

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510065

研究課題名(和文)放射線量の差により細胞外と核内で異なる防御応答を示すシャペロンとその結合タンパク

研究課題名(英文)The chaperone and its binding protein, annexin II, which have a distinct role in the extracellular space and in the nucleus, depending on the differences in radiation doses

研究代表者

喜多 和子(Kita, Kazuko)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80302545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：annexin IIは、シャペロンHSP27と結合し細胞質に局在するが、細胞外や核内にも存在する。しかし、細胞外放出機構や細胞外・核内での機能は十分には解明されていない。

本研究では、annexin IIの細胞外放出にp38 MAPKを介する酸化ストレスシグナルが関わること、および、低線量X線照射によりその機構が活性化されることが示唆された。また、膵癌由来細胞においては、annexin IIが多く放出され、細胞外のannexin IIが抗癌剤やX線に対する抵抗化に関わる可能性が示された。一方、annexin IIの核内での機能としては、損傷DNAの修復機構に関わることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Annexin II, the chaperone HSP27-binding protein in the cytoplasm, is known to be localized in the extracellular space or in the nucleus of human cells. The mechanisms of the localization and its functions in the extracellular space or in the nucleus are not yet fully understood.

The current study is the first report to suggest that the reactive oxygen species (ROS)-activated signal pathway via p38 MAPK was involved in the extracellular release of annexin II, and this pathway was stimulated by low-dose X-ray irradiation. Furthermore, we found that pancreatic cancer-derived cells released annexin II more abundantly than other cancerous or noncancerous cells did, and our finding suggested the possibility that extracellular annexin II confers resistance to anticancer drugs and X-ray irradiation via PI3K and MEK signal pathways. We also suggested a novel potential role of annexin II in the nuclei that is associated with repair activity of damaged-DNA

研究分野：放射線生物学

キーワード：annexin II シャペロン 放射線 酸化ストレス シグナル伝達 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

(1) シャペロン・結合タンパク質の細胞内での機能

研究代表者らは、ヒト細胞における放射線抵抗性に関わる分子メカニズムを研究してきており、これまでに、細胞質シャペロン HSP27, GRP78, GRP94 が紫外線や X 線に対する致死抵抗性に関わることを見出した^{1,2)}。続いて、HSP27 結合タンパク質として annexin II を同定し、HSP27・annexin II 複合体が、紫外線致死抵抗性に関わるとの示唆を得た³⁾。これらの知見が示すように、上述のシャペロン類やその結合タンパク質 annexin II は、細胞内の DNA 損傷応答で重要な機能を持つことが予測されるが、その機構の詳細は不明であった。

(2) シャペロン・結合タンパク質の細胞外での機能

上述のシャペロンや annexin II⁴⁾は細胞外へも放出されることが知られているが、細胞外での機能や放出機構の詳細は十分に明らかにはされていない。代表者らは、細胞外シャペロンとその結合タンパク質が、細胞外からも放射線応答に関わると予測し、recombinant annexin II を作製し、紫外線高感受性培養ヒト細胞の培養液中に添加したところ、比較的低線量の紫外線に対し、細胞が致死抵抗化することを見出した⁵⁾。これらの知見から、シャペロン類と annexin II は、放射線などのストレス負荷に応じて細胞外に放出され、外表面から、オートクラインあるいはパラクライン作用により致死抵抗化に関わる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

代表者らは、これまで主に紫外線について調査してきた結果を基に、シャペロンとその結合タンパク質による放射線抵抗性の機構には、細胞外表面からの作用を介するものと、核内での損傷 DNA 修復過程に関わるものの異なる 2 つが存在すると考えている。本研究は、上記の応答が I) 電離放射線(主に X 線)や電磁波に対しても機能するかを調査し、II) 細胞外と III) 核内での作用メカニズムを解明することを目的とする。

具体的な研究概要としては、研究が先行している HSP27 とその結合タンパク質 annexin II を中心に、1) X 線・電磁波・紫外線などのストレスを線量別に細胞に曝露した後の細胞外放出や細胞内局在調査、2) 細胞外での作用については、放出された因子によるスト

レス抵抗化、その作用機構の詳細および放出機構の解析、3) 核内での機能については、損傷 DNA 修復への関与を検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養ヒト細胞

培養ヒト細胞 R5a、子宮頸癌細胞 HeLa、膀胱癌由来細胞 BxPC-1、MiaPaCa-2、AsPC-1、KP-4、および Panc-1 を用いた。

(2) 阻害剤処理・X 線照射およびその後の培養液回収

細胞を直径 10 cm シャーレに播種し(2x10⁶ 細胞/シャーレ) 24 時間培養した後、血清無添加の MEM 培地で 1 回洗った。その後、血清無添加の MEM 培地 7 ml を加え、X 線(0, 0.2, 1, 4 Gy) あるいは短波長紫外線(UVC)(0, 0.4, 3, 12 J/m²)照射し、1 時間あるいは 4 時間後に培養液を回収した。阻害剤実験では、N-acetyl cysteine (NAC)(10 mM) あるいは SB203580(10 μM)を含む血清無添加の MEM で 1 時間前処理した後、X 線 0.2 G 照射し、さらに 1 時間培養した後、培養液を回収した。

(3) 培養液中のシャペロン・結合タンパク質の検出

培養液に、phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM と bovine serum albumin (BSA) 4 μg を添加し、Centrifugal Filter Units (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland)で濃縮した。さらに、トリクロロ酢酸を加えて得た沈殿を SDS サンプリング液処理し、annexin II と HSP27 との存在量をウエスタンブロット法により解析した。

(4) ウエスタンブロット解析

一次抗体として、それぞれ抗 annexin II 抗体と抗 HSP27 抗体を用い、次いで、HRP-標識二次抗体を用い、ECL 検出液による酵素反応で生じた発光をルミノイメージアナライザー LAS-3000 で検出した。培養液の回収率などの補正は、初めに培養液に添加した BSA 量を指標にすることとし、SDS-PAGE ゲル上の BSA のタンパク質バンドをクマシーブリリアントブルー(CBB)で染色し、その濃さをサンプル間で比較した。

細胞内シグナル伝達分子の活性化(リン酸化)状態の検討には、線量別 X 線照射 1 時間後に回収した細胞を、プロテアーゼ阻害剤と脱リン酸化酵素阻害剤を含む低張緩衝液(10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 10 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% NP-40)で溶解し、遠心して得た細胞質画分を用いた。画分中の p38 MAPK のリン酸化状態を、リン酸化 p38 MAPK (p-p38)を認識す

る抗体を用いたウエスタンブロッティング法で解析した。同時に、リン酸化型・脱リン酸化型の両方を認識する抗体で総 p38 MAPK 量を調べた。

(5) 紫外線損傷 DNA 除去能力解析

UVC 照射された細胞を各時間培養した後、DNA を抽出し、その中に存在する損傷 DNA を、サイクロブタン型チミンダイマー(CPD) と 6,4 光産物(6-4PP)に対する特異抗体を用いた ELISA 法で測定した⁶⁾。

4. 研究成果

(1) 線量別ストレス曝露後のシャペロンとその結合タンパク質の細胞外放出解析

始めに、種々の細胞間の annexin II 細胞外放出量を比較検討した結果、非癌培養ヒト細胞や HeLa 細胞では放出量が少ないが、膀胱癌由来細胞がより多く放出していることが明らかになった(図 1A)⁷⁾。

放出量の少ない HeLa 細胞では、低線量 X 線 (0.2 Gy) 照射の 1 時間から 4 時間後、annexin II の放出が認められた。この細胞外放出量増加は低線量特異的であり、高線量では認められなかった(図 1B)。UVC 照射後も、顕著な増加は観察されなかった(図 1B)。HSP27 も低線量 X 線照射後、放出が亢進したが(図 1B)、GRP78 の放出亢進は認められなかった(結果省略)。一方、細胞内の annexin II タンパク質と HSP27 タンパク質の発現量には、コントロールの actin と比べ大きな変動は観察されなかった。X 線のほかに、過酸化水素処理によっても放出が促進されることを見出した(結果省略)。

放出量増加は抗酸化剤 *N*-acetyl cysteine (NAC) 処理により抑制された(図 2A)。細胞内の酸化ストレス応答シグナル分子 ATM, p38 MAPK, PI3K, Erk1/2 の活性化状態を調べた結果、低線量 X 線照射後 p38 MAPK の活性化が亢進していた(図 2B)。さらに、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 で前処理すると、低線量 X 線による放出量増加が抑制された(図 2A)。また、過酸化水素(酸化ストレス剤)処理による annexin II 細胞外放出促進も、NAC および SB203580 前処理により抑制された(結果省略)。

以上から、低線量放射線による annexin II 放出促進には、p38 MAPK を介する酸化ストレスシグナルが関わると考えられる。一方、種々の細胞間での比較実験では、X 線および過酸化水素致死抵抗性細胞では、低線量 X 線照射による annexin II 細胞外放出促進が認められたが、感受性細胞では顕著な促進は認め

られなかった。これらの結果からも、annexin II の細胞外放出に酸化ストレス応答が関わることが示唆された。

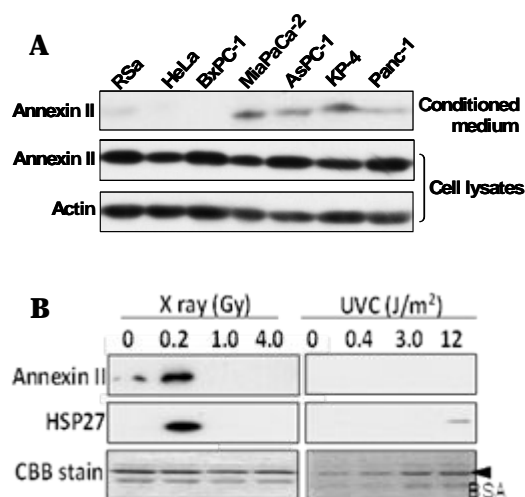


図 1.

A. 種々の細胞における annexin II の細胞外放出

非癌細胞 R5a、子宮頸癌由来細胞 HeLa、および種々の膀胱癌由来細胞 BxPC-1、MiaPaCa-2、AsPC-1、KP-4、Panc-1 における annexin II 細胞外放出量を比較検討した。

B. 線量別 X 線および UVC 照射後の annexin II と HSP27 の細胞外放出

照射 4 時間後の培養液を回収して解析した。培養液サンプル量の比較は CBB 染色された BSA で行った。

なお、電磁波の影響として直流磁場 (10 テスラ) の影響を調査したが、シャペロンとその結合タンパク質の細胞外への放出は認められなかった。

(2) 細胞外での機能の解析

膀胱癌由来細胞の培養液や recombinant annexin II (rANX II) の培養液への添加により、HeLa 細胞や膀胱癌由来細胞やの抗癌剤抵抗性が増加することを見出した⁷⁾。この抵抗性増加は、PI3K や MEK シグナルを介するアポトーシス誘導抑制によることを明らかにした⁷⁾。さらに、rANX II が X 線抵抗性に関わることも見出した(図 3)。

(3) 核内の損傷 DNA 修復過程への関与
annexin II の発現量を増減させた細胞について、UVC および中波長紫外線(UVB)による損傷 DNA 修復能力を紫外線損傷 DNA 除去能力解析により調べた。その結果、発現量の

増減に応じて損傷修復能力が増減したことから、annexin II の修復過程への関与が示唆された⁶⁾。

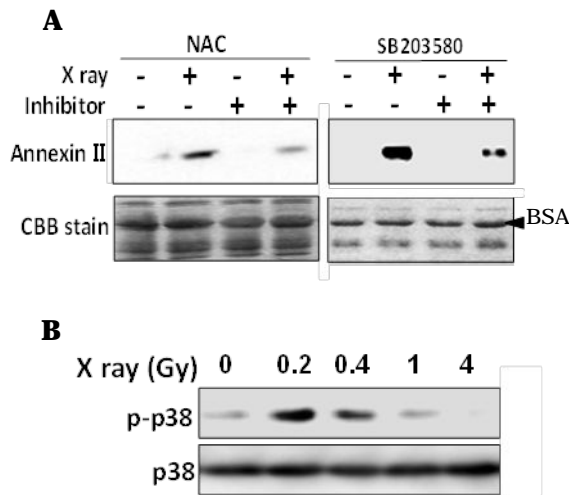


図 2.

A. 低線量 X 線照射後の annexin II 細胞外放出の阻害剤による抑制

阻害剤 NAC(10 mM) あるいは SB203580 (10 μ M) で 1 時間前処理後、X 線(0.2 Gy)照射し 1 時間後に回収した培養液を用いて解析した。

B. X 線照射後の細胞内シグナル伝達分子 p38 MAPK の活性化

照射 1 時間後に細胞を回収し、細胞質画分を調製して解析した。

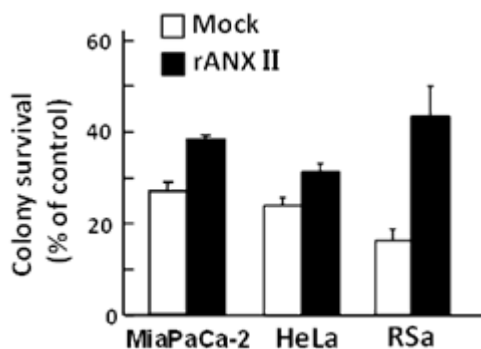


図 3. 細胞の X 線致死感受性に及ぼす rANX II の影響

MiaPaCa-2 細胞と HeLa 細胞には rANX II を 0.8 μ g/ml, RSa 細胞には 0.2 μ g/ml 培養液中に添加し 24 時間処理した。その後、MiaPaCa-2 細胞と HeLa 細胞には X 線 4 Gy, RSa 細胞には 3 Gy 照射し 2 週間後のコロニー数を数えて生存率を求めた。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけと今後の展望

annexin II は、Ca²⁺依存性リン脂質結合性タンパク質であり、主に細胞質に局在し、エンドサイトーシスやシグナル伝達に関わることが知られているが、最近、細胞外への放出も示唆されている⁴⁾。しかし、分泌シグナルをもっていないことから、ゴルジ体を介する通常の分泌経路によらないと推測されており、細胞外放出の分子機構は不明である⁴⁾。本研究では、ヒト細胞における annexin II の細胞外放出機構に p38 MAPK を介する酸化ストレスシグナルが関わることを初めて示唆した。さらに、細胞外の annexin II の新たな機能として、抗癌剤や X 線に対する抵抗化への関与を明らかにした。一方、細胞内での機能としては、比較的高線量の紫外線照射後の損傷 DNA 修復機構に関わることを見出した。細胞内外での異なる annexin II 機能の切り替えがどのように調節されているのか、また、HSP27 がその調節に関わるのかなどが今後の興味深い課題である。

< 引用文献 >

1 Wano C, Kita K, Takahashi S *et al.* Protective role of HSP27 against UVC-induced cell death in human cells. *Exp Cell Res*, 2004; 298: 584-592.

Zhai L, Kita K, Wano C *et al.* Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human RSa cells. *Exp Cell Res*, 2005; 305: 244-252.

Tong X, Kita K, Karata K *et al.* Annexin II, a novel HSP27-interacted protein, is involved in resistance to UVC-induced cell death in human AP¹ cells. *Photochem Photobiol*, 2008; 84: 1455-1461.

Gerke V, Moss SE. Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev*, 2002; 82: 331-371.

Kita K, Sugita K, Chen S-P *et al.* Extracellular recombinant annexin II confers UVC resistance and increases the Bcl-xL to Bax protein ratios in human UVC-sensitive cells. *Radiat Res*, 2011; 176: 732-742.

Yano A, Chen S-P, Kita K, *et al.* Involvement of annexin II in resistance to UVB-induced cell death and increased nucleotide excision repair capacity of UV-damaged DNA in human cells, *Biosci Biotech Biochem*. 2013; 77: 307-311.

Sato T, Kita K, Sugaya S, *et al.* Extracellular release of annexin II from pancreatic cancer cells

and resistance to anticancer drug-induced apoptosis by supplementation of recombinant annexin II. *Pancreas*, 2012; 41: 1247-1254.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1 Sato T, Kita K, Sato C, Kaneda A. A herbal medicine, Hochu-ekki-to (Bu-zhong-yi-qi-tang), enhances cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells. *Molecular Medicine Reports*, 査読有, in press. (Corresponding author)

2 Kita K, Sugita K, High sensitivity to cell death and low repair activity of DNA damages after exposure to oxidative stress in Cockayne syndrome (CS) patient-derived cells. *NO TO HATTATSU*, 査読有, in press.

3 Tanaka T, Arai M, Jiang X, Sugaya S, Kanda T, Fujii K, Kita K, Sugita K, Imazeki F, Miyashita T, Kaneda A, Yokosuka O. Downregulation of microRNA-431 by human interferon- β inhibits viability of medulloblastoma and glioblastoma cells via upregulation of SOCS6. *Int J Oncol*, 査読有, 2014; 44: 1685-1690. doi: 10.3892/ijo.2014.2317.

4 Tanaka T, Arai M, Minemura S, Oyamada A, Saito K, Jiang X, Tsuboi M, Sazuka S, Maruoka D, Matsumura T, Nakagawa T, Sugaya S, Kanda T, Katsuno T, Kita K, Kishimoto T, Imazeki F, Kaneda A, Yokosuka O. Expression level of sonic hedgehog correlated with the speed of gastric mucosa regeneration in artificial gastric ulcers. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 査読有, 2014; 29: 736-741. doi:10.1111/jgh.12445

5 Kita K, Sugaya S, Tanaka T, Dong M, Sato C, Suzuki N. Effects of lifeceramics-treated water on resistance to oxidative stress in human cells, *Food Function*, 査読有, 2013; 11: 14-19. <http://www.foodfunction.org/books.html>

6 Yano A, Chen S-P, Kita K, Jiang X, Ren Q, Sato T, Suzuki N. The involvement of annexin II in resistance to UVB-induced cell death and increased nucleotide excision repair capacity of UV-damaged DNA in human cells, *Biosci Biotech Biochem*. 査読有, 2013; 77: 307-311. (Corresponding author) doi: 10.3892/etm.2012.696

7 Tanaka T, Sugaya S, Kita K, Arai M, Kanda T, Fujii K, Imazeki F, Sugita K, Yokosuka O, Suzuki N. Inhibition of cell viability by human IFN- β is mediated by microRNA-431. *Int J Oncol*, 査読有, 2012; 40:1470-1476. doi: 10.3892/ijo.2012.1345

8 Sato T, Kita K, Sugaya S, Suzuki T, Suzuki N. Extracellular release of annexin II from

pancreatic cancer cells and resistance to anticancer drug-induced apoptosis by supplementation of recombinant annexin II. *Pancreas*, 査読有, 2012; 41: 1247-1254. (Corresponding author) doi: 10.1097/MPA.0b013e31824f356f.

9 Tong X-B, Kita K, Chen, S-P, Jiang X, Sugaya S, Jing, W-L, Zhang S-F, Suzuki, N. Involvement of HSP27 in UVC and interferon susceptibility of human breast cancer KT cells. *Exp Therap Med*, 査読有, 2012; 4: 913-917. (Corresponding author) doi: 10.3892/etm.2012.696

[学会発表] (計 7 件)

1 Extracellular release of annexin A2 via oxidative stress response after low-dose X-ray irradiation in human cells Kita K, Sato C, Sugaya S, Sugita K, Kaneda A 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 5 月 25 日 - 29 日, 国立京都国際会館, 京都府、京都市

2 菅谷茂, 松坂恵介, 船田さやか, 喜多和子, 金田篤志 ホスト細胞内における外来 DNA のエピゲノム状態の可視化. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 - 27 日 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

3 喜多和子, 佐藤知穂美, 菅谷茂, 杉田克生, 金田篤志 低線量放射線による酸化ストレス応答シグナルを介する annexin A2 の細胞外放出 第 57 回 日本放射線影響学会大会 2014 年 10 月 1 日 - 3 日 かがしま県民交流センター、鹿児島県、鹿児島市

4 喜多和子, 佐藤哲生, 菅谷茂, 田中健史, 杉田克生, 金田篤志 低線量 X 線照射による annexin II と HSP27 の細胞外放出の促進 第 56 回 日本放射線影響学会大会 2013 年 10 月 18 日 - 20 日ホテルクラウンパレス青森、青森県、青森市

5 喜多和子, 杉田克生 コケイン症候群患者由来細胞の酸化的 DNA 損傷に対する致死感受性と修復能力. 第 55 回 日本小児神経学会総会学術集会 2013 年 5 月 29 日 - 6 月 1 日 iichiko 総合文化センター、大分オアシスタワーホテル、大分県、大分市

6 菅谷茂, 喜多和子, 田中健史, 鈴木紀行, 鈴木信夫 ヒト培養細胞を用いた機能性ゼオライトによる過酸化水素およびカドミウム除去効果の検討 第 28 回ゼオライト研究会 2012 年 11 月 29 - 30 日 東京タワーホテル船堀、東京都、江戸川区

7 杉田克生, 喜多和子, 杉田記代子, 久保田雅也 annexin II によるコケイン症候群での紫外線高感受性軽減機構の解析 第 54 回小児神経学会総会 2012 年 5 月 17 日 - 19 日 ロイトン札幌、北海道、札幌市

[図書] (計 2 件)

1 Jiang X, Sugaya S, Ren Q, Sato T, Tanaka T,
Fujii K, Kita K, Suzuki N. Prevention of
Pancreatic Cancer. In: Pancreatic Cancer,
Molecular Mechanisms and Targets, ed. S.K.
Srivastava: InTech Croatia . 2012, 161-174.

2 Kita K, Guo W-Z, Wano C, Zhai L, Tong X-B,
Jin Y-H, Chen S-P, Suzuki N. A novel function
of HSP27, GRP78 and annexin II. In : Human
SOS Biological Science, ed. N. Suzuki:
Transworld Research Network, India, 2012,
25-48.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

喜多 和子 (KITA, Kazuko)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号 : 80302545

(2)研究分担者

菅谷 茂 (SUGAYA, Shigeru)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 90334177

(3)連携研究者

田中 健史 (TANAKA, Takeshi)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 80595976
(平成 24 年度のみ連携研究者)