

## 放射線感受性を制御する分子シャペロンおよびレドックスによる新たな分子機構の発見

近藤宇史, 井原義人, 浦田芳重, 後藤信治, 村田寛明, 安岡千枝, 奥永知宏, 神田宗武, 室井栄治, 林田 靖, 溝田新吾, 野中和樹, 河野貴明, 池崎みどり, 江村亜貴子

放射線による細胞傷害機構について、分子シャペロンとレドックス因子という2つの細胞機能制御機構の観点から研究を行った。その結果、小胞体(ER)シャペロンであるカルレチキュリンの発現増強が放射線感受性の増大と関連し、細胞生存に関わるAktシグナルを抑制することがわかった。このAktシグナルはグルタレドキシンによってレドックス制御を受けていた。さらに、抗酸化酵素であるグルタチオンS-転移酵素pの核内移行が、放射線感受性抑制に重要であることも見出した。以上の研究は、ER、ミトコンドリア、核の生理機能が関与する放射線感受性制御の新たな分子機構を提示するものである。

### 成 果

#### 1. 放射線感受性における小胞体シャペロン・カルレチキュリンの役割

放射線治療はがん治療の重要な戦略のひとつであるが、その細胞傷害の分子機構の解明は放射線生物学においても重要な課題である。放射線照射はDNAや、細胞膜、細胞内タンパク質に対するROSやRNSの影響を介して、細胞に傷害を与える。さらに、放射線による細胞傷害の分子機構のひとつとして、細胞内Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスの破綻を介した、アポトーシスの誘導機構が示唆されている。カルレチキュリン(CRT)は小胞体(ER)に存在するCa<sup>2+</sup>結合性の分子シャペロンである。我々は、CRTの高発現が心筋芽細胞株のアポトーシス感受性を増強させることを、レチノイン酸を用いた分化誘導条件や酸化ストレス条件下で観察し、その分子機構の解析を進めてきた。

本研究で我々は、CRTの働きという観点から、ヒトグリオーマの放射線感受性制御の分子機構について解析検討を試みた。放射線感受性の低い細胞株(U251MG, T98G)と感受性の高いH4細胞株でERシャペロンの発現レベルに差異があるかについて調べたところ、CRTはU251MG, T98Gでの発現がH4に比べて相対的に抑制されていた。この結果は、CRTの発現レベルが放射線感受性の増加と関連することを示唆した。

放射線感受性とCRT発現レベルの関係をさらに検討するため、CRT遺伝子を定常的に高発現するU251MG株を樹立した(U251MG-CRT-M5, M6)(図1A)。CRT高発現細胞とコントロール細胞について、ガンマ線照射(0-10 Gy)を行い、10日後のコロニー形成能について解析し、放射線感受性の差異について検討した。その結果、CRT高発現細胞ではコントロールに比べ、コロニー形成率の低下が観察され、CRT高発現は放射線感受性を増強することが明らかとなった(図1B)。さらに、ガンマ線照射96時間後のCRT高発現細胞ではコントロー

ルと比べ、TUNEL陽性細胞が顕著に存在することが確認された。

次に、放射線照射の細胞生存シグナルAktキナーゼ経路への影響に関して、Akt/Protein kinase Bの放射線照射後の活性化状態について、特異的リン酸化部位認識抗体により解析した。コントロールでは照射後3時間でAktのリン酸化が見られたが、CRT高発現細胞ではAktのリン酸化が見られず、Aktシグナルの抑制が明らかとなった。なお、ガンマ線照射後3時間以内でAktの顕著なリン酸化はCRT高発現、コントロール細胞いずれにも見られなかった。また、Aktのキナーゼ活性の検討から、CRT高発現細胞でのAktのリン酸化の抑制は、活性の抑制とよく相関していることもわかった(図1C)。活性化Akt遺伝子を導入したCRT高発現株では、放射線誘導性アポトーシスが抑制されることから、CRT高発現株における放射線感受性の増強機構にはAktシグナルの抑制が重要であることが確認された。一方、

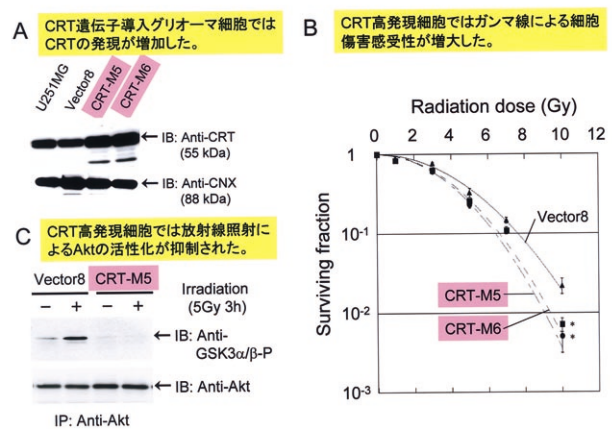


図1. カルレチキュリン(CRT)高発現細胞と放射線細胞傷害感受性の増大。A. CRT遺伝子導入グリオーマ細胞におけるCRTの発現(ウエスタンブロット解析)。B. CRT遺伝子導入細胞におけるガンマ線細胞傷害感受性の増大(ガンマ線照射2週間後のコロニー形成能解析)。C. CRT遺伝子導入細胞におけるAktキナーゼの活性化(ガンマ線照射後のAkt活性をGSK3 / のリン酸化で評価)。

Aktの脱リン酸化に関わる Protein phosphatase 2A (PP2A) について解析したところ, CRT高発現株では PP2A catalytic (PP2Ac) サブユニット分子の発現が誘導され, 活性が有意に上昇していることがわかった。PP2Ac 遺伝子プロモーターの解析から, この遺伝子発現誘導には CRT 高発現株に見られる  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの変化が重要な役割を果たすことがわかった。

以上の結果より, 放射線感受性の低いグリオブラストーマ細胞株では感受性の高いグリオーマ細胞株に比べ, CRTの発現の低いことがわかった。CRT発現量の違いが放射線感受性に関与するかについて, CRT遺伝子高発現細胞を作製し解析したところ, CRT高発現細胞では放射線感受性が増加していた。そして, 放射線感受性増強の分子機構のひとつに細胞生存シグナルである Aktシグナルの活性化抑制の関与のあることが示された(図2左)。

## 2. レドックス因子による放射線および酸化ストレス感受性の制御機構

### (1) グルタレドキシシン (GRX) による酸化ストレス感受性制御の分子機構

放射線照射による細胞傷害機構において, 細胞内の ROSの発生による酸化ストレスとレドックス(酸化還元)制御の重要性が考えられる。我々は, 細胞生存シグナルAktの酸化ストレス下での制御をレドックス制御の観点から検討した。

GRXは, グルタチオン存在化で細胞内のタンパク質のレドックス状態を制御することが知られる。我々は, GRX遺伝子を心筋筋細胞H9c2に導入し, GRXを定常的に高発現する細胞株を作製し酸化ストレス感受性への影響を調べた。その結果, GRX高発現細胞はコントロール細胞に比して, 明らかに過酸化水素による酸化ストレス誘導性のアポトーシスに耐性を示すことがわかった。この分子機構について, Aktのレドックス制御に着目し解析したところ, コントロール細胞では, 酸化ストレスによりAkt分子のシステインが酸化修飾を受け, PP2A

との複合体形成により脱リン酸化を受けてAktは失活した。一方, GRX高発現細胞では, Akt分子のシステインの酸化修飾がGRXにより還元され, PP2Aと結合ができないことで, Aktのリン酸化と活性化状態の維持されることがわかった。

以上の結果より, GRXがレドックス制御を介して, Aktを酸化的失活から保護することが, GRXの酸化ストレス誘導性アポトーシスに対する保護効果の分子機構にとって重要であることが明らかとなった(図2右)。

### (2) 核内グルタチオンS-転移酵素pによる酸化的DNA傷害と放射線誘導細胞死の抑制

我々は, 核内に局在するグルタチオンS-転移酵素p (GSTp)が, 癌細胞の抗がん剤耐性獲得に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本研究では, GSTpの核移行に及ぼす酸化ストレスの影響と酸化ストレスによるDNA傷害の防御におけるGSTpの役割について検討した。

生体にはグルタチオンに代表される種々の抗酸化物質とGSTやグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX)などの抗酸化酵素群が存在しROSによる細胞障害を防御しているが, 核内の抗酸化機構に関しては今のところ十分な知見が得られていない。GSTpの核移行を阻害するマッシュルームレクチン (ABL)を前投与し核内GSTpの存在量を低下させたHCT8細胞では, 過酸化水素曝露によって核の凝集とTUNEL陽性細胞群の増加が観察されると同時に, 核画分の脂質過酸化の増加も認められた。過酸化水素によってGSTpは核に蓄積したが, GPXは核移行しなかった。脂質過酸化によって生成される13-hydroperoxyoctadecadienoic acid (13-HPODE)の代謝過程で, 2'-deoxyguanosineとの間で7-(2-oxo-heptyl)-substituted 1, N<sup>2</sup>-etheno-2'-deoxyguanosine adductが形成されるが, この酸化的DNA傷害はグルタチオンの存在下でGSTpにより抑制された。GSTpの存在下では, 13-HPODE由来の脂質アルデヒドである4-oxo-2-nonenalとGSHの結合体形成が観察された。これらの結果から, 核に局在するGSTpがアルデヒド修飾DNAの生成を軽減することによって, 酸化的DNA傷害を抑制していることが示唆された。さらに, ABLを前投与した細胞の放射線による細胞死が有意に増加した。これらのことから, 核GSTpが放射線を含む酸化ストレスに対する細胞の感受性を規定する重要な分子であることが示唆された。

## 3. 結論

分子シャペロンとレドックス因子という2つの細胞機能制御機構が放射線による細胞傷害感受性の制御に重要であるという知見を得た。それぞれの分子機構が低線量放射線被曝による細胞影響においてどのような役割を果たすのか, 今後の詳細な解析検討が重要であると考えられる。

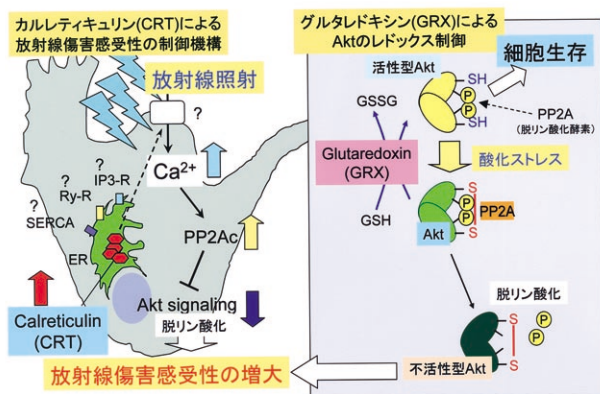


図2. 放射線感受性を制御する分子シャペロンおよびレドックスによる新たな分子機構。(左)カルレチキュリン(CRT)による放射線細胞傷害感受性の制御機構。(右)グルタレドキシシン(GRX)によるAktのレドックス制御。