

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791338

研究課題名(和文)低線量率照射による二本鎖切断残存および誤修復を利用した放射線感受性予測法の開発

研究課題名(英文) Radiosensitivity test during low dose rate irradiation in normal and repair deficient cells

研究代表者

田中 智樹 (Tanaka, Tomoki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80594598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：放射線感受性の異なる正常線維芽細胞、Ataxia Telangiectasia細胞を用いて低線量率照射後の感受性を染色体異常から解析した。細胞はG0期の状態で0.5 Gy/dayの線量率で1-3 Gy照射した。1 Gy当たりの線量で正常細胞では0.36個、AT細胞では3.3個の染色体断片が見られた。3 Gy照射後にG0期染色体とG2期染色体解析を行ったところ、G2期では染色体の誤修復である転座数はG2期で増加がみられたが、8割の誤修復はG0期で見られておりAT細胞ではG0期で多くの誤修復が見られたことからAT細胞では染色体断片の認識に遅れがあり高線量率と同様な感受性を呈することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We exposed normal and ataxia telangiectasia cells to 0.5 Gy per day to gamma ray. Cells were maintained under G0 during irradiation. The dose was 1 to 3 Gy and chromosomal aberrations using fusion premature chromosomal condensation technique were analyzed. Giemsa staining showed that 1 Gy induces around 0.36 fragments in normal cells and around 1.35 in AT cells, indicating that AT cells rejoin breaks less effectively than normal cells. We also analyzed chromosomal exchange after exposure to 3 Gy using FISH techniques. AT cells have more misrejoined breaks. When cells irradiated with 3 Gy were subcultured and G2 chromosomal aberrations were analyzed using calyculin-A induced PCC technique, unrejoined breaks decreased and misrejoined breaks increased in both cell lines, suggesting that AT cells begin to rejoin breaks when a certain number of breaks are accumulated and an increased number of exchanges were observed in G0 AT cells, which is similar situation after high-dose-rate irradiation

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：低線量被曝 放射線感受性 染色体解析

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する放射線治療は、臓器の機能および形態の保持が可能なことより根治的治療方法としてその役割、適応範囲が増大している。しかし、腫瘍および正常組織の放射線感受性を事前に予測できないため経験に基づく画一的な線量で治療が行われているという問題点が指摘されている。放射線感受性が事前に予測できれば、腫瘍および正常組織の感受性が個々の患者に応じて線量を増減することが可能となり、治療成績改善のみならず副作用軽減にもつながる新たな治療戦略の確立につながる。これまで、正常組織、癌細胞の放射線感受性に関するアッセイとして、微小核形成、コメットアッセイ、ギムザ染色による染色体異常、最近ではマイクロアレイを用いた遺伝子レベルの解析まで行われているがいまだに、放射線感受性のメカニズムは不明であり、実用的な感受性アッセイは開発されていない。我々は、これまで、染色体プローブを用いる FISH (fluorescence in situ hybridization)法を用いて、放射線感受性が修復の効率のみならず正確性も重要であることを報告し、FISH 法による詳細な染色体解析が少なくとも線維芽細胞では感受性を反映することを示してきた。これまで得られた研究成果をさらに進めるために、DNA 損傷部位に鋭敏に反応して特異的にフォーカスを形成する γ -H2AX に対する蛍光抗体法を FISH 法、PCC 法と併用する新たなアッセイを開発し、個々の腫瘍および正常組織の放射線感受性に応じた新しい治療方法を開発することは非常に意義がある研究と考えている。また、福島原発の事故による低線量率被曝の影響は今後発現する可能性もあり正常人、放射線感受性を有する人の低線量被曝影響は重要な意義をもつ研究と考えられる。

2. 研究の目的

がん細胞および正常組織細胞の放射線感受

性を治療前に予測する predictive assay を低線量率照射による染色体損傷解析を用いて解析する方法から確立することを目的とする。高線量率を使用した predictive assay はこれまで十分な成果が得られていない。低線量率照射で生じる DNA2 本鎖切断は、蓄積される傾向があり、細胞によりその認知が異なることが予測され、predictive assay に役立つことが期待される。

3. 研究の方法

本研究は低線量率照射による細胞の放射線感受性を細胞生存率と染色体損傷から解析する。低線量率照射で使用される線量率は約 0.5Gy/day で、約 2 時間で一つの DNA 二本鎖切断が引き起こされる線量である。1 Gy、2 Gy、3 Gy 照射による二本鎖切断の残存数と FISH 法を用いた染色体損傷(誤修復)の頻度から感受性予測方法を確立する。

(1). 放射線感受性の異なる線維芽細胞の放射線感受性を FISH 法により解析する。

ヒト由来の正常線維芽細胞 AG1522、放射線に対して著しく高感受性を示す Ataxia telangiectasia 由来の細胞 (GM01829, AT2KY)、哺乳類細胞の主たる修復経路である NHEJ(non-homologous end joining)の欠損細胞 180Br、ナイミーヘン症候群の遺伝子 NBS1 異常細胞を使用した。

対数増殖期にある細胞を 10%の血清を含む培地で培養容器 (T25) に継代し、contact-inhibition の状態になるまで培養する。生体内では正常細胞および放射線抵抗性を示す低酸素癌細胞は G0 期と考えられるため、0.1%の血清しか含まない低栄養培養液に交換し培養を続けることにより G0 期の細胞集団を得る。

これら細胞周期を G0 期にそろえた癌細胞に X 線照射を行い G0 期で一定時間 (~ 24 時間) 修復させたのちに、トリプシンにて単細胞浮遊液をつくり、適当数をシャーレに播

種しコロニー法により生存率を決定する。

以上の実験により線維芽細胞の感受性を決定する。

(2). Fusion-PCC による G0/G1 PCC と FISH および γ -H2AX 抗体のフォーカス形成の比較解析

fusion-PCC (prematurely condensed chromosomes) サンプルの作成
静止期の細胞の放射線感受性を決定した上記条件における修復を評価するため、fusion-PCC を行い G0/G1 期の染色体を凝集させ可視化する。Fusion-PCC 法は M 期の HeLa 癌細胞と G0/G1 期の線維芽細胞、癌細胞を sendai virus を介して融合させる方法で唯一 G0/G1 期染色体を観察できる方法である。M 期 HeLa 細胞に豊富に含まれる maturation promotion factor により G0/G1 期の染色体凝集がおこり顕微鏡を通して観察可能となる。

G0/G1 PCC に FISH を適応する。

G0/G1 PCC 法により得られた染色体を 72 の 70% フォルマミド溶液により DNA 二本鎖を解離させた後、70%, 85%, 100% のエタノールで脱水する。前もって 72 にて二本鎖を解離させておいた染色体 1 番および 3 番に対するプローブを滴下する。スライドは NP40 にて洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察し、染色体異常を解析する。H2AX に対する抗体を同時に反応させ、FISH による染色体異常部位と H2AX のフォーカス部位を比較することにより、修復されずに残っているフラグメントおよび誤修復との関係を解明する。

上記、より、G0/G1 期における染色体異常が、放射線誘発損傷を反映しているかを解明する。

上記の実験は高線量率でも行い低線量率の実験結果との違いの有無を確認する。

4. 研究成果

正常人の線維芽細胞、AT 細胞の 2 種類の線維芽細胞の生存率から正常細胞では高線量率と低線量率では明らかな差異が見られた。これまでの報告と同様に高線量率での生存率は低線量率より明らかに低い傾向が見られたが、放射線高感受性の AT 細胞では高線量率でも低線量率でもほぼ同様な著しい感受性を呈した。図 1 に高線量率と低線量率における染色体解析結果を提示する。低線量率では持続低線量率で 3 日間照射を行い照射終了後に G0/G1 期の染色体損傷を解析した。高線量率 (2Gy/min) では照射後に直ちに染色体解析を行なった。これにより低線量率と高線量率における放射線影響を観察できた。

図 1

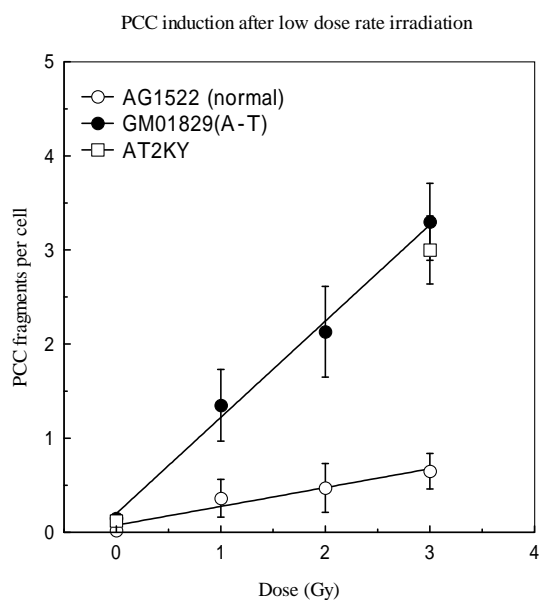


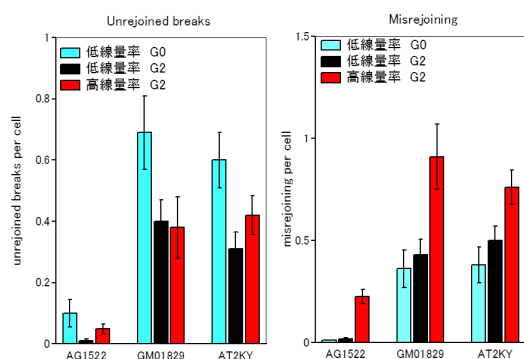
図 1 の結果から低線量率照射の線量 染色体断片数は比例関係が認められた。正常の線維芽細胞では、3 Gy あたりで 0.6 個程度の染色体断片が見られたが、AT 細胞では 3 個ほどの染色体断片が見られ、高感受性を反映する結果が得られた。

高線量率の実験から正常の線維芽細胞も AT 細胞も 3 Gy あたり 18 個の染色体断片が観察された。低線量率でも高線量率でも同一線量

では染色体損傷数は同一と考えられるので、低線量率照射中に正常細胞では95%、AT細胞では82%が再結合していることが分かった。

細胞周期進行に伴う染色体修復の影響を見目的で照射終了後にトリプシン処理を行い細胞周期をさせて、G2期染色体解析を行なった。G0/G1期の染色体損傷と比較することにより細胞周期、特にG1/Sチェックポイントの影響を調べることができた。図2に結果を提示する。

図2



正常繊維芽細胞、AT細胞いずれにおいてもG0/G1期染色体断片数はG2期よりも頻度が高い傾向が見られた。細胞周期進行により染色体の再結合が行われたことを示す結果となった。

誤修復を表す misrejoining の結果からは正常細胞では低線量率ではG0/G1期、G2期で殆ど誤修復は見られなかったが、AT細胞ではG0/G1期染色体とG2期染色体でのご修復頻度は大きな差が見られなかった。

これまで、AT細胞の低線量率照射で起こる誤修復は細胞周期チェックポイント異常によって誤修復が引き起こされていると考えられていたが、本研究結果は低線量率照射では細胞周期のチェックポイント(G1/S checkpoint)異常が誤修復の原因ではなく、G0/G1期間で修復が完了していることを示す結果であった。

生体内では正常細胞は殆どG0/G1期に存在すると考えられ、照射による有害事象の発現はG0/G1期に如何に正しい結合ができるかによって変化する可能性があり、今後も研究を続けていく予定である。本結果は現在論文としてまとめている段階である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

田中智樹, 萬 篤憲, 戸矢和仁, 吉田佳代, 高橋 茜, 黒岩信子, 西山徹, 矢木康人, 斉藤史郎

前立腺癌に対する IMRT 併用小線源療法における直腸毒性の軽減 第26回日本放射線腫瘍学会学術大会 平成25年10月18日 青森

田中智樹, 栗林 徹, 池本孝司, 三嶽秀介, 小切孝洋, 金田朋也, 小池直義, 花田剛士, 茂松直之

前立腺癌に対する IMRT の初期経験 第443回日本医学放射線学会 関東地方会 平成25年6月1日 東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6．研究組織

(1) 研究代表者

田中 智樹 (Tanaka Tomoki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80594598