

放射線照射後の Ca, Fe, Zn 動態と、それによるアポトーシス感受性と 抵抗性人白血病細胞内における微量元素動態

原田 聡¹⁾、石井 慶造²⁾、山崎 浩道²⁾、松山 成男²⁾、神谷 富裕³⁾、
酒井 卓郎³⁾、荒川 和夫³⁾、世良 耕一郎⁴⁾、二ツ川 章二⁵⁾

¹⁾ 岩手医科大学放射線科
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

²⁾ 東北大学工学部量子エネルギー工学科
980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 01

³⁾ 日本原子力研究所、高崎研究所
370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233

⁴⁾ 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村留が森 348-58

⁵⁾ 日本アイソトープ協会・茅記念滝沢研究所
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村留が森 348-58

1. はじめに

放射線によるアポトーシスとは、放射線照射後の細胞における細胞死の一つであり、放射線照射が刺激となって、細胞内の死へのプログラムが喚起される結果起こる、細胞の自殺である^{1),2)}。現在まで、放射線によるアポトーシスに対して、癌放射線治療における局所制御と治療経過予測、癌治療効果増強の目的で^{3),4)}、その発生過程の解明が行われて来た⁵⁾⁻¹⁷⁾。

アポトーシスの発生過程には、決定機構と実行機構の2段階が存在し^{1),2)}、後者のアポトーシス実行機構においては、1) Bax/Bcl-2 によって制御を受けるミトコンドリア脱分極⁵⁾⁻⁷⁾、2) 脱分極に続く Cytochrome C への細胞質への放出^{7), 8)}、3) Cytochrome C による核内における caspase -3, -9, DNase、Ca, Mg dependent endonuclease の活性⁷⁾⁻⁹⁾と、それによる核の自己消化⁸⁾⁻¹⁷⁾の3段階が存在する。

上記、アポトーシス実行機構の3段階の各々に関しては、微量元素が関与する。1)のミトコンドリア脱分極においては、ミトコンドリア内膜への Ca, Mg 流入が起き⁵⁾⁻⁸⁾、2)の細胞質に放出される Cytochrome-C 中には Fe が含まれる⁵⁾、最後に、3)の caspase-3, および-9 には、その活性を制御する DED (Death Domain Factor) の Walker-B box 上に、Mg 結合 Domain¹⁰⁾が存在し、DNase、Ca/Mg dependent endonuclease の活性には Ca, Mg が必要である事が知られている¹¹⁾⁻¹⁷⁾。したがって、アポトーシス実行機構と、放射線照射後の微量元素動態との間には、関連が考えられた。

前年度(200年度)の実験において、我々は、これら微量元素の内、Ca, Fe, Zn について、放射線照射後の人白血病細胞 MOLT-4 と、HL-60 細胞におけるアポトーシス発生と細胞内微量元素動態との関連を検討し、アポトーシス初期における細胞質内 Fe 点状集積、アポトーシス後期における核内の集積増強を観察した。今回、我々は、細胞内 Fe 点状集積とミトコンドリアからの cytochrome-C 放出、核内カルシウム集積増強と caspase-3, -8 活性との関連性を加え、報告する。

2. 方法

【細胞培養、放射線照射】細胞は人白血病細胞である MOLT-4, HL-60 を、RPMI1640 培地+10% fetal serum 下にて培養した。培地が 70% コンフルエントに達した時点で、細胞数を 1.0×10^6 個/ml に調整、10% HEPES buffer を加えた培地に交換、24 時間培養後に放射線照射を施行した。放射線照射は、 ^{60}Co 線を使用し、線量率 34.1 - 35.6 cGy/min にて、線量 1, 2, 5, 10, 20 Gy を照射した。照射後、3, 6, 9, 12, 24 時間後に細胞を採取し、1) アポトーシス検出、2) micro PIXE camera による微量元素分布の画像化を行った。

【アポトーシス検出、および micro PIXE camera】アポトーシスは、May Giemsa 染色を用いて検出、その発生頻度を発生百分率を用いて表した。

【Micro PIXE Camera】micro PIXE camera は、ビーム径 $1.5 \mu\text{m}$ の 2 MV proton beam を用いて、 $20 \times 20 \mu\text{m}$ の範囲を scan し、Ca, Fe, Zn の細胞内分布を画像化した。

【Cytochrome-C 測定】ミトコンドリア分画と核分画を遠沈勾配法により分離後、各々の分画中の Cytochrome-C をウェスタンブロット法を用いて検出した。

【Caspase-3, -8 測定】細胞を破碎後、pNa 抗体を用いた比色分析法を用いて、caspase-3, -8 を測定した。

結果

【至適線量の決定】

至適線量決定のため、照射 6 時間後におけるアポトーシスの発生率を照射線量に対してプロットした (Fig.-1)。アポトーシス感受性である MOLT-4 cell においては、照射線量 5 Gy までは、線量増加に対するアポトーシス増加率は $11.87\% / \text{Gy}$ であったが、5 Gy 以上では、 $0.99\% / \text{Gy}$ と有意に減少した。したがって、本実験における至適線量を 5 Gy と設定した。尚、アポトーシス抵抗性の HL-60 では、各照射線量におけるアポトーシスの有意な増加は認められなかった。

【至適線量下におけるアポトーシスの経時的変化】

至適線量 5 Gy 下におけるアポトーシス発生経時適変化を Fig.-2 示す。アポトーシス感受性である MOLT-4 細胞においては、アポトーシス発生率は経時的に増加し、その頻度は $92.1 \pm 2.13\%$ であった。したがって、照射線量 5 Gy では、殆ど全ての細胞がアポト

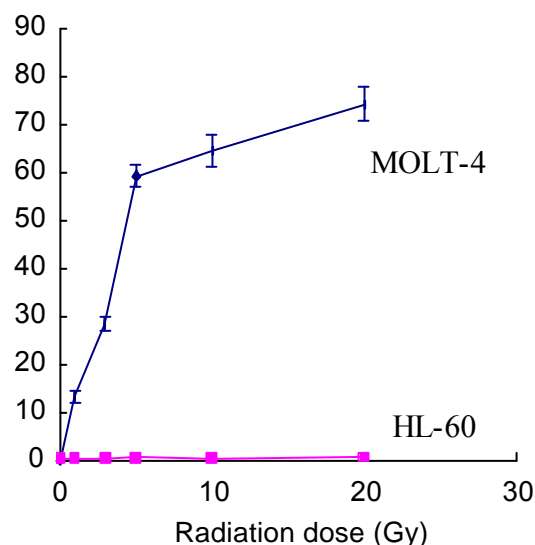


Fig.-1: 線量とアポトーシス発生の関係

ーシスに陥ると判断した。一方、アポトーシス抵抗性である HL-60 細胞においては、各経時的観察点での、有意なアポトーシス発生増加は認められなかった。

【micro PIXE camera による微量元素分布の変化】

micro PIXE camera による画像を Fig-3 に示す。以下アポトーシス感受性の MOLT 細胞と、アポトーシス抵抗性の HL-60 細胞別に述べる。

(MOLT-4 細胞；アポトーシス感受性)：照射前においては、細胞内に Fe の高集積像は認められず、Ca は細胞内に均一に分布、Zn は核内に強く集積していた。照射 6 時間後において、細胞質内に点状の高集積が認められ、Ca は核に集積し始める反面、核内からは Zn の集積が低下した。照射 9 時間後においては、照射 9 時間後においては、細胞質内の点状集積は明瞭化し、点状集積の周囲には、淡い集積増強が認められた。Ca の核内における集積は増加した。Zn に関しては、再び核内への集積が認められた。照射 24 時間後においては、細胞質内への点状集積は消失した。Ca の核内への集積は、照射 9 時間後よりは低下したが、カルシウムの集積は残存した。Zn に関しては、細胞内の有意な集積は認められなかった。

(HL-60, アポトーシス抵抗性)：アポトーシス抵抗性の HL-60 においては、MOLT-4 細胞の様な Ca, Fe, Zn の規則正しい変化は認められなかった。線量 20Gy においては、壊死分画が増強し、細胞中微量元素の全てが低下し、線量 5 Gy においては、再増殖分画が増加し、核中に Zn の増加が見られる傾向が認められた。

【ミトコンドリアからの Cytochrome-C の放出：Fig-4】

ミトコンドリアから細胞質への Cytochrome-C 放出は、照射 6 時間後から 9 時間後に認められ、micro PIXE camera において、細胞質の Fe 点状集積が認められた照射 6 時間後から 9 時間後に一致した。また、アポトーシス抵抗性の HL-60 細胞においては、Cytochrome-C 放出と細胞質内 Fe 点状

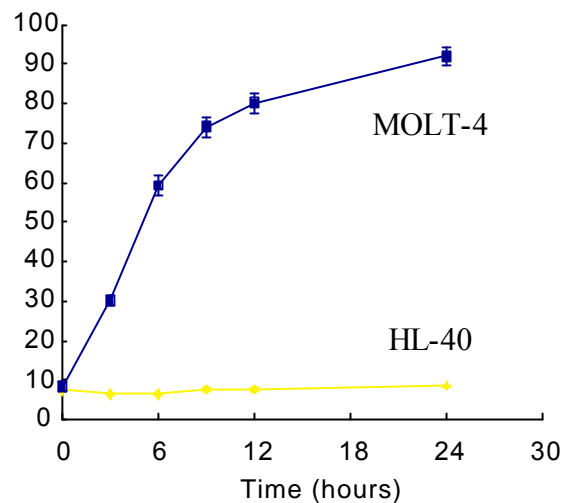


Fig-2: 線量 5 Gy 時点でのアポトーシス発生の経時的変化

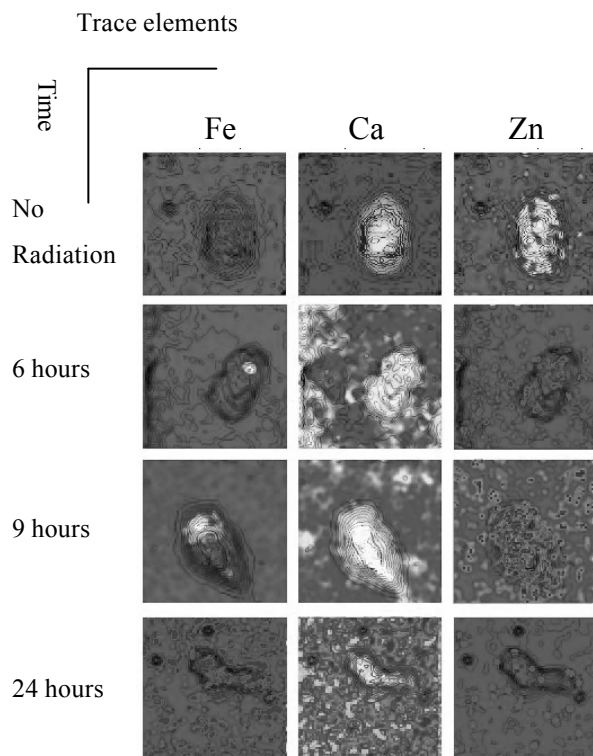


Fig-3
Micro PIXE Camera による、Ca, Fe, Zn の経時的変化

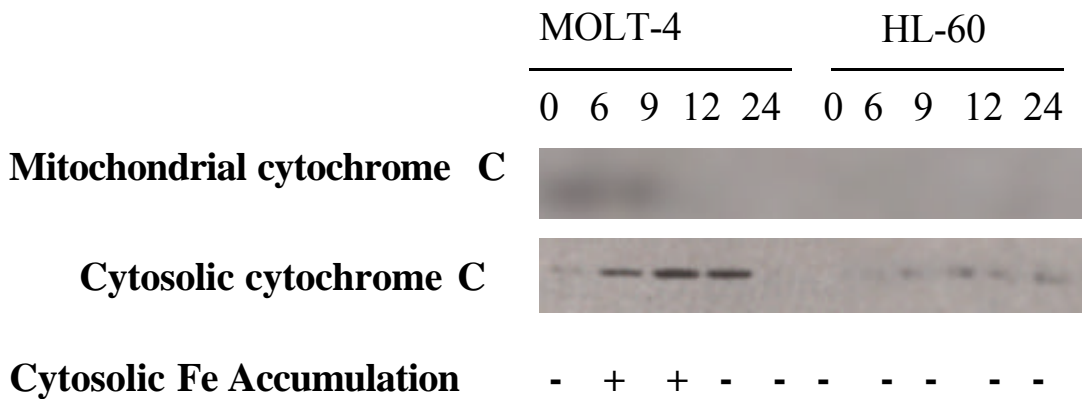


Fig-4: ミトコンドリアからの Cytochrome-C 放出と、細胞質内 Fe 点状集積との関連

集積とも見られなかった。

【核内 Caspase-3,-8 の活性: Fig-5】 Caspase-3, -8 活性とも、照射 3 時間後から上昇し始め、以後漸増し、照射 12、24 時間後に、最大の活性を示した。これは、micro PIXE camera における核内 Ca 上昇とも時間的に一致した。また、アポトーシス抵抗性の HL-60 細胞においては、Caspase-3,-8 活性も、核内 Ca 上昇も認められなかった。

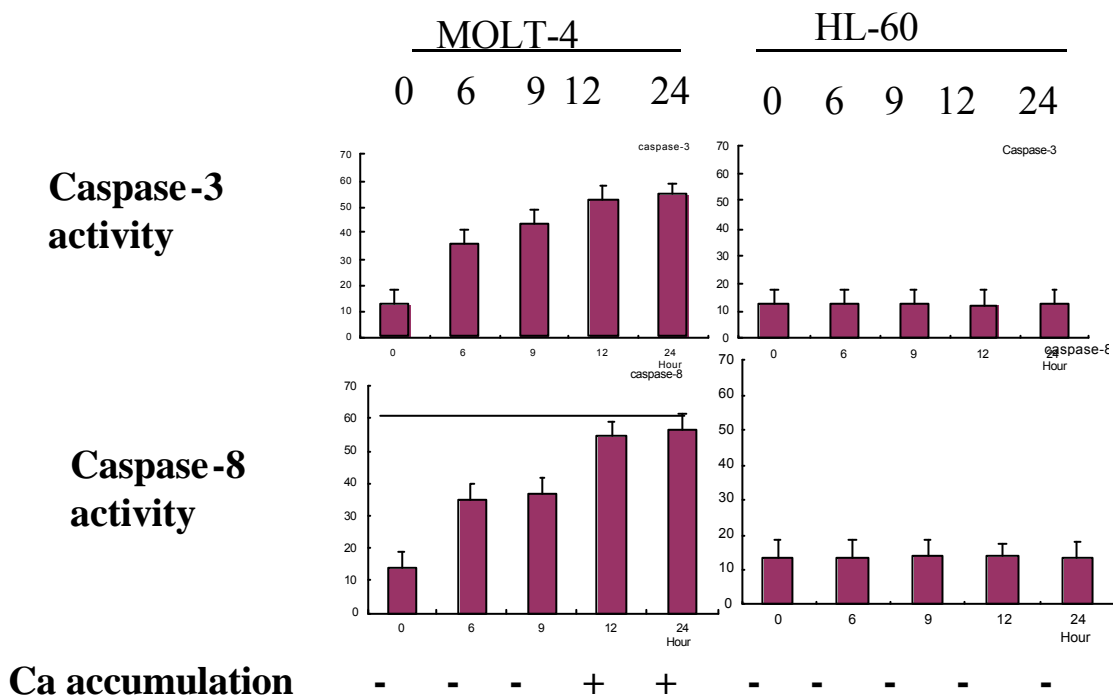


Fig-5: Caspase-3,-8 の経時的変化と、核内 Ca 集積との関連

3. 考察

現在までアポトーシスについて、微量元素の解析が Ca, Mg について行われて来た⁶⁾⁻¹⁷⁾。DNase 活性に關与する Ca に関しては蛍光免疫染色、Flow cytometry によって測定されてきたが、その所見はあくまでも間接的であり、直接的に Ca の動態を測定するものではなかった。また、アポトーシス発生と Fe, Zn の動態に關しては、現在まで全く報告が存在してはいない。

Micro PIXE camera は、細胞に直径 μm 単位の proton beam を照射、細胞中の微量元素から発生する特性 X-線を検出し、細胞内微量元素分布を画像化する分析法であり、一つの細胞から多種の微量元素の分布を画像化可能である。したがって、放射線照射によるアポトーシスの様に、多種の微量元素が關与する細胞現象を究明するには、大変有用と思われた。

今回の実験で、放射線によるアポトーシス発生初期に、細胞質に Fe の高集積が認められた。アポトーシス発生に關与する物質の内、Fe を含む物質が cytochrome C のみであり、Fe 動態が Western blott によるミトコンドリアから細胞質への Cytochrome-C 放出と關連する事から、アポトーシス発生初期に認められた Fe の高集積が cytochrome C である事が考えられた^{5), 6)}。

また、アポトーシス発生後期において、核に Ca の集積増加が認められたが、これに關しては、Caspase-3, -8 活性と關連する事から、これら Caspase との關連が考えられた¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。

REFERENCIES

- 1) J.F.R. Kerr ,A.H. Wyllie , A.R. Currie : Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. Br. J. Cancer 1972, 26, 239-257.
- 2) J.F.R. Kerr, J. Searle, B.B. Harmon, and C.J. Bishop, Apoptosis. In *Perspectives on Mammalian Cell Death* (C.S.Potten, Ed.) PP. 93-119. Oxford Univ. Press, New York.1972.
- 3) Eric Duchaud, Agenes Ridet, Dominique Stoppa-Lyonett, Nicolas Janin, Ethel Moustacchi, and Filippino Roselli.: Deregulated Apoptosis in Ataxia Teleangiectasia: Associaton with Clinical Stigma and Radiosensitivity. Cancer. Res. 1997, 56, 1400-1404
- 4) Satoshi Harada, Ryuichi Sato, Ryuji Nakamura, Hiroshi Oikawa, Hirobumi Oikawa, Shie Ohgi, Yoshiaru Tmakawa, and Toru Yanagisawa: The correlation between spontaneous and Radiation induced apoptosis in T3b bladder cancer, and the precedence between tow kinds of apoptosis for predicting clinical prognosis. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2000, 48, p1059-1057.
- 5) Jek Yang, Xesong Liu, Kapil Bahalla, Caryn Naekyun Kim, Ana Maria Ibrado, Jiyang Cai, Tsung-I Peng, DeanP. Jones, Xiaodong Wang: Prevention of Apoptosis By Bcl-2 release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. Nature 1997, 275 (21), 1129-1132.
- 6) Qing Zao, Takashi Kondo, Asao Noda, and Yoshisada Fujiwara: Mitochondrial and intracellular free-calcium regulation of radiation-induced apoptosis in human leukemic cells. INT J. RADIAT. BIOL. 1999, 75, 493-504.
- 7) Millie M. Chien, K. Elizabeth Zahradka, M. Karen Newell and John H. Freed: Fas induced B Cell Apoptosis Reuires and Increase in Free Cytosolic Magnesium as an Early Event. The Jounal of Biological Chemistry 1999, 274, 7059-7066.

- 8) Rebert Eskes, Bruno Antonso, Astrid Osen-Sand, Sylvie Monteessuit, Christoph Richter, Remy Sadoul, Gnazalo Mazzei, Anthony Nicholas and Jean-Calude Martinou: Bax Induced Cytochrome C Release from Mitochondria is independent of the Permiability Transition Pore bu Highly Dependent on Mg Ions. *J. Of Cell biology*, 1998, 143, 217-224.
- 9) C. N. Kim, X. Wang, Y Huang, A.M. Ibrado, L. Liu, G.Fang and K. Bahalla: Overexpression of bcl-xL inhibits ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other pertubations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res.* 57, 3155-3120.
- 10) A. Takahashi, E. S. Alnemri, Y. A. Lazebnk. T. Fernades Alenmri, G. Litwack, R.D. Moir,R.D. Goldman, G. G. Poirier, S. H. Kaufman, and W. C. Earnshaw: Cleavage of lamin A by Mch 2alfa but not CPP32; multiple interleukin 1 β converting enzyme related protease with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proceedings of the Ntional academy of science USA* 1996, 93, 8395-8400.
- 11) S. Tamura, and D. Shiokawa: Multiple forms of nuclear deoxyribonuclease in rat thymocytes. 1994, 203, 789-797.
- 12) M.J.Arends, R.G. Morris, and A.H.Wyllie: Apoptosis: The Role of Endonuclease. *Am. J. of Pathol.* 1990 136 (3), 593-608.
- 13) B. Zhivotovsky, P. Nicotera, G. Bellomo, K. Hanson, and S. Orrenius: Ca²⁺ and Endonuclease Activation in Radiation-Induced Lymphoid Cell Death. *Exp. Cell Res.* 1993, 207, 163-170.
- 14) Larisa V. Nikonova, Igor P. Beletsky and Sauil R. Umansky: Properties of some nuclear nucleases of rat thymocytes and their changes in radiation-induced apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 215, 893-901 1993.
- 15) . W.H. Strätling, C. Grade, and W. Hörz: Ca/Mg-dependent Endonuclease from Porcine Liver. *J. of Biol. Chem.* 1984 259(9), 5893-5898.
- 16) Tomotaka Hashida, Yasuharu Tanaka, Norisada Matsunami, Koichiro Yoshihara, Tomoya Kamiya, Yoshinori Tanigawa, and Samuel S. Koide: Purification and Properties of Bull Seminal Plasma Ca²⁺, Mg²⁺-dependent Endonuclease. *J. Biol. Chem.* 1982. 257(21) 13114-13119,
- 17) R. Ishida, H. Akiyoshi and T. Takahashi: Isolation and Purification of Calcium and Magnesium dependent Endonuclease from Rat Liver Nuclei. *Biochem. Biol. Res. commun.* 1974 56(3) 703-710..