

令和元年6月10日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10012

研究課題名(和文)重粒子線照射におけるDNA修復因子の機能解析とより効果的な治療法への応用

研究課題名(英文) Analysis of DNA repair mechanism after heavy-ion irradiation and its application to radiation therapy

研究代表者

泉 雅子 (Izumi, Masako)

国立研究開発法人理化学研究所・仁科加速器科学研究センター・専任研究員

研究者番号：00280719

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)：重粒子線治療は先進的ながん治療法として利用されているが、重粒子線に特異的なDNA二本鎖切断の損傷修復機構は完全に解明されていない。本研究では、DNA修復タンパク質を欠損する哺乳類細胞やDNA修復経路の阻害剤で処理した哺乳類細胞を用いて、DNA二本鎖切断やDNA修復タンパク質を蛍光抗体法により検出することにより修復機構を解析した。その結果、X線あるいは様々なエネルギーの重粒子線における主たるDNA修復機構は非相同末端結合であること、また、相同組換え機構は非相同末端結合欠損をある程度相補できるが、エネルギーが高くなると相同組換え反応で相補できないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重粒子線は、X線に比べて高い致死効果を持つこと、標的部分のみに高い放射線量を与えることが可能であること、酸素効果の影響を受けにくいことから、先進的ながん治療法として利用されている。しかし、重粒子線に特異的なDNA損傷修復機構は完全に解明されていない。本研究は、重粒子線照射後のDNA損傷修復の理解に寄与するだけでなく、将来的には重粒子線照射とDNA修復阻害剤(抗がん剤)を組み合わせた新しい治療法の開発や、宇宙空間における有人飛行の放射線リスク評価に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The heavy-ion irradiation is used as a radiation therapy, although DNA repair mechanism is not fully understood. In this research, the number of DNA double strand breaks or the foci of DNA repair proteins were analyzed after X-ray or heavy-ion irradiation with various linear energy transfer in mammalian cells where specific DNA repair pathways were inhibited by the lack of DNA repair proteins genetically or the pretreatment of inhibitors against DNA repair proteins. The main repair pathway for DNA double strand breaks after both X-ray or heavy-ion irradiation was non-homologous end joining. In addition, homologous recombination could complement the defect of non-homologous end joining after X-ray irradiation, but not after high energy heavy-ion irradiation completely.

研究分野：分子生物学

キーワード：重粒子線

1. 研究開始当初の背景

放射線は、DNA上に塩基損傷、塩基脱落、DNA一本鎖切断、DNA二本鎖切断など様々なタイプの損傷を作る。放射線が生成するDNA損傷の中でもDNA二本鎖切断は他の修復経路に比べて反応が複雑な上、突然変異や染色体異常を引き起こすことが多いため最も重篤な損傷であり、放射線の生物影響はDNA二本鎖切断の頻度に大きく依存する。

重粒子線はガンマ線やX線に比べて高い致死効果を持つこと、標的部分のみに高い放射線量を与えることが可能であること、酸素による増強効果を受けにくい環境でも高い致死効果を発揮できるため低酸素状態のがん細胞に対しても高い治療効果を持つことから、先進的ながん治療法として利用されている。重粒子線は、X線やガンマ線に比べてDNA二本鎖切断を高頻度で引き起こす上、塩基損傷など様々な損傷を狭い領域に生じ、X線などの低エネルギー放射線に比べて修復困難なDNA二本鎖切断を生成する。X線により生じたDNA二本鎖切断は、哺乳類細胞では主として相同組換えが非相同末端結合により修復されるが、重粒子線により生じた修復困難なDNA二本鎖切断がどのように修復されるのかは不明な点が多い。

申請者は、重粒子線により生じたDNA二本鎖切断修復機構を明らかにする目的で、チャイニーズハムスター由来のCHO細胞とそれを親株とするDNA修復機構に欠損を持つ変異体を用いて重粒子線照射後の生存率を調べたところ、重粒子線によるDNA二本鎖切断修復には主として相同組換えが関与しており、非相同末端結合の寄与は小さいことを示唆するデータを得ていた。同様の研究結果は他のグループからも報告されていたが (Genet et al., 2012、他) その一方で非相同末端結合の寄与も示唆する報告もあり (Zafer et al., 2010) これが細胞種の違いによるものなのか照射条件の違いによるものかは不明であり、統一的な見解には至っていなかった。

がん細胞は、その遺伝的バックグラウンドの違いにより、各種抗がん剤や放射線治療に対する耐性が異なる。また、現在、DNA修復因子やDNA修復・細胞死を制御するチェックポイント因子を標的とした抗がん剤のスクリーニングが進められており、放射線治療との併用により、放射線のがん治療の効果を高めることも検討されている。特に、重粒子線治療は経費がかかることがデメリットの一つであるが、治療効果を高め、少ない照射回数による治療が可能となれば、費用の軽減化やより多くの患者の受け入れにつながると考えられる。重粒子線照射後のDNA修復機構を明らかにすることは、単に基礎研究として重要なだけでなく、将来的な治療法への応用を検討する上でも重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類細胞における重粒子線により誘発されるDNA二本鎖切断の修復機構を、分子レベルで解明することを主たる目的とした。具体的には、複数の哺乳類細胞を用いて、X線と様々なエネルギーの重粒子線を照射し、

- 1) 重粒子線により生成するDNA二本鎖切断が非相同末端結合あるいは相同組換えのいずれの経路により修復されるのか
 - 2) DNA修復反応における非相同末端結合と相同組換えの寄与の割合と放射線のエネルギーとの相関
 - 3) DNA二本鎖切断修復の効率と放射線のエネルギーとの相関
- の三点を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

1) DNA修復タンパク質の可視化解析

哺乳類細胞は細胞ごとに遺伝的なバックグラウンドが異なる。特に、がん細胞や不死化した細胞ではDNA修復タンパク質やDNA修復チェックポイント機構に異常がある場合も少なくない。そこでNB1RGB細胞(ヒト正常繊維芽細胞)とHeLa細胞(ヒト子宮頸がん細胞)を用いて、解析を行った。X線あるいは様々なエネルギーを持つ重粒子線(線エネルギー付与率 = 80~300 keV/μm)を照射し、各修復反応に特異的なタンパク質(DNA-PK, Rad51等)や、各修復反応の選択に関与するタンパク質(53BP1, Rif1, CtIP等)の局在を蛍光抗体法により染色し、それぞれの修復タンパク質がDNA損傷部位に集積しているか調べ、修復に関与しているタンパク質を明らかにした。これと並行して、DNA二本鎖切断部位の指標としてリン酸化型ヒストンH2AXを蛍光抗体で染色し、実際にDNA二本鎖切断修復が起きているかをモニターした。また、NB1RGB細胞は血清飢餓により静止期に同調できるので、静止期の細胞に放射線を照射し、同様に修復タンパク質の局在やDNA二本鎖切断修復の効率を調べた。

2) DNA修復タンパク質の欠損株を用いた解析

CHO細胞とCHO細胞を親株とするDNA-PK欠損株(非相同末端結合欠損株)、XRC3欠損株(相同組換え欠損株)を用いて上記1)と同様にX線あるいは様々なエネルギーを持つ重粒子線を照射し、リン酸化型ヒストンH2AXを蛍光抗体で染色することによりDNA

二本鎖切断修復の経時的変化を調べ、修復の効率と放射線のエネルギーの相関を調べるとともに、いずれの修復経路が寄与しているかを検討した。

3) DNA修復阻害剤を用いた解析

NB1RGB細胞を非相同末端結合あるいは相同組換えの阻害剤(それぞれの経路に必須の修復タンパク質であるDNA-PKとRad51の阻害剤を用いる)で処理した後に、X線あるいは重粒子線照射し、上記1)2)と同様にDNA修復タンパク質やDNA二本鎖切断を可視化し、その経時的な変化を調べることにより、どのような修復経路が機能しているのかを解析した。

4. 研究成果

1) DNA修復タンパク質の可視化解析

NB1RGB細胞あるいはHeLa細胞に5GyのX線や重粒子線を照射し、経時的に細胞を固定し、蛍光抗体法によりDNA修復タンパク質の局在を蛍光抗体法により観察した。どちらの細胞でも、照射30~60分後には、すべての細胞で非相同末端結合に關するDNA-PKのフォーカスが観察され、Rif1、53BP1が共局在していることが観察された。また、フォーカスの数は30~60分後が最大となり、その後経時的に減少したが、その減少は放射線のエネルギーが高いほど時間がかかった。照射24時間後に残存していたフォーカスの数は最大値に比べて、X線では約5%、炭素線(線エネルギー付与率 = 80 keV/μm)では10%、アルゴン線(線エネルギー付与率 = 300 keV/μm)では25%であった。また、DNA-PKのフォーカスは、リン酸化型ヒストンH2AXとも共局在しており、その数の経時的変化はよく類似していた。

一方、相同組換えに關するRad51のフォーカスは、全体の30%程度の細胞にのみ観察され、その数は照射後3~5時間後に最大となった後にゆっくりと減少し、24時間後の時点ではフォーカスを持つ細胞の割合は5%以下に低下した。Rad51のフォーカスもリン酸化型ヒストンH2AXと局在していた。また、高エネルギー放射線(アルゴン線)の場合は、Rad51とDNA-PKも共局在して大きなフォーカスを形成しているおり、両者の経路に關する修復因子が集合している様子が観察された。

ヒト正常繊維芽細胞を血清飢餓によりG0期に同調し、蛍光抗体法により放射線照射後の修復タンパク質の動態を、対数増殖期の細胞と比較した。DNA-PKのフォーカス数は、X線照射後は対数増殖期に比べてG0期では約二倍形成されていた。一方、重粒子線照射後のフォーカス数は、対数増殖期とG0期ではほぼ同じであった。また、CHO細胞とDNA-PKを欠く変異体(非相同末端結合欠損株)を用いてRad51のフォーカスの数を調べたところ、重粒子線では親株と変異株とで差はなかったが、X線照射では親株よりも変異株の方がRad51のフォーカスが約二倍形成されていた。さらにヒト正常繊維芽細胞においても、相同組換えが機能しない静止期の細胞と、対数増殖期の細胞とでDNA修復の速度に大きな差がなかった。

以上の結果は、X線照射では少なくとも一部のDNA二本鎖切断修復反応において、非相同末端結合と相同組換えが競争的に機能しているが、重粒子線の場合はいずれかの修復経路が優先的に機能していることを示唆している。また、X線と同様に、重粒子線照射後のDNA二本鎖切断修復に、主に非相同末端結合が關与していることを示唆している。

2) DNA修復タンパク質の欠損株を用いた解析

CHO細胞、CHO細胞を親株とするDNA-PK欠損株(非相同末端結合欠損株)、XRCC3欠損株(相同組換え欠損株)にX線や重粒子線を照射し、DNA二本鎖切断の指標であるリン酸化型ヒストンH2AXのフォーカス数の経時的変化を調べることによりDNA修復効率を評価した。X線照射後、非相同末端結合欠損株と相同組換え欠損株では、野生株に比べてDNA修復に二倍程度時間がかかった。一方、炭素線(線エネルギー付与率 = 80 keV/μm)、アルゴン線(線エネルギー付与率 = 300 keV/μm)では非相同末端結合欠損株は野生株に比べて大幅に修復が遅れ、野生株では24時間後に大部分の修復が完了しているのに対して、炭素線では照射24時間後に40%、アルゴン線では90%のDNA二本鎖切断が修復されずに残った。また、相同組換え欠損株では、炭素線での遅延はX線と同程度であったが、アルゴン線では非相同末端結合欠損株ほどではないものの、修復は大幅に遅延し4~5倍の時間を要した。

さらに、CHO細胞、CHO細胞を親株とするDNA-PK欠損株、XRCC3欠損株にX線あるいは重粒子線を照射後、経時的に細胞抽出液を調製してDNA二本鎖切断の指標となるリン酸化型ヒストンH2AXの量を調べたところ、DNA-PK欠損株では、X線と同様に炭素線、アルゴン線でも照射後のリン酸化型ヒストンH2AXの増加量が他の細胞よりも少ないことが判明した。DNA-PKはヒストンH2AXをリン酸化する主要な酵素の一つであり、X線だけではなく、重粒子線でもDNA切断を認識して活性化されていることが示唆された。従来の報告では、高LET放射線においてはDNA-PKがDNA切断末端に結合できない可能性が示唆されていたが、非相同末端結合に關するDNA-PKも重粒子線による損傷を認識し、活性化されて別の修復タンパク質をリン酸化していることが明らかになった。

3) DNA修復阻害剤を用いた解析

NB1RGB細胞に対してDNA-PKとRad51の阻害剤を用いて同様の実験を行い、DNA修復に与える影響を調べた。DNA-PK阻害剤ではX線、重粒子線いずれの場合も、照射後の修復が大幅に阻害されたのに対して、Rad51阻害剤はDNA-PK阻害剤ほど大きな影響を与えなかった。また、DNA-PK阻害剤は、LETが高くなるほどその影響が大きくなった。

以上の結果は、2)で示された結果とも合致し、いずれの放射線でも主たるDNA修復機構は非相同末端結合であることを示している。また、相同組換え機構は非相同末端結合欠損をある程度相補できるが、エネルギーが高くなると相同組換え反応で相補できないことを示唆している。その一方で、従来報告や申請者によるCHO細胞とその変異株を用いた生存率の解析結果では、重粒子線特有のRBEの増加は相同組換えに依存していることが明らかになっている。そこで、重粒子線により生じるDNA二本鎖切断は主に非相同末端結合により修復されるが、一部の重篤な損傷は相同組換えでのみ修復可能であり、それが細胞の生存率に影響を与えていると考えられる。

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Izumi, M. and Abe, T. The inhibitor of DNA-PK suppressed DNA repair after heavy-ion irradiation in quiescent mammalian cells. RIKEN Accel. Prog. Rep. 51, in press. (査読有)
2. Izumi, M. and Abe, T. (2017) The recruitment of Rad51 and phosphorylated DNA-PKcs after heavy-ion irradiation in human normal fibroblast. RIKEN Accel. Prog. Rep. 50, 233. (査読有)
3. Izumi, M., Mizuno, T., Yanagi, K., Sugimura, K., Okumura, K., Imamoto, N., Abe, T., and Hanaoka, F. (2017) The Mcm2-7-interacting domain of human mini-chromosome maintenance 10 (Mcm10) protein is important for stable chromatin association and origin firing. J. Biol. Chem. 292, 13008-13021. (査読有)
4. Amino, M., Yoshioka, K., Furusawa, Y., Tanaka, S., Kawabe, N., Hashida, T., Tsukada, T., Izumi, M., Inokuchi, S., Tanabe, T., Ikari, Y. (2017) Inducibility of ventricular arrhythmia 1 year following treatment with heavy ion irradiation in dogs with myocardial infarction. Pacing Clin. Electrophysiol. 40, 379-390. (査読有)
5. Izumi, M. and Abe, T. (2016) The defect of non-homologous end joining substantially enhanced the focus formation of Rad51 after X-ray irradiation, but not after heavy-ion irradiation. RIKEN Accel. Prog. Rep. 49, 251. (査読有)
6. Izumi, M. and Abe, T. (2015) Localization of Rad51 and phosphorylated DNA-PKsc after heavy-ion irradiation in mammalian cells. RIKEN Accel. Prog. Rep. 48, 301. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Tomita, M., Tsukada, T., and Izumi, M.: Bystander cell killing effects induced by low-fluences of high-LET radiations. The 64th Annual Radiation Research Society Meeting, 2018
2. 泉 雅子、水野 武、柳 憲一郎、杉村和人、奥村克純、今本尚子、阿部知子、花岡文雄: 「ヒトMcm10のMcm2-7相互作用ドメインの同定」第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、2017

〔図書〕(計 1 件)

1. Izumi, M. (2015) Effects of radiation on human body, Shibata, T., ed. (Japan Radioisotope Association), vol.1-2.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

http://www.riken.jp/research/labs/rnc/accel_app/rad_biol/
http://www.nishina.riken.go.jp/labo/muta_bio.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者：無し

(2)研究協力者：無し

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。