

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 28 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740023

研究課題名(和文)重粒子線によるDNA二重鎖切断修復特異的に働くユビキチンリガーゼの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of a ATM-RNF8 dependent NHEJ pathway in tumor quiescent cells following heavy ion irradiation.

研究代表者

中島 菜花子 (Nakajima, Nakako)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・研究員(任常)

研究者番号：50402863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療では、がん細胞のDNA修復機構は治療効果を妨げるためDNA修復の人為的制御が望まれる。重粒子線は照射対象に集中的にエネルギーを付与する高LET(線エネルギー付与)の性質を持つ放射線であり、重粒子線によるDNA損傷は末端が複雑な二重鎖切断が形成され、修復されにくい。当課題では、重粒子線によるDNA損傷であっても、休止期のがん細胞では、ゆっくりと修復されることを見だし、その修復経路に特徴的に働く因子群を特定した。特に、ヒストン修飾酵素RNF8が特異的に働くことと、RNF8の機能阻害に放射線治療の効果を高め、がんの再発を防ぐ効果が期待できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Heavy ions induce multiple closely localised double strand break sites (Clustered DSBs). The clustered DSBs are repaired dependently by E3 ubiquitin ligase RNF8. RNF8 is known as a DNA repair factor within the heterochromatin (HC) region. We found that HC-building factor siKAP1 did not affect the repair defect in RNF8 knockdown cells post Fe ions irradiation. This suggests that RNF8 is required for clustered DSBs repair following heavy ion irradiation not only in HC-regions but also in euchromatin regions. It is also known that RNF8 recruits 53BP1 and BRCA1 to DSB sites. The repair of clustered DSBs in 53BP1 knockdown cells were impaired to similar levels as the defect in RNF8 knockdown cells, whereas no repair defect was observed in BRCA1 knockdown cells. Taken together, clustered DSBs induced by heavy ions are repaired by RNF8-53BP1 dependent pathway.

研究分野：生物学

キーワード：放射線 重粒子線 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

DNA に生じた損傷は DNA 修復機構によって速やかに修復される。DNA 修復の異常は、細胞死・細胞老化・体細胞突然変異を引き起こし、発がんの原因になる。放射線治療においては、がん細胞が持つ DNA 修復機構は放射線抵抗性を引き起すため治療の妨げになる。

DNA 損傷のタイプには一本鎖切断・塩基損傷・二重鎖切断があり、それぞれに働く修復機構は異なる。DNA 二重鎖切断は最も細胞死を引き起す頻度が高い重篤な損傷であり、主に非相同末端連結(NHEJ)又は相同組換え修復(HR)の経路により修復される。DSB 誘発後、細胞は最適な DSB 修復経路を選択する必要がある、その欠如は細胞の遺伝子不安定性及びがん化を引き起こす。実際に乳がん細胞においては、両経路間の不均衡が報告されている。細胞周期・クロマチン構造・DSB 末端構造の複雑性などのいくつかの条件が DSB 修復経路選択決定に関わることが知られているが、特になぜ「DSB 末端構造の複雑性」が DSB 修復経路決定に影響するかについては未だ多くが解明されていない。放射線誘発 DSB は放射線が有する線エネルギー付与 (LET: Linear Energy Transfer) により切断端及び周辺の形状が異なり、それぞれの損傷に適した DNA 修復反応が行われると考えられる。放射線の種類を LET により大きく分類すると、光子線(X 線)と粒子線(アルファ・炭素・鉄線等)に分けられる。前者は LET が低く、後者は LET が高いため複雑な末端構造を有する DSB を誘発することが物理学的シミュレーションから導かれている。一般的な DSB 修復分野においては光子線照射後の DNA 損傷応答について研究が行われ、現在まで多くの知見が得られている。しかしながら粒子線照射後の DSB はその形状のみならず修復機構も異なると考えられ、実際にその DSB 修復機構は長く未解明であった。近年、G2 期細胞に重粒子線を照射した場合、X 線とは異なり HR が優位になることを見出し、DSB 末端構造の複雑性と DSB 修復選択性の間に大きな関連性が示された(Shibata et al., EMBO J, 2011, Yajima et al., DNA repair, 2013)。重粒子線照射誘発 DSB に対する修復経路選択性の変動は、その特性である DSB 末端構造の複雑性が原因であると考えられる。HR 経路は DSB end resection(DSB 末端の削り込み)により開始されるが、重粒子線誘発 DSB の末端では高電子密度による末端塩基配列や DNA バックボーンが高度に崩壊していると想定されるため、DSB 末端配列のプロセッシングが必要とされると想定されている。従って、X 線誘発 DSB とは異なる修復経路が用いられる重粒子線誘発 DSB 末端では、通常とは異なる機序で修復分子が働いていると考えられる。

2. 研究の目的

重粒子線によって誘発される複雑な DNA 損傷後に働く DNA 修復経路を明らかにし、

その経路に必須の因子の分子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 重粒子線照射後の遅緩型 DNA 修復

重粒子線による DNA 損傷は修復効率が悪く、増殖中の細胞では、DNA 損傷を残したままチェックポイントアレストが解除し、細胞は分裂期に入り、Mitotic Catastrophe を引き起す(Nakajima NI et al., PLOS ONE, 2013)。このことは重粒子線の生物効果が高い理由の一つと考えられるが、その後、残存した DNA 損傷が修復されるかどうかは検証されていなかった。当課題では、ヒト肺がん細胞 A549 を血清飢餓法によって G0 期:休止期に同調し、重粒子線 (炭素線 LET70keV/ μm , 鉄線 LET200keV/ μm) を照射して照射後 4 日後までの遅い修復を観察した。DNA 二重鎖切断は、マーカーとしてリン酸化 H2AX(γ H2AX)を蛍光標識抗体で標識し、蛍光顕微鏡下で観察した。また G0 期であることを確認するため、細胞周期マーカーとして CENP-F 抗体と DNA 合成期に DNA に取り込まれる EDU にて細胞を標識し、CENP-F と EDU 共に陰性の細胞のみ解析した。また、現象の普遍性の確認のため、ヒト繊維芽細胞を同様に G0 期に同調し解析した。

(2) 遅緩型修復の経路解析

休止期の細胞内では、主に NHEJ 経路が働く。当課題では、重粒子線照射後の遅緩型 DNA 修復が NHEJ 経路であるかどうかを検証した。NHEJ 経路には DNA-PKcs が必須であるため、DNA-PK 阻害剤 NU7441 で(1)の細胞を処理し、DNA 修復効率への影響を解析した。次に、NHEJ が ATM (毛細血管拡張性運動失調症変異遺伝子産物)依存性であるかどうかを同様の方法で検証した。ATM は HR の初期に必須の因子であるが、NHEJ の中に、ATM 依存性経路が存在することが 2004 年に Riballo らによって報告されている。

(3) 遅緩型修復経路における ATM の分子機能

ATM は HR 修復経路においては、ATM によってリン酸化される FHA(Forkhead associated domain) 部位を有している MDC1(Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) とユビキチンリガーゼ RNF8 をリン酸化する。当課題では、A549 の MDC1 と RNF8 を RNAi 干渉法にてノックダウンし、重粒子線照射後の DNA 損傷修復への影響を解析した。さらに、RNF8 に DNA 損傷部位にリクルートされる DNA 修復因子 53BP1 と BRCA1 をそれぞれノックダウンした細胞の DNA 修復効率を解析し、遅緩型修復経路の全容の解明を試みた。siRNA は 2 種類のシークエンスを使用し、オフターゲット効果ではないことを確認した。

(4) 遅緩型修復経路の選択を誘導する DNA 損傷の複雑性の解析

HR の初期過程では、DNA 損傷末端の複雑性に依存して、CtIP 依存的に DNA 末端の削

り込み (Resection) が亢進する。RPA のリン酸化は Resection のマーカーとなっている。遅延型修復経路の、Resection 過程への依存性を、CtIP のノックダウンが DNA 修復効率への影響解析と RPA のリン酸化をウェスタンブロットにて解析した。また、遅延型修復経路選択に、DNA 末端結合タンパク、KU80 が影響するか解析した。

(5)ヘテロクロマチン領域の修復

ATM-RNF8 は HR 経路においては、ヘテロクロマチン領域の修復に関わると言われている。重粒子線照射後の遅延型修復経路が、損傷部位のクロマチン構造に依存するかを、ヘテロクロマチン形成タンパク KAP1 および HP1 を阻害した細胞を作成し、解析した。

(6)MMEJ との相違性

NHEJ の代替経路として Backup-NHEJ や alternative-NHEJ と呼ばれる MMEJ(microhomology-mediated end joining)経路と、重粒子線照射後の遅延型修復経路との関連性を解析した。MMEJ 経路に必須の XRCC1 の発現阻害と、PARP の阻害剤による遅延型修復経路への影響を解析した。

(7)遅延型修復による染色体異常

NHEJ は間違った修復:エラーを起こし易い修復経路であることは知られている。遅延型修復におけるエラーの頻度と、FISH 法にて解析した。

(8)遅延型修復が生存率に与える影響

遅延型修復は重粒子線照射後のがん細胞の生存率に影響するかを、コロニー形成法と MTT 法により検討した。RNF8 の機能阻害として、プロテアソーム阻害剤により細胞内のユビキチンを枯渇させ、ユビキチン化を阻害した細胞に重粒子線を照射し生存率への影響を測定した。

4. 研究成果

(1)重粒子線照射後の遅延型 DNA 修復

休止期に同調した細胞を解析することによって、遅い修復の解析が可能になった。重粒子線には低 LET の放射線も混在しているため、照射後～8時間までは、X線照射によって誘導された DSB と同様に、急速に修復された。8時間後に残存した DSB の修復は修復効率が著しく低下したが、8時間後から 96時間後までの DSB を観察すると、時間経過に従って、DSB が消失していた(図1)。このようなゆっくりした DSB の消失は高線量においても同様の現象が確認された。またヒト繊維芽細胞においても観察された。すなわち、高 LET の複雑な DSB であっても、休止中の細胞内において、ゆっくりと修復されることが確認された。

(2)遅延型修復の経路解析

G0 期では姉妹染色分体が存在しないため、主な DNA 修復経路は NHEJ である。照射直後から 8時間後までの修復は NHEJ であると考えられたが、8～96時間以降の遅延型修復経路が NHEJ であるかどうかを NHEJ の阻

害剤によって検証した。重粒子線照射後の修復は、早期の修復も遅い修復も DNA-PK 阻害剤(NU7441)によって、阻害された(図2)。課題代表者が 2013 年に発表した報告においても、重粒子線照射後の修復は、NHEJ 必須の因子 XLF に依存性があった。これらのことから、重粒子線照射後の遅延型修復経路は NHEJ であることが示唆された。次に、ATM 阻害剤(KU55933)存在下で、重粒子線照射後の DSB を観察すると、早期の修復には阻害が認められず、遅延型修復にのみ阻害効果が認められた(図2)。このことから、遅延型修復経路は ATM 依存性 NHEJ であることが強く示唆された。

図1. 休止期肺がん細胞内 γ H2AXフォーカス数の経時変化

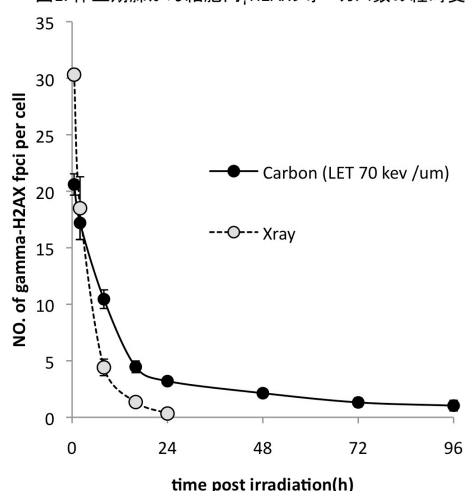
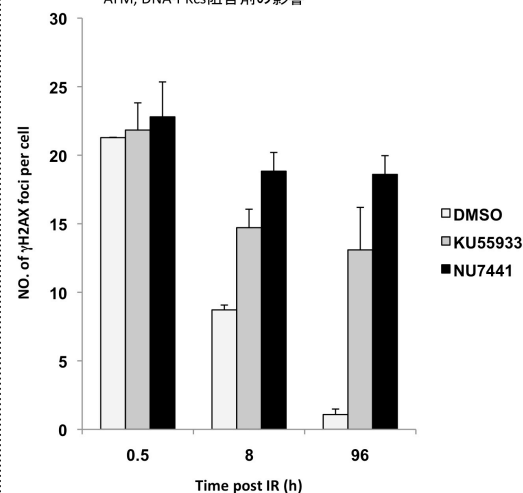


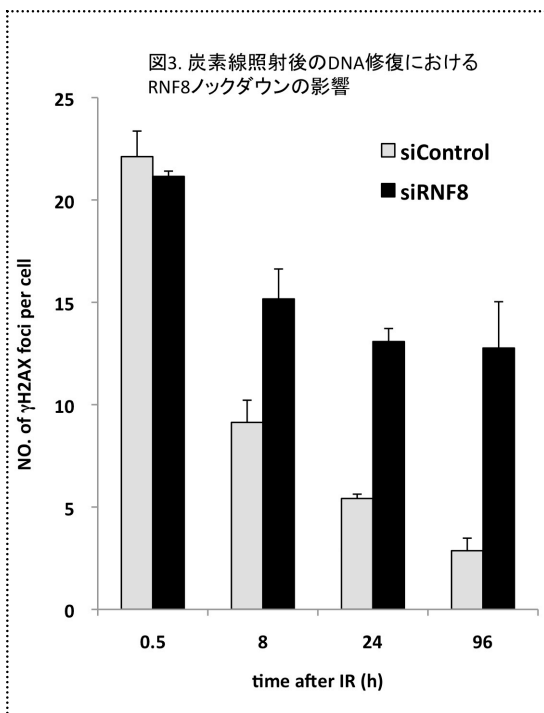
図2. 炭素線照射後のDNA修復における ATM, DNA-PKcs阻害剤の影響



(3)遅延型修復経路における ATM の分子機能

ATM のリン酸化部位を持つ MDC1 と RNF8 のノックダウンの遅延型修復への影響を同様に解析した。MDC1 をノックダウンした細胞では、遅延型修復の効率が上昇した。RNF8 ノックダウンでは早期の修復へは影響がなかったが、遅延型修復は ATM 阻害剤存在下と同様に著しく阻害された(図3)。この結果、

重粒子線照射後の遅緩型修復は ATM-RNF8 依存性修復経路であることが明らかになった。RNF8 は、リン酸化 MDC1 に損傷部位にリクルートされて働くユビキチンリガーゼとして知られているが、遅緩型修復は、RNF8 が MDC1 非依存的にリン酸化されて機能するユニークな経路であることが示唆された。さらに、RNF8 の機能を検討した。RNF8 は損傷部位に 53BP1 および BRCA1 をリクルートすることが報告されている。遅緩型修復は、BRCA1 ノックダウンには影響を受けず、53BP1 ノックダウンによって、阻害された。すなわち、RNF8 は 53BP1 を損傷部位にリクルートすることで機能していることが分かった。



(4)遅緩型修復経路の選択を誘導するDNA損傷の複雑性の解析

遅緩型修復経路の初期過程に、重粒子線に誘導されるDNA損傷の末端の複雑性が依存するかを検討した。HR および MMEJ 経路の初期過程では、DNA 末端の削り込み Resection が起る。課題代表者らは、重粒子線照射によって、Resection のマーカーである RPA のリン酸化が亢進することを過去に報告している。しかし、休止期細胞においては、重粒子線照射によって RPA のリン酸化の増加は認められなかった。また、Resection に必須の因子、CtIP ノックダウンは遅緩型修復経路に影響しなかった。

(5)ヘテロクロマチン領域の修復

HR においては、ATM-RNF8 は、ヘテロクロマチン領域の DNA 損傷部位のクロマチンの弛緩に働くことが報告されている。ヘテロクロマチン形成タンパク KAP1 をノックダウンした細胞の重粒子線照射後の修復を観察したが、KAP1 ノックダウンによる、遅延型

修復の阻害は認められなかった。

(6)MMEJ との相違性

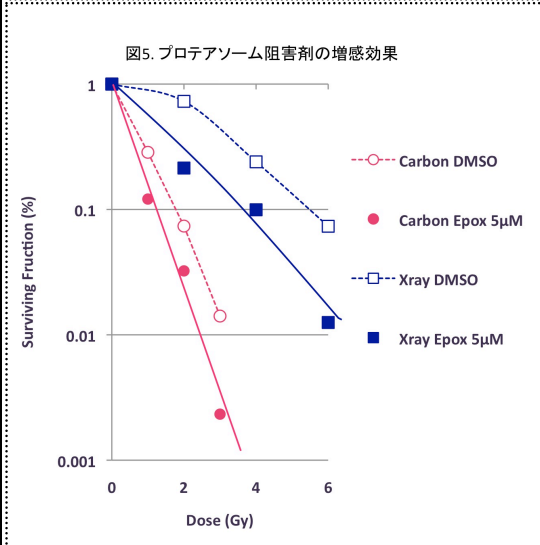
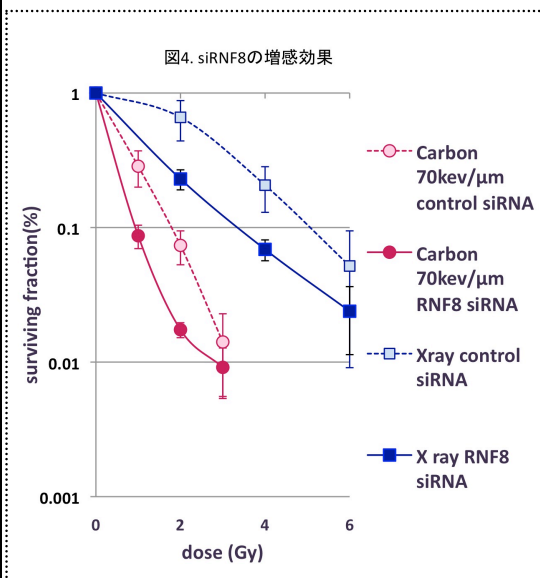
MMEJ に必須の因子、XRCC1 と PARP の欠損による遅延型修復に対する阻害は認められなかった。53BP1 依存性の MMEJ の報告があるが、重粒子線照射後の遅緩型修復とは異なる経路であることが示唆された。

(7)遅緩型修復による染色体異常

重粒子線照射 96 時間後に再増殖したがん細胞では、染色体異常の増加が認められた。染色体異常は ATM と RNF8 に依存性が認められた。

(8)遅緩型修復が生存率に与える影響

重粒子線照射後のヒト肺がん細胞の生存率は、siRNF8(図 4)およびプロテアソーム阻害剤(Epox, 図 5)によって、低下を認めた。これらのことから、RNF8 の機能を阻害することで、重粒子線治療の効果を高め、がんの再発を防ぐことができると期待される。



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 0 件)

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 中島 菜花子、「休止期細胞の DNA 修復機構」、第 19 回癌治療増感研究シンポジウム、2017 年 2 月 4 日、奈良県文化会館、奈良県奈良市

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 菜花子 (Nakako Izumi Nakajima) ,
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・放射線障害治療研究部・研究員

研究者番号：50402863

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

矢島 浩彦 (Hirohiko Yajima) ・国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・放射線障害治療研究部・主任研究員

研究者番号：30261895

柴田 淳史 (Atsushi Shibata) ・群馬大学・先