

X線照射によるバイスタンダー効果のシグナル伝達機構の解析

安藤達彦¹、渡邊 彩¹、柿崎竹彦¹、世良耕一郎²、和田成一¹

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ロンセンター
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、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、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、この細胞外に分泌されたスフィンゴミエリナーゼ分子について検証したところ、スフィンゴミエリナーゼ分子は亜鉛元素だけでなくその他の二価の金属元素、特にカルシウム元素との関連性も示唆されてきた。

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二価の金属元素の経時的変化を観察し、細胞外に分泌されたスフィンゴミエリナーゼの分子状態について解析した。

2 測定方法

2.1 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

細胞はグリオーマ由来の A172 細胞を用いた。X線 6 Gy 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：1,000 ppm / 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。

2.2 照射後の培養液の免疫沈降によるスフィンゴミエリナーゼの精製とその産物の SDS-PAGE による解析

X線 6 Gy 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、30 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 G アガロース Protein G 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 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。ゲルをクマシーブリリアントブルーにより染色した。

3 結果および考察

3.1 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 6 Gy 照射後の経時的に培養上清を回収し、抗スフィンゴミエリナーゼ抗体による免疫沈降を用いたスフィンゴミエリナーゼ生成物中の微量元素を解析した。スフィンゴミエリナーゼ生成物中の亜鉛元素量の経時的な変化を Fig. 1A に示した。スフィンゴミ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 15 分後では有意な増加が観察された。

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フィンゴミ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⁾。本研究でも X線照射後の培養上清中のスフィンゴミエリナーゼを精製することによって、スフィンゴミ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、スフィンゴミエリナーゼは亜鉛元素と結合して細胞外に分泌されることが再確認できた。実際、亜鉛含有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ミエリナーゼは細胞外に分泌されたスフィンゴミ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。

一方で PIXE 解析によってスフィンゴミエリナーゼ精製物中のその他の微量元素に着目したところ、カルシウムが検出され、その他の微量元素はほとんど観察されなかった。このカルシウムは実験系における溶液のバックグラウンドと考えられたが、X線照射後のスフィンゴミエリナーゼ精製物中のカルシウム元素量の経時的な変化を観察したとき、スフィンゴミエリナーゼ精製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、照射5分後から徐々に増加した Fig. 1B。また、このスフィンゴミエリナーゼ精製物中のカルシウム濃度の経時的変化はX線照射後のスフィンゴミエリナーゼ精製物中の亜鉛元素の経時的変化と対応していた。これらのことから、X線照射後に培養液中に照射細胞から分泌されたスフィンゴミエリナーゼはカルシウム元素との関連性も示唆された。

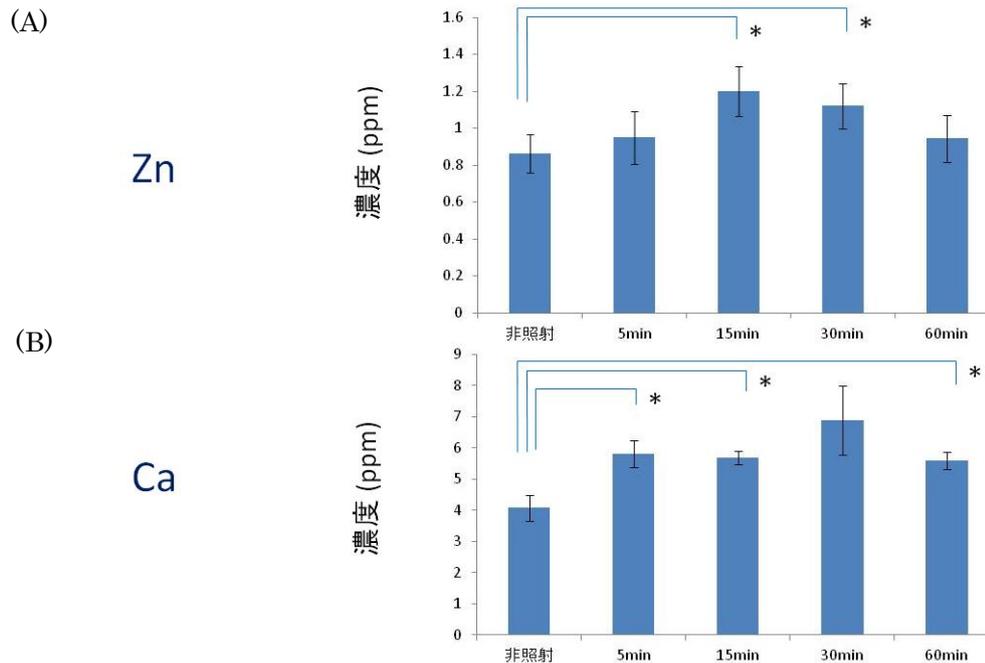


Fig.1 X線6Gy照射後の培養上清中の亜鉛濃度(A)とカルシウム濃度(B)の経時的変化

3.2 照射後の培養液の免疫沈降によるスフィンゴミエリナーゼの精製とその産物の SDS-PAGE による解析

スフィンゴミエリナーゼとカルシウム元素の関連性において、スフィンゴミエリナーゼがカルシウム結合タンパク質と複合体の可能性を検証するため、X線照射後のスフィンゴミエリナーゼの精製産物を SDS-PAGE により解析した。Fig.2 は X線6 Gy 照射5分および30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 SDS-PAGE を行い、ゲルを染色した。染色ゲルには分泌型のスフィンゴミエリナーゼの約 57 kDa のバンド付近に明瞭にバンドが観察され、X線照射5分後、バンドが濃くなること観察された。この結果は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、X線照射によってスフィンゴミエリナーゼの分泌が増加したと考えられた。さらに、57 kDa 以外にもバンドが観察され、約 50 kDa に明瞭のバンドが観察された。さらに、この 50 kDa のバンドは照射5分後が最も濃く、57 kDa のバンドの経時的変化と対応していた。これらのことから、X線照射によってスフィンゴミエリナーゼは照射5分後から分泌が亢進され、さらにスフィンゴミエリナーゼは約 50 kDa のタンパク質と複合体を形成した細胞外に分泌されると考えられた。

本研究においてこの 50 kDa のタンパク質を完全に同定できていない。しかし、スフィンゴミエリナーゼの活性化にはカルモジュリンが必要と考えられている⁶⁾。カルモジュリンはカルシウム元素結合タ

ンパク質であるのでスフィンゴミエリナーゼの挙動と対応すると考えられるが、カルモジュリンの分子量は 16 kDa であり、本研究で観察された 50 kDa とは一致しない。しかし、カルモジュリンはカルモジュリンキナーゼと相互作用することによって活性化し、また、カルモジュリンキナーゼの分子量は約 50 kDa であるため、今回検出された 50 kDa のバンドはカルモジュリンキナーゼの可能性が考えられた。カルモジュリンキナーゼはさまざまなタンパク質をリン酸化することによって活性化するシグナル伝達分子である。このため、X 線照射によって細胞外に分泌され、バイスタンダー細胞に作用して細胞死に関するシグナル伝達の誘導が推察された。しかしながら、本研究において検出されたカルシウム元素は細胞外に分泌されたスフィンゴミエリナーゼに直接結合する可能性もあるため、X 線照射によって生じるバイスタンダー因子については今後詳細に解析することが必要である。

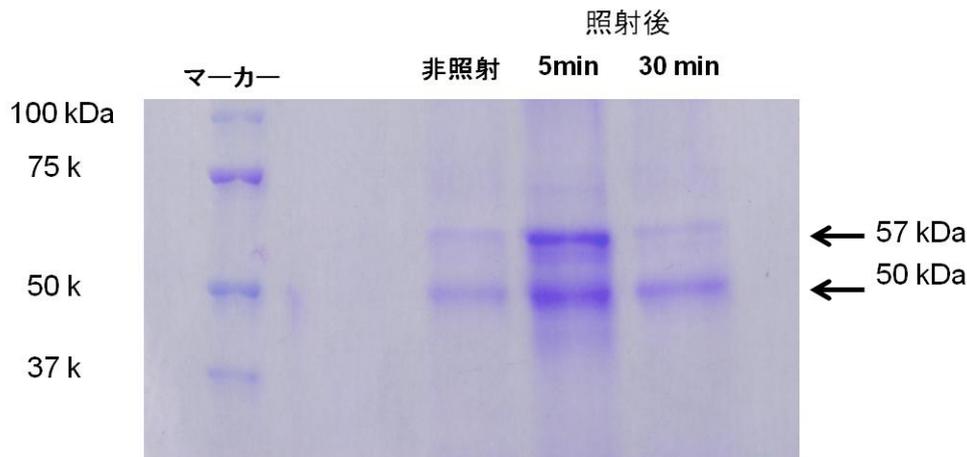


Fig.2 X 線照射後の培養液中における抗スフィンゴミエリナーゼ抗体による精製産物中のタンパク質の検出

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. 1998. The Cellular Trafficking and Zinc Dependence of Secretory and Lysosomal Sphingomyelinase, Two Products of the Acid Sphingomyelinase Gene. *J. Biol. Chem.* 273(29),18250–18259.
- 6) Masson M, Albouz S, Boutry JM, Spezzatti B, Castagna M, Baumann N. 1989. Calmodulin antagonist W-7 inhibits lysosomal sphingomyelinase activity in C6 glioma cells. *J Neurochem.* 52(5):1645-7.

The analyses of bystander effect induced by X ray irradiation in glioma cell

T. Ando¹, A.Watanabe¹, T.Kakizaki¹, K.Sera² and S.Wada¹

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. When divalent metals included in the purified sphingomyelinase using PIXE analysis were analyzed, zinc element and calcium element were observed. When the purified sphingomyelinase was analyzed by SDS-PAGE, sphingomyelinase and other molecular (50 kDa) were observed. These results indicate sphingomyelinase secreted by radiation formed the complex with other molecular.