

平成 20 年 3 月 26 日

# 平成 19 年度「重力センサーと放射線センサー（細胞膜近傍に存在する放射線のターゲット）の解明」活動報告書

代表者所属：東京大学大学院医学系研究科附属

疾患生命工学センター放射線研究領域

氏名：細井 義夫

## 1. 構成メンバ

氏名	所属
細井 義夫	東京大学医学部放射線研究領域
榎本 敦	東京大学医学部放射線研究領域
廣野 光	東京大学医学部放射線研究領域
水野 敦子	自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門

## 2. 本年度WG会合開催実績

(1) 第 1 回：平成 19 年 12 月 5 日（水）

## 3. 活動目的

宇宙空間に人が長期間滞在する場合には、微小重力と低線量放射線による被ばくが重要な問題である。微小重力は骨塩量、筋力、免疫の低下など生理的影響を及ぼすだけでなく、細胞レベルにおいて影響を及ぼすことが報告されている。すなわち、上皮成長因子（EGF）投与による c-fos と c-jun の発現は、過重力環境で増大し微小重力環境では逆に低下することが報告されている。また、プロテインキナーゼ C（PKC）の活性と細胞内の分布が過重力と微小重力で影響を受けることが報告されている。細胞に対するズリ応力などの機械的刺激により、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇、ジアシルグリセオール（DG）を介した PKC の活性化、リガンド非依存性の EGF 受容体（EGFR）の活性化、ERK 活性化等が報告されている。機械的刺激での機序としては伸展イオンチャンネル（SA チャンネル：stretch-activated channel）の活性化が考えられているが、SA チャンネルの阻害剤により ERK や EGFR の活性化を抑制できないことから別の機序が存在していると考えられる。機械的刺激によりホスホリパーゼ C（PLC）の活性化や IP3 の上昇が報告されていることから、機械的刺激による ERK や EGFR の活性化の機序として G タンパク質や G タンパク連結型受容体（GPCR）の活性化が示唆されるが、真の重力センサー・機械的刺激センサーが何かは未だ明らかではない。

0. 2Gy 以下の低線量放射線照射により細胞増殖の促進や免疫活性化が誘導される。それらの機序の一つとして、放射線により EGFR がリガンド非依存性に活性化し、ERK の活性化が誘導されることが報告されている。低線量放射線照射はこの他に PLC の活性化、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇、ジアシルグリセオール（DG）を介した PKC の活性化、

ホスホリパーゼ C (PLC) の活性化、IP3 の上昇など、重力による影響とほとんど同じ反応が誘導される。

我々は放射線によるリガンド非依存性 EGFR 活性化と ERK 活性化が、Src 活性化を介する EGFR の transactivation によるものであることを明らかにした (Li et al., BBRC 341: 363-368, 2006)。Src を介した EGFR の transactivation の多くが GPCR 由来であることから、放射線による EGFR の transactivation も GPCR 由来である可能性がある。

微小重力と低線量放射線という宇宙空間で問題となる 2 つが共に極めて近い情報伝達経路を使っていることは注目に値する。また、宇宙では、微小重力と放射線により誘導される情報が細胞内でクロストークして、異なった現象が起こることも考えられる。本研究班ワーキンググループでは、過重力・機械的刺激と放射線により誘導されるリガンド非依存性 EGFR 活性化の上流を探索し、重力センサーと放射線センサー（細胞膜近傍にある放射線のターゲット）を明らかにすることを目的とした。

具体的には重力センサーと放射線センサーの解明のために、可能性のある遺伝子/遺伝子産物の探索とノックアウト細胞等の収集について検討を加える。重力センサーの候補としては、機械刺激に反応することが報告されている TRPV4、TRPV2、AT1 受容体、P2X、PECAM-1、細胞骨格に着目し、それらが重力センサーである可能性を検討するとともに、それらのノックアウト細胞/マウスの収集や活性の測定方法について検討する。放射線センサーの候補としては、GPCR、PTP、アラキドン酸代謝系、細胞膜脂質に着目し、それらが放射線センサーである可能性を検討するとともに、それらのノックアウト細胞/マウスの収集や活性の測定方法について検討することを目的とした。

#### 4. 活動内容

自治医科大学薬理学部門に存在する機械刺激に応答する受容体 TRPV4 ノックアウトマウスと、遺伝的バックグラウンドを同じくするコントロールマウスから肺線維芽細胞株を樹立することを活動内容とした。平成 19 年 12 月 5 日 (水) に自治医科大学医学部薬理学講座分子薬理学部門に細井らが行き、TRV4 ノックアウトマウス、V4-/- の ♂3 匹とそのコントロールマウス、C57BL/6J の ♂3 匹から肺を摘出し、線維芽細胞を培養系に移した。その後 transform したクローン細胞を 1 匹からそれぞれ 2 クローン樹立し、凍結保存した。今後はこれらの細胞を用いて、TRPV4 受容体が定常重力や変動重力により活性化するかどうかを検討する予定である。定常重力と変動重力は過重力発生装置と 3D クリノスタットの利用を考えている。

変動重力 (加速度) が培養細胞に及ぼす影響としては、変動重力直後に一過性の ERK1/2 の活性化が認められた。ERK の活性化は EGFR 阻害剤と Src の阻害剤で抑制されること、並びに EGF 受容体 Tyr845 のリン酸化が亢進することから、Src を介した EGF 受容体の transactivation が重要であることが示唆された。ただし、Src と SHP-2 の活性化状態をリン酸化により調べた結果では、活性化は顕著ではなかったため、この点に関してはさらに詳細の検討が必要と思われる。

定常重力の影響としては、30G で 1 時間培養した後には、MDA-MB-468 細胞では ERK の活性が低下していることが明らかになった。また、細胞増殖に関しては、2-30G の定常重力は細胞増殖に大きな影響を及ぼさなかった。

3D クリノスタットにより 20 秒間細胞を処理しても一過性の ERK の活性化が認められた。また 3D クリノスタット 24 時間処理により、細胞増殖は大きく抑制されることを確認した。これはこれまでの報告に一致するものであった。また、DNA 損傷等による細胞周期の停止に関与する ATM 遺伝子の関与を調べるため、ATM に異常を持つ毛細血管拡張性運動失調症の患者由来の細胞を用いて検討した。予備的実験の結果では MDA-MB-468 細胞と同様に増殖速度は大きく抑制された。このことから、3D クリノスタットによる細胞増殖の停止には ATM は関与していないことが推測できた。放射線による細胞周期の停止では ATM が必須であることから、放射線と変動重力では細胞周期停止の機序は異なることがあきらかになった。今後は変動重力による細胞周期の停止の原因解明のため、p53 ノックアウト細胞やフローサイトメーターによる細胞周期解析等が必要と考えている。

重粒子線の影響に関しては、これまでに少なくとも 0.001Gy 以上の炭素イオン線と鉄イオン線により ERK1/2 が活性化することを明らかにした。0.001Gy は宇宙ステーションでの 1 日の被ばく線量にほぼ等しいため、宇宙ステーションにあっても同様なことが起こっている可能性が考えられる。また、重粒子線 0.001Gy でも影響が認められたことから、バイスタンダー効果の関与が考えられる。現在はバイスタンダー効果の機序を明らかにするため、ギャップジャンクションの関与について研究を進めている。また、重粒子線による ERK1/2 の活性化は X 線と同様に EGFR の transactivation を介していることを明らかにした。

## 5. 成果

### 学会発表

細井義夫<sup>1</sup>、榎本 敦<sup>1</sup>、笹野仲史<sup>1</sup>、加藤宝光<sup>2</sup>、関根絵美子<sup>2</sup>、岡安隆一<sup>2</sup>、宮川 清<sup>1</sup>、<sup>1</sup>東京大学医学部放射線研究領域、<sup>2</sup>放射線医学総合研究所粒子線生物：重粒子線照射による EGF 受容体の活性化、第 46 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、p52、平成 19 年 7 月 20-21 日

細井義夫<sup>1</sup>、榎本 敦<sup>1</sup>、笹野仲史<sup>1</sup>、加藤宝光<sup>2</sup>、関根絵美子<sup>2</sup>、藤井義大<sup>2</sup>、岡安隆一<sup>2</sup>、宮川 清<sup>1</sup>、<sup>1</sup>東京大学医学部放射線研究領域、<sup>2</sup>放射線医学総合研究所粒子線生物：重粒子線による EGF 受容体を介した ERK の活性化、日本放射線影響学会第 50 回大会、p89、平成 19 年 11 月 14-17 日

細井義夫<sup>1</sup>、榎本 敦<sup>1</sup>、笹野仲史<sup>1</sup>、加藤宝光<sup>2</sup>、関根絵美子<sup>2</sup>、岡安隆一<sup>2</sup>、宮川 清<sup>1</sup>、<sup>1</sup>東京大学医学部放射線研究領域、<sup>2</sup>放射線医学総合研究所粒子線生物：重粒子線による EGF 受容体活性化、日本放射線腫瘍学会第 20 回学術大会、p52、平成 19 年 12 月 13-15 日