

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 4 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650304

研究課題名（和文） 超音波によるゲノム損傷応答機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of Genome Damage Response Induced by Ultrasound

研究代表者

近藤 隆 (KONDO TAKASHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授

研究者番号：40143937

研究成果の概要（和文）：超音波による細胞内 DNA 二本鎖切断の誘発をリン酸化ヒストン H2AX および comet 法におけるテールの伸長の観察により、初めて証明した。DNA 二本鎖切断は、超音波キャビテーション発生と関連し、そのメカニズムとしてキャビテーションによるフリーラジカル生成（放射線類似作用）によるものではなく、機械的作用によるものと思われる。また、修復に係る蛋白質は放射線によるものとは異なることが判明した。

研究成果の概要（英文）：A likely candidate process has been suggested to involve sonochemical activity, where reactive oxygen species mediate the generation of DNA single-strand breaks. Here however, we provide compelling new evidence that strongly supports a purely mechanical mechanism. Moreover, by a combination of specific assays (neutral comet tail and staining for γ H2AX foci formation) we demonstrate for the first time that US exposure at even moderate intensities exhibits DNA double-strand breaks, through its facility to generate DNA damage across multiple cancer lines. Notably, colocalization assays highlight that ionizing radiation and ultrasound have distinctly different signatures to their respective γ H2AX foci formation patterns, likely reflecting the different stress distributions that initiated damage formation.

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：超音波医科学

科研費の分科・細目：生体医工学・生体材料学

キーワード：超音波・DNA 損傷、二本鎖切断、リン酸化ヒストン H2AX、キャビテーション、フリーラジカル、DNA-PK

1. 研究開始当初の背景

医療分野において放射線や磁場とならび、超音波は画像診断に必須の手段として発達してきた。近年では超音波による加温療法や、集束超音波による癌焼灼療法などに代表さ

れるように、超音波の癌治療への応用が盛んに行われるようになってきた。超音波の生体作用として、アポトーシスの誘発や遺伝子発現の変化が明らかになってきた。また、遺伝

子導入や薬物送達(ドラッグデリバリー)および分子標的治療等の新たな視点から超音波の応用が期待されるようになってきている。そのため、超音波の安全性の検討および治療応用の両面から、DNA 損傷および損傷の誘発機構と細胞応答について検討する必要がある。

2. 研究の目的

超音波照射による細胞内DNA 損傷の実態を明らかにするとともに、その生成メカニズムを解明する。また、その修復に関する分子を調べる。

3. 研究の方法

細胞として、主にヒトリンパ腫細胞株 U937 を使用した。超音波照射には OG 技研製 ES-2 を用いた。ESR スピン捕捉法を用いて、放射線および超音波により産生される OH ラジカルの定量し、キャビテーションの指標とした。DNA 二本鎖切断の測定にはリン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) をフローサイトメトリーにて測定した。また、直接的な検出方法として、中性条件下でのコメットアッセイによる DNA 二本鎖切断の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 超音波による DNA 二本鎖切断の誘発

超音波がDNA 損傷を誘発することは試験管レベルでは古くから証明されており、実験室では集束超音波技術による高強度の超音波が、クロマチン免疫沈降法や次世代シーケンサーのライブラリー調製の際に必要な断片化DNAを得るためのツールとして用いられている。超音波による哺乳動物細胞でのDNA 損傷誘発の報告は1970年代からみられ、ヒトリンパ球での娘染色体交換や、マウスEMT6細胞での塩基損傷、ヒトリンパ球やCHO細胞でのDNA一本鎖切断などが報告されている。超音波がDNA 損傷を引き起こすメカニズムとしては、前述した水分子由来のフリーラジカル

の関与が示唆されている。これまでの超音波によるDNA 損傷に関しては、一本鎖切断や塩基損傷などの比較的軽微な損傷についてのみであったが、近年我々は、DNA 損傷の中で最も重要とされる、DNA 二本鎖切断が起こることを明らかにした。実験条件として、ヒトリンパ腫細胞株U937細胞に、超音波(1 MHz, Duty factor 10%、パルス繰り返し周波数100 Hz)を強度 0.3 W/cm^2 (ピーク音圧、 0.54 MPa , ONDA HNR-0500 ハイドロフォン測定時)で1分間照射した。

本条件は、以前に著者らの実験で、U937細胞における十数パーセント前後のアポトーシスと遺伝子発現変化を観察したものと同一である。照射による温度上昇は 1°C 未満であり、主に超音波の非熱作用による生物効果を反映しているといえる。放射線照射した細胞と同様、超音波照射30分後の細胞において、DNA 二本鎖切断のマーカである γ H2AXが検出された(図1)。照射強度を 0.1 W/cm^2 から段階的に上げた場合に、 0.1 W/cm^2 では γ H2AXの優位な増加は観察されなかったが、 0.2 W/cm^2 から陽性細胞が出現し、キャビテーション効果が明確に観察される 0.3 W/cm^2 、 0.4 W/cm^2 まで強度依存的にその割合が増加していった。X線照射とは異なり、強度をさらに上げた場合(0.5 W/cm^2 以降)はむしろ陽性細胞の割合が減少していたが、これは超音波が細胞融解を高頻度に起こす強度に到達したためと推測される。より直接的な検出方法として、中性条件下でのコメットアッセイによるDNA 二本鎖切断の検出を試みたところ、超音波照射直後の細胞におけるコメットテールの伸張を観察できた(図2)。H2AXリン酸化やコメットテールの伸張は、リンパ腫細胞株であるMolt-4、Jurkat、HL-60をはじめ、神経膠腫細胞株のM059K、子宮肉腫細胞株のMES-SAなど種々の細胞株において確認することができた。これら

の結果から、ある一定の強度の超音波が細胞内でもDNA二本鎖切断を引き起こしうる事が明らかとなった。超音波によりDNA二本鎖切断が起こることについては、癌治療への応用という観点からは新たな可能性が期待される一方で、診断領域での超音波の安全性が懸念されるようにも思える。

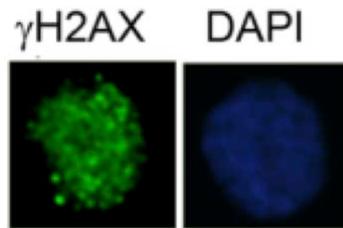


図 1. 超音波による DNA 二本鎖切断の誘発。超音波照射 30 分後に観察されるリン酸化ヒストン H2AX のフォーカス形成。

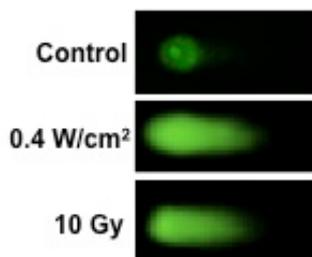


図 2. 超音波による DNA 二本鎖切断。超音波照射直後に観察されるコメットテール。陽性対照は X 線照射群。

しかしながら、本研究で用いた超音波の強度は診断領域で用いられるものよりはるかに強いこと（診断用超音波の強度は本条件の最低強度である 0.1 W/cm²を下回る）、また *in vitro*と異なり生体に照射した際にはキャビテーションが起きにくいことを考えると、少なくとも診断領域で用いられている超音波については、同様の損傷を起こすことはないと思われる。

(2) DNA 二本鎖切断のメカニズム

放射線は電離による直接作用とラジカル産生による間接作用によって、Bleomycinはキ

レート形成やラジカル産生によってDNA二本鎖切断を引き起こす。超音波の物理化学的な作用としては、非熱作用としてキャビテーションによる機械的作用や化学的作用が挙げられる。超音波によるDNA一本鎖への損傷誘発機構については、化学的作用が主に関与していると考えられていたため、筆者らは超音波によるラジカルの産生が二本鎖切断形成にも寄与しているかどうか検討した。まず ESR スピン捕捉法を用いて、放射線および超音波により産生されるOHラジカルの定量を行い比較した結果、同程度のγH2AXを誘発する線量および強度では、超音波によるOHラジカルの産生量は放射線と比べて低く、約 1/10 程度であった。ラジカルスカベンジャーの添加によってOHラジカルの産生は抑制されたが、H2AX陽性細胞の割合には影響が見られなかった。一方で、三原子分子ガスである亜酸化窒素(N₂O)を培地中に飽和させてキャビテーションを抑制すると、ヒストンH2AX陽性細胞はほぼ完全に消失した(図3)。

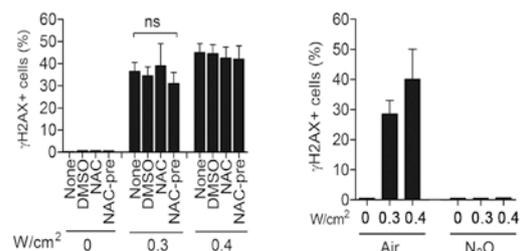


図 3. DNA 二本鎖切断の機構。

ラジカルスカベンジャー(DMSO: ジメチルスルホキシド、NAC: N-アセチルシステイン)の超音波誘発γH2AXへの影響。NACについては超音波照射直前および照射3時間前に添加した(NAC-pre)。右図はN₂Oによる超音波キャビテーションの抑制とγH2AX誘導の抑制を示す。培地中に空気(Air)もしくはN₂Oを飽和させて超音波照射し、30分後にγH2AXをフロー

サイトメトリーにて測定した。

このことから、超音波の機械的作用により核内の DNA 二本鎖切断が誘発されており、化学的な作用の寄与は非常に限定的である事が明らかとなった。超音波により活性化される DNA-PK の核局在を検討すると、核内でフォーカスを形成するもの以外にも、核膜に裏打ちするように局在するものがあることがわかった。H2AX リン酸化のシグナル伝達が既報のいずれの機構に当てはまらなかったのは、超音波の機械的刺激により核膜への損傷が引き起こされている結果であると推測される。このユニークな DNA-PK 応答の生物学的意義やメカニズムについては、今後の研究が期待される。

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 7 件)

- ① Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui ZG, Kagiya G, Kondo T, Doi N, and Feril LB Jr: Regulation of gene expression in human prostate cancer cells with artificially constructed promoters that are activated in response to ultrasound stimulation. *Ultrason Sonochem* 20: 460-467, 2013. (doi: 10. 1016/j. ultsonch. 2012. 05. 007) 査読有
- ② Furusawa Y, Fujiwara Y, Campbell P, Zhao Q-L, Ogawa R, Hassan MA, Tabuchi Y, Takasaki I, Takahashi A, and Kondo T: DNA double-strand breaks induced by cavitation mechanical effects of ultrasound in cancer cell lines. *PLoS One* 7: e29012, 2012. (doi:10. 1371/ journal. pone. 0029012) 査読有
- ③ Hassan MA, Furusawa Y, Minemura M, Rapoport N, Sugiyama T, and Kondo T: Ultrasound-induced new cellular mechanism involved in drug resistance. *PLoS One* 7: e48291, 2012. (doi:

10. 1371/ journal. pone. 0048291) 査読有

- ④ Furusawa Y, Fujiwara Y, Hassan MA, Tabuchi Y, Morita A, Enomoto A, and Kondo T: Inhibition of DNA-dependent protein kinase promotes ultrasound -induced cell death including apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Lett* 322: 107-112, 2012. (doi:10. 1016/j. canlet. 2012. 02. 020) 査読有
 - ⑤ Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, Hassan MA, Tabuchi Y, Nomura T, and Kondo T: Ultrasound activates ataxia telangiectasia mutated- and Rad-3 related (ATR)-checkpoint kinase 1 (Chk1) pathway in human leukemia Jurkat cells. *Ultrason Sonochem* 19: 1246-1251, 2012. (doi:10. 1016/j. ultsonch. 2012. 04. 003) 査読有
 - ⑥ Hassan MA, Ahmed IS, Campbell P, Kondo T: Enhanced gene transfection using calcium phosphate co-precipitates and low-intensity pulsed ultrasound *Eur J Pharmaceut Sci* 47: 768-773, 2012. (doi:10. 1016/j. j. ejps. 2012. 08. 007) 査読有
 - ⑦ Hassan MA, Furusawa Y, Zhao Q.L., Takasaki I, Ferl LB Jr., Tachibana K, Minemura M., Sugiyama T, and Kondo T: Differential cytotoxicity and sonosensitization by sanazole: Effect of cell type and acoustic parameters. *J. Med. Ultrasonics* 38: 65-72, 2011. (doi:10. 1007/s10396-010-0295-2) 査読有
- [学会発表] (計 8 件)
- ① Kondo T, Hassan MA, Zhao QL, Ogawa R, Tabuchi Y, and Furusawa Y: Roles of intracellular oxidative stress in DNA Damage and apoptosis induced by different physical stressors: ionizing radiation, hyperthermia and ultrasound. 28th RBC-NIRS International Symposium, Radiation-associated Repair Proteins and DNA Repair Network 2012, 11, 29-30, Kyoto, Japan.

- ② Feril LB, Tachibana K, Kondo T, Ogawa R, Cui ZG: Enhancement of ultrasound- or hyperthermia-induced cancer cell killing by antibacterial agents. The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (ICHO) & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine, 2012, 8, 28-31, Kyoto, Japan.
- ③ Hassan MA, Ahmed IS, Campbell P, Kondo T: Enhanced gene transfection using calcium phosphate co-precipitates and low-intensity pulsed ultrasound. The 39th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2012, 7, 15-18, Quebec, Canada.
- ④ Furusawa Y and Kondo T: Ultrasound induces DNA double strand breaks in genome DNA through the cavitation effects. The 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry and The International Workshop on Advanced Sonochemistry, 2011, 11, 2-4, Nagoya, Japan.
- ⑤ Feril LB Jr, Tachibana K, Yamaguchi K, Ikeda-Dantsuji Y, Kondo T, Tabuchi Y, Furusawa Y, and Takasaki I: Gene regulation and sonotransfection by low-intensity ultrasound resulting in melanoma inhibition. The 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry and The International Workshop on Advanced Sonochemistry, 2011, 11, 2-4, Nagoya, Japan.
- ⑥ Mariame MA, Furusawa Y, Minemura M, and Kondo T: Studies on the biological and chemical effects of ultrasound and microbubbles: implications in drug delivery and biosafety. The 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry and The International Workshop on Advanced Sonochemistry, 2011, 11, 2-4, Nagoya, Japan.
- ⑦ Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui ZG, and Kondo T: Effect of sonication on miRNA expressions and its application for gene expression control with ultrasound. The 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry and The International Workshop on Advanced Sonochemistry, 2011, 11, 2-4, Nagoya, Japan.
- ⑧ Buldakov MA, Hassan MA, Zhao QL, Cherdyntseva NV, and Kondo T: In vitro dependence of chemical and biological effects of low intensity pulsed ultrasound on pulse repetition frequency. The 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochemistry and The International Workshop on Advanced Sonochemistry, 2011, 11, 2-4, Nagoya, Japan.
- 〔図書〕 (計3件)
- ① 近藤 隆: 第9章 バイオ・医学への応用。音響サイエンスシリーズ, 7. 音響バブルとソノケミストリー。日本音響学会編集, 189-209, コロナ社、東京、2012。
- ② Feril LB Jr., Tachibana K, Kondo T, and Campbell P: Chapter 12: Sonodynamic Therapy in Therapeutic Ultrasound: Mechanisms to Applications (Public Health in the 21st Century), Editor, Frenkel V. 279-295, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011.
- ③ Furusawa Y, Fujiwara Y, Zhao Q-L, Hassan MA, Ogawa R, Tabuchi Y, Takasaki I, Takahashi A, Ohnishi T, and Kondo T: Ultrasound-induced DNA damage and signal transductions indicated by gamma H2AX. 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU2010) Editors, Matsumoto Y, Crum LA, and ter Haar GR, 322-325, AIP Conf Proc 1359, American Institute of Physics, New York, 2011.
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/radsci/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
近藤 隆 (KONDO TAKASHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授
研究者番号 : 40143937
- (2) 研究分担者
田渕 圭章 (TABUCHI YOSHIAKI)
富山大学・生命科学先端研究センター・准教授
研究者番号 : 20322109

趙 慶利 (ZHAO QING-LI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教
研究者番号 : 90313593

高崎 一郎 (TAKASAKI ICHRO)
富山大学・生命科学先端研究センター・助
教
研究者番号 : 00397176