

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19835

研究課題名(和文) Hprt遺伝子座の欠失パターンを指標にした重粒子線のトラック構造の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the truck structure of the heavy particle beam using the deletion pattern in the hprt gene

研究代表者

小原 麻希 (OBARA, Maki)

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・業務補助員(任非)

研究者番号：80736992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は重粒子線がもたらす大きな生物効果を明らかにすることを目的としている。重粒子線誘発フリーラジカルの寄与を明らかにするため、OHラジカル除去剤としてDMSOを用い、hprt遺伝子座における突然変異誘発頻度と突然変異体の欠失パターンを調べた。突然変異誘発における間接作用の寄与率は、X線で約80%、炭素線で約50%となり、重粒子線においても間接作用の関与が少なくないことが示唆された。突然変異体におけるhprt遺伝子の欠失パターンを調べると、重粒子線ではフリーラジカル除去の有無に関わらず同様の欠失パターンを示し、重粒子線誘発突然変異体は直接作用が主要因であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aims to investigate the contribution of the indirect action to the mutation induction using DMSO in cells irradiated with X-rays or carbon-ion beam to ascertain the profound biological effects by the heavy particle beam. The mutation induction was detected as 6-thioguanine-resistant colonies at the hprt locus and the deletion pattern of exons in the hprt gene was analyzed by the multiplex polymerase chain reaction. The contribution of the indirect action of X-rays on the mutation frequency was approximately 80%, and both contributions of low- and high-LET carbon ions were approximately 50%. The total deletion rate was approximately 60% in cells irradiated with carbon ions. When combined with DMSO in carbon ions-irradiated cells, the total deletion rate remained persistent. These results demonstrated that the indirect action of carbon ions was unlikely to exert a substantial impact on the gene deletion pattern of carbon ions-induced mutants.

研究分野：放射線生物学

キーワード：重粒子線 突然変異 間接作用

1. 研究開始当初の背景

放射線によって引き起こされる生物影響の程度は、重粒子線やX線といった放射線種や線質の違い、それらがもたらすフリーラジカル量ならびにDNA修復能や細胞周期などに強く影響される。重粒子線はX線などの光子放射線よりもLETが高く、RBEが大きい。そのため、放射線抵抗性の難治性がんに対して非常に有効な放射線であることが知られている。放射線生物学的には重粒子線がもたらす大きいRBEは、粒子トラックに沿って複雑かつ複数の損傷が密に生成し、それらが修復困難な致死損傷となるためと考えられている。重粒子線による細胞致死効果には重粒子線のエネルギーが直接DNAに付与される直接作用が、主体的に関与していることが報告されているが、重粒子線がもたらす重篤な損傷の実態把握は未だに完全には明らかにされていない。そのため、本研究では重粒子線による突然変異誘発に着目し、未だ明らかにされていない粒子トラック構造とDNA損傷の関係を明らかにすることを目的とした。重粒子線による重篤な損傷に関する知見は、重粒子線治療の有効性を示す基礎知見となり、X線治療にどのような効果を組み合わせれば重粒子線のような生物効果をもたらすことができるのかを導くための重要な知見である。

2. 研究の目的

本研究は、重粒子線のトラック構造とDNA損傷との関係を明らかにすることを目的としている。*hprt* 遺伝子座における突然変異誘発頻度を調べ、さらにその欠失パターンを生物影響の指標として粒子線線質の違いおよび放射線誘発フリーラジカルの寄与の関係を明らかにすることで、粒子線のトラック構造を放射線化学ならびに放射線生物学の視点から解明するため、以下のことを目的とする。

(1) X線と低および高LET炭素線の*hprt* 遺

伝子座における突然変異誘発頻度を求め、炭素線の突然変異誘発におけるRBEならびにLET依存性を明らかにする。

(2) X線と低および高LET炭素線の*hprt* 遺伝子座の欠失パターン解析を行う。

(3) OHラジカル除去剤を用いて放射線誘発突然変異頻度へのOHラジカルの寄与を求め、*hprt* 遺伝子座の欠失パターンとOHラジカルの関連を調べる。

3. 研究の方法

(1) 放射線誘発突然変異頻度測定

使用する細胞はチャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞を用いる。突然変異体検出の指標として*hprt* (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) 遺伝子を使用し、6-TG (6-thioguanine) により突然変異体のみを選択的に生存可能にする。突然変異形成のため放射線照射後、適宜継代しながら10日間培養する。照射10日後、トリプシン処理により細胞を回収し、突然変異頻度(MF: mutation frequency)を算出するため、6-TGを添加した培養液を用いてコロニー形成法を行う。同時に、コロニー形成効率(PE: plating efficiency)を算出するために、通常の培養液を用いてコロニー形成法を行う。12日間培養を行い、細胞の固定・染色後にコロニー数を数え、PEとMFを算出する。MFはPEで補正し、非照射のMFとの差を求めることにより放射線誘発突然変異頻度を算出する。

重粒子線は放医研HIMACから供給される炭素線(LET:13~100 keV/μm)を用いる。LETが14 keV/μmの炭素線を低LET炭素線、90 keV/μmの炭素線を高LET炭素線として使用して重粒子線誘発突然変異頻度を算出し、突然変異誘発のLET依存性を明らかにする。また、X線と炭素線の結果を比較し、放射線誘発突然変異に対する炭素線のRBEを求める。

(2) 放射線の直接作用・間接作用による突然変異誘発への影響

OH ラジカル除去剤である DMSO を用いて OH ラジカルの突然変異誘導への影響を調べる。DMSO は照射約 1 時間前に処理し、細胞に取り込ませる。DMSO 処理後、(1)と同様の方法を行い、放射線誘発突然変異頻度を算出する。放射線による間接作用への寄与が求められる先行研究(K. Shinohara *et al.*, 1996) を基に、DMSO 濃度と突然変異頻度の関係から DMSO による突然変異への最大保護率を算出し、X 線の間接作用による突然変異誘導への寄与率を算出する。

(3) 放射線誘発突然変異体の変異型解析

放射線照射後に 6-TG により選択的に突然変異体にコロニー形成を行わせる。形成されたコロニーからシングルコロニーをピックアップし、適度に増殖させた後、DNA 抽出を行う。抽出した DNA を鋳型として Multiplex PCR を行い *hprt* 遺伝子の全ての exon 領域を増幅させ、電気泳動を行うことにより *hprt* 遺伝子の欠損状態を調べる。X 線と炭素線による突然変異体の変異型や DMSO 処理・非処理時の変異型を比較することにより、重粒子線特異的な突然変異体形成の有無を明らかにする。

参考文献

K. Shinohara, H. Nakano, H. Ohara, Detection of Auger enhancement induced in HeLa cells labeled with iododeoxyuridine and irradiated with 150 kV X-rays, *Acta Oncol*, 35, 1996, 869–875.

4. 研究成果

(1) 放射線誘発突然変異頻度と間接作用寄与

X 線誘発突然変異頻度は線量依存的に増加したが、炭素線誘発突然変異頻度は低 LET

では 6Gy、高 LET では 2Gy で最大値を示した。また、炭素線の RBE は高 LET 炭素線で 6.69 となった。細胞致死における炭素線の RBE は 2~3 であるため、高 LET 炭素線による突然変異への効果は非常に大きいと考えられた。

突然変異頻度が最大となる線量で DMSO により OH ラジカルを除去した場合、X 線では DMSO 濃度依存的に突然変異頻度は減少した。高 LET 炭素線では DMSO により突然変異頻度は減少したが、DMSO 濃度依存的な変化は観察されなかった。突然変異における間接作用の寄与率を算出すると、X 線で約 80%であり、炭素線では約 50%と見積もられた。放射線による間接作用の寄与は高 LET 放射線になると減少はするが、重粒子線においても間接作用が 40%以上関与することが示唆された。

表 1. RBE と間接作用寄与率

	X 線	低 LET 炭素線	高 LET 炭素線
線量(Gy)	9	6	2
RBE	-	1.08	6.69
間接作用(%)	78±9	56±19	48±5

(2) 放射線誘発突然変異体の変異型

放射線誘発突然変異体において *hprt* 遺伝子の欠失パターンを point mutation(遺伝子欠失はない点突然変異)、partial deletion(exon の一部欠失)、total deletion(全ての exon 欠失)に分類した。非照射時における欠失パターンは point mutation が 60%、partial deletion が 37%、total deletion が 3%と欠失は少ない。X 線照射時は point mutation が 55%、total deletion が 25%と欠失が増え、炭素線照射時は total deletion が約 60%と exon 欠失の増加を示した。

フリーラジカルを除去すると DNA 損傷量が減少し、放射線への防護効果を示す。OH

ラジカル除去により放射線誘発突然変異頻度が減少したため突然変異体の欠失も減少すると予想したが、X線照射においても炭素線照射においても DMSO 処理時の total deletion は減少しなかった。特に、重粒子線では OH ラジカル除去の有無に関わらず同様の欠失パターンを示し、重粒子線による突然変異体は OH ラジカルによる間接作用ではなく、直接作用が主要因と考えられた。

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)

[学会発表](計 6 件)

小原 麻希、鷗澤 玲子、平山 亮一、長谷川 純崇、重粒子線誘発突然変異におけるフリーラジカルの影響、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017.10.27、京葉銀行文化プラザ (千葉県)

Maki Obara, Ryoichi Hirayama, Akiko Uzawa, Sumitaka Hasegawa, Contribution of indirect action to high-LET radiation-induced cell lethality and mutation, 56th Annual Conference of the Particle Therapy Co-Operative Group, 2017.5.12, パシフィコ横浜 (神奈川県)

小原 麻希、鷗澤 玲子、平山 亮一、長谷川 純崇、高 LET 放射線誘発突然変異における間接作用の寄与、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016.10.26, JMS アステールプラザ (広島県)

Maki Obara, Ryoichi Hirayama, Akiko Uzawa, Sumitaka Hasegawa, Contribution of indirect action to high LET radiation-induced mutation, 42nd Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 2016.9.5, アムステルダム (オランダ)

小原 麻希、鷗澤 玲子、平山 亮一、

長谷川 純崇、炭素線誘発突然変異におけるフリーラジカルの影響、第 54 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、2016.7.16、I-site なんば (大阪府)

Maki Obara, Akiko Uzawa, Toshiyuki Shirai, Hiroshi Tauchi, Ryoichi Hirayama, Contribution of indirect action to radiation-induced mutation and cell lethality, 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.28, 国立京都国際会館 (京都府)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小原 麻希 (OBARA, Maki)

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・業務補助員

研究者番号：80736992