

低線量放射線照射によるバイスタンダー効果誘導機構の解析

馬殿淳美¹、田村咲子¹、和田成一¹、柿崎竹彦¹、後藤祥子²

世良耕一郎³、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 (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

³ 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

これまで、低線量域の放射線照射による細胞応答は高線量域からのデータを外挿して予測されてきた。しかし、近年、低線量域での細胞応答に関して、高線量域のデータから逸脱する現象が報告されるようになり、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った¹⁾。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。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。1992年 Nagasawa らによって、細胞に低線量の α 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%の細胞しか放射線にヒット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²⁾。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。しかしながら低線量照射によって誘導される生物応答は、未だ詳細には解明されていない。

グリオーマ細胞に低線量放射線照射をしたときに超感受性を示すことが報告されており、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超感受性はバイスタンダー効果、特に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、バイスタンダーを誘導する液性因子の候補としては TNF- α 、TGF- β 1 や活性酸素種の OH ラジカルや NO ラジカルの関与も示唆されているが、これらの因子の放射線誘導機構については詳細には解明されていない。そこで、これらの因子の誘導には細胞膜応答が引き

金となる可能性が示唆されているので⁴⁾、放射線誘発の細胞膜応答を担うスフィンゴリエリナーゼに着目した。この酵素は TNF- α 、IL-1 β 、FAS リガンドなどの細胞外のサイトカインや、熱ショック、ストレス刺激、 γ 線照射、UCV 照射やストレス刺激によって活性化され、細胞膜を構成するスフィンゴリエリンを加水分解し、セラミドの放出を引き起こす。セラミドは、脂質のセカンドメッセンジャー、細胞周期停止、細胞老化やアポトーシスなどを含む多様なストレス関連反応の修飾因子として機能しているため、スフィンゴリエリナーゼが放射線による細胞致死効果に重要な役割を担うと考えられている⁵⁾。当研究では、スフィンゴリエリナーゼ阻害剤による薬理学的手法によって、液性のバイスタンダー効果が抑制されることを観察し、低線量放射線照射によるバイスタンダー効果の誘導にはスフィンゴリエリナーゼが関与することを明らかにした³⁾。

さらに、スフィンゴリエリナーゼは、その活性に多種の 2 価金属イオンを要すると報告⁶⁾がなされており、近年、中性スフィンゴリ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。

そこで、低線量照射による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、低線量照射後の細胞内外におけるスフィンゴリエリナーゼ活性を観察し、スフィンゴリエリナーゼの活性化に関与する金属イオンの特定のために低線量放射線照射後の細胞内外の金属イオン量を PIXE 法を用いて経時的に分析した。

2 測定方法

2.1 照射後の細胞内外のスフィンゴリエリナーゼ活性の観察

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 0.02 Gy/min で行った。照射後、活性化スフィンゴリエリナーゼの細胞内外の移行を調べるため、照射後 0 分、5 分、15 分間、インキュベーター内で培養した各照射細胞から細胞、培養液をそれぞれ回収しスフィンゴリエリナーゼ活性測定の試料とした。照射した細胞とその培養液を回収した。回収した照射細胞は蛋白抽出と定量を行った。培養液は限外濾過によって濃縮をした。それぞれの試料を Amplex Red sphingomyelinase Assay Kit を用いてスフィンゴリエリナーゼ活性を測定した。96 穴プレートを使用し、100 μ l/well の酢酸ナトリウム (pH=5.0) を入れ、そこに各試料を 3 μ g/well ずつ加えた。次に各々のサンプルと positive control に基質である 2%スフィンゴリエリンを 10 μ l ずつ添加し、37°Cの遮光条件下で 6 時間反応させた。反応後、Assay Kit の反応試薬 (Amplex Red reagent、Horseradish peroxidase、coline oxidase、alkalin phosphatase) を緩衝溶液である Tris-HCl (pH=8.0) で溶解して 100 μ l/well ずつ加えた。その後マルチモードプレートリーダーを用いて蛍光強度の測定 (波長 544/590 nm) を行うことにより試料中のスフィンゴリエリナーゼ活性を測定した。

2.2 照射後の細胞内外微量元素の変動

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、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、スフィンゴリエリナーゼの活性には 2 価の金属元素を要求するため、Mg、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、各細胞を凍結乾燥させ、ニッ川ら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 : 1,000 ppm/1N HCl、Factor 1.004) を用い、細胞試料に対して終濃度 : 約 1,000 ppm になるように加えた。培養液の試料は Pb 標準液を最終濃度 1,000 ppm になるように調整した。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、2.9 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

3.1 照射後の細胞内外のスフィンゴミエリナーゼ活性の観察

これまでに低線量 X 線照射による細胞致死効果、特にバイスタンダー効果による致死効果にはスフィンゴミエリナーゼの関与が示唆された⁴⁾。そこでバイスタンダー効果に関与するスフィンゴミエリナーゼ活性化機構の解明のため、X 線照射後のスフィンゴミエリナーゼ活性を細胞内と細胞外において分析した。低線量 0.1 Gy 照射後の細胞内におけるスフィンゴミエリナーゼ蛋白活性値を経時的に測定し、コントロール（非照射細胞）を 1 とした時の照射後培養時間 0 分、5 分、15 分のときの値を算出した (Fig.1A)。このとき照射 0 分の値は、 1.01 ± 0.046 、照射 5 分後では 1.08 ± 0.02 、照射 15 分後では 0.96 ± 0.09 となった。細胞内スフィンゴミエリナーゼ活性は照射 5 分後において増加する傾向を示し、非照射に対して統計的有意差が認められた ($p < 0.05$)。また、照射 15 分後では、統計的有意差は認められなかったが非照射より低くなる傾向が観察された。

さらに、照射細胞の培養液におけるスフィンゴミエリナーゼ蛋白活性値を測定することにより、細胞外のスフィンゴミエリナーゼ活性の経時的な変化を観察した (Fig. 1B)。細胞内における測定と同様に、コントロール（非照射細胞群）を 1 とした時の照射後培養時間 0 分、5 分、15 分のときの値を算出した。このとき照射 0 分の値は 1.09 ± 0.068 、照射 5 分後では 1.025 ± 0.003 、照射 15 分後では 1.10 ± 0.032 となった。細胞外スフィンゴミエリナーゼ活性は照射 15 分後において増加する傾向を示し、非照射に対して統計的有意差が認められた ($p < 0.05$)。細胞内のスフィンゴミエリナーゼの経時的な動きとして、5 分後に上昇し 15 分後にはそれに比べ減少しており、逆に細胞外における動きとしては、5 分後に減少し 15 分後には増加した。この結果により、スフィンゴミエリナーゼは低線量照射によって照射 5 分後までに細胞内で活性化し、照射 5 分後から 15 分後までの間に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た可能性が示唆された。

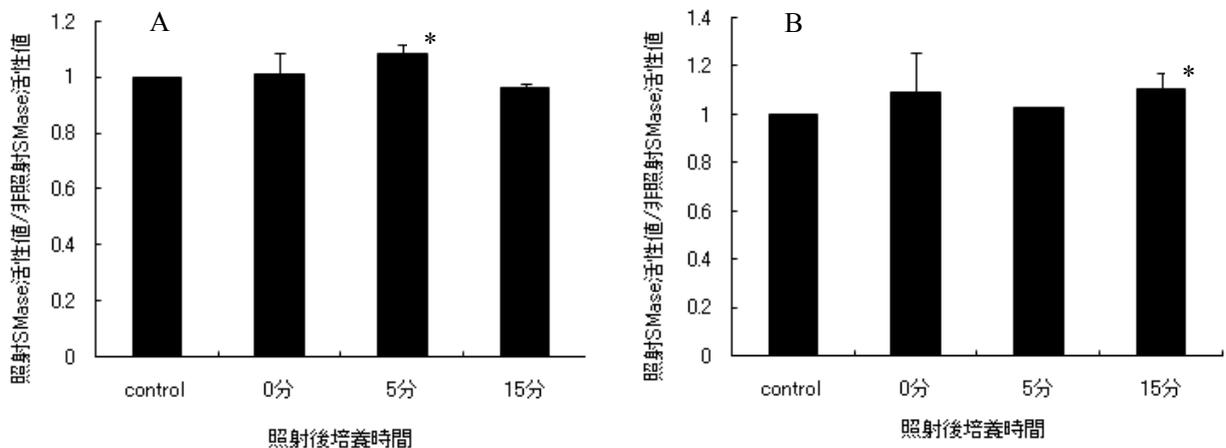


Fig.1 低線量 X 線を照射した時の細胞内外の SMase 活性。(A)X 線 0.1Gy 照射後の細胞内 SMase の経時的変化と (B)細胞外 SMase の経時的変化。結果は平均値±SE で表している。* $P < 0.05$

3.2 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⁶⁾。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と考えられる、各種 2 価の金属イオンである Mg、Ca、Zn の細胞内外の挙動を調べるため、細胞に低線量放射線を照射後、2 価の金属イオンの細胞内外の変化を PIXE 元素分析法によって経時的に解析した。

X 線 0.1 Gy 照射後の細胞内 Zn 量の経時的な変化を Fig. 2A に示した。コントロール（非照射細胞群）を 1 とした時の照射 0 分の値は 1.1 ± 0.18 、照射 5 分後では 1.31 ± 0.49 、照射 15 分後では 1.19 ± 0.058 となった。X 線照射による経時的な細胞内 Zn 動態はコントロールに対して統計的有意差は認められなかったが、コントロー

ルに対し照射0分から5分後で著しく増加する傾向が観察され、照射15分後にコントロールの値に近づく傾向が観察された。また照射細胞の培養液におけるZn量を測定することにより、細胞外Zn量の経時的な変化をFig. 2Bに示した。細胞内における測定と同様に、コントロール（非照射細胞群）を1とした時、照射0分の値は 1.62 ± 0.39 、照射5分後では 0.79 ± 0.33 、照射15分後では 1.47 ± 0.12 となった。照射0分で細胞外Zn量は上昇し、照射5分後にはコントロールに対して減少する傾向が観察され、照射15分後でコントロールに対して高い値を示し、統計的有意差が認められた ($p < 0.05$)。細胞内のZnの経時的な挙動として、5分後に上昇し15分後にはそれに比べ減少しており、逆に細胞外の動きとしては、5分後に減少し15分後には増加した。この結果から、低線量照射によってZnは照射5分後までに細胞内外を挙動し、照射5分から15分後までの間に細胞外に出たと考えられ、スフィンゴミエリナーゼ活性にZnを要求する可能性が示唆された。

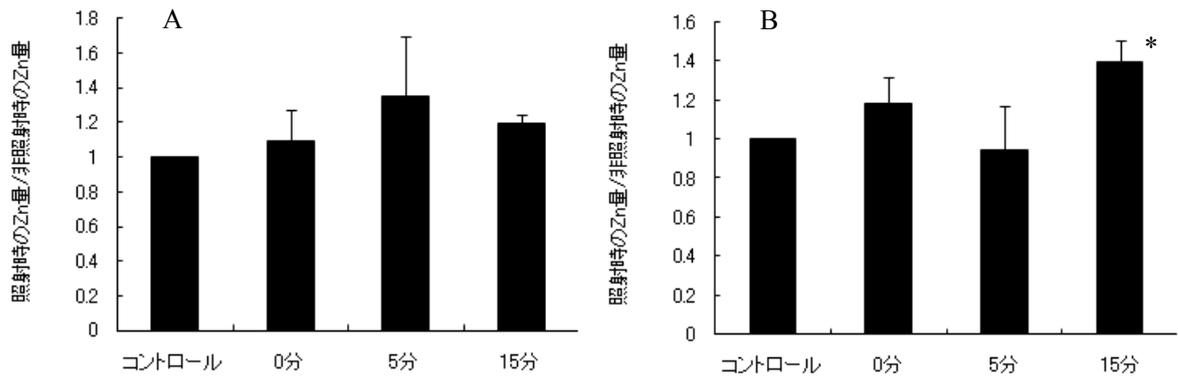


Fig.2 低線量 X 線照射による細胞内外の亜鉛元素量の経時的変化。(A)細胞内亜鉛量の経時的変化と(B)細胞外亜鉛量の経時的変化。結果は平均値±SE で表している。* $P < 0.05$

X 線 0.1 Gy 照射後の細胞内外 Mg 量の経時的な変化を Fig. 3A、B に示した。細胞内 Mg 量および細胞外 Mg 量は照射後に減少する傾向が観察されたが、スフィンゴミエリナーゼ活性との関連性は認められなかった。

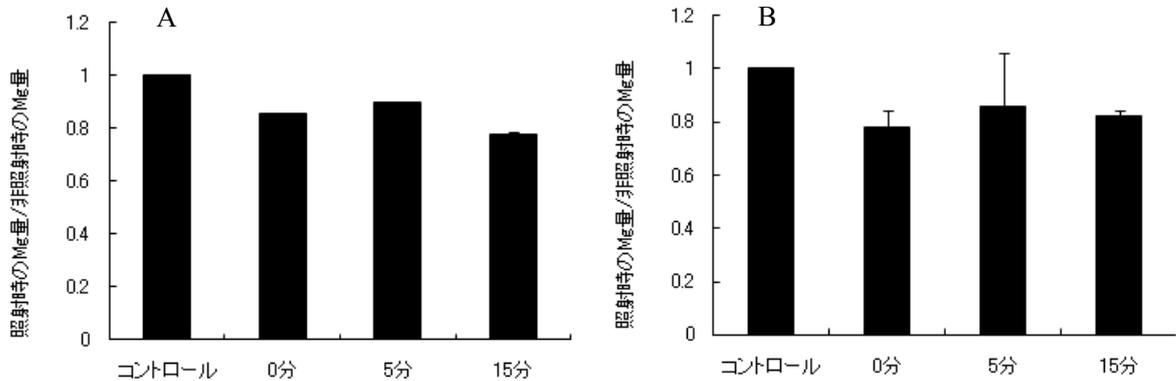


Fig.3 低線量 X 線照射による細胞内外のマグネシウム元素量の経時的変化。(A)細胞内マグネシウム量の経時的変化と(B)細胞外マグネシウム量の経時的変化。結果は平均値±SE で表している。

X 線 0.1 Gy 照射後の細胞内 Ca 量の経時的な変化を Fig. 4A に示した。コントロール（非照射細胞群）を1とした時の照射0分の値は 0.997 ± 0.2 、照射5分後では 1.32 ± 0.33 、照射15分後では 1.02 ± 0.08 となった。また照射細胞の培養液におけるCa量を測定することにより、細胞外Ca量の経時的な変化をFig. 4Bに示した。細胞内における測定と同様に、コントロール（非照射細胞群）を1とした時の照射後培養時間0分、5分、15分のときの値を算出した。照射0分の値は 0.97 ± 0.08 、照射5分後では 1.02 ± 0.12 、照射15分後では 0.96 ± 0.12 となった。細胞内においては、照射後5分でCa量が増加し15分で減少する傾向が観察されたが、細胞外の

Caの動きとしてはあまり経時的な変化は認められず、スフィンゴミエリナーゼ活性との関連性は認められなかった。

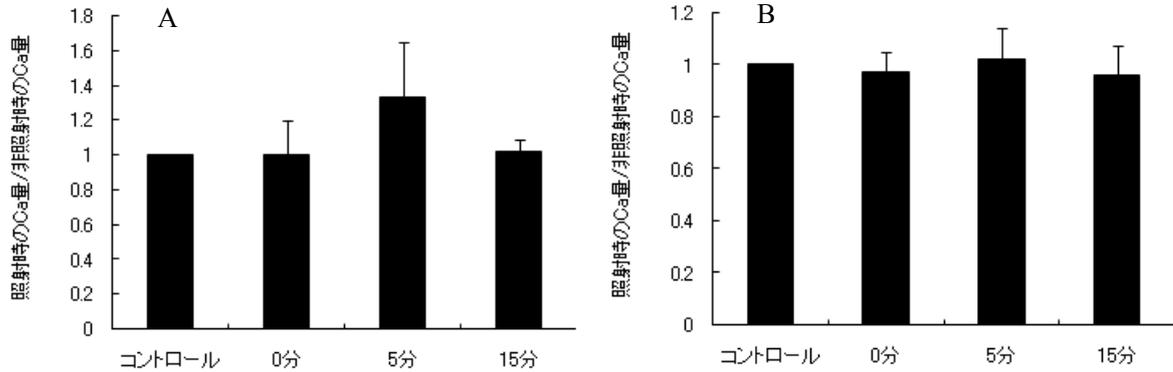


Fig.4 低線量X線照射による細胞内外のカルシウム元素量の経時的変化。(A)細胞内カルシウム量の経時的変化と(B)細胞外カルシウム量の経時的変化。結果は平均値±SEで表している。

4 考察

本研究では、放射線照射によるバイスタンダー効果のメカニズムの初期過程を解析した。特にこの現象を引き起こす液性因子としてのスフィンゴミエリナーゼの関与について解析するために、低線量照射に対して過敏に応答を示すグリオーマ細胞株を用いて解析を行った。まず、放射線超感受性を示すと報告されているグリオーマ由来のA172細胞に低線量域の0.1 Gyの照射を行い、細胞内と細胞外におけるスフィンゴミエリナーゼ活性を経時的に測定した。

細胞内のスフィンゴミエリナーゼ活性は照射5分後に上昇、15分後には減少し、逆に細胞外における変化としては、照射5分後に減少、15分後には増加した。この結果からA172細胞において、低線量照射により照射直後から5分後までに細胞内でスフィンゴミエリナーゼが活性化し、5分後から15分後に細胞内で活性化したスフィンゴミエリナーゼが細胞外に出て行くと考えられ、スフィンゴミエリナーゼが近傍の非照射細胞に作用しバイスタンダー効果を引き起こすバイスタンダー因子の1つであることが考えられた。

またスフィンゴミエリナーゼには、酸性スフィンゴミエリナーゼと中性スフィンゴミエリナーゼが存在する。ヒト腫瘍細胞において、放射線照射後に酸性スフィンゴミエリナーゼ活性は増加するが、中性スフィンゴミエリナーゼ活性に変化は認められなかったと報告されている。今実験で測定したスフィンゴミエリナーゼ活性は酸性スフィンゴミエリナーゼ活性であり、低線量放射線によりバイスタンダー効果に関わるのは酸性スフィンゴミエリナーゼであると考えられた。

また、スフィンゴミエリナーゼの活性化に必要な金属元素の動きを解析することより、間接的にスフィンゴミエリナーゼの活性化に関与する金属イオンの特定出来るため、低線量放射線照射後の細胞内外の金属元素量、特にMg、Ca、Znの細胞内外の濃度をPIXE法を用いて経時的に分析した。本研究ではスフィンゴミエリナーゼ活性と関連した挙動が観察されたのはZnであった。細胞内Zn量が照射5分後に顕著に上昇し、15分後に低下するという結果に加えて、細胞外Zn量がその動きに相反するような動態を示すことが観察された。特に細胞外Zn量が照射15分後にコントロールに対して有意な上昇を示した。これらの結果から照射後に細胞内に取り込まれたZnが15分後までに細胞外に移動すると考えられた。また放射線照射後のZnの挙動はスフィンゴミエリナーゼの活性が高まる時間とほぼ一致しており、細胞内Zn量の上昇がスフィンゴミエリナーゼを活性化させると考えられた。したがって放射線照射によるスフィンゴミエリナーゼの活性化にはZnを要し、Znと結合した活性型スフィンゴミエリナーゼが細胞外に分泌される可能性が示唆された。

実際、Zn刺激性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、人の皮膚線維芽細胞、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いる⁷⁾。また、このZn刺激性スフィンゴ

ミエリナーゼは酸性スフィンゴミエリナーゼ遺伝子から産生されると報告されている⁷⁾。これらのことから今回の実験におけるバイスタンダー効果に関与する酸性スフィンゴミエリナーゼ活性に Zn が要求されると考えられた。また Zn を活性中心に結合するのは、酸性スフィンゴミエリナーゼのうち、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。リソソーム型は、非活性型のスフィンゴミエリナーゼがリソソームへ移行し、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活性化されるが、その分泌経路は細胞内 Zn プールからは比較的隔離されているため、活性化に際し外因性の Zn を要求する。つまり照射後5分に観察された Zn の細胞内増加は、放射線照射によって外因性（細胞外）の Zn 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）になり、また照射15分後における細胞内 Zn の減少は、Zn 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考えられた。

Mg については X 線照射による細胞内外 Mg 量は経時的に減少する傾向が観察された。また Ca については細胞外の Ca 量は経時的な変化は認められなかったが、細胞内においては、照射後5分で Ca 量が増加する傾向が観察された。これらは上記のスフィンゴミエリナーゼ活性の経時変化と細胞内外の金属元素の挙動とは一致せず、Mg と Ca はスフィンゴミエリナーゼ活性との関与が低いと考えられた。

今回の研究では、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行った。A172へ低線量照射を行うと、細胞内で活性化したスフィンゴミエリナーゼの細胞外への挙動が観察され、バイスタンダー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の可能性が示唆され、更に、活性には Zn が関連することが推察された。

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) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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 bystander effect induced by low-dose radiation in glioma cell

A. Baden¹, S. Tamura¹, S. Wada¹, T. Kakizaki¹, S. Goto², K. Sera³ and N. Ito¹

¹School of Veterinary Medicine, Kitasato university
35-1 Higashi23banyo, Towada, Aomori 034-8628, Japan

²Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

Recently, the effects of low dose radiation have only been estimated by extrapolation from the data obtained by the higher dose radiation. Low dose radiation effects such as bystander effect cannot be explained by extrapolation from the data obtained by higher dose radiation. So far, we suggested that radiation induced bystander effect is closely related with sphingomyelinase. To analyze mechanism between activation of sphingomyelinase and induction of bystander effect, in this study we investigated the relationship between sphingomyelinase activity and divalent metal that are necessary for sphingomyelinase activation using PIXE analysis. Activation of sphingomyelinase induced by radiation (0.1Gy) was observed in glioma cell (A172 cell). The activity increased for 5 min and decreased for 15 min after irradiation inside the cell. On the other hand, the activity increased for 15 min after irradiation outside the cell. When fluctuation of intracellular and extracellular metal element was analyzed after irradiation, concentration of intracellular zinc element increased for 5 min and decreased for 15 min after irradiation and that of extracellular zinc element increased for 15 min after irradiation. These results indicate sphingomyelinase activation and fluctuation of zinc element was corresponding. It is considered that activation of sphingomyelinase induced by radiation was due to zinc element and sphingomyelinase itself is one of bystander factors.