

## 放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

### 「線量・線量率効果係数」 DDREF=2 の妥当性の検討

#### 放射線感受性の個人差の課題の検討

小林純也（国際医療福祉大学・教授）

#### 研究要旨

放射線は DNA 損傷と活性酸素種（ROS）蓄積による酸化ストレスをともに誘発し、高線量照射ではゲノム DNA への DNA 損傷の誘発が放射線細胞影響の多くを占めると考えられる。一方、低線量（率）放射線ではこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかでない。本研究では放射線障害・影響が蓄積されると考えられる放射線高感受性ヒト遺伝子欠損細胞を用いて、低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系を確立することを目的としている。今年度の研究ではヒト正常繊維芽細胞における低線量率照射時の ROS 蓄積とミトコンドリア機能との関係を明らかにするとともに、ヒト血管内皮細胞において、昨年度までの研究で明らかとした指標候補である  $\gamma$ -H2AX 陽性微小核の形成機構について検討した。その結果、繊維芽細胞に対する低線量率ガンマ線照射がミトコンドリア融合制御因子の発現低下を介してマイトファジー不全とし、その結果 ROS の蓄積につながっていることを明らかにした。また、血管内皮細胞における発現タンパク質を DIA プロテオーム法で網羅的に解析した結果、低線量率ガンマ線照射により、微小核形成抑制に関与する複数種のタンパク質が減少していることを明らかにするとともに、低線量率照射特異的に増加する 32 種類のタンパク質を同定した。これらの結果から、昨年度までの研究で明らかとした  $\gamma$ -H2AX 陽性 H2AX とともに、繊維芽細胞において発現低下したミトコンドリア融合制御因子・マイトファジー制御因子、血管内皮細胞において低線量率照射特異的に増加する 32 種類のタンパク質は低線量率放射線影響の検出、線量率効果を検討する上で有力な指標候補となりうることを明らかとした。

**キーワード：** 活性酸素、酸化ストレス、ミトコンドリア、放射線高感受性、ATM

#### 研究協力者

なし

#### I. 研究目的

医療被ばく、職業被ばく、原発事故では、低線量放射線による放射線の晩発性の身体的影響である発がんが懸念されている。しかし、低線量・低線量率の放射線影響については未解明な部分

が多く、その評価の元となるデータ自体が乏しいのが現状である。放射線は DNA 損傷と活性酸素種（ROS）蓄積による酸化ストレスをともに誘発するが、低線量（率）放射線生体影響におけるこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかとされていない。本研究では、放射線高感受性のヒト遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線影響が蓄積される条件化で、低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系を確立する。影響評価の指標としては、活性酸素の発生源であるミトコンドリアを対象とし、従来指標である微小核形成とも比較することにより、DDREF=2 の妥当性を再評価できる放射線影響評価法を確立する。さらに、酸化ストレスによるミトコンドリア機能異常の放射線発がんへの寄与についても明らかにすることを目的とする。

今年度の研究ではヒト正常繊維芽細胞における低線量率ガンマ線照射時の ROS 蓄積とミトコンドリア機能との関係を検討するとともに、ヒト繊維芽細胞よりも酸化ストレスに感受性と考えられるヒト血管内皮細胞において、昨年度までの研究で明らかとした指標候補である  $\gamma$ H2AX 陽性微小核の形成機構を DIA プロテオーム解析を用いて検討し、低線量率放射線影響における酸化ストレス応答の機構、及び線量率効果解析に適した材料・指標の候補を明らかにする。

## II. 研究方法

### 1. 細胞と培養条件

ヒト毛細血管拡張性運動失調症由来繊維芽細胞を SV40 ウイルスで不死化した ATM 欠損細胞 (AT5VIBA) および ATM cDNA 導入相補した細胞 (AT5VIBA/ATM-wt)、ナイミーヘン症候群患者由来 NBS1 欠損細胞 (GM7166 : 同様に SV40 で不死化) と NBS1 cDNA 導入した相補細胞 (GM7166/NBS1-wt)、正常人由来繊維芽細胞 48BR (テロメラーゼ導入して不死化した細胞)、及びヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞は、100 mm プラスティックディッシュ内で 10%ウシ胎児血清 (ギブコ) と抗生物質を添加した培養液 (DMEM:ギブコ) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養した<sup>1,2)</sup>。また、ヒト胎児臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUE-101) はコラーゲン I コート 60mm ディッシュ (イワキ) 内で、HuMedia-EG2 培地 (クラボウ) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養した<sup>3)</sup>。分裂寿命があるため、40PDL (population doubling time) 未満の継代数の細胞のみを実験に用いた。

### 2. ガンマ線照射

細胞へのガンマ線の高線量率急照射は Gammacell 40Ex (MDS Nordion 社 : 線量率 0.9 Gy/min) を用いて室温で行った。低線量率緩照射は低線量長期放射線照射装置 (産業科学 : 線量率 1 Gy/day) を用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に細胞を播種したディッシュを静置して行った。両方の装置とも照射線源は <sup>137</sup>Cs であり、累積線量は 2.5 Gy として行った。

### 3. ウェスタンブロット法

ガンマ線照射を行った後、細胞はトリプシン処理で剥離して回収し、PBS で一度洗浄を行った。回収した細胞は RIPA 液 (10 mM Tri-HCl/pH7.5, 1% NP-40, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA) でタンパク質成分を可溶化し、遠心して上清として回収した。回収した溶液はタンパク質濃度を定量し、各サンプルそれぞれ、50  $\mu$ g を SDS-PAGE 電気泳動を行った。泳動分離されたタンパク質はセミドライ式エレクトロブロット装置 (アトー) で PVDF 膜 (イモビロン: ミリポア) に転写した後、転写された PVDF 膜は、ブロッキング溶液 (5%Skim milk/TBS-T) 内で 1 時間浸透した。次に、TBS-T 適当な濃度に希釈した一次抗体液に一晩反応させ、その後、TBS-T 液で洗浄を行った。さらに、1%BSA/TBS-T で適当な濃度に希釈した horseradish peroxidase 標識した二次抗体 (GE ヘルスケア) に 1 時間反応させた後、TBS-T で洗浄した。その後、目的とするたんぱく質のバンドは、ECL-prime (GE ヘルスケア) を用いて発行させ、X 線フィルムに露光することによって検出した。

\* ウェスタンブロット法に用いた抗体は以下の通りである。

抗 MFN1 抗体 (Proteintech)、抗 MFN2 抗体 (Proteintech)、抗 OPA1 抗体 (Santa Cruz)、抗 MFF 抗体 (Proteintech)、抗 LC3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗  $\beta$  actin 抗体 (シグマ)、抗 PINK1 抗体 (Novus Biologicals)、抗 Parkin 抗体 (Proteintech)、抗 p62 抗体 (Proteintech)、抗 pKAP1 抗体 (Bethyl)、抗 KAP1 抗体 (GeneTex)

#### 4. 免疫蛍光染色法

100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス (マツナミ) 上に  $1.0 \times 10^5$  個の細胞を播種し、インキュベーター内で一晩培養してから、ガンマ線照射を行った (ATM 阻害剤添加群は同時に阻害剤 [10  $\mu$ M] を添加した)。細胞固定の 30 分前 (照射終了 6 時間後) に MitoTracker Red を 5  $\mu$ l 添加して、インキュベーター内で静置した。スライドガラスは冷 PBS で洗浄し、冷メタノールに浸し氷温で 20 分間固定、さらに冷 PBS で洗浄後、0.5% Triton X-100/PBS に浸し氷上で 10 分処理を行い、冷 PBS で洗浄した。続いて、5%BSA/PBS に室温で 20 分間反応させ、PBS で一度洗浄後、PBS で 1000 倍に希釈した抗  $\gamma$ H2AX 抗体 (ミリポア) に 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1.0% BSA/PBS で 1000 倍に希釈した二次抗体 (Alexa488 標識 mouse IgG 抗体: Molecular Probe) 溶液に 1 時間反応させた。PBS 洗浄後、DAPI 入りの封入剤を滴下し、カバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡 (ライカ社) で観察し、画像データを取得した。

#### 5. 活性酸素種、活性窒素種の染色法

100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス (マツナミ) 上に  $1.0 \times 10^5$  個の細胞を播種し、インキュベーター内で一晩培養してから、ガンマ線照射を行った後に、ROS 総量染色には dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を、Superoxide 及び RNS 染色には ROS/RNS Detection Kit (Enzo Life Sciences) 内の特異的染色液を培地に添加し 15 分間後に PBS でスライドガラスを洗浄後、カバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡 (ライカ社) で観察し、画像データを取得した。

## 6. DIA プロテオーム解析

血管内皮細胞は高線量率あるいは低線量率ガンマ線照射終了 30 分後に回収し、PBS で洗浄した後、細胞のみ液体窒素で急速冷凍した。同様に凍結した非照射細胞とともに、株式会社かずさゲノムテクノロジーズに送付して、DIA プロテオーム解析を行った。解析結果については同定タンパク質名とその相対発現量のリストとして提供された。

（倫理面への配慮）

本申請研究では基礎研究目的として樹立され、学術雑誌<sup>1-3)</sup>に報告済みのヒト培養細胞のみを用いるため、倫理委員会の審査は必要としない。また、本分担研究では動物実験を行う予定は無い。

## III. 研究結果

### 1. ミトコンドリア融合・分裂制御因子への影響の検討

これまでの解析から、低線量率ガンマ線照射は細胞内酸化ストレスの蓄積、ミトコンドリア動態の変化が顕著に認められ、ヒト正常細胞では特に顕著であった。ミトコンドリアは細胞内で最大の ROS/酸化ストレス発生器官であることから、低線量率照射ではミトコンドリアの機能不全が、酸化ストレスの蓄積につながっている可能性が示唆された。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返しながら、損傷ミトコンドリアをマイトファジー（オートファジーの一種）で排除して機能維持をしており、融合・分裂サイクルの異常が機能不全につながると考えられている<sup>4)</sup>。それゆえ、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響を検討した。

最初にヒト正常 48BR 細胞及びがん細胞 HeLa で ROS 総量 (total ROS)、ミトコンドリア性 ROS (superoxide)、活性窒素種 (RNS) のガンマ線照射後の細胞内蓄積を特異的色素を用いて検討すると (図 III-1)、正常細胞では total ROS 及び superoxide が低線量率照射時で非照射時と比べて、有意に増加していたが、高線量率照射では増加していなかった。しかし、RNS は低線量率、高線量率の両方の照射で増加していた。一方、HeLa 細胞では高線量率、低線量率にかかわらず、照射後にこれらの増加は認められなかった。つまり、ヒト正常細胞では低線量率照射により損傷したミトコンドリアからミトコンドリア性 ROS である superoxide が漏えい、蓄積すると示唆される。

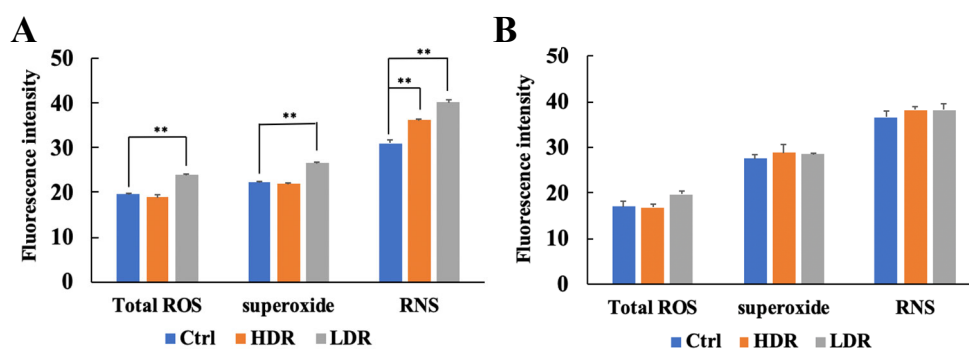


図 III-1 ガンマ線照射における ROS, RNS 蓄積

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、特異的色素で細胞染色して、ROS, superoxide, RNS の蓄積を検討した (A: 48BR 細胞 ; B: HeLa 細胞)。Ctrl : 非照射  
 \*\* p<0.01

次に、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響をウェスタンブロット法で検討すると (図III-2)、ミトコンドリア融合制御因子である MFN1 および MFN2 は低線量率照射後では非照射細胞と比べて、有意な減少が見られ、その低下は照射 24 時間後でも認められたが (図III-2BC)、高線量率照射時には見られなかった。また、別の融合制御因子 OPA1 も低線量率照射終了直後から顕著に低下し、その低下は 24 時間後まで持続していた (図III-2A)。一方、分裂制御因子 MFF は低線量率照射でも明確な差は認められなかった。これらの結果は、低線量率照射はミトコンドリア融合制御因子の発現に影響を及ぼすことにより、ミトコンドリアの機能維持に影響している可能性が示唆される。

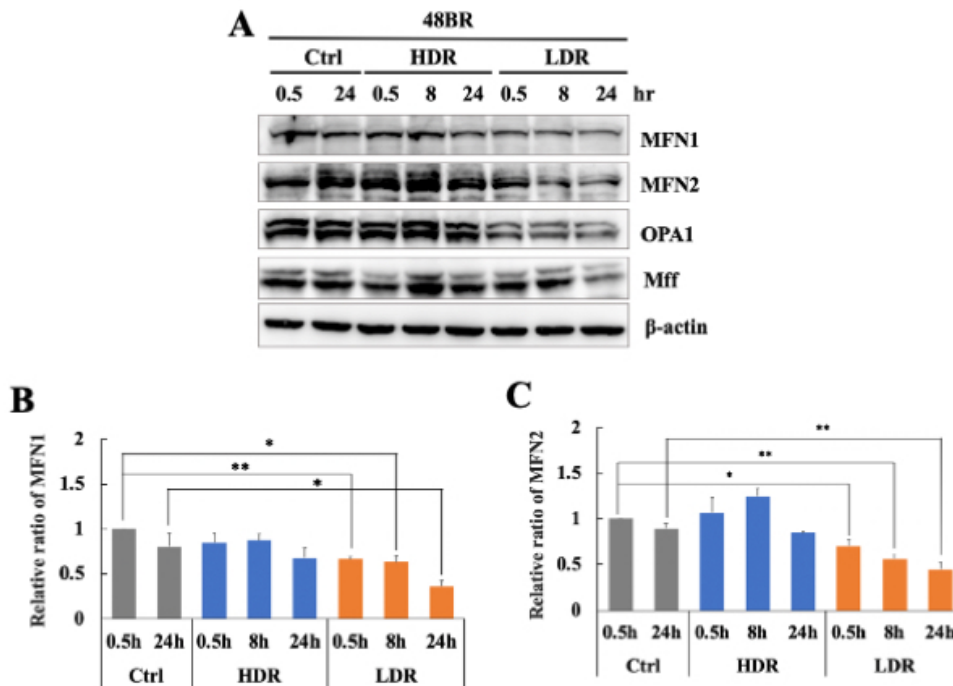


図 III-2 48BR 細胞におけるミトコンドリア融合・分裂因子の発現

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。MFN1 (B)、MFN2 (C)は(A)を含む 3 回の実験データで統計解析を行った結果である (\* p<0.05; \*\* p<0.01)。

2. ミトファジーへの影響の検討

損傷ミトコンドリアから継続的に ROS 漏えいを防ぐために損傷ミトコンドリアの排除機構として細胞にはマイトファジー (オートファジーの一種) が備わっており、この制御にミトコンドリア分裂・融合因子がかかっているが、図 III-2 で示したように低線量率照射後にはミトコンド

リア融合タンパク質が低下することが示された。このような低下はミトファジー制御に異常が生じていると考えられたことから、ミトファジー制御因子 (PINK1, Parkin) についてウェスタンブロット法で検討した (図 III-3)。ミトファジー制御因子のうち PINK1 は高線量率照射後に有意に増加しており、ミトファジーが活性化していると考えられるが、低線量率照射後は非照射細胞とほぼ増減が無く、ミトファジーは誘導されていないと考えられる。

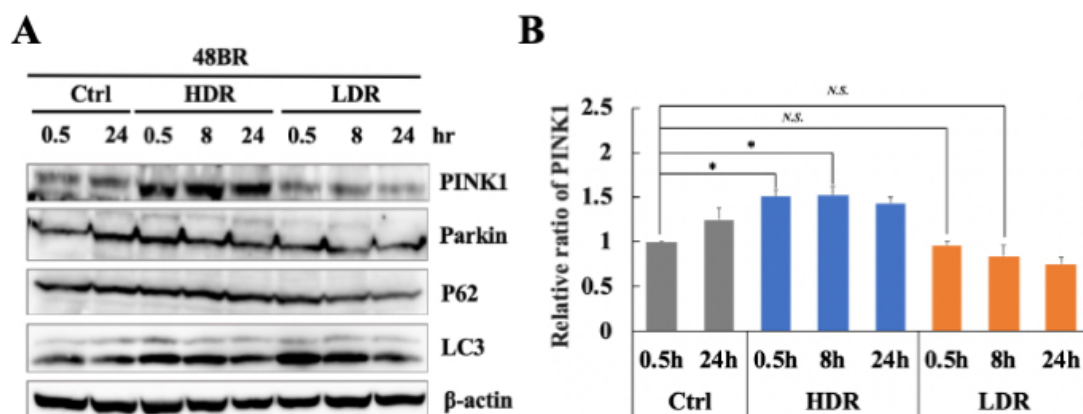


図 III-3 48BR 細胞におけるミトファジー因子の発現

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。(B) PINK1 について、(A) を含む 3 回の実験データで統計解析を行った結果である (\*  $p < 0.05$ ; N.S. 有意差無)。

毛細血管運動性失調症原因遺伝子 *ATM* の遺伝子産物 ATM はタンパク質リン酸化酵素として、DNA 二本鎖切断損傷で活性化されるとともに、ROS などで酸化ストレス蓄積時に活性化することが知られている<sup>5)</sup>。昨年までの検討から ATM の阻害は低線量率照射時に  $\gamma$ H2AX 微小核形成を顕著に誘導することを明らかにしており、ミトファジー機構を通して ATM が低線量率照射時に発生するミトコンドリア性 ROS の漏えい抑制に関与する可能性が考えられる。それゆえ、ATM 阻害剤添加によるミトファジー制御因子への影響を検討すると (図 III-4)、高線量率照射時にみられる PINK1 の増加が、ATM 阻害剤添加で見られなくなった。この結果から、高線量率照射におけるミトファジー活性化には ATM が関与することが示唆される。

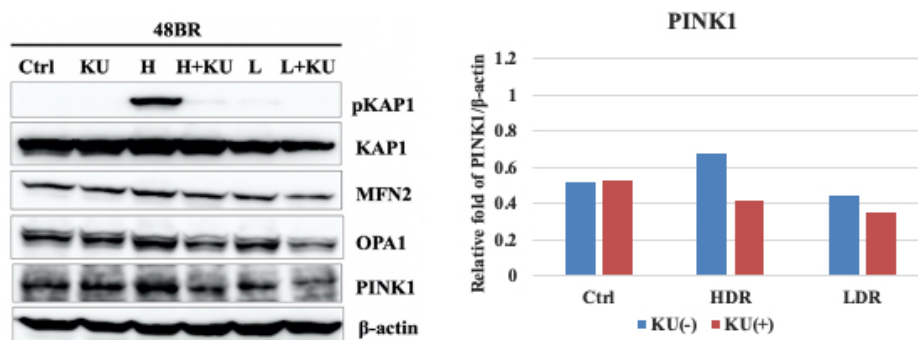


図 III-4 48BR 細胞における ATM 阻害時のミトファジー因子の影響



高線量率（H）あるいは低線量率（L）ガンマ線、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。KU: ATM 阻害剤 KU55937 添加

### 3. 血管内皮細胞における微小核形成誘導機構の検討

昨年度までの解析から、低線量率ガンマ線照射では $\gamma$ H2AX 陽性微小核形成が誘導され、特に血管内皮細胞では顕著に認められた。 $\gamma$ H2AX 陽性微小核は DNA 二本鎖切断損傷が含まれると考えられ、ゲノム DNA の損傷に起因して発生し、ゲノム不安定化による発がんや cGAS を介した炎症応答の活性化による細胞機能低下・細胞老化にもつながる可能性がある<sup>6)</sup>。それゆえ、血管内皮細胞での $\gamma$ H2AX 陽性微小核の形成機構の解明を目的とし、発現タンパク質の網羅的解析を DIA (Data independent acquisition) プロテオーム法を用いて行い、非照射細胞と比べて発現量が顕著に変化するタンパク質の同定を試みた。従来の DDA (data-dependent acquisition) 法によるプロテオーム解析では発現量の低いタンパク質を同定する検出感度は無く、原理上、定量解析が行えないが、今回 DIA 法で検討した結果、6500 種類あまりのタンパク質の同定に成功した。それらの中で、131 種類のタンパク質は非照射と比べて低線量率照射時に 2 倍以上に増加し、増殖因子シグナル伝達、炎症応答、酸化ストレス応答、p53 関連のタンパク質が含まれていた。一方、低線量率照射で二分の一以下に低下するタンパク質は 145 種類同定し、DNA 複製、ヒストン・クロマチン、M 期制御にかかわる因子が含まれていた。さらにこの 145 種類のうち 85 種類のタンパク質は高線量率照射では変動せず、低線量率照射でのみ顕著な低下をしていたが、Cystoscape 3.8/string APP 解析を行うと、明白なクラスターを形成し、このクラスター内には KIFC1, KIF20A, KIF14, KIF15, KIAA0101 など、微小核形成制御への関与が示唆される因子が含まれていた (図 III-5)。一方、低線量率照射でのみ増加する因子は 32 個同定されたが、明確なクラスターの形成がみられなかった。

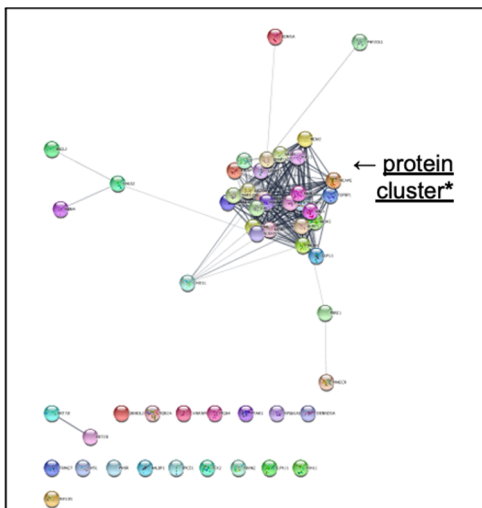


図 III-5 低線量率照射特異的に減少するタンパク質のクラスター形成

血管内皮細胞において低線量率照射特異的に減少するタンパク質 85 種類について、Cystoscape 3.8/string APP で解析を行った。

## IV. 考察

本研究では、放射線高感受性を示すヒト遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線障害が蓄積される条件化で、活性酸素の発生源であるミトコンドリアを主な指標対象として、DDREF=2 の妥

当性の再評価に利用できる低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系の確立をめざし、本年度研究ではヒト正常繊維芽細胞における低線量率照射時の ROS 蓄積とミトコンドリア機能との関係を明らかにするとともに、ヒト繊維芽細胞よりも酸化ストレスに感受性と考えられるヒト血管内皮細胞において、 $\gamma$ H2AX 陽性微小核形成機構の検討を行った。

細胞内の ROS の最大の発生器官はミトコンドリアであり、昨年度研究から低線量率放射線照射により ROS の蓄積と並行してミトコンドリアの動態変化が起こることを明らかとしてきた。ミトコンドリアは ROS 発生器官であるため、常に損傷が発生しており、損傷したミトコンドリアはミトコンドリア同士の融合と分離のサイクルを繰り返す過程でミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジーを活性化して、損傷ミトコンドリアを除去していると考えられる<sup>4)</sup>。図Ⅲ-2 が示すとおり、低線量率ガンマ線照射によりミトコンドリア融合制御因子の発現が顕著に低下するとともに、マイトファジー制御因子 PINK1 は誘導されなかった。一方、高線量率照射ではミトコンドリア融合制御因子は非照射時と同様に発現し、PINK1 が照射に伴い顕著に増加することからマイトファジーが活性化し、損傷ミトコンドリアが正常に排除されていると考えられる。図Ⅲ-1 に示されるとおり、低線量率照射ではミトコンドリア性 ROS である superoxide の蓄積が増加するが、高線量率照射では増加していないことから、高線量率照射ではマイトファジーが活性化して損傷したミトコンドリアが除去されることにより ROS の蓄積が起らないが、低線量率照射ではミトコンドリア融合制御因子の減少でマイトファジー不全となって損傷ミトコンドリアが残存し、ROS の蓄積につながっていると考えられる。ATM は昨年度までの解析から微小核形成の抑制に機能すると考えられるが、今回マイトファジーの制御にかかわる可能性も示唆されており、低線量率放射線被ばく時の生体影響を考える上で、ATM のマイトファジーにおける機能を明らかにすることは重要と考えられる。

血管内皮細胞は生体内では酸素を多く含む血液に常に触れており、他の組織の細胞と比較して、酸化ストレス応答が亢進していることが考えられ、低線量率放射線影響を検出する上で、有望な生体材料と考えられる。昨年度までの解析で低線量率ガンマ線照射により  $\gamma$ H2AX 陽性微小核の形成が誘発され、低線量率放射線被ばくに対する有力な指標となると考えられた。本年度の研究では、その微小核形成機構を解明するために、DIA プロテオーム法を用いて発現タンパク質の網羅的解析を試み、低線量率照射時にのみ、顕著に減少する 85 種類のタンパク質を同定し、これらの中には微小核形成にかかわる複数のタンパク質が含まれていた。さらに、低線量率照射でのみ発現上昇する 32 種類のタンパク質も同定した。これらのタンパク質が低線量率放射線被ばくによる生体影響に関係するかは、これら個々の役割の解明が必要であるが、これら因子は血管内皮細胞において、低線量率放射線長期被ばくの細胞影響を高感度に検出するための指標となりうる可能性があり、線量率効果の検討への活用も考えられる。

## V. 結論

ヒト正常繊維芽細胞では高線量率放射線被ばく時には損傷したミトコンドリアがマイトファジー機構で除去され、損傷ミトコンドリアからの ROS の漏れいには至らないが、低線量率放射線長期被ばくではミトコンドリア融合タンパク質の低下によりマイトファジーが誘導されず、損傷ミ



トコンドリアが残存して ROS を漏えいし続け、細胞内に過度な蓄積を引き起こし、微小核形成につながる可能性がある。血管内皮細胞では低線量率放射線照射により、 $\gamma$ H2AX 陽性微小核形成制御にかかわる一群のタンパク質が低下して、微小核が誘発されると考えられる。それゆえ、 $\gamma$ H2AX 陽性微小核、ミトコンドリア融合タンパク質、マイトファジー制御因子、さらに血管内皮細胞で低線量率照射特異的に上昇する 32 種類のタンパク質は、低線量率放射線長期被ばくの細胞影響の高感度に検出、線量率効果の再検討において、有力な指標になり得ると考えられる。

## VI. 次年度以降の計画

これまでの研究で同定した指標候補について、異なる線量率を用いて、線量率の違いとの相関を検討する。血管内皮細胞で同定した 32 種類のタンパク質の低線量率放射線被ばくにおける細胞影響への関与を検討する。また、これまでの研究で個人差への作用因子である ATM を特異的に阻害した時のこれら指標候補への効果も検討し、これらが DDREF 算定に影響しうる個人差要因の指標となり得るかを検討する。

## VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

### ア) 論文・雑誌等

該当なし

### イ) 学会発表等

- 1) 小林純也. 「低線量放射線の生体影響の解明」 日本歯科放射線学会第 1 回秋季学術大会・特別講演、2020 年 10 月 31 日、松本市（オンライン開催）
- 2) 小林純也. 低線量放射線影響研究と放射線生物学教育. 放射線生物学東京談話会（東京 RBC）、2021 年 2 月 13 日、東京（オンライン開催）

### ウ) 書籍・総説

- 1) 「低線量リスクに関するコンセンサスと課題」（第 1 章 DNA・細胞レベルで起きること、執筆担当、p105-114）日本保健物理学会・日本放射線影響学会 低線量リスク委員会（甲斐 倫明、今岡 達彦、小笹 晃太郎、児玉 靖司、小林 純也、小村 潤一郎、酒井 一夫、佐々木 道也、島田 義也、田内 広、高原 省五、富田 雅典、吉永 信治）。放射線生物研究 55 巻第 2 号（特別号）、2020。

### エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

該当なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

1) 環境省・放射線健康管理・健康不安対策事業「長期的視点に立った放射線に関する科学リテラシー涵養とリスクコミュニケーション人材育成のための小中学校における「目で見る」放射線科学教育の実践研究」・放射線科学セミナー「放射線について」（小林純也講師）、郡山市立湖南小中学校（オンライン開催）、令和 3 年 2 月 16 日

## VIII. 引用文献

- 1) Sakamoto S Iijima K Mochizuki D, et al. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene*2007; 26: 6002-6009.
- 2) Zhou H Kawamura K Yanagihara H, et al. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms; ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50 and cell cycle dependent-degradation of protein. *J Radiat Res* 2017; 58: 487-494.
- 3) 阿武久美子. 血管内皮細胞の培養. 広島大学技術センター報告集 2004; 第 1 号:72-75.
- 4) Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* 2017; 11:637-645.
- 5) Guo Z Kozlov S Lavin MF, et al. ATM activation by oxidative stress. *Science* 2010; 330: 517-521.
- 6) Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* 2017;548:466-470.

# Relationship between radiosensitivity and genetic individual difference

Junya Kobayashi

*International University of Health and Welfare • Professor*

**Key word:** ROS, oxidative Stress, mitochondria, radiosensitivity, ATM

## **Abstract**

Exposure to ionizing radiation causes both DNA damage and oxidative stress induced by excess accumulation of ROS (reactive oxidative species). In the case of acute radiation, the biological effects of radiation are most induced by generation of genomic DNA damage, while it is unknown about the contribution between DNA damage and oxidative stress to the biological effects by low dose (rate) radiation. In this project, we attempt to develop hypersensitive detection system of the effect by low dose (rate) radiation using radiation hypersensitive genetic disorders. And, we investigated whether low dose rate irradiation to human normal fibroblast influences expression of mitochondria-related factors and amplifies oxidative stress. We also investigated the effect in human vascular endothelial cells. Mitochondria function is maintained by its fusion/fission cycle, related with mitophagy. Low dose rate irradiation by gamma-ray decreased some regulatory factors for mitochondria fusion. Although high dose rate irradiation increased mitophagy regulatory factor, which leads to mitophagy activation, low dose rate irradiation did not. Probably, the defect of mitophagy under low dose rate irradiation might lead to accumulate ROS from damaged mitochondria. We previously found that human vascular endothelial cells showed formation of gammaH2AX-positive micronuclei under low dose rate irradiation, and clarified several kinds of protein related with regulation of micronuclei formation with DIA proteome analysis in this year. DIA proteome analysis also identified 32 proteins which increased in response to low dose rate IR. Taken together, such our identifying factors might be useful marker to reconsider DDREF.