

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11653

研究課題名（和文）非侵襲生体イメージング法による生体内修復機構の解明：次世代DSBセンサーマウス

研究課題名（英文）Analysis of repair mechanisms by imaging methods in vivo: Next-generation DSB sensor mice

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・量子医科学研究所 重粒子線治療研究部・上席研究員

研究者番号：70280740

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）：DNA二本鎖切断（DSB）損傷は、生体内で最も深刻なDNA損傷であり、修復できなければ細胞死や細胞老化を引き起こし、正しく修復されなければ突然変異や発がんを引き起こす可能性がある。培養細胞を用いた解析結果から、哺乳類細胞では主に非相同末端結合（NHEJ）と相同組換え（HR）の2つのメカニズムによってDSBが修復されると考えられている。一方、生体内での修復反応に関する情報はほとんどない。これまでに私達はNHEJ機構を生体皮膚で検出するためのDSBセンサーマウスの開発に成功した。本研究では生体内での修復機構を理解するために新たなマウス作成のための研究を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA二本鎖切断損傷(DSB)は電離放射線や化学物質などの要因ばかりでなく細胞内の生理的な代謝によっても誘導される。哺乳類の細胞では、DSBは、主に、非相同末端結合と相同組換え機構により修復するとされているが、損傷直後から始まるDNA修復を体内で解析することは技術的に難しかった。本研究の成果をもとに、生体内で損傷直後から始まる分子機構をリアルタイムに解析することによって、未知のDNA修復に関わる生理的意義が解明されることが期待される。また、DSB機構で働く修復遺伝子の変異を原因とする遺伝病やゲノムの不安定化などに起因するがんなどの病態解明や予防医学的な研究に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：DNA double-strand break (DSB) damage is the most serious DNA damage, causing cell death and cellular senescence if not repaired, and potentially causing mutations and carcinogenesis if not repaired correctly. Based on analyses using cultured cells, it is thought that DSBs are repaired in mammalian cells mainly by two mechanisms: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). On the other hand, little information is available on the DNA repair response in vivo. In this study, we proceeded to create a new mouse model to understand repair in vivo.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：Ku70 DSB XLF NHEJ Live cell imaging

1. 研究開始当初の背景

放射線で誘発された DNA 二本鎖切断 (DSB) 損傷は、生体内で最も深刻な DNA 損傷であり、修復できなければ細胞死や細胞老化を引き起こし、正しく修復されなければ突然変異や発がんなどの疾患を引き起こす可能性があると考えられている。実際、DSB 損傷を修復する XLF、XRCC4、DNA-PKcs などのタンパク質をコードする修復遺伝子や DSB 応答機構で働く ATM や NBS1 などのタンパク質をコードする遺伝子を責任遺伝子とする放射線高感受性や免疫不全、脳神経系の異常などの症状を呈する遺伝性の疾患やゲノム不安定化と高発がん性を特徴に持つ遺伝病などが報告されている。また、多くの臨床由来のがん細胞からはこれらの DSB 修復機構や DSB 応答機構で働く遺伝子に変異が見つかった。DSB 修復機構は電離放射線や環境中の化学物質、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主に非相同末端結合 (NHEJ) 機構と相同組換え (HR) 機構により修復されると考えられている。NHEJ 機構では Ku70、Ku80、DNA-PKcs、XLF、XRCC4、Artemis、DNA Ligase VI などのタンパク質が働き、HR 機構では Rad51、Rad54、BRCA1、MRN 複合体などのタンパク質が働くとされている。ニワトリ由来の DT40 細胞などの培養細胞を用いた解析から、ゲノムの安定性維持には細胞周期依存的な 2 つの経路 (NHEJ と HR) の選択が重要とされているが 2 つの経路が必要な理由は明らかになってはいない。一方、生体内では同じ細胞周期にある同一の組織幹細胞でも年齢や組織に依存して DNA 修復能が異なるので生体内ではより複雑な調節を受けていると予測されるが、損傷直後から始まる修復過程を生体内で検出する方法は開発されていない。これまでに培養細胞を用いたライブセルイメージング法による解析結果などから、哺乳類細胞では主に非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) の 2 つのメカニズムによって DSB が修復されると考えられてきた。その一方で、損傷直後から始まる DNA 修復を生体内で解析することは技術的に困難だったことから、生体内での DSB 損傷後の修復メカニズムや DSB 修復機構の選択メカニズムなどに関する情報はほとんど報告されていない。最近、私達は NHEJ 機構を生体内で検出するための DSB センサーマウスを作出した。一方、放射線感受性の細胞周期依存性などの各種依存性と DNA 修復経路との関係を生体内で解析するためには新たなマウスを開発する必要がある。さらに、それらのマウスの生体内で損傷直後から開始する DNA 修復の分子機構をイメージングするためには、実験システムの構築が必要である。

2. 研究の目的

DNA 二本鎖切断 (DSB) 損傷は、生体内で最も深刻な DNA 損傷であり、修復できなければ細胞死や細胞老化を引き起こし、正しく修復されなければ突然変異や発がんを引き起こす可能性がある。培養細胞を用いた解析結果から、哺乳類細胞では主に非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) の 2 つのメカニズムによって DSB が修復されると考えられている。一方、生体内での修復反応に関する情報はほとんどない。これまでに私達は NHEJ 機構を生体皮膚で検出するための DSB センサーマウスの開発に成功した。本研究では、放射線感受性の細胞周期依存性などの各種依存性と細胞内の 2 つの DSB 修復機構との関係を生体内で解析し理解するために、新たなマウス作成のための研究を進める。

3. 研究の方法

本研究は、以下のように進めた。

(1) DSB センサーマウス作出のための基礎実験:

a. GFP 融合マウス Rad54 (GFP-Rad54) を発現するマウス作出の検討:

(a-1) 発現ベクターの構築: 公開されている遺伝子配列情報を参考にして相同組換え (HR) 機構で働くマウス Rad54 タンパク質をコードする遺伝子を人工合成した。マウス生体内の外来性 Rad54 を非侵襲で時間空間的に解析するためのセンサーとして GFP を選択し、GFP 遺伝子にフレームを合わせて Rad54 遺伝子を連結した発現ベクターを構築した。

(a-2) マウス培養細胞への遺伝子導入と発現解析: 構築した発現ベクターからマウス Rad54 が発現することを確認するために、リポフェクション法でマウス培養細胞に導入した。マウス培養細胞での発現解析は、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) ノックアウトマウスの作出: ノックアウトマウスの作出はマウス胚を材料に CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法等で行った。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。作出したゲノム編集マウスを系統化するために、交配し、子孫を得た。同様の方法で子孫に遺伝することを確認した。一部のゲノム編集マウス由来の精子は、過排卵処理した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。

(2) 損傷直後から始まる DNA 修復の分子機構をマウスの生体内でイメージングする実験システムの高度化: 既に開発し凍結保存してある DSB センサーマウスの受精卵を仮親マウスに受精卵移植し、産子を得た。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用いて皮膚から簡易精製したゲノム DNA を材料に PCR 法により行った。続いて、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を高度化するための実験を行った。マウス皮膚組織内部の細胞への DNA 損傷の誘導はマイクロレーザー照射により行った。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。

(3) マウスの腸と皮膚における DSB 修復蛋白質の発現解析 : DSB 修復能は修復蛋白質の発現量により調節されている可能性がある。生体解析のための基礎情報を得るために、マウス腸と皮膚における修復蛋白質の発現を調べた。ウエスタン法で特異性が高い可能性が示された NHEJ 修復タンパク質 (Ku70, Ku80, XLF など) と HR 修復タンパク質 (Rad51 と Rad54) の特異抗体を用いて、マウス細胞を材料に免疫細胞染色を行い蛍光顕微鏡法で観察した。次に、特異性が高い抗体と増殖マーカー (Ki-67) を使用して腸と皮膚での発現を一般的な免疫化学組織染色法で解析した。

4. 研究成果

(1) 生体内で DSB 修復機構を解析するための新たなマウス (GFP-Rad54 発現マウス) の作出を行うために、予備的な実験を進めた。GFP-Rad54 発現ベクターをマウス培養細胞株に導入したところ、GFP-Rad54 は細胞核に局在した。しかし、GFP-XLF 発現ベクターなどに比較してその発現量は低く、また、陽性を示す細胞は非常に少なく、細胞分裂を阻害する傾向が見られた。次に、Rad54 に対する特異抗体を使用して、マウス培養細胞株に対する蛍光細胞染色を行った結果、細胞核が陽性になったけれども、Ku70 や Ku80 などの NHEJ 機構で働くタンパク質に比較してその発現量が少なかった。これらの結果は、本研究で使用する検出システムを使用して生体内における DSB 損傷後の挙動を追跡するには、Rad54 は不適である可能性を強く示唆する。他方、腸からの初代培養細胞あるいはそれを株化した細胞株を材料に条件検索を進める予定であったが、培養系の確立ができなかった。

(2) NHEJ 機構を生体皮膚で検出するための DSB センサーマウス (GFP-XLF 発現マウス (図 1)) を使用して、損傷直後の細胞内で生じた DSB を検出する解析システムを高度化するための予備実験を進めた。その結果、以前の結果と同様に、GFP-XLF は皮膚上皮ケラチノサイトの細胞核に局在することが確認できた (図 1)。しかし、興味深いことに、極一部の細胞では主に細胞質に局在していた。これは、細胞形態から推定すると細胞周期の違いというよりは分化レベルの違いによる可能性があると考えている。今後、分化マーカーなどを使用した詳細な解析が必要である。次に、DSB 損傷後の GFP-XLF の挙動を解析したところ、DSB に集積することが確認できた (図 2)。本実験で使用したマウスは遺伝子導入して発現させている GFP-XLF に加えて、内在する XLF を発現している。そのため、DSB への集積や NHEJ 修復の過程で、観察している GFP-XLF が共存する内在性の XLF と競合している可能性がある。そのことを示唆する可能性がある結果が得られたので、その可能性を除外するために、XLF を欠損するマウスに GFP-XLF を発現させるための XLF ノックアウトマウスの作成を CRISPER/Cas9 法を使用して試みた。しかしながら、目的の個体を得ることはできなかった。一方、DSB 修復に必要な遺伝子を欠損する 2 重変異マウスの作出はできた (図 3)。今後、このマウスを利用して解析を進める予定である。ところで、細胞内の GFP を検出する実験を進めている際に、波長の影響を考慮する必要性を示唆する結果が得られたので、モデル細胞を使用して解析を進めている。

(3) マウスの腸と皮膚における DSB 修復蛋白質の発現解析 : DSB 修復能は修復蛋白質の発現量により調節されている可能性がある。生体解析のための基礎情報を得るために、マウスの腸と皮膚における修復蛋白質の発現を調べた結果、NHEJ で機能するタンパク質は皮膚の基底層にある上皮細胞の核に発現していた。また、腸の腺底部の細胞の核に強く発現していることが示唆された。興味深いことに、培養細胞での結果と必ずしも一致しない可能性があることが示唆されたので、今後、更に詳細な解析をする予定である (図 4)。

上述したように、DNA 二本鎖切断 (DSB) 損傷は、生体内で最も深刻な DNA 損傷であり、修復できなければ細胞死や細胞老化を引き起こし、正しく修復されなければ突然変異や発がんを引き起こす可能性があると考えられている。これまでに培養細胞を用いたライブセルイメージング法による解析結果などから、哺乳類細胞では主に非同源末端接合 (NHEJ) と相同組換え (HR) の 2 つのメカニズムによって DSB が修復されると考えられてきた。その一方で、損傷直後から始まる

DNA 修復を体内で解析することは技術的に困難なことから、生体内での DSB 修復機構やその選択メカニズムなどに関する情報はほとんど報告されていない。これまでに私達は NHEJ 機構を生体皮膚で検出するための DSB センサーマウスの開発に成功した。本研究では生体内での修復を理解するために新たなマウス作成のための研究を進めた。本研究の成果をもとに、これまで解析できなかった損傷直後から始まる分子機構を生体内でリアルタイムに解析することによって、未知の DNA 修復に関わる生理的意義が解明されることが期待される。また、新たな動物モデルや観察システムは DSB 機構で働く修復遺伝子の変異を原因とする遺伝病やゲノムの不安定化などに起因するがんなどの病態解明や予防医学的な研究に役立つ可能性があるかと期待している。

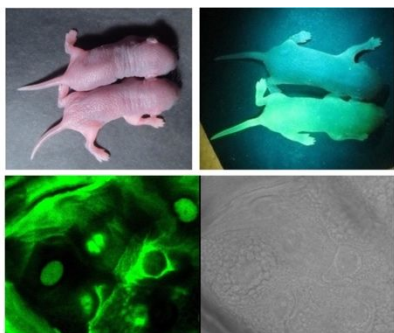


図1 DSBセンサーマウス
(左上) マウス; (右上) マウスの蛍光像
(左下) 皮膚内部蛍光像; (右下) 皮膚内部組織像

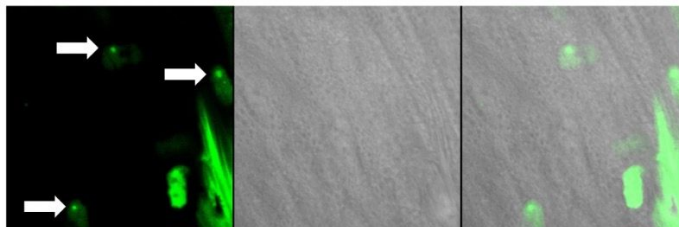


図2 マウス皮膚組織で検出したDSBs像 (矢印)
(左) 皮膚内部蛍光像
(中) 皮膚内部組織像
(右) 左と中のマージ図

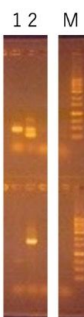


図3 DSBセンサーマウスのゲノム
PCR解析の例
1) 野生型マウス; 2) 2重変異マウス;
M) マーカー

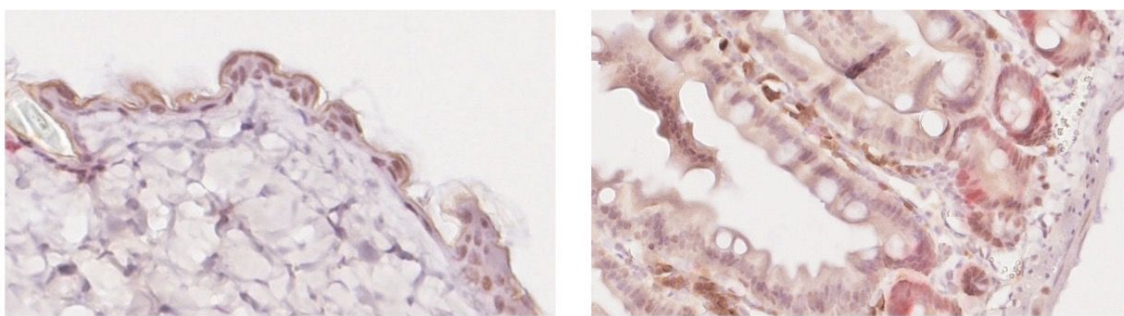


図4 マウスの皮膚 (左) と腸 (右) の免疫組織化学染色像

実験開始当初には予測できなかった研究代表者の入通院や所属機関の 2 度のリストラ、外部実験動物販売施設からのコンタミなどに加えて、新型コロナウイルス感染症への対応(在宅勤務やマウスの飼育制限など)のために、長らく断続的に動物実験ばかりでなく動物の開発や飼育が実施できない状況になった。関連して、外部施設からのマウスの導入や購入が停止したこと、さらに、必要不可欠な研究消耗品の欠品や高騰などは本研究課題の遂行に大きな影響を与えた。他方、隣接都県を含む移動制限や学会が開催されなかったことなどから、外部研究者から技術的な御指導を受ける機会が失われた。そのような制限のある中、本研究を進めるにあたって、研究代表者所属の国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構千葉地区の動物管理施設やエックス線照射施設の管理運営、実験動物開発等に関わる研究員や技術員、支援員の皆様など様々な方々に、適切な助言や技術支援をはじめ多大なる御協力を頂きました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 生田統悟、神田浩明、小池亜紀、小池学
2. 発表標題 組織特異的DNA修復経路欠損マウスの開発-腸管上皮特異的Ku70欠損マウス
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------