

## X線照射によるバイスタンダー効果誘導におけるシグナル分泌の解析

植田大介<sup>1</sup>、柿崎竹彦<sup>1</sup>、夏堀雅宏<sup>1</sup>、世良耕一郎<sup>2</sup>、和田成一<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>岩手医科大学サイクロトンセンター  
020-0603 岩手県滝沢市留が森 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<sup>1,2</sup>。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) がメディウム (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いため、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関与することが明らかにされている<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。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<sup>5</sup>。一方、スフィンゴミエリナーゼは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<sup>6</sup>。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る可能性が考えられた。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、膜小胞内のタンパク質の存在を検証した。さらに、膜小胞内に含まれるタンパク質の金属元素要求性についても検証した。

## 2 方法

### 2.1 X線照射後の培養液からの膜小胞の精製と膜小胞内のタンパク質の解析

細胞はグリオーマ由来の A172 細胞を用いた。膜小胞は 100nm~1 $\mu$ m であるため、100nm における限外濾過法を用いた。X線 6Gy 照射 10 分後に細胞外(培養液)を 100nm の限外濾過フィルターを用いて遠心した。遠心後に 100nm 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 SDS サンプルバッファーによって変性および加熱後に SDS-PAGE に供した。電気泳動後にゲルをクマシーブリーリアントブルーにより染色した。

### 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)中から精製した膜小胞が含有する微量元素を解析するため、照射後 10 分間に培養上清から精製した膜小胞サンプルの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、2 価の金属元素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、内部標準に Pd 標準液(原子吸光測定用標準液: 100ppm/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  $\mu$ 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、2.9 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

### 3.1 膜小胞の精製とその含有タンパク質の SDS-PAGE による解析

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。そこで、膜小胞内に含まれるタンパク質の種類について観察した。Fig.1 は X線 6 Gy 照射 10 分培養後に培養液を回収し、100 nm フィルターで限外濾過後の溶液について SDS-PAGE を行い、ゲルを染色した。染色ゲルには約 57 kDa のバンド付近に明瞭にバンドが観察され、X線照射 10 分後では非照射に比べ、バンドが濃くなる傾向が観察された。さらに、57 kDa 以外にもバンドが観察され、約 50 kDa と 70 kDa にバンドが観察された。この結果から膜小胞は数種類のタンパク質を含有しており、さらに、X線照射によって膜小胞の分泌が増加したと考えられた。これまでの研究において X線照射によって細胞外にスフィンゴミエリナーゼの分泌亢進が報告されている<sup>4</sup>。このスフィンゴミエリナーゼの分子量は 57 kDa であり<sup>6</sup>、本研究で検出された 57 kDa のタンパク質はスフィンゴミエリナーゼである可能性が考えられた。さらに、スフィンゴミエリナーゼの活性化にはリン酸化酵素のカルモジュリンキナーゼが関与する。このカルモジュリンキナーゼは 50 kDa のタンパク質である。このため、スフィンゴミエリナーゼが活性化の状態では細胞外に分泌されるならば、カルモジュリンキナーゼの制御を受けていると考えられ、膜小胞はカルモジュリンキナーゼも含有すると考えられた。さらに、スフィンゴミエリナーゼとカルモジュリンキナーゼは相互作用をするため<sup>7</sup>、スフィンゴミエリナーゼとカルモジュリンキナーゼは単体として膜小胞に存在するわけではなく、複合体を形成することが推察された。

また、本研究で検出された 70 kDa のタンパク質については明らかに出来ないが、スフィンゴミエリナーゼの前駆体は約 70 kDa であり、細胞内でプロセッシングされて 57 kDa となる。このため、70 kDa のタンパク質については 57 kDa のスフィンゴミエリナーゼの前駆体である可能性が示唆された。実際、膜小胞はリン脂質で構成されており、スフィンゴミエリンを主体に構成されている。このため、細胞膜に応答する分子が

多く含まれるのは妥当だと考えられる。これらのことから膜小胞のシグナル伝達にはスフィンゴミエリナーゼに関連する分子が重要と考えられた。

### 3.2 膜小胞内の微量元素の解析

膜小胞内のタンパク質の解析により、膜小胞内はスフィンゴミエリナーゼやカルモジュリンキナーゼを含有する可能性が示唆された。また、これらのタンパク質は金属元素と結合することによって活性化するため<sup>5,7</sup>、膜小胞内も金属元素を含有すると考えられる。そこで、X線照射後に膜小胞を精製し、膜小胞内の微量元素を観察した。本研究において膜小胞に亜鉛、カルシウム、銅、鉄が検出できた。さらに Fig. 2-1 と 2-2 は X線照射による膜小胞が含有する金属元素の変化を表している。亜鉛とカルシウムは X線照射後に有意な増加が認められたが、銅と鉄においては明らかな変化は観察されなかった。これらのことから、膜小胞は金属元素を含有しており、特に亜鉛とカルシウムが X線による影響に関与すると考えられた。

膜小胞内に検出されたタンパク質の候補としてスフィンゴミエリナーゼが考えられたが、スフィンゴミエリナーゼは亜鉛やカルシウムと結合する。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ため、亜鉛の増加はスフィンゴミエリナーゼの挙動と相関があると考えられた。また、カルモジュリンキナーゼはその活性化にカルシウム結合分子のカルモジュリンと相互作用するため、カルシウムの挙動はカルモジュリンキナーゼに相関すると考えられた。これらのことから膜小胞によるシグナル伝達の因子としてスフィンゴミエリナーゼは重要な因子の1つと考えられた。しかし、本研究の解析はタンパク質と微量元素の関係は間接的な結果であるため、今後さらにそのタンパク質に対応した直接的な解析が必要である。

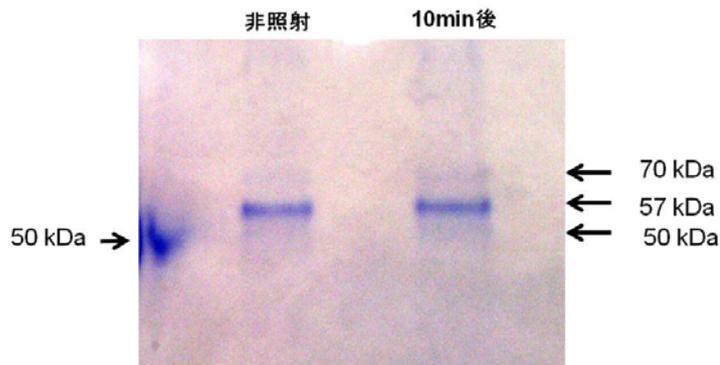


Fig.1 X線 6 Gy 照射後の培養液から精製した膜小胞のタンパク質の検出

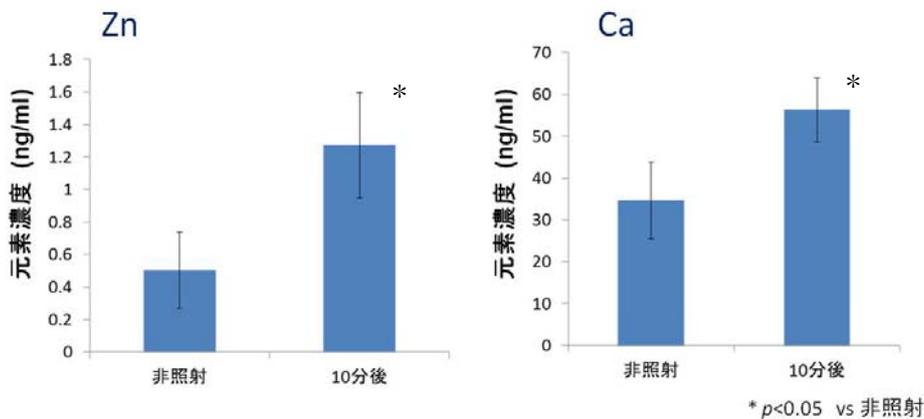


Fig. 2-1 X線 6Gy 照射後の膜小胞内の亜鉛濃度 (Za) とカルシウム濃度(Ca)の経時的変化

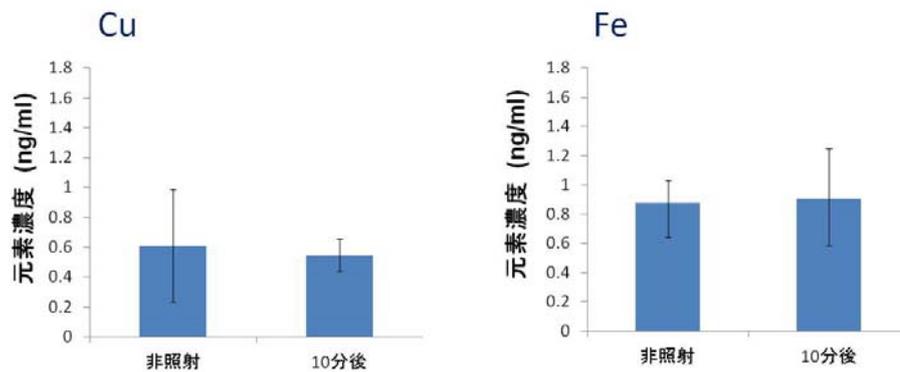


Fig. 2-2 X線6Gy照射後の膜小胞内の銅濃度(Cu)と鉄濃度(Fe)の経時的変化

#### 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.
- 7) Masson M, Albouz S, Boutry J.M, 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 analysis of signal secretion on bystander effect induced by X ray irradiation

D. Ueta<sup>1</sup>, T. Kakizaki<sup>1</sup>, M. Natsuhori<sup>1</sup>, K. Sera<sup>2</sup> and S. Wada<sup>1</sup>

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

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

### Abstract

Recently, it was considered that the cell lethal effect by low dose radiation was due to bystander effect. 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 with sphingomyelinase. Still more signal transduction of sphingomyelinase is related to microvesicles. To include protein and metal in the microvesicles, in this study we investigated divalent metal and proteins in the microvesicles using PIXE analysis and SDS-PAGE. 50 kDa, 57 kDa and 70 kDa proteins were detected by SDS-PAGE, and zinc and calcium elements were detected by PIXE analysis in the microvesicles. These results indicate microvesicles by radiation secrete many molecules that are related to signal transduction.