



Title	放射線誘導アポトーシスにおけるサバイビンの役割とレドックス制御
Author(s)	小倉, 亜希
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第9039号
Issue Date	2009-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k9039
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/38129">http://hdl.handle.net/2115/38129</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	ogura.pdf



[Instructions for use](#)

放射線誘導アポトーシスにおけるサバイビンの  
役割とレドックス制御

小倉 亜希

## <目次>

目次	1
略語一覧	3
緒言	5
第一章：腫瘍細胞の抗アポトーシス因子サバイビンを標的とした 放射線増感作用とそのメカニズムの解析	
1. 序論	10
2. 材料と方法	14
3. 結果	
3-1. ヒト肺腺癌由来 A549 細胞における X 線照射の影響	19
3-2. アデノウイルスベクターをトランスダクションした腫瘍細胞における サバイビンの発現	20
3-3. 変異サバイビンを過剰発現させた腫瘍細胞における X 線誘導 アポトーシスの検出	20
3-4. 変異サバイビンのリン酸化能と Smac/DIABLO との結合能の解析	21
4. 考察	27
5. 小括	30
第二章：放射線誘導アポトーシス経路におけるチトクロム c 遊離の レドックス制御	

1. 序論	31
2. 材料と方法	33
3. 結果	
3-1. X線に誘導されるミトコンドリアからのシトクロム <i>c</i> 遊離および カスパーゼ活性化に対する抗酸化剤 N-acetyl-L-cystein (NAC)の効果	37
3-2. 細胞内およびミトコンドリアでの ROS 産生に対する X 線の効果	37
3-3. A549 細胞から単離したミトコンドリアにおける NADH/succinate 依存的 スーパーオキシド(O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )生成に対する X 線の効果	38
3-4. X線照射によるミトコンドリアの形態と膜電位( $\Delta\psi_m$ )の変化	40
3-5. X線照射による酸素消費量の変化	41
3-6. X線に誘導される Bcl-2 ファミリーの発現に対する NAC の効果	42
4. 考察	51
5. 小括	55
総括	56
謝辞	58
引用文献	59
英文抄録	66

<略語一覧>

- Apaf-1 : apoptotic protease-activating factor-1
- Bax : Bcl-2 associated x protein
- BIR : Baculovirus IAP repeat
- CDC2 : cell division cycle 2
- CYPMPO : 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide
- DCFDA : 2',7'-dichlorofluorescein diacetate
- DiOC<sub>6</sub>(3) : 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodine
- DNA : deoxyribonucleic acid
- DPI : diphenylene iodonium
- EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid
- ESR : electron spin resonance
- FITC : fluorescein isothiocyanate
- Hfsc : hyperfine splitting constants
- IAP : inhibitor of apoptosis protein
- LiNc-BuO : lithium 5,9,14,18,23,27,32,36-octa-n-butoxy-2,3-naphthalocyanine
- NAC : N-acetyl-L-cystein
- NOX : NADPH oxidase
- PBS : phosphate-buffered saline
- PI : propidium iodide
- PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride
- RNA : ribonucleic acid
- ROS : reactive oxygen species
- RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction

- SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
- Smac/DIABLO : second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI
- SOD : superoxide dismutase
- S-PBN : N-tert-butyl- $\alpha$ -(2-sulfohenyl)-nitron
- Trolox : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

## <緒言>

放射線の生体に対する標的は DNA であり、放射線が DNA を直接イオン化して損傷を誘導する直接作用ならびに水分子のイオン化により生じた活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) を介した間接作用により DNA 損傷を引き起こすと考えられている。DNA 損傷を受けた細胞は細胞周期を一時的に停止させて様々な修復酵素による DNA 修復作業が行われるが、修復できずに残った損傷を持つ細胞はネクローシス (壊死) あるいはシグナル伝達を介したアポトーシスによる細胞死に陥る。アポトーシス (プログラム細胞死) は遺伝的に制御された細胞の自殺であり、生体の正常な発育、ホメオスタシスの維持、不必要な細胞の排除において重要な役割を果たしている。そのため、アポトーシス抑制が起こると癌化へつながることから、その機構解明は非常に重要である。一方、癌細胞のアポトーシス誘導を増強することが、近年、癌治療の 1 つの戦略となっている。

アポトーシスには二つの経路が存在し<sup>1)</sup>、一つ目はミトコンドリアを中心とした内因性経路、二つ目は細胞膜上のデスレセプターを中心とした外因性経路である (図 1)。放射線や制癌剤のような遺伝子に損傷を与える処置 (genotoxic agents) は主に内因性経路を活性化することが知られているが<sup>1)</sup>、放射線照射でデスレセプターの発現が上昇するなど外因性経路が関与する場合もあることが報告されている<sup>2)</sup>。内因性経路ではミトコンドリアが重要な役割を果たしており、DNA 損傷に誘発されて内膜と外膜の膜間に存在するシトクロム *c*<sup>3)</sup> や Smac/DIABLO<sup>4)</sup> などのアポトーシス促進タンパク質が細胞質に放出される (図 1)。漏出したシトクロム *c* は dATP、カスパーゼ 9 と複合体を形成し、カスパーゼ 3 の活性化を経てアポトーシスが実行される。また、Smac/DIABLO はカスパーゼを阻害している Inhibitor of apoptosis protein (IAP) ファミリータンパク質を抑

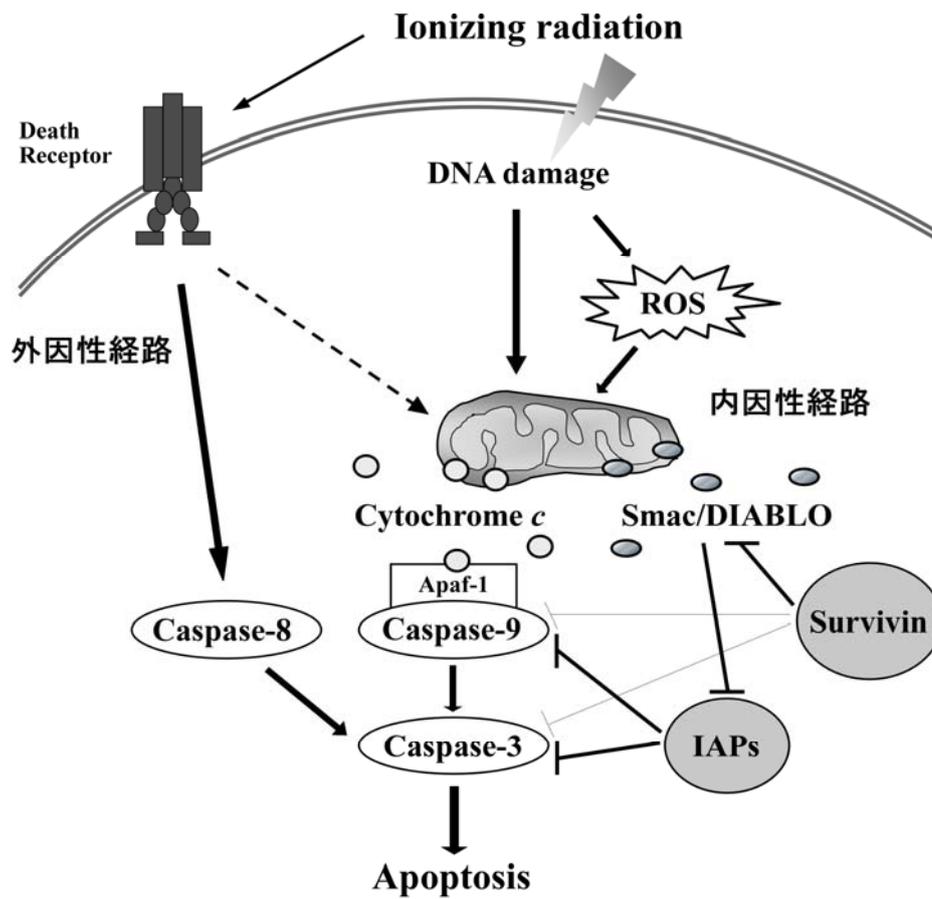


図1. 放射線が誘導するアポトーシスの内因性経路および外因性経路

制することでアポトーシス促進に寄与している<sup>4)</sup>。しかしながら、末梢リンパ球や白血病などの一部の造血系由来の腫瘍細胞を除き<sup>5)</sup>、多くの固形腫瘍細胞では放射線を照射しても数十時間以内の細胞周期の間期にはアポトーシスをほとんど起さない<sup>6,7)</sup>。この放射線抵抗性の一因として、腫瘍細胞内ではアポトーシスを回避するための機構が亢進していることが知られている<sup>8)</sup>。そのため、制癌剤を併用することで放射線が誘導するアポトーシスを増強させる試みが多くの研究と臨床の現場で行われている<sup>9,10)</sup>。これまで本研究室で、RNA 合成阻害を作用機序として開発された新規制癌剤エチニルシチジンが、放射線との併用によりヒト胃腺癌由来 MKN45 細胞、MKN28 細胞ならびにマウス大腸腺癌由来 colon26 細胞においてアポトーシス増強を引き起こすことを *in vitro*<sup>6)</sup>ならびに *in vivo*<sup>7)</sup>で見いだした。これらの論文の中で、エチニルシチジンによる放射線増感効果は、細胞周期関連タンパク質 CDC2、サイクリン B1、Wee1 およびアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2、サバイビンの発現抑制と関連していることを報告した。加えて、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤パーバラノール A による放射線誘導アポトーシスの増強効果においても、IAP ファミリータンパク質と Bcl-2 ファミリータンパク質のダウンレギュレーションが重要であることが示された<sup>11)</sup>。以上のことから、癌細胞の生存や抗アポトーシスに関わるタンパク質を分子標的として、効果的に放射線の細胞致死効果を増強できると考えられた。

サバイビンは IAP ファミリーに属するタンパク質であり、G2/M 期において最大の発現を示し、アポトーシス抑制と正常な有糸分裂の実行に関与している<sup>12,13,14)</sup>。正常組織ではほとんど発現が認められないのに対し、ほとんどの癌細胞で顕著に発現が増加していることから、腫瘍におけるその発現が悪性度、再発率、予後の指標として注目されている<sup>15,16)</sup>。本研究ではこのタンパク質に着目し、第一章では放射線抵抗性の固形腫瘍細胞におけるサバイビンの役割と放射線増感

の標的としての可能性を検討した。その結果、サバイピンはミトコンドリアから遊離した Smac/DIABLO の結合阻害を介して放射線誘導アポトーシスを抑制しており、アデノウイルスベクターを用いて本来の機能を失わせるような変異を導入したサバイピンタンパク質（変異サバイピン）を腫瘍細胞に過剰発現させると放射線誘導アポトーシスを増強できることが明らかになった。

一方、放射線の細胞死誘導には照射直後に発生する ROS が関与する DNA の損傷が重要であることは前述した通りであるが、照射後数分から数時間後に細胞内の酸化還元システムの関与により二次的な ROS が生じ、これらがシグナル伝達物質としてアポトーシス誘導を制御していることが近年明らかになってきた<sup>17,18)</sup>。本研究室においても、放射線照射後に抗酸化剤 Trolox<sup>19)</sup>または N-acetyl-L-cystein (NAC)<sup>2,20)</sup>を処理すると、ヒト白血病由来 Molt-4 細胞に生じた放射線誘導アポトーシスが減弱することを明らかにした。このような照射後に二次的に産生される ROS の発生源としてミトコンドリアが示唆されている<sup>17,18)</sup>。しかし、短寿命 ROS をミトコンドリア特異的に検出するのは困難であり、放射線により上昇する ROS の発生源がミトコンドリアという直接的な証明はまだなされていない。よって、第二章ではミトコンドリアからのシトクロム c 遊離に着目し、放射線誘導アポトーシスのレドックス制御について検討した。結果として、放射線によるミトコンドリアからのシトクロム c 遊離ならびにサバイピンの抑制により増強したアポトーシスは抗酸化剤の照射後処理により抑制されることが示された。さらに、ミトコンドリアの ROS に特異的な蛍光プローブと単離したミトコンドリアを用いた電子スピン共鳴(ESR)-スピントラップ法により、放射線照射によってミトコンドリアからの ROS 産生が増加する直接的な証明を試みた。

なお、本博士論文の第一章についてはすでに誌上発表し(*Cancer Letters*, 2008.

259: 71-81) 、第二章の結果については受理(*Cancer Letters*, in press)されている。

## <第一章>

### 腫瘍細胞の抗アポトーシス因子サバイビンを標的とした放射線増感作用と そのメカニズムの解析

#### 1. 序論

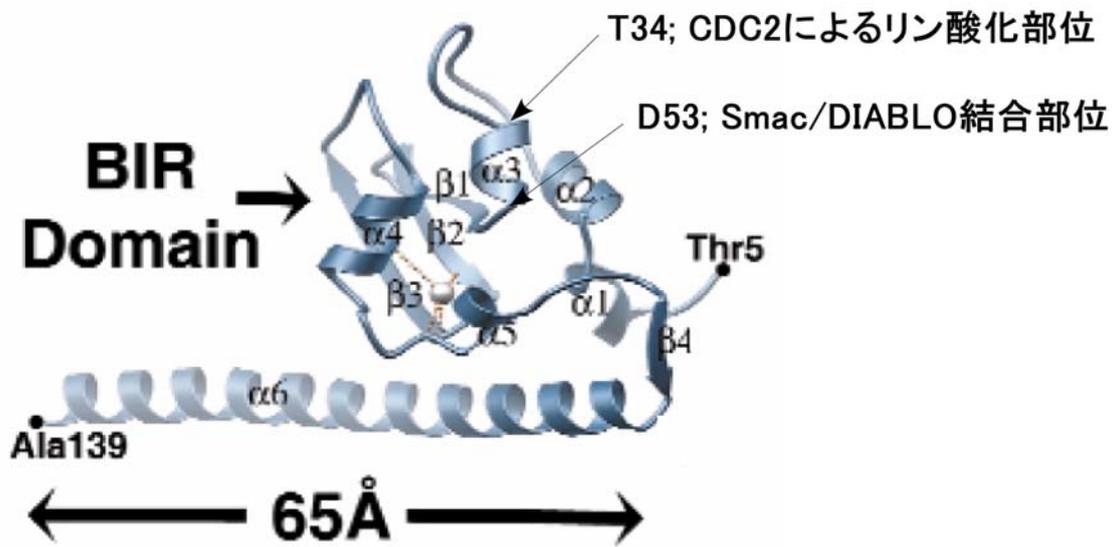
放射線と制癌剤を組み合わせる腫瘍の併用治療は、放射線抵抗性の腫瘍の治療効果を高め、それぞれの適応量と副作用を軽減できることから、現在多くの臨床現場で用いられている。それに加え、近年では個々の腫瘍の性状に合わせたテーラーメイド治療が提唱されており、腫瘍細胞の生存に関わるタンパク質を分子標的として抑制することで放射線の効果を増強させる試みがなされている<sup>8)</sup>。アポトーシス抑制活性を持ち腫瘍の生存に寄与するタンパク質は数多く存在するが、ミトコンドリアの下流で制御する因子として重要なのが inhibitor of apoptosis protein (IAP)ファミリータンパク質である<sup>21)</sup>。この IAP ファミリータンパク質は70~80アミノ酸からなる Baculovirus IAP repeat (BIR)ドメインを通じてアポトーシスの実行因子であるカスパーゼを直接阻害し、様々な刺激に誘導されるアポトーシスを抑制している(図1)。本研究では、その中のひとつであるサバイビンに分子標的として着目した。その理由としては、放射線がG2/M期において細胞周期停止を誘導する一方で、サバイビンはG2/M期に発現が最大に達するという特徴を持つため、放射線誘導アポトーシスの抑制に大きく寄与していると予想できたからである。加えて、緒言でも述べたようにサバイビンは腫瘍細胞特異的に過剰発現して放射線や制癌剤抵抗性の一因となっているため、その機能を阻害しても正常細胞への副作用を最小限に抑えられることも期待される。このように、サバイビンは放射線の効果を増強するための理想的な標的であると考えられるが、しかしながら、それについての十分な検討はまだな

れていない。

サバイビンのアポトーシス抑制メカニズムは、G2/M 期において CDC2 により 34 番目のスレオニン残基がリン酸化を受け<sup>22)</sup>、84 番目のシステイン残基を含む BIR ドメインを通して<sup>12)</sup>カスパーゼを直接阻害する<sup>23)</sup>と考えられていた。実際、サバイビンのこれらの部位を変異させたドミナントネガティブタンパク質は制癌剤によるアポトーシスを増強させることができ<sup>12,22,24)</sup>、筆者もマウス胚線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞において X 線誘導アポトーシスも増強できることを示した<sup>25)</sup>。しかし、X 線構造解析などによりカスパーゼとの直接結合を否定する報告が相次いで発表され<sup>26,27,28)</sup>、近年、サバイビンは他の IAP ファミリーを阻害するために必要な Smac/DIABLO の N 末端側と結合することでその機能を阻害し、アポトーシスを間接的に抑制していることが証明された<sup>29,30,31)</sup>。その報告の中では、サバイビンの 53 番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に変異させると Smac/DIABLO との結合能を失い、そのドミナントネガティブタンパク質の過剰発現によりヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞における薬剤誘導性アポトーシスを増強できることが示された。しかし、サバイビンのアポトーシス抑制機能に必須であると考えられているリン酸化と Smac/DIABLO との結合の関連性は不明なままである。

本研究では、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞ならびにヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞を用いて、サバイビンの機能を阻害することで放射線誘導アポトーシスを増強できるのか検討した。この目的のために、リン酸化部位である 34 番目のスレオニン残基をアラニン残基に変異させた T34A および Smac/DIABLO との結合部位である 53 番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に変異させた D53A をコードしたアデノウイルスベクターを作製して実験に用いた (図 2)。さらに、サバイビンが放射線誘導アポトーシス経路を抑制する詳細なメカニズムを調べる

ために、これらの変異サイバインを過剰発現した A549 細胞を用いて Smac/DIABLO との結合におけるリン酸化の重要性を明らかにした。



Verdecia *et al.* 2000. *Nat. Struct. Biol.*, 7; 602–608.

図2. サバイビンタンパク質の三次元構造と本研究において変異を与えた部位

## 2. 材料と方法

### 2-1. 細胞株および培養方法

ヒト肺腺癌由来 A549 細胞の培養は 10%牛胎児血清(Filtron, Brroklyn, Australia)、2.0 g/l NaHCO<sub>3</sub>、10<sup>5</sup> U/l ペニシリン G カリウム (萬有製薬、東京)、0.1 g/l ストレプトマイシン (明治製菓、東京) を含む RPMI1640 培地(Gibco-BRL/Invitrogen)にて、ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞は 10%牛胎児血清(Filtron)、3.7 g/l NaHCO<sub>3</sub>、10<sup>5</sup> U/l ペニシリン G カリウム (萬有製薬)、0.1 g/l ストレプトマイシン (明治製菓) を含む DMEM 培地(Gibco-BRL/Invitrogen)にて行い、ウォータージャケット式インキュベーター(BNA-111;タバイエスベック、東京)にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で維持した。

### 2-2. 試薬

Propidium iodide (PI)およびノコダズールは Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)より購入した。<sup>32</sup>Pi (オルトリン酸)は MP Biomedicals, Inc. (Irvine, CA)より購入した。プロテイン G-セファロースは Amersham-Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK)より購入した。抗 survivin 抗体および抗 actin 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)から、抗 cytochrome *c* 抗体は BD Pharmingen (Ereodegem, Belgium)から、抗 Smac/DIABLO 抗体は Calbiochem (San Diego, CA)から、抗 cleaved caspase-3 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA)からそれぞれ購入した。

### 2-3. プラスミドコンストラクトの作製

サバイビンの cDNA は HeLa 細胞の総 RNA から RT-PCR により増幅し、CR2.1-TOPO (Invitrogen)に組み込んだ。変異サバイビンは PCR を用いた部位特

異的変異作製法により作製し、シーケンサーCEQ8000 DNA Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA)によりその塩基配列を確認した。

#### 2-4. アデノウイルスベクターの作製およびトランスダクション

野生型(WT)、T34A および D53A サバイビンの cDNA はエントリーベクター pENTR/D-TOPO (Invitrogen)に組み込み、LR clonase (Invitrogen)を用いてアデノウイルスベクターpAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen)に組み換えた。精製したプラスミドを PacI で消化してウイルスの複製起点を含む2つの ITR(inverted terminal repeat)サイトを露出させた後、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてパッケージング細胞である 293A 細胞にトランスフェクションした。7日後、細胞を集めて凍結・融解を6回繰り返すことによりウイルスの粗抽出液をつくり、再度 293A 細胞に感染させることでアデノウイルスを増幅させた。力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech)により決定した。70-80%の密度の腫瘍細胞株に MOI 50 の力価で pAd-LacZ, pAd-WT, pAd-T34A ならびに pAd-D53A をコードするウイルスを 37°C、1 時間感染 (トランスダクション) させ、培養液を加えてさらに 24 時間インキュベートして実験に用いた。

#### 2-5. X 線照射

X 線照射装置 PANTAK HF-350 型(島津製作所、京都)を使用し、ターンテーブルを用いて回転させながら線量率 3.9 Gy/min (200 kVp, 20 mA, 1.0 mm Al フィルター)、室温にて 10 Gy を照射した。

#### 2-6. ウェスタンブロット法

細胞をスクレイパーで採取し、1,500 rpm、4°Cにて5分間遠心した。PBS(-)に

て2回洗浄を行った後、100  $\mu$ l の氷冷 Lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A)で細胞を懸濁し、30 分間氷上に静置して細胞を溶解した。15,000 rpm、4°Cで10 分間遠心し、上清をサンプルとした。Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)のプロトコールに従ってタンパク質濃度の定量を行い、各試料の濃度を統一した。その後、3 倍濃度の SDS-PAGE 用試料調製用緩衝液を試料の 1/2 量添加し、沸騰水で3 分間加熱処理後に泳動試料とした。試料を SDS-PAGE 電気泳動装置(Bio-Rad Laboratories)で展開し、ウエスタンブロッティング転写装置(Bio-Rad Laboratories)を用いてニトロセルロース膜(Advantec, 東京)に 60V、1 時間転写した。転写したニトロセルロース膜は、5%低脂肪スキムミルクを含む Tris-Tween-20 緩衝液 (TBST buffer; 10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4)で室温において1 時間ブロッキングした。5%低脂肪スキムミルクを含む TBST 溶液にて抗 survivin 抗体ならびに抗 actin 抗体は 2000 倍、抗 Smac/DIABLO 抗体ならびにカスパーゼの活性化断片(p17, p19)に対する抗体 (抗 cleaved caspase-3 抗体)は 1000 倍希釈し、4°Cにて一晩処理した。その後、HRP 標識二次抗体と反応させ、ECL (enhanced chemiluminescence) キット (Western Lighting<sup>TM</sup>, Chemiluminescence Reagent Plus; Perkin Elmer, Boston, MA)を用いた化学発光法にて検出した。

#### 2-7. ミトコンドリアから遊離したシトクロム *c* の検出

照射から 24 時間後に細胞を回収し、1,500 rpm、4°Cにて5 分間遠心した。PBS(-)にて2回洗浄を行った後、300  $\mu$ l の氷冷 buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF)で細胞を懸濁し、氷上にて1 時間半静置した後、Dounce 型ホモジェナイザーにて細胞

を壊した。上清を 1,000 g、4°Cにて 10 分間遠心し、得られた上清をさらに 26,000 rpm、30 分間遠心(CS100, Hitachi, Ltd., 東京)した。得られた上清を細胞質分画とし、上述の方法に従ってウェスタンブロットを行った。

## 2-8. 免疫沈降

アデノウイルスベクターのトランスダクションから 24 時間後、Smac/DIABLO をミトコンドリアから遊離させるために 100 nM タキソールを処理して 24 時間インキュベートした。細胞を回収して 1,500 rpm、4°Cにて 5 分間遠心し PBS(-)にて 2 回洗浄を行った後、500  $\mu$ l の免疫沈降用 Lysis buffer (1% Triton X-100, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A)で細胞を懸濁し、4°Cにて一晩静置した。遠心後、上清と抗 Smac/DIABLO 抗体を 4°Cにて 1 時間混和し、さらにプロテイン G-セファロースを加えて一晩混和した。免疫沈降物を Lysis buffer で 2 回洗浄し、SDS-PAGE 用試料調製用緩衝液で懸濁して上記の方法に従ってウェスタンブロットを行った。

## 2-9. リン酸化されたサバイビンの検出

トランスダクションから 24 時間後、細胞を 0.2 mCi/ml  $^{32}$ Pi を含むリン酸不含 RPMI1640 にて 37°C、1 時間ラジオアイソトープラベルし、100 ng/ml ノコダゾールを加えてさらに 6 時間インキュベートした。細胞を回収し、2-8 の方法に従って抗サバイビン抗体を用いた免疫沈降を行った。SDS-PAGE で展開後ゲルを乾燥させ、リン酸化サバイビンに由来する放射能活性を FUJIX BAS2500 イメージングアナライザー(富士フィルム、東京)にて解析した。

## 2-10. アポトーシスの検出と定量

X線照射から48時間後、細胞を回収し1,500 rpm、4°Cにて5分間遠心した。PBS(-)にて2回洗浄後、1%グルタルアルデヒド/PBSを500 µl加えて懸濁し、4°Cにて一晩細胞を固定した。固定後、1,500 rpm、4°Cにて5分間遠心して上清を除去し、 $1 \times 10^6$ 個の細胞に対してPBS(-)を20 µl加え0.2 mg/ml PI溶液を5 µl添加し、暗所にて室温で15分間染色した。染色された細胞をスライドグラスにのせ、蛍光顕微鏡(BX50; OLYMPUS, 東京)にて200個以上の細胞を観察した。核の断片化とクロマチンの凝縮が見られる細胞を計数し、その全体に対する存在率を算出した。また、アネキシン Vによるアポトーシス細胞の検出では照射後24時間に細胞を回収し、洗浄後FITC結合アネキシン Vを含む結合 buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)中で暗所にて室温で10分間染色した。これをナイロンメッシュに通して試料溶液とし、フローサイトメーターEPICS XL (Beckman Coulter)を用いて解析した。フローサイトメトリーによる sub G1 期分画の検出では照射後時間経過に従って細胞を回収し、洗浄後70%エタノールを1 ml加えて懸濁し、4°Cにて一晩細胞を固定した。固定後、1,500 rpm、4°Cにて5分間遠心して上清を除去し、PBS(-)で洗浄後100 µlのPBS(-)を加えて懸濁し、20 mg/mlのRNaseを1 µl加えて37°Cで30分間処理した。処理後、PBS(-)で洗浄し、1 mg/ml PI溶液を20 µl加えたPBS(-)1 mlを加えて暗所で30分間染色した。これをナイロンメッシュに通して試料溶液とし、フローサイトメーターEPICS XL (Beckman Coulter)を用いて解析した。

## 2-11. 統計解析

データは平均値±標準誤差(S.E.)で表示し、 $p < 0.05$ の時にその差が有意であると判断した。

### 3. 結果

#### 3-1. ヒト肺腺癌由来 A549 細胞における X 線照射の影響

最初に、X 線を照射されたヒト肺腺癌由来 A549 細胞におけるアポトーシス誘導について検討した。まず、A549 細胞に 10 Gy の X 線を照射して 12、24、36 および 48 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーにより細胞周期の変化を観察した (図 3A)。各細胞周期の比率から分かるように、非照射細胞に比べ照射細胞では G2/M 期分画が顕著に増加したが、48 時間まで sub G1 期分画の増加は見られなかった。sub G1 期分画とは G1 期の細胞より DNA 含量が少ない細胞の分画であり、一般的にアポトーシス誘導によって DNA 自己分解を起こした細胞群であることを意味している。以上のことから、放射線により G2/M 期における細胞周期停止が誘導されているが、sub G1 期分画に反映されるアポトーシスは照射後 48 時間まで増加していないことが明らかになった。また、X 線照射から 24 時間後の細胞の PI 染色による核の形態学的観察によっても、G2/M 期停止細胞に特徴的な大きくなった核は観察されたが、アポトーシス細胞の指標である核の断片化とクロマチンの凝縮はほとんど観察できなかった (図 3B)。さらにアポトーシス誘導の有無を確認するために、アポトーシス実行タンパク質であるカスパーゼ 3 の活性化をウエスタンブロットにて調べた。その結果、放射線高感受性のヒト白血病由来 Molt-4 細胞では容易に放射線によりカスパーゼ 3 の活性化断片が観察されたが(positive control)、A549 細胞では照射から 48 時間後までカスパーゼ 3 の活性化は見られなかった (図 3C)。一方、アポトーシス誘導に必須のミトコンドリアからのシトクロム *c* の遊離 (図 3D) と Smac/DIABLO の発現上昇 (図 3E) は照射から 24 時間後にはすでに起こっていることが示された。以上の結果より、X 線を照射された A549 細胞においてアポトーシスシグナルはミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離まで進んでいるが、アポトーシス

の実行には達していないことが明らかになった。

### 3-2. アデノウイルスベクターをトランスダクションした腫瘍細胞におけるサバイビンの発現

腫瘍細胞内で高レベルかつ比較的長期的に目的タンパク質を発現させるため、変異サバイビンをコードした複製欠損アデノウイルスベクターを作製した。pAd-LacZ は $\beta$ -galactosidase をコードしており、ウイルス毒性のコントロールとして用いた。pAd-LacZ, pAd-WT, pAd-T34A ならびに pAd-D53A を A549 細胞およびヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞にトランスダクションし、24 時間後に細胞を回収してサバイビンの発現をウェスタンブロットで確認したところ、野生型 (pAd-WT) ならびに変異 (pAd-T34A および pAd-D53A) サバイビンを導入した細胞でサバイビンの過剰発現が確認できた (図 4A)。さらに抗サバイビン抗体を用いた免疫染色では、ほぼすべての細胞で強いサバイビンの発現が観察された (図 4B)。よって、このようなサバイビンの高発現系を用いて以下の実験を行った。

### 3-3. 変異サバイビンを過剰発現させた腫瘍細胞における X 線誘導アポトーシスの検出

続いて、変異サバイビンを過剰発現させることにより腫瘍細胞の X 線誘導アポトーシスを増感できるか調べた。照射から 24 時間後に細胞を回収し、早期アポトーシス細胞において細胞膜上に現れるフォスファチジルセリンを特異的に認識する FITC 結合アネキシン V を用いたフローサイトメーターにより評価したところ、図 5A に示すように pAd-LacZ ならびに pAd-WT を導入した A549 細胞では 10 Gy の X 線を照射してもアネキシン V 陽性細胞は増加しなかった。一方、

pAd-T34A ならびに pAd-D53 を導入すると照射により右方にアネキシン V 陽性細胞の増加を示す新たなピークが現れた。さらに、PI 染色による核の形態学的観察では、T34A ならびに D53A を過剰発現した A549 細胞では 10 Gy 照射から 48 時間後には核の断片化とクロマチンの凝縮を指標とするアポトーシス細胞が頻繁に見受けられるようになったが、LacZ ならびに WT 過剰発現細胞ではほとんど見られなかった (図 5B)。同様の結果は HeLa 細胞でも得られた (結果は示していない)。そのようなアポトーシス細胞を計測して細胞全体に対する存在率を算出すると、両方の腫瘍細胞において T34A ならびに D53A 過剰発現細胞ではより WT 過剰発現細胞に比べて有意に放射線誘導アポトーシスが増加した (図 5C)。

#### 3-4. 変異サバイビンのリン酸化能と Smac/DIABLO との結合能の解析

サバイビンがアポトーシスを抑制するためには G2/M 期において CDC2 によりリン酸化を受ける必要があることが知られているため<sup>22)</sup>、WT ならびに変異サバイビンのリン酸化能について調べた (図 6A)。トランスダクション後 0.2 mCi/ml <sup>32</sup>Pi を A549 細胞に取り込ませ、ノコダゾールを 6 時間処理して細胞を M 期に集積させた。細胞を回収して抗サバイビン抗体による免疫沈降を行い、サバイビンのリン酸化状態をオートラジオグラフィーで解析したところ、WT はリン酸化されているのに対し、T34A はリン酸化されないことが実際に確かめられた (図 6A)。さらに、Smac/DIABLO 結合部位を変異させた D53A では WT と同様のバンドが検出でき、リン酸化部位の構造は保存されていることが明らかになった。続いて、サバイビンのアポトーシス抑制機序として Smac/DIABLO の阻害を介した間接的な抑制が示唆されていることから<sup>30)</sup>、変異サバイビンの Smac/DIABLO との結合能を免疫沈降によって調べた (図 6B)。通常ミトコンド

リア膜間に存在する Smac/DIABLO を細胞質に放出させるためにタキソールで処理し<sup>30)</sup>、24 時間後に細胞を回収した。免疫沈降前の細胞抽出液では、WT, T34A ならびに D53A 導入細胞でサバイビンの強い発現が確認でき (図 6B 上段)、Smac/DIABLO はトランスダクションに関係なくすべての細胞で発現していた (図 6B 中段)。続いて、同じ細胞抽出液を用い、抗 Smac/DIABLO 抗体による免疫沈降後、抗サバイビン抗体によるウエスタンブロットを行った。その結果、抗 Smac/DIABLO 抗体は WT を免疫沈降したが、T34A ならびに D53A はほとんど免疫沈降されなかった (図 6B 下段)。この結果は、T34A ならびに D53A が WT と比較して Smac/DIABLO との結合能が著しく低下していることを示している。さらに、T34A ならびに D53A 過剰発現細胞では WT 過剰発現細胞に比べて X 線照射によりカスパーゼ 3 の活性化が上昇し (図 6C)、アポトーシス経路が促進していることを確認できた。以上より、サバイビンの 34 番目のスレオニン残基と 53 番目のアスパラギン酸残基はサバイビンが Smac/DIABLO と結合するために重要であり、A549 細胞においてサバイビンは Smac/DIABLO と結合することで Smac/DIABLO と IAP との結合を阻害してアポトーシスを抑制していると考えられた。

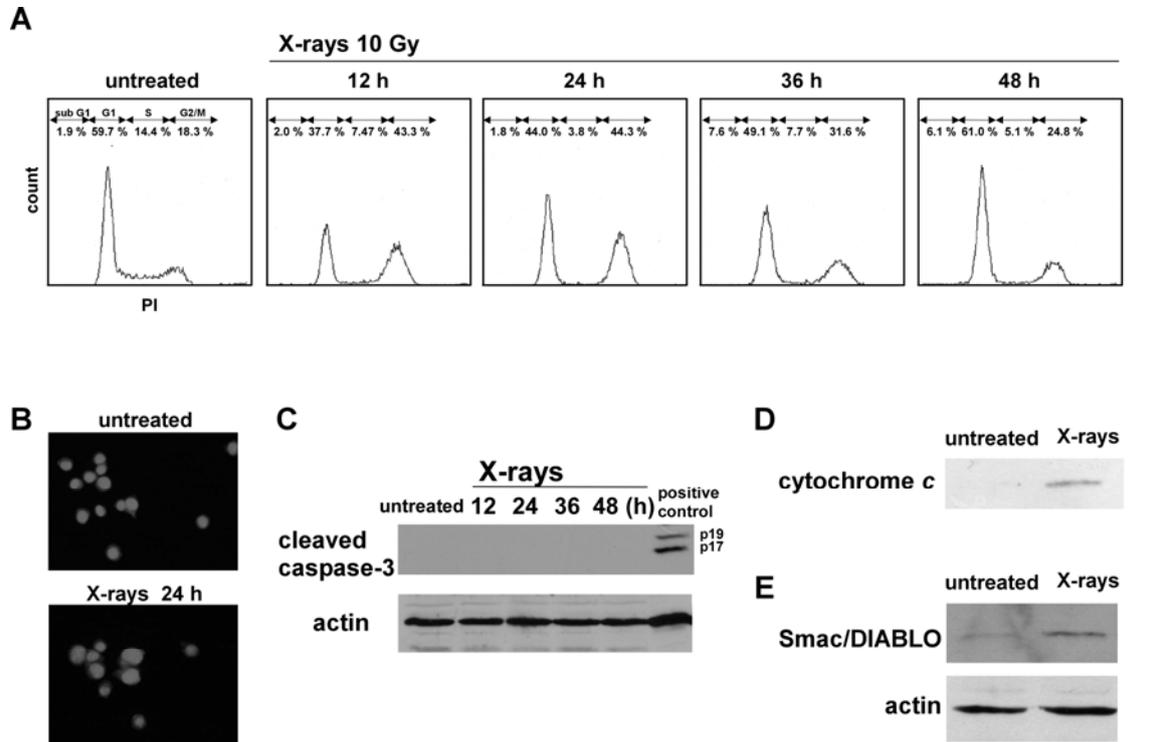


図3. ヒト肺腺癌由来A549細胞におけるX線照射の影響

- (A)非照射ならびに照射後12、24、36、48時間後の細胞を回収し、PI染色後フローサイトメーターにて細胞周期を解析した。各細胞周期における細胞の比率を表示した。
- (B)非照射ならびに照射から24時間後の細胞のPI染色による核の蛍光顕微鏡像。
- (C)非照射ならびに照射から12、24、36、48時間後の細胞を回収し、カスパーゼ3の活性化をウエスタンブロットにて調べた。陽性コントロールとしてヒト白血病由来Molt-4細胞を用いた。
- (D)非照射ならびに照射から24時間後の細胞を回収して細胞質分画を分離し、ウエスタンブロットにてシトクロムcの遊離を調べた。
- (E)非照射ならびに照射から24時間後の細胞を回収し、ウエスタンブロットにてSmac/DIABLOの発現を調べた。

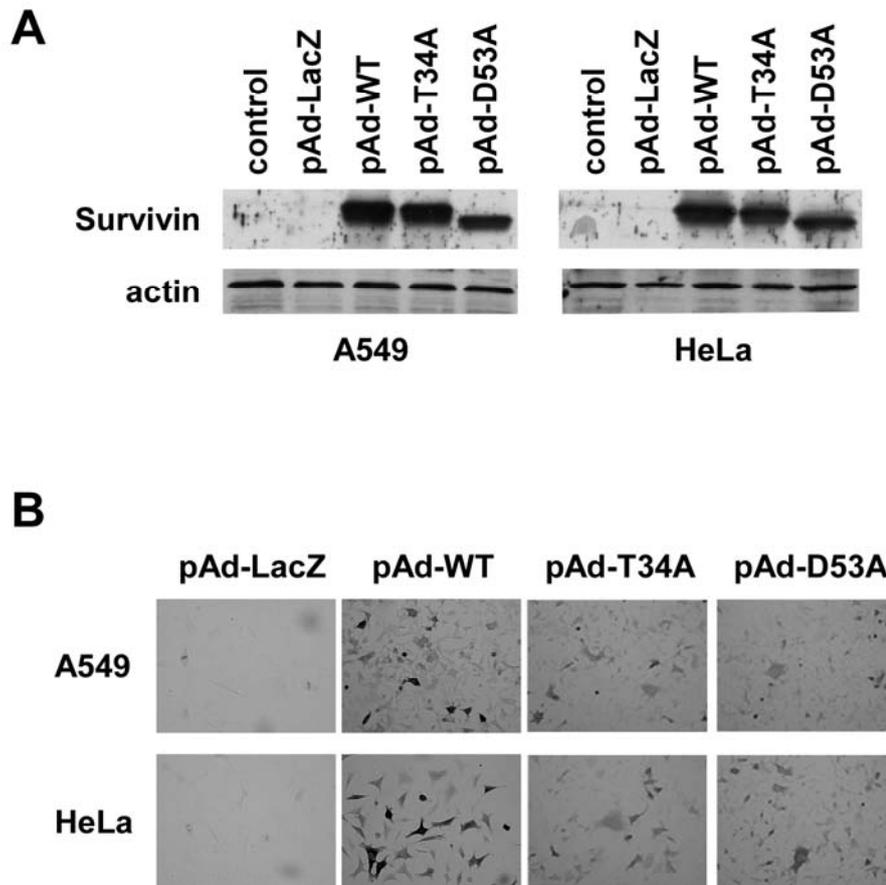


図4. アデノウイルスベクターをトランスダクションした腫瘍細胞におけるサバイビンの発現  
 (A)アデノウイルスベクター導入から24時間後、A549細胞ならびにHeLa細胞におけるサバイビンの発現をウエスタンブロットにて調べた。  
 (B)アデノウイルスベクター導入から24時間後、A549細胞ならびにHeLa細胞におけるサバイビンの発現を抗サバイビン抗体を用いた免疫染色にて解析した。

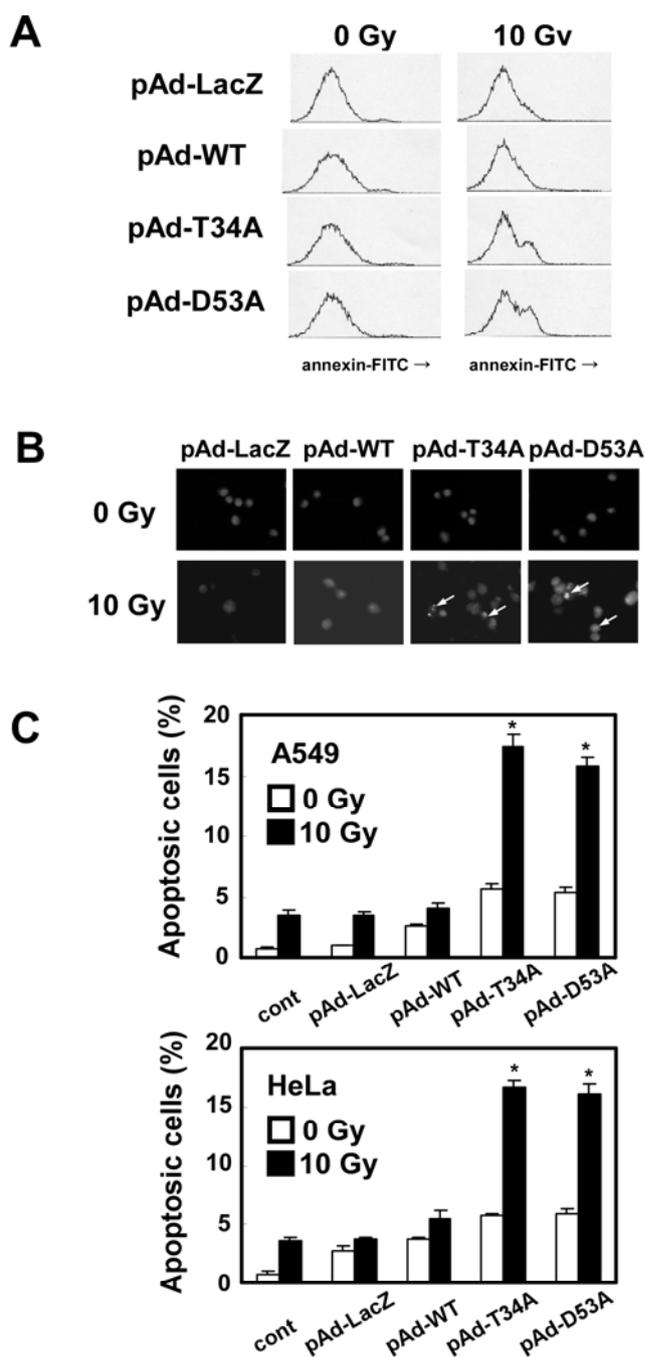


図5. 変異サイバインを過剰発現させた腫瘍細胞におけるX線誘導アポトーシスの検出  
 (A) サイバインタンパク質を発現させたA549細胞に10 Gyを照射し、24時間後に細胞を回収してFITC結合アネキシンV染色を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の検出を行った。  
 (B) 照射から48時間後のA549細胞を回収し、蛍光顕微鏡によるPI染色後の核の形態学的観察を行った。矢印;アポトーシス細胞。  
 (C) (B)で観察されたアポトーシス細胞の細胞全体に対する割合。実験は独立して3回行い、各カラムとバーは平均±S.E.で表示した。統計的有意差はpAd-WT導入細胞群に対して\*: $p < 0.05$ で表示した。

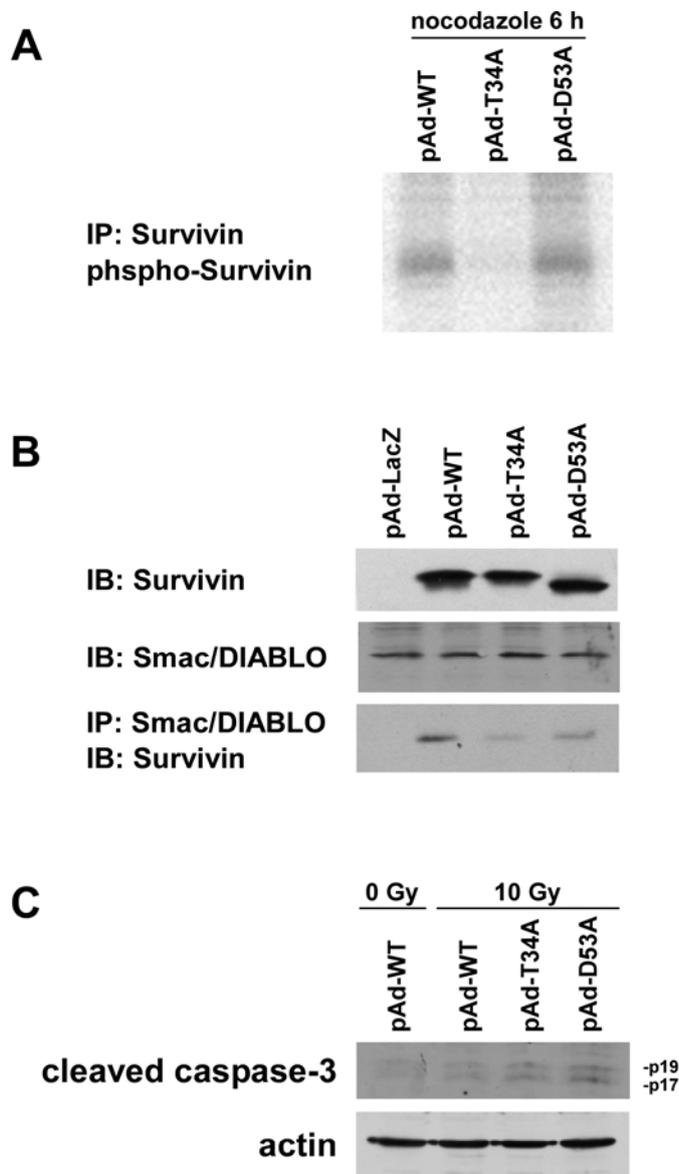


図6. 変異サバイビンのリン酸化能とSmac/DIABLOとの結合能の解析

- (A) サバイビンタンパク質を発現したA549細胞を0.2 mCi/ml  $^{32}\text{P}$ iを含むリン酸不含培地で1時間インキュベートし、ノコダゾール(100 ng/ml)を加えてさらに6時間培養した。抗サバイビン抗体で免疫沈降を行い、リン酸化されたサバイビンに由来する放射能活性をオートラジオグラフィで検出した。
- (B) Smac/DIABLOをミトコンドリアから遊離させるためにタキソール(100 nM)を24時間処理し、サバイビンならびにSmac/DIABLOの発現と抗Smac/DIABLO抗体によるサバイビンの共免疫沈降をウエスタンブロットにて調べた。
- (C) 非照射ならびに照射から36時間後の細胞を回収し、カスパーゼ3の活性化をウエスタンブロットにて調べた。

#### 4. 考察

本研究では、ミトコンドリアの下流でアポトーシスを抑制している因子としてサバイビンに着目し、その機能阻害による放射線誘導アポトーシスの増強効果について検討した。その目的のために、リン酸化部位である 34 番目のスレオニン残基をアラニン残基に変異させた T34A と Smac/DIABLO 結合部位の 53 番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に変異させた D53A という二種類のドミナントネガティブタンパク質を作製して腫瘍細胞に過剰発現させた。サバイビンはダイマーを形成して機能を発揮することが報告されているため<sup>13,28,30,31</sup>、D53A は内因性の正常なサバイビンとダイマーを形成することで内因性サバイビンによる Smac/DIABLO のサバイビン抑制を阻害し、放射線誘導アポトーシスを増強したと考えられる。一方、CDC2 によりリン酸化を受けられない T34A は細胞内で内因性サバイビンと CDC2 との結合を競合し、そのために内因性のサバイビンのリン酸化を阻害することが報告されている<sup>22</sup>。しかしながら、サバイビンの機能阻害によるアポトーシス増強効果はカスパーゼ依存性と考えられているが、T34A による内因性サバイビンのリン酸化の阻害がどのように放射線誘導アポトーシスシグナルを増強するのか明らかにされていない。筆者はそのメカニズムとして、リン酸化能を失った T34A が D53A と同様に Smac/DIABLO と結合できなくなったことがひとつの理由ではないかと仮説をたてた。よって本研究では、抗 Smac/DIABLO 抗体による変異サバイビンの免疫沈降後に抗サバイビン抗体によるウエスタンブロットを行った。図 6B に示すように T34A は Smac/DIABLO 結合部位を変異させた D53A と同様に Smac/DIABLO と結合できないことが示された。加えて、T34A が本当に細胞周期 M 期においてリン酸化されなくなっているのか検討するために、変異サバイビン発現細胞にノコダゾールにを処理して M 期に同調させたときのリン酸化能の有無について調べた。

図 6A に示すように、WT と同様に D53A はリン酸化が起きていたが、T34A 発現細胞ではリン酸化サバイビンは検出されなかった。また、筆者は T34 をアスパラギン酸(D)あるいはグルタミン酸(E)に変異させたサバイビンをマウス胚線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞に導入すると、T34A のような放射線誘導アポトーシスの増強が起こらないこともすでに示している<sup>25)</sup>。以上の結果は、34 番目のスレオニン残基のリン酸化による負電荷の導入がサバイビンの Smac/DIABLO との結合活性に重要であることを示している。T34A ならびに D53A を過剰発現させると X 線照射によるカスパーゼ 3 の活性化が見られたことから (図 6C)、内因性サバイビンのリン酸化や結合部位の変異によりサバイビンと Smac/DIABLO との結合を阻害するとフリーの Smac/DIABLO が増加して IAP ファミリーを抑制し、それによりカスパーゼが活性化してアポトーシスが誘導されたと考えられる。本研究は、サバイビンのリン酸化と Smac/DIABLO との結合の関係を明らかにした初めての報告である。

腫瘍細胞が放射線抵抗性を示す原因として、サバイビンの過剰発現の他に腫瘍抑制因子 p53 の突然変異または欠損がよく知られている<sup>1)</sup>。二種類の腫瘍細胞で誘導されたアポトーシスの割合を比較すると、p53 を欠損した HeLa 細胞と wild-type の p53 を持つ A549 細胞の間に差は見られなかった (図 5)。よって、変異サバイビンによる放射線誘導アポトーシスの増強効果は p53 の状態に依存しないと考えられ、p53 が変異または欠損している多くの腫瘍細胞でも効果を示すことが期待できる。さらに、*in vivo* でのサバイビンの機能阻害の有用性も示されており<sup>24)</sup>、今回用いたアデノウイルスベクターも動物の腫瘍へ注入、投与することにより *in vivo* での利用が可能である。本研究室では膜透過性ペプチド TAT を融合した T34A タンパク質をマウスの移植腫瘍に直接接種して細胞内に導入し、放射線を照射することにより放射線単独に比べて有意な抗腫瘍効果を

示す結果が得られている<sup>32)</sup>。今後、この TAT を用いた導入法と今回のアデノウイルスを用いた導入法について変異サバイビンの導入効率、副作用ならびに増感効率等を比較することが臨床応用を考える上で重要である。

以上のことから、サバイビンは A549 細胞においてミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離まで進んだ放射線誘導アポトーシスを Smac/DIABLO の機能阻害を介して抑制しており、サバイビンのドミナントネガティブタンパク質である T34A ならびに D53A を過剰発現させることで、放射線抵抗性を示す腫瘍細胞に効果的にアポトーシスを誘導できることが明らかになった。

## 5. 小括

本章では腫瘍の放射線抵抗性に寄与する抗アポトーシスタンパク質サバイビンの機能解析および、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入を用いたサバイビンの抑制によるヒト肺腺癌由来 A549 細胞ならびにヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞の放射線誘導アポトーシスの増強効果について検討した。まず、放射線単独によりアポトーシス経路が活性化するか調べたところ、A549 細胞ではミトコンドリアからのシトクロム *c* の放出は起きていたがカスパーゼ 3 の活性化およびアポトーシスは観察されなかった。サバイビンを機能的に阻害するため、リン酸化部位である 34 番目のスレオニン残基をアラニン残基に変異させた T34A ならびに Smac/DIABLO 結合部位である 53 番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に変異させた D53A をコードするアデノウイルスベクターを作製した。これらを腫瘍細胞に過剰発現させて放射線を照射すると、48 時間後に生じるアポトーシスは WT を過剰発現させた細胞に比較して有意に増加した。さらに、Smac/DIABLO 抗体を用いた免疫沈降により、リン酸化を受けない T34A は WT に比べて顕著に Smac/DIABLO との結合活性が減弱していることが観察された。以上の結果から、サバイビンは腫瘍細胞において Smac/DIABLO と直接結合してその機能の阻害を介して放射線誘導アポトーシスを抑制しており、変異サバイビンの導入によりその結合を阻害することで放射線誘導アポトーシスを有意に増加できることが明らかになった。サバイビンは多くの腫瘍細胞に特異的に過剰発現していることから、放射線治療における分子標的として有用であると考えられる。

## <第二章>

### 放射線誘導アポトーシス経路におけるチトクロム *c* 遊離のレドックス制御

#### 1. 序論

細胞に照射された放射線は水を放射線分解することにより、OH $\cdot$ 、O $_2^{\cdot-}$ ならびに H $_2$ O $_2$  などの活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)を生成させることが知られている<sup>33,34</sup>。そのように生じた ROS は照射を受けた細胞や組織内で 10<sup>-9</sup> 秒の短時間内に細胞内分子(DNA, タンパク質, 脂質など)と反応し、細胞死、細胞周期停止、突然変異、癌化などにつながる深刻なダメージを与える<sup>33,34,35,36</sup>。近年、これらの ROS の消滅後に改めて細胞内で二次的に ROS が産生され、アポトーシスシグナル伝達分子となることが明らかになってきた。本研究室では、抗酸化剤 Trolox<sup>19)</sup>または N-acetyl-L-cystein (NAC)<sup>2,20)</sup>を照射後に処理することでヒト白血病由来 Molt-4 細胞の放射線誘導アポトーシスを顕著に減少させることを明らかにした。このことは、照射後に二次的に生じた ROS が放射線誘導アポトーシスで重要な役割を果たしていることを示している。実際、Chen らが行った細胞内 ROS を検出する蛍光プローブを用いた実験でも、多発性骨髄腫細胞において  $\gamma$  線照射から数時間後に徐々に ROS 産生が上昇し、それらがアポトーシスシグナルになっていることが明らかになっている<sup>37)</sup>。細胞内の主要な ROS の発生源としてミトコンドリアと細胞膜上の NADPH オキシダーゼが知られているが、放射線によって二次的に生じる ROS の発生源としてミトコンドリア呼吸鎖が示唆されている<sup>17,18)</sup>。しかしながら、一般的に短寿命である ROS をミトコンドリア特異的に直接検出することが難しく、放射線照射後に二次的に生じる ROS がミトコンドリア由来であるかどうかは未だ明らかにされていない。

第二章では、固形腫瘍細胞において X 線照射後にミトコンドリアからの ROS

産生が上昇するのか、またそれらが放射線誘導アポトーシス経路、特にミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離に関与しているのか検討を行った。始めに、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞において X 線照射から何時間後にシトクロム *c* 遊離が起こるのかをウエスタンブロットにより確認し、それに対する抗酸化剤の照射後処理の効果を検討した。続いて、細胞内の ROS を検出する蛍光試薬 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) を用いて X 線照射後の細胞内 ROS 産生の変化を調べた。ミトコンドリア由来の ROS を検出するため、ミトコンドリアの ROS を特異的に検出する新規蛍光プローブ MitoAR を用いて生細胞での観察を行った。さらに、照射した細胞から単離したミトコンドリア呼吸鎖基質 NADH/succinate 依存性  $O_2^{\cdot -}$  (スーパーオキシド) 生成を、スピントラップ剤 CYPMPO を用いた ESR-スピントラップ法により検討した。最後に、ミトコンドリア由来の ROS が照射により増加するメカニズムをミトコンドリアの形態学的観察および膜電位の測定、ESR オキシメトリーによる酸素消費量の変化ならびに Bcl-2 ファミリーの発現変化を調べることにより解析した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 細胞株および培養方法

ヒト肺腺癌由来 A549 細胞の培養は前章に示した方法で行った。

### 2-2. 試薬

5-(2,2-Dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO)は Radical Research Inc.(東京)より購入した。Propidium iodide (PI), DCFDA および diphenylene iodonium (DPI)は Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)より購入した。6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は Calbiochem-Novabiochem International Inc. (San Diego, CA)より購入した。N-tert-butyl- $\alpha$ -(2-sulfophenyl)-nitron (S-PBN)は Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)より購入した。抗 actin 抗体および抗 Bax 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)から、抗 Bcl-2 抗体および抗 Bcl-X<sub>L</sub> 抗体は Wako (大阪)から、抗 cytochrome *c* 抗体は BD Pharmingen (Erebodegem, Belgium)から購入した。N-acetyl-L-cystein (NAC)および特に表記のない一般試薬は和光純薬(大阪)から購入した。

### 2-3. X線照射ならびに薬剤処理

X線照射は前章に示した方法で行った。20 mM NAC、10 mM Trolox、15 mM S-PBN ならびに 70  $\mu$ M DPI は X線照射直後に培養液に加え、37°C でインキュベートした。

### 2-4. アデノウイルスベクターのトランスダクションならびにアポトーシスの検出と定量

アデノウイルスベクターのトランスダクションならびに PI 染色後のアポトーシスの検出と定量は前章に示した方法で行った。

## 2-5. 活性酸素種の測定

蛍光プローブ DCFDA は細胞内 ROS を検出するために用いた。10  $\mu$ M DCFDA を含む PBS(-)で細胞を 37°C にて 30 分インキュベートした。未取り込みの DCFDA は PBS(-)で 2 回洗浄することにより取り除き、PBS(-)で再懸濁してフローサイトメトリーにより解析した。ミトコンドリアの ROS を特異的に検出するために、東京大学大学院薬学系研究科の長野哲男教授により提供を受けた新規蛍光プローブ MitoAR を用いた<sup>38)</sup>。細胞を 1  $\mu$ M MitoAR を含む培地で 37°C にて 30 分間インキュベートし、蛍光顕微鏡 (IX71 ; Olympus) で観察した。写真は IPLab imaging software (Scanalytics Inc., Fiarfax, VA)を用いた CCD カメラ(SenSys KAF1400 ; Photometrics Inc., Tucson, AZ)により撮影した。

## 2-6. ESR 測定

ミトコンドリア分画は Mitochondria Isolation Kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)により単離し、5 mM ミトコンドリア呼吸鎖基質 (succinate, glutamate ならびに malate)、0.5 mM NADH、0.2%ジギトニンおよび 10 mM CYPMPO と混和した。ミトコンドリア分画の終濃度は 250  $\mu$ g/ml とした。反応液はすぐに水溶液 ESR 用平型セル(RST-DVT05; 50 mm $\times$ 4.7 mm $\times$ 0.3 mm, Radical Research)に移し、温度コントローラー(ES-DVT4, JEOL)で 37°C制御下の ESR の空洞共振器に挿入して測定を行った。ESR 測定には日本電子製 JEOL-RE X-band スペクトロメータを使用し、すべての ESR スペクトルは 37°C において以下の条件で行った; 10 mW 入射マイクロ波強度, 100 kHz 磁場変調周波数, 0.1 mT 磁

場変調振幅ならびに 15 mT 磁場掃引幅。超微細構造結合定数(hyperfine splitting constants; Hfsc)の解析およびコンピューターシミュレーションは Win-Rad Radical Analyzer System (Radical Research)を用いて行った。スーパーオキシドと CYPMPO の反応によって生成するスピン付加体 CYPMPO-OOH の ESR スペクトルを同定するために、スーパーオキシドの標準発生系 (ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系) を用いて検討した。具体的には、250  $\mu$ M ヒポキサンチン、25 mU/ml キサンチンオキシダーゼ、0.1 mM DATAPAC および 10 mM CYPMPO を混合して 5 分間インキュベートし、上記の条件で ESR スペクトルを得た。

#### 2-7. 電子顕微鏡による形態学的観察

細胞は 3%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液で 4°Cにて 4 時間固定した。その後、2%四酸化オスミウム添加カコジル酸緩衝液で 4°Cにて 2 時間後固定を行い、脱水してエポキシ樹脂に包埋した。厚さ 80 nm の超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200、日本電子、東京) で観察した。

#### 2-8. DiOC<sub>6</sub>(3)を用いたミトコンドリア膜電位( $\Delta\psi_m$ )の測定

細胞を回収して 1,500 rpm、4°Cにて 5 分間遠心した。PBS(-)で洗浄後、40 nM の 3'3'-dihexyloxyacarbocycamine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))を含む PBS(-)で暗所にて 37°C、15 分間染色した。染色した細胞を PBS(-)で洗浄し、1 ml の PBS(-)に再浮遊させてフローサイトメーターにより解析した。

#### 2-9. ESR を用いたオキシメトリー法

$1 \times 10^7$ /ml の細胞と 1 mg/ml の酸素プローブ Lithium 5,9,14,18,23,27,32,36

-octa-n-butoxy-2,3-naphthalocyanine (LiNc-BuO; 北海道教育大学の中村秀夫准教授より提供を受けた)を PBS(-)中で混和した。反応液はすぐにガス透過性 TPX 製キャピラリー (内径  $\phi$  0.76 mm) に移し、37°C において ESR 測定を行った。測定条件は、1 mW 入射マイクロ波強度, 100 kHz 磁場変調周波数, 0.01 mT 磁場変調振幅強度ならびに 0.5 mT 磁場掃引幅である。スペクトルの線幅の測定は Win-Rad Radical Analyzer System (Radical Research)を用いて行った。以下に示す Fulii らにより報告された酸素分圧とシグナルの線幅の関係式より、酸素分圧を算出した<sup>39)</sup>。

$$pO_2 \text{ (mmHg)} = (LW \times 10000 - 340) / 10.33 \quad (LW; \text{line width [mT]})$$

## 2-10. 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差(S.E.)で表示し、 $p < 0.05$  の時にその差が有意であると判断した。

### 3. 結果

#### 3-1. X線に誘導されるミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離およびカスパーゼ活性化に対する抗酸化剤 N-acetyl-L-cystein (NAC)の効果

始めに、放射線誘導アポトーシス経路におけるアポトーシスの実行とシトクロム *c* 遊離の時間的關係を明らかにすることを試みた。アポトーシス誘導の時間経過について、T34A ならびに D53A を過剰発現させた A549 細胞では 10 Gy 照射後 24 時間から LacZ 導入細胞に比べて有意にアポトーシスが増加し、48 時間で顕著にアポトーシスの割合が増加した (図 7A)。しかしながら、シトクロム *c* 遊離に関しては、変異サバイビンを導入していない A549 細胞でもすでに照射後 24 時間にはミトコンドリアからシトクロム *c* が放出されていることが明らかになった (図 7B)。続いて、このシトクロム *c* 遊離にレドックス制御が関与しているか調べるため、3つの抗酸化剤 NAC、Trolox ならびに S-PBN とフラビンタンパク質阻害剤 DPI を照射直後に培地に添加し、24 時間後に細胞を回収した。図 7C に示すように、すべての薬剤は照射により誘導されたシトクロム *c* の遊離を強く阻害した。加えて、NAC の照射後処理は変異サバイビンの導入により増強したアポトーシス誘導 (図 7D) とカスパーゼ 3 の活性化 (図 7E) を抑制した。これらの結果は、照射後に二次的に発生する ROS がミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離とアポトーシス誘導に関与していることを示している。

#### 3-2. 細胞内およびミトコンドリアでの ROS 産生に対する X線の効果

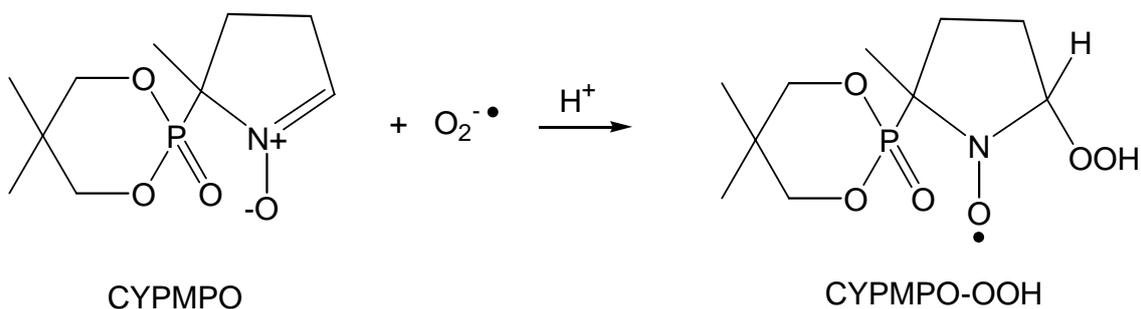
X線に誘導されるシトクロム *c* の遊離が ROS により調節されている可能性が示されたため(図 7C)、続いて照射後時間が経過してから細胞内 ROS 産生が増加するか検討した。この目的のために、細胞内 ROS を検出する二種類の蛍光プローブを実験に用いた。ひとつは細胞膜を通過して細胞内の ROS と反応し蛍光を

発する DCFDA であり、この試薬を A549 細胞にロードしてフローサイトメトリーを行うと照射後 12 時間の細胞では蛍光強度のピークが非照射の細胞に比べて右にシフトし、蛍光強度が放射線により増加することが示された (図 8A 左)。非照射細胞を 1 として照射による蛍光強度の経時的变化を棒グラフにすると、細胞内 ROS 産生は照射後 6 時間から上昇し、24 時間後まで有意に増加していた (図 8A 右)。さらに、この ROS 産生に必要な細胞内器官を明らかにするため、新規蛍光試薬 MitoAR を用いた実験を行った (図 8B)。この試薬は選択的にミトコンドリアに局在し ROS と反応して蛍光を発するため、ミトコンドリア由来の ROS を特異的に検出できることが報告されている<sup>38)</sup>。非照射細胞の培地に MitoAR を加えて 37°C で 30 分間インキュベートしたところ、図 8C 左に示すような弱い蛍光強度を持つ細胞群が観察された。照射から 6 時間後、同様に MitoAR を処理して蛍光顕微鏡で観察すると写真のような強い蛍光を持つ細胞を多数見ることができた(図 8C 中)。この強い蛍光を持つ細胞は、NAC を照射直後から 6 時間処理するとほとんど見みられなくなった(図 8C 右)。

### 3-3. A549 細胞から単離したミトコンドリアにおける NADH/succinate 依存的スーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )生成に対する X 線の効果

MitoAR を用いた観察により、X 線照射から 6 時間後の A549 細胞においてミトコンドリアからの ROS 産生が増加することが明らかになったことから(図 8C)、照射後二次的に生じる ROS の発生源としてミトコンドリアが強く示唆された。それを確かめるために、単離したミトコンドリアを用いた無細胞系においてスーパーオキシドの生成を ESR-スピントラップ法により検出した (図 9)。ミトコンドリアの酸素代謝において、その 3%程度の電子はミトコンドリア呼吸鎖から漏れ出てスーパーオキシドになると考えられている<sup>40)</sup>。よって、まず非照射の

A549 細胞から単離したミトコンドリアを呼吸鎖基質(5 mM succinate、glutamate ならびに malate)、0.5 mM NADH、0.2%ジギトニンならびに 10 mM CYPMPO と混和して反応液を作製した。0.2%の濃度のジギトニンはミトコンドリアの膜に穴を開け、ミトコンドリア機能を大きく抑制することなく NADH をミトコンドリア内に浸透させると報告されている<sup>41)</sup>。37°Cの温度制御下での ESR 測定により、25 分後には図 9A(I)に示したような ESR シグナルが得られた。このシグナルは SOD を添加することで完全に消失した (シグナル(V))。このシグナルを同定するために二つの構造異性体であるアイソマー A (Hfsc は  $A_N=1.34$  mT,  $A_H=1.34$  mT,  $A_P=5.15$  mT) と アイソマーB (Hfsc は  $A_N=1.35$  mT,  $A_H=1.07$  mT,  $A_P=4.95$  mT)に由来するスペクトルをコンピューター上で作成して重ね合わせたところ、図 9A(I)のスペクトルに極めて似たものが得られた (シグナル(VII))。この二つの構造体のシミュレーションに用いられた Hfsc は、以前、Kamibayashi らが報告しているスーパーオキシドと CYPMPO の反応によって生じた CYPMPO-OOH の Hfsc とほぼ同じであった<sup>42)</sup>。さらに、スーパーオキシドの発生系として確立されているヒポキサンチン (HX)/キサンチンオキシダーゼ (XOD)系により得られたスーパーオキシドと CYPMPO を反応させたところ、シグナル(VI)が得られた。このシグナルは、シミュレーションや以前報告された CYPMPO-OOH の Hfsc とほぼ同じであった。以上の事実により、シグナル(I)は以下の反応式のようにスーパーオキシドと CYPMPO が反応して形成された CYPMPO-OOH スピンアダクトを示していると考えられた。



続いて呼吸鎖基質の必要性を調べたところ、このシグナル(I)からジギトニンまたは succinate を除去することで著しく小さくなり (シグナル(II)および(III))、NADH の除去でほとんど見えなくなった (シグナル(IV))。また、反応液混和後の 37°C インキュベートによる (I)~(IV) のシグナルの低磁場から 5 番目のシグナル強度(h)の経時変化をグラフにすると、CYPMPO-OOH アダクトによる ESR シグナルの強さは時間依存的に増加し、25分で最大になることを確認した(図 9B)。このように、A549 細胞から単離したミトコンドリアにおける NADH/succinate 依存的なスーパーオキシド生成を検出できたので、非照射細胞と照射細胞でそのシグナルの大きさを比較した(図 9C)。照射後 6 時間の細胞から単離したミトコンドリアから得られるシグナルは非照射細胞から得られるシグナルよりも大きくなり、タンパク質濃度で標準化すると有意に増加 (約 1.6 倍) していることが明らかになった(図 9D)。

### 3-4. X 線照射によるミトコンドリアの形態と膜電位( $\Delta\psi_m$ )の変化

ミトコンドリアから産生されるスーパーオキシドが X 線照射により増加するメカニズムを調べるため、照射後の A549 細胞の電子顕微鏡による形態学的観察とミトコンドリア膜電位( $\Delta\psi_m$ )の測定を行い X 線照射がミトコンドリアに与える影響を調べた。アポトーシス刺激から数日後にアポトーシスに陥った細胞ではミトコンドリアは機能不全となり、形態学的な腫大や $\Delta\psi_m$  の崩壊などが観察

されることが知られている。しかし、刺激後数時間から一日以内のミトコンドリアの変化については不明なため、電子顕微鏡による形態学的観察を行ったところ照射後 12 時間および 24 時間ではミトコンドリアの形態に大きな変化は見られなかった(図 10)。続いて、 $\Delta\psi_m$  依存的にミトコンドリアに取り込まれる蛍光試薬 DiOC<sub>6</sub>(3)を用いてフローサイトメトリーを行ったところ、蛍光強度は非照射細胞の 4.8%から照射後 12 時間では 28.6%に、24 時間では 35.0%に増加し、この $\Delta\psi_m$ の上昇は 48 時間後まで持続した(図 11)。以上のように、X 線照射後シトクロム *c* の遊離やミトコンドリアでの ROS 産生が増加している時間ではミトコンドリアの形態は保たれ膜電位は過分極していたことから、照射された A549 細胞ではミトコンドリアが活性化状態にある可能性が示された。

### 3-5. X 線照射による酸素消費量の変化

ミトコンドリアからの ROS 産生が上昇する時間においてミトコンドリアが活性化していることが示されたので(図 11)、呼吸鎖が亢進した結果漏れ出るスーパーオキシドが増加している可能性を考えた。よって、呼吸鎖が亢進している指標のひとつとして ESR によるオキシメトリーを行い、酸素消費量の変化を観察した(図 12)。酸素プローブとして用いた LiNc-BuO は安定なフリーラジカル化合物であり(図 12A)、培地中に溶け込んでいる常磁性体である酸素(三重項酸素)と相互作用し、その磁気緩和効果により酸素濃度に比例して ESR スペクトルの線幅(line width)が広がっていくという特徴を持つ<sup>39,43)</sup>。この酸素プローブと非照射細胞を混和して 37°C でインキュベートすると、時間依存的に線幅が徐々に狭くなっていくことが観察された(図 12B)。これは、細胞によって酸素が消費されることにより酸素濃度が徐々に低下していったことを示している。一方、照射後 6 時間の細胞から得られたシグナルは非照射細胞のものに比べて線幅の

狭くなり方が急激であることが示された。これらの線幅から変換式を用いて酸素濃度を算出すると、図 12C に示すように照射された細胞では非照射細胞よりも酸素消費率が大きいことが示された。また、この酸素消費率の増大はミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤であるロテノンにより阻害されたことから、照射後 6 時間の細胞ではミトコンドリアの呼吸鎖の亢進により酸素消費量が増加したと考えられる。

### 3-6. X 線に誘導される Bcl-2 ファミリーの発現に対する NAC の効果

最後に、ミトコンドリアからのシトクロム *c* の遊離は一般的にアポトーシス促進作用を持つ Bcl-2 ファミリータンパク質(Bax)とアポトーシス抑制作用を持つ Bcl-2 ファミリータンパク質(Bcl-2 と Bcl-X<sub>L</sub>)のバランスで調節されているため、Bcl-2 ファミリータンパク質の照射後の発現の変動とミトコンドリアへの局在化を調べた (図 13)。まず、X 線照射による Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> ならびに Bax の発現の変化をウエスタンブロットにて調べた。図 13A に示すように、アポトーシス抑制作用を持つ Bcl-2 ならびに Bcl-X<sub>L</sub> の発現は照射後 12 時間から 36 時間にかけて徐々に増加したが、アポトーシス促進作用を持つ Bax は照射後 6 時間および 12 時間で顕著に増加し、Bcl-2 に対する Bax の比(Bax/Bcl-2)も同じ時間でピークに達した。続いて Bax とレドックス制御の関係を明らかにするために、照射後 12 時間に認められた Bcl-2 ファミリータンパク質の発現に対する NAC の照射後処理の効果を検討した。図 13B に示すように、NAC の照射後処理は放射線に誘導された Bax、Bcl-2 ならびに Bcl-X<sub>L</sub> の発現を抑えなかった。これらの結果とシトクロム *c* が照射後 24 時間に遊離されることから (図 7B)、Bax の発現上昇は ROS による制御の上流に位置していることが示唆された。さらに、非照射および照射後の細胞からミトコンドリア分画を分離しウエスタンブロッ

トを行ったところ、図 6C に示したように照射から 6 時間および 12 時間後に Bax がミトコンドリアへ集積し、Bcl-2 は大きな変化を示していないことが明らかになった。また、ミトコンドリア分画のシトクロム *c* は照射後 24 時間で低下しており、これはシトクロム *c* がミトコンドリアから遊離したことを示すものである。

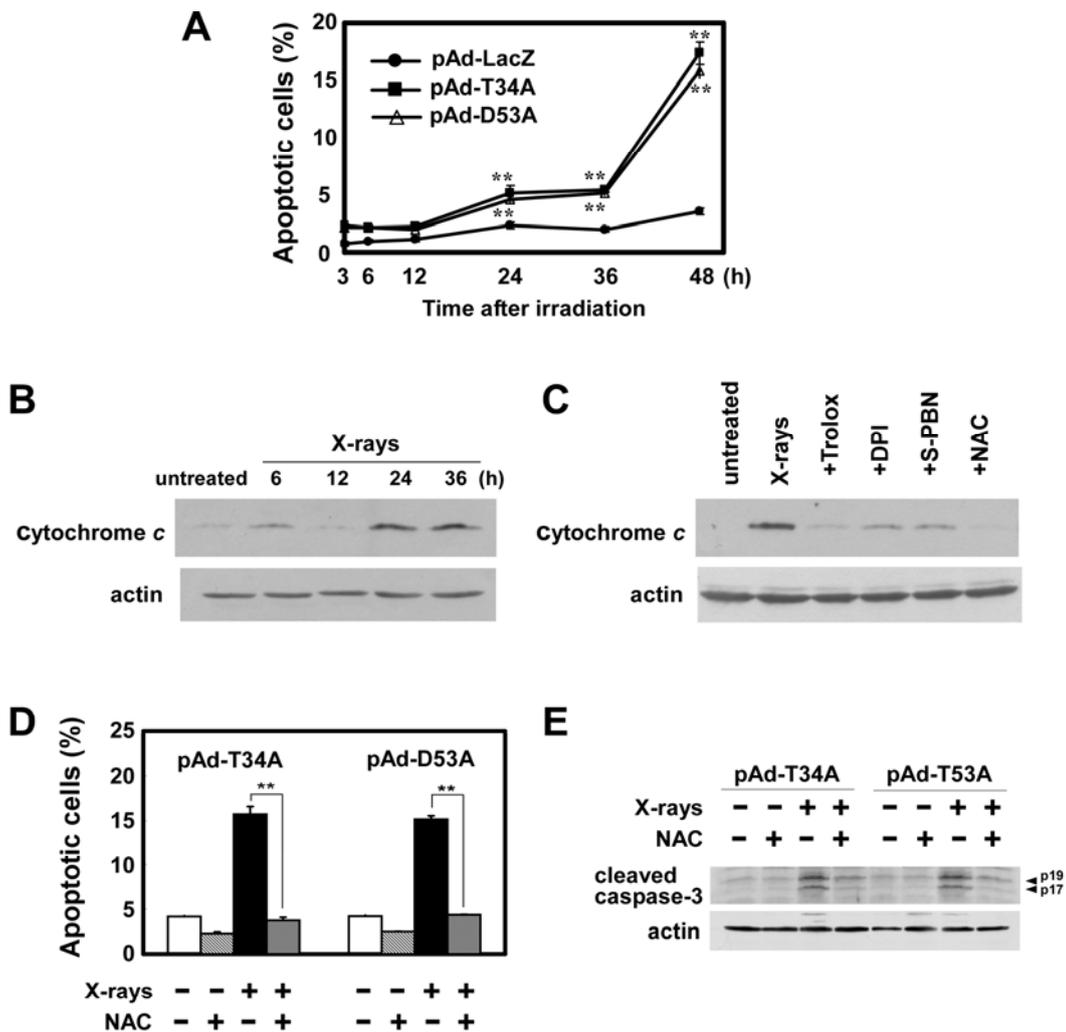


図7. X線により誘導されたミトコンドリアからのシトクロムc遊離とカスパーゼ活性化に対する抗酸化剤 N-acetyl-L-cystein (NAC)の効果  
 (A)サビインタンパク質を発現したA549細胞に10 Gyを照射し、3、6、12、24、36、48時間後のアポトーシス誘導をPI染色にて検出し定量化した。グラフは平均±S.E.で表示し、統計学的有意差はLacZ導入細胞群に対して\*\* $p < 0.01$ で示した。  
 (B)非照射ならびに照射から6、12、24、36時間後の細胞を回収して細胞質分画を分離し、ウエスタンブロットにてシトクロムcの遊離を調べた。  
 (C)照射直後にTrolox (10 mM)、DPI (70  $\mu$ M)、S-PBN (15 mM)ならびにNAC (20 mM)を培地に添加し、24時間後に細胞質分画を分離してウエスタンブロットにてシトクロムcの遊離を調べた。  
 (D)照射直後にNAC (20 mM)を培地に添加し、48時間後のアポトーシス誘導をPI染色にて検出し定量化した。グラフは平均±S.E.で表示し、統計学的有意差は照射細胞群に対して\*\* $p < 0.01$ で示した。  
 (E)照射直後にNAC (20 mM)を培地に添加し、48時間後にウエスタンブロットによるカスパーゼ3の活性化断片の検出を行った。

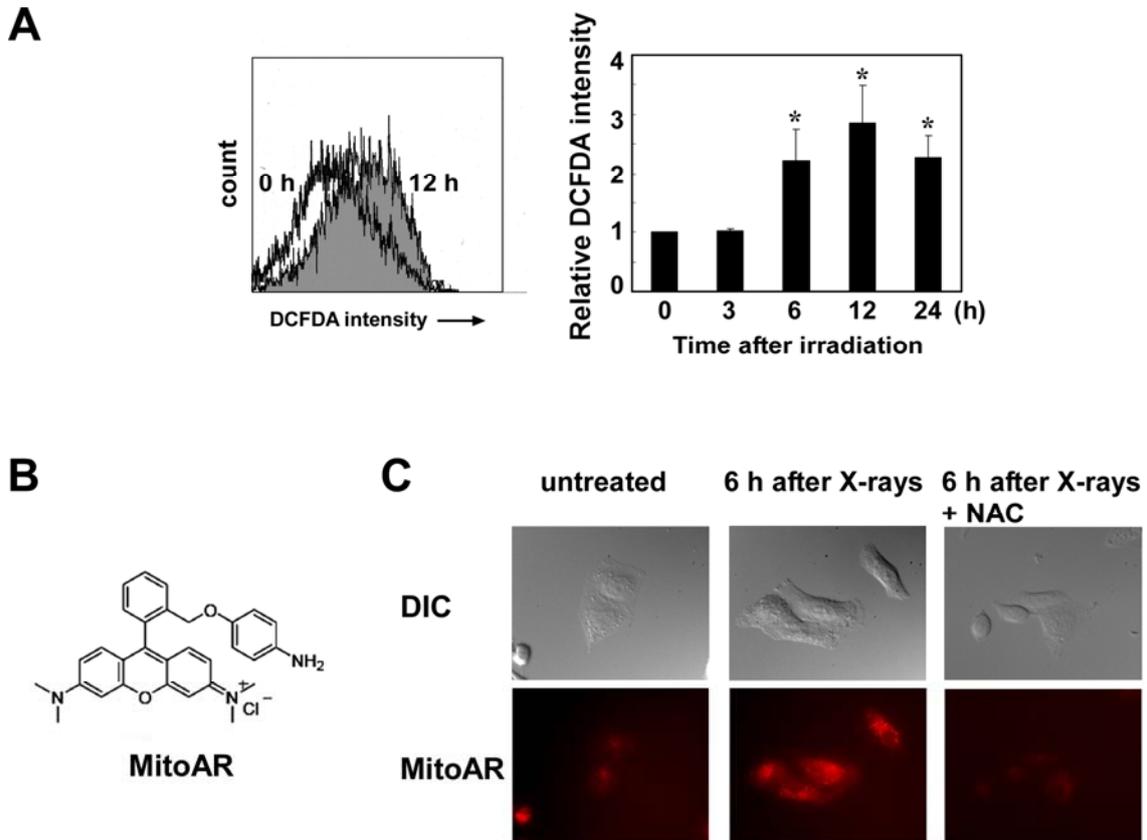


図8. 細胞内およびミトコンドリアでのROS産生に対するX線の効果

(A)左: 非照射および照射から12時間後の細胞に2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) ( $10 \mu\text{M}$ )を $37^\circ\text{C}$ 、30分間処理して得られる典型的なフローサイトメトリーのプロファイル。右: 非照射および照射から3、6、12、24時間後の細胞にDCFDAを処理してフローサイトメトリーを行い、非照射細胞に対する蛍光強度を示した。グラフは平均+S.E.で表示し、統計的有意差は非照射細胞群に対して $*p < 0.05$ で表示した。

(B)MitoARの化学構造式。

(C)非照射(左)および照射から6時間後(中)および照射直後にNAC (20 mM)を処理して6時間後(右)の細胞にMitoAR ( $1 \mu\text{M}$ )を $37^\circ\text{C}$ 、30分間処理し、微分干渉 (DIC) および蛍光 (MitoAR) 顕微鏡で観察した。

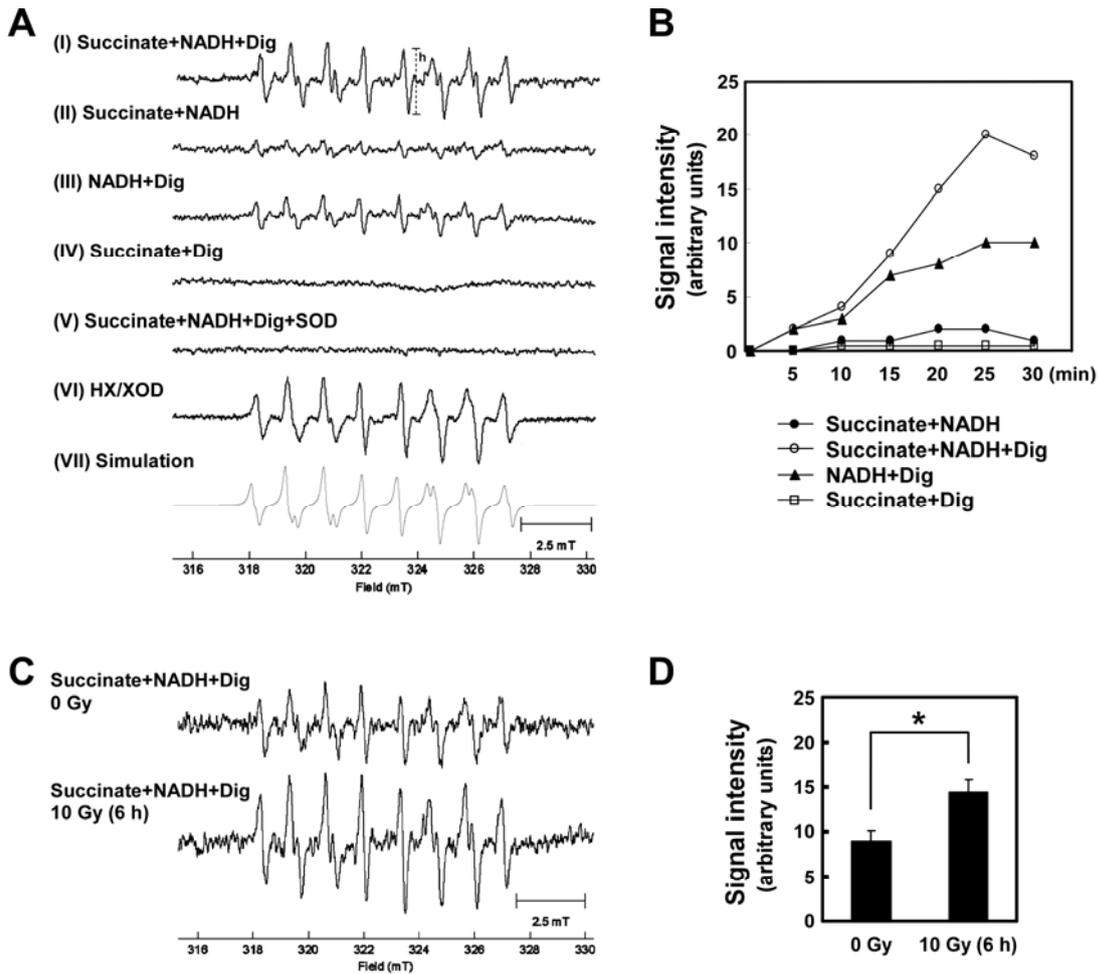


図9. A549細胞から単離したミトコンドリアにおけるNADH/Succinate依存性スーパーオキシド( $O_2^-$ )生成  
 (A)スピントラップ剤CYPMPOを用いて得られたESRスペクトル。(I)~(V)単離したミトコンドリア、CYPMPOおよび上記の薬剤を混合して37°C、25分間インキュベートした。(VI)ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系においてCYPMPOを用いて得られるESRスペクトル。(VII)コンピューターによるシミュレーション。低磁場から5番目のシグナル強度をhとした。  
 (B)(A)の(I)~(IV)のESRシグナル強度(h)の典型的な経時的変化。  
 (C)非照射ならびに照射から6時間後の細胞より単離したミトコンドリアから得られたESRスペクトル。  
 (D)(C)で得られたシグナル強度をタンパク質濃度で標準化した。グラフは平均+S.E.で表示し、統計的有意差は非照射細胞群に対して\*: $p < 0.05$ で表示した。

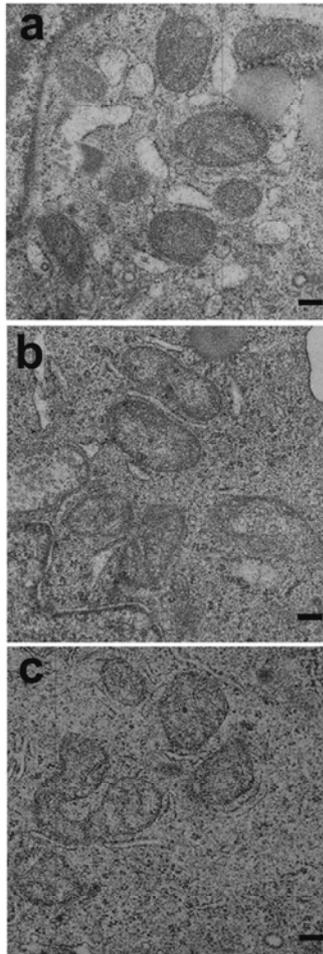


図10. 電子顕微鏡によるX線照射後のミトコンドリアの形態学的観察

非照射(a)ならびに照射後12時間(b)および24時間(c)のA549細胞の電子顕微鏡像。  
Bar=200 nM

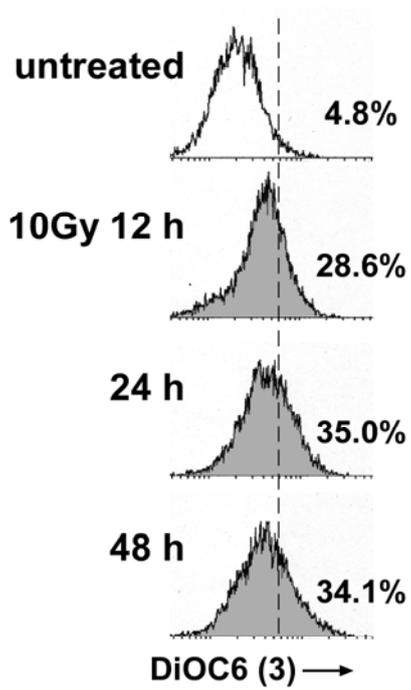


図11. ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\psi_m$ )に対するX線の効果

非照射ならびに照射から12、24、48時間後のA549細胞を回収し、DiOC6(3)染色を用いたフローサイトメトリーを行った。

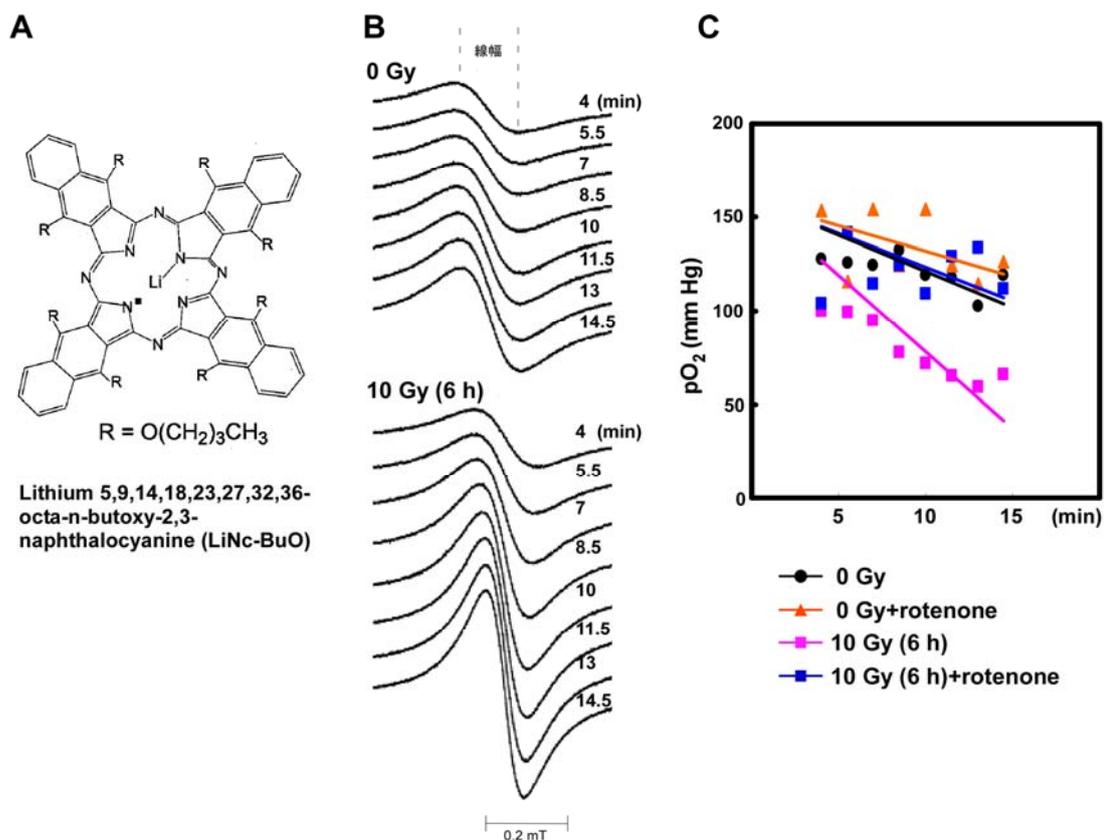


図12. 酸素消費量の変化に対するX線の効果

(A)酸素プローブLithium 5,9,14,18,23,27,32,36-octa-n-butoxy-2,3-naphthalocyanine (LiNc-BuO)の化学構造式。

(B)非照射ならびに照射から6時間後のA549細胞と酸素プローブを混和して37°Cでインキュベートしたときに得られるシグナルの経時的変化。二例のうち一例を示した。

(C)非照射ならびに照射から6時間後のA549細胞と酸素プローブをロテノン(2 μM)存在下または非存在下で混和し、37°Cでインキュベートして得られたシグナルの線幅(line width)から酸素消費量の変化を算出した。

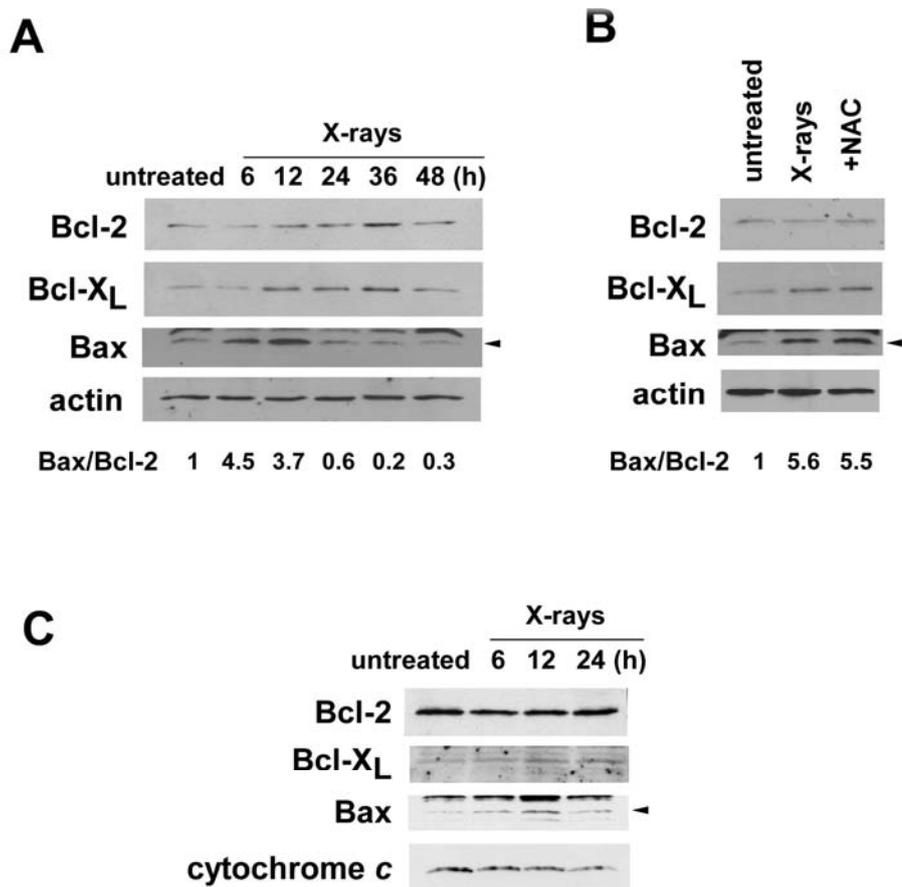


図13. X線により誘導されるBcl-2ファミリータンパク質の発現に対するNACの効果  
 (A)非照射および10 Gy照射から6、12、24、36、48時間後の細胞を回収し、Bcl-2ファミリータンパク質の発現をウエスタンブロットにて調べた。  
 (B)照射直後に培地にNAC(20 mM)を添加し、12時間後の細胞におけるBcl-2ファミリータンパク質の発現をウエスタンブロットにて調べた。  
 (C)非照射および照射から6、12、24時間後の細胞を回収してミトコンドリア分画を分離し、Bcl-2ファミリータンパク質ならびにシトクロムcのミトコンドリアへの集積をウエスタンブロットにて調べた。

#### 4. 考察

放射線により誘導されるアポトーシスではミトコンドリアは重要な役割を果たしており、ミトコンドリア膜間からのシトクロム *c* 遊離はアポトーシスの実行に重要な役割を果たしている。しかしながら、シトクロム *c* 遊離の詳細なメカニズムは明らかになっていない。近年、放射線により二次的に生じた ROS がアポトーシスに関与していることが示されたことから、第二章では A549 細胞における X 線が誘導するミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離のレドックス制御について検討した。結果として、照射後 24 時間に見られたシトクロム *c* 遊離は抗酸化剤 NAC、Trolox、S-PBN とフラビンタンパク質阻害剤 DPI を照射後に処理することにより強く抑制された (図 7C)。水の放射線分解により一次的に生じる ROS は  $10^{-9}$  秒以内に細胞内分子と反応して消え去ると考えられているため<sup>33,34)</sup>、この結果は照射により二次的に生じてくる ROS がアポトーシスの引き金となるミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離に密接に関与していることを示している。

ROS は細胞内の様々な反応の過程で生成されるが、主な発生源はミトコンドリアと細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼ(NOX)である。近年、T 細胞性白血病細胞において  $\gamma$  線が誘導するシトクロム *c* 遊離とアポトーシスがミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤ロテノンにより抑制されることが示されるなど<sup>17)</sup>、アポトーシスに関係する ROS の発生源としてミトコンドリアを示唆する報告がなされている。しかし、これらの研究および本研究で細胞内 ROS を検出するために用いた DCFDA はスーパーオキシドから生じた  $H_2O_2$  により酸化されて蛍光を発すると考えられているが、金属イオンやヘムタンパク質にも触媒されてしまうことがあるため正確さに欠けることが示されている<sup>44)</sup>。本研究では、放射線照射後に二次的に腫瘍細胞内で産生される ROS の発生源としてミトコン

ドリアを示す直接的な証拠を得るために、ミトコンドリアの ROS を特異的に検出する MitoAR を用いた生細胞の観察 (図 8C) および単離したミトコンドリアからのスーパーオキシド生成の ESR スピントラッピング法による検出 (図 9) を行った。MitoAR を用いた観察では、図 8C に示すように照射後 6 時間にはミトコンドリアでの ROS 産生が増加していることが明らかになった。ESR スピントラッピング法では、スーパーオキシドに対する反応性とスピンアダクトの安定性が高い新規スピントラッピング剤 CYPMPO を用い、単離したミトコンドリアからの呼吸鎖基質依存的なスーパーオキシド生成を検出することに成功した (図 9A)。そのスーパーオキシド生成は照射後 6 時間の細胞から単離したミトコンドリアでは非照射細胞に比べて有意に増強した (図 9D)。以上の結果から、X 線を照射された腫瘍細胞内ではシトクロム *c* 遊離に先だってミトコンドリアでのスーパーオキシド産生が増加することが直接的に証明された。その詳細なメカニズムは明らかになっていないが、三つの可能性が考えられる。

第一に、放射線による二次的な細胞内 ROS 上昇の原因として照射により呼吸鎖が活性化して漏れ出るスーパーオキシドが増加した可能性が挙げられる。というのは、通常ミトコンドリアから生じるスーパーオキシドは呼吸鎖からの漏れであると考えられているためである<sup>40,41)</sup>。ミトコンドリアの呼吸鎖では電子伝達の過程でマトリックスから外膜と内膜の膜間へプロトンをくみ出し、その電気化学的濃度勾配により形成されたミトコンドリア膜電位( $\Delta\psi_m$ )を利用して ATP を合成している。図 11 に示したように照射後 12 時間から 48 時間まで  $\Delta\psi_m$  は上昇していたことから、照射により呼吸鎖が亢進してプロトンがくみ出された結果、過分極したと考えられる。さらに、細胞に取り込まれる酸素のほぼ 90% が呼吸鎖での反応に使われることから、ESR によるオキシメトリーで観察された照射細胞での酸素消費量の増大も呼吸鎖が亢進していることを示唆している。

実際、Gudz らは X 線照射された胸腺細胞では酸素消費量が増加し、それがミトコンドリア呼吸鎖の ATP 合成酵素阻害剤で抑制されることを報告している<sup>45)</sup>。次に、ミトコンドリアからのシトクロム c 遊離を制御していると考えられている Bcl-2 ファミリータンパク質の関与である。

放射線による二次的な細胞内 ROS 上昇の考えられる第二の原因として、Bax の発現上昇とそのミトコンドリアへの集積が考えられる。一般的に、シトクロム c 遊離はアポトーシス刺激により細胞質に存在する Bax がミトコンドリアへ集積して多量体化することが重要であるとされている<sup>46)</sup>。図 13 に示すように、X 照射により Bax の発現とミトコンドリアへの集積は 6 時間および 12 時間後に顕著に上昇した。しかし、X 線に誘導された Bax の発現上昇は NAC を照射後処理しても抑制されなかったことから、アポトーシスシグナルにおいて Bax は ROS 産生の上流に位置していると考えられる。Kirkland らの報告では、神経成長因子 (NGF) の欠乏により生じる神経細胞のアポトーシスは、Bax の細胞質からミトコンドリアへの移動と細胞内 ROS の上昇により引き起こされるシトクロム c 遊離を介して誘導されることが示されている<sup>47)</sup>。さらに、組み換え体の Bax と単離したミトコンドリアを混和するとミトコンドリアから生成するスーパーオキシドが増加することも報告されている<sup>48)</sup>。以上の観察から、放射線により誘導された Bax の発現上昇およびミトコンドリアへの集積がシトクロム c 遊離の原因となるミトコンドリアからの ROS 生成を調節していると考えられる。しかしながら、Bax が ROS 産生を増加させるメカニズムとして、呼吸鎖への直接作用や多量体化した Bax により新たに形成された孔を通じて呼吸鎖に必要な基質が多く取り込まれてミトコンドリアが活性化する<sup>49)</sup>などの理由が推測されているが明らかになっていない。

最後に、放射線による二次的な細胞内 ROS 上昇の原因として挙げられるのは、

ミトコンドリアに存在する ROS 産生に関与する酵素が放射線照射により変化した可能性である。Lee らの報告では、酸化ストレスに対する細胞防御に重要なミトコンドリアの NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (IDPms) を過剰発現させると γ 線が誘導する細胞内の ROS 産生とアポトーシスが減少することが示されている<sup>50)</sup>。また、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II (succinate dehydrogenase) のサブユニットを siRNA で抑制するとミトコンドリアからの ROS 産生が増加するという報告もある<sup>51)</sup>。今後、こうしたミトコンドリア呼吸鎖に関連するタンパク質発現の放射線に対する応答を検討することがメカニズムの解明に重要であると思われる。一方、ミトコンドリア以外のもうひとつの主要な ROS の発生源である NOX ファミリーに属するタンパク質の発現が放射線により上昇するという報告もあり<sup>52)</sup>、腫瘍細胞では NOX1 と NOX4 の発現上昇が知られていることから、NOX から発生する ROS の今後関与も検討する必要がある。

本研究では、X 線によりミトコンドリアからスーパーオキシド産生が増加し、放射線誘導アポトーシスに必要なミトコンドリアからのシトクロム c 遊離を引き起こしていることが明らかになった。さらに、このミトコンドリアでのスーパーオキシド産生の増加は、X 線により発現が上昇した Bax がミトコンドリアへ集積しミトコンドリア呼吸鎖を活性化したことがひとつの原因であると考えられた。

## 5. 小括

本章では、固形腫瘍細胞において X 線照射後二次的にミトコンドリアからの ROS 産生が上昇するのか、またそれらが放射線誘導アポトーシス経路におけるミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離に関与しているのか検討を行った。X 線照射により誘導されたミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離は、抗酸化剤 NAC、Trolox、S-PBN ならびにフラビンタンパク質阻害剤 DPI の照射後処理により強く抑制された。細胞内の ROS を検出する蛍光試薬 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) を用いたフローサイトメトリーおよびミトコンドリア由来の ROS を検出する新規蛍光プローブ MitoAR を用いた生細胞の観察により、照射から 6 時間後には細胞内、特にミトコンドリアでの ROS 産生が増加することが明らかになった。さらに、細胞から単離したミトコンドリアを用いてスピントラップ剤 CYPMPO による ESR-スピントラップ法を行ったところ、照射によりミトコンドリア呼吸鎖基質 NADH/succinate 依存性スーパーオキシド生成が増加した。また、照射によりミトコンドリア膜の電位差の増大、ESR オキシメトリーによる酸素消費量の増加および Bax の発現増加とミトコンドリアへの集積が観察された。以上の結果から、X 線照射によりミトコンドリアへ集積した Bax がミトコンドリア呼吸鎖を活性化し、それによって産生が増加したスーパーオキシドが増放射線誘導アポトーシスに重要なミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離を引き起こしていることが明らかになった。

## <総括>

一般的に、DNAに損傷を与えるような放射線や制癌剤処理は、ミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離とそれに続くカスパーゼの活性化を介したアポトーシス経路を活性化すると考えられている。しかしながら、放射線抵抗性の固形腫瘍ではアポトーシスの実行を伴わずにシトクロム *c* 遊離が観察されることがあるため、内因性の抗アポトーシス因子がアポトーシスシグナルをミトコンドリアの下流で抑制していると考えられる。第一章において、そのような因子としてサバイビンに着目し、サバイビンのドミナントネガティブタンパク質(T34AまたはD53A)の導入によるその機能の阻害によりA549細胞で放射線誘導アポトーシスを促通できることを証明した。このように、シトクロム *c* 遊離は放射線感受性の造血系由来細胞だけでなく、サバイビン機能の阻害により誘導された放射線誘導アポトーシスでも重要な役割を果たしている。しかしながら、ミトコンドリアからシトクロム *c* が遊離する詳細なメカニズムは明らかになっていない。

近年、放射線誘導アポトーシスがレドックス制御を受けていることが明らかになってきた。レドックス(redox)とは還元(reduction)と酸化(oxidation)をあわせた造語であり、狭義にはタンパク質システイン残基上のチオール基の酸化還元に基づく可逆的構造変化により種々の細胞機能を制御することと定義されている。しかし、広義には細胞内外の酸化還元状態により生体の恒常性(ホメオスタシス)が制御されることを意味しており、細胞増殖、分化、細胞死などに重要な役割を果たしている。活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)はレドックス制御に関わる代表的な因子であるが、一般的に短寿命であることから検出が難しく、反応生成物や蛍光プローブなどにより間接的に検出されることが多い。ESR法はROSのうちOH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NOなどのフリーラジカルを検出する方法として有用で

あり、直接的に酸素ラジカルをとらえることができる。中でも酸素ラジカルをニトロ系やニトロン系の化合物と反応させて比較的寿命が長いニトロオキシドラジカルに変換し、そのスペクトルからラジカル構造を同定して半定量化するというスピントラップ法がよく用いられている。第二章では、これらの手法を用いて腫瘍細胞から単離したミトコンドリアからのスーパーオキシド生成が X 線照射により増加することを明らかにした。好気性生物はミトコンドリア呼吸鎖で酸素を消費しながらエネルギーを産生するため、このスーパーオキシドは照射を受けた細胞内で生存や DNA 修復、細胞死に対応するために ATP 産生が亢進した結果ミトコンドリア呼吸鎖から漏れ出たものであるかもしれない。本研究ではこれらのスーパーオキシドが放射線誘導アポトーシス経路におけるシトクロム *c* 遊離に関与している可能性を示したが、放射線に誘導される他のシグナル経路においても重要な役割を果たしていると考えられる。

結論として、本研究では固形腫瘍細胞内ではサバイビンが Smac/DIABLO の機能阻害を介してシトクロム *c* 遊離まで進んだ放射線誘導アポトーシスをミトコンドリアの下流で抑制しており、サバイビンのドミナントネガティブタンパク質の発現によりそのサバイビンの機能を抑制することで放射線の細胞致死効果を増強できることが明らかになった。さらに、放射線誘導アポトーシス経路で重要な役割を果たしているミトコンドリアからのシトクロム *c* 遊離は、照射により増加したミトコンドリアからのスーパーオキシド生成により制御されていることが示された。また、このスーパーオキシド産生の増加は、照射を受けて Bax がミトコンドリアへ集積したことによるミトコンドリア呼吸鎖の亢進に由来している可能性が示唆された。放射線抵抗性の固形腫瘍細胞における放射線誘導アポトーシス経路とその抵抗性を明らかにすることは、新たな分子標的を見つけ効果的な癌治療を行う上で重要であると考えられる。

<謝辞>

本稿を終えるにあたり、御指導賜りました北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座放射線学教室の稲波修教授に深く感謝致します。本論文を御校閲頂きました本研究科比較形態機能学講座薬理学教室太田利男准教授、生化学教室木村和弘教授ならびに桑原幹典北海道大学名誉教授に厚く御礼申し上げます。試薬を供与して下さいました東京大学大学院薬学系研究科長野哲男教授ならびに北海道教育大学函館校中村秀夫准教授に謹んで御礼申し上げます。また、電子顕微鏡によるミトコンドリア観察に際して本研究科比較形態機能学講座解剖学教室昆泰寛教授の御指導に対し厚く御礼申し上げます。ミトコンドリアの $O_2$ 計測に対して御協力を頂きましたあさおクリニック大和田滋博士ならびに筑波技術大学東西医学統合医療センター平山暁教授に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたり、始終多大な御助言、御協力をして下さった本研究科環境獣医科学講座浅沼武敏准教授ならびに放射線学教室各位に心から感謝致します。

<引用文献>

- 1 Verheij, M. and Bartelink, H. 2000. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.*, 301: 133-142.
- 2 Hamasu, T., Inanami, O., Asanuma, T. and Kuwabara, M. 2005. Enhanced induction of apoptosis by combined treatment of human carcinoma cells with X rays and death receptor agonists. *J. Radiat. Res.*, 46: 103-110.
- 3 Green, D.R. and Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312.
- 4 Du, C. Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102: 33-42.
- 5 Takahashi, K., Inanami, O., Hayashi, M. and Kuwabara, M. 2002. Protein synthesis-dependent apoptotic signalling pathway in X-irradiated MOLT-4 human leukaemia cell line. *Int. J. Radiat. Biol.*, 78: 115-124.
- 6 Inanami, O., Iizuka, D., Iwahara, A., Yamamori, T., Kon, Y., Asanuma, T., Matsuda, A., Kashiwakura, I., Kitazato, K. and Kuwabara, M. 2004. A novel anticancer ribonucleoside, 1-(3-C-ethynyl- $\beta$ -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine, enhances radiation-induced cell death in tumor cells. *Radiat. Res.*, 162: 635-645.
- 7 Yasui, H., Inanami, O., Asanuma, T., Iizuka, D., Nakajima, T., Kon, Y., Matsuda, A. and Kuwabara, M. 2007. Treatment combining X-irradiation and a ribonucleoside anticancer drug, TAS106, effectively suppresses the growth of tumor cells transplanted in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 68: 218-228.
- 8 Schmitt, C.A. and Lowe, S.W. 1999. Apoptosis and therapy. *J. Pathol.*, 187: 127-137.

- 9 Rotman, M. and Aziz, H. 1990. Concomitant continuous infusion chemotherapy and radiation. *Cancer*, 65 :823-835.
- 10 Ma, B.B., Bristow, R.G., Kim, J. and Siu, L.L. 2003. Combined-modality treatment of solid tumors using radiotherapy and molecular targeted agents. *J. Clin. Oncol.*, 21: 2760-2776.
- 11 Iizuka, D., Inanami, O., Kashiwakura, I. and Kuwabara, M. 2007. Purvalanol a enhances cell killing by inhibiting up-regulation of Cdc2 kinase activity in tumor cells irradiated with high doses of x rays. *Radiat. Res.*, 167: 563-571.
- 12 Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C. and Altieri, D.C. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by Survivin. *Nature*, 396: 580-584.
- 13 Muchmore, S.W., Chen, J., Jakob, C., Zakula, D., Matayoshi, E.D., Wu, W., Zhang, H., Li, F., Ng, S.C. and Altieri, D.C. 2000. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein Survivin. *Mol. Cell*, 6: 173-182.
- 14 Altieri, D.C. and Marchisio, P.C. 1999. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab. Invest.*, 79: 1327-1333.
- 15 Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J.J., Maestre, J., Martin, C., Font, A., Barnadas, A. and Abad, A. 1999. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J. Clin. Oncol.*, 17: 2100-2104.
- 16 Adida, C., Haioun, C., Gaulard, P., Lepage, E., Morel, P., Briere, J., Dombret, H., Reyes, F., Diebold, J., Gisselbrecht, C., Salles, G., Altieri, D.C. and Molina, T.J. 2000. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 96: 1921-1925.

- 17 Lee, Y.J., Lee, D.H., Cho, C.K., Chung, H.Y., Bae, S., Jhon, G.J., Soh, J.W., Jeoung, D.I., Lee, S.J. and Lee, Y.S. 2005. HSP25 inhibits radiation-induced apoptosis through reduction of PKC $\delta$ -mediated ROS production. *Oncogene*, 24: 3715-3725.
- 18 Ni, Y., Gong, X.G, Lu, M., Chen, H.M. and Wang, Y. 2008. Mitochondrial ROS burst as an early sign in sarsasapogenin-induced apoptosis in HepG2 cells. *Cell Biol. Int.*, 32: 337-343.
- 19 Inanami, O., Takahashi, K. and Kuwabara, M. 1999. Attenuation of caspase-3-dependent apoptosis by Trolox post-treatment of X-irradiated MOLT-4 cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 155-163.
- 20 Hamasu, T., Inanami, O., Tsujitani, M., Yokoyama, K., Takahashi, E., Kashiwakura, I. and Kuwabara, M. 2005. Post-irradiation hypoxic incubation of X-irradiated MOLT-4 cells reduces apoptotic cell death by changing the intracellular redox state and modulating SAPK/JNK pathways. *Apoptosis*, 10: 557-567.
- 21 Deveraux, Q. and Reed, J.C. 1999. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13: 239-252.
- 22 O'Connor, D.S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P.C. and Altieri, D.C. 2000. Regulation of apoptosis at cell division by p34Cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 13103-13107.
- 23 Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T. and Reed, J.C. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer*

*Res.*, 58: 5315-5320.

- 24 Mesri, M., Wall, N.R., Li, J., Kim, R.W. and Altieri, D.C. 2001. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J. Clin. Invest.*, 108: 981-990.
- 25 Ogura, A. 2005. Overexpression of survivin mutants enhances radiation-induced apoptosis in mouse fibroblast NIH3T3 cells. *Jpn. J. Vet. Res.*, 53: 103-104.
- 26 Banks, D.P., Plescia, J., Altieri, D.C., Chen, J., Rosenberg, S.H., Zhang, H. and Ng, S.C. 2000. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood*, 96: 4002-4003.
- 27 Verdecia, M.A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D.A., Hunter, T. and Noel, J.P. 2000. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat. Struct. Biol.*, 7: 602-608.
- 28 Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. 2001. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104: 791-800.
- 29 Song, Z., Yao, X. and Wu, M. 2003. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 278: 23130-23140.
- 30 Song, Z., Liu, S., He, H., Hoti, N., Wang, Y., Feng, S. and Wu, M. 2004. A single amino acid change (Asp 53 --> Ala53) converts survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *Mol. Biol. Cell*, 15: 1287-1296.
- 31 Sun, C., Nettlesheim, D., Liu, Z. and Olejniczak, E.T. 2005. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry*, 44: 11-17.
- 32 Amitani, M. 2005. Suppression of cell proliferation in colon26 solid tumor by a treatment combining X irradiation and local injection of T34A mutant survivin

- fused with membrane permeable TAT peptide. *Jap. J. Vet. Res.*, 53: 103-104.
- 33 Riley, P.A. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 65: 27-33.
- 34 Wallace, S.S. 1998. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat. Res.*, 150: s60-s79.
- 35 Tominaga, H., Kodama, S., Matsuda, N., Suzuki, K. and Watanabe, M. 2004. Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *J. Radiat. Res.*, 45: 181-188.
- 36 Tsuzuki, T., Nakatsu, Y. and Nakabeppu, Y. 2007. Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 98: 465-470.
- 37 Chen, Q., Chai, Y.C., Mazumder, S., Jiang, C., Macklis, R.M., Chisolm, G.M. and Almasan, A. 2003. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome *c* release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ.*, 10: 323-334.
- 38 Koide, Y., Urano, Y., Kenmoku, S., Kojima, H. and Nagano, T. 2007. Design and synthesis of fluorescent probes for selective detection of highly reactive oxygen species in mitochondria of living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 10324-10325.
- 39 Fujii, H., Sakata, K., Katsumata, Y., Sato, R., Kinouchi, M., Someya, M., Masunaga, S., Hareyama, M., Swartz, H.M. and Hirata, H. 2008. Tissue oxygenation in a murine SCC VII tumor after X-ray irradiation as determined by EPR spectroscopy. *Radiother. Oncol.*, 86: 354-360.
- 40 Halliwell, B. and Gutteridge M.C. 1998. Free Radicals in Biology and Medicine, 3th ed. Oxford University Press Inc., New York.

- 41 Han, D., Williams, E. and Cadenas, E. 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.*, 353: 411-416.
- 42 Kamibayashi, M., Oowada, S., Kameda, H., Okada, T., Inanami, O., Ohta, S., Ozawa, T., Makino, K. and Kotake, Y. 2006. Synthesis and characterization of a practically better DEPMPO-type spin trap, 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO). *Free Radic. Res.*, 40: 1166-1172.
- 43 Pandian, R.P., Kutala, V.K., Parinandi, N.L., Zweier, J.L. and Kuppusamy, P. 2003. Measurement of oxygen consumption in mouse aortic endothelial cells using a microparticulate oximetry probe. *Arch. Biochem. Biophys.*, 420: 169-175.
- 44 Zielonka, J. and Kalyanaraman, B. 2008. "ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis"--a critical commentary. *Free Radic. Biol. Med.*, 45: 1217-1219.
- 45 Gudz, T.I., Pandelova, I.G. and Novgorodov, S.A. 1994. Stimulation of respiration in rat thymocytes induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 138: 114-20.
- 46 Youle, R.J. and Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9: 47-59.
- 47 Kirkland, R.A., Windelborn, J.A., Kasprzak, J.M. and Franklin, J.L. 2002. A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome *c* release during programmed neuronal death. *J. Neurosci.*, 22: 6480-6490.
- 48 Rodrigues, C.M., Solá, S., Sharpe, J.C., Moura, J.J. and Steer, C.J. 2003. Tauroursodeoxycholic acid prevents Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C release in isolated mitochondria. *Biochemistry*, 42: 3070-3080.

- 49 Harris, M.H., Vander Heiden, M.G, Kron, S.J. and Thompson, C.B. 2000. Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol. Cell Biol.*, 20: 3590-3596.
- 50 Lee, J.H., Kim, S.Y., Kil, I.S. and Park, J.W. 2007. Regulation of ionizing radiation-induced apoptosis by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 282: 28213385-13394.
- 51 Guzy, R.D., Sharma, B., Bell, E., Chandel, N.S. and Schumacker, P.T. 2008. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.*, 28: 718-731.
- 52 Tateishi, Y., Sasabe, E., Ueta, E. and Yamamoto, T. 2008. Ionizing irradiation induces apoptotic damage of salivary gland acinar cells via NADPH oxidase 1-dependent superoxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 366: 301-307.

## **Role of survivin in radiation-induced apoptosis and its redox regulation**

**Aki Ogura**

*Laboratory of Radiation Biology, Department of Environmental Veterinary Medical  
Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine,  
Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan*

Ionizing radiation is a useful tool for cancer therapy. In hematopoietic cell lines such as malignant lymphoma and leukemia cells, apoptotic cell death is prone to be induced by ionizing radiation. In these cell lines, ionizing radiation is known to easily promote apoptotic signaling such as cytochrome *c* release from mitochondria, followed by activation of caspase and caspase-activated DNase. However, in solid tumor cell lines derived from adenocarcinoma, squamous cell carcinoma or melanoma, the constitutive or inducible antiapoptotic proteins such as Bcl-2 family and the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family proteins seem to inhibit this apoptotic signaling. Survivin is a IAP family, which is intensively expressed in the G2/M phase and phosphorylated by cell division cycle 2 (CDC2), and known to have strongly antiapoptotic activity through interaction with Smac/DIABLO which acts as a proapoptotic protein. Its expression is prominently upregulated in most human cancer cells, but is undetectable or very low in normal tissues. Therefore, survivin seems to be an ideal target for radiosensitization in solid tumor cells. In this study, I firstly examined whether dominant negative vectors encoding survivin mutants, T34A (phosphorylation site by CDC2) and D53A (binding domain for smac/DIABLO) abrogate the function of

constitutive survivin and facilitate radiation-induced apoptotic cell death in tumor cells.

In first experiment, we prepared two adenoviral vectors for pAd-T34A and pAd-D53A to investigate the mechanism of radioresistance of solid tumor cells. When T34A and D53A were overexpressed in human lung carcinoma A549 and human cervical carcinoma HeLa cells, radiation-induced apoptosis was significantly enhanced. Furthermore, we examined the binding capability of survivin with Smac/DIABLO in the cells overexpressing these mutants. Coimmunoprecipitation analysis revealed that mutant forms of survivin, D53A and T34A, could bind to Smac/DIABLO but with much less affinity compared to the authentic form. These results suggest that radiation-induced apoptosis of tumor cells is increased by inhibition of the interaction between survivin and Smac/DIABLO through overexpression of T34A and D53A. These results indicated that radiation-induced apoptosis of tumor cells is increased by inhibition between survivin and Smac/DIABLO through overexpression of T34A and D53A, suggesting that survivin may be effective for therapeutic treatment in radioresistant solid tumors.

Recently, it has been reported that apoptosis in human leukemia Molt-4 cells is remarkably inhibited if antioxidants such as N-acetyl-L-cystein (NAC) and Trolox are added to the medium within several minutes after X irradiation. This suggests that the secondary production of ROS occurs as a late event after irradiation and that these secondary ROS play an important role in radiation-induced apoptotic signaling. Mitochondria in mammalian cells are well-known to play an important role in the intrinsic pathway of genotoxic-agent-induced apoptosis by releasing cytochrome *c* into cytosol and to be a major source of reactive oxygen species (ROS).

The second aim of this study was to examine whether mitochondrial ROS are

involved in radiation-induced apoptotic signaling in A549 cells. Post-irradiation treatment with NAC inhibited cytochrome *c* release from mitochondria but did not affect expression levels of Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax, suggesting that the late production of ROS triggered cytochrome *c* release. This treatment also inhibited radiation-induced apoptosis in T34A- and D53A-survivin-overexpressed A549 cells. Experiments using DCFDA (a classical ROS fluorescence probe) and MitoAR (a novel mitochondrial ROS probe) demonstrated that intracellular and mitochondrial ROS were enhanced 6 h after X irradiation. Furthermore, the ROS production ability of mitochondria isolated from A549 cells was evaluated by ESR spectroscopy combined with a spin-trapping reagent (CYPMPO). When isolated mitochondria were incubated with NADH, succinate and CYPMPO, an ESR spectrum due to CYPMPO–OOH was detected. This NADH/succinate-dependent ROS production from mitochondria of irradiated cells was significantly increased in comparison with that of unirradiated cells. Oxymetry using lithium 5,9,14,23,27,32,36-octa-n-butoxy-2,3-naphthalocyanine (LiNc-BuO) and ESR spectroscopy showed that oxygen consumption in irradiated A549 cells, which was inhibited by rotenone, a mitochondrial complex I inhibitor, was increased in comparison with that of unirradiated cells. These results indicate that ionizing radiation enhances the ROS production from mitochondria to trigger cytochrome *c* release in A549 cells.

In summary, present experiments clearly demonstrated that abrogation of the function of constitutive survivin facilitate radiation-induced apoptotic cell death in radioresistant solid tumor cells such as A549 and HeLa cells and radiation-induced secondary ROS from mitochondria play as an essential role in cytochrome *c* release from mitochondria in their apoptotic signal pathways.