The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	放射線による細胞死の分子機構
Author(s)	渡邉, 正己; 鈴木, 啓司; 児玉, 靖司
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 2002, 62(10), p. 540-544
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19409
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

総　説

特　集：放射線治療研究において
アポトーシスは本当に重要か

放射線による細胞死の分子機構

渡邉　正己　　鈴木　啓司　　児玉　靖司

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生物学研究室

Special Lecture

Molecular Mechanism of Cell Death by Radiation

Masami Watanabe, Keiji Suzuki, and Seiji Kodama

p53 protein, a tumor suppressor protein, is accumulated and activated by ionizing radiation. It activates various downstream genes whose functions are involved in cell cycle arrest, apoptosis, and DNA repair. Although it was thought generally that G1 arrest by *p53* activation after ionizing radiation was a transient phenomenon to facilitate DNA repair, we found that it is irreversible and permanent in both normal human cells and tumor cells. Because cells arrested irreversibly express various phenotypes, such as cell enlargement and expression of senescence associated-β-gal, this is related to cellular senescence, but not to apoptosis. Therefore, we termed this phenomenon senescence-like growth arrest (SLGA). These results indicate that SLGA is the main form of cell death caused by ionizing radiation. SLGA can be utilized as an index of cancer therapy, because it is induced not only by radiation but also by anticancer drugs and is easy to examine by vital staining, thereby making the induction of SA-β-gal an index.

Research Code No.: *401*

Key words: *Apoptosis, Radiosensitivity, p53*

Received Sep. 9, 2002

Division of Radiation Biology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

本論文は，日本医学放射線学会誌編集委員会が企画し，執筆依頼した．

別刷請求先
〒852-8501　長崎市文教町1-14
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生物学研究室
渡邉　正己

はじめに

放射線による細胞死には複数の分子機構が関与し，その発現のバランスによって癌細胞の放射線致死感受性は大きく異なると予想される．そのため，治療対象の癌が放射線治療の対象になるか否かの判定を正確に行う手法の開発が癌の放射線治療の効果の向上に必須である．

放射線照射による細胞死のメカニズムとして*p53*が関与するアポトーシスが注目されてきた．しかし，培養細胞で，放射線によるアポトーシスが誘導されるのは，造血や生殖系の細胞など一部に限られることが次第に明らかになってきた．その一方で，活性化された*p53*のもう一つの機能は，一時的に細胞周期進行を停止させることにある．この緊急的細胞周期停止によって，DNA損傷を修復するために必要な時間が十分に確保され，遺伝的安定性が維持されると考えられている．このように，期待とは異なり，アポトーシスが放射線による細胞死の主流であることを支持する証拠は少ない．

それでは，放射線による細胞死はどのような機構で起きるのだろうか？この疑問に対し，最近，われわれは，放射線を照射された細胞において非可逆的な細胞周期停止が誘導されることを発見した．その細胞は，老化細胞と共通する老化形質が発現するのでその現象を老化様細胞増殖停止(Senescence-like-growth arrest：SLGA)と名付けている．このSLGAが発現すると，細胞は非可逆的に増殖を停止するが，栄養状態が保たれれば長期間生存し続けることができる．

このように放射線によるSLGAの誘導は，体細胞の増殖が完全に停止するという意味でいえば細胞死の一形態と考えられ，放射線による癌治療効果を推定するために新たな指標となるだけでなく，そのメカニズムの解明によって，細胞死の全容の解明が期待できる．

放射線は細胞増殖の永久停止を誘導する

放射線照射された細胞では，癌抑制遺伝子産物である*p53*が活性化され，細胞周期の進行が緊急的かつ一時的に停止

(G1期停止)すると報告されて以来[1]，*p53*依存的な細胞周期停止は，DNA複製前にDNA損傷を修復するために必要な現象であるとされてきた．しかし，この報告のもととなる研究では，骨髄性白血病由来の癌細胞ML-1細胞が使われていたが，その後，正常ヒト細胞線維芽細胞を用いて行われた実験では，G1 期停止は照射後96時間を経ても維持されることが明らかにされた[2,3]．たとえ，*p53*遺伝子機能が正常であっても，正常細胞と癌細胞の間で放射線応答は異なるようである．

その後の研究で，正常細胞でも癌細胞でも細胞周期の永久停止が起きた細胞の出現率は，被曝線量に比例するとともにコロニー形成法で求めた細胞の生存率と極めて近似することが分かった[4]．そのため，われわれはアポトーシスを顕著に起こさない線維芽細胞や上皮系の細胞などにおける一種の細胞死の型であると考えるようになった．放射線照射により非可逆的に細胞周期停止を起こした細胞は，巨大かつ扁平な形状を示し，継代培養時に観察される老化細胞の形状に極めて似ている[3]．さらに，この細胞は，老化細胞において特異的に発現される老化マーカーSenescence-associated-β-galactosidase(SA-β-gal)を発現する[5]．そのため，放射線が誘導する細胞増殖の永久停止は，細胞内での老化プログラムを発動を伴うと予想され，われわれは“老化様細胞増殖停止(SLGA)”と名付けた[3]．

SLGAの発現には*p53*の継続的活性化が必要である

放射線照射後，一過的な細胞周期進行停止のためには，*p53*が活性化され，引き続いて下流の$p21^{WAF1/CIP1}$，RBなど一連の細胞増殖制御遺伝子が活性化されることが知られているが，SLGAの誘導の際にも同様の経路の活性化が必須である．Fig. 1 にSLGAが誘導される比較的高い線量(6Gy)のX線を照射した際の細胞増殖制御遺伝子産物の発現動態をウエスタン・ブロティング法で調べた結果を示した．*p53*蛋白質レベルは，X線照射後，数時間の間に上昇し，その発現レベルは，照射後10日経ってもほとんど低下することなく高いままで維持される[3]．*p53*蛋白質の下流でG1 期停止に最も重要な役割を果たすとされる$p21^{WAF1/CIP1}$の発現は，*p53*の誘導より少し遅れ照射後12時間でピークに達した後，徐々に発現レベルの低下が起こり，10日後にはほとんど非照射細胞レベルまで戻る(Fig. 1)．この時期において*p53* のレベルは依然高いままである．$p21^{WAF1/CIP1}$は，CyclinD/Cdk4，CyclinD/Cdk6 およびCyclinE/Cdk2 の活性を抑制することによってRB蛋白質のリン酸化を抑制する．RB蛋白質は，リン酸化されると自分と結合している転写因子E2Fを解離し細胞増殖を促進するが，脱リン酸化状態では，E2Fと結合し細胞増殖が抑制される．そこで，RB蛋白質のリン酸化状態を調べると，照射直後に脱リン酸化したまま，照射後10日経ってもその状態が継続することが分かった．

以上のことから，細胞は，放射線照射されると，速やかにG1期停止にかかわる諸因子が活性化され細胞周期停止状態に陥り，ひき続きSLGA状態に陥ることが分かった．

ただ，RB蛋白質の脱リン酸化の状態は*p53*の蓄積と同様に，照射後10日間経っても継続するのに対し，$p21^{WAF1/CIP1}$の発現は，照射によって急激に増加した後，経日的に減少し10日目には，ほとんど非照射対象細胞と同レベルに戻ってしまう．したがって，$p21^{WAF1/CIP1}$が機能しなくなった後に，RBのリン酸化を阻害し続ける機構の存在を考えねばならない．おそらく$p21^{WAF1/CIP1}$に変わるサイクリン依存性キナーゼ(Cdk)阻害剤の誘導があるのだろう．

そこで，現在までに同定が報告されている主要なCdk阻害剤について，その発現を検討した結果，$p21^{WAF1/CIP1}$のレベルが減少するにつれて$p16^{INK4a}$のレベルが上昇していることが分かった[3](Fig. 1)．したがって，放射線照射によるSLGAの誘導では，その初期に*p53*の活性化による$p53^{WAF1/CIP1}$の誘導が必要であるが，$p21^{WAF1/CIP1}$の誘導によって引き起こされた細胞周期停止が長期間にわたって維持されるには，それだけでは不十分で，その後の$p16^{INK4a}$の誘導が必要であると思われる．

しかし，継続的に細胞増殖が停止するだけで細胞は死を迎えない．何が細胞を死に導くのであろうか？正常ヒト二倍体細胞では，DNAを複製するたびに染色体末端にあるTTAGGGという 6 塩基の単純な繰り返し配列であるテロメアが短縮することが知られている．そして，このテロメア短縮がある限界を超えると細胞は分裂できなくなり，その状態が細胞老化と呼ばれる．その際も*p53*が活性化される．テロメア末端が短縮することによってDNA末端がテロメア・ループ構造がとれなくなりDNAの二重鎖末端が生ずる．この構造は，放射線によって生じた二重鎖切断端と同じものなので*p53*活性化のシグナルを出すのではないだろうか．したがって，われわれが発見した放射線によるSLGAの誘導，細胞老化と同様にテロメア短縮が引き金になっているかもしれない．これまでも放射線照射によりテロメアにDNA損傷が起こるとテロメアが短縮し，細胞の老化を促進することが予想されていた．しかし，SLGAが誘導された正常ヒト二倍体細胞のテロメア長をサザンブロット変法を用いて検討した結果，放射線照射によりSLGA状態に陥った細胞のテロメア長は，非照射細胞のそれと差は認められなかった[3]．

ヒト正常体細胞は，通常，テロメレース活性を完全に失われている．一方，癌細胞はテロメレース活性を有している．したがってテロメレース活性が存在する場合には，SLGAが誘導されない可能性がある．しかし，われわれの研究結果によれば，SLGAは，テロメレース活性の有無に関係なく誘導され，SLGAが誘導されたことによってその後のテロメレース活性およびテロメア長ともに顕著な変化は起こさなかった．もちろん，放射線により細胞内の数本の染色体にのみテロメア短縮が起きることによって細胞老化が誘導されSLGAの原因となるという可能性は否定できない．この場合，われわれの用いたサザンブロット変法でも変化を捕らえることは難しい．しかし，現時点で，われ

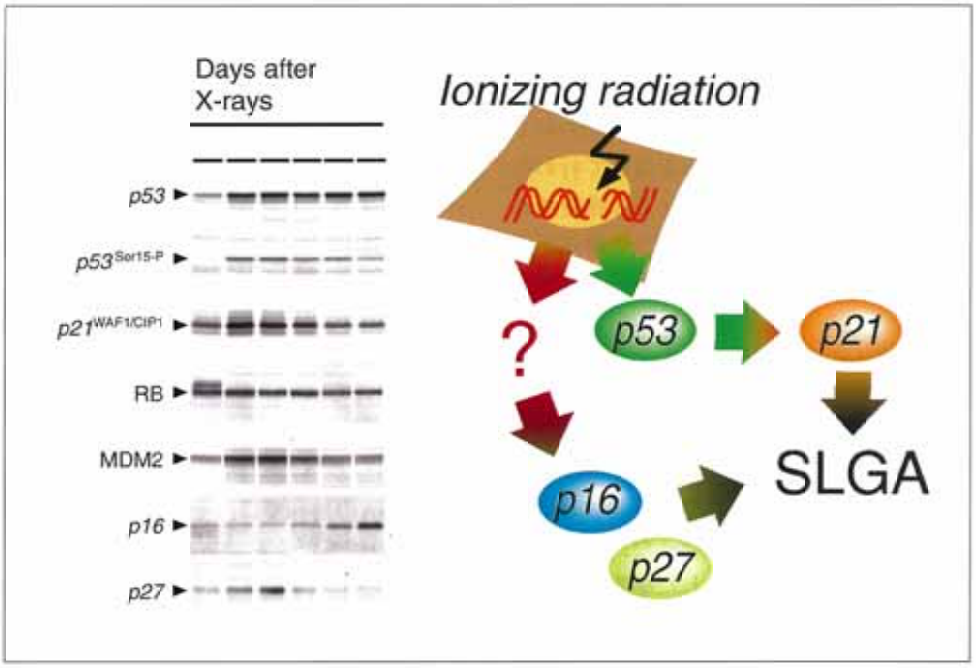


Fig. 1　放射線(6Gy)を照射されたヒト細胞における細胞増殖制御関連遺伝子の活性化動態とSLGAの誘導に関与すると思われる情報伝達経路

われはSLGAの誘導はテロメアの維持機構とは関係しない現象と予想する．

SLGAの誘導は，放射線によって誘発されたDNA損傷のうち，修復不可能な損傷から絶えず*p53*にシグナルが伝達されることによると考えられる．放射線で誘導されるSLGAと細胞老化によって誘導されるSLGAの細胞老化の誘導機構が同じか否かは，現時点において明確ではない．しかし，最近，放射線照射後の*p53*のリン酸化と老化細胞でみられる*p53*のリン酸化の部位が異なるという報告[6]がされている．この報告は，放射線と老化で誘導されるSLGAに互いに異なった情報伝達経路が関与している可能性を指摘しており非常に興味深い現象として詳細な検討が必要である．

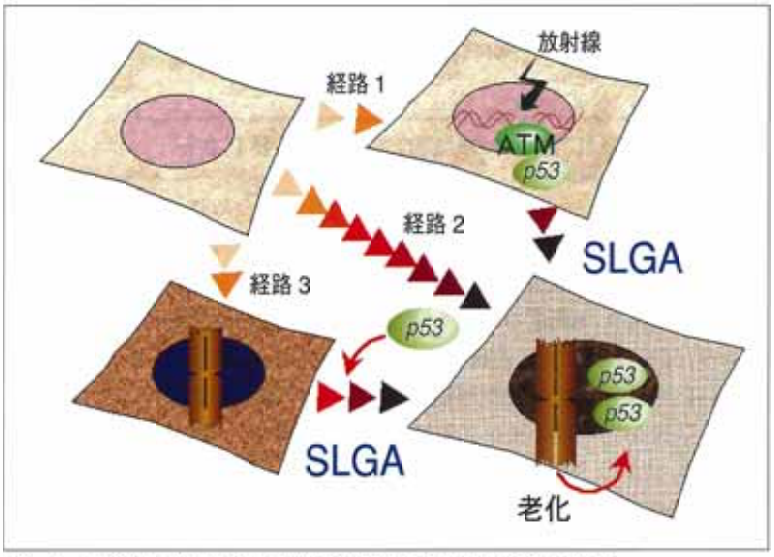
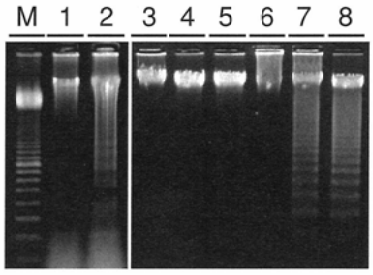


Fig. 2　放射線誘導SLGAと細胞老化に伴うSLGAの誘導模式図

なぜ，このように*p53*へのシグナルが長期にわたって送り続けられるのであろうか．SLGAはX線で効率的に誘導される．したがって，放射線照射によってできたDNA二重鎖切断のうち修復不可能なものが存在し，それが長期間残存し，シグナルを出し続けているのではないか．しかし，二重鎖切断のままでは存在し続けられない．そこで，われわれはDNA二重鎖切断部位でリン酸化されるヒストンH2AX構造に注目している．H2AXはヒストンコアを構成するヒストン蛋白質の一つであるH2Aのサブタイプで，全ヒストン蛋白質の数%を占めるであるといわれている．われわれはリン酸化ヒストンH2AXの動態を指標にSLGA誘導へのDNA二重鎖切断のかかわりを解析し，リン酸化ヒストンH2AXが照射後，長期間にわたって細胞内に存在し続けることを明らかにした．

われわれは，得られた結果を総合して以下のような可能性を考えている(Fig. 2)．正常細胞はテロメアが短縮することによって*p53*を活性化するシグナルが出され続け細胞周期は停止し老化する(Fig. 2，経路 2)．分裂途中の若い細胞に放射線を照射すると細胞内に修復不可能な損傷が残存して，それが原因で*p53*にシグナルが送り続けられ細胞はSLGAを誘導する(Fig. 2，経路 1)．今回用いた癌細胞は，テロメアが短縮しているので，*p53*を誘導しただけでもSLGAが誘導されるが(Fig. 2，経路 3)，放射線照射により修復不可能な残存DNAからのシグナルも加わってSLGAの

Table 1　放射線照射を受けた癌細胞におけるSLGAとアポトーシスの誘導



1. HE49 (6 Gy)
2. Molt-4 (6 Gy)
3. NCI-H1299 (6 Gy)
4. HT1080 (6 Gy)
5. MCF-7 (6 Gy)
6. RKO (6 Gy)
7. HT1080 (40J/m^2)
8. RKO (40J/m^2)

Cells	IR (6 Gy)		UV (40J/m^2)
	SLGA	Apoptosis	Apoptosis
HE49 (Normal human cells)	+	−	+
NCI-H1299 (Non-small cell lung carcinoma)	−	−	+
HT1080 (Fibrosarcoma)	+	−	+
MCF-7 (Breast adenocarcinoma)	+	−	+
RKO (Colon carcinoma)	+	−	+

誘導が増強されたのであろう．

効果的な癌の放射線治療を行うために必要なことは？

癌の放射線治療においては，腫瘍部位にいかに効率良く細胞死を引き起こすかが最も重要な問題となる．その視点から，最近は，放射線により誘導されるアポトーシスにかかわる分子が次々と明らかにされていることに刺激され，放射線照射による効率的なアポトーシスの誘導によりその治療効果が飛躍的に高まることが期待されてきた．しかし，本稿で述べたように癌であっても固形腫瘍は放射線照射されてもアポトーシスを極めて起こしにくく，放射線による細胞死はSLGAが主流であることが分かってきた．そこで，われわれは，癌細胞において放射線照射によりSLGAを誘導することによって，癌細胞の増殖を不可逆的に停止させる，すなわち，放射線による癌治療効果の向上ができないかどうか検討した．

まず，野生型*p53*遺伝子を持つ他のヒト癌細胞に6Gyの放射線照射を行いSLGAが誘導されるかどうかを検討した．この実験では，野生型*p53*遺伝子を持っているので*p53*機能の解析のための研究に用いられているHT1080，MCF-7およびRKOの3種の細胞に6GyのX線を照射して観察した．その結果，いずれの癌細胞でもアポトーシスに特徴的なDNAラダーは顕著には観察されず，細胞形態からもアポトーシスは誘導されていないことがわかった(Table 1)．一方SA-β-gal染色を行うとすべての細胞で陽性細胞の出現が確認され，SLGAが誘導されていることが確認された．これらの細胞に紫外線を照射した場合にはいずれの癌細胞でもアポトーシスが起きることから，これらの細胞にはアポトーシスを起こす能力はあるにもかかわらずSLGAのみが誘導されたことが明らかである．

しかし，一般的には，癌細胞は*p53*遺伝子に欠失あるいは変異を持つものが多い．そこで，*p53*遺伝子に欠失あるいは変異を持つヒト癌細胞で同様に検討した．その結果，やはり一部を除いて多くの癌細胞で放射線によりSLGAが誘導されることが分かった(Table 2)．多くの癌細胞では正常の*p53*機能を持たないためにG1期停止は起こらない．おそらく，細胞は，一時的なG2期停止を起こした後に分裂期に入るものの破綻的状況(mitotic catastroph)に陥るものと思われる．そのため，核分裂も細胞分裂ともに成就せず通常の2倍量のDNAを持つG1細胞として永続的細胞周期停止に陥り，結果的にSLGA状態になるものと予想される．*p53*機能に依存的にSLGAが誘導される時にも，*p53*蛋白質の転写活性化とは無関係に*p16*INK4aの発現が誘導されることは既に述べたが，*p53*機能非依存的なSLGAが誘導される場合も，何らかのメカニズムにより*p16*INK4aなどのCKIの発現が上昇して細胞周期を停止しているのであろう．今後これらCKI誘導の特定と，その発現制御機構を明らかにする必要がある．

最後に，われわれは，野生型*p53*遺伝子を用いた遺伝子療法と放射線療法の併用の効果について調べるため，*p53*遺伝子を欠失したヒト肺非小細胞癌であるNCI-H1299に，野生型ヒト*p53*遺伝子を組み込んだ誘導型遺伝子発現ベクターを導入し，人為的に野生型*p53*蛋白質を発現できる細胞を樹立した．*p53*蛋白質は昆虫ホルモンの合成誘導体であるポナス

Table 2　放射線照射された種々の癌細胞におけるSA-β-galの発現

Cells	%SA-β-gal-positive cells X-ray dose (Gy)	
	0	10
wt p53		
HT1080	5.0±0.4	89.9±5.5
RKO	1.1±0.3	49.9±2.8
MCF-7	3.6±0.8	95.4±9.8
mutated p53		
A431	0.1±0.3	4.9±0.8
M059K	0.5±0.8	29.7±1.2
HCC1937	1.1±1.6	87.6±7.5
Capan-1	2.3±1.1	98.3±8.7

10^5 cells were seeded into T25 flasks and inclubated for 24 hours. Cells were irradiated with 10 Gy of X-rays and incubated for 5 days before analysis of SA-β-galactosidase expression. Percentage of SA-β-galactosidase positive cells was calculated as the number of cella stained divided by the number of cells.

テロンA(以下PA)を培地中に添加することにより*p53*遺伝子発現が活性化され*p53*蛋白質が誘導されるようになる．

誘導スイッチpVgRXR(第一のプラスミド)をすでに導入してある細胞にpINDp53プラスミドを導入し99p53-1細胞を樹立した．この細胞は，PAを添加するとおよそ6時間後から*p53*蛋白質が誘導され，その後*p53*の下流の*p21*，MDM2，GADD45蛋白質などが誘導される．その結果，*p21*が誘導されるとRBが脱リン酸化型に移行して細胞周期停止が起こるので，PA添加後6時間，つまり*p53*蛋白質が誘導され始める頃にX線を照射してH1299癌細胞の致死過程を追跡した．その結果，この細胞では，アポトーシスに典型的な形態変化は全くみられず，そのかわり老化細胞に特異的に発現する老化マーカーであるSA-β-gal (Senescence associated β-galactosidase)を発現する細胞が線量依存的に誘導されることが分かった．SA-β-galの発現は*p53*を単独で誘導した場合にもみられるが，X線照射によりその頻度が顕著に増加した．これらの結果は，野生型*p53*遺伝子の移入による遺伝子療法と放射線療法の併用も有効な癌治療法として充分に期待できることが分かった．

まとめ

放射線照射による細胞死のメカニズムはアポトーシスではなく老化様増殖停止(SLGA)が主流であることが明らかになった．SLGAは，放射線だけでなく抗癌剤によっても誘導されることから[7,8]，癌治療の新たな治療効果として有用であると思われる．また，SLGAの誘導はSA-β-galの誘導を指標にした生体染色により簡単に調べられることから，治療部位より得られた病理標本を染色することによって，放射線治療の効果を確認する指標として用いることもできると考えられる．今後，SLGA誘導にかかわるCKI発現亢進の分子メカニズムを解明することにより，癌治療法の一つとしての放射線療法に新たな応用の基盤が提供されることを期待したい．

文　献

1) Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 51: 6304–6311, 1991
2) Leonardo AD, Linke SP, Clarkin K, et al: DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of cipl in normal human fibroblasts. Genes Dev 8: 2540–2551, 1994
3) Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, et al: Radiation-induced senescence like growth arrest requires TP53 over function but not telomere shortening. Radiat Res 155: 248–253, 2001
4) Desimore JN, Dolezalova H, Redpath JL, et al: Prolonged cell cycle arrest in irradiated human diploid skin fibroblasts: the role of nutrient deprivation. Radiat Res 153: 131–143, 2000
5) Dimri GP, Lee X, Basile G, et al: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 92: 9363–9367, 1995
6) Webley K, Bond JA, Jones CJ, et al: Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. Mol Cell Biol 20: 2802–2808, 2000
7) Chang B-D, Xuan Y, Broude EV, et al: Role of p53 and $p21^{waf1/cip1}$ in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. Oncogene 18: 4808–4818, 1999
8) Chang B-D, Broude EV, Dokmanovic M, et al: A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. Cancer Res 59: 3761–3767, 1999