

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K00549

研究課題名(和文) DNA損傷を負った細胞が生死の運命を決定する時期と要因の解明

研究課題名(英文) Elucidating the timing and factors that determine the fate of DNA-damaged cells from life to death

研究代表者

橋本 光正 (HASHIMOTO, Mitsumasa)

金沢医科大学・一般教育機構・准教授

研究者番号：70293975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷を負った細胞は、損傷を修復して生存を試みるのか、修復をあきらめてアポトーシス死へ向かうのか、この決定をいつ、どのように下すのかについて研究した。X線照射後の細胞をタイムラプス顕微鏡で動画撮影し、最終的に生存あるいはアポトーシス死に移行した細胞の照射以降の状態を観察した。その結果、X線照射後72-96時間で決定されることが示唆された。X線照射により引き起こされるDNA損傷(H2AXの集積を指標)は、24時間以内に修復されることが明らかにされている。しかし細胞の生死を決定する時間帯はそれよりもかなり遅れ72-96時間であると考えられる。これを決定する因子についてさらに探索する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の当該分野の研究では、DNA損傷の早い修復も遅い修復も24時間程度で完了するとされてきた。しかし本研究において、細胞の生死を決定する時間帯はそれよりもかなり遅い時間帯でやってくるのが明らかになった。近年研究機器の発展により、損傷後数十秒以内に起こる反応に注目されがちであるが、数日以降に起こる事象にも目を向けるべきであると考えられる。がんの放射線治療や化学療法の研究においても、この現象は念頭におくべきである。早い反応のみならず、遅れてやってくる反応の差異も重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We studied when and how DNA-damaged cells make the decision to repair the damage and attempt to survive, or give up on repair and move toward apoptotic death. The results showed that the cells that survived 72 hours after X-irradiation were not affected by X-irradiation. The results suggest that the time window of 72-96 hours after X-irradiation determines when the cells survive and die: DNA damage induced by X-irradiation (as indicated by H2AX accumulation) is repaired within 24 hours. However, the time window for determining cell viability is much later, between 72 and 96 hours. Factors that determine this need to be explored further.

研究分野：放射線生物学

キーワード：コロニー形成 生存志向細胞 死滅志向細胞 X線照射 DNA損傷の定着 増殖遅延 53BP1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

X線照射により引き起こされるDNA二重鎖切断(DNA double strand break: DSB)は、全細胞周期に機能し切断端を直接連結させる非相同末端結合修復(NHEJ)経路、late S~G2期に姉妹染色分体の相同配列を使って修復する相同組換え修復(HR)経路のどちらかで修復される。経路選択は一般的にNHEJが7~8割、HRが2~3割とされており、その経路選択の仕組みが精力的に研究されている。しかしHRには相同DNA配列が必要であること、非同調細胞集団で細胞周期的に相同DNA配列を持つ細胞集団の割合(非同調細胞集団のうち、S期の後期、G2期、M期)を考慮すれば、経路選択の仕組みの有無に関係なくNHEJが7~8割、HRが2~3割という数字は必然性を持つ数字であると考えられる。53BP1はDSBに速やかに集積し、DSBのNHEJ経路やDNA損傷チェックポイント機構に関与するタンパク質として広く認知されている。DSB部位に集積した53BP1は光学顕微鏡で観察できるフォーカスを形成し、53BP1フォーカスの1個がDSBの1個に相当する。

2. 研究の目的

(1)DNA損傷の程度が大きすぎて修復できない時、細胞は死に向かうと考えられているが、DNA損傷の程度とは損傷の数なのか、大きさなのか、あるいは損傷が残っているのに細胞周期が進行し始めるのか、不明な点がある。そこでこれらの点を明らかにする。

(2)DSBが発生した時に、細胞全体として、どのような損傷応答が起こるのであろうか。DNA損傷を負った細胞は、損傷を修復して生存を試みるのか、修復をあきらめて死滅へ舵を切るのか、この運命の決定をいつ、どのように下すのであろうか。そこでこれらの点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)細胞

主に、骨肉腫細胞株 U2OS(p53: 野生型)とこの細胞に EGFP 融合 53BP1 を発現させた細胞株を用いた。細胞株は 10%牛胎児血清を含む DMEM 培地で 37℃、5%CO₂ 環境下で培養し、コンフルエント状態に達する前に継代して増殖状態を維持した。

(2)コロニー形成アッセイ

対数増殖期にある U2OS を 400~4000 個、培養細胞用ディッシュ(60 mm あるいは 100 mm)に植え込む。翌日、X線を 400mGy/min の線量率で照射する。X線照射装置は M-80WE (ソフトックス)を用いた。照射後 10~12 日間培養、70%エタノールで固定後、5%ギムザ水溶液で染色した。

(3)蛍光免疫染色

細胞の固定は PBS 緩衝液に溶解した 4%パラホルムアルデヒドに 10 分間浸漬することで行った。固定した細胞は、70%エタノールに置換した。γ-H2AX を検出するためには、一次抗体として mouse γ-H2AX モノクローナル抗体(Upstate)を、2次抗体として Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 546 anti-mouse IgG(Molecular Probes)を用いた。DAPI を含む封入剤 Pro Long(Molecular Probes)で封入した。

4. 研究成果

(1)細胞数とコロニーの関係

がん培養細胞を用いた放射線に対する生存曲線を決定する実験においてコロニー形成法を用いた。この時、生存率 10%程度を与える X 線を照射すると、コロニーの大きさに差が生じることが経験的に知られている。また非照射群のコロニーと大きさを比較しても明確に差がある。

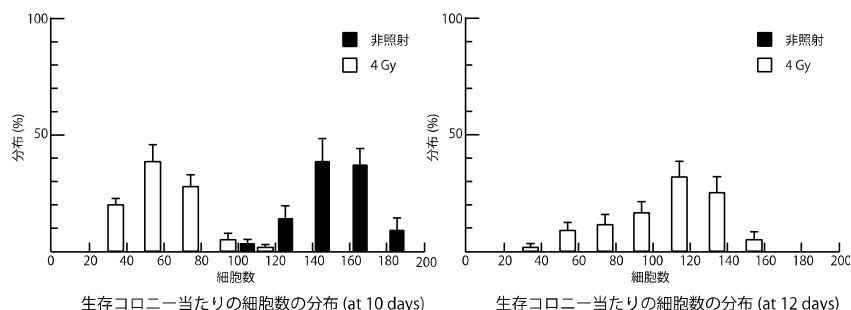


図1 コロニーと細胞数の関係

図1に示すように、培養細胞のX線に対する生存実験における、コロニーと細胞数の関係を定量化した。ヒトがん細胞U20Sに4GyのX線を照射し、10日後に形成されたコロニー当たりの細胞数を計測した。その結果を図1に示した。非照射群のコロニーは平均151個の細胞で形成されていた。これに対して、4GyのX線を照射した群では、平均47個の細胞で形成されていた。推定される細胞分裂回数はそれぞれ7.2回と5.5回であった。細胞分裂回数に約1.7回の違いがあった。この数字は細胞が培養ディッシュに巻き込まれた時に生じる細胞周期の違いを超える値であり、対数増殖期の細胞倍加時間(33時間)から推定すると60時間程度の増殖遅延が認められた。この違いから生じる時間差こそ、細胞が損傷を修復し、その生死を決定するのに要している時間であると考えられる。この考えをさらに補強するために、4GyのX線を照射した細胞を12日間培養し、コロニー当たりの細胞数を計測した。この条件では、コロニーは平均102個の細胞で形成されていた。推定細胞分裂回数は6.6回であった。(なお、非照射の条件下では、形成されたコロニーの中心部に抜けが観察された。)生存コロニー中の細胞は、a)非照射のコロニーと同等な細胞、b)コントロールより大きな核を持つ細胞(不均等分裂を示唆)、c)歪な細胞から構成されていた。ただし、コロニーの細胞数が60以下の群では明らかにb)とc)からなる細胞の形態異常が生じたものがマジョリティーを構成した。

(2)増殖遅延の起こる時間帯

次に増殖遅延の起こっている時間帯を明らかにするために、X線照射後の細胞を透過型顕微鏡で観察した。U20S細胞に4GyのX線を照射し、観察した。48時間目まで、X線を照射された細胞においても大きな形状の変化は認められず、また培養ディッシュから遊離する細胞も非照射に比べて有意に大きな値を取ることはなかった。72時間目で細胞が遊離して培養液中を浮遊するものが観察された。ただし、この時点で4GyのX線の生存率(10%程度)を反映するような高頻度なものではなかった。さらに細胞の外形状の変化として、細胞の膨張が観察されるようになった。96時間目でもこの特徴は亢進した。

フローサイトメトリーによる細胞周期解析でも48時間目までは、細胞周期チェックポイント機構により細胞周期のG1、G2期に停止している細胞が大部分を占めるが、72時間目でsub-G1ピークの分画が増加し、96時間目で20%を超えた。このことからこの時間帯(72-96時間)で細胞分裂死が始まることが示唆された。細胞周期の再進行を調べるために、U20S細胞に4GyのX線を照射した後、24、48、72、96、120時間目にBrdUをパルスラベルし、細胞周期の再進行を調べたところ、48時間目まではほとんど確認されなかったが、72時間目以降では経時的に増加する傾向が認められた。これらのことから72-96時間の時間帯におそらくDNA損傷の修復が完了しないまま、細胞周期が進行を再開し、M期に辿り着き、そこ

で分裂の不具合、不均等分裂、細胞のディッシュからの遊離が発生し、死に向かうことが推察される。

次にこれらの現象と DNA 修復タンパクの関係性を調べるために、U2OS に EGFP 融合 53BP1 を発現させた細胞株を用意した。この細胞を用いた結果、以下のデータを得た。4Gy の X 線照射直後から 96 時間目までを、タイムラプス蛍光顕微鏡で撮影したところ、96 時間以内にアポトーシス死を迎えた細胞は 5%以下であった。図 2 に示すように、1Gy の X 線照射では 53BP1 の foci は 24 時間以内に著しく減少するが、4Gy の X 線照射では 24 時間目以降も残存した。53BP1 foci 残存細胞において、培養ディッシュから遊離し細胞分裂死を迎えるものが観察された。したがって 96 時間目以降のデータでは 53BP1 foci 残存細胞を過小評価している可能性が考えられる。

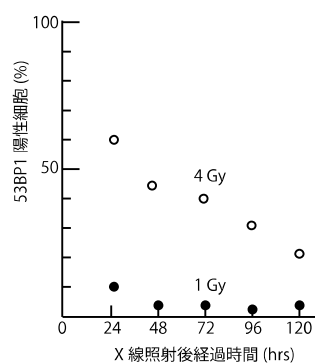


図 2 X 線照射と 53BP1 陽性細胞の変化

通常、X 線による DNA 損傷の修復は NHEJ による早い修復と HR による遅い修復があるが、早い修復だと 8 時間、遅い修復でも 24 時間以内には完了しているとされている。1Gy の線量ではその損傷を修復する能力が細胞には十分備わっており、多数の細胞が生存を志向できるが、4Gy の線量では修復能力を上回る損傷がもたらされ、生存を志向しても、修復システムが機能できないことが示唆された。

(3) 修復経路とコロニー当たりの細胞数との関係

代表的な修復経路には NHEJ 経路と HR 経路がある。生存細胞が示すコロニー当たりの細胞数の違いがこれらの修復経路によるものかを調べるために X 線照射時から ATM 阻害剤 (KU-55933)あるいは DNA-PK 阻害剤 (NU-7441) 添加し、コロニー当たりの細胞数との関係を測定した。図 3 に示すように、DNA-PK 阻害剤 (NU-7441) 添加では生存コロニー当たりの細胞数はコントロール (DMSO) に比べて、減少した。ただし、ATM 阻害剤あるいは DNA-PK 阻害剤を添加した条件では、生存率そのものが著しく低下しているため、コントロールに比べて細胞密度が低下していることを考慮する必要があると考えられる。

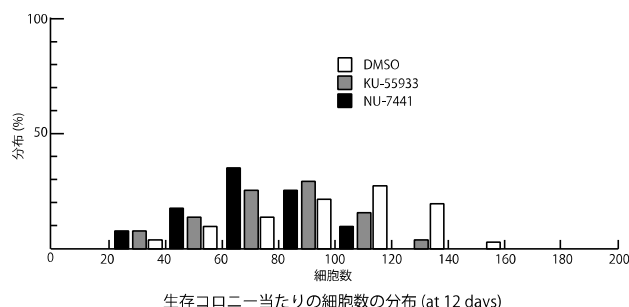


図 3 修復経路とコロニー当たりの細胞数

(4)死滅を志向する細胞の解析

そこで、4Gy の X 線照射後 96 時間を経過した細胞のうち、53BP1 陽性細胞および浮遊細胞を回収し、これを死滅志向細胞として調べたところ、DNA 損傷の定着、ATM の脱リン酸化、ミトコンドリア膜電位の不安定化、核膜構造の脆弱化、が認められた。BRCA1、BRCA2 について調べたが、大きな差異は認められなかった。

以上の結果より、損傷を負った細胞の生と死を決定する時間帯はU2OS細胞においては72-96時間の時間帯であると推察される。この時間帯までに修復されなかった損傷はゲノム内に固定され、細胞周期の再進行に従い分裂期に進行し、そこで分裂の不具合から死滅を志向する方向に向かうと考えられる。その要因としてはゲノム内に発生する損傷量であり、それが細胞の運命を決定する大きな要因となるであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	奥田 光一 (OKUDA Kouichi) (60639938)	弘前大学・保健学研究科・准教授 (11101)	変更：2022年12月1日

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