

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12248

研究課題名(和文)細胞及び腫瘍に生じるクラスター損傷の可視化と修復機構の解明

研究課題名(英文) Visualization of cluster damage in cells and tumors and elucidation of repair mechanisms

研究代表者

中野 敏彰 (Toshiaki, Nakano)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・主幹研究員

研究者番号：10526122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線が誘発するDNAの局所的な多重損傷部位(クラスター損傷)は、放射線の生物学的影響と密接に関係していると考えられている。しかしながらこれまでクラスター損傷を解析する方法がなかった。そこで我々はDNA損傷にラベルをすることでDNA損傷位置を原子間力顕微鏡(AFM)で可視化可能なサイズにしAFMによるDNA損傷の観察および解析を可能にした。この手法を用いて、電離放射線を照射したTK6細胞から抽出したゲノムDNA中に生じる個々の種類のDNA損傷の生成量及び修復速度を計測することで、個々のDNA損傷の修復機構を明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、鎖切断を伴わないクラスターDNA損傷(シンプルクラスター損傷や高密度クラスター損傷)は効率的に修復される一方で、DSBを伴う高複雑度DSB(DSB+塩基)は特に高LETの鉄イオン照射後に長期間生体内に存在し続けることを明らかにした。これにより、クラスターDNA損傷の定量と修復効率の評価が可能となり、電離放射線の生物学的影響を理解する上で極めて重要な知見が得られた。本研究は、放射線治療や化学療法による腫瘍治療、および正常細胞の発がんリスクに関連するクラスター損傷の生物学的影響を評価する上で重要な進展をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Radiation-induced localized multiple damage sites in DNA, known as clustered DNA damage, are believed to be closely related to the biological effects of radiation. However, there has been no established method for analyzing clustered damage until now. In response, we developed a technique to label DNA damage sites, making them visible at a size detectable by atomic force microscopy (AFM). This advancement allows for the analysis of these sites using AFM. By applying this method, we were able to measure the production and repair rates of various types of DNA damage in the genomic DNA extracted from irradiated TK6 cells. Consequently, we successfully elucidated the repair mechanisms for individual types of DNA damage.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷 cluster DNA damage irradiation

1. 研究開始当初の背景

放射線はその飛跡に沿って分子を電離し、これにより照射された細胞内では飛跡と重なる DNA 部位に高密度な損傷（クラスター損傷）が生じると考えられている。しかし、この高密度損傷の存在を実験的に実証した研究はこれまで存在しなかった。申請者はこれまでに、原子間力顕微鏡（AFM）を用いてクラスター損傷を個別に可視化・検出する方法を確立し、放射線照射によってプラスミド DNA に生じた損傷の解析を行ってきた。その結果、線エネルギー付与（LET）の増加に伴い、クラスター損傷を伴う損傷が増加することが明らかとなった。その後、さらにこの技術を発展させ、AFM による DNA 損傷の可視化分析技術を簡素化しつつ正確さを向上させ、放射線照射された細胞や腫瘍中の DNA でもクラスター損傷や DSB 末端に塩基損傷を含む新たな DNA 損傷の観察を可能にした。この技術を用いることで、損傷ごとの修復速度や修復欠損細胞での修復機構の解明、及び個々の DNA 損傷が生物に及ぼす影響を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

放射線は飛跡に沿って分子を電離することから、照射された細胞では、飛跡と重なる DNA 部位に高密度な損傷（クラスター損傷）が生じると考えられている。しかし、実験的に高密度損傷の存在を実証した研究はなかった。そこで申請者はこれまでに、原子間力顕微鏡（AFM）を用いクラスター損傷を個別に可視化・検出する方法を確立し、放射線を照射したプラスミドに生じた損傷の解析を行い、線エネルギー付与（LET）の増加によりクラスター損傷を伴う損傷が増加している事を明らかにした。本研究では、さらに系を発展させ、AFM による DNA 損傷の可視化分析技術を観察方法の簡素化及び正確さの点で大きく展開し、放射線を照射した細胞や腫瘍中の DNA でも検討する方法を確立し、細胞や腫瘍中に生じた塩基損傷、クラスター損傷、DSB 末端に塩基損傷を含む新たな DNA 損傷の観察を可能にする。これにより放射線による高密度損傷の存在を実証し、その修復速度および修復欠損細胞での修復機構を解明することを目的とした。さらに、個々の DNA 損傷が生物に及ぼす影響を明らかにすることで、放射線損傷の生物学的影響に関する新たな知見を提供する。

3. 研究の方法

DNA 損傷部位に特異的に結合するビオチン化プローブを使用し、これにアビジンを結合させた後、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて可視化・解析する方法を確立した。この方法により、試験管内でのプラスミド DNA 照射によってクラスター DNA 損傷が生成されることを示した【図 1】。次に、細胞内での DNA 損傷解析においては、照射された細胞からゲノム DNA を単離し、数千塩基対 (bp) サイズに切断した後、損傷部位をビオチン/アビジン標識し、AFM で観察した。また、低線量の照射では損傷を含まない DNA 断片の割合が高く、損傷の観察が困難であるため、損傷を含む DNA を選択的に濃縮する方法を確立した。具体的には、ビオチン標識された損傷を含む DNA をストレプトアビジン磁気ビーズと結合させて精製し、損傷

のない DNA 断片を除去することで、損傷を持つ DNA 断片のみを選択的に回収した。この方法により、細胞内の DNA 損傷のタイプを分類し、線エネルギー付与 (LET) の異なる放射線によって生じる DNA 損傷誘発頻度の違いを調べ、各 DNA 損傷の修復速度を評価することが可能になった。

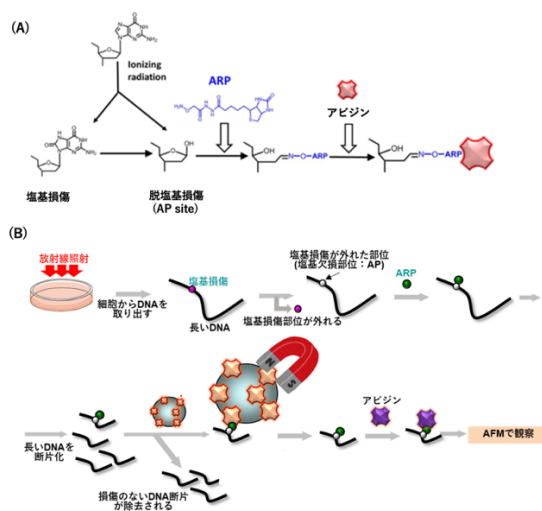


図 1. DNA 損傷可視化の解析方法

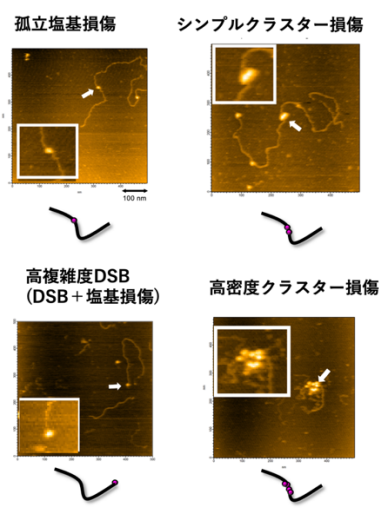


図 2. AFM により観察された様々な DNA 損傷

研究方法

(1) 放射線 (X 線、鉄イオン線) による DNA 損傷

TK6 培養細胞 (ヒトリンパ細胞) に対して、X 線および鉄イオン線をそれぞれ 0Gy、20Gy、40Gy、60Gy の線量で照射した。コントロールとして過酸化水素 0-1mM で 1 時間処理した (フェントン反応)。照射後、細胞から DNA を精製し、ビオチン標識したクラスター DNA 損傷を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。そして、損傷の頻度 (損傷/Mbp) およびクラスター DNA 損傷内の損傷数を解析した。

(2) 放射線によって生じた DNA 損傷の修復機構の解明

X 線および Fe イオンビーム (40Gy) を用いて細胞を照射し、照射後 0 時間、1 時間、6 時間、18 時間の各時間点で DNA を回収した。各時間点におけるクラスター DNA 損傷頻度 (損傷/Mbp) とクラスター DNA 損傷内の損傷数、さらに孤立損傷頻度 (損傷/Mbp) を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察し解析した。

4. 研究成果

(1) X 線、鉄イオンビーム、過酸化水素による損傷の定量

AFM 解析の結果、磁気ビーズにより精製された DNA 中には、以下の損傷が含まれていることが明らかとなった: 孤立塩基損傷、シンプルクラスター損傷 (塩基損傷を 2 つ含むクラスター)、高密度クラスター損傷 (塩基損傷を 3 つ以上含むクラスター)、および高複雑度 DSB (DSB+塩基損傷) 【図 2】。DNA 精製の回収率は約 30%であったため、これらの損傷を考慮して全体の DNA 量を算出した。定量結果を【図 3】に示す。X 線照射された TK6 細胞では、孤立塩基損傷、シンプルクラスター損傷、および高複雑度 DSB (DSB+塩基損傷) の割合がそれぞれ 83.5%、12.2%、5.3%となった。各 DNA 損傷の割合は、X 線照射量が増加しても

ほとんど変化しなかった。鉄イオンビーム照射では、孤立塩基損傷が 60.3%、シンプルクラスター損傷が 20.2%、高密度クラスター損傷が 4.8%、高複雑度 DSB が 5.3%であった。鉄イオンビームは、過酸化水素や X 線処理よりも多様なタイプのクラスター DNA 損傷を生成することがわかった。電離放射線 (X 線や鉄イオン線) は多くのクラスター DNA 損傷を生じる一方で、フェントン反応ではほとんどクラスター DNA 損傷が生じなかった。この結果は、電離放射線の生物効果を理解する上で、クラスター DNA 損傷の重要性を実験的に示す。孤立塩基損傷とクラスター DNA 損傷の比率は、鉄イオンビームでは 11.0 : 1.0、X 線では 2.1 : 1.0 であった。一方、鉄イオンビームは、低 LET の X 線よりも多くのクラスター DNA 損傷を生成することが明らかとなった。

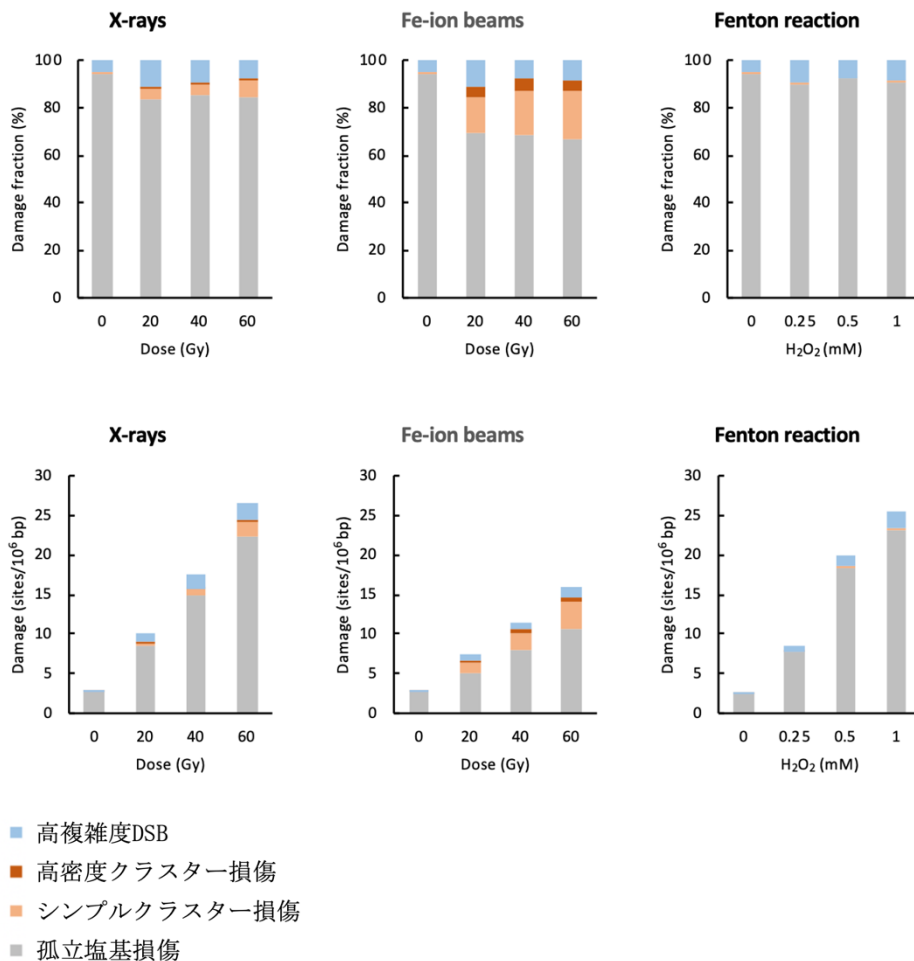


図 3. 各 DNA 損傷タイプの割合 (上) と DNA 損傷収量 (下)

(2) X 線と鉄イオンビームによる DNA 損傷の修復

電離放射線照射後、一定時間の培養を行い、生じた DNA 損傷の修復速度を観察した (図 4)。X 線 40Gy 照射後の DNA 損傷量を観察すると、1 時間後には孤立塩基損傷が修復され始め、6 時間後には損傷が 20%以下に減少した。照射後 18 時間では、わずかに孤立塩基損傷が残存するものの、損傷数は照射前とほぼ同等のレベルに戻った。一方で、クラスター DNA 損傷も孤立塩基損傷と同程度の速度で修復され、高複雑度 DSB も同様の割合で修復された。全てのタイプを含む DSB は、6 時間までに急速に修復が進行し、その後は緩やかな修復が続いた。一方、40Gy の鉄イオンビーム照射の場合、1 時間後には半数以上の孤立塩基損傷が修復され、6 時間後には 20%以下に減少した。同様に、シンプルクラスター損傷や高密度クラスター

一損傷も孤立塩基損傷と同程度の速度で修復された。高複雑度 DSB は 1 時間後にわずかに増加し、その後はゆっくりとした速度で修復が進んだ。これは修復途中での高複雑度 DSB の増加は、シンプルクラスター損傷や高密度クラスター損傷内の塩基損傷が塩基除去修復機構によって修復される際に生じる DNA 切断が DSB を引き起こしたためであると考えられる。鉄イオンビーム照射後 18 時間では、孤立塩基損傷とシンプルクラスター損傷、および高密度クラスター損傷の大半が修復されたが、高複雑度 DSB は約 50%が修復されなかった。

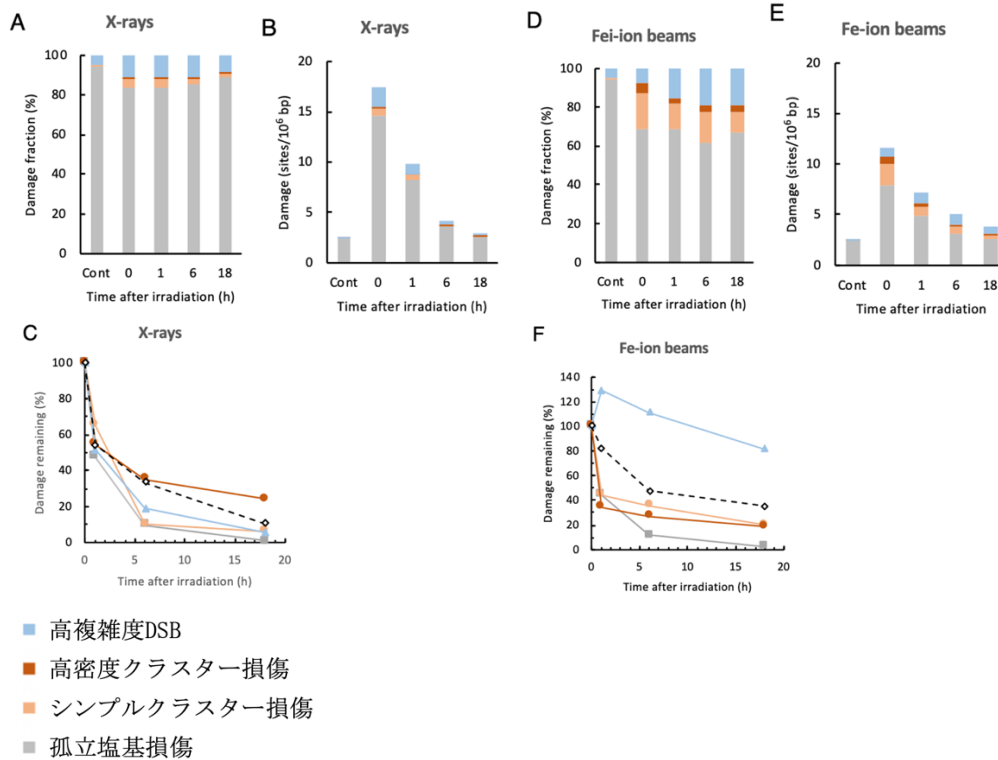


図 4. 各 DNA 損傷の修復速度の比較

まとめ

AFM を用いて、損傷した細胞内 DNA を選択的に濃縮し、生体内における DNA 損傷の種類別定量法を確立した。この方法を用いて解析した結果、X 線や鉄イオンビームなどの電離放射線が生体内で様々なタイプのクラスター DNA 損傷を引き起こすことが明らかになった。一方で、フェントン試薬による処理ではクラスター DNA 損傷はほとんど生じなかった。さらに、高 LET の鉄イオンビーム照射は X 線よりも頻繁にクラスター DNA 損傷を誘発するだけでなく、その複雑性も X 線より高くなることが明らかになった。また、鎖切断を伴わないクラスター DNA 損傷 (シンプルクラスター損傷や高密度クラスター損傷) は効率的に修復される一方で、DSB を伴う高複雑度 DSB (DSB+塩基) は特に高 LET の鉄イオン照射後に長期間生体内に存在し続けることが示された。クラスター DNA 損傷の定量を可能にし、修復効率を明らかにした本研究の結果は、電離放射線の生物学的影響を理解する上で極めて重要である。本研究により、放射線治療や化学療法による腫瘍治療、および正常細胞の発がんリスクに関連するクラスター損傷の生物学的影響を評価するための重要な進展がもたらされると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Yusuke, Takaku Yoshihide, Nakano Toshiaki, Akamatsu Ken, Inamura Dai, Nishizawa Seiichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Synthetic DNA binders for fluorescent sensing of thymine glycol-containing DNA duplexes and inhibition of endonuclease activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6088-6091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CC01501G	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 中野敏彰, 赤松憲, 鹿園直哉	4. 巻 116
2. 論文標題 放射線照射によって生じたDNA損傷の構造解析と修復速度	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 放射線化学	6. 最初と最後の頁 15-19
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Toshiaki, Moriwaki Takahito, Tsuda Masataka, Miyakawa Misa, Hanaichi Yuto, Sasanuma Hiroyuki, Hirota Kouji, Kawanishi Masanobu, Ide Hiroshi, Tano Keizo, Bessho Tadayoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 SPRTN and TDP1/TDP2 Independently Suppress 5-Aza-2 -deoxycytidine-Induced Genomic Instability in Human TK6 Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 2059-2067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.2c00213	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 Nakano Toshiaki, Akamatsu Ken, Tsuda Masataka, Tujimoto Ayane, Hirayama Ryoichi, Hiromoto Takeshi, Tamada Taro, Ide Hiroshi, Shikazono Naoya	4. 巻 119
2. 論文標題 Formation of clustered DNA damage in?vivo upon irradiation with ionizing radiation: Visualization and analysis with atomic force microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2119132119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2119132119	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9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野敏彰, 赤松憲, 鹿園直哉
2. 発表標題 放射線により生じる高複雑度のDNA損傷の可視化と修復機構の解明
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第66回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野敏彰, 赤松憲, 鹿園直哉
2. 発表標題 放射線照射によって生じるDNA損傷の構造解析と修復機構の解明
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野敏彰, 赤松憲, 鹿園直哉
2. 発表標題 放射線照射した細胞に生じるDNA損傷の分子レベルでの可視化と定量解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野敏彰, 赤松憲, 津田 雅貴, 井出 博, 鹿園 直哉
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた変異原物質や放射線で生じるDNA損傷の直接観察
3. 学会等名 第51回 日本環境変異原ゲノム学会（JEMS）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野敏彰, 赤松憲, 津田雅貴, 井出博, 鹿園直哉
2. 発表標題 電離放射線を照射したTK6細胞におけるゲノムDNAの原子間力顕微鏡(AFM)による直接可視化
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第65回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野敏彰, 赤松憲, 鹿園直哉
2. 発表標題 放射線照射した細胞に生じるDNA損傷の分子レベルでの可視化と解析
3. 学会等名 量子生命科学会 第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiaki Nakano, Ken Akamatsu, Naoya Shikazono
2. 発表標題 Direct visualization of isolated and clustered DNA damage using atomic force microscope (AFM) in TK6 cells exposed to ionizing radiation
3. 学会等名 Radiation Research Society's 68th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野敏彰, 赤松憲, 津田雅貴, 井出博, 平山亮一, 廣本武史, 玉田太郎, 鹿園直哉
2. 発表標題 放射線照射した細胞に生じるDNA損傷の可視化
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野敏彰 , 津田雅貴 , 森脇隆仁 , 笹沼博之 , 川西優喜 , 鹿園直哉 , 井出博 , 田野 恵三
2. 発表標題 azadCによって生じるDNMT1-DPC損傷の修復に関わるSPRTN経路とプロテオーム依存的な経路の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2021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