

## 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

### ーバイスタンダー効果と微量元素との関連ー

田村咲子<sup>1</sup>、須藤繭子<sup>1</sup>、和田成一<sup>1</sup>、柿崎竹彦<sup>1</sup>、伊藤じゅん<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

近年、低線量放射線の生物影響が多様な角度から研究されるようになり、この生物影響は単に高線量からの外挿では説明のつかない現象と認識されるようになってきた。低線量放射線による影響の中で特徴的なものとして放射線による非標的効果 (Non-targeted effects) の誘導が注目を集めている。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のと同様の放射線影響が誘導されることであり、その原因としてはバイスタンダー効果が一因としてあげられている。1992年、Nagasawaらによって細胞に低線量の $\alpha$ 線を照射して染色体に現れる効果を調べていたときに、ごく微量の放射線を照射して全体の1%の細胞しか放射線が照射されていないにもかかわらず、結果的に30%もの細胞に染色体の変化が起こるという現象が観測された<sup>1)</sup>。これは、照射を受けた細胞から何らかのシグナルが発生し、それが非照射細胞に伝わることによって照射影響が発現するという現象の存在を明らかにする契機となった。バイスタンダー効果が細胞に伝えられる経路として、細胞間接着を必要とするものと必要とされないものの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もので、細胞接着を必要としない経路では、メディウムを介して照射細胞から分泌された液性因子 (バイスタンダー因子) によりバイスタンダー効果が発現するといわれ、腫瘍細胞では液性因子の寄与が大きいと考えられている。この液性因子の候補としては TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$ 1 が示されており、近年その因子として OH ラジカルや NO ラジカルも重要であると考えられている。また、バイスタンダー効果の誘導機構として細胞質や細胞膜に放射線がヒットすることにより細胞内情報伝達系の引き金となることが報告されているが<sup>2)</sup>、細胞質や細胞膜に起因するバイスタンダー効果の誘導機構の詳細は明らかにされていない。

一方、放射線照射による細胞膜応答の鍵となる蛋白はスフィンゴミエリナーゼと有力視されており、この

蛋白はTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、FAS リガンドなどの細胞外のサイトカインと密接に関係して細胞周期停止や細胞老化、アポトーシスの細胞死を誘導する。このため、スフィンゴミエリナーゼの活性化がバイスタンダー効果による細胞致死を誘導すると予想される。

そこで本研究では、スフィンゴミエリナーゼ活性とバイスタンダー効果による細胞致死効果の関連を明らかにするとともに、スフィンゴミエリナーゼの活性化にはさまざまな 2 価の金属イオンが必須であるので、スフィンゴミエリナーゼの活性化に関与する 2 価の金属イオンを調べるため、放射線照射後の細胞内の 2 価の金属の変動を PIXE 分析によって解析を行った。

## 2 測定方法

### 2.1 バイスタンダー効果による細胞死効果の検討

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 線を線量率 0.02Gy/min で行った。細胞致死効果の評価には Clonogenic assay を用いた。細胞に 0.1Gy となるよう照射し、インキュベーターで 2 時間培養した。その後シャーレに既知の適度な細胞数を播種し、14 日間培養後 10%ホルマリンを用いて固定し、生存率を算出した。バイスタンダー効果による生存率は 0.1Gy 照射後、1 時間培養し、その培地を回収して非照射細胞に添加・培養 1 時間後、Clonogenic assay を用いて生存率を算出した。培地を介したバイスタンダー効果のスフィンゴミエリナーゼの関与を解析するため、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理による薬理的検討を行った。阻害剤としてはクロルプロマジンを用い、最終濃度 4  $\mu$ mol/L となるよう調整した。照射 1 時間前に阻害剤を培地に添加し、照射 1 時間後に培地を回収し、その培地を非照射細胞に添加・培養 1 時間後、Clonogenic assay を用いて生存率を算出した。

### 2.2 照射後の細胞内微量元素の変動

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、1 時間、2 時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、Ca、Zn、Cu 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、細胞試料に対して終濃度: 約 1,000ppm となるように加えた。この調製試料 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。

## 3 結果

### 3.1 低線量放射線照射による細胞致死効果の評価

A172 細胞において X 線 0.1Gy が照射されたときの細胞致死効果を観察したとき生存率は 84%であり、X 線照射により生存率は有意に低下した ( $p < 0.05$ )。培地を介したバイスタンダー効果による細胞致死を解析するために X 線照射 1 時間後に培養液を非照射細胞に移し換え、1 時間培養後に生存率を Clonogenic assay によって評価したとき、その生存率は 84%であり、培地交換により生存率は有意に低下した ( $p < 0.05$ ) (Fig.1)。これらの結果は低線量 X 線照射を受けた細胞から何らかの因子が分泌され、この因子が細胞致死の誘導に関与することを示唆している。

### 3.2 スフィンゴミエリナーゼ阻害剤添加による低線量放射線の細胞致死効果

スフィンゴミエリナーゼとバイスタンダー効果の関連性を解析するため、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理後に低線量放射線が照射された細胞の致死効果と非照射細胞への照射された細胞の培養液の添加による細胞致死効果を Clonogenic assay によって評価した。照射 1 時間前にスフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理後、X 線を 0.1Gy 照射した。まず、0.1Gy X 線照射された細胞の致死効果を観察した時、生存率は 103%となり、この生存率とスフィンゴミエリナーゼ阻害剤無処置の X 線照射による生存率を比較したとき(Fig.2A)、両者の生存率の間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。次に、スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理した細胞に X 線照射後、その培養液を非照射細胞に移し替えた時の細胞の生存率は 99%となった。この生存率とスフィンゴミエリナーゼ阻害剤無処置の細胞を X 線照射したときの培養液処理による生存率を比較した時(Fig.2B)、両者の生存率の間に有意な差が認められた。 ( $p < 0.05$ )。これらの結果はスフィンゴミエリナーゼ活性が低線量の X 線の照射を受けた細胞の細胞致死効果と X 線照射を受けた細胞の培養液による細胞致死効果に関与することを示唆している。

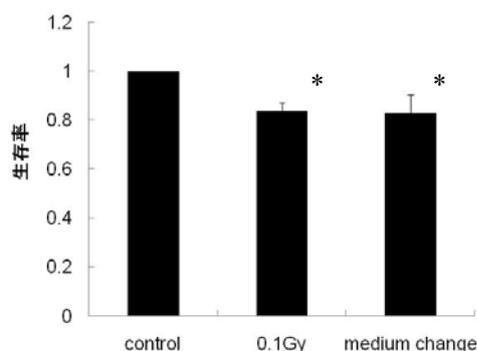


Fig.1 低線量 X 線を照射した時の細胞致死効果。X 線 0.1Gy 照射したとき細胞生存率の低下が観察された。0.1Gy 照射した細胞のメディウムを非照射細胞に添加したときも生存率の低下が観察された。結果は平均値±SE で表している。\* $P < 0.05$

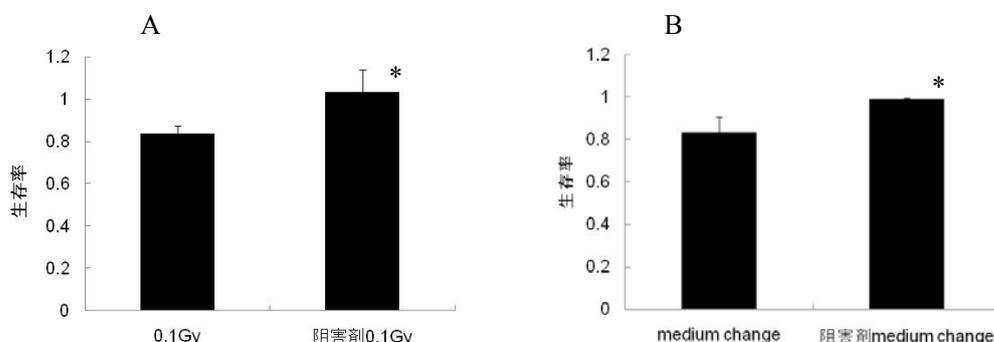


Fig.2 スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理による低線量 X 線を照射した時の細胞致死効果。スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理 1 時間後に A)X 線 0.1Gy 照射したときの生存率および B)0.1Gy 照射した細胞のメディウムを非照射細胞に添加したときの生存率はスフィンゴミエリナーゼ無処置のものと比較して有意に生存率が高くなった。結果は平均値±SE で表している。\* $P < 0.05$

### 3.3 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、特にこの活性化には 2 価の金属イオンが不可欠であると考えられている [ ]。本研究で低線量 X 線照射を受けた細胞の致死効果および照射を受けた細胞から分泌される因子による細胞致死効果にスフィンゴミエリナーゼの関与が示唆された。そこで、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各種 2 価の金属イオンの細胞内外の挙動を調べるため、低線量放射線照射による 2 価の金属元素の細胞内濃度変化を PIXE 元素分析法によって経時的に解析した。

0.1GyX 線照射後の細胞内 Zn 濃度の経時的な変化を Fig.3 に示した。非照射群では  $19 \pm 2$ ppm、照射直後では  $17 \pm 2$ ppm、照射後 5 分では  $24 \pm 6$ ppm および照射後 15 分間では  $16 \pm 1$ ppm、照射後 1 時間では  $21 \pm 8$ ppm、照射後 2 時間では  $19 \pm 7$ ppm であり、照射直後にやや低下し、5 分後に上昇、15 分後には下降して、1 時間後および 2 時間後には非照射群とほぼ同程度になる傾向が観察された。照射 5 分後では細胞内 Zn 濃度は非照射群に対して有意差は認められなかったが著しく増加する傾向が観察され、照射 15 分後では非照射群に対して低い値を示し、有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。この結果は低線量放射線照射によって照射 5 分から 15 分後に Zn が細胞内外を挙動することを示唆している。

その他の 2 価の金属元素について、特に、カルシウム、銅の X 線照射による細胞内の変動を観察したとき、照射直後から 2 時間後まで有意な変化は認められなかった。

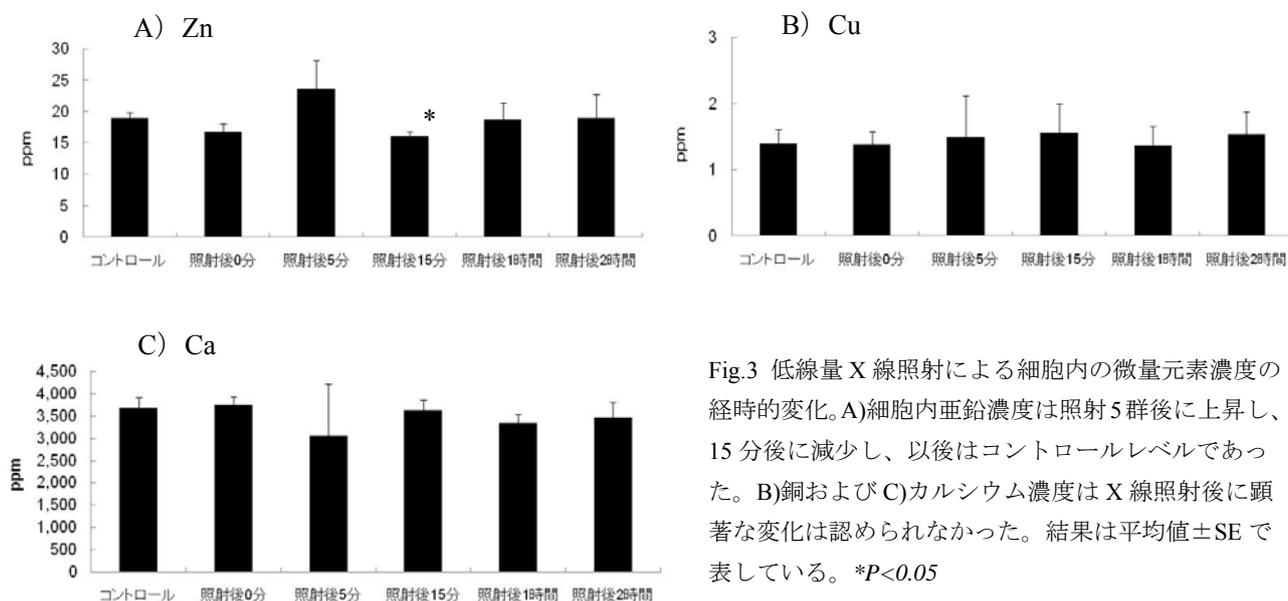


Fig.3 低線量 X 線照射による細胞内の微量元素濃度の経時的変化。A)細胞内亜鉛濃度は照射 5 分後に上昇し、15 分後に減少し、以後はコントロールレベルであった。B)銅および C)カルシウム濃度は X 線照射後に顕著な変化は認められなかった。結果は平均値 ± SE で表している。\* $P < 0.05$

#### 4 考察

低線量域の放射線応答は高線量域の放射線応答から低線量域への外挿からでは説明できない生物効果が相次いで報告されており、低線量照射における特徴的な生物影響として、バイスタンダー効果や放射線超感受性: Hyper-Radiosensitivity(HRS)などが観察されてきた。HRS とは、低線量照射において DNA 損傷が小さいために修復系の誘導が起きず、低線量照射によって生じた DNA 損傷が十分な修復されないため細胞死がより引き起こされる現象である。一方、低線量照射線超感受性を示す原因としてバイスタンダー効果が重要視されている。特に腫瘍細胞のバイスタンダー効果の臨床応用が期待されているため、腫瘍細胞株の A172 における低線量照射によってバイスタンダー効果が誘発されるかを調べた。照射された細胞のメディアムを未照射細胞のそれと移し替える実験を行った。メディアムを移し替え 1 時間培養したのち Clonogenic assay により非照射の細胞群の生存率を算出すると、コントロールのそれに対し有意に低下した。すなわち照射細胞のメディアムと非照射の細胞と一緒に培養を行うことによって非照射の細胞群があたかも照射刺激を受けたような生存率低下を示すことが明らかとなり、これは照射細胞からのメディアムを介した液性のバイスタンダー因子による非照射細胞への細胞致死効果の誘発と考えられた。

このバイスタンダー効果の誘導メカニズムについて、細胞質や細胞膜への放射線刺激による影響も注目され、細胞質や細胞膜への放射線のヒットにより細胞内情報伝達系が活性化されることやアポトーシスが誘導

されることが報告されている<sup>3)</sup>。そこで、本研究では、放射線による細胞膜応答に関与するスフィンゴミエリナーゼに注目した<sup>4)</sup>。スフィンゴミエリナーゼ阻害剤を用いてメディウム交換実験を行ったところ生存率の有意な回復が認められ、スフィンゴミエリナーゼ阻害によりメディウムを介して誘発されるバイスタンダー効果が阻害されたと考えられた。この結果から低線量照射によって細胞膜による放射線応答によって細胞内シグナル伝達経路と細胞外シグナル伝達経路が活性化されることが推察された。また、バイスタンダー因子と考えられている分子の TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、FAS リガンド、OH ラジカルおよび NO ラジカルなどはスフィンゴミエリナーゼの活性化によって亢進されると報告されているため、スフィンゴミエリナーゼがバイスタンダー効果を誘導する上流分子の一つである可能性が示唆された。

スフィンゴミエリナーゼの活性化は金属イオン依存的でありその種類は特に亜鉛、マグネシウム、カルシウム、コバルト、銅、マンガンなど 2 価金属イオンが必須であるので、放射線照射によるスフィンゴミエリナーゼの活性化メカニズムを明らかにするため、照射後細胞内微量元素の濃度を PIXE 分析を用いることにより経時的に測定した。本研究では、カルシウム、銅では照射後経時的に細胞内の金属元素の有意な変動は観察されなかったが、亜鉛では細胞内濃度が照射後 5 分で上昇する傾向を示し、照射 15 分後に有意に低下した。これらの結果は照射により亜鉛元素は細胞内外の挙動し、低線量放射線に対する放射線応答に亜鉛が関与することを示唆している。また、UV 照射による酸性スフィンゴミエリナーゼの活性が照射 5 分後から認められ<sup>4)</sup>、本研究における亜鉛の挙動はこれらのスフィンゴミエリナーゼ活性が高まる時間とがほぼ一致した。また、亜鉛を活性中心に持つスフィンゴミエリナーゼは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<sup>5)</sup>。リソソーム型は非活性化のスフィンゴミエリナーゼがリソソームへの移行し、リソソーム内部において Zn 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生じ、その分泌経路が細胞内亜鉛プールからは比較的隔離されているため、その活性に対し外因性の亜鉛を要求するという報告がある<sup>6)</sup>。これらのことから、照射 5 分に観察された亜鉛の細胞内増加は、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）になると推察され、照射 15 分後の細胞内の亜鉛の減少は亜鉛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という推察される。

本研究では低線量放射線刺激によるバイスタンダー効果とその因子について検証をおこなった。A172 細胞は低線量照射に対し細胞致死効果を示し、これはバイスタンダー効果との関連が示唆された。またその効果を引き起こす液性因子としてスフィンゴミエリナーゼが示唆され、このスフィンゴミエリナーゼの活性化には亜鉛が関連することが推察された。

## 参考文献

- 1) Nagasawa, H. and Little, J. B. (1992) Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 52, 6394-6396.
- 2) 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
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Schuchman, E. H., Suchi, M., Takahashi, T., Sandhoff, K., and Desnick, R. J.(1991) *J. Biol. Chem.* 266, 8531-8539
- 6) 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.

## **The analyses of the cell lethal effect induced by low-dose radiation in glioma**

### **— Relation of bystander effect and trace elements —**

S.Tamura<sup>1</sup>, M.Sudo<sup>1</sup>, S.Wada<sup>1</sup>, T.Kakizaki<sup>1</sup>, J.Ito<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 23bantyo, 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**

So far, the effects of low dose radiation have only been estimated by extrapolation from the data obtained by the higher dose radiation. Recently low dose radiation effects such as bystander effect cannot be explained by extrapolation from the data obtained by higher dose radiation. Cell death induced by bystander effect was induced by factors secreted from irradiated cell to unirradiated cell. And it is considered that cell membrane is important target for induction of bystander effect. In this study, to elucidate bystander effect, we investigated the relationship cell membrane effect (sphingomyelinase activity) and bystander effect, and divalent metal ion that are necessary for sphingomyelinase activation using PIXE analysis.

Cell death by radiation induced bystander effect was observed in glioma cell (A172 cell). This bystander effect was inhibited by sphingomyelinase inhibitor. When fluctuation of intracellular metal element was analyzed after irradiation, concentration of intracellular zinc element increased for 5 min and decreased for 15 min after irradiation. It is reported that sphingomyelinase activated for 5min after irradiation, sphingomyelinase activation and fluctuation of zinc metal was corresponding.

This result suggested that radiation induced bystander effect was caused by sphingomyelinase activation that was relative to zinc element.