

X線照射によるバイスタンダー効果誘導機構の解析

渡邊 彩¹、山本真弥¹、吉窪朝妃¹、和田成一¹、柿崎竹彦¹、世良耕一郎²、伊藤伸彦¹

¹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

²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^{1, 2)}。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。

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³⁾。さらに、バイスタンダー効果を誘導する液性因子として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た。また、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⁴⁾。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。一方、放射線による細胞膜応答は低線量域から誘導されることを明らかにしてきたが、この細胞膜応答は比較的高線量 (20Gy) でも誘導される報告されている。このため、腫瘍に対する放射線治療の線量レベルでもバイスタンダー効果による細胞致死が治療効果の影響に反映されると考えられる。

そこで、本研究では、腫瘍細胞における放射線誘発バイスタンダー効果において、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、X線照射後の細胞外に分泌されたスフィンゴミエリナーゼとその細胞外分泌液中の亜鉛元素の経時的変化を観察し、バイスタンダー細胞の細胞死誘導機構におけるスフィンゴミエリナーゼの関与を検討した。

2 測定方法

2.1 照射後の培養液中のスフィンゴミエリナーゼの経時的変化

細胞はグリオーマ由来の A172 細胞を用いた。X 線 6Gy 照射後に細胞外（培養液）中のスフィンゴミエリナーゼの動態を調べるため、照射後 5 分、15、30 分、60 分間、インキュベーター内で培養し、培養液中のスフィンゴミエリナーゼを免疫沈降法によってスフィンゴミエリナーゼを精製した。免疫沈降は X 線照射後の細胞外の培養液にプロテイン A アガロース Protein A Agarose と抗スフィンゴミエリナーゼ抗体に添加し 4°C 反応させ、遠心後の沈降物をスフィンゴミエリナーゼ生成物とした。生成物をウエスタンブロッティングによって解析した。生成物を SDS サンプルバッファーによって変性および加熱後に遠心し、上清を SDS-PAGE に供した。ゲルを PVDF メンブランに転写後に一次抗体として抗スフィンゴミエリナーゼ抗体を用い、二次抗体にアルカリホスホターゼ標識抗体を用いてスフィンゴミエリナーゼを検出した。

2.2 照射後の培養液中からのスフィンゴミエリナーゼ精製物中の微量元素の解析

X 線 6Gy 照射後に細胞外（培養液）中から精製したスフィンゴミエリナーゼが含有する微量元素を解析するため、照射後 5 分、15、30 分、60 分間、インキュベーター内で培養し、培養液を免疫沈降法によってスフィンゴミエリナーゼを精製し、その精製スフィンゴミエリナーゼ蛋白質が含有する微量元素を 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 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、培養液からスフィンゴミエリナーゼを精製し、内部標準には Pd 標準液（原子吸光測定用標準液：1,000ppm / 1N HCl、Factor 1.004）を用い試料を調整した。それぞれの調製試料 5 μ 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 照射後の培養液中のスフィンゴミエリナーゼの経時的変化

これまでに X 線照射後の培養上清にスフィンゴミエリナーゼの酵素活性が照射 5 分から 15 分後ごろに上昇することが観察された。そこで、この培養液中でのスフィンゴミエリナーゼ蛋白質量の上昇をより直接的に解析するため、X 線照射後の培養液を抗スフィンゴミエリナーゼ抗体によって免疫沈降を行い、この免疫沈降物をウエスタンブロッティングによって解析した。

Fig.1 は X 線 6Gy 照射 5 分から 60 分培養後に培養液を回収し、培養液を抗スフィンゴミエリナーゼ抗体によって免疫沈降を行い、その後ウエスタンウエスタンブロッティングによってスフィンゴミエリナーゼを検出したメンブランである。約 57 kDa のバンド付近に明瞭にバンドが観察され、X 線照射後、バンドが濃くなることが観察され、特に照射 15 分から 30 分にかけて濃度の濃いバンドが観察された。この結果は X 線照射によってスフィンゴミエリナーゼが細胞内から細胞外に分泌され、このスフィンゴミエリナーゼ自身がシグナル分子として作用することを示唆している。

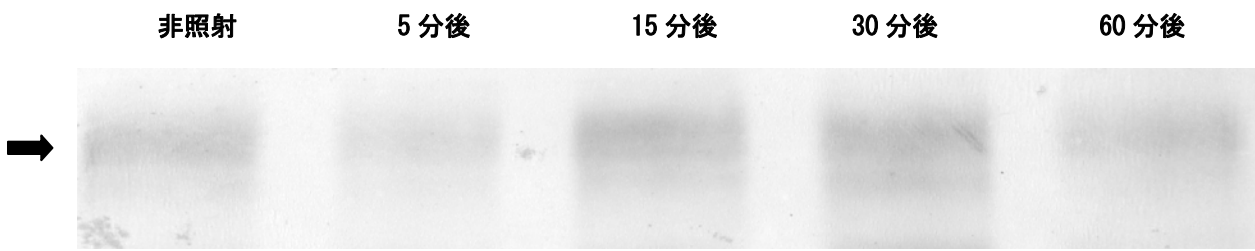
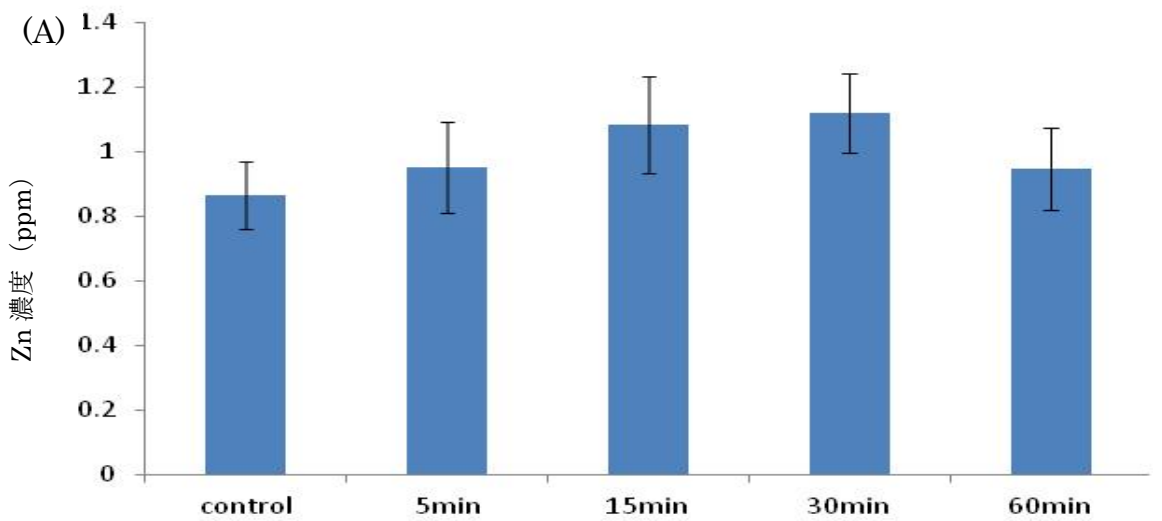
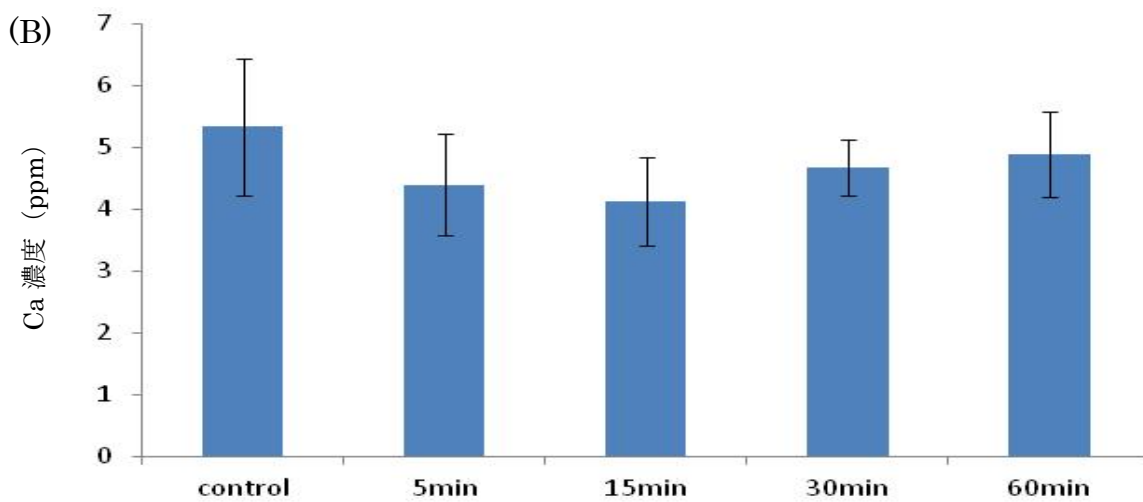


Fig 1. X線 6Gy 照射 5分~60分培養後の培養液を抗スフィンゴミエリナーゼ抗体によって免疫沈降し、その後、ウエスタンブロッティングによってスフィンゴミエリナーゼを検出した。矢印は約 57 kDa を示す。



X線照射後時間



X線照射後時間

Fig.2 X線 6Gy 照射後の培養上清中の亜鉛濃度(A)とカルシウム濃度(B)の経時的変化

3.2 照射後の培養液中からのスフィンゴリエリナーゼ精製物中の微量元素の解析

X線6 Gy照射後の経時的に培養上清を回収し、抗スフィンゴリエリナーゼ抗体による免疫沈降を用いたスフィンゴリエリナーゼ生成物中の微量元素を解析した。スフィンゴリエリナーゼ生成物中の亜鉛元素量の経時的な変化をFig. 2Aに示した。スフィンゴリエリナーゼ生成物中の亜鉛濃度はコントロール(非照射群)に比べ照射群では増加する傾向が観察され、照射15分から30分後には高値を示し、照射30分後では有意な増加が観察された。スフィンゴリエリナーゼ生成物中のカルシウム元素量の経時的な変化をFig. 2Bに示した。スフィンゴリエリナーゼ生成物中のカルシウム濃度はX線照射群ではコントロール(非照射群)と比べ有意な変化は観察されなかった。また、その他の二価の金属元素は検出されなかった。この亜鉛元素の経時的な増加は、照射後のスフィンゴリエリナーゼタンパク質の増加と相関することが観察され、細胞外に分泌されるスフィンゴリエリナーゼは亜鉛元素を含有することが示唆された。

4 考 察

これまで放射線によるバイスタンダー効果からの細胞死致死効果に関与するスフィンゴリエリナーゼは亜鉛元素が関係することが間接的に証明されてきた²⁾。本研究では、X線照射後の培養上清中のスフィンゴリエリナーゼを精製することによって、スフィンゴリエリナーゼが含有する金属元素を直接的に解析したところ亜鉛元素が検出され、これまでの間接的な解析と一致する結果が得られた。これらのことからバイスタンダー効果に関与するスフィンゴリエリナーゼは亜鉛元素を含有することが明らかとなった。実際、亜鉛含有スフィンゴリ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おり⁵⁾、亜鉛が結合によって分泌型タンパク質の機能を獲得する。本研究で検出したスフィンゴリエリナーゼは細胞外に分泌されたスフィンゴリエリナーゼであるため、細胞外に分泌されシグナル分子として他の細胞に作用することが推察された。

また、本研究においてスフィンゴリエリナーゼ精製物に対するPIXE解析によって、有意に観察できた二価の金属元素は亜鉛とカルシウムであった。生成物中のカルシウムの経時的な変化はスフィンゴリエリナーゼタンパク質の量の経時的な変化と対応することが観察されなかった。このことから、スフィンゴリエリナーゼは亜鉛元素を含有し細胞外に分泌することが考えられた。しかし、スフィンゴリエリナーゼ生成物中に高濃度のカルシウムが検出されたため、カルシウムもスフィンゴリエリナーゼ分泌および活性化に関与するかもしれないと考えられた。本研究の実験手法では培養上清を抗スフィンゴリエリナーゼ抗体によって沈降させた産物をPIXE解析に供している。このスフィンゴリエリナーゼが他のタンパク質と複合体を形成することによってシグナル分子として作用するならば、PIXE解析に供したサンプル中には別のタンパク質が含まれている。このため、検出されたカルシウムはスフィンゴリエリナーゼと複合体を形成するタンパク質に由来するかもしれない。このため、今後、スフィンゴリエリナーゼと複合体を形成するタンパク質を解析することによってバイスタンダー効果の作動機構からシグナル伝達機構を詳細に解析できると考えられる。

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, Kessler 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 bystander effect induced by X ray irradiation in glioma cell

A. Watanabe¹, M. Yamamoto¹, S.Wada¹, T.Kakizaki¹, K.Sera² and N. Ito¹

¹School of Veterinary Medicine, Kitasato university
35-1Higashi23bantyo, Towada, Aomori 034-8628, Japan

²Cyclotron 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 included in the sphingomyelinase using PIXE analysis. Purified sphingomyelinase form Extracellular medium after irradiation (6 Gy) using immunoprecipitation increase for 15 min and increased for 30 min after irradiation. Then, when divalent metals included in the purified sphingomyelinase using PIXE analysis were analyzed, zinc element and calcium element were observed, and fluctuation of zinc element concentration after irradiation corresponded with purified sphingomyelinase value. These results indicate sphingomyelinase secreted by radiation include zinc element and sphingomyelinase is activated by binding zinc element.