

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 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791434

研究課題名（和文）：がん治療における放射線増感を目指した DNA 損傷シグナル増幅の分子機序の解明

研究課題名（英文）：The mechanism of amplification in DNA-damage signaling for enhancement of radiosensitivity

研究代表者

鈴木 正敏（SUZUKI MASATOSHI）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60515823

研究成果の概要（和文）：

放射線照射によって DNA 二重鎖切断依存的に損傷シグナル伝達経路の活性化に伴って細胞死など様々な生物反応が誘導されている。近年では、その損傷シグナルが増幅されることで効果的に細胞死を誘導する事が示唆されてきた。本研究課題では損傷シグナルの増幅度が正常細胞に比べてがん細胞で低下している事、損傷シグナルの増幅に細胞周期依存性がある事を明らかにした。今後、シグナル増幅の詳細な分子機構が明らかになる事で、がん細胞特異的な放射線増感作用を高め、効果的な放射線治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：

DNA double-strand breaks trigger activation of signal transduction pathways including induction of cell death. Recently, it is suggested that the amplification of DNA damage signaling could be related to the effective cell death induction. In this study, we revealed that the amplification of DNA-damage signaling was suppressed in tumor cell lines. We also demonstrated cell cycle phase-dependency in the amplification of DNA-damage signaling.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：放射線治療生物学

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：DNA 二重鎖切断、放射線誘発フォーカス形成、老化様増殖停止、生細胞イメージング、乳がん

1. 研究開始当初の背景

殺腫瘍細胞効果を期待する放射線療法では、放射線治療領域に必ず正常細胞が含まれる。そのため、正常細胞よりも放射線感受性が高い腫瘍に対する放射線療法が効果的であると考えられるが、実際は正常組織と比較した腫瘍の放射線感受性はほぼ等しいか、やや感受性である事が知られている。

正常組織あるいは腫瘍由来の培養細胞を用いてコロニー形成法による放射線感受性試験を行うと、6 Gy 以上の高線量域で両者に

顕著な差が見られる。高線量域の放射線照射を受けた正常細胞はコロニー形成能を失うが、その一方で腫瘍細胞では高線量域においても生存細胞が残っている。近年では腫瘍部位への照射技術の向上により高線量小分割照射法が採用されるようになっており、高線量域におけるがん細胞の放射線抵抗性分子機構の解明は、高線量治療時の放射線増感法開発への応用が期待される。

正常線維芽細胞、あるいはヒト固形腫瘍由来細胞株では高線量照射によって誘導され

る主要な細胞死形態が、老化細胞と類似した形態変化を伴う不可逆的増殖停止を特徴とする老化様増殖停止である事を申請者のグループは明らかにしてきた。高線量照射によって生じる損傷が修復されずに長期間にわたって残存すると、細胞周期チェックポイント機構が持続的に活性化することで不可逆的増殖停止を誘導する。この不可逆的な細胞増殖の停止はコロニー形成能を消失させる事から細胞死と見なされている。放射線照射後のアポトーシス誘導頻度は正常線維芽細胞で10%未満、がん細胞では数十%程度であり、残る細胞死形態は老化様増殖停止である。すなわち、老化様増殖停止が十分に誘導されなかったがん細胞が本研究における放射線抵抗性細胞の対象となる。

DNA二重鎖切断は放射線によって生成される最も致命的な損傷である。そのため放射線増感法的手段として、効果的なDNA二重鎖切断の導入が考えられてきた。近年では、DNA二重鎖切断を鋭敏な方法で検出し、個々の細胞単位での定量を可能とする手法が確立された。DNA二重鎖切断付近では様々なDNA修復関連因子、及びシグナル伝達因子が集積し、加えて損傷付近のヒストンタンパク質の修飾が明らかにされてきた。このような因子を蛍光免疫染色法によって可視化する事で、例えば、53BP1やリン酸化H2AXなどがフォーカスと呼ばれる斑点状のシグナルを核内で形成し、個々のフォーカスをDNA二重鎖切断として検出、定量することが可能となった。そこで、放射線感受性の異なる様々ながん細胞において放射線照射後の残存フォーカス数の検討が試みられたが、放射線感受性との相関は見られない事が報告されている。すなわち、DNA二重鎖切断の修復活性以外の要因によってがん細胞の放射線抵抗性が付与される可能性が示唆される。

申請者のグループは放射線照射後にフォーカスの大きさが継時的に増大する事、照射数日後には巨大化したフォーカスのみが残存し、照射数週間以降も残存している事、老化様増殖停止誘導細胞でも巨大化フォーカスが残存する事を報告した。老化様増殖停止の誘導で中心的な役割を担うp53はATM依存的なリン酸化を受けて活性化するが、ATMもDNA二重鎖切断領域で自己リン酸化により活性化し、更にはリン酸化ATMによるフォーカスも継時的に巨大化することも確認されている。リン酸化ATMフォーカスのサイズは、ATM依存的なリン酸化部位の一つであるp53セリン15部位のリン酸化レベルと相関があった事から、放射線誘発フォーカスはDNA二重鎖切断の局在を示すだけではなく、その大きさによってDNA二重鎖切断損傷シグナルの大きさを示す可能性が示唆

された。すなわち、巨大化フォーカスはDNA損傷シグナルの増幅を示す可能性が考えられる。

正常細胞と野生型p53を発現するがん細胞で、p53が関与する反応の一つであるG1期チェックポイント機構を活性化するために必要な放射線量が異なる事が報告されている。正常線維芽細胞では2Gyの放射線により有意にG1期停止が誘導されるが、野生型p53を発現している乳がん細胞株MCF-7では2Gyでは顕著なG1期停止が見られず、6Gy以上の放射線量がこの増殖停止に必要である事が示されている。MCF-7でも高線量放射線照射によって老化様増殖停止が誘導されるため、正常細胞とがん細胞で見られるp53活性化の程度の違いが細胞死誘導能、すなわち放射線感受性の違いとして示されている可能性がある。本研究課題では正常細胞とがん細胞におけるDNA損傷シグナルの増幅をフォーカスサイズの増大を指標に調べ、フォーカス増幅に関与する因子を探索する。

2. 研究の目的

- (1) 正常細胞とがん細胞において、リン酸化H2AX、及び53BP1による放射線誘発フォーカスのサイズの変化を放射線照射後から継時的に観察する事で、両者にDNA損傷シグナル増幅の程度に差があることを検討する。
- (2) 放射線誘発フォーカスの巨大化に関与する因子の探索を行い、がん細胞で抑制されている経路を調べる。H2AXリン酸化の意義としてクロマチン構造の弛緩が考えられているが、癌細胞ではDNAあるいはヒストンタンパク質のメチル化酵素活性が高い事、あるいはポリコム構成因子がリン酸化H2AX局在部位へ集積する事が報告されており、がん細胞における局所的なメチル化活性の亢進がフォーカス巨大化の抑制に機能する可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 蛍光免疫染色による放射線誘発フォーカスの可視化

正常細胞とがん細胞でのフォーカスサイズの継時的変化を調べる目的で、正常細胞としてhTERTで不死化した皮膚由来線維芽細胞BJ-hTERTを、がん細胞として乳がん細胞株MCF-7、前立腺癌細胞株PC-3を用いた。カバーガラス上に播種された各細胞は2GyのX線照射1、6、12、24、72、120時間後に固定された。細胞固定は4%パラホルムアルデヒド溶液で10分間処理した後、0.5%トライトンX-100溶液を氷上で5分間処理する事で膜透過処理を行った。放射線誘発フォーカスの

検出はリン酸化 ATM (Ser1981)、リン酸化 H2AX (Ser139)、53BP1 をそれぞれ特異的に認識する 1 次抗体、G2 期細胞の検出には CENP-F を特異的に認識する 1 次抗体を 5 % ドライミルックを含むトリスバッファー (TBS-DT) で希釈後、固定したサンプルにのせて 37°C で 2 時間処理した。1 次抗体は PBS で洗浄後、2 次抗体として Alexa488、あるいは Alexa594 が結合しているマウスまたはウサギ IgG 抗体を TBS-DT に希釈した溶液をのせて 37°C で 1 時間処理した。細胞核の対比染色は DAPI 染色を行った。

(2) shRNA 導入による Bmi-1 発現抑制株の作成

Bmi-1 に対する shRNA 配列を含むレンチウイルスベクターとエンベロープ、パッケージングベクターを 293T へ導入 48 時間後に培養上清を回収、フィルターを過後、MCF-7 あるいは PC3 へ処理し、3 日間培養した。その後、Bmi-1 に対する shRNA を安定的に発現する細胞をピューロマイシン耐性細胞株として選択した。Bmi-1 の発現抑制は細胞核抽出物を用いたウェスタンブロット法により確認後、(1) で記載した方法によって蛍光免疫染色を行った。

(3) 生細胞イメージングによる細胞周期と 53BP1 動態の解析

生細胞イメージングで利用される G2 期の細胞周期マーカーである mKO₂-hGeminin を MCF-7 へ導入した細胞を作成した。G2 期マーカーの導入は (2) で記載した方法と同様にレンチウイルスシステムを用いた。G2 期マーカー導入細胞は薬剤選択をせずに、mKO₂ を発現しているクローンを単離した。単離された細胞は更に、ヒト 53BP1 の DNA 結合ドメイン断片とその N 末端側に mCherry を融合した mCherry-BP1-2 をレトロウイルスシステムにより導入後、ピューロマイシンによる薬剤選択によって mCherry-BP1-2 が安定的に発現している細胞を回収した。

4. 研究成果

(1) がん細胞における放射線誘発フォーカスサイズ増大の抑制

正常細胞とがん細胞の間に、放射線照射後の継時的なフォーカスサイズの増大過程差が見られるかを検討した。2 Gy の放射線を照射された正常細胞 BJ-hTERT 細胞では、照射 1 時間後では微細なフォーカスが細胞核の至る所で多数観察された。その後、微細なフォーカスは継時的に減少するが、照射 6 時間後では部分的にサイズが増大し始めるフォーカスが観察され、その後の時間経過とともに徐々にサイズが増大するフォーカスが多数観察された。照射 72、120 時間後では巨大化

したフォーカスのみが残存していた。

同様にフォーカスサイズの検討を MCF-7 で行った。MCF-7 でも照射 1 時間後では正常細胞と同様に微細なフォーカスが観察され、照射 3 日後、あるいは 5 日後に残存するフォーカスは照射 1 時間後のフォーカスに比べてそのサイズは増大していた。しかしながら、MCF-7 で照射 72、あるいは 120 時間後に観察されたフォーカスのサイズは同じ条件で BJ-hTERT で検出されるフォーカスサイズよりも小さいことがしめされた。よって、MCF-7 ではフォーカス巨大化が抑制されている事から、DNA 損傷シグナル増幅機構が正常細胞と比べて弱くなっている事が予想される。

正常細胞では照射 72、120 時間後ではほぼ全ての細胞で巨大化フォーカスが検出されるが、MCF-7 では照射直後に比べてサイズが大きいフォーカスをもつ細胞に加えて、照射直後と同程度の大きさを持つ細胞が観察された。前者の様式を示すフォーカスは細胞あたり 5 個以下のフォーカス数として検出されるが、後者の様式を示すフォーカスは細胞あたり 10 個以上のフォーカスを持っており、DNA 損傷修復が前者のフォーカス様式を持つ細胞と比べて遅い事が考えられる。このように正常細胞と異なるフォーカス様式は、MCF-7 以外にも PC3 前立腺癌細胞株で同様に検出された事から、がん細胞では損傷シグナルの増幅程度が正常細胞と比べて小さい事が予想される。

(2) がん細胞における Bmi-1 の発現抑制と放射線誘発フォーカス形成への影響

がん細胞では、メチル化酵素活性が正常細胞と比べて高い事から、DNA、クロマチンレベルで高度なメチル化を受けている事が知られている。H2AX のリン酸化はクロマチン構造の弛緩と関連する可能性が示唆されており、がん細胞における高度なクロマチンメチル化は H2AX リン酸化反応を抑制し、結果的に、フォーカスの巨大化を抑制する可能性が考えられる。特にヒストンタンパク質のメチル化に関与するポリコーム複合体の構成因子で、がん細胞で発現が上昇している Bmi-1 は放射線照射後に斑点状の局在様式を示し、その局在部位はリン酸化 H2AX フォーカスと一致している事が報告された事から、放射線照射後では DNA 二重鎖切断付近での局所的なヒストンメチル化反応によって、放射線誘発フォーカスの巨大化が阻害される可能性がある。そこで、Bmi-1 を shRNA の導入によって恒常的にその発現を抑制した状態でフォーカスの巨大化を検討した。

まず、MCF-7 で Bmi-1 の蛍光免疫染色を行い、放射線照射後のリン酸化 H2AX フォーカスとの局在関係を調べた。非照射時では、Bmi-1 の斑点状のシグナルが複数観察され、

これらはリン酸化 H2AX と局在が一致していなかった。放射線照射後では、Bmi-1 は非照射時とほぼ同数の斑点状シグナルが観察された。また、そのシグナルは照射1時間後では特に両者の局在の一致は観察されず、照射120時間まで継時的に観察したが、いずれの時間帯においても Bmi-1 の検出様式に顕著な違いは認められず、リン酸化 H2AX フォーカスとの局在も不一致であった。そのため、MCF-7 同様に Bmi-1 を過剰発現している PC3 を用いて同様の検討を行った。PC3 においても、Bmi-1 の検出様式は照射前後で変化がなく、またリン酸化 H2AX とともに照射後の時間によらず一致している Bmi-1 は見られなかった。そこで、各種固定法、あるいは複数の Bmi-1 に対する抗体など様々な組み合わせで Bmi-1 の検出を試みたが、リン酸化 H2AX と局在が一致する Bmi-1 は検出されなかった。最後に先行論文で使用された細胞、固定方法、1次抗体を用いて検出を行ったが、我々の手法では放射線照射後に Bmi-1 がリン酸化 H2AX フォーカス部位と局在が一致するという結果は再現できなかった。

Bmi-1 の DNA 二重鎖切断付近における局所的な影響を調べる事が出来なかったため、核内に広く存在している Bmi-1 がフォーカスの巨大化に及ぼす影響を検討した。そのため、shRNA をレンチウイルスシステムによって導入し、安定的に shRNA が発現している MCF-7 を薬剤選択により単離した。それぞれの単離されたクローンから細胞核成分を抽出し、ウェスタンブロッティングによって Bmi-1 の核内レベルを検討したところ、最も発現抑制されていたクローンでは約 50%以上の抑制効果が確認された。そこで、このクローンを用いて放射線照射後のリン酸化 H2AX フォーカスのサイズを検討したところ、sh-scr を導入した対照細胞と同様のフォーカスサイズであったことから、Bmi-1 のがん細胞での過剰発現はフォーカス巨大化を阻害していない可能性が示唆された。

(3) フォーカス巨大化過程における細胞周期依存性の検討

フォーカスの巨大化過程における細胞周期の影響を検討するために、G2期で核内に蓄積する事が知られている CENP-F を認識する抗体とリン酸化 H2AX を検出する蛍光免疫染色を行った。核内で CENP-F が検出される CENP-F 陽性細胞と核内への局在がみられない陰性細胞に区別して解析を行った。放射線照射1時間後では CENP-F 陰性、陽性細胞ともに小さな点状のフォーカスが検出され、その後の継時変化を解析すると CENP-F 陰性細胞のみで巨大化フォーカスが検出され、CENP-F 陽性細胞では照射1時間後に観察されるような点状のフォーカスが多数検出され

た。同様の結果は BJ-hTERT でも検出された。そのため、細胞周期の G1 期で特異的にフォーカスが增大している事が予想される。

そこで、53BP1 フォーカスの動態をより詳細に、かつ細胞周期状態とカップリングして解析するために生細胞イメージングを活用した。そのため、生細胞イメージングで G2 期細胞周期マーカーとして利用されている mKO₂-hGeminin を BJ-hTERT あるいは MCF-7 に導入し、mKO₂-hGeminin を発現しているクローンを薬剤選択を用いずに単離した。その後、53BP1 の動態を調べるために mCherry-BP1-2 を導入後、ピューロマイシンを使った薬剤選択によって細胞周期と 53BP1 の動態を解析できる細胞を樹立した。

放射線照射直後の mCherry-BP1-2 が形成するフォーカスのサイズは、照射を受けた時点での細胞周期によらずほぼ同一の大きさであった。G1 期で照射を受けた場合には、そのまま G1 期にとどまり続ける場合には mCherry-BP1-2 のサイズは継時的に増大していく一方で、サイズが大きくなる細胞では次の細胞周期へ移行している事が示された。G2 期で照射を受けた場合には、G2 期にとどまり続ける間は mCherry-BP1-2 のサイズに変化はないが、G1 期へ細胞周期が移行するとそのサイズが増大する事が明らかとなった。また、放射線照射後では、特に今回用いた線量域では Bj-hTERT の G2 期照射細胞では分裂期を介さずに G1 期へ移行する分裂期スキッピングが誘導されるが、分裂期の通過の有無に関わらず mCherry-BP1-2 は G1 期でサイズが増大する事が明らかとなった。すなわち、DNA 損傷シグナルの増幅は G1 期特異的に起こっている事が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Suzuki M., Suzuki K., Kodama S., Yamashita S., Watanabe M., Persistent Amplification of DNA damage signal involved in replicative senescence of normal human diploid fibroblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 査読有, 2012: 8pages, 2012, DOI: 10.1155/2012/310534
2. Suzuki M., Yamauchi M. Oka Y., Suzuki K., Yamashita S. Live-cell imaging visualizes frequent mitotic skipping during senescence-like growth arrest in mammary carcinoma cells exposed to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology*,

- Biology, Physics, 査読有, 83 (2): e241-250, 2012, DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.12.003
3. Ozeki A., Suzuki K., **Suzuki M.**, Ozawa H., Yamashita S. Acceleration of astrocytic differentiation in neural stem cells surviving Xirradiation. NeuroReport, 査読有, 23 (5): 290-293, 2012, DOI: 10.1097/WNR.0b013e3283509a79
 4. Yamauchi M., Suzuki K., Oka Y., **Suzuki M.**, Kondo H., Yamashita S. Mode of ATM-dependent suppression of chromosome translocation. Biochemical and Biophysical Research Communication, 査読有, 416: 111-118, 2011, DOI:10.1016/j.bbrc.2011.11.006
 5. Oka Y., Yamauchi M., **Suzuki M.**, Yamashita S., Suzuki K. Persistence and dynamics of DNA damage signal amplification determined by microcolony formation and live-cell imaging. Journal of Radiation Research, 査読有, 52: 766-774, 2011, DOI: 10.1269/jrr.10164
 6. Suzuki K., Mitsutake N., Saenko V., **Suzuki M.**, Matsuse M., Ohtsuru A., Kumagai A., Uga T., Yano H., Nagayama Y., Yamashita S. Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. PLoS One, 査読有, 6 (4) e19354, 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0019354

[学会発表] (計 7 件)

1. **鈴木正敏**、鈴木啓司、桑原義和、山下俊一、福本学、ATM-p53 経路が高線量放射線照射と併用するパクリタキセルへの感受性に影響を及ぼす可能性、第 15 回癌治療増感研究シンポジウム、2013 年 2 月 10 日、奈良県
2. **鈴木正敏**、鈴木啓司、山下俊一、高線量放射線照射と同時併用のパクリタキセル処理が誘発する細胞死に p53 遺伝子状態が及ぼす影響、日本癌学会 第 71 回学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道
3. **鈴木正敏**、山内基弘、鈴木啓司、山下俊一、p53-p21 経路に依存した放射線誘発分裂期スキッピングの誘導、日本放射線影響学会 第 55 回大会、2012 年 9 月 6

日、宮城県

4. **鈴木正敏**、鈴木啓司、山下俊一、放射線誘発老化様増殖停止誘導過程における分裂期のスキッピング、日本放射線影響学会 第 54 回大会、2011 年 11 月 19 日、兵庫県
5. 鈴木啓司、山内基弘、**鈴木正敏**、山下俊一、DNA 損傷分子マーカーによる次世代細胞遺伝学的線量評価、日本放射線影響学会 第 54 回大会、2011 年 11 月 17 日、兵庫県
6. 鈴木啓司、尾関あゆみ、**鈴木正敏**、山下俊一、X 線マイクロビーム局所照射による神経幹細胞分化の促進、日本放射線影響学会 第 54 回大会、2011 年 11 月 17 日、兵庫県
7. **鈴木正敏**、鈴木啓司、山下俊一、Ionizing radiation frequently triggers mitosis skipping resulting in a senescence-like growth arrest、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日 愛知県

[その他]

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/path/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 正敏 (SUZUKI MASATOSHI)
 東北大学・加齢医学研究所・助教
 研究者番号：60515823