

## 低線量放射線照射によるバイスタンダー効果誘導機構の解析

吉窪朝妃<sup>1</sup>、馬殿淳美<sup>1</sup>、和田成一<sup>1</sup>、柿崎竹彦<sup>1</sup>、後藤祥子<sup>2</sup>、

世良耕一郎<sup>3</sup>、伊藤伸彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北里大学獣医学部獣医学科獣医放射線学研究室  
034-8628 青森県十和田市東 23 番町 35-1

<sup>2</sup>(社) 日本アイソトープ協会滝沢研究所  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-1

<sup>3</sup>岩手医科大学サイクロトンセンター  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

### 1 はじめに

低線量放射線による影響の中でも特徴的なものとして、放射線による非標的効果 (Non-targeted effects) の誘導が注目されている<sup>1,2)</sup>。非標的効果とは、直接照射を受けていない細胞において、直接照射を受けた細胞で見られる放射線影響が誘導される現象であり、その原因の一つとしてバイスタンダー効果が注目されている。このメカニズムは、照射を受けた細胞から何らかのシグナルが発生し、それが非照射 (バイスタンダー) 細胞に伝わることによって照射影響が発現することによると考えられた。このシグナル伝達経路は細胞間接着を必要とするものと、必要としないものの 2 つが知られている。細胞間接着を必要とする経路では細胞間に形成されたギャップジャンクションを通じて低分子量の物質がやり取りされる機構によって、細胞接着を必要としない経路では照射細胞から分泌された液性因子 (バイスタンダー因子) が細胞のメディウム (培養液) を介してシグナルを伝達する機構によって、バイスタンダー効果が発現するといわれている。また、腫瘍細胞ではギャップ結合が十分に発現をしていないため、腫瘍細胞によるバイスタンダー効果は液性因子を介したシグナル伝達が主体であると考えられている。しかしながら低線量照射によって誘導されるバイスタンダー効果の液性因子を介するシグナル伝達機構は、未だ詳細には解明されていない。

これまでに当研究では、グリオーマ細胞の低線量照射によるバイスタンダー効果には液性因子を介したバイスタンダー効果が強く影響することを明らかにした<sup>3)</sup>。さらに、バイスタンダー効果を誘導する液性因子の候補としては TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 や活性酸素種の OH ラジカルや NO ラジカルの関与も示唆されているが、放射線誘発の細胞膜応答を担うスフィンゴミエリナーゼがバイスタンダー効果誘導に関与することを明らかにしてきし、低線量照射後の細胞内外のスフィンゴミエリナーゼ活性を測定したとき、細胞外でもスフィンゴミエリナーゼ活性の上昇が観察された。また、スフィンゴミエリナーゼは細胞膜においてセカンドメッセンジャーのセラミドを生成し、セラミドはミトコンドリアに直接作用して、OH ラジカルの放出を促進すると考えられている。さらに、スフィンゴミエリナーゼは、その活性に多種の 2 価金属イオンを要すると報告がなされており、近年、中性スフィンゴミエリナーゼについては、その活性中心にコバルト、マグネシウム、カルシ

ウムなどが結合した立体構造が明らかにされ、その金属イオンの種類によって酵素活性が異なるということが明らかにされた<sup>4)</sup>。一方、スフィンゴミエリナーゼが亜鉛元素と結合することによっても活性化され、特に亜鉛元素と結合したスフィンゴミエリナーゼは細胞外への分泌能を獲得すると考えられている。これらのことから、低線量放射線照射によって活性化したスフィンゴミエリナーゼが細胞外に分泌され、バイスタンダー因子として非照射細胞に作用し細胞死が誘導され可能性が考えられた。

そこで、本研究では、低線量照射による液性因子を介したバイスタンダー効果誘発機構のより詳細な解析を行うため、低線量照射後の細胞内外におけるスフィンゴミエリナーゼの活性化に関与する亜鉛元素の放射線照射後の細胞内外の亜鉛元素量の経時的変化を観察し、バイスタンダー細胞が細胞死に陥るメカニズム解析として、バイスタンダー細胞内に生じる OH ラジカルや NO の測定と DNA 損傷生成を観察した。

## 2 測定方法

### 2.1 照射後の細胞内外微量元素の変動

放射線照射後に細胞内外を移行する微量元素の動態を調べるため、照射後 0 分、5 分、15 分間、インキュベーター内で培養し、細胞内の微量元素を PIXE によって解析した。特に、スフィンゴミエリナーゼの活性には 2 価の金属元素を要求するため、Mg、Ca、Zn に着目して測定を行った。PIXE 分析用試料の作成については、各細胞を凍結乾燥させ、ニッ川らの方法により硝酸湿式灰化処理を行った。内部標準は Pd 標準液（原子吸光測定用標準液：1,000ppm / 1N HCl、Factor 1.004）を用い、細胞試料に対して最終濃度：約 1,000ppm ように加えた。培養液の試料も Pb 標準液を最終濃度 1,000ppm なるように調整した。それぞれの調製試料 5 $\mu$ l を、マイラー製ターゲットホルダーに貼付したポリプロピレンフィルム上に直径 7 mm の円状になるよう滴下し、自然乾燥後、PIXE 照射ターゲットとした。全てのサンプルの測定および解析は日本アイソトープ協会 仁科記念サイクロトロンセンター(Nishina Memorial Cyclotron Center：NMCC)にて行った。照射条件として、2.9MeV 陽子で照射を行い、放出された X 線スペクトルを測定した。得られた X 線エネルギースペクトルを PIXE スペクトル解析プログラム SAPIX を用いて解析を行った。

### 2.2 バイスタンダー細胞内 ROS および NO の観察

使用細胞は低線量照射に対して超感受性を示すグリオーマ A172 細胞を用いた。照射は X 線(0.1Gy)を用いた。照射後、バイスタンダー細胞内の ROS と NO を調べるため、照射後 0 分、5 分、15 分間、インキュベーター内で培養した各照射細胞から培養液をそれぞれ回収し、あらかじめ ROS 検定試薬 CM-H2DCFDA および NO 検定試薬 CM-H2DCFDA と 1 時間、反応させた非照射細胞に回収した培養液を添加した。細胞を回収し、遠心 (4 $^{\circ}$ C、500 g、5 分) 後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、洗浄した細胞は  $8 \times 10^5$ /ml の濃度のなるように PBS に浮遊させ、50  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートに播種し、蛍光強度の測定 (波長 485/510 nm) を行った。蛍光強度の測定にはマルチモードプレートリーダーを用いた。

### 2.3 バイスタンダー効果による DNA 損傷の観察

細胞群に 0.1 Gy の X 線を照射した。照射 1 時間後にシャーレから培地を除去し、別に用意した免疫染色用の細胞群へ培地を移した。培地を添加後 30 分、60 分、90 分それぞれインキュベーターで培養し、PBS で洗浄後 4% パラホルムアルデヒドで 1 分間固定し、0.1% Triton X-100 含有 PBS で 10 分間処理した。染色は 1 次抗体に anti Phospho-Histon 抗体 H2A.X ser139 を 50 倍希釈して、2 次抗体には Alexa Fluor 568、F(ab') fragment of goat anti-rabbit を 200 倍希釈して用いた。1% BSA によるブロッキングは 1 時間行った。核染色には 4,6 diamino 2 phenylindole (DAPI) を用いた。観察は U 励起及び B 励起系フィルターを用いて鏡検を行い、約 500 個の細胞における focus を数え、細胞 1 個当たりの focus を算出した。

### 3 結果

#### 3.1 低線量放射線照射による微量元素動態の経時的変化

スフィンゴミエリナーゼ活性は金属イオン依存性であり、この活性化には 2 価の金属イオンが不可欠であると考えられ、X 線照射によるスフィンゴミエリナーゼの活性化に関与する 2 価の金属元素は亜鉛元素であることが示唆された。そこで、バイスタンダー効果誘導機構におけるスフィンゴミエリナーゼの関与とその活性化への亜鉛元素の関与を詳細に検証するため、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処置による低線量放射線照射後の亜鉛元素の細胞内外の変化を PIXE 元素分析法によって経時的に解析した。

X 線 0.1 Gy 照射後の細胞内亜鉛元素量の経時的な変化を Fig. 1A に示した。コントロール（非照射細胞群）を 1 とした時の照射直後の値は  $1.08 \pm 0.12$ 、照射 5 分後では  $1.23 \pm 0.13$ 、照射 15 分後では  $1.00 \pm 0.09$  となった。X 線照射による経時的な細胞内亜鉛元素動態はコントロールに対して統計的有意差は認められなかったが、コントロールに対し照射直後から 5 分後で増加する傾向が観察され、照射 15 分後にコントロールの値と同程度まで減少する傾向が観察された。また、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理後の細胞内亜鉛元素量の経時的な変化は照射直後の値は  $1.09 \pm 0.16$ 、照射 5 分後では  $1.16 \pm 0.16$ 、照射 15 分後では  $1.18 \pm 0.22$  となった。スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処置によっても照射直後から照射 5 分後までに細胞内亜鉛元素は増加する傾向が観察され、さらに照射 15 分後は照射 5 分後とほぼ同程度であった。Fig. 1B は細胞外亜鉛元素量の経時的な変化を示している。細胞内における測定と同様に、コントロール（非照射細胞群）を 1 とした時、照射直後は  $0.88 \pm 0.08$ 、照射 5 分後では  $0.97 \pm 0.08$ 、照射 15 分後では  $1.31 \pm 0.09$  となった。照射直後から照射 5 分後にはコントロールに対してほぼ同程度を示し、照射 15 分後でコントロールに対して高い値を示し、統計的有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処置における細胞外の亜鉛元素量の経時的な変化は、照射直後から照射 15 分までコントロールと比べ変化は観察されなかった。これらの結果は、スフィンゴミエリナーゼ活性の挙動が細胞内から細胞外への亜鉛の移動に関与することを示唆している。これらのことから、細胞が放射線照射されることによって亜鉛元素が細胞内に流入し、スフィンゴミエリナーゼが活性化され、活性化したスフィンゴミエリナーゼが細胞外に放出されたと考えられた。

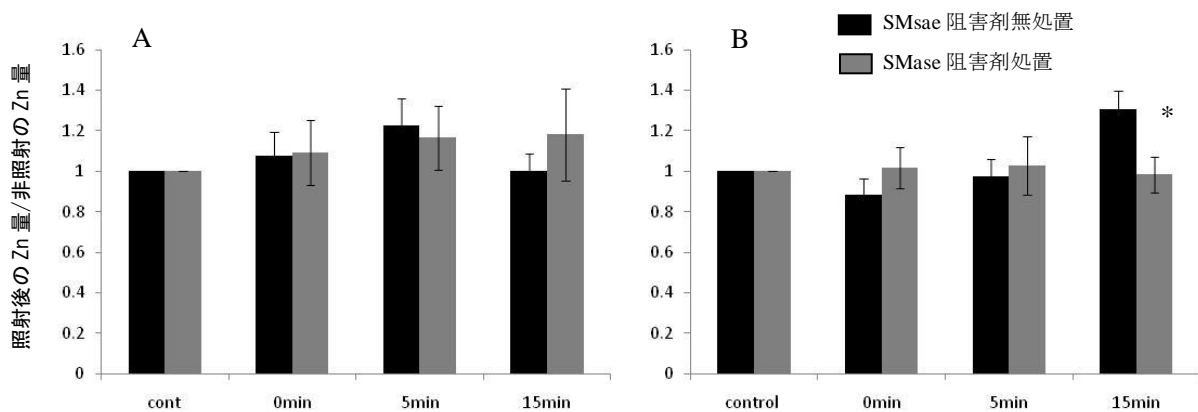


Fig.1 低線量 X 線照射による細胞内外の亜鉛元素量の経時的変化。(A)細胞内亜鉛量の経時的変化と(B)細胞外亜鉛量の経時的変化。結果は平均値±SE で表している。\* $P < 0.05$

#### 3.2 バイスタンダー効果による非照射細胞への ROS、NO における影響の評価

X 線照射により分泌されるシグナル分子としてスフィンゴミエリナーゼの可能性が示唆され、スフィンゴミエリナーゼによる細胞致死のメカニズムはスフィンゴミエリナーゼの下流分子のセラミドにより細胞内に

ラジカル種が産生され、細胞が傷害されるためと考えられている。そこで低線量放射線照射においてバイスタンダー細胞内に生じたラジカル種を評価するために、X線 0.1 Gy を照射した細胞を 1 時間培養し、その後、培養液を回収し、蛍光色素を取り込ませた非照射の細胞に移し替えて 1 時間および 2 時間培養し、培養液の添加によって産生される ROS および NO を蛍光強度として測定した。まず ROS について、非照射細胞に培養液交換後から 1 時間および 2 時間後の、コントロール（非照射細胞群）を 1 とした時の蛍光強度比を算出した（Fig. 2A）。培養後 1 時間では  $1.02 \pm 0.041$ 、培養後 2 時間では  $0.998 \pm 0.041$  であり、コントロールとの差はほとんど観察されなかった。この結果よりバイスタンダー効果において細胞内で OH ラジカルの関与は低いと考えられた。

次に NO について、非照射細胞に培養液交換後から 1 時間および 2 時間後の、コントロール（非照射細胞群）を 1 とした時の蛍光強度比を算出した（Fig.2B）。このとき培養後 1 時間後では  $1.015 \pm 0.052$ 、培養後 2 時間後では  $1.06 \pm 0.01$  であり、非照射に対して 1 時間後では統計的有意差は認められなかったが、2 時間後では非照射に対して上昇し統計的有意差が認められた。これらの結果よりこの実験系におけるバイスタンダー効果による細胞損傷に関与しているのは NO である可能性が考えられた。

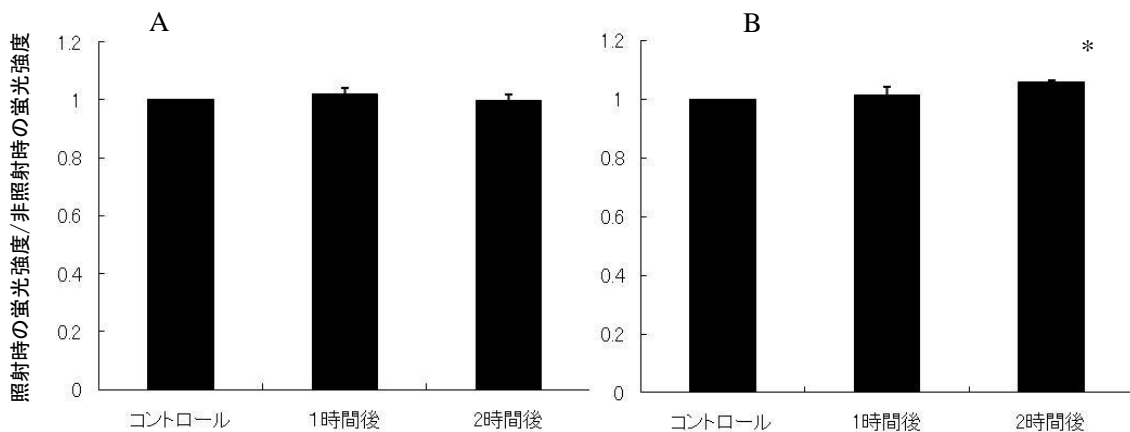


Fig.2 低線量 X 線照射によるバイスタンダー細胞内のラジカル産生の経時的変化。(A)OH ラジカルと(B)NO の経時的変化。結果は平均値±SE で表している。\* $P < 0.05$

### 3.3 バイスタンダー効果による DNA 損傷の誘導

培養液交換によってバイスタンダー細胞内に NO の産生されることが観察されたため、バイスタンダー細胞が細胞死を引き起こす原因は NO ラジカルによって DNA 損傷が生成されるためと考えられた。そこで、培養液交換後にバイスタンダー細胞内に観察される DNA 損傷の経時的変化を調べた(Fig.3)。0.1Gy 細胞の培養液を交換後の DNA 損傷のコントロールに対する比率は、培養液交換後 30 分から 60 分後まではコントロールとほぼ同程度であり、90 分後にコントロールの約 1.5 倍に損傷率が高くなった。さらに、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処置細胞に X 線照射後の培養液交換によるバイスタンダー細胞に生成される DNA 損傷は各時間でコントロールとほぼ変わらない損傷率を示した。これらの結果は、バイスタンダー細胞内では DNA 損傷が生成され、DNA 損傷生成にはスフィンゴミエリナーゼが関与することを示唆しており、バイスタンダー細胞はスフィンゴミエリナーゼの作用により細胞死が誘導されると推察された。

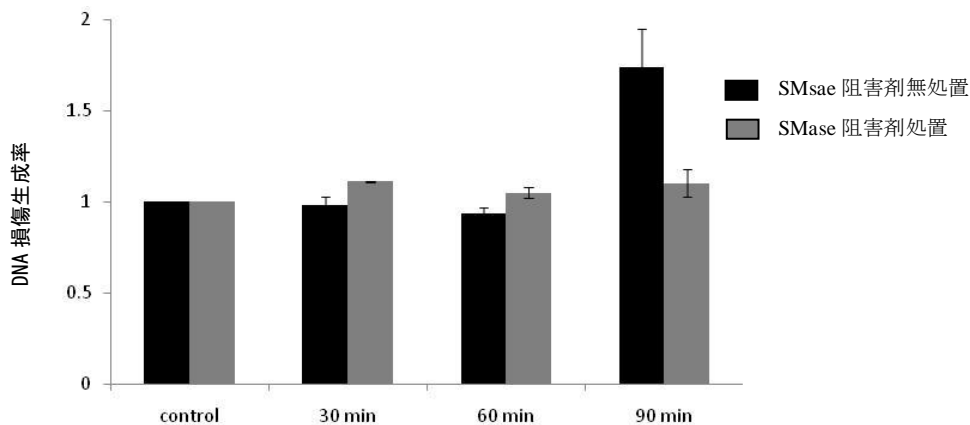


Fig.3 低線量 X 線照射によるバイスタンダー細胞内に生成された DNA 損傷。結果は平均値±SE で表している。

#### 4 考 察

亜鉛元素刺激性スフィンゴミエリナーゼは人やマウスのマクロファージ、人の皮膚繊維芽細胞、小グリア細胞、数種の培養された細胞から分泌されていることが報告されている 5)。また、この亜鉛元素刺激性スフィンゴミエリナーゼは酸性スフィンゴミエリナーゼ遺伝子から産生されると報告されている 5)。これらのことから今回の実験におけるバイスタンダー効果に関与する酸性スフィンゴミエリナーゼ活性では亜鉛元素が要求されると推察される。

また亜鉛元素を活性中心に結合するのは、酸性スフィンゴミエリナーゼのうち、リソソーム型と細胞質に存在する分泌型の 2 つの型が知られている。リソソーム由来のスフィンゴミエリナーゼは、その活性に要する亜鉛元素量が分泌型のそれより少ないが、これはリソソームが酵素活性に必要な亜鉛元素のうちある程度の量を含んでいることを示しているとの報告がある。リソソーム型は、非活性型のスフィンゴミエリナーゼがリソソームへ移行し、リソソーム内部において亜鉛元素に暴露されることにより活性を得る。それに対し分泌型は、ゴルジ分泌経路を通して輸送される過程で活性化されるが、その分泌経路は細胞内亜鉛元素プールからは比較的隔離されているため、活性化に際し外因性の亜鉛元素を要求するという報告がある 5)。つまり照射後 5 分に観察された亜鉛元素の細胞内増加は、放射線照射によって外因性（細胞外）の亜鉛元素が細胞内に流入し、細胞内の非活性型のスフィンゴミエリナーゼと結合することによって活性型スフィンゴミエリナーゼ（分泌型スフィンゴミエリナーゼ）になり、また照射 15 分後における細胞内亜鉛元素の減少は、亜鉛元素と結合して活性型となった分泌型スフィンゴミエリナーゼが細胞外へ分泌された可能性が考えられた。さらに、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処置における結果では照射 15 分後に観察された細胞外の亜鉛元素の増加が抑制されたことから、亜鉛元素と結合し、活性化したスフィンゴミエリナーゼの分泌能が抑制されたため、バイスタンダー細胞に細胞死誘導に関するシグナル伝達が抑制されたと考えられた。これらのことからバイスタンダー効果の誘導にはスフィンゴミエリナーゼ自身がバイスタンダー因子として作用することが示唆された。

スフィンゴミエリナーゼの作用による細胞致死のメカニズムはスフィンゴミエリナーゼの下流分子のセラミドにより細胞内にラジカル種が産生され 6)、ラジカル種自体、またはそれにより産生されるサイトカインなどにより、細胞が傷害されるためと考えられた。そこで低線量放射線照射においてバイスタンダー細胞における細胞障害因子としてのラジカル種の影響を評価するために、バイスタンダー細胞内において産生される ROS および NO 産生を測定した。

ROS 由来の蛍光強度を測定したところ、コントロールとの差はほとんど観察されなかったことからバイスタンダー効果において細胞内で OH ラジカルの関与は低いと考えられた。

一方、NO由来の蛍光強度を測定したところ、非照射に対して1時間後では統計的有意差は認められなかったが、2時間後では非照射に対してNO由来の蛍光強度に統計的有意な増加が認められ、バイスタンダー効果における細胞損傷に関与しているのはNOである可能性が考えられた。

低線量照射によるNO産生のメカニズムのひとつとして、細胞膜応答によってNO合成酵素の活性化の関与が示唆されている。一般に細胞膜ではシグナル伝達に関与する様々なレセプターなどが存在する微量領域(ラフト)を形成しており、活性化したスフィンゴミエリナーゼは細胞膜に作用し、ラフトを構造変化させシグナル伝達をより活性化する(7)。これまでに、スフィンゴミエリナーゼの作用による細胞膜応答によって、ラフト付近でNO合成酵素がリン酸化され活性化される知見を得ている。これらのことから、バイスタンダー細胞に液性因子としてスフィンゴミエリナーゼが作用し、バイスタンダー細胞に細胞膜応答を誘導することによって活性化NO合成酵素から産生されたNOやNOにより派生したサイトカインなどが細胞核に作用し、細胞死を誘導する可能性が考えられた。

さらに、スフィンゴミエリナーゼによるラフトの構造変化により産生されるNOの細胞障害として細胞死の主たる要因のDNA二重鎖切断を引き起こすことを確かめたとき、バイスタンダー細胞のDNA損傷率は90分で増加し、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処置によってバイスタンダー細胞においてDNA損傷率の増加が抑制された。これらの結果からバイスタンダー細胞ではNOによってDNA損傷が生成され、細胞死が誘導されたと考えられた。これらのことから、低線量放射線照射によるバイスタンダー効果による細胞死誘導メカニズムとして、放射線照射を受けた細胞内でスフィンゴミエリナーゼが亜鉛元素と結合することによりスフィンゴミエリナーゼが活性化し、活性化スフィンゴミエリナーゼは細胞外に分泌されバイスタンダー細胞に作用し、バイスタンダー細胞内では細胞膜応答が誘導され、NO合成酵素が活性化し、産生されたNOを介してDNA損傷が生成され細胞死が誘導されたと推察された。

#### 参考文献

- 1) Hall E.J. (2004) Henry S. Kaplan Distinguished Scientist Award 2003. The crooked shall be made straight; dose-response relationships for carcinogenesis. *Int.J.Radiat.Biol.*,80,327-337
- 2) Nagasawa, H. and Little, J. B. (1992) Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 52, 6394-6396.
- 3) 田村咲子、須藤繭子、和田成一、柿崎竹彦、伊藤じゅん、世良耕一郎、伊藤伸彦、グリオーマにおける低線量放射線照射による細胞致死効果の解析 バイスタンダー効果と微量元素との関連、NMCC共同利用研究成果報文集14、p.144-149、2008. 5
- 4) Ago, H., Oda, M., Takahashi, M., Tsuge, H., Ochi, S., Katunuma, N., Miyano, M. and Sakurai, J. 2006. Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J. Biol.Chem.* 281:16157-16167.
- 5) Schissel SL, Keesler GA, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. The Cellular Trafficking and Zinc Dependence of Secretory and Lysosomal Sphingomyelinase, Two Products of the Acid Sphingomyelinase Gene (1998) *J. Biol. Chem.* 273(29),18250-18259.
- 6) Zhang Y, Mattjus P, Schmid PC, Dong Z, Zhong S, Ma WY, Brown RE, Bode AM, Schmid HH, Dong Z. (2001) Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in UVA-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.*276(15) 11775-11782.
- 7) Shao,C.,Folkard,M.,Michael,BD.and Prise,K.M.(2004) Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101(37):13495-13500.

## The analyses of bystander effect induced by low-dose radiation in glioma cell

A. Yoshikubo<sup>1</sup>, A. Baden<sup>1</sup>, S.Wada<sup>1</sup>, T.Kakizaki<sup>1</sup>, S. Goto<sup>2</sup>, K.Sera<sup>3</sup> and N. Ito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Veterinary Medicine, Kitasato university  
35-1 Higashi 23banyo, Towada, Aomori 034-8628, Japan

<sup>2</sup>Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association  
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

<sup>3</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

### Abstract

Recently, it was considered that the cell lethal effect by low dose radiation was due to bystander effect. Cells irradiated low dose radiation secreted something liquid factor that induced lethal effect by signal transduction. So far, we suggested that radiation induced bystander effect is closely relative with sphingomyelinase. To analyze mechanism between activation of sphingomyelinase and induction of bystander effect, in this study we investigated divalent metal that are necessary for sphingomyelinase activation using PIXE analysis and mechanism of lethal effect by sphingomyelinase. Extracellular zinc value by radiation (0.1Gy) decreased for 5 min and increased for 15 min after irradiation. On the other hand, fluctuation of extracellular zinc value by treatment of sphingomyelinase inhibitor was suppressed. NO and DNA damage were induced in the bystander cells, that were non-irradiated cells culturing with medium of irradiated cells. These results indicate sphingomyelinase is activated by binding zinc element, sphingomyelinase itself function as bystander factor and induce cell death.