

# 放射線・紫外線適応応答マーカーを指標とした 老化制御因子スクリーニング法の開発

東京都健康長寿医療センター研究所分子機構研究チーム

三浦 ゆり

Organisms are exposed to various stresses such as oxidative stress and other environmental stresses, resulting in the diverse pathophysiological and pathological conditions with age. However, it is also known that low dose stress induces the adaptive response, which exerts protective effects against a subsequent higher dose. Radiation adaptive response has been widely observed in various biological systems. The protective responses are expected to bring anti-aging effects in dermal cells. Thus, in order to find anti-aging factors involved in adaptive response, we try to explore the biomarkers of radiation adaptive response in dermal cells, and lead to develop the protective agents against dermal aging. In the present study, we examined radiation adaptive response in dermal fibroblast, and explored the low dose irradiation-responsive proteins using proteomics on two-dimensional (2-D) PAGE. As a result, 0.1Gy pre-irradiation followed by 2-Gy challenging-irradiation at 3-hr interval induced radiation adaptive response in dermal fibroblast. From proteomics analyses of protein profiles of 0.1Gy- or non-irradiated dermal fibroblast, some candidate proteins, which are responsible for radiation adaptive response, were revealed.

## 1. 緒言

老化には、遺伝的要因と環境的要因の両方が深く関与しているが、環境的要因の中で最も重要なのは活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレスである。しかし、ひとくちに酸化ストレスと言っても、老化に実際に関与しているのは一度に多くの細胞を死に至らしめるような強い酸化ストレスではなく、それほど強くはないが持続的な酸化ストレスである。酸化ストレスの生体影響に関する研究は、活性酸素・フリーラジカルが様々な疾患や炎症などに深く関与することが明らかにされて以来、様々な研究者から注目を集めているが、現在のところ酸化障害あるいは細胞死を引き起こすような強いストレス負荷の研究がほとんどであり、老化や慢性疾患のモデルとなるような低レベルの持続的なストレスに関してはほとんど明らかにされていないのが現状である。しかし、老化による細胞の機能低下とその機構を明らかにするためには、低レベルの酸化ストレスに的を絞った研究が必要である。特に皮膚は、紫外線、環境放射線、環境汚染物質など様々な刺激に直接曝される部位であり、皮膚老化の制御を目的とした研究をするためには、放射線や紫外線の低線量照射による老化モデルの構築と、その解析が必要不可欠であると考えられる。

弱い(低レベルの)酸化ストレスによる生体への影響を考えるときは、強い(高レベルの)酸化ストレスにはない



Proteomic Research for Biomarker of Adaptive Response to Ionizing and Ultraviolet Radiation

Yuri Miura

Research Team for Functional Genomics,  
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

特異的な現象について考慮する必要がある。それが、ホルミシスあるいは適応応答と呼ばれる現象である。「ホルミシス(hormesis)」という言葉は、ギリシア語の「hormo(興奮する)」が語源になっており、「大量では有害なさまざまな毒物などが、少量ではかえって生理機能の刺激効果をもたらすこと」と定義されている。つまり、ストレスもその強さがマイルドであれば、生体にとってプラスの効果をもたらすということである。放射線に関しては、低線量放射線照射により放射線適応応答が引き起こされることが知られている。放射線適応応答は、予め低線量放射線を照射することにより高線量放射線に対する放射線抵抗性を獲得することであり、この防御応答は様々な生物で観察されている<sup>1,2)</sup>。放射線適応応答に関与する因子は、DNA修復関連因子など様々な酵素やタンパク質が知られている<sup>3)</sup>。しかし、多様な実験系において様々な指標を用いて研究されているため、その分子機構は多様であり、それぞれの細胞、あるいはそれぞれの照射条件により関与する因子も様々であると考えられる。

皮膚は、環境放射線に直接曝される部位であるため、皮膚老化につながる酸化的傷害だけでなく、適応応答も引き起こされていると考えられる。放射線適応応答を活性化する因子は、酸化障害の蓄積を防御し老化を防止する因子であり、老化制御因子と考えられる。このため、皮膚老化を遅らせて肌をみずみずしく保つためには、酸化ストレスを抑え込むことを目的とした抗酸化化粧品の開発だけでなく、細胞自身のもつこのようなストレス応答能を高め、防御機構を活性化させることも重要であると考えられる。

そこで本研究では、皮膚線維芽細胞を用い、低線量放射線照射による細胞への影響をタンパク質レベルで解析し、細胞の自己防御応答である適応応答の活性化因子を探索することを目的とする。発現プロテオミクスを用いて、低線

量放射線照射による細胞への影響を解析し、細胞の自己防御応答である適応応答によって発現変動するタンパク質、すなわち適応応答マーカーを探索する。今後、抗体等を用いてこの適応応答マーカーを高感度かつ簡便に検出する系を構築し、適応応答マーカーを指標とした老化制御作用を持つ化合物のスクリーニングから、適応応答活性化という新たなメカニズムによる皮膚老化防止剤の開発につなげる。

## 2. 実験

### 2.1 培養細胞

細胞は、ヒト皮膚由来の線維芽細胞であるTIG-118を用いた。培地は10% FBS, 1% penicillin-streptomycinを含む $\alpha$ -MEMを用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> / 95 % air中で培養した。

### 2.2 X線照射

X線は、X線照射装置(MBR-1505R2:日立メディコ)を用い、室温で照射した。低線量照射は、5.5 mm Al+2.1 mm Cuのフィルターを用いて、管電流2mA、管電圧100 kV、線量率0.01Gy/minで行い、0.1Gy照射した。また、適応応答実験の場合の追加照射は、0.5mm Al + 0.1mm Cuのフィルターを用いて、管電流5mA、管電圧150kV、線量率0.16Gy/minで行い、2Gy照射した。照射しない細胞群(対照群)も照射群が照射している時間帯は室温に放置した。

### 2.3 放射線適応応答実験

細胞は、X線を照射する1日前に細胞数を計測し、フラスコにプレートした。適応応答は、あらかじめ照射する低線量放射線照射の後、一定間隔後に高線量の追加照射を行い、追加照射による放射線障害があらかじめ低線量照射を行うことによって、軽減されるかどうかを調べるものである。そこで、あらかじめの低線量放射線と追加の高線量放射線を、それぞれ照射する群としない群に分け、全部で4群の細胞を用いて適応応答を評価した。即ち(低線量照射有-追加照射有)、(低線量照射有-追加照射無)、(低線量照射無-追加照射有)、(低線量照射無-追加照射無)である。細胞は、それぞれの条件で低線量照射と追加照射を行った後、37°C 5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で2日間培養し、2日後の細胞数増加を調べた。

### 2.4 二次元電気泳動

細胞を低線量照射群と非照射群に分け、低線量照射群に0.1Gy照射を行った。照射3時間後に照射群、非照射群とも細胞を回収し、細胞分画キットを用いて核画分を分取した。分取した核画分から、タンパク質抽出バッファー(8.5M urea, 0.2% SDS, 2% Triton-X100, 3% 2-mercaptoethanol, 2% Pharmalyte<sup>3-10</sup>)を用いて、還元的にタンパク質を抽

出した。タンパク質二次元電気泳動とプロテオーム解析は、以下のように行った([http://proteome.tmg.or.jp/2D/2DE\\_method.html](http://proteome.tmg.or.jp/2D/2DE_method.html))<sup>4)</sup>。

あらかじめ膨潤させておいた等電点電気泳動用ストリップゲル(Immobiline DryStrip, pH4-7, 18cm: GE Healthcare)に抽出した核画分タンパク質をのせ、一次元目の等電点電気泳動を行った(CoolPhoreStaar IPG-IEF Type P, Anatech)。ストリップゲルを還元化、アルキル化処理後、SDS-PAGEを行った(CoolPhoreStar SDS-PAGE Dual-200, Anatech)。泳動ゲルを蛍光染色し(SYPRO-Ruby)、ゲルスキャナーを用いて泳動像を取り込み、ゲル間のディファレンシャルディスプレイ解析を行った(PDQuest, Bio-Rad)。非照射細胞の泳動像と低線量照射細胞の泳動像のスポットをマッチングさせ、発現が変動するタンパク質スポットを探索した。

### 2.5 タンパク質の同定

発現の変動したスポットを、スポットカッターを用いて切り出し、脱色処理後にトリプシン(Promega)とリシルエンドペプチダーゼ(和光純薬)により酵素消化を行った。得られたペプチドをゲル片より抽出し、ターゲット上でマトリクス( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)と混合した後、MALDI-TOF質量分析計(AXIMA-CFR; Shimadzu Biotech)を用いて質量分析を行い、ペプチドマスフィンガープリンティングを得た。Mscot検索サイト(Matrix Science, London, UK, see <http://www.matrixscience.com>)を利用して、スポットの同定を行った。

## 3. 結果

### 3.1 低線量放射線適応応答

まず、皮膚線維芽細胞において低線量放射線適応応答の起きる条件を検討した。生体が適応応答を起こすためには、あらかじめの照射と追加照射、さらにその間の間隔を決めることが重要である。そこで、あらかじめの照射(低線量照射)については0から1Gyまで、また追加照射(高線量照射)については1Gyから5Gyまで検討し、適応応答がもっとも顕著に現れる照射条件を求めた。また、あらかじめ照射と追加照射の間隔は、3時間と24時間について検討した。その結果、あらかじめ照射を0.1Gyで行い、2Gyの追加照射を3時間後に照射することにより、追加照射による細胞増殖阻害が最も抑制され、皮膚線維芽細胞において適応応答がおきることが明らかになった(図1)。

### 3.2 二次元電気泳動による放射線適応応答因子の解析

そこで次に、適応応答が発現する照射条件でX線を照射し、プロテオミクス解析を用いて照射後の核タンパク質の解析を行った。0.1Gy照射3時間後に細胞を回収し、細胞分画キットにより核タンパク質を抽出した後、等電点電気

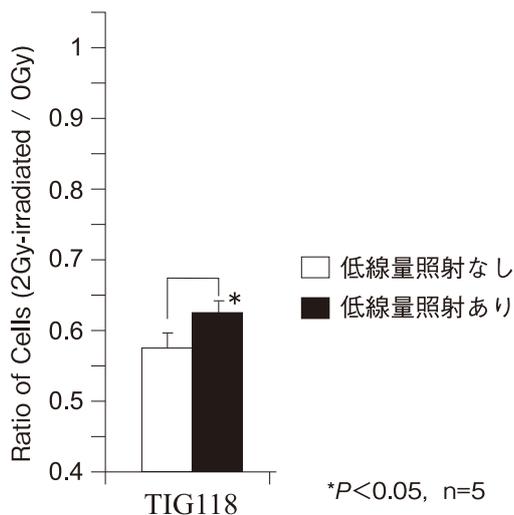


図1 皮膚線維芽細胞における適応応答

皮膚線維芽細胞である TIG-118 にあらかじめ 0.1Gy 照射し、3 時間後に 2Gy 照射して、2 日間培養後の細胞数を計測した。あらかじめ 0.1Gy 照射をした細胞としない細胞で、それぞれ 2Gy 照射による細胞増殖阻害を計算した。あらかじめ低線量照射を行ったものの方が、2Gy 照射による細胞数の低下が少なく、増殖阻害が軽減されていることが示された。

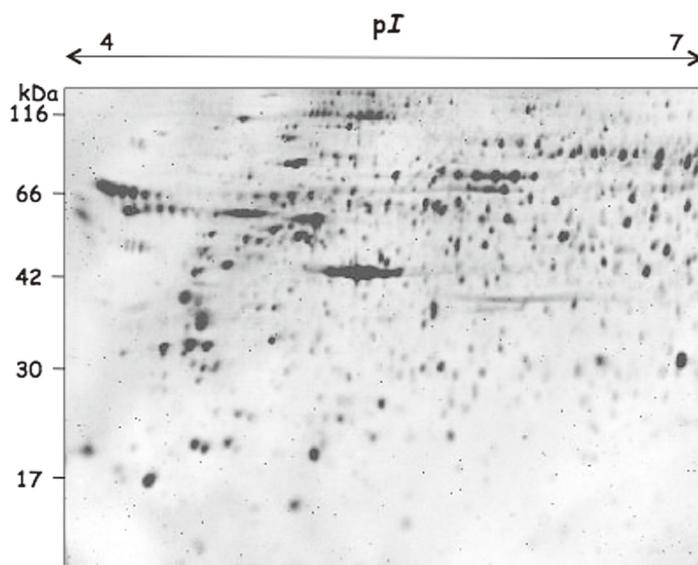


図2 皮膚線維芽細胞の核画分タンパク質の二次元電気泳動像 (0.1Gy 照射 3 時間後)

TIG-118 に 0.1Gy 照射し、3 時間後に細胞を回収して細胞分画を行った。核画分を分取してタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。

泳動と SDS-PAGE を行った。図 2 に 0.1Gy 照射 3 時間後の核タンパク質の二次元電気泳動像を示す。低線量照射を行った細胞と行わない細胞について、得られた 2-D 画像を PDQuest (Bio-Rad) を用いて解析し、低線量照射により核内の発現が変動するタンパク質を探索した。その結果、0.1Gy 照射によって増加するスポットを 18 スポット、減少するスポットを 8 スポット検出した。これらのタンパク質スポットについて MALDI-TOF/MS を用いたペプチドマスマスフィンガープリンティングにより同定を行い、放射線適応応答との関連性について検討している。

#### 4. 考 察

低刺激のストレスによって引き起こされる防御応答の一つである適応応答は、今まで様々な生物で観察されてきた。ほ乳類細胞で初めて放射線適応応答を報告したのは 1984 年 Olivieri らである<sup>1)</sup>。彼らがヒトのリンパ球における放射線適応応答を報告して以来、低線量放射線による適応応答は様々な実験系で様々な指標を用いて行われてきた。我々の実験系でも、若齢ラットから初代培養したアストロサイトにおいて、細胞増殖阻害を指標とした放射線適応応答が起きることを報告している<sup>5)</sup>。今回の皮膚由来線維芽細胞を用いた実験により、比較的 PDL の若い皮膚線維芽細胞では、放射線適応応答が起きることが明らかになった。そこで、放射線適応応答の分子機構について考察した。まず、あらかじめ低線量照射による軽度の傷害 (DNA

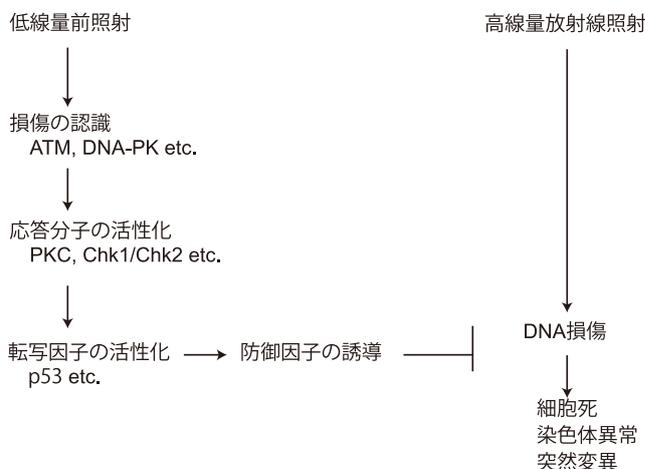


図3 放射線適応応答のメカニズム

二本鎖切断や膜構造の変化など) をセンサー分子が認識し、次にシグナル伝達分子が活性化して情報を伝達した後、最後に DNA 修復酵素やストレス防御因子などの防御能を持ったタンパク質が合成されると考えられる (図 3)<sup>2)</sup>。

あらかじめ低線量照射と高線量の追加照射の間の間隔に最適時間が存在するのは、この反応にかかる時間であると考えられるので、本実験系で適応応答が引き起こされる低線量照射後 3 時間後に細胞を回収し、この時核内において発現変動するタンパク質をプロテオーム解析により調べた。これらのタンパク質は、放射線適応応答において防御因子の誘導に関与するタンパク質である可能性があると考

えられる。今後、これらのタンパク質とその適応応答における役割を明らかにし、適応応答を活性化する因子の発見に繋げたい。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より御礼申し上げます。

#### (参考文献)

- 1) Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S.: Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* **223**:594-597; 1984.
- 2) Miura, Y.: Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res (Tokyo)* **45**:357-372; 2004.
- 3) Miura, Y., Endo, T.: Survival responses to oxidative stress and aging. *Geriatr. Gerontol. Int.* **10**:S1-S10; 2010.
- 4) Miura, Y., Kano, M., Abe, K., et al.: Age-dependent variations of cell response to oxidative stress: proteomic approach to protein expression and phosphorylation. *Electrophoresis* **26**:2786-2796; 2005.
- 5) Miura, Y.: Proteomic approach for biomarker discovery in radioadaptive responses -Age-dependent variations of cell response to low-dose radiation- *Biol. Sci. Space* **23**:17-22; 2009.