

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04263

研究課題名(和文) がん放射線治療におけるDNA2本鎖切断修復機構選択の役割

研究課題名(英文) Role of pathway choice for DNA double-strand break repair in cancer radiotherapy

研究代表者

瀬尾 雄二 (Seo, Yuji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00302000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNA2本鎖切断は少なくとも4種類の機構で修復される。Poly(ADP-ribose) polymerase 阻害薬はDNA2本鎖切断の修復に際して、相同組換え修復と微小相同配列媒介末端接合を抑制したが、その一方で一本鎖アニーリングによる修復を増加させた。異なる修復機構によってDNA損傷が修復されたことにより、放射線照射による染色体転位の形成が増加した。修復機構選択を変化させることで放射線治療の効果や副作用の発現を調節できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線照射によるDNA損傷に対して複数の修復機構がどのように選択され、それぞれ修復結果がどのように異なるのか。またそれらが癌細胞の放射線感受性にどう影響するのか。これらを明らかにすることで、がん放射線治療の効果予測したり、効果を増強させる方策の開発につながる可能性がある。また放射線照射の副作用として遺伝子異常が生じることを軽減させる方法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：There are at least four mechanisms to repair DNA double-strand breaks (dsbs). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors suppressed repair of DNA dsbs by a homologous recombination repair and a microhomology-mediated end joining, while increasing repair through a single-strand annealing pathway. The altered choice of the repair mechanism for ionizing radiation-induced DNA dsbs increased the formation of chromosomal translocations. The findings suggested that adjusting the choice of the repair pathways may enhance the efficacy of radiotherapy and reduce potential adverse effects.

研究分野：放射線治療学

キーワード：放射線治療 DNA2本鎖切断修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線照射による DNA2 本鎖切断の修復機構は大きく非相同末端接合 (Non-homologous end joining [NHEJ]) と相同組換え修復 (Homologous recombination [HR]) に分類される。近年、NHEJ とは独立した末端接合機構の存在が明らかになり、微小相同配列媒介末端接合 (microhomology-mediated end joining [MMEJ]) および一本鎖アニーリング (single strand annealing [SSA]) としてその解明が進められている。MMEJ は alternative NHEJ あるいは backup NHEJ と呼ばれ、当初は NHEJ のバックアップ機構と考えられていたが、その後 HR のバックアップとしても機能することが示された。さらに最近では NHEJ、HR の単なるバックアップ機構ではなく主要な修復システムとして働くことも報告されている。放射線照射後の DNA2 本鎖切断に対する修復の成否がその後の転帰に大きな影響を与えるのは言うまでもないが、4 つの修復機構それぞれの生物学的意義について多くは未解明である。その中で poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) は修復機構の選択に関与しており、HR と NHEJ のバランスを調節することが示されている。また我々はこれまでの放射線増感作用の研究の中で、PARP 阻害薬が放射線照射後に染色体転位を増加させることによって分割感受性 (すなわち細胞生存曲線における Linear-quadratic model の値あるいは / 比) に影響を与えることを示した。これらの事から DNA2 本鎖切断の修復の成否のみでなく、どの修復機構が選択されるのかによって、放射線治療の効果や副作用の発現が変化するのはないかと考えている。

2. 研究の目的

- (1) 4 つの修復機構経路の一部が抑制された場合、他経路で代償されれば、修復量全体への影響は大きくはないと考えられる。しかし、誤修復が生じた結果としての遺伝子変異は修復経路によってそれぞれ異なる。そこで、修復経路の選択が変化した場合に生物学的効果へどのように影響を与えるかを明らかにする。
- (2) NHEJ と HR に加えて MMEJ と SSA が放射線照射後の DNA 修復にどのように寄与しているのかを解明する。
- (3) 4 種類の DNA2 本鎖切断修復機構を含む DNA 修復経路の遺伝子異常と放射線感受性の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト大腸癌培養細胞において HR、NHEJ、MMEJ による DNA2 本鎖切断の修復効率を測定した。DNA2 本鎖切断は CRISPR-Cas9 システムを用いて既知の塩基配列の特定部位に作成した。その 2 本鎖切断修復に際して、HR、NHEJ、MMEJ でそれぞれ修復された場合にゲノム DNA に組み込まれるようにデザインされた蛍光色素発現プラスミドを CRISPR-Cas9 酵素およびガイド RNA と同時に細胞内へ導入することにより、その蛍光発現率から相対的な修復効率を分析した。
- (2) DNA2 本鎖切断に対して使用された修復機構により修復結果の塩基配列に違いが生じる。そこで上記 (1) と同様に CRISPR-Cas9 酵素を用いて既知の塩基配列の特定部位に DNA 2 本鎖切断を作成し、その修復後の塩基配列を次世代シーケンサーを用いて分析した。つぎに X 線照射によって生じた DNA 2 本鎖切断に対する修復の結果生じる塩基配列の変化を次世代シーケンサーを用いて分析した。
- (3) DNA2 本鎖切断修復機構の選択性を修飾する因子として PARP 阻害薬を使用して上記 (1)、(2) の実験を行った。
- (4) DNA 修復経路における遺伝子変異が放射線治療へ与える影響を調べる目的で、細胞の包括的なゲノム変異と放射線感受性の関連について分析した。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌培養細胞 HCT116 において、DNA2 本鎖切断修復部位の塩基配列を次世代シーケンサーを用いて分析した。まず Cas9 酵素とガイド RNA を用いて Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の標的配列に DNA2 本鎖切断を作成した。標的切断部位のすぐ上下流には最長 6 塩基対の微小相同配列が存在した。Cas9 およびガイド RNA の細胞への導入後は 48 時間培養を続け、切断部位修復後の塩基配列を決定した。HR で修復された場合は修復後の配列変化はないと考えられる。NHEJ の場合は修復に相同配列は必要とされず 1-2 塩基対のランダムな欠失が修復結果として想定される。それに対して MMEJ と SSA は修復の最初に DNA 切断部位の末端処理が必要で、まず Nuclease によって 1 本鎖の糊代が形成される。ここまでは HR と同様であるが、その後 HR が姉妹染色体を鋳型として修復を行うのに対して、MMEJ と SSA では 1 本鎖の相補配列同士が接合することにより修復が行われる。そのため MMEJ の場合は 4-6 塩基対の微小相同配列、SSA の場合は 10 塩基対以上の相同配列の存在が想定される。これらに基づき修復後の塩基配列から使用された修復経路を推定した (図 1)。分析の結果、多くの場合

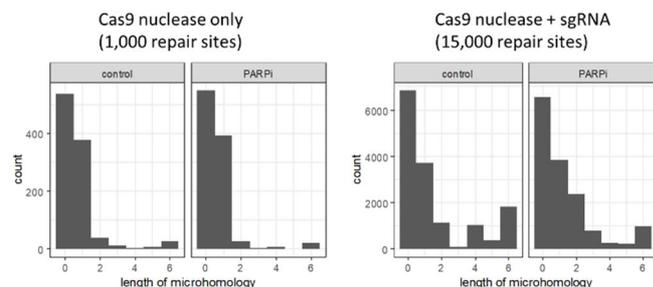


図 1

再接合部の上下流に塩基配列の相同性は小さく相同配列長は 0-1 であるものの、最長で 6 までの相同配列がみられた。22%が相同配列長 4-6 塩基対であり MMEJ で修復されたと推定される。PARP 阻害薬を併用することにより、配列長 4-6 の微小相同配列は 9.7%と有意に減少した。

(2) 次に蛍光色素発現プラスミドを Cas9、ガイド RNA と同時に HCT116 細胞へ導入し、プラスミド配列が切断修復部位のゲノムに組み込まれた場合に発現する蛍光をフローサイトメトリーで定量した(図 2)。DNA 切断は GAPDH 遺伝子の(1)と同じ部位においた。3 種類の蛍光色素発現プラスミドはガイド RNA との組み合わせで、HR、NHEJ、MMEJ で修復された場合にそれぞれゲノムに組み込まれ蛍光を発現するような塩基配列を有した。蛍光発現の頻度を PARP 阻害薬の有無で比較した。PARP 阻害薬は MMEJ の抑制効果が最も大きく、HR も有意に抑制したがその差は小さかった。一方 NHEJ による修復に変化は認めなかったが、やや増加する可能性があると考えられた。

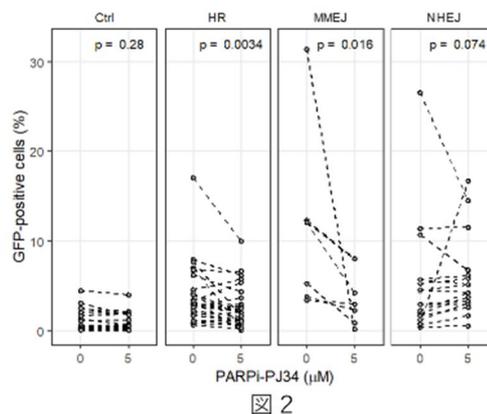


図 2

(3) X 線照射による DNA2 本鎖切断修復後の塩基配列から使用された修復経路の分析を行った。HCT116 細胞に 10Gy 照射し、24 時間培養後に次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。まず DNA 損傷修復による染色体転位部位を同定した(図 3)。対照と比較して 10 Gy の照射により染色体転位はやや増加がみられたが、統計学的有意な差はなかった。しかし PARP 阻害薬併用下で照射した場合は照射のみと比較して有意に染色体転位が増加した。ここで染色体転位を生じた再接合部位の上下流の塩基配列の相同性を分析したところ、対照と比較して 10 Gy の照射では塩基配列の相同性に変化はなかった。しかし、PARP 阻害薬を併用した場合は、接合部位周囲の塩基配列に有意な相同性の増加を認めた(図 4)。特に塩基配列長が 10 を超えるような長い相同配列が多く見られるのが特徴であった。PARP 阻害薬により MMEJ による修復が減少し、SSA による修復が増加したと考えられ、DNA2 本鎖切断後の染色体転位に SSA が関与する可能性が示唆された。

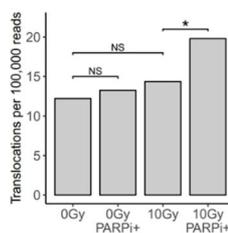


図 3

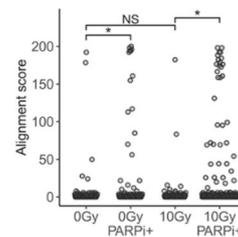


図 4

(4) DNA 修復経路の異常はゲノム不安定性に寄与し、がん化やがんの進行に関与している。DNA 修復経路の遺伝子異常が放射線感受性へ与える影響を調べる目的で、癌細胞の包括的なゲノム変異と放射線感受性の関連について検討した(図 5)。59 種類の癌細胞株における遺伝子変異の種類や量は COSMIC データベースを用いた。全遺伝子を 1)DNA 修復に関わる Caretaker 遺伝子、2)細胞分裂や細胞死を制御する Gatekeeper 遺伝子、3)細胞増殖に関わるがん遺伝子、4)がん化に直接関わらないパッセンジャー遺伝子の 4 つに大きく分類し、それぞれの群において各細胞の遺伝子変異数を求めた(図 5 上段)。さらに、各群の遺伝子変異数が全遺伝子変異数に占める割合を求めた(図 5 下段)。放射線感受性は各細胞において、その細胞生存曲線から平均致死線量(MID)を計算しその指標とした。MID はその値が大きいほど放射線抵抗性が大きいことを示している。各群の遺伝子変異数が全遺伝子変異数に占める割合と放射線感受性の関連を調べたところ、Gatekeeper 遺伝子とがん遺伝子ではその割合が高くなるほど放射線抵抗性が示された。逆にパッセンジャー遺伝子の変異数の割合が大きくなるほど放射線感受性が高いことが示された。これは遺伝子異常の蓄積が必ずしも放射線耐性を生じるわけではなく、逆に感受性を増加させることがあることを示している。実際に、Gatekeeper 遺伝子やがん遺伝子を含むドライバー遺伝子における遺伝子変異数の全遺伝子変異数に対する割合が高い場合は、放射線治療を受けた様々な癌患者において生存率が低いことがわかった(図 6)。その一方、Caretaker 遺伝子の場合は、変異数自体や全遺伝子変異数との割合において放射線感受性との関連は示されなかった。つまり、DNA 修復経路の遺伝子異常そのものが直接的に放射線感受性を変化させている現象はヒト癌細胞で確

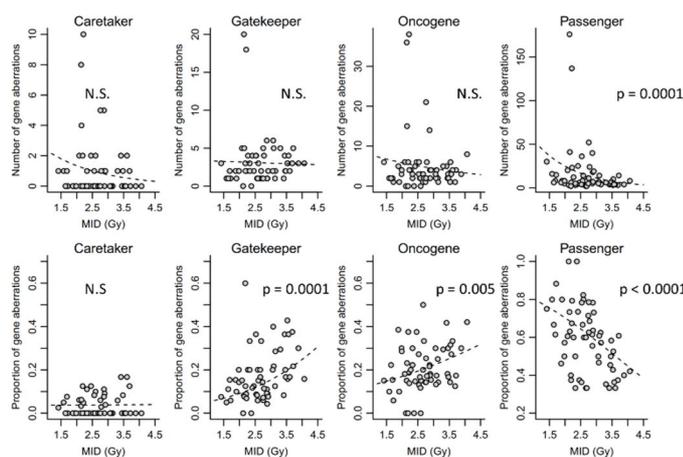


図 5

を求めた(図 5 上段)。さらに、各群の遺伝子変異数が全遺伝子変異数に占める割合を求めた(図 5 下段)。放射線感受性は各細胞において、その細胞生存曲線から平均致死線量(MID)を計算しその指標とした。MID はその値が大きいほど放射線抵抗性が大きいことを示している。各群の遺伝子変異数が全遺伝子変異数に占める割合と放射線感受性の関連を調べたところ、Gatekeeper 遺伝子とがん遺伝子ではその割合が高くなるほど放射線抵抗性が示された。逆にパッセンジャー遺伝子の変異数の割合が大きくなるほど放射線感受性が高いことが示された。これは遺伝子異常の蓄積が必ずしも放射線耐性を生じるわけではなく、逆に感受性を増加させることがあることを示している。実際に、Gatekeeper 遺伝子やがん遺伝子を含むドライバー遺伝子における遺伝子変異数の全遺伝子変異数に対する割合が高い場合は、放射線治療を受けた様々な癌患者において生存率が低いことがわかった(図 6)。その一方、Caretaker 遺伝子の場合は、変異数自体や全遺伝子変異数との割合において放射線感受性との関連は示されなかった。つまり、DNA 修復経路の遺伝子異常そのものが直接的に放射線感受性を変化させている現象はヒト癌細胞で確

認められなかった。

(5) 総括：DNA2 本鎖切断は異なる機構で修復されればその結果として異なる遺伝子異常が生じる可能性がある。本研究ではDNA2 本鎖切断修復による塩基配列の変化を分析することによって、どの経路で損傷が修復されたかを明らかにした。PARP 阻害薬を用いた場合は、HR と MMEJ による修復が減少し SSA による修復を介した染色体転位が増加することが示された。その一方で DNA 損傷修復経路の異常と放射線感受性の間に関連は示されなかった。その理由の一つとして、ある修復機構に

異常があっても代替機構での代償的修復が起こる可能性があげられる。そのため放射線治療の分割感受性に変化が生じるものの、放射線感受性への直接的な影響は軽度であると考えられる。しかし、修復経路の異常はゲノム不安定性を生じるため、ドライバー遺伝子変異およびパッセンジャー遺伝子変異の蓄積をもたらす。前者は放射線感受性を低下させ、逆に後者は感受性を増加させるため両者のバランスが最終的な各細胞の放射線感受性に影響を与えることになる。ドライバー遺伝子変異とパッセンジャー遺伝子変異の量的バランスを決める因子は現時点で不明であるが、修復経路の選択の変化をもたらす誤修復との関連についても今後分析を進める必要がある。

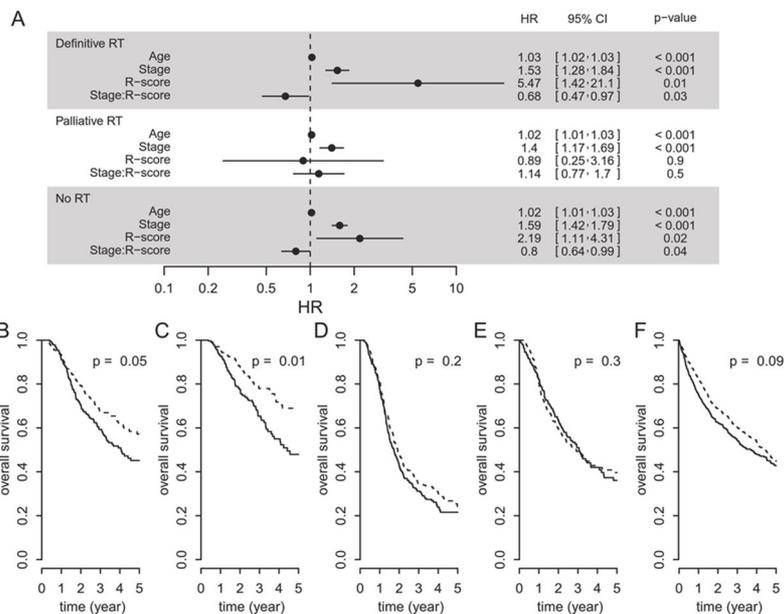


図6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Seo Yuji, Tamari Keisuke, Takahashi Yutaka, Minami Kazumasa, Isohashi Fumiaki, Suzuki Osamu, Sumida Iori, Ogawa Kazuhiko	4. 巻 93
2. 論文標題 Impact of accumulated alterations in driver and passenger genes on response to radiation therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The British Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 20190625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1259/bjr.20190625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 TAMARI KEISUKE, SANO KEISUKE, LI ZHIHAO, SEO YUJI, OTANI KEISUKE, TATEKAWA SHOTARO, TORATANI MASAYASU, TAKAOKA YUJI, TAKAHASHI YUTAKA, MINAMI KAZUMASA, ISOHASHI FUMIAKI, KOIZUMI MASAHIKO, OGAWA KAZUHIKO	4. 巻 39
2. 論文標題 Ro 90-7501 Is a Novel Radiosensitizer for Cervical Cancer Cells that Inhibits ATM Phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4805 ~ 4810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.13665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Yutaka, Yasui Tomohiro, Minami Kazumasa, Tamari Keisuke, Hayashi Kazuhiko, Otani Keisuke, Seo Yuji, Isohashi Fumiaki, Koizumi Masahiko, Ogawa Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Carbon ion irradiation enhances the antitumor efficacy of dual immune checkpoint blockade therapy both for local and distant sites in murine osteosarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 633 ~ 646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li Zhihao, Tamari Keisuke, Seo Yuji, Minami Kazumasa, Takahashi Yutaka, Tatekawa Shotaro, Otani Keisuke, Suzuki Osamu, Isohashi Fumiaki, Ogawa Kazuhiko	4. 巻 148
2. 論文標題 Dihydroouabain, a novel radiosensitizer for cervical cancer identified by automated high-throughput screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiotherapy and Oncology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radonc.2020.03.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 瀬尾雄二
2. 発表標題 LQモデルと / - 放射線生存曲線と数理モデル-
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会放射線生物学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Seo, K. Tamari, Y. Takahashi, K. Minami, K. Otani, F. Isohashi, K. Ogawa
2. 発表標題 A dual role of genomic instability on radiosensitivity in cancer cells
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上俊彦、小川和彦、小泉雅彦	4. 発行年 2017年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 439
3. 書名 放射線治療学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 和彦 (Ogawa Kazuhiko) (40253984)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	