

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460299

研究課題名(和文)臓器セシウム蓄積に関わる細胞膜セシウム輸送経路の解明

研究課題名(英文) Finding the cesium permeation pathway of cell membrane which contributes the accumulation of cesium into the organs.

研究代表者

挟間 章博 (Hazama, Akihiro)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60218394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：セシウムの臓器蓄積モデルとしてHeLa細胞を使用した。HeLa細胞に対してCsが増殖抑制効果を示すことを明らかにし、学術論文(FEBS Lett. 2017 Mar;591(5):718-727)として発表した。本研究で細胞内へのCsの流入が実際に起きていることが示され、Csにより解糖系酵素の発現抑制や機能抑制が起きている可能性が示された。HeLa細胞と他の細胞株のCs感受性の違いからCsの透過経路となる遺伝子を調べたところ、TRPC1、TRPM7がCsの透過経路と予想できた。

研究成果の概要(英文)：We use HeLa cells as a model of Cs accumulation. We found that Cs could suppress HeLa cell proliferation in a dose-dependent manner (FEBS Lett. 2017 Mar;591(5):718-727). In this report Cs accumulation in HeLa cells was demonstrated and the enzymes for glycolysis including GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), LDH(Lactate dehydrogenase), PK(Pyruvate kinase) were suppressed by Cs. We selected the candidates of Cs permeation pathway, including KCNH family, TRPC family and TRPM family. Expression levels of those candidates were examined by RT-PCR method in different cell lines. KCNH3, TRPC1, TRPC4, TRPM4, TRPM7 were considered as the Cs permeation pathway. We examined the change of expression level of those channels in HeLa cells by application of Cs. TRPC1 and TRPM7 were increased by Cs. Those channels are considered as the strong candidate for Cs permeation pathway.

研究分野：細胞分子生理学

キーワード：セシウム HeLa細胞 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日の東日本大震災後の原子力発電所の事故による環境中への放射性物質の放出は、放射性物質による土壌の汚染を引き起こした。放射性セシウムにより人体がどのような影響を受けるか、という点については、様々な議論があるが、「どのような経路でセシウムが細胞内に流入するか？」という最も根本的な問題については未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

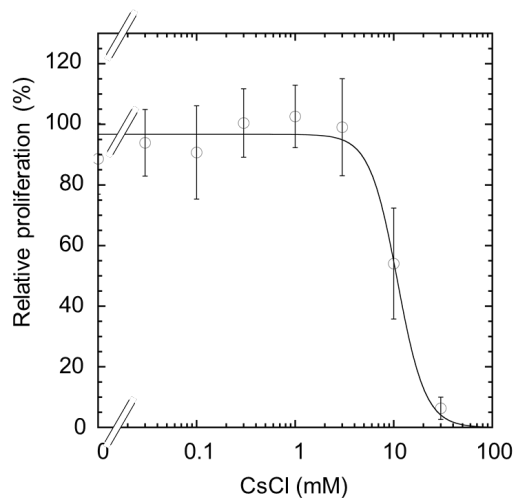
本研究は、細胞膜に存在するセシウム輸送経路を明らかにすることで、セシウムの臓器への蓄積メカニズムを解明すると同時に、セシウムの細胞レベルでの細胞内環境への影響についての研究を行うことで「セシウムの輸送機序・代謝への作用機序の解明」を行う。

3. 研究の方法

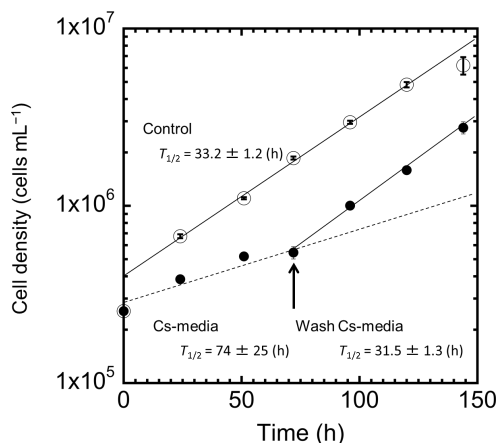
(i)細胞レベルでのセシウムの細胞への取込・排出機序、()取り込まれたセシウムが細胞内環境、細胞内中間代謝物等に与える影響、()分子レベルでの細胞内へのセシウム輸送を担うチャネル・トランスポーターの同定、

4. 研究成果

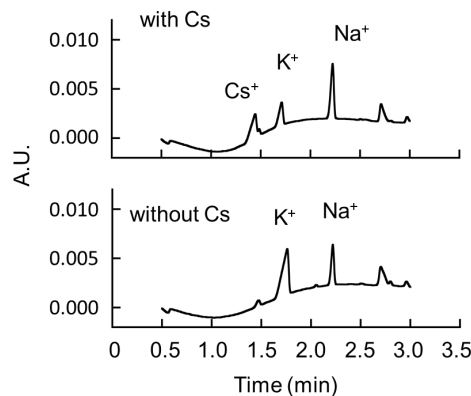
HeLa 細胞に対してに対するセシウムの及ぼす影響を調べるために、HeLa 細胞に対してセシウムが増殖抑制効果を示すことを明らかにした。細胞増殖抑制効果におけるセシウムの濃度依存性については、細胞外 1 mM 以上の濃度で増殖抑制が認められ、10 mM で 50% の増殖抑制が観察された。



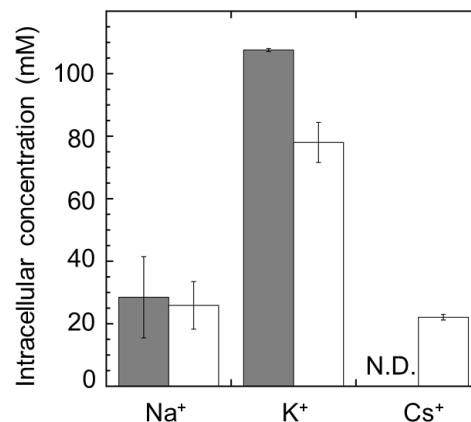
また、セシウムの細胞増殖抑制効果は、セシウムを除去することにより細胞増殖が回復することから、セシウムが細胞に傷害を与えて増殖を抑制しているわけではないことが示唆された。



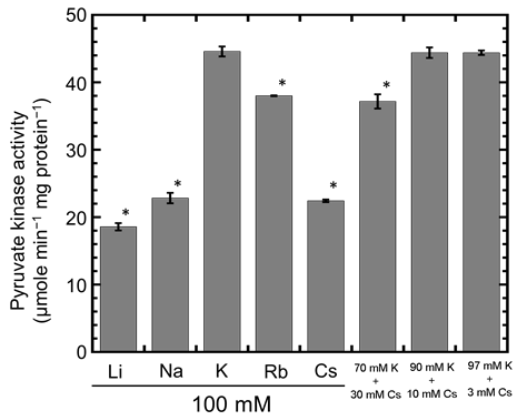
細胞内の Cs の存在については、キャピラリー電気泳動法により細胞内への Cs の流入が実際に起きていることが示された。キャピラリー電気泳動法については、Cs 以外に細胞内の主要なカチオンであるナトリウム、カリウムについても細胞内に含まれる量を確認した。細胞外に Cs が存在すると、Cs 特有のピークが細胞内液に出現することが示された。



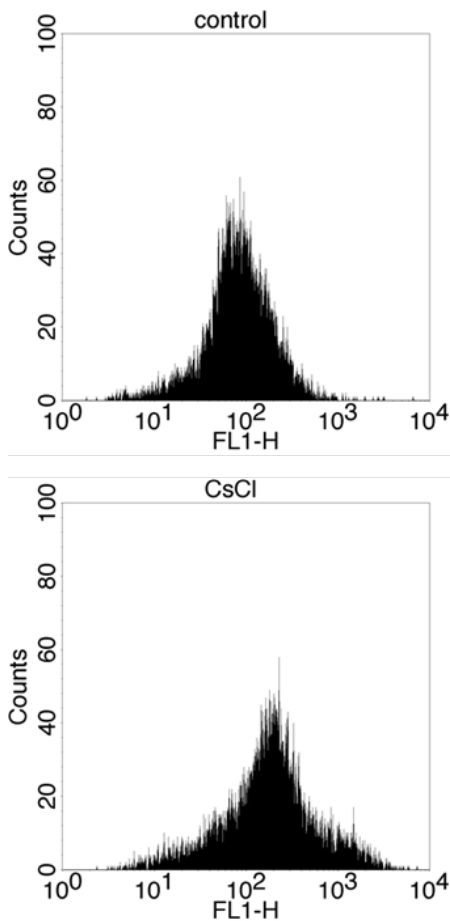
細胞内液における電解質濃度を検討したところ、細胞外に Cs を投与することにより、細胞内カリウムが減少し、その濃度に相当する濃度の Cs が検出された。このことは、カリウムが Cs によって置換されることを示唆している。



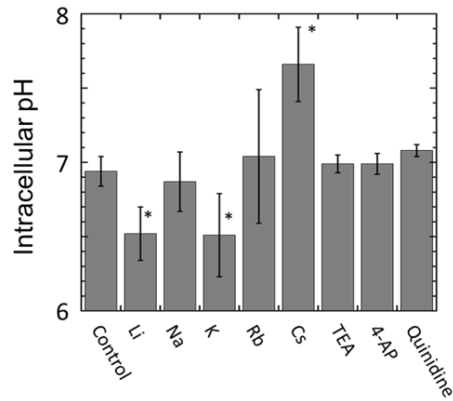
また、Csにより、解糖系酵素の発現抑制や機能抑制が起きている可能性が示された。ピルビン酸キナーゼの酵素活性を *in vitro* の系で測定したところ、次の図のように、セシウム存在下でピルビン酸キナーゼの酵素活性が抑制されていることが明らかとなった。



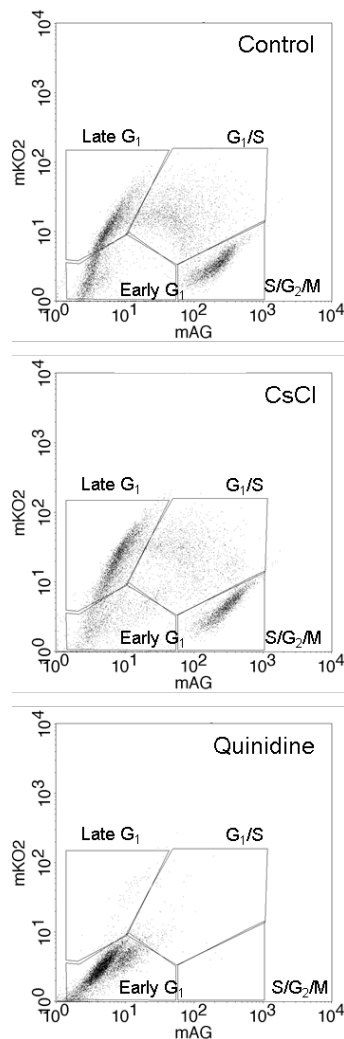
セシウムの細胞増殖抑制効果については、細胞内の pH が関与する可能性があるため、pH 感受性蛍光色素を用いて、細胞内 pH を測定した。蛍光の検出については、フローサイトメトリーを用いた。最初に、細胞外にセシウムを存在させると、蛍光がアルカリ側にシフトした。



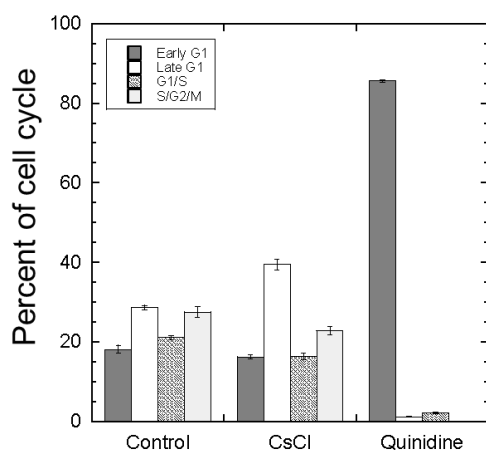
セシウムは、カリウムチャネルの阻害剤としても知られていることから、種々のカリウムチャネル阻害剤について細胞内のアルカリ化が起こるかどうかが調べた。その結果、アルカリ化はセシウム特有の減少であることが分かった。



セシウムの細胞周期に対する影響を調べるために、細胞周期の応じた蛍光を発する FUCCI 発現 HeLa 細胞を用いた。この細胞にセリウム及び、他のカリウムチャネル阻害剤としてキニジンと投与し、フローサイトメトリーで蛍光観察を行なった。



セシウムとキノジンでは全く蛍光のパターンが異なっており、キノジンは G1 期で細胞周期が停止するのに対して、セシウムでは、G0/G1、G2/S、M のそれぞれが延長することが分かった。



以上の結果は、細胞外に投与されたセシウムが細胞内に流入し、解糖系酵素を抑制することで細胞内の酸産生を抑え、細胞内をアルカリ化させることで、細胞増殖の抑制に至るメカニズムがあることを示している。

発表論文以降の研究としては、HeLa 細胞以外に、HUEhT-1、HEK293、HSC-1 に対して Cs の細胞増殖に与える影響を調べたところ、HUEhT-1 で最も低濃度で Cs が細胞増殖を抑制することが分かった。また、各細胞について、Cs の透過経路の候補となる KCNH ファミリー、TRPC ファミリー、TRPM ファミリーの遺伝子発現を調べた。その結果、KCNH3、TRPC1、TRPC4、TRPM4、TRPM7 が Cs の透過経路の候補として予想できた。HeLa 細胞に対して、Cs 添加により Cs の透過経路候補の発現変化が起こるかどうかが調べたところ、TRPC1、TRPM7 で Cs 添加による発現の亢進が認められた。最終的にそれらが Cs の透過経路であることの証明にはまだ至っていないが、本研究の目的に対して成果が挙げられたものとする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Cesium reversibly suppresses HeLa cell proliferation by inhibiting cellular metabolism.

Kobayashi D, Kakinouchi K, Nagae T, Nagai T, Shimura K, Hazama A.

FEBS Lett. 2017 Mar;591(5):718-727.

[学会発表](計 3 件)

第 94 回日本生理学会 2017 年 3 月
セシウムが HeLa 細胞の代謝酵素発現に与える影響

挟間章博・熊谷悠・久米由佳・小林大輔

第 93 回日本生理学会 2016 年 3 月
膜電位への影響を介さないセシウムによる HeLa 細胞の増殖抑制

挟間章博・大竹雅也・小林大輔

第 93 回日本生理学会 2015 年 3 月
Cs による細胞増殖阻害時に何が起きているか?

小林大輔・垣野内景・長江智紀・挟間章博

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.fmu.ac.jp/cms/physiol1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

挟間章博 (HAZAMA, Akihiro)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60218394

(2) 研究分担者

小林大輔 (KOBAYASHI, Daishuke)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40528080

三宅将生 (MIYAKE, Masao)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00381385

勝田新一郎 (KATSUDA, Shinichiro)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 80285022

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し