

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10317

研究課題名(和文)放射線によって活性化されるcPLA2の役割

研究課題名(英文)The role of cPLA2 activated by irradiation

研究代表者

片山 郁夫(KATAYAMA, Ikuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：80295089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞質型ホスホリパーゼA2(cPLA2)は放射線によって活性化され、活性化されたcPLA2は核膜周辺で機能することがわかった。さらには、細胞に放射線を照射した際に起こるATM遺伝子(毛細血管拡張性運動失調症変異遺伝子)の活性化を介した「細胞死シグナル」において、cPLA2は抑制的に機能していることが示唆された。また、細胞に放射線を照射した際に起こるEGFR遺伝子(上皮成長因子受容体遺伝子)を介した「細胞生存シグナル」においても、cPLA2は抑制的に機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、cPLA2は放射線によって活性化されること、活性化されたcPLA2は核膜周辺で機能すること、さらには放射線によって活性化されたcPLA2は「細胞死シグナル」および「細胞生存シグナル」の両方に対して抑制的に機能していることがわかった。すなわち、cPLA2は細胞膜をはじめとする生体膜の構成成分を加水分解する酵素として機能するだけでなく、「放射線による細胞の生死」に関わるシグナル伝達に関与することが示唆された。このことは、cPLA2が放射線治療における有用な標的遺伝子の1つである可能性を示唆するものだと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) is activated by irradiation, and that the activated cPLA2 is localized to the perinuclear region. Furthermore, we investigated the involvement of cPLA2 in the "cell death signal" and "cell survival signal" induced by irradiation. It was suggested that cPLA2 functions repressively for the "cell death signal" mediated by activation of the ATM gene (ataxia telangiectasia mutated gene), and for the "cell survival signal" mediated by the EGFR gene (epidermal growth factor receptor gene).

研究分野：歯科放射線学

キーワード：cPLA2 電離放射線 細胞生存シグナル 細胞死シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞に放射線を照射すると、直ちに細胞膜に存在する上皮成長因子受容体 (EGFR) がリガンド非依存的に自己リン酸化され活性化される。この EGFR は受容体型チロシンキナーゼで、多くの悪性腫瘍に過剰発現が認められ、特に頭頸部癌では 90~95 % に過剰発現がみられる。

(Hematol Oncol Clin North Am 22: 1099-1124, 2008)。活性化された EGFR はその下流の PI3K/Akt や MEK/Erk を活性化し、いわゆる「細胞生存シグナル」伝達経路が活性化される。一方、放射線照射によって細胞の核内で DNA の二重鎖切断 (double strand break = DSB) が起こると、セリン/スレオニンキナーゼである ATM の自己リン酸化を起点として、「細胞周期の停止/DSB の修復」のシグナル伝達経路が活性化される。しかしながら、「細胞周期の停止/DSB の修復」がうまく機能しなかったときは「細胞死シグナル」が発せられる。放射線による細胞の生死は、この「細胞生存シグナル」と「細胞死シグナル」のバランスによって決定されると考えられている。

(2) cPLA2 はリン脂質代謝に関わり、細胞膜をはじめとする生体膜の構成成分であるグリセロリン脂質の sn-2 位のエステル結合を加水分解する酵素である。その活性化には、505 番目のアミノ酸であるセリン (Ser505) が、Erk あるいは p38 でリン酸化されることが必要である。活性化した cPLA2 は細胞膜等からアラキドン酸 (AA) とリゾホスファチジルコリン (LPC) を遊離する。AA はプロスタグランジン類やロイコトリエン類等の原料であり炎症反応の起点となる脂肪酸であるが、同時に LPC とともにセカンドメッセンジャーとしても機能する (Cell Signal 15: 637-665, 2003)。よって、cPLA2 は炎症反応のみならず様々な細胞質内のシグナル伝達経路に関与していると考えられる。また最近の研究においては、cPLA2 の核内でのシグナル伝達経路についても報告されているが (Cell 165:1160-1170, 2016)、cPLA2 は核内でも何らかの機能を有していることが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線による cPLA2 の活性化のメカニズムを明らかにし、さらには細胞の生死を決定するシグナル伝達における cPLA2 の役割を解明することである。それにより、cPLA2 が放射線治療の際の有用な標的遺伝子の 1 つとなりうる可能性を示すことができるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、cPLA2WT マウスおよび cPLA2KO マウスの肺から分離した cPLA2(+/+)および cPLA2(-/-)の線維芽細胞を使用し、放射線照射 (エクソ線照射) を行い、以下の 3 点について検討を行った。

### (1) cPLA2 の活性化

cPLA2 の活性化については、cPLA2 の経時的なリン酸化および細胞内での局在で評価した。①cPLA2(+/+)の線維芽細胞に放射線を照射し、cPLA2 のリン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法 (WB 法) を行った。②さらに、cPLA2 のリン酸化抗体を用い、放射線照射を行った cPLA2(+/+)の線維芽細胞の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で活性化された cPLA2 の細胞内での局在を確認した。

### (2) 「細胞死シグナル」における cPLA2 の役割

「細胞死シグナル」については、生細胞数の計測および「細胞死シグナル」の起点となる ATM のリン酸化 (=活性化) で評価した。①cPLA2(+/+)および cPLA2(-/-)の細胞に放射線照射を行い、Cell Counting Kit を用いた生細胞数計測を行った。②さらに、cPLA2(+/+)および cPLA2(-/-)の細胞に放射線照射を行い、ATM のリン酸化について WB 法で検討を行った。

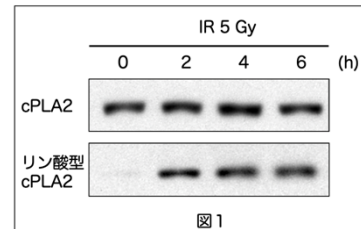
### (3) 「細胞生存シグナル」における cPLA2 の役割

「細胞生存シグナル」については、細胞膜に存在する EGFR (上皮成長因子受容体) の自己リン酸化 (=活性化) で評価した。cPLA2(+/-)および cPLA2(-/-)の細胞に放射線照射を行い、EGFR のリン酸化について WB 法で検討を行った。

## 4. 研究成果

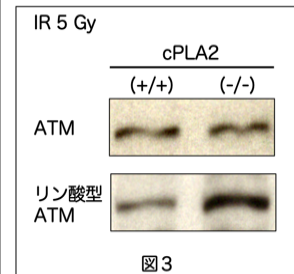
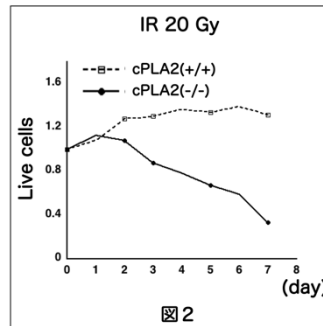
### (1) 放射線によって cPLA2 の活性化が起こる。

① cPLA2(+/-)の線維芽細胞に放射線を照射し、cPLA2 のリン酸化 (=活性化) を WB 法で検討したところ、cPLA2 のリン酸化がおこることが確認された (図 1)。②さらに、cPLA2(+/-)の線維芽細胞に放射線を照射し免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡でリン酸化された cPLA2 の局在を検討したところ、核膜周辺に局在することが確認された。



### (2) 「細胞死シグナル」において cPLA2 は抑制的に機能する。

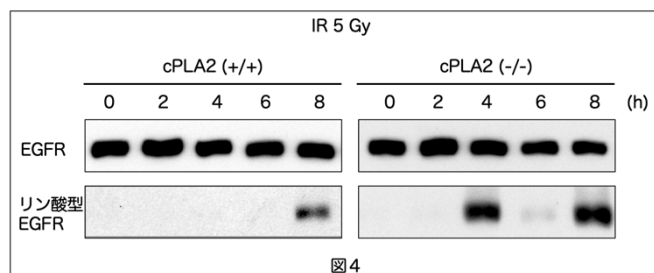
① cPLA2(+/-)および cPLA2(-/-)の細胞に放射線照射を行い、Cell Counting Kit を用いて生細胞数計測を行ったところ、cPLA2(+/-)では細胞死がほとんど起こらなかったが、cPLA2(-/-)では 60~70%に細胞死が起こった (図 2)。②さらに、cPLA2(+/-)および cPLA2(-/-)の細胞



に放射線を照射し、ATM のリン酸化について WB 法で検討したところ、cPLA2(+/-)および cPLA2(-/-)の細胞のどちらにも放射線照射直後から ATM のリン酸化がみられたが、cPLA2(-/-)では cPLA2(+/-)と比較して ATM のリン酸化が多く起こることが確認された (図 3)。以上のことから、「細胞死シグナル」において cPLA2 は抑制的に機能することが示唆された。

### (3) 「細胞生存シグナル」において cPLA2 は抑制的に機能する。

cPLA2(+/-)および cPLA2(-/-)の細胞に放射線を照射し、「細胞生存シグナル」の起点となる EGFR の活性化を検討したところ、cPLA2(+/-)の細胞では放射線照射 8 時間後にリン酸化のピークがあるのに対して、cPLA2(-/-)の細胞では 4 時間後と 8 時間後にリン酸化のピークがあることが確認された (図 4)。このことから、放射線による「細胞生存シグナル」に対して cPLA2 は抑制的に関与していることが示唆された。



### (4) まとめ

以上のことから、cPLA2 は放射線によって活性化され核周辺で機能すること、放射線による「細胞死シグナル」および「細胞生存シグナル」の両方に対しては抑制的に機能していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takagi Yukinori, Hashimoto Kunio, Sasaki Miho, Eida Sato, Katayama Ikuo, Sumi Misa	4. 巻 40
2. 論文標題 Juvenile onset of primary Sjogren's syndrome: changes in imaging findings during a 7-year progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2466-2467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.55563/clinexprheumatol/z3exkq	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takagi Yukinori, Hashimoto Kunio, Katayama Ikuo, Eida Sato, Sumi Misa	4. 巻 37
2. 論文標題 Juvenile primary Sjogren's syndrome with ranula: is ranula a clinical sign that leads to early detection of Sjogren's syndrome?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 328 ~ 335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11282-020-00473-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hotokezaka Yuka, Katayama Ikuo, Nakamura Takashi	4. 巻 3
2. 論文標題 ATM-associated signalling triggers the unfolded protein response and cell death in response to stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-1102-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuka Hotokezaka, Hitoshi Hotokezaka, Ikuo Katayama, Shuichi Fujita, Miho Sasaki, Sato Eida, Masataka Uetani	4. 巻 36
2. 論文標題 A case of tophaceous pseudogout of the temporomandibular joint extending into the cranium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 203-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11282-019-00410-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Yukinori, Katayama Ikuo, Eida Sato, Sasaki Miho, Shimizu Toshimasa, Sato Shuntaro, Hashimoto Kunio, Mori Hiroki, Otsuru Mitsunobu, Umeda Masahiro, Kumai Yoshihiko, Toya Ryo, Kawakami Atsushi, Sumi Misa	4. 巻 12
2. 論文標題 Three Signs to Help Detect Sjogren's Syndrome: Incidental Findings on Magnetic Resonance Imaging and Computed Tomography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 6487 ~ 6487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm12206487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佛坂 由可 (HOTOKEZAKA Yuka) (10244089)	長崎大学・病院 (歯学系)・講師  (17301)	
研究分担者	佐々木 美穂 (SASAKI Miho) (10437874)	長崎大学・病院 (歯学系)・助教  (17301)	
研究分担者	田代 茂樹 (TASHIRO Shigeki) (20300882)	長崎大学・病院 (医学系)・助教  (17301)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------