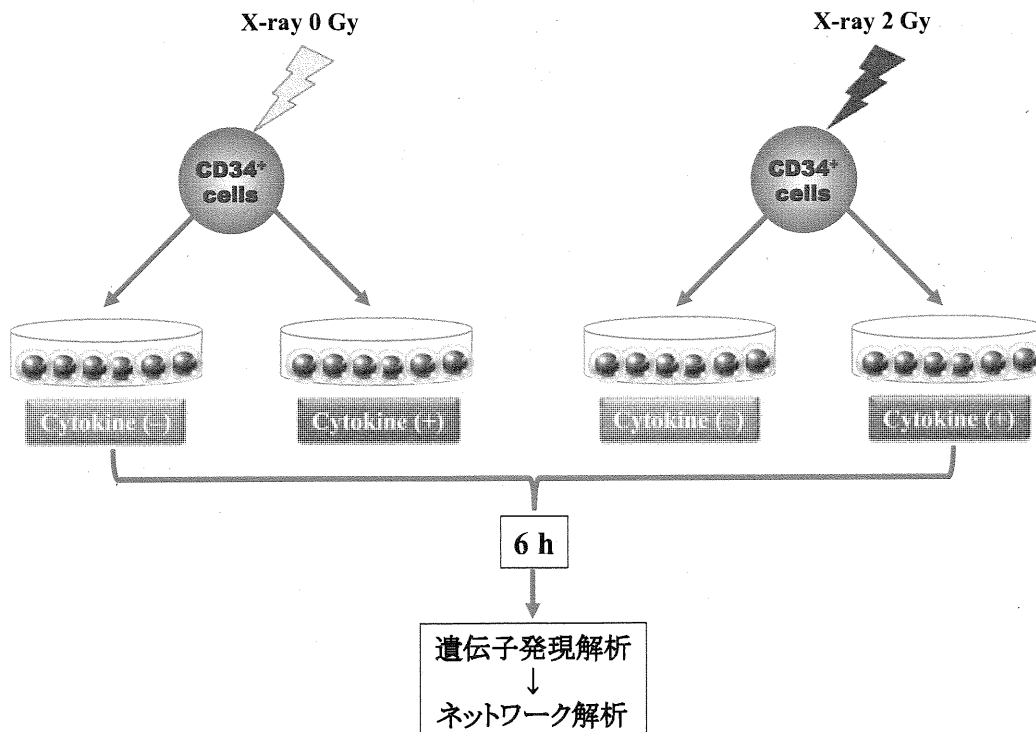


ヒト造血幹細胞の分離と実験概要



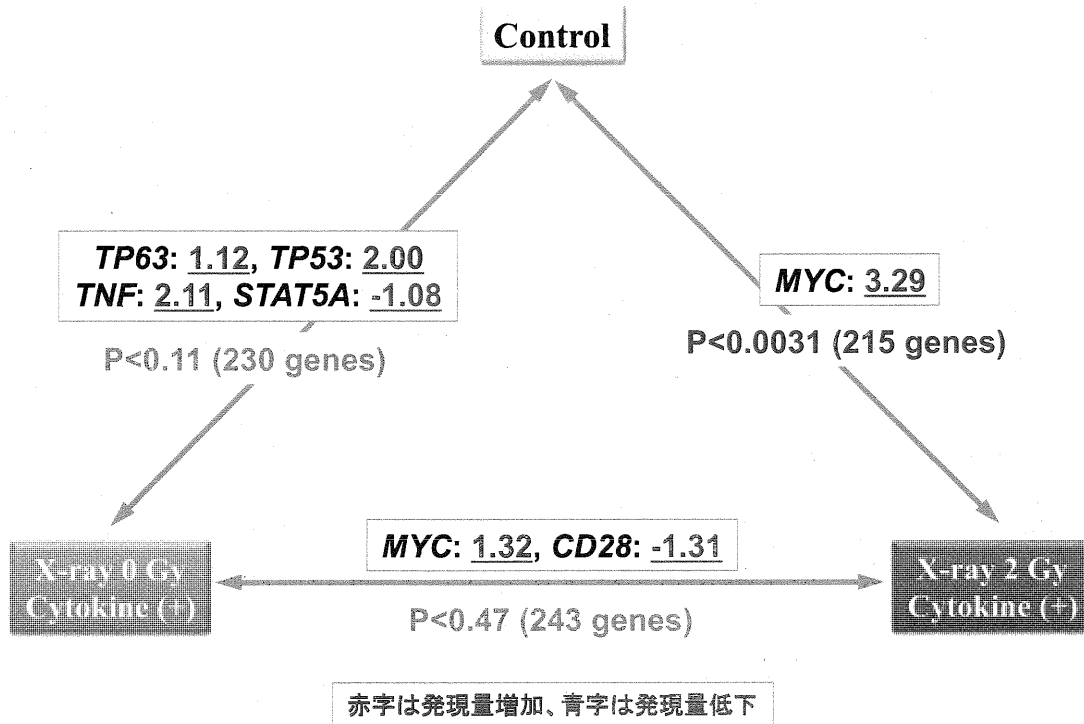
13

ヒト造血幹細胞の放射線曝露に伴う遺伝子変化の実験概要

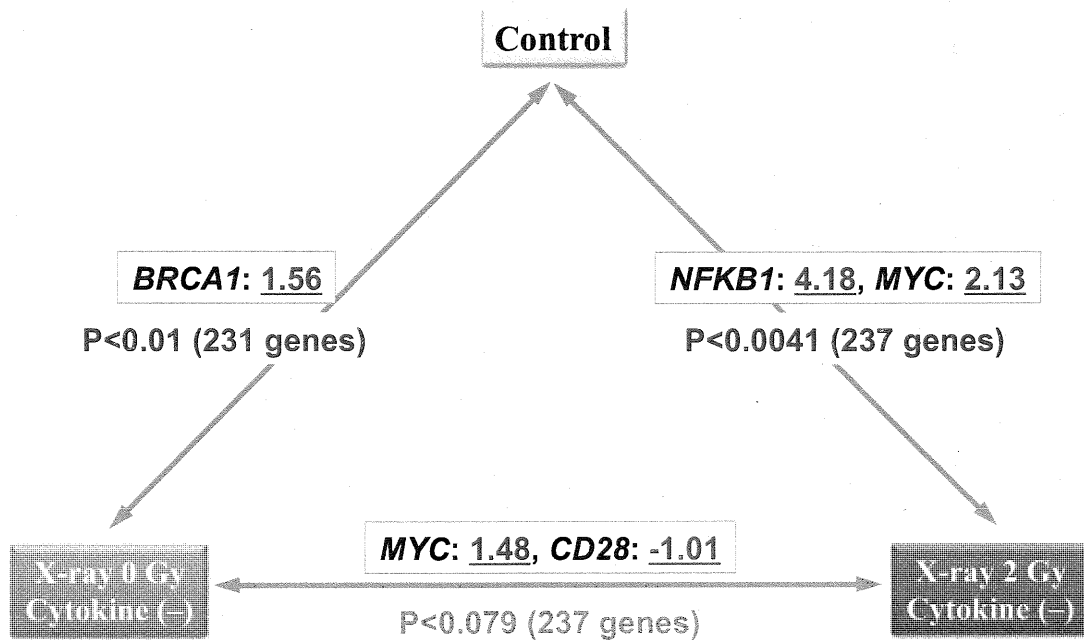


14

ヒト造血幹細胞の放射線曝露に伴う遺伝子変化の相互比較

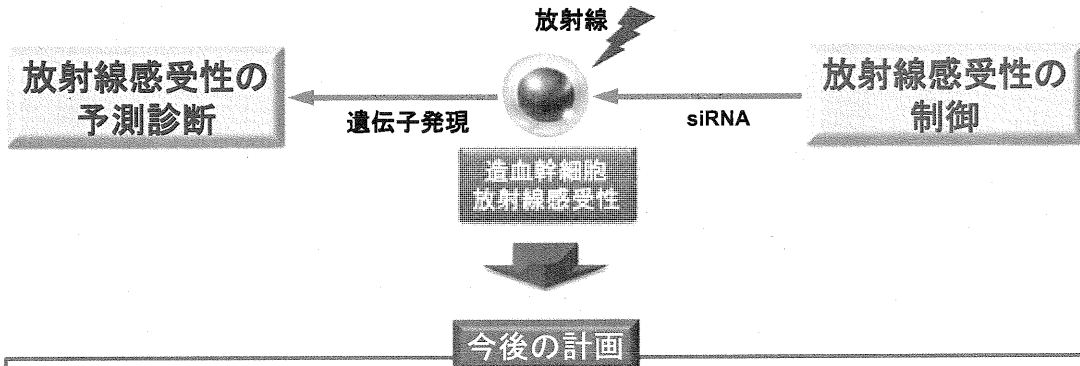


ヒト造血幹細胞の放射線曝露に伴う遺伝子変化の相互比較



まとめ

1. 2 Gy照射ヒト造血幹細胞ではおよそ360遺伝子に変動(非照射細胞比>2.0)が見られた。
2. 2 Gy照射ヒト造血幹細胞で最も変動した遺伝子はp21であった。
3. 変動遺伝子のネットワーク解析から、c-Mycが大きな役割を担っている可能性が示唆された。

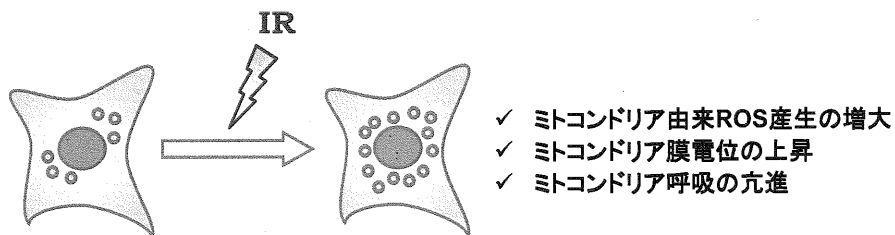


1. 造血幹細胞発現抗原、遺伝子と放射線感受性との関連性を明らかにする。
2. 短鎖干渉性RNAにより、個体の放射線感受性を制御する。
3. 最終的には、放射線感受性の予測診断法へ繋げる。

「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割」 北海道大学 稲波 修

目的

- 放射線照射による『ミトコンドリア由来ROSの増加とそれに伴うミトコンドリア機能変化』を引き起こすメカニズムの解明。



そこで本研究では、特にミトコンドリア含量の変化に着目し、

- ① 放射線照射後に起こる細胞内ミトコンドリア含量の変化の詳細な解析を行い、
- ② これを誘導するメカニズムを検討することを目的に研究を行った。

X線照射後の細胞内ミトコンドリアの変化

ヒト胎児線維芽細胞 NIH3T3 cells

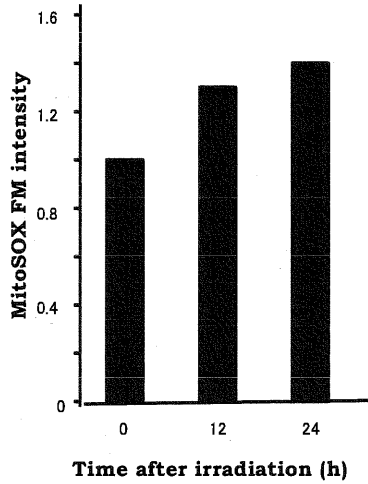
X-rays, 10 Gy

Mitochondrial ROS by MitoSOX

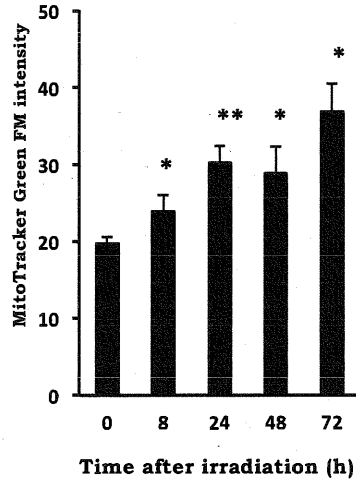
Mitochondrial mass analysis by Mitotracker Green

Mitochondrial DNA content analysis by qPCR

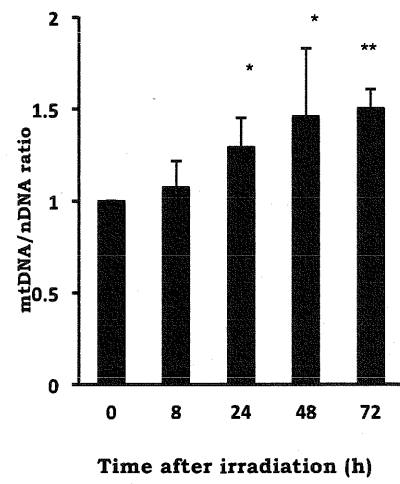
ミトコンドリア由来ROS量



ミトコンドリア量(膜量)



ミトコンドリアDNA量

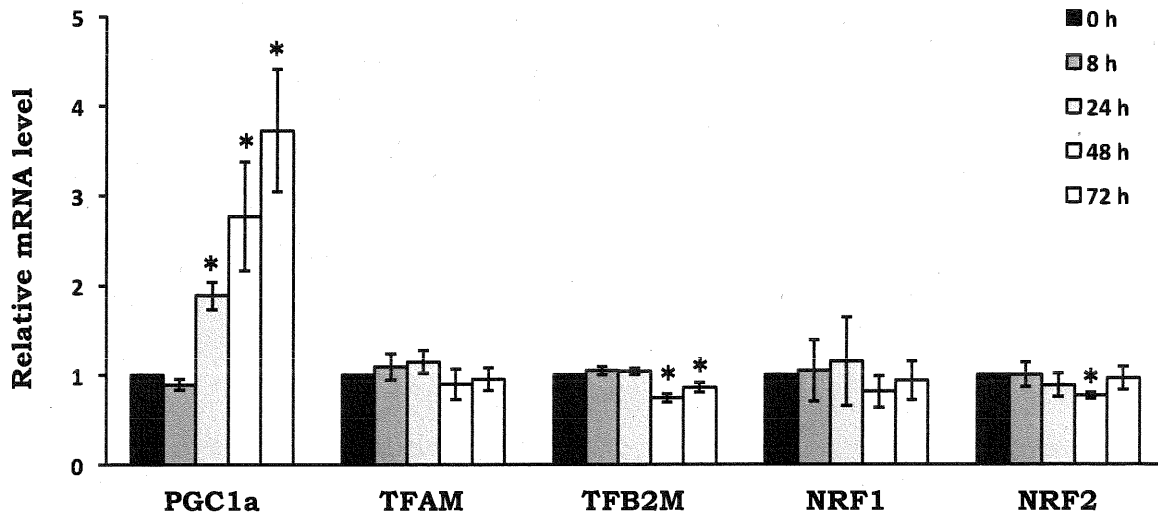


* : p<0.05; ** : p<0.01 (vs 0 h)

X線照射後のミトコンドリア生合成関連遺伝子発現の変化

mRNA level analysis by qPCR

NIH3T3 cells
X-rays, 10 Gy

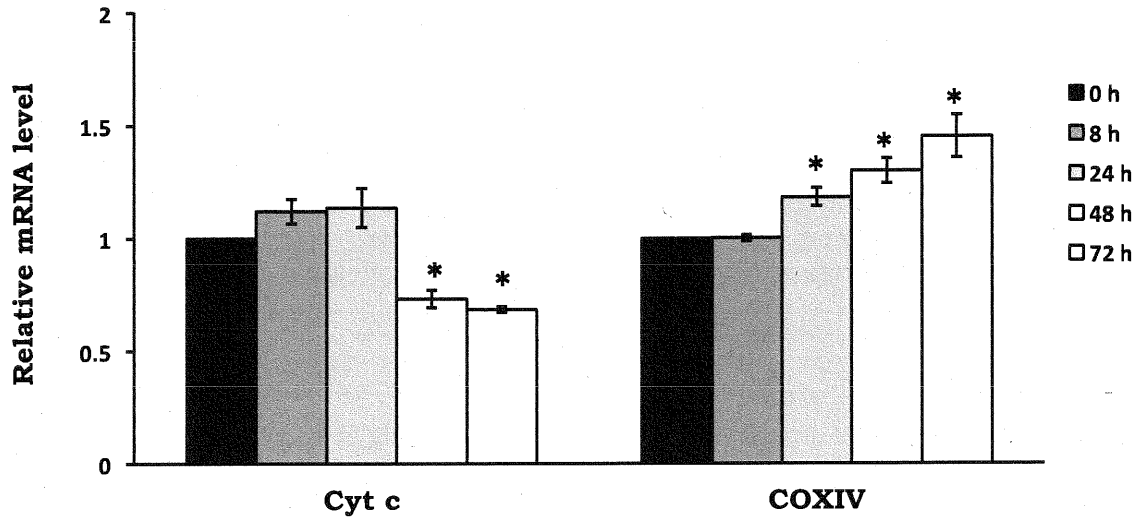


* : p<0.05 (vs 0 h)

X線照射後の電子伝達系遺伝子の発現変化

mRNA level analysis by qPCR

NIH3T3 cells
X-rays, 10 Gy



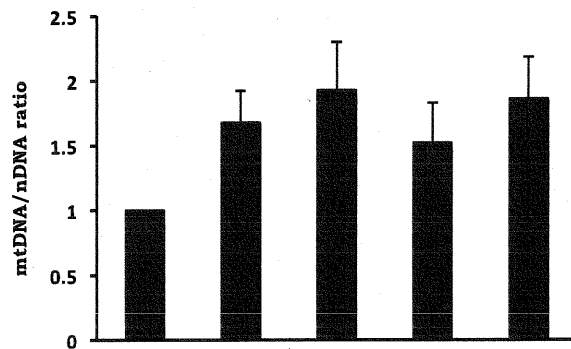
* : p<0.05 (vs 0 h)

X線照射による細胞内ミトコンドリア含量の変化に対する各種薬剤の効果

Mitochondrial DNA content analysis by qPCR

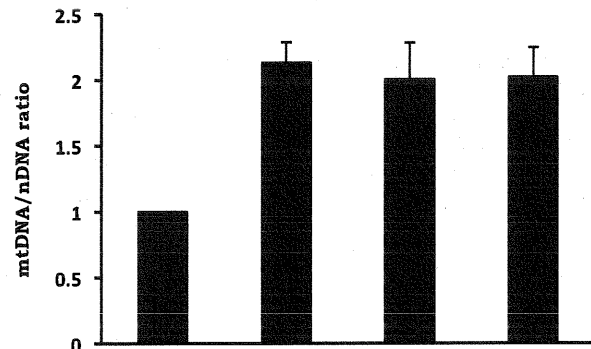
NIH3T3 cells

Ku60019 (ATM inhibitor)



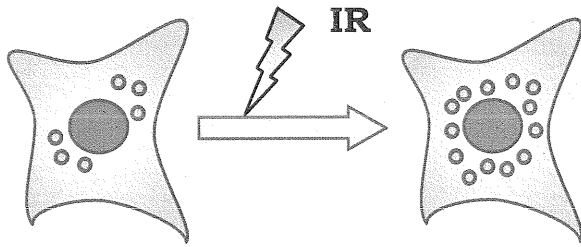
IR (10 Gy) - + + + +
Ku (nM) - - 10 100 1000

N-acetylcysteine (antioxidant)



IR (10 Gy) - + + +
NAC (mM) - - 10 20

まとめ



現象として今回、明らかになったこと

- ↑ ミトコンドリアの量の増加
Mitochondrial mass
- ↑ ミトコンドリアDNAの増加
Mitochondrial DNA
- ↑ ミトコンドリアからの活性酸素増加
ROS from mitochondria

メカニズムに関連して現在までに明らかになったこと

- × ミトコンドリアの正常な生合成によるミトコンドリア量の増加によるものではない
(通常、ミトコンドリア量の増大で活性化するPGC1a-NRF-TFAM/TFBM axisの関与が無い)
- × DNA二重鎖切断によるシグナル分子(ATM)により誘引されたものではない
- × 細胞内の活性酸素(ROS)が上昇が引き金で起きる現象では無い

今後の検討課題

- ? Fission/fusionのサイクルと細胞周期サイクルとのずれが起きているか?
- ? Mitophagyが一過性に放射線によって抑制されている可能性?
- ? 細胞内のROSが放射線感受性にどの様に係わっているか?
- ? 炎症関連細胞の低線量照射でのROS生成とサイトカイン産生・炎症応答は関連するか?

放射線による二次的なROS産生亢進とその非がん生物影響との関連性

