

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659587

研究課題名（和文） 53BP1 をターゲットとした DNA 損傷修復の可視化と癌治療戦略

研究課題名（英文） Imaging of DNA damage repair using 53BP1 protein and establishment of therapeutic strategy for cancer treatment.

研究代表者

栗政 明弘 (KURIMASA AKIHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80343276

研究成果の概要（和文）： DNA 損傷応答に関与する癌抑制因子 53BP1 は、DNA 二本鎖切断損傷(DSB)部位へと急速にリクルートされ、損傷フォーカスを形成する。53BP1 に変異を導入することで細胞内に安定的に発現できる GFP-53BP1 融合タンパク質を見出し、DNA 損傷を検出するバイオセンサーを開発した。さらに、共発現させた PCNA-DsRed の核内局在パターンにより細胞周期の移行を同定できるシステムを構築した。これら 2 つの蛍光タンパク質を発現する U2OS 細胞株(U2RDP-LE53-21)を用いることにより、異なる細胞周期で生じる DNA 損傷を生きた状態で観察することが可能となった。本研究では、通常培養と 3 つの DNA 損傷誘導薬剤を用いた場合においてライブセルイメージングを行い、細胞周期の違いにより損傷フォーカスがどのように誘導されるかを検証した。U2RDP-LE53-21 は細胞周期依存的な DNA 損傷の検出が可能であり、今後抗がん剤開発や放射線増感剤開発に役立つ可能性を示した。

研究成果の概要（英文）： Tumor suppressor p53 Binding Protein 1(53BP1) is recruited rapidly to sites of DNA double-strand breaks (DSBs) and participates in the cellular response to DNA damage. We exploited property of 53BP1 that accumulate in DSB sites and developed biosensor detecting DNA damage using the special form of 53BP1-GFP fusion protein that could express stably in the cell. Furthermore, we built a system that can identify the difference of cell cycle stage by intranuclear localization patterns of PCNA-DsRed. U2OS cell lines (U2RDP-LE53-21) expressing both these fluorescent fusion proteins make it possible to observe DSBs occurred in different cell cycle stage, these cells remain living. Here, we show how 53BP1 foci are observed in normal culturing conditions, and also how DSBs 53BP1 foci are induced by chemical agents such as Neocarzinostatine (NCS) or DNA Topoisomerase I inhibitor Camptothecin (CPT) that are well-known DSBs inducers. The number of 53BP1 foci was increased by these chemical agents and cell cycle distribution was prolonged compare to cells in normal culture condition. U2OS cell lines may be available for the screening chemotherapy drugs and radiosensitizers that induce DSBs in cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線腫瘍学、バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

がんは我が国の死因の第 1 位であり、加齢により発症リスクが高まり、高齢化社会

の進行にともない罹患者・死者数は今後とも増加していく。今後は化学療法、放射線療法により重きが置かれると考えられてい

る(厚生労働省:がん対策推進基本計画)。化学療法は、その副作用がたびたび問題となっているが、分子標的創薬により、副作用が少なく効果の高い新規の抗がん剤の開発が進められている。また放射線治療は、高齢者や再発例でも身体の機能を保ったまま、QOL(Quality of Life:生活の質)を損なうことなく治療が進められるという大きな利点がある。今後、化学療法を推し進めるための新薬開発の促進、また放射線治療をより効果的に行うための放射線増感療法剤の開発が求められている。

創薬に際して、いかに迅速に目的に沿った活性を有する候補薬剤を十分に選別するかが鍵を握っている。多くの候補薬剤があっても、副作用が無く、代謝の影響が少なくかつ効果が高い、最終的に市販に至る薬はほんのわずかしが得られない。そのため、候補薬剤を迅速に同定する試みはきわめて重要である。これまでにない新薬を開発するためには、これまでの手法を踏襲するのではなく、スクリーニングから新しい手法を導入する時代となってきている。雑多な状態の細胞をひとまとめにして解析するのでは、緻密な解析には応用できなくなっている。

本研究では、生きたままの状態での細胞内のDNA損傷を観察可能にする技術を用いて、創薬の初期の段階で低分子化合物ライブラリーをスクリーニングする細胞周期依存的DNA損傷検出バイオセンサーシステムの開発を目指している。細胞を固定して高価な抗体で染色する必要もなく、細胞の状態の変化を同時に観察できるなど、今までにない全く新しい検索が可能となっている。

生細胞の解析システムは、解析は複雑ではあるが、それを効率的に進める周辺技術を開発していけば、新規の抗がん剤開発の可能性が高まると期待されている。特に最近注目されるがん幹細胞は、細胞周期を逸脱し、休止期にある場合もあり、その状態で効果の高い抗がん活性をもつ薬剤を見つける必要がある。一方で、増殖期にあるがん細胞をターゲットにする抗がん剤もこれまで以上に必要となっている。細胞の細胞周期を生きた状態で判別しながら薬効評価ができることは、このような抗がん剤開発にきわめて重要で新しいシステムと考えられる。

2. 研究の目的

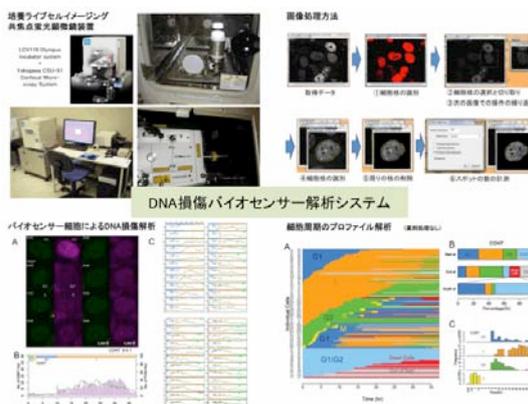
研究の目的は、生きた細胞において、薬剤により生じるDNA損傷と修復の過程と、細胞周期の変化観察し、DNA損傷と細胞周期の乱れを同時に検出し、精密に定量評価するシステムを構築することにある。これにより、種々の作用の異なる抗がん剤、あ

るいは多様な遺伝子変化を有するがん細胞において、細胞のダメージを引き起こすDNA損傷を分子レベルで解明・評価し、合成致死変異のメカニズムを明らかにすることを旨とし、新たなDNA損傷誘導薬剤の探索システムを開発していく。また、放射線類似の作用を示す薬剤や、放射線増感剤の薬効評価にも応用できるシステムを構築する。

3. 研究の方法

53BP1は、DNA2本鎖損傷部位に集積し、ヒストンH2AXのリン酸化に類似した局在を呈する。 γ -H2AXは固定した細胞をリン酸化特異的抗体で免疫染色する必要があるのに対して、GFP融合53BP1タンパク質を用いると生細胞にてDNA2本鎖切断損傷の検出が可能となる。このため、我々はGFP融合・改変53BP1タンパク質を発現する細胞を構築した。さらに、PCNA-DsRed融合タンパク質を共発現させ、PCNA-DsRedの核内局在パターンにより細胞周期の違いを同定できるシステムを構築した。これら2つの蛍光タンパク質を発現するU2OS細胞株(U2RDP-LE53-21)を用いることにより、異なる細胞周期で起こるDNA損傷を生きた状態で観察することが可能となった。共焦点レーザー顕微鏡を用いた単一DNA2本鎖切断損傷を誘導するシステムにより、生細胞での微細な損傷の挙動観察が可能となった。

一方、CO₂インキュベータと組み合わせた培養顕微鏡と、ニポードディスク高速共焦点顕微鏡により、退色をおさえた長時間のタイムラプス観察の検討を行った。本研究では、DNAの2本鎖切断損傷を引き起こすことが知られてい



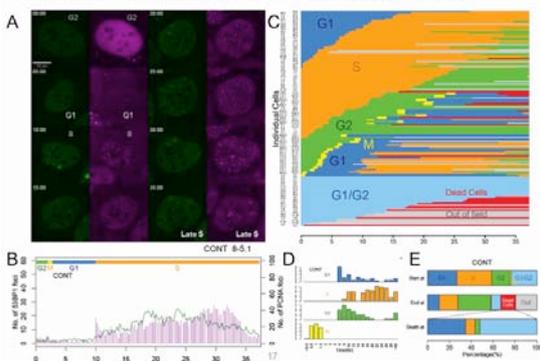
る抗がん剤を用いて、DNA損傷を生細胞で観察し、その損傷の形態と変化を観察し、その挙動を細胞周期の位置との関係を含めて明らかにしていく。本研究では、通常培養時をコントロールとし、DSBs誘導薬剤であるネオカルチノスタチン(NCS)、トポイソメラーゼI阻害剤であるカンプトテシン(CPT)、トポイソメラーゼII α とDNA-PKcsの阻害剤であるNK314の3つの薬剤を用いた場合においてライブセルイメージングを行い、細胞周期の違いにより

GFP-53BP1 foci がどのように誘導されるかを検証した。また、生細胞に生じた、単一の 2 本鎖切断に由来するであろう DNA 損傷 Foci の挙動を、新たに構築したソフトウェアを用いた画像解析により検討を行った。

4. 研究成果

オリンパス CO2 培養顕微鏡システムと横河電機高速共焦点顕微鏡を組み合わせた装置を用いて、タイムラプス撮影を 37 時間にわたり行い、生理的な培養条件下で細胞周期の観察が可能かを検討した。U2OS 細胞に DNA 2 本鎖切断損傷のフォーカス検出のための 53BP1-GFP と、細胞周期を同定するための PCNA-DsRed の 2 つの融合タンパク質を共発現させたものを用いている。これらにより、細胞周期の推移を同定しながら蛍光顕微鏡撮影を行い、損傷のフォーカスを検出した。

バイオセンサー細胞による DNA 損傷と細胞周期解析 (薬剤処理なし)



細胞周期に関しては、それぞれ G1、S、G2、M 期が延長する傾向は見られ、全体としての分裂時間も延長があるが、退色することなく M 期を除いた G1、S、G2 期から出発して周期を一巡する細胞を観察することができることが明らかとなっている。またこのとき生理的に生じる 53BP1 の Focus の存在も確認している。この条件で得られた生理的な条件下で、タイムラプス撮影開始後 3 時間後から DNA2 本鎖切断損傷 (DSBs) を引き起こす抗がん剤 Neocarzinostatin (NCS)あるいは Topoisomerase I 阻害剤である Camptothecin(CPT)を投与することにより、DNA 損傷 Focus 誘発とその挙動の違いを観察した。その結果、NCS に関しては細胞周期に依存せずに顕著な DNA 損傷フォーカスの観察が可能であった。一方 CPT では、G1、G2 期ではわずかながらではあるが Focus 形成が認められた。

一方、TopoisomeraseI が作用する S 期では Focus の形成がより顕著であった。さらに G1 期や G2 期で投与後ある程度時間が経過したのちに細胞がそれぞれ S 期、あるいは M、G1 期を経由して S 期に移行した際には、S 期移行とともに Focus の誘導が観察された。

このように、DNA 2 本鎖切断損傷の誘導薬剤の作用機序を反映した形での観察が可能と

なった。

DNA 損傷 Focus と細胞周期をタイムラプス観察することにより、抗がん剤の作用機序の解明に役立ち、これらは今後の新たな抗がん剤の開発のツールとなりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Tomimatsu N, Mukherjee B, Deland K, Kurimasa A, Bolderson E, Khanna KK, Burma S. Exo1 plays a major role in DNA end resection in humans and influences double-strand break repair and damage signaling decisions. *DNA Repair (Amst)*.2012 Apr 1; 11(4): 441-8. Epub 2012 Feb 11

[学会発表] (計 5 件)

(1) 栗政明弘、堀田絵理香、富松望、岩淵邦芳、David J. Chen U2OS細胞における DNA 2 本鎖切断損傷フォーカスのライブセルイメージングとその動態、第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011 年 10 月 3~5 日

(2) 堀田絵理香、岡田茜、宮野佳子、富松望、岩淵邦芳、David J. Chen、栗政明弘、U2OS 細胞における DNA 2 本鎖切断損傷フォーカスのライブセルイメージングとその動態、日本放射線影響学会、第 54 回大会、神戸：2011 年 11 月 17-19 日

(3) 堀田絵理香、宮野佳子、岡田茜、矢倉はるな、末岡榮三朗、栗政明弘、DNA 2 本鎖切断損傷ライブセルイメージングによるトポイソメラーゼ阻害剤の薬効評価、日本放射線影響学会、第 55 回大会、仙台：2012 年 9 月 6-8 日

(4) Hotta E, Okada A, Miyano Y, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ, Kurimasa A, Live cell imaging and kinetics of DNA double-strand breaks (DSBs) foci in cycling U2OS cells. The 14th International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW2012), Radisson Blu Hotel, Paschim Vihar, New Delhi, INDIA Feb. 7-11, 2012

(5) Hotta E, Miyano Y, Okada A, Yakura H, Sueoka E, Iwabuchi K, Kurimasa A, Live cell imaging of DNA double-strand breaks (DSBs) foci induced by topoisomerase inhibitors and evaluation of cell cycle progression. 28th RBC-NIRS International Symposium, Kyoto, Co-op Inn Kyoto, Nov. 29-30, 2012

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：DNA 二本鎖切断損傷の解析装置及び解析方法

発明者：栗政明弘、富田祐一郎、渡部勇哉

権利者：国立大学法人鳥取大学、(株) eBASE Solutions Laboratory

種類：特許

番号：特願 2011-146381

出願年月日：2011 年 6 月 30 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗政 明弘 (KURIMASA AKIHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：8 0 3 4 3 2 7 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし