

令和元年6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00549

研究課題名(和文) DNA二本鎖切断損傷の非侵襲生体イメージング法の開発：次世代DSBセンサーマウス

研究課題名(英文) Development of a sensor mouse model of DNA damage : next-generation DSB sensor mouse

研究代表者

小池 学 (KOIKE, MANABU)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・主幹研究員(定常)

研究者番号：70280740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：電離放射線や抗がん剤により誘発される様々なDNA損傷の中で、細胞死、細胞老化、発ガン等の原因となりうるDNA二本鎖切断(DSB)は生物にとって最も危険なDNA損傷である。XLFはDSBを修復するKu依存性非相同末端結合機構で働く修復蛋白質で損傷直後からDSBに集積することが培養細胞を用いた実験から示されている。本研究ではDSBの非侵襲生体イメージング法の開発を目指して、DSBを生体で可視化できるモデル動物を作出するために、GFPに融合したXLFタンパク質を発現するマウスを作製した。そのマウスを用いてGFP-XLFタンパク質はDSB損傷直後からDSBを誘導した部位に集積することを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではDNA二本鎖切断損傷の非侵襲生体イメージング法の開発を目指して、次世代DSBセンサーマウスの作成を試みた。DSBは放射線だけでなく環境変異源や各種抗がん剤でも生じるので、本研究で開発したマウスは広範な研究領域で貴重な実験材料となることが期待される。また、DSBを生体で可視化できるモデル動物は開発されていないので開発したマウスをさらに詳細に解析する方法を確立できれば人体でのDSB可視化法や治療効果診断法の開発等につながる可能性がある。さらに、XLFを責任遺伝子とする先天性疾患が報告されているので、生体内のXLFの機能を解析することでそれら疾患の病態解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed GFP-XLF transgenic mice. Furthermore, we demonstrated that the GFP-XLF accumulates at DSB sites in living mouse. The mice developed and information might be useful for DNA repair study and other various studies.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：DSB損傷 センサーマウス GFP 修復蛋白質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線は DNA に損傷を起こし、ガンや遺伝病等を誘発する。従って、医療放射線、飛行環境、原子力事故等を主な線源とする放射線の人体への影響の解明は安全性評価や放射線防護の実際に即して今後の重要な課題である。他方、これまで主に培養細胞を材料とした解析により得られてきた「放射線応答機構の分子レベルでの解析結果」を実際の人体の放射線影響の解明とリスク評価の精度向上に役立てるには、今後、培養細胞での解析に加えて、非ヒトモデル哺乳類個体を材料とした生体内での分子レベルの解析が不可欠とされている。DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復機構は電離放射線や環境中の化学物質や化学療法剤により生じた DSB を修復し遺伝情報を安定に維持する機構で、齧歯類やヒト細胞では非相同末端結合 (NHEJ) 機構と相同組換え (HR) 機構により修復される。他方、DSB 損傷が完全に修復されないとゲノム DNA 中の変異は発ガン等の疾患の原因になりうる。細胞内では DNA に障害が起こると傷の感知システムが働き、DNA 修復や細胞周期調節機構が働く。被ばく後の細胞が DSB を修復するには、初期応答として DSB を認識し結合する蛋白質がリン酸化等の修飾を受け DSB 損傷部位に移動・局在することが重要であるが、生細胞中での局在部位の可視化は方法論的限界によりできなかった。最近、新しい蛍光蛋白質の開発等により生体分子の生細胞中での可視化が可能になった。しかし、そのほとんど全てが培養細胞を用いた解析で、生体 (個体) での解析は行われていない。DSB 損傷は細胞周期に依存して NHEJ が HR 機構により修復されることが培養細胞を用いた実験から示唆されているが、生体内で 1) 実際にこれらの修復機構の選択がなされるのか、2) 選択されるならば、その選択機構は齧歯類とヒト細胞で同じか？、3) 幹細胞と分化細胞に違いはあるか？、4) 修復できない DSB が生じた場合の細胞の運命は、アポトーシス、あるいは、それ以外の細胞死か？等の詳細な解析はされていない。上述したように、哺乳類個体の細胞に生じた DSB 損傷を生体で観察した報告はない。従って、DSB が修復されずに残った時の細胞の運命を理解するには、生体でリアルタイムに DSB を検出しトレースするための新手法を開発する必要がある。蛍光や発光蛋白質による生体分子標識法は生きた細胞内の蛋白質を検出するのに非常に優れた方法であり、既に発生過程での特定の細胞の運命や遺伝子の転写活性化の追跡等に活用され、GFP (蛍光緑色蛋白質) やホタル発光遺伝子等を利用した組換えマウスは多数開発されている。しかしながら、DSB 損傷をリアルタイムに検出、且つ、被ばく後の細胞の運命をトレース可能にしたマウスは開発されていない。以前私達は、DNA 修復蛋白質 Ku70 の挙動と損傷細胞の運命をトレースするために DNA 損傷センサーマウスを開発した。一方、Ku70 は、1) 修復不可能な重大な損傷領域でも検出されること (Bekker-Jensen ら, JCB, 2006)、2) 単独で apurinic/apyrimidinic sites に結合し NHEJ 機構を介さず塩基除去修復の効率に影響を与える (Choi ら, PLOS ONE, 2014)。従って、NHEJ 機構が活性化した DSB 部位のみを検出するには Ku70 以外の蛋白質を指標にする必要がある。培養細胞の解析から NHEJ 機構による DSB 修復のモデルが提唱されている。即ち、DSB センサー Ku (Ku70/Ku80) が DNA 切断末端に結合すると修復が開始し、末端に結合した Ku が DNA-PKcs と複合体 (DNA-PK) を形成すると自己及び下流の蛋白質の活性を調節する。活性化した XLF/XRCC4/DNA Ligase IV は Artemis がプロセシングした末端同士を再結合し修復を完了する。私達は Ku の機能と制御機構に注目して研究を行い、Ku の細胞内局在や挙動を解明すると共に、その制御機構が NHEJ 機構の制御に重要であることを明らかにしてきた。最近、DNA 損傷部位に損傷直後から集積する Ku 蛋白質の様子を追跡するためのライブセルイメージング法の開発に成功した (小池ら, ECR, 2008; 2011)。さらに、マウス細胞で Ku は NHEJ コア修復蛋白質 XRCC4, DNA-PKcs や XLF の DSB へのリクルートに必須であるが、p21, Rad52 や Artemis のリクルートには不必要なことを明らかにした (小池ら, ECR, 2011; BBRC, 2011; 2013)。他方、XRCC4 と XLF は NHEJ 機構でのみ働くが、DNA-PKcs はそれ以外の機構でも働く。従って、DSB 部位での NHEJ 機構の活性化の指標には、XLF と XRCC4 が適す。電離放射線による DNA 損傷の細胞内分布を高感度に検出する技術が開発され (Rogakou ら, JCB, 1999)、高線量ばかりでなく低線量放射線によっても DSB が生じることが解明されたが、その検出法は損傷部位で起こるヒストン (H2AX) のリン酸化修飾変化 (H2AX) を認識する抗体による病理標本上やフローサイトメーターで行う方法のために非侵襲的に生体で解析することはできない。また GFP を融合した H2AX の DNA 損傷部位への集積を検出することは、抗体による方法と異なり非常に難しい (Siino ら, BBRC, 2002; 小池ら未発表)。ところで、生体組織の細胞は細胞周期の G0/G1 期の細胞がほとんどであり、HR 機構で働く Rad51 蛋白質等は G0/G1 期には損傷部位に集積が検出されないため、生体の損傷細胞を同定するためには適さない。皮膚は放射線感受性の高い組織の一つで、特に、毛包幹細胞や分化後に活発な増殖能を持つ表皮基底細胞が被ばくにより広範囲に重大な損傷を受けると生命の維持にも関わる。一方、体表を覆うので、もし被ばくの指標が見つければ、外部からの被ばくの検知や被ばく量の定量化に最適の組織である。表皮角化細胞は皮膚の最外層にある上皮細胞で、角化層と表皮層を構成する細胞のほとんど全てがこの細胞であることから、皮膚を構成する細胞の中では GFP のイメージングに最も適した細胞である。ところで、被ばくにより DSB を生じた染色体では H2AX のリン酸化修飾が起こり、傷が未修復のままならばリン酸化状態が継続される (Rogakou ら, JCB, 1999)。最近、私達は、被ばくした皮膚表皮基底細胞での H2AX と p53 のリン酸化修飾変化や遺伝子発現変化に注目して解析を行い、これらの修飾変化や下流遺伝子の発現変化が線量に依存して皮膚で起こることを報告した (小池ら, JRR, 2005)。一方、

H2AX の発現は毛周期毎にダイナミックに変化しており (小池ら、BBRC, 2007) マウス皮膚では低線量放射線被ばくの指標としては適さない。寿命が長い幹細胞に遺伝子変異が蓄積すると発癌の原因となるので分化細胞とは修復機構や放射線感受性が異なる可能性が高いが、未解明のままである。他方、損傷直後 1 秒以内に DSB 末端に結合する修復蛋白質により修復機構の選択がなされる可能性が高い。最近、分子病理学と生化学的方法により、毛包幹細胞は抗アポトーシス遺伝子 BCL2 の過剰発現と NHEJ 活性の亢進により放射線誘発アポトーシスに抵抗性であると報告 (Sotiropoulou ら、2010, Nature Cell Biol.) されたが、被ばく直後の DSB の誘発や修復蛋白質の挙動については解析がなされていない。

以上の背景から、DSB の非侵襲生体イメージング法を開発して、DSB や修復タンパク質 XLF の挙動を生体、特に皮膚で可視化できるモデル動物を開発して、解析することは重要である。

## 2. 研究の目的

ヒトを含む生物にとって様々な DNA 損傷の中で DSB は最も危険な DNA 損傷であると考えられており、エックス線等の放射線やある種の抗がん剤により誘発され、細胞死、細胞老化、変異や発ガン等の原因となる可能性が有る。XLF は DSB を修復する Ku 依存的な非相同末端結合機構で働く修復蛋白質で、DNA 損傷直後から DSB に集積することが培養細胞を用いた実験から示されているが、生体組織中でも同様に集積するかについては検証がなされていない。本研究では、DSB の非侵襲生体イメージング法を開発を目指して、DSB を生体で可視化できるモデル動物を作出するために、次世代 DSB センサーマウスを作成することを目的とする。また、作成したマウスを用いて、GFP-XLF タンパク質が生体内で DSB 損傷直後から DSB を誘導した部位に集積するか否かを検証する。

## 3. 研究の方法

本研究は、以下に記すように行った。

まず、はじめに、GFP 融合 XLF (GFP-XLF) を発現するマウスの作出を試みた。続いて、マウスの系統化、精子、受精卵の保存、同時に、非侵襲で時間空間的に解析するためのイメージングシステムの確立のための基礎実験を行った。

### (1) GFP-XLF 発現ベクターの構築とマウスの作出

#### a. 発現ベクター構築と導入遺伝子の大量精製

マウスの生体内の DSB を非侵襲で、時間空間的に解析するための外来性のセンサーとして、GFP を選択した。上皮細胞では組織と分化レベルごとに、特異的なケラチンタンパク質の発現が、厳密に制御されている。皮膚の表皮基底細胞に外来性のセンサーとして利用する GFP 融合蛋白質を恒常的、且つ、特異的に発現誘導するために、皮膚の表皮基底細胞で発現するケラチンのプロモーターを選択した。まず、はじめに、GFP を融合した XLF 遺伝子をプロモーターの下流に連結した発現プラスミドベクターを遺伝子工学的な手法により構築した。発現プラスミドベクターは大腸菌内で大量複製した後、プロモーター、GFP-XLF、TATA 配列、ポリ A シグナルなどからなる発現に必要な最小限の遺伝子断片になるように制限酵素処理を行ってから、精製した。DNA 断片は冷凍庫 (-20 度) に保存した。

#### b. GFP-XLF 発現マウスの作出

マイクロインジェクション法により、C57BL/6J マウスの前核期受精卵に上記の DNA 溶液を導入し、GFP-XLF 発現マウスを作出した。遺伝子型の確認は導入遺伝子を特異的に検出するプライマーセットを合成し、ゲノム PCR 法により行った。

#### c. GFP-XLF 発現マウスの交配と系統化

作出した GFP-XLF 発現マウス系統を維持するために、野生型マウス (C57BL/6J) と自然交配し、子孫を得た。尚、導入遺伝子が子孫に遺伝することの確認は上記のプライマーセットを用いたゲノム PCR 法によって行った。

#### d. GFP-XLF 発現マウスにおける GFP-XLF タンパク質の検出

導入した外来遺伝子からの GFP-XLF タンパク質の特異的な発現の確認は、GFP-XLF 発現マウスの背部皮膚、腹部皮膚、尾などから抽出した総タンパク質を材料に、抗 GFP 抗体、抗 XLF 抗体、抗  $\alpha$ -アクチン抗体 (コントロール) を用いたウエスタン法による解析で行った。

#### e. GFP-XLF と赤色蛍光タンパク質 DsRed を二重発現するマウスの作出

GFP-XLF と赤色蛍光タンパク質 DsRed を二重発現するマウスの作出は、所属研究所で分与していただいた赤色蛍光タンパク質 DsRed を全身で発現するマウス (CAGGS-DsRed マウス) を GFP-XLF 発現マウスに自然交配して作出した。

### (2) 生体内で発現した GFP-XLF タンパク質の細胞内局在の解析と損傷直後から追跡するためのイメージングシステムの構築

#### a. GFP-XLF 発現マウス皮膚組織での GFP-XLF タンパク質の細胞内局在

GFP-XLF 発現マウス皮膚組織での GFP-XLF タンパク質の細胞内局在解析は、蛍光顕微鏡法と共焦点レーザー顕微鏡法を用いて行った。

#### b. マウス生体内における GFP-XLF タンパク質の DNA 損傷部位への集積

マウス生体内における GFP-XLF タンパク質の DNA 損傷部位への集積は、ヒト XLF やウシ

XLF タンパク質の検出のために培養細胞を用いて確立した方法を改良して解析した(Koike ら, 2011, 2015)。マウス皮膚細胞への DNA 損傷の誘導はマイクロレーザー照射により行った。GFP-XLF の損傷部位へ蓄積する様子の検出はマイクロレーザー照射直後から共焦点レーザー顕微鏡法により行った。

#### 4. 研究成果

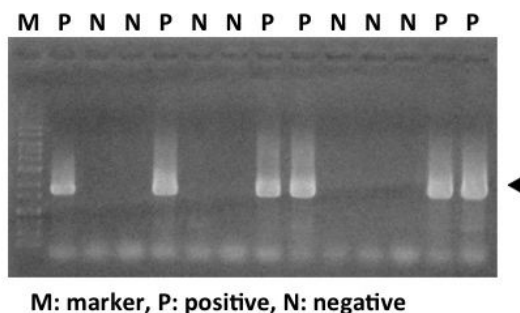
GFP-XLF タンパク質を発現するマウスの作出とそれらマウス系統の樹立を第一の目標として実験を行った。さらに、生体内で非侵襲、経時的に DSB を解析するために、マウスに人工的に発現させた GFP-XLF タンパク質の挙動を解析するためのイメージングシステムを確立し、培養細胞やマウス個体を材料に種々の基礎実験を行った。

##### (1) GFP-XLF 発現トランスジェニックマウスの作出と自然交配による系統化

GFP-XLF 発現マウスの作出はマイクロインジェクション法により行った。GFP-XLF DNA 断片を注入した C57BL/6J マウス前核期受精卵を偽妊娠誘導した マウスの卵管に移植した結果、ファウンダートランスジェニックマウスが得られた。マウスの尾から抽出、精製したゲノム DNA を材料に、導入遺伝子断片を特異的に検出できる PCR プライマーセットにより遺伝子型解析を行った。その結果、ゲノム DNA から導入遺伝子の断片が検出された。この結果は、トランスジェニックマウスが作出できたことを示唆する。作出したトランスジェニックマウスを系統化するために、野生型マウス(C57BL/6J) と交配し、子孫を得た(図1)。上記の導入遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーセットによるゲノム PCR 法により、導入遺伝子が子孫に遺伝することを確認した。図2に、遺伝子型解析を行った1例を示す。自然交配によって2系統を維持し、GFP-XLF を皮膚表皮基底細胞で安定に発現するマウスの系統化と保存を行なう目的で、GFP-XLF 発現 マウスと C57BL/6J マウスを交配した。得られた産仔の中から導入遺伝子が伝達された GFP-XLF 発現 マウスを選択し、精子を凍結保存した。また、一部の精子は、過排卵処理した C57BL/6J マウスの卵子と体外受精を行い、得られた受精卵の中から2細胞期まで発生した受精卵を凍結保存した。尚、導入した遺伝子はメンデルの法則に従い、子孫に伝達されること、導入した遺伝子断片による致死的な効果がないことを確認できている。



図1 GFP-XLF 発現マウス



M: marker, P: positive, N: negative

図2 マウスの遺伝子型解析

##### (2) GFP-XLF 発現マウスの皮膚細胞における外来性 GFP-XLF タンパク質の発現

導入したケラチンプロモーターに連結した GFP-XLF 遺伝子断片から GFP-XLF タンパク質が皮膚細胞に特異的に発現したことを確認するために、GFP-XLF 遺伝子断片が検出された陽性マウスと陰性マウス背部皮膚を含む各組織から抽出した総タンパク質を材料に抗 GFP 抗体、抗 XLF 抗体、抗  $\alpha$ -アクチン抗体を用いてウエスタン法による解析を行った。その結果、陽性マウス由来の尾、背部皮膚、腹部皮膚由来の総タンパク質中に導入遺伝子から発現した GFP-XLF タンパク質が検出された。一方で、肝臓や脾臓由来の総タンパク質中からは検出できなかった。また、両マウスの材料から  $\alpha$ -アクチン(コントロール)が、検出できた(図3に解析したデータの一部を示す)。以上の結果は、導入したケラチンプロモーターに連結した GFP-XLF 遺伝子断片から GFP-XLF タンパク質が皮膚細胞に特異的に発現したことを示唆する。さらに、陽性マウスの全身の皮膚で発現していることを確認するために、蛍光顕微鏡法や簡易的に GFP を検出するための蛍光ライトをあてて調べた結果、GFP-XLF が全身の皮膚で発現していることが確認できた(図4)。さらに詳細に、マウス皮膚の GFP-XLF の発現パターンを調べるために、マウス若齢個体や背部皮膚、腹部皮膚、尾に由来する組織片を材料に、共焦点レーザー顕微鏡法と蛍光顕微鏡法により細胞内局在を調べた結果、GFP-XLF タンパク質は陽性マウスの上皮基底細胞の細胞核に特異的に発現していることがわかった(データ未公表)。

##### (3) 生体内で非侵襲、経時的に DSB を解析するために、マウスに人工的に発現させた GFP-XLF タンパク質の挙動を解析するためのイメージングシステムの確立と解析

マウス生体皮膚細胞内における GFP-XLF タンパク質の DNA 損傷部位へ集積する様子の解析は、ヒト XLF やウシ XLF タンパク質の検出のために培養細胞を用いて確立した方法を改良して行った(Koike ら, 2011, 2015)。マウス生体皮膚細胞への DNA 損傷の誘導はマイクロ



レーザー照射により行った。GFP-XLF の損傷部位へ蓄積する様子はマイクロレーザー照射直後から共焦点レーザー顕微鏡法により観察した。これらの方法によって作成したマウスを用いて、GFP-XLF タンパク質が DSB 損傷直後から DSB を誘導した部位に集積するか否かをレーザーにより誘導して検証した結果、損傷直後からレーザー照射によって誘導した損傷部位に集積することが明らかになった（データ未公表）。尚、GFP-XLF タンパク質がマウス細胞でレーザー照射によって誘導した DSB に集積することは、H2AX 抗体による細胞染色法で確認した。

ところで、アポトーシスを起こした細胞の細胞核は凝縮することが知られている。本研究で予備的に実験を行った結果、レーザー照射によって DNA 損傷を誘導した生体皮膚細胞では、細胞核の凝縮の様子は観察されなかった。次に、皮膚組織や細胞内の構造とその変化をより高感度で検出するためのマウスを作成するために、GFP-XLF マウスに赤色蛍光タンパク質 DsRed を全身で発現するマウス(CAGGS-DsRed)を交配した。得られた仔マウスにおける 2 つの外来遺伝子の発現パターンを観察した結果、マウス産仔の中から 2 つの導入遺伝子を発現するマウスを得られたことがわかった。それらのマウスにおいて 2 つの導入遺伝子のタンパク質の発現パターンは、様々であった（図 5）。一方、私達が用いた共焦点レーザー顕微鏡法の解像度では、皮膚組織や細胞内の構造とその変化を詳細に解析することはできなかった。尚、本研究期間の間に、所属する組織で大きな組織改編が 2 度あり、年度途中で研究代表者の所属が変更になったこと、外部から導入したマウスが衛生的な問題から実験に使用できなくなったことなどから、予定していた実験に影響が出た。これらの点については、今後の課題である。

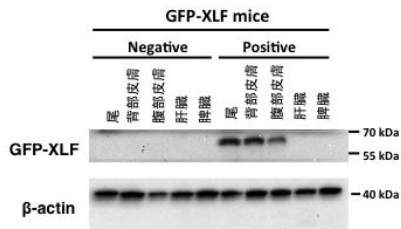


図 3 GFP-XLF タンパク質の組織特異的発現



図 4 GFP-発現マウスのイメージング



図 5 GFP-XLF/DsRed 二重発現マウス

以上まとめると、実際に GFP-XLF 発現マウスを材料にライブセルイメージング法によって皮膚細胞の細胞核内で発現する GFP-XLF タンパク質を検出し、DNA 損傷部位に集積する様子を追跡できた。以上の結果は損傷 DSB に結合する DNA 修復蛋白質 XLF に融合した GFP を指標に生体でリアルタイムに細胞核と DSB を検出し、損傷直後からの DNA 修復蛋白質 XLF の挙動と損傷した細胞のその後の運命をトレースするために次世代 DSB センサーマウスを開発できたことを示唆する。本研究で得られた結果に基づいて、今後さらに解析することを検討している。

#### 4. 研究成果

上述したように、エックス線等の放射線やある種の抗がん剤により誘発される様々な DNA 損傷の中で、細胞死、細胞老化、変異や発ガン等の原因となりうる DSB はヒトを含む生物にとって最も危険な DNA 損傷であると考えられている。XLF は DSB を修復する Ku 依存的な非相同末端結合機構で働く修復蛋白質で、損傷直後から DSB に集積することが培養細胞を用いた実験から示されている。本研究では、DSB の非侵襲生体イメージング法の開発を目指して、次世代 DSB センサーマウスの作成を試みた。DSB を生体で可視化できるモデル動物を作成するために、GFP に融合した XLF (GFP-XLF タンパク質) を発現するマウスを作製した。そのマウスを用いて、GFP-XLF タンパク質は DSB 損傷直後から DSB を誘導した部位に集積することを実証できた。DSB は放射線だけでなく環境変異源や各種抗がん剤でも生じるので、本研究で開発したマウスは、広範な研究領域で貴重な実験材料となることが期待される。さらに、DSB を生体で可視化でき

るモデル動物は開発されていないので、開発したマウスをさらに詳細に解析する方法を確立することで、人体での DSB 可視化法や治療効果診断法の開発等につながる可能性がある。さらに、XLF を責任遺伝子とする先天性疾患が報告されているので、生体内の XLF の機能を解析することでそれら疾患の病態解明につながることを期待される。

本研究を遂行する過程において、研究代表者の所属する国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所の動物管理施設、エックス線照射施設、実験動物開発等に関わる研究員や技術員等の方々に、技術支援や的確な助言をはじめ多大なる協力をして頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)  
投稿準備中

〔学会発表〕(計 件)  
発表準備中

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

##### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：小池 亜紀

ローマ字氏名：KOIKE AKI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。