

X線照射によるバイスタンダー因子に関する研究

岩木晃太郎¹、柿崎竹彦¹、夏堀雅宏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
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

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放射線影響が発現することによると考えられている。このシグナル伝達経路には 2 つのシグナル伝達機構が知られている。1 つめは細胞間接着を必要とする経路であり、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であり、他方は細胞接着を必要としない経路であり、照射細胞から分泌された液性因子 (バイスタンダー因子) がメディアム (培養液) を介してシグナルを伝達する機構である。一方、腫瘍細胞ではギャップ結合は弱く、またはギャップジャンクション構成タンパク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 X 線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関与することが明らかにされている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も明らかにされている⁴。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され、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ことが明らかにされた⁵。一方、このスフィンゴミエリナーゼは細胞外にスフィンゴミエリナーゼ単体が分泌されるのではなく、その他の分子と複合体を形成して分泌されることが示唆された。さらに、近年、細胞間シグナル伝達には膜小胞 (マイクロベジクル) が重要と考えられており、スフィンゴミエリナーゼも膜小胞に含有される可能性が考えられた。

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 線照射後の培養上清から膜小胞を精製し、膜小胞内の金属結合タンパクを精製した。さらに、精製した金属結合タンパクからスフィンゴミエリナーゼを精製し、精製スフィンゴミエリナーゼが結合する金属元素を PIXE 法によって解析した。

2 方法

2.1 X線照射後の培養液からの膜小胞内の金属結合性スフィンゴミエリナーゼの精製

細胞はグリオーマ由来の A172 細胞を用いた。膜小胞は 100 nm~1 μm であるため、100 nm における限外濾過法を用いた。X線 6 Gy 照射 10 分後に細胞外（培養液）を 100 nm の限外濾過フィルターを用いて遠心した。遠心後に 100 nm のフィルター上に残存する成分を PBS で洗浄回収し、膜小胞サンプルとした。このサンプルを金属結合ビーズ（Chelating Sepharose Fast Flow）に 24 時間攪拌混和した。その後、Tris-HCl 溶液により洗浄後、イミダゾール溶液によってビーズからタンパクを解離させ、タンパク溶液を回収した。このタンパク溶液中のタンパク濃度は BCA 法によって測定を行った。さらに、このタンパク溶液に対して抗スフィンゴミエリナーゼ抗体を用いた免疫沈降法によって、金属結合性スフィンゴミエリナーゼを精製した。

2.2 X線照射後の培養液中の膜小胞内の微量元素の解析

X線 6 Gy 照射後に細胞外（培養液）中から精製した金属結合性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、PIXE 法によって解析した。PIXE 分析用試料の作成については、内部標準に Pd 標準液（原子吸光測定用標準液：100 ppm / 1N HCl、Factor 1.004）を用いた膜小胞サンプルを作成した。それぞれの調製試料 5 μl 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、2.9 MeV 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 結果および考察

膜小胞は細胞間シグナル伝達において重要な因子であり、膜小胞は多くのタンパク質を含んでいる。さらに膜小胞内にスフィンゴミエリナーゼの存在が示唆され、バイスタンダー効果に関与すると考えられている。まず、膜小胞内の金属結合タンパクを精製するため、X線照射後の培養上清中の膜小胞分画に金属結合性ビーズを反応させた後にビーズから金属結合タンパクを回収した。この回収タンパク溶液中のタンパクの存在を確認するためタンパク濃度を測定したところ、タンパクが検出された。さらに、X線照射したタンパク溶液は非照射と比べ、有意な増加が観察された（Fig.1）。このことから、X線照射によって膜小胞の分泌が亢進し、膜小胞は金属結合タンパクを含有すると考えられた。これまでも X線照射における膜小胞分画のタンパク濃度の増加が報告されているため、さまざまな金属に結合したタンパクが細胞外に膜小胞の形態で分泌されたと考えられた。

次に、膜小胞内に含まれる金属結合スフィンゴミエリナーゼが結合する金属元素の同定のため、膜小胞内に含まれる金属結合タンパクから抗スフィンゴミエリナーゼ抗体による免疫沈降によりスフィンゴミエリナーゼを精製し、この精製スフィンゴミエリナーゼが結合する金属元素を PIXE 法により解析した。PIXE 法により明らかに検出できた 2 価の金属元素はカルシウム、亜鉛、銅および鉄であった（Fig.2-1,2）。また、X線照射による金属元素濃度の変化を観察したところ、亜鉛および銅は X線照射によって増加する傾向が観察され、一方、カルシウムや鉄は X線照射によって明らかな増加は観察されなかった。また、タンパクを含まない対照回収液における PIXE 法においても今回検出されたカルシウム、亜鉛、銅および鉄が観察され、いずれも非照射サンプルと同程度であった。これらのことからスフィンゴミエリナーゼは亜鉛および銅と結合することが考えられ、特に亜鉛と銅に結合するスフィンゴミエリナーゼを含有する膜小胞の分泌亢進がバイスタンダー効果の発現に関与すると推察された。これまでにスフィンゴミエリナーゼは様々な 2 価の金属元素と結合することによって活性化することが報告されており⁶、特に分泌型のスフィンゴミエリナーゼは亜鉛と結合すると考えられている。本研究でも膜小胞内のスフィンゴミエリナーゼでは亜鉛元素が観察されたため、スフィンゴミエリナーゼが分泌活性を有するためには亜鉛が不可欠と考えられた。

また、本研究ではスフィンゴミエリナーゼが結合する金属元素として銅も存在すると考えられた。一方、

銅と結合するタンパクは様々なタンパクが存在するが、スフィンゴミエリナーゼと銅の関連性については報告がない。本研究では X 線照射により膜小胞として分泌亢進するスフィンゴミエリナーゼに結合する金属元素として銅の可能性が示唆されたが、X 線照射によって有意な増加ではなかったため、さらに金属結合スフィンゴミエリナーゼの精製量を増加させることによってより詳細に解析する必要がある。

以上のことから X 線照射によって膜小胞が分泌され、膜小胞は金属結合タンパク質を含有し、特にパイスタンダー効果の誘導に関与すると示唆されているスフィンゴミエリナーゼは亜鉛と銅と結合することによってシグナル伝達に関与すると考えられた。

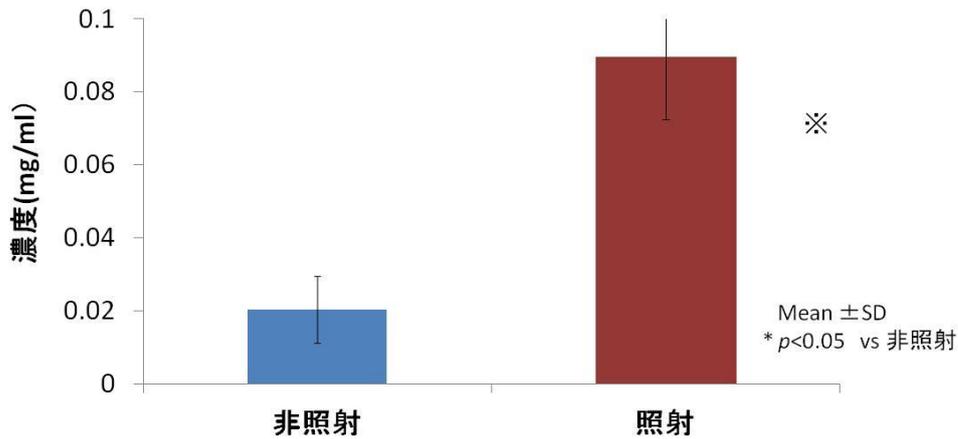


Fig.1 X 線 6 Gy 照射後の培養液から精製した膜小胞の金属結合タンパク濃度

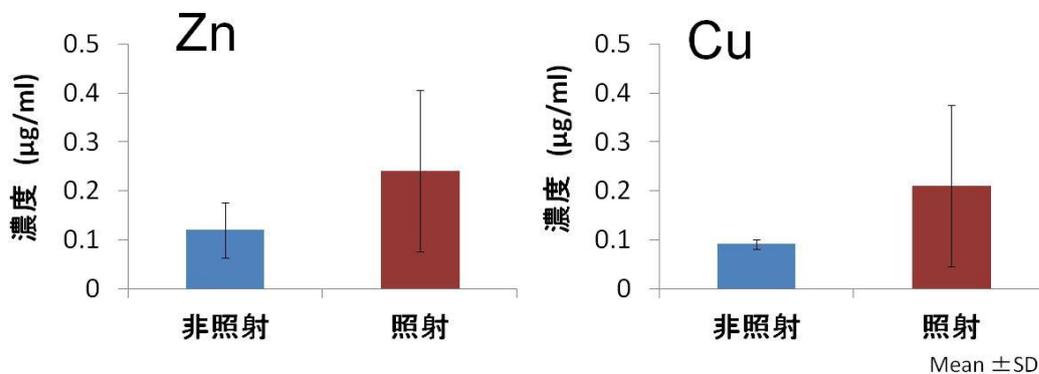


Fig. 2-1 X 線 6 Gy 照射後の膜小胞内スフィンゴミエリナーゼの亜鉛濃度 (Zn) 銅濃度 (Cu) の変化

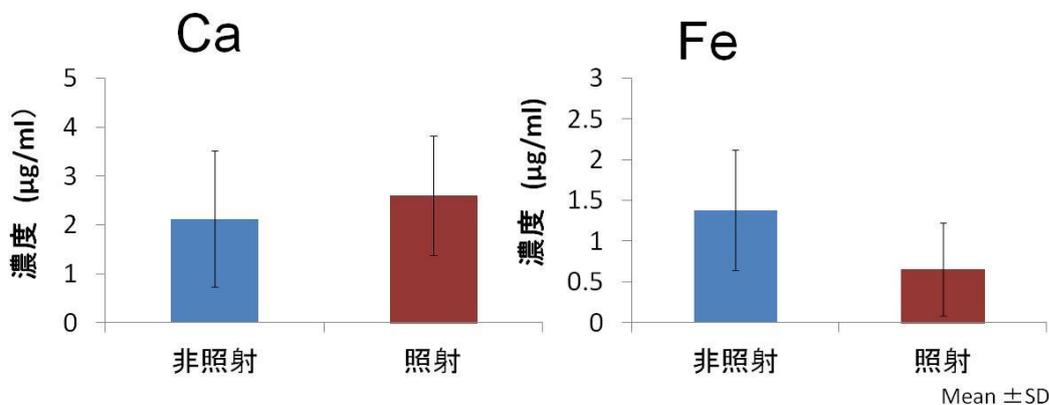


Fig. 2-2 X 線 6 Gy 照射後の膜小胞内スフィンゴミエリナーゼのカルシウム濃度 (Ca) と鉄濃度(Fe)の変化

参考文献

- 1) Hall E.J. 2003. The crooked shall be made straight; dose-response relationships for carcinogenesis. *Int.J.Radiat.Biol.*,80,327-337
- 2) Nagasawa, H., 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) Wada S., Sudo M., Tamura S., Kakizaki T., Sera K. and Ito N. The analyses of the cell lethal effect induced by low-dose radiation in glioma—Relation of bystander effect and metal elements— *Int. J. PIXE*, 2011:1&2:47-54.
- 5) 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.
- 6) Schissel S.L., Keesler G.A., Schuchman E.H., Williams K.J., 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.

The analysis of signal secretion on bystander effect induced by X ray irradiation

K. Iwaki¹, T. Kakizaki¹, M. Natsuhori¹, K. Sera² and S. Wada¹

¹School of Veterinary Medicine, Kitasato university
35-1 Higashi 23bantyo, Towada, Aomori 034-8628, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

Recently, bystander effect was focused on the radiation effects. Irradiated cells secreted something liquid factor that induced lethal effect by signal transduction. So far, we suggested that radiation induced bystander effect is closely relative to sphingomyelinase. Still more signal transduction of sphingomyelinase is related to microvesicles. Because many divalent metals bind sphingomyelinase in microvesicles, in this study we investigated divalent metal in refined sphingomyelinase using PIXE analysis. The concentration of zinc and copper element form refined sphingomyelinase increased after irradiation. These results indicate zinc- and copper-binding sphingomyelinase is related to signal transduction on bystander effect.