

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590659

研究課題名(和文)末梢血を用いたDNA修復活性評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of evaluation method for double strand repair capacity with peripheral blood

研究代表者

鈴川 和己 (Suzukawa, Kazumi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50334066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断のマーカーとしてよく知られているgammaH2AXを用い、フローサイトメトリーを用いて放射線照射後のDNA損傷修復を評価する方法を開発し、検討した。ヒトとマウスの末梢血リンパ球を用いた検討では、加齢によりgammaH2AX減少率つまりDNA損傷修復能が低下することが明らかになった。造血器悪性腫瘍(悪性リンパ腫)患者と同年齢ボランティアとの比較では、DNA損傷修復能は優位差を認めなかった。以上の結果より、がん発生の高リスク因子はDNA損傷修復能の個体差よりも加齢による低下が深く関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To approach the difference in the DSB repair function in healthy individuals and patients with hematological malignancies, we focused on the reversion of gammaH2AX, an established marker of DSB, to H2AX. Irradiation induced gammaH2AX in dose dependent manner. Maximal amount of gammaH2AX was observed at one hour after irradiation. Then the amount of gammaH2AX gradually decreased, suggesting the progress of DSB repair. DSB repair evaluated by the dephosphorylation of gammaH2AX was significantly decreased in older (over 39) volunteers than younger ones. Age-matched analysis between volunteers and post-chemotherapeutic lymphoma patients revealed increase of DSB repair in patients, indicating that the impairment of DNA repair function is affected more by aging than chemotherapy. Our results suggest that aging is a significant factor for decreased DSB repair after irradiation, which might be associated with increased prevalence of cancer in aged individuals.

研究分野：臨床検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：DNA二重鎖切断 放射線 H2AX 脱リン酸化

1. 研究開始当初の背景

(1)がんは遺伝子の変異によりもたらされる疾患であり、これまで様々な方法でがんにおける遺伝子変異が解析されてきた。がんにおけるゲノム変異は点突然変異、染色体転座、欠失、増幅の4種類が知られているが、これら4つのうち3つにはDNA二重鎖切断を伴う。

(2)固形がんで見られる染色体異常は非常に複雑であるために解析が進まなかったが、近年肺癌におけるEML4-ALK、前立腺がんにおけるTMPRSS2-ERG等の特異的な染色体異常による遺伝子異常が明らかとなり、今後同様のがん特異的な遺伝子異常が徐々に明らかにされていくと思われる。

(3)造血器悪性腫瘍や肉腫に見られる染色体異常は固形がんと比較して単純であることが多いため、解析が早く進んだ。急性白血病においては、約半数において特異的な染色体転座が認められる。また急性リンパ性白血病におけるp16遺伝子の欠失や慢性骨髄性白血病リンパ芽球性急性転化におけるIkaros遺伝子の欠失といった疾患特異的に高率な遺伝子欠失が観察される。

(4)これらの染色体転座や遺伝子欠失が生じる背景にはDNA二重鎖切断とその修復の際に生じるエラーが重要な役割を果たしていると考えられる。

(5)放射線・抗がん剤等によるDNA二重鎖切断が生じると、ATM遺伝子のリン酸化が起こり、ATMの標的遺伝子群のリン酸化が起きる。それらの中にはp53, H2AX, CHK1, CHK2が含まれ、損傷したDNAの認識と細胞周期の停止を起し、切断されたDNAの修復反応が惹起される。DNA修復が成功すると細胞周期停止が解除されるが、適切な修復が行われなければ細胞はアポトーシスへと向かう。

(6)DNA二重鎖切断の修復には2種類のメカニズムが知られている。1.相同組み換え修復と2.非相同組み換え修復である。白血病に見られる染色体転座や欠失などの発生には2.非相同組み換えがより重要な役割を果たしていると考えられる。非相同組み換え修復にはKu, DNA-PK, XRCC4, ligase IVなどの分子が関与することが明らかになっている。相同組み換え修復にはNBS1, RAD51等が関与することが明らかになっているが、その全容は未だに不明な部分が多い。

(7)末梢血白血球におけるDNA二重鎖切断の修復能を簡便な方法で評価することができれば、がん発症高リスクである個人の同定や、治療後二次がん発症の高リスクである症例の同定が可能となる。

2. 研究の目的

(1)リン酸化H2AX等を指標に末梢血白血球におけるDNA損傷(二重鎖切断)およびそ

の修復能力を評価する方法を確立し、がん発症高リスクである個人の同定や、治療後二次がん発症が高リスクである症例の同定を可能にすることを当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1)gammaH2AXによるDNA損傷の検出

DNA損傷(二重鎖切断)が生じた場合の最も早期の細胞応答の一つは、核内でDNAが巻き付いているヒストンたんぱく質H2AXの139番セリン部位のリン酸化である。gammaH2AX(リン酸化H2AX)に特異的な蛍光標識モノクローナル抗体を用いることで、DNA損傷を検出することが可能となる。これまでgammaH2AXの検出には主として免疫染色が用いられてきたが、本研究では血液細胞を用いるため、フローサイトメトリーにより検出した。

(2)フローサイトメトリーによるヒト白血球DNA損傷検出

RPMI1640(細胞培養液)で2~3倍に希釈した末梢血をFicollに重層し、遠心によって単核球を分離した。これに4Gyの放射線を照射し、1,2,6時間後それぞれ0.16%ホルムアルデヒドを加えて氷上に20分静置し細胞を固定した。

固定後の細胞にFITCでラベルした抗gammaH2AX抗体を加え暗所で反応させ、フローサイトメトリーで各細胞の蛍光強度を測定した。

フローサイトメトリー解析においてFSC(細胞の大きさ)、SSC(細胞内顆粒)の大きな集団を単球、小さな集団をリンパ球分画としてGateを設定した。放射線照射前の細胞の蛍光強度をヒストグラムでプロットし、peak channel number(mode)の5倍をCutoffとしてそれ以上の蛍光強度を示す細胞を陽性細胞とした。

まず放射線非照射の陽性細胞比率を求めた。次に放射線照射後一定時間経過時点(1,2,6時間後)において、陽性細胞比率を測定し、各細胞集団におけるgammaH2AX量の変化を評価した。

また以下の計算式により、gammaH2AX減少率を求めた。

$$\frac{A \text{時間での陽性細胞比率} - B \text{時間での陽性細胞比率}}{A \text{時間での陽性細胞比率}}$$

($\times 100$)

X線照射後、陽性細胞は1, 2時間で最大となるためAに1ないし2時間後、Bに4, 6時間後の陽性細胞率を当てはめて計算した。

放射線非照射時のFACS解析でのヒストグラム分布に着目し、蛍光強度が分布のピークを示す値の3倍以上の蛍光強度を示す細胞(高gammaH2AX細胞)の割合を健常人と患者で比較検討した。

(3)免疫染色によるヒト白血球DNA損傷の検

出

gammaH2AX抗体で染色した細胞を、poly-L-Lysineでコートしたスライドガラスに滴下しスライドに張り付かせた。その後DNAに対して強力に結合する蛍光色素であるDAPI入りの封入剤で封入した。標本を蛍光顕微鏡で観察しFITCの発光が見られるものを発光スポットの数で分類した。

(4) フローサイトメトリーによるマウス白血球DNA損傷検出

対象マウス各数匹から計約1,000 μ l採血をした。RPMI1640(細胞培養液)で約4倍に希釈した末梢血をFicoll-Paque PREMIUM 1.084に重層し、1200rpm 20分遠心後、単核球を分離した。細胞培養液に浮遊させた単核球にGamma Cell[®]を用いて4Gyの γ 線を照射し、DNA二重鎖切断を起こした。その後37度のインキュベータで細胞培養し、1時間後・6時間後に0.16%ホルムアルデヒドを加えて氷上に20分静置し、細胞を固定した。

固定後の細胞にFITCでラベルした抗gammaH2AX抗体を加え暗所で20分間反応させ、フローサイトメトリー(BD FACSCalibur[™])を用いて各細胞の蛍光強度を測定した。フローサイトメトリー解析においてFSC(細胞の大きさ)、SSC(細胞内顆粒)により細胞を展開し、まとまった集団が認められれば、Gateを設定した。ヒトの単核球は単球とリンパ球の集団に分けることができたが、マウスの白血球分画はリンパ球が87%を占めることを反映し、一つの集団しか認められず、この集団をリンパ球分画とした。各時間で固定した細胞の蛍光強度をヒストグラムでプロットし、geometric meanの値でgammaH2AX量を測定した。

未照射時、照射後1時間、6時間の測定値から γ H2AX量減少比率を測定し、老齢マウスと若齢マウスのDNA修復能を比較した。また、定量ビーズを使用することで、未照射時のgammaH2AX量を比較し、リンパ球DNA損傷量の加齢による変化につき検討した。

(5) γ H2AX脱リン酸化酵素遺伝子発現比較

gammaH2AXはセリンがリン酸化しているため、gammaH2AXの脱リン酸化にはセリン・スレオニンホスファターゼが作用する。今回はセリン・スレオニンホスファターゼのうち γ H2AXを脱リン酸化すると報告されている、リン蛋白質ホスファターゼであるPP2,PP4,PP6の触媒サブユニット(PPP2CA,PPP2CB,PPP6C,PPP4C)と調節サブユニット(PPP2R2A,PPP2R1B,PPP2R5C,PPP4R3B,PPP6R1,PPP6R2,PPP4R2)、および金属依存性蛋白質ホスファターゼであるPPM1Dの遺伝子発現を比較した。

上記と同じ方法でリンパ球を分離した後、4Gyの放射線を照射し、各時間で細胞を破壊・固定した。その後、QIAGEN[®] QIAamp[®] RNA Blood Miniを用いてRNAを抽出、RT-PCR

でcDNAを合成し、各条件での遺伝子発現量をApplied Biosystems 7500リアルタイムPCRを用いて若齢マウスと高齢マウス(平均64.4週齢)の発現量を比較した。なお、内部コントロール遺伝子として解糖系酵素であるGAPDHを利用した。

4. 研究成果

(1) 研究全体の成果概略

ヒト末梢血リンパ球を用いて検討したところ、放射線照射によるDNA二重鎖切断を反映していると思われる細胞内gammaH2AXの量は放射線量依存的に増加し(図1)、その量は放射線照射後1時間でピークとなり、その後6時間までの間で減少が観察され(図2)、その過程で切断されたDNA二重鎖の修復が行われていると推察された。

図1 照射放射線量と gammaH2AX 陽性細胞割合

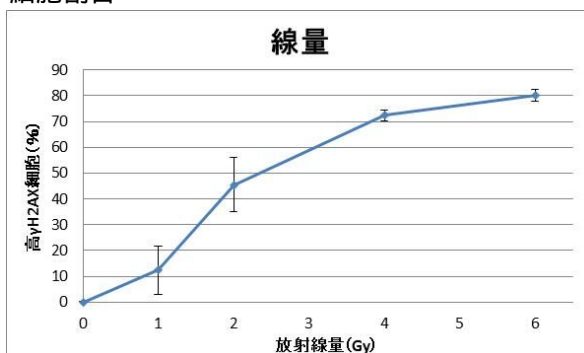
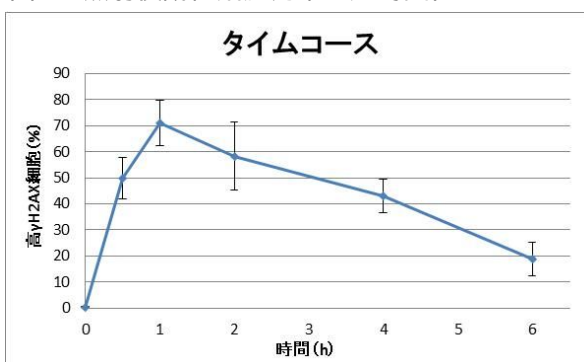


図2 照射後陽性細胞比率の経時変化



次にボランティア血液について検討してみたところ、40歳以上のリンパ球は40歳以下のリンパ球に比べて優位にgammaH2AX減少率が低いことが明らかになった。(図3)

このことはヒト末梢血リンパ球におけるDNA二重鎖切断修復能力は加齢により低下することを示唆している。

一方で、造血器悪性腫瘍(主として悪性リンパ腫)患者と同年齢のボランティアとの比較では、gammaH2AX減少率には有意差が認められず(図4)がんの患者において必ずしもDNA二重鎖切断修復能力が低下しているわけではないことを示唆している。

図3 年齢グループ別の gammaH2AX 減少率比較

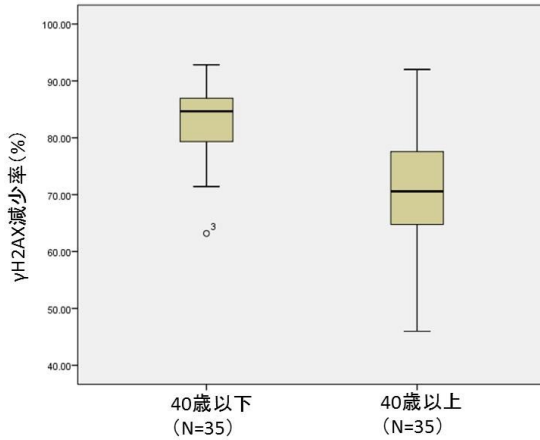
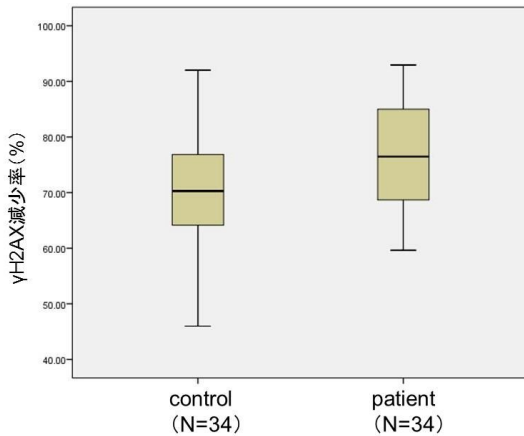


図4 健常人对造血器腫瘍患者の gammaH2AX 減少率比較



ヒトで観察された結果が、マウス末梢血リンパ球でも同様にみられるか検討した結果、マウスにおいても老齢個体は、若年個体に比較して gammaH2AX 減少率が低く (図5) 加齢による DNA 二重鎖切断修復能の低下が認められると考えられた。

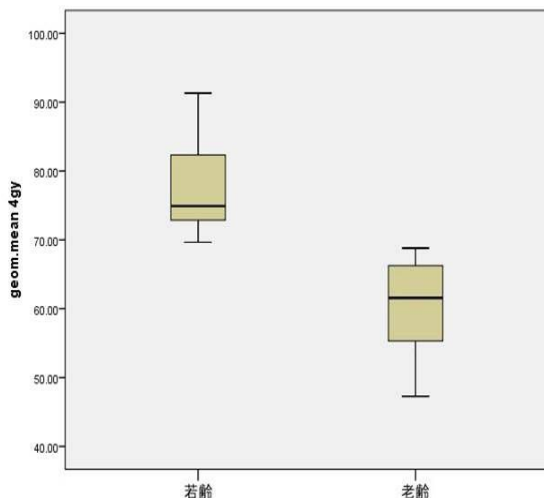


図5 週齢グループ別の gammaH2AX 減少率比較 (マウス)

これらの結果より、DNA 二重鎖切断修復能の低下に深く関与するのは、加齢による変化であると考えられた。

(2)23 年度の成果

当初白血病細胞株を用いて、放射線照射により DNA 二重鎖切断を起こし、これにより生じる gammaH2AX をフローサイトメトリーにより検出することに成功した。また放射線照射後一定時間経過すると H2AX の脱リン酸化が起きることも確認できた。この H2AX の脱リン酸化は切断された DNA 二重鎖が修復されたことを反映していると考えられる。

次にパイロット研究として数名の健常人より同意を得た後に末梢血 2ml の提供を受けた。これらの血液から Ficoll を用いて単核球を分離し、同様に放射線照射前後の gammaH2AX をフローサイトメトリーにより検出したところ、H2AX のリン酸化および脱リン酸化の程度が白血病細胞株とは異なることが明らかになった。

まず研究代表者自身の末梢血を採取した後、白血球を分離し、放射線照射後白血球をホルムアルデヒドを用いて固定した。その後蛍光色素 FITC で標識された抗 gammaH2AX 抗体を反応させ、フローサイトメトリーによる DNA 二重鎖切断の間接的な観察を行った。放射線照射量とリン酸化 H2AX 陽性細胞比率の間には良好な相関関係がみられた。次に放射線照射による DNA 二重鎖切断とその後の修復を観察するための至適条件を検討した。ほぼ 100%の細胞で有意に H2AX がリン酸化したことを確認するのに必要な線量は 4Gy 以上であることが判明した。また経時的にリン酸化 H2AX 陽性細胞数の変化を観察したところ、放射線照射後 1~2 時間でピークとなり、6 時間までほぼ直線的に減少することが明らかになった。この結果によりリン酸化 H2AX 陽性細胞比率を観察するタイミングを放射線照射後 1, (2,) 4, 6 時間後とした。

施設内倫理委員会で承認された手順に基づき、同意を得た後に健常人から末梢血を得て、同様の検討を行った。得られたデータを解析し、健常人末梢血白血球における経時変化を解析した。

治療後外来通院中の造血器腫瘍患者から同意を得た後、診療に用いられた血液検査検体の残余血液から白血球を分離し、同様の検討を行った。その結果健常人に比較して患者ではリン酸化 H2AX 陽性細胞比率の減少程度が少ないことが明らかとなり、治療後の造血器腫瘍患者では健常人に比較して、DNA 二重鎖切断の修復割合が少ないことが示唆される結

果が得られた。

(3)24年度の成果

ヒト末梢血単核球を分離し、放射線照射によりDNA二重鎖切断を発生させる。そのDNA損傷の検出を容易にするために、DNA二重鎖切断検出の確立したマーカーであるリン酸化H2AX (gammaH2AX)を特異的モノクローナル抗体により同定する方法を用いた。照射する放射線量を調節することで、照射後一定時間でgammaH2AXが著明に増加し、その後徐々に減少する過程を明らかにした。このgammaH2AX減少過程は、損傷を受けたDNAが修復される過程を見ていると考えられる。この修復能力が、健常人とがん患者では異なり、がん患者のDNA修復が低下しているのではないかという仮定を検証する目的で、研究を進めた。

施設内倫理委員会で承認された手順に基づき、説明後同意を取得した健常人及び造血器悪性腫瘍患者から末梢血を得て、単核球を分離した。4Gyのガンマ線照射を行った後の、gammaH2AX陽性細胞数についてデータ収集した。得られたデータを元に、放射線照射後の末梢血単核球におけるgammaH2AX陽性細胞の経時的変化を解析した。

前年度行った解析では、健常人に比較して造血器悪性腫瘍患者ではgammaH2AX陽性細胞比率の減少程度が少なく、治療後の造血器腫瘍患者では健常人に比較して、DNA二重鎖切断の修復能が少ないことが示唆される結果が得られた。今年度は解析対象症例数を増やして検討した。健常人78名、治療前患者33名、治療後患者90名から末梢血を採取し、解析を行った。幅広い年齢の健常人から検体を得ることが出来たため、年齢による違いを検討可能となった。若年者と高齢者で比較をすると、高齢者のDNA修復能が有意に低いことが明らかになった。健常人と患者の年齢をあわせたペアで解析した結果、健常人と患者との間で、有意な差が見られなかった。また患者では治療前後で修復能の違いは見られなかった。以上の結果から、加齢により、損傷DNA修復能が低下することが示唆された。

(4)25年度の成果

マウスを用い、DNA二重鎖切断に対する修復能の加齢による低下が、ヒトとは異なる生物種でもみられる共通の変化であるか検討することとした。また、gammaH2AXを脱リン酸化する酵素の遺伝子発現に着目し、これらの放射線照射前後における発現変化や、放射線未照射時における発現量が加齢により変化するか検討を行うこととした。

まず放射線照射によるgammaH2AX量変

化について評価方法の検討を行い、最もばらつきが小さく、他の論文でも用いられているgeometric meanを採用することにした。次に若齢マウスリンパ球に放射線を照射後、1時間でのgammaH2AX量(geometric mean値)を測定した。gammaH2AX量は線量増加とともに増加し、2Gy以上ではほぼ横ばいとなった。

若齢マウスリンパ球に2Gy放射線照射後gammaH2AX量(geometric mean値)の経時的変化を観察した。gammaH2AX量は1時間で最大となり、6時間後有意に減少した。若齢マウスと高齢マウス(平均61週齢)のgammaH2AX減少率を比較すると、全ての線量において高齢で減少率が低下する傾向がみられたが、4Gyにおいてのみ、統計的に有意な低下が認められた。

放射線照射前後の遺伝子発現量の変化率(放射線照射後発現量/照射前発現量)を比較すると、gammaH2AXを脱リン酸化する酵素として着目した12の遺伝子のうち10種では、若齢マウスで放射線照射によって発現の誘導が見られるのに対し、高齢マウスでは変化なし、もしくは低下していた。その中でもPPP2CA, PPP6R2, PPP4R3B, PPM1Dでは、高齢マウスと若齢マウスの変化率に有意差がみられた。また、定常時の遺伝子発現を比較してみると、PPP4Cのみ若齢マウスに比べ高齢マウスで高値を示した。

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)

[学会発表](計 1件)

Kazumi Suzukawa Yasushi Kawakami
Shigeru Chiba, Decreased repair activity of double-strand DNA break by irradiation in the peripheral lymphocyte with aging 第75回日本血液学会学術集会 平成25年10月12日、ロイトン札幌、札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 和己(SUZUKAWA KAZUMI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号 50334066

(3)連携研究者

千葉 滋(CHIBA SHIGERU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 60212049

大越 靖(OKOSHI YASUSHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号 10400673

横山泰久(YOKOYAMA YASUHISA)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 70512820