

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07775

研究課題名(和文) 静止期の細胞における重粒子線照射後のDNA二本鎖切断修復機構の解析

研究課題名(英文) Repair mechanism for DNA double strand breaks caused by heavy-ion irradiation in quiescent mammalian cells

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：重粒子線により生じるDNA二本鎖切断修復は、X線に比べて相同組換えへの依存度が高いとされるが、生体内の大部分の細胞やがん幹細胞の多くは相同組換えが機能しない静止期にある。本研究では、静止期のヒト正常線維芽細胞における重粒子線照射後のDNA二本鎖切断の修復経路は非同相末端結合であり、代替的非相末端結合や一本鎖アニーリングは機能していないことを明らかにした。一方、対数増殖期にあるG1期の細胞では一本鎖アニーリングに関与するタンパク質がDNA損傷に応じてクロマチンに結合していることが観察され、より突然変異を誘発しやすい修復経路も関与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

重粒子線は先進的ながん治療法として利用されているが、重粒子線に固有のDNA損傷の修復反応は、完全に解明されていない。本研究では静止期の哺乳類細胞における重粒子線照射後のDNA二本鎖切断修復機構を分子レベルで解明するとともに、その結果引き起こされる染色体異常や突然変異のリスクを評価し、二次発がんの危険性を予測し治療最適化のための基盤データとする。また、本研究の成果は宇宙空間における有人飛行の放射線リスク評価にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：Among DNA damages caused by ionizing radiation, DNA double strand breaks (DSBs) are the most lethal damage. Mammalian cells have four pathways to repair DSBs: non-homologous end joining (NHEJ), homologous recombination (HR), alternative non-homologous end joining (a-NHEJ), and single strand annealing (SSA). In mammalian cells, HR plays more important roles in the repair of DSBs caused by heavy-ions. However, a major part of cells in the body or cancer stem cells are in quiescent state (G0) where HR does not work. In this research, it is shown that NHEJ is the major repair pathway in quiescent cells, whereas several essential proteins for a-NHEJ or SSA are not expressed in quiescent cells. On the other hand, several proteins involved in SSA, which is a more error-prone pathway than NHEJ, are recruited to DSBs in G1 cells where HR does not work. Therefore, the repair pathways for DSBs caused by heavy-ions are different between G0 and G1 cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA修復 重粒子線

1. 研究開始当初の背景

放射線が生成する DNA 損傷の中でも DNA 二本鎖切断は最も重篤な損傷で、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、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、修復困難な複雑な DNA 損傷を生成する。哺乳類細胞の DNA 二本鎖切断の修復機構は、相同組換え、非相同末端結合、代替的非相同末端結合、一本鎖アニーリングの 4 種類であるが、重粒子線に固有の複雑な 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。

研究開始以前に、申請者や複数のグループが CHO や MEF を親株とする相同組換えや非相同末端結合の欠損株を用いて、生存率を指標とした放射線感受性の解析を行っていた。それによれば、非相同末端結合の欠損株では X 線と重粒子線とで放射線感受性に大きな差がなく、重粒子線照射後は非相同末端結合が抑制されることが示唆されていた。また、重粒子線による損傷は DNA 二本鎖切断の修復過程で片方の DNA 鎖の削り込み反応が起こりやすいことが報告されており、S/G2 期では X 線に比べて相同組換えの寄与が大きくなることが報告されていた。一方、この削り込み反応は G1 期でも起こるが、G1 期においては相同組換えは起こらないので、削り込み反応に引き続いて代替的非相同末端結合、一本鎖アニーリングにより修復される可能性が指摘されていた。しかし、実際にこれらの反応の関与を示す具体的なデータは報告されていなかった。

生体内の大部分の細胞や、がん細胞の中でも増殖の遅いがん幹細胞の多くは増殖を停止した静止期の状態にあり、相同組換えは機能しない状態にある。相同組換え以外の 3 つの経路のうち、代替的非相同末端結合と一本鎖アニーリングはいずれも末端の損傷部位を取り除いた後に、末端付近の短い相補的配列を利用して修復する方法であり、非相同末端結合に比べて長い領域にわたる切断末端の塩基欠失を伴うことが多く、転座などの染色体異常も引き起こしやすいと考えられている。しかし、静止期の細胞における重粒子線照射後の DNA 二本鎖切断修復反応や、その結果引き起こされる染色体異常や突然変異のリスクについてはほとんど解析されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、静止期の哺乳類細胞における重粒子線照射後の DNA 二本鎖切断の修復機構や、重粒子線照射の二次発がんリスクを分子レベルで解明することを目的とした。生体内の大部分の細胞は静止期にあり、がん細胞の周辺組織やその手前にある重粒子線が通過する部位に存在する静止期の細胞が重粒子線に対してどのように応答するのか(修復できない DNA 損傷が生じて細胞死や細胞老化が引き起こされるのか、あるいは、修復の結果、染色体異常や突然変異が生じて将来的な発がんにつながるのか)は、二次発がんのリスクを評価するうえで重要である。また、がん幹細胞の多くは静止期に存在しているため、放射線治療や抗がん剤の効果が小さく、根治的な治療を困難にしている。静止期の細胞における DNA 修復機構を明らかにし、その感受性を高めることができればより効果的な治療が期待できると考えた。

本研究では(1)静止期の細胞における重粒子線照射後の DNA 二本鎖切断の修復反応に、非相同末端結合、代替的非相同末端結合、一本鎖アニーリングの各反応が関与しているのか明らかにし、対数増殖期の細胞の修復機構との差異について解析すること、(2)静止期の細胞に重粒子線を照射した後の染色体異常の誘発率や突然変異率を明らかにすることの二点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA 二本鎖切断の修復機構の解析

DNA 修復に関わるタンパク質の蛍光抗体法による可視化解析

ヒトのがん細胞や不死化した細胞では、DNA 修復タンパク質を欠損している場合や、静止期への同調が困難な場合も多いので、本研究では主にヒト正常繊維芽細胞(NB1RGB 細胞)を用いて静止期の解析を行った。細胞を血清飢餓により静止期に同調した後に重粒子線で照射し、経時的に細胞を固定して、各修復反応に特異的なタンパク質(DNA-PK、polymerase、Rad52 など)や、各修復反応の選択に関与するタンパク質(53BP1、Rif1、CtIP など)の局在を蛍光抗体法により染色した。同時に、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、修復効率を評価するとともに、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。

さらに各修復経路の阻害剤で処理したり、siRNA 処理により特異的な修復タンパク質をノックアウトした後に重粒子線を照射して同様に解析し、DNA 修復の効率が影響を受けるかをリン酸化型ヒストン H2AX を蛍光抗体法で検出することにより評価した。また、重粒子線のエネルギー(線エネルギー付与:LET)を変化させて同様の実験を行い、DNA 損傷の重篤度と修復反応の関連を調べた。

DNA 修復に関わるタンパク質の生化学的解析

重粒子線照射後、界面活性剤処理により細胞を可溶化し、修復タンパク質が DNA 上に結合した状態でクロマチン画分を得る系を確立した。そして画分中に含まれる修復タンパク質や翻訳後

修飾をウエスタンブロットにより解析することにより、どの修復経路が機能しているか推測した。また、重粒子線の LET を変化させて同様の実験を行い、DNA 損傷の重篤度と修復反応の関連を調べた。

(2) 修復反応におけるリスクの評価

染色体異常の解析

静止期と対数増殖期のヒト正常繊維芽細胞に重粒子線や X 線を照射し、修復のための時間をおいた後に、未成熟染色体凝縮法を用いて染色体異常(二動原体染色体、環状染色体、無動原体断片)の発生頻度を比較することを試みた。

突然変異の解析

非相同末端結合に比べて代替的非相同末端結合や一本鎖アニーリングではより長い欠失が起こることが多いので、これらの反応が働くと突然変異率が高くなると予想された。そこで、静止期の細胞に重粒子線や X 線を照射した後、修復のための十分な時間をおいてから血清添加により対数増殖期に導入し、6-チオグアニン耐性を指標にして X 染色体上にあるヒポキサンチングアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子の突然変異率を測定し、対数増殖期の突然変異率と比較することを試みた。また、修復のための時間をおいた後に、増殖期に導入して生存率をコロニー形成法により調べ、修復経路の阻害剤が放射線感受性に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) DNA 二本鎖切断修復機構の解析

DNA 修復に関わるタンパク質の蛍光抗体法による可視化解析

NB 1 RGB 細胞を血清飢餓により静止期に同調し、非相同末端結合に関与する DNA-PK の阻害剤 (NU7441) 代替的非相同末端結合に必要な PARP の阻害剤 (Olaparib)、一本鎖アニーリングに関与する Rad52 の阻害剤 (6-OH-DOPA) で処理した後に 2Gy の重粒子線 (LET = 80-300 keV/μm) で照射し、リン酸化型ヒストン H2AX のフォーカス数の経時的变化を蛍光抗体法により調べた。DNA-PK 阻害剤処理では照射直後に生じた DNA 二本鎖切断のほとんどが 24 時間後にも修復されずに残ったのに対して、PARP 阻害剤や Rad52 阻害剤は修復効率に大きな影響を与えなかった。また、静止期の細胞においてはリン酸化型ヒストン H2AX とリン酸化型 DNA-PK、53BP1、Rif1 など非相同末端結合に関わるタンパク質との共局在が観察されたが、削り込み反応に関わる CtIP との共局在は見られなかった。さらに siRNA により非相同末端結合に関与する 53BP1 をノックダウンした場合は修復効率が 60%程度低下したのに対して、二本鎖切断末端の削り込み関与する CtIP をノックダウンした場合は修復効率は 20%程度しか低下しなかった。以上の結果から、静止期における主要な修復経路は非相同末端結合であると考えられた。

一方、対数増殖期の細胞を用いて同様の実験を行ったところ、X 線では DNA-PK 阻害剤、相同組換えに関与する Rad51 の阻害剤処理で修復速度はいずれも 2 倍程度遅くなった。それに対して重粒子線照射では Rad51 阻害剤は大きな影響は無かったが、DNA-PK 阻害剤処理により修復速度は大幅に遅くなり、LET が高くなるほど DNA-PK 阻害剤の効果が大きくなった。したがって、対数増殖期の場合も重粒子線照射後の主要な修復経路は非相同末端結合であると考えられる。また、X 線照射の場合は、非相同末端結合と相同組換えは互いに相補できるが、重粒子線では相同組換えが非相同末端結合を相補できないことが判明した。

これまでの報告から、重粒子線照射後の S/G2 期の細胞では X 線照射に比べて相同組換えで修復される割合が高いことが報告されている。S/G2 期の細胞でリン酸化型ヒストン H2AX と Rad51 の共局在を調べたところ、重粒子線では X 線に比べて共局在する Rad51 の割合が高くなっていったが、LET が高くなるほどリン酸化型ヒストン H2AX と Rad51 フォーカスの解消は遅くなり 300 keV/μm ではほとんどフォーカスは解消しなかった。すなわち、LET が高くなると相同組換え反応へ進みやすくなるが、反応は効率よく進行しないことが示唆された。これは、前述の阻害剤の解析で得られた相同組換えが非相同末端結合を相補できないという結果とも一致する。

DNA 修復に関わるタンパク質の生化学的解析

細胞に X 線あるいは重粒子線を照射した後に、界面活性剤処理によりクロマチン結合画分を得て、DNA 損傷に応じてクロマチン上にリクルートされてくる修復タンパク質をウエスタンブロットにより解析する系を確立した。静止期、対数増殖期いずれの細胞でも、X 線や重粒子線で照射した後の非相同末端結合の活性化の指標となる DNA-PK のリン酸化は、線量に比例して増加し、線量に応じて非相同末端結合が機能していることが示唆された。一方、静止期の細胞中では削り込み反応に関わる Mre11、代替的非相同末端結合に関わる DNA ポリメラーゼ のタンパク質の発現レベルが対数増殖期の細胞に比べて著しく低下しており、一本鎖アニーリングや代替的非相同末端結合が起こりにくくなっていることが判明した。

また、対数増殖期の細胞では、相同組換えの指標となる Rad51 タンパク質のクロマチン結合量は、X 線照射の場合は 15Gy までは線量に依存して増加したが、30Gy を超えると逆に減少し、高

い線量では効率的にクロマチンに結合していないことが示された。重粒子線の場合は、5Gy までは増加したが 15Gy 以上で減少し、より低い線量で減少に転じていることが示された。これらの結果は、修復経路の選択が線量にも依存していることを示唆している。一方、G1 期に同調した細胞に重粒子線を照射し、クロマチンを精製して損傷依存的に結合するタンパク質をウエスタンブロットにより解析したところ、一本鎖アニーリングに関与する Rad52 のクロマチン結合量が線量に依存して増加した。静止期、G1 期はいずれも姉妹染色体が存在しないが、細胞内に存在する修復タンパク質の発現レベルには大きな違いがあり、G1 期の場合は非相同末端結合以外の修復経路も機能している可能性がある等、その修復様式には差異があることが示唆された。

(2) 静止期の細胞における重粒子線のリスク評価

当初、静止期の細胞に重粒子線を照射した後に未成熟染色体凝縮法を用いて染色体異常を解析する予定であったが、静止期の細胞から染色体凝縮を導くのは困難であることが判明した。また、6-チオグアニン耐性を指標にしてヒポキサンチン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子の突然変異率を調べようとしたが、NB 1 RGB 細胞は HeLa 細胞や CHO 細胞と異なり 6-チオグアニン処理により増殖が停止するものの死滅しなかったために、耐性株を選択することができず、突然変異率を測定することは困難であった。

そこで、重粒子線照射後に修復の時間(1 - 7日)を与えたのちに増殖期に導入してコロニー形成法により生存率をしらべたところ、増殖期に移行した NB 1 RGB 細胞ではリン酸化型ヒストン H2AX のフォーカスは観察されず修復が完了しており、生存率は非照射の細胞と差がなかった。また、修復が完了していない細胞はチェックポイントが機能して p21 や p53 が発現しており、増殖サイクルに入れないことが判明した。一方、HeLa 細胞では重粒子線照射後、リン酸化型ヒストン H2AX のフォーカスが 5-7 個程度存在した状態のまま分裂期に入り、数回の分裂後には集団中で微小核を有する細胞の割合が数%から 60%に上昇していた。従って、チェックポイントコントロールが機能している正常な細胞においては重粒子線の損傷が修復されないと増殖は停止するのでがん化のリスクは低いと考えられた。しかし、がん幹細胞や前がん状態の細胞の様に染色体の不安定性を引き起こすような遺伝的なバックグラウンドのある細胞においては、修復が不完全なまま増殖サイクルに入り細胞の悪性化が引き起こされる可能性があると考えられる。

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 M. Izumi and T. Abe	4. 巻 55
2. 論文標題 Recruitment of Rad51 onto chromatin is suppressed by high dose irradiation of heavy-ions in mammalian cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RIKEN Accel. Prog. Rep.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 M. Izumi and T. Abe	4. 巻 54
2. 論文標題 Kinetics of Rad51 foci in G2 phase after heavy-ion irradiation in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RIKEN Accel. Prog. Rep.	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 M. Izumi and T. Abe	4. 巻 53
2. 論文標題 Non-homologous end-joining is the major repair pathway for DNA double strand breaks in human fibroblast after heavy-ion irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RIKEN Accel. Prog. Rep.	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 T. Ikeda, M. Sakai, K. Takemoto, A. Shibata, M. Izumi, and M. Uesaka	4. 巻 53
2. 論文標題 Ion microbeam irradiation to damage DNA in RPE cell nucleus with tapered glass capillary optics at Pelletron facility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RIKEN Accel. Prog. Rep.	6. 最初と最後の頁 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Izumi, M. and Abe, T.	4. 巻 52
2. 論文標題 The inhibitor of DNA-PK suppressed DNA repair after heavy-ion irradiation in quiescent mammalian cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RIKEN Accel. Prog. Rep.	6. 最初と最後の頁 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 泉 雅子、阿部知子
2. 発表標題 重粒子線により誘発されるDNA二本鎖切断の修復機構の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomita, M., Tsukada, T., and Izumi, M.
2. 発表標題 Bystander cell killing effects induced by low-fluences of high-LET radiations
3. 学会等名 the 64th Annual Radiation Research Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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

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
---------	---------