

吉田貴子 論文内容の要旨

主論文

Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation

ミトコンドリアの機能障害は、放射線照射後の持続的な酸化ストレスの原因となり得る

Free Radical Research, in press

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻

(主任指導教員: 李桃生教授)

緒言

近年、放射線により誘導されるゲノム不安定性とミトコンドリア由来の活性酸素種 (ROS) との関連性が複数の研究報告から示唆されているが、放射線がどのようなメカニズムにより、ミトコンドリアからの ROS 産生を増加させるのかよく分かっていない。ミトコンドリアでは ATP 産生の過程で、電子伝達系 (ETC) から漏れた電子により酸素分子が還元され、ROS の一種であるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) が生じる。また、ETC 複合体が阻害されると、電子の漏れが増加し、 O_2^- 産生も増加することが知られている。一方、放射線照射時に、水分子 (H_2O) の電離により生じるヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) は、極短寿命ながら最も有害な ROS であり、脂質やタンパク質等の生体高分子を過酸化することも知られている。

そこで、著者らは、放射線照射により放出された $\cdot OH$ によりミトコンドリアが酸化ダメージを受け、ETC 複合体が機能障害を起こすことで O_2^- の産生が亢進する可能性を想定した。

本研究では、放射線暴露がミトコンドリアの機能障害を確かに誘導するのか、さらにその機能障害が、ゲノム不安定性亢進の一因となり得る持続的な酸化ストレスをどのように引き起こすのか検討した。

対象と方法

ラット胎児胸部大動脈平滑筋由来 A7r5 細胞株を使用した。細胞に γ 線 (線源; ^{137}Cs , 線量率; 1 Gy/min.) を線量 5Gy となるように照射し、以下の解析を行った。

- 1) 細胞内 ROS 産生の観察: 放射線暴露初期の細胞内の ROS レベルは、蛍光プローブである H_2DCFDA を用いて、蛍光顕微鏡で観察した。
- 2) ミトコンドリア ETC 複合体の酵素活性の測定: NADH 脱水素酵素 (ETC 複合体

I)の酵素活性の測定は、既報に従って分光学的に行った。阻害剤の存在・非存在下で、基質の1分間当たりの吸光度変化を測定し、その差を用いて活性値を算出した。

- 3) ミトコンドリア由来 ROS の解析: ミトコンドリアからの O_2^- の産生レベルを、蛍光プローブである MitoSoxTM Red mitochondrial superoxide indicator を用い、フローサイトメリーにより解析した。
- 4) ミトコンドリアおよび核 DNA の酸化的損傷の評価: 酸化 DNA のバイオマーカーである 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) の生成量を ELISA 法により測定した。

結 果

- 1) γ 線照射後5分で、細胞内 ROS による DCF 蛍光が強く見られたが、30分以降はほとんど観察されなかった。即ち、細胞内の ROS レベルは、照射後5分以内で最も高く、その後は急速に低下していくことが分かった。
- 2) NADH 脱水素酵素活性は、照射後12時間以内に低下し始め、その後72時間後まで低下し続けた。
- 3) ミトコンドリア内の ROS 産生は、照射後18時間から上昇が観察され、24時間後はさらに増加し、72時間後まで亢進し続けた。
- 4) ミトコンドリア DNA 中の 8-OHdG の生成量は、照射後18時間までは変化がなかったが、24時間後から増加し、72時間後まで高値を示した。一方、核 DNA 中の 8-OHdG は、照射後72時間経過しても変化が見られなかった。

考 察

γ 線照射後、細胞内の ROS レベルが数分以内に上昇し直ぐに下降したのは、放射線により H_2O が電離され $\cdot OH$ が産生されたことを示唆している。

$\cdot OH$ は非常に反応性に富むので、極短寿命でもミトコンドリア膜内のリン脂質などを過酸化し、その結果、NADH 脱水素酵素の活性低下を招いたと考えられる。また、ミトコンドリアからの ROS 産生は、NADH 脱水素酵素の活性低下から数時間後に観察され始めたことから、ミトコンドリアの ROS 産生レベルが有意に増加したのは、ミトコンドリアの機能障害によって ETC から電子が漏れたことに因ることも示唆された。

ミトコンドリア内で ROS が増加し始めたのと同時期に、ミトコンドリア DNA も酸化的障害を受けたが、照射後18時間ではミトコンドリアと核 DNA の酸化的損傷は見られなかった。これは、照射後直ちに生じる細胞内 ROS がミトコンドリアや核 DNA に与える影響は非常に小さく、ミトコンドリア DNA の酸化的損傷は、ミトコンドリアの機能障害に起因する ROS の蓄積によって引き起こされたと考えられる。

ゲノム不安定性に関する実験を始め、上記の可能性を実証するにはさらなる解析が必要ではあるが、放射線照射後、ミトコンドリアの機能障害が持続的な酸化ストレスを引き起こし、長時間に亘ってゲノム不安定性を誘導するのに寄与することは十分考えられる。以上のことから、抗酸化剤投与によってミトコンドリアの機能を正常化することは、放射線が誘導するゲノム不安定性や発がんに対する有用な治療戦略になり得ると考えられる。