

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340023

研究課題名(和文)放射線及びアルデヒド化合物が誘発する致死DNA損傷の解析

研究課題名(英文)Analysis of lethal DNA damage induced by ionizing radiation and aldehydes

研究代表者

中野 敏彰 (NAKANO, TOSHIAKI)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：10526122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線や変異原物質は、致命的な損傷としてDNA二本鎖切断(DSB)を生成する。しかし、DSBと同時に生成するDNA-タンパク質クロスリンク(DPC)及びDNA鎖間架橋(ICL)の細胞致死に対する寄与は明らかではない。本研究では、X線照射及び変異原物質(アルデヒド)処理した細胞の致死に対するDPC・ICLの寄与を検討した。アルデヒドによる細胞致死には、DNA損傷に依存する機構と依存しない機構があり、前者ではICLの関わりが示された。X線照射による細胞致死の場合、常酸素細胞ではDSBが重要であるが、低酸素性細胞ではDPCが残留し、DSBに加えDPCが細胞死に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA double strand breaks (DSBs) are the most critical DNA lesions for cell death. However, other lethal lesions such as DNA-protein cross-links (DPCs) and DNA interstrand cross-links (ICLs) are produced by DNA damaging agents. Here we estimated the roles of DPCs and ICLs in the lethal events of cells upon exposure to aldehydes and X-rays. DNA repair was essential for alleviating the cytotoxic effect of weakly toxic aldehydes such as saturated aldehydes. Our data also suggest that ICLs are the critical cytotoxic DNA damage induced by aldehydes. X-rays produced more DPCs in hypoxic tumors than in normoxic tumors. X-rays generated two types of DPC that differed according to their rate of removal from the genome. The half-lives of the rapidly removed components of DPCs and DSBs were similar, but those of the slowly removed components of DPCs were markedly different. The long half-life and abundance of the slowly removed DPCs may exert deleterious effects on cells in conjunction with DSBs.

研究分野：分子生物

キーワード：損傷 DNA修復 生物影響

1. 研究開始当初の背景

1) アルデヒドが誘発する DNA

アルデヒド化合物は遺伝毒性と細胞毒性を示すことが知られており、アテローム性動脈硬化やファンconi貧血などの様々な疾病への関与が示唆されている。アルデヒドの遺伝毒性は DNA 損傷に由来し、塩基付加体、DNA 二本鎖切断 (DSB)、DNA-タンパク質クロスリンク (DPC)、DNA 鎖間架橋 (ICL) など多様な損傷が生成することが知られている。しかし、どの損傷がアルデヒドの細胞毒性にそれぞれどの程度寄与しているかは明らかにされていない。

2) 放射線が誘発する DNA 損傷

放射線の致死作用は、主にゲノムに生じた DSB に由来するが、低酸素性細胞における DSB 生成量は、常酸素細胞に比べ顕著に減少する。同時に、低酸素性細胞では、常酸素細胞では認められない特徴的なゲノム損傷として DPC が生成する。しかし、低酸素性細胞特異的に生じる放射線誘発 DPC 損傷が DSB に加えどの程度細胞死やゲノム不安定性に寄与するかは明らかにされていない。この点は、腫瘍組織に含まれる低酸素性細胞の放射線応答を考える上でも興味深い問題である。

2. 研究の目的

放射線やアルデヒドは、致死損傷として DSB や DPC や ICL を誘発するが、これらの全体量を調べた研究はなく、実際にどの損傷が細胞に対して主要な致死効果を及ぼしているのか明らかにされていない。そこで本研究では、放射線照射及び変異原物質 (アルデヒド) 処理した

細胞における DSB、DPC、ICL の初期誘発とゲノムからの除去動態を同時にモニターし比較することにより、細胞致死に対する DSB、DPC、ICL の寄与を見積もった。

3. 研究の方法

1) 細胞毒性に対するアルデヒド化合物の影響

アルデヒド化合物 (飽和、短鎖、不飽和、および長鎖、不飽和アルデヒド) でハムスター由来 AA8 および、ヒト MRC5 細胞を処理し、コロニー形成法により 10% 生存率を与える濃度を求め細胞毒性を比較した。細胞は DNA 修復機構欠損細胞 (ヌクレオチド除去修復機構欠損、騒動組み換え修復欠損、FANC 修復機構欠損) を用いることによって、細胞毒性に対する DNA 損傷の寄与について検討した。

2) DNA 損傷の分析方法

DSB の分析 : スタティックフィールド電気泳動で分析した。処理後の細胞をアガロースプラグに包埋する。界面活性剤で細胞を溶解し、プロテアーゼで除タンパク後、プラグ中の DNA を電気泳動した。プラグから溶出した DNA と全 DNA の比から DSB の変動を解析した。DPC の分析 : 蛍光物質標識法を用いて解析した。処理後の細胞を回収し、ゲノム DNA を密度勾配遠心法によって単離精製した。クロスリンクタンパクを蛍光物質で標識して蛍光強度を測定し、蛍光強度の変化から DPC の変動を明らかにした。ICL の分析 : DSB や DPC のように定量方法がないことから、DNA 修復欠損細胞を用いて、アルデヒドや放射線に対する感受性を比較し、その結果から細胞致死に関わる主要

なゲノム損傷を遺伝学的に推測した。

3) 放射線照射腫瘍の DNA 損傷解析

C3H/He マウスの下肢大腿部に SCCVII 細胞を移植し、腫瘍サイズが約 10 mm になるまで成長させた。マウスの大腿部を輪ゴムで結紮し人為的に低酸素状態にした腫瘍、および、結紮しない常酸素状態の腫瘍を X 線照射した。照射後、腫瘍を常酸素状態に戻し、経時的に腫瘍を摘出した。腫瘍をホモジェナイズ後、CsCl 密度勾配超遠心で DNA を精製し、DPC に含まれるタンパク質を蛍光物質で標識し、上記のアルデヒド処理と同様な方法で DPC を分析した。DSB は、トリプシン処理で腫瘍細胞を分散し、スタティックフィールド電気泳動で分析した。

4 . 研究成果

1) アルデヒドの結果と考察

本研究では、変異原物質としてアルデヒド化合物に注目し、修復欠損細胞の感受性および細胞における致死損傷の誘発に基づき、細胞致死に対する DSB、DPC、ICL の寄与を検討した。MRC5-SV 細胞を単純アルデヒド (formaldehyde, FA)、飽和アルデヒド (acetaldehyde, AA ; propionaldehyde, PA)、短鎖、不飽和アルデヒド (trans-2-pentenal, PET)、長鎖、不飽和アルデヒド (4-hydroxynonenal, HNE) で処理し、10%生存率における DSB および DPC 誘発を調べた。DSB 誘発はすべてのアルデヒドで認められたが、処理後 24-48 時間に起こるアポトーシスに由来していた。単純アルデヒド (FA) および短鎖・長鎖、不飽和アルデヒド (PET、HNE) は DPC を誘発したが、飽和アルデヒド (AA、PA) は DPC を誘発しなかった。ICL 誘発につ

いては、相同組換え修復 (HRR) 欠損および XPF 欠損 CHO 細胞の感受性を指標とした。両細胞は、FA 及び AA に高感受性を示したが、PET 及び HNE には弱い感受性しか示さなかった。ファンコニ貧血修復経路欠損細胞も FA 及び AA に高感受性を示したが、PET 及び HNE には弱い感受性しか示さなかった。以上の結果から、アルデヒドによる細胞致死には、DNA 損傷に依存する機構と依存しない機構があることが明らかになった。さらに、DNA 損傷に依存する細胞致死には、ICL が関わっていることが示された。

2) 放射線処理の結果と考察

常酸素・低酸素腫瘍ともに、X 線の照射線量 (0-60 Gy) に比例して DPC 量は増加した。DPC 生成の線量依存直線の勾配から DPC 生成効率を比較したところ、低酸素腫瘍における DPC 生成効率は常酸素腫瘍に比べ 2.8 倍高かった。この傾向は、これまでに得られている酸素の影響と一致した。つぎに、X 線照射 (40 Gy) した腫瘍における DPC の除去 (修復) 動態を、DyLight 550 標識により調べた。照射した腫瘍では、常酸素・低酸素ともに DPC は時間とともに二相的に減少した。DPC の時間依存的な減少は、二重指数関数モデルでよく近似され、そのパラメータ解析から、速やかに除去される DPC (半減期 0.65 h) の割合が約 32%、ゆっくり除去される DPC (半減期 70 h) の割合が約 68%と推定された。一方、DSB については、速やかに除去される DSB (半減期 0.18 h) の割合が約 51%、ゆっくり除去される DSB (半減期 3.9 h) の割合が約 49%と推定された。この結果から、低酸素性細胞では DPC が残留し、放射線誘発細胞死に DSB に加え DPC が関わっている可能性が示唆された。

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 3 件)

1) Nakano, T., Xu Xu, Salem, A. M., and Ide, H. Radiation-induced DNA-protein cross-links: Mechanisms and biological significance, Free Radic Biol Med S0891-5849(16), 31075-9. (2017)(査読あり)

2) Xie, M. Z., Shoulkamy, M. I., Salem, A. M., Oba, S., Goda, M., Nakano, T., and Ide, H. Aldehydes with high and low toxicities inactivate cells by damaging distinct cellular targets, Mutation Research 786, 41-51, (2016) (査読あり)

3) Nakano, T., Mitsusada, Y., Salem, A. M., Shoulkamy, M. I., Sugimoto, T., Hirayama, R., Uzawa, A., Furusawa, Y., and Ide, H. Induction of DNA-protein cross-links by ionizing radiation and their elimination from the genome, Mutation Research 771,45-50, (2015), (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1) Toshiaki Nakano, et al. (4名) アルデヒドが誘発するゲノム損傷、第39回日本分子生物学会、2016年11月30日～12月2日、神奈川県横浜市

2) Toshiaki Nakano, et al. (5名) Analysis of DNA-protein cross-link induced by aldehydes, 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 20-24 March 2016, Melbourne, Australia

3) Toshiaki Nakano, et al. (5名) DNA損傷依存のおよび非依存的なアルデヒドの細胞毒性発現機構、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27日～28日、福岡県福岡市

[図書] (計 1 件)

1) Ide, H., Nakano, T., Shoulkamy, M. I., and Salem, A. M, Formation, Repair, and Biological Effects of DNA-Protein Cross-Link Damage, In Advances in DNA Repair,43-80,(2015)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/genec hem/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野 敏彰 (NAKANO, Toshiaki)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号 10526122