

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591453  
 研究課題名（和文）  $\gamma$ -H2AX リン酸化と未熟染色体損傷解析による放射線感受性試験の開発と臨床応用  
 研究課題名（英文） Assay of radiation sensitivity from  $\gamma$ H2AX and aberration in prematurely condensed chromosomes.  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：宇野 隆（Uno Takashi）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
 研究者番号：30302540

## 研究成果の概要：

正常組織および放射線に対して著しい感受性を示す細胞の放射線感受性の機序を調べる目的で間期細胞の染色体凝集法と FISH (fluorescence in situ hybridization) 法、 $\gamma$ -H2AX を用いて解析した。X 線および粒子線を用いた解析から低エネルギーの X 線で、感受性の差が顕著であり高エネルギーの X 線では感受性に差が見られなかった。放射線感受性を決定する遺伝子である ATM の抑制により細胞間の増感効果が異なることが分かり ATM に着目した感受性試験の有用性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：放射線治療および放射線生物学  
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学  
 キーワード：染色体異常、FISH 法、  
 放射線感受性、未熟染色体凝集、 $\gamma$ H2AX

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する放射線治療は、臓器の機能および形態の保持が可能なことより根治的治療方法としてその役割、適応範囲が増大している。しかし、腫瘍および正常組織の放射線感受性を事前に予測できないため経験に基づく画一的な線量で治療が行われているという問題点が指摘されている。放射線感受性が事前に予測できれば、腫瘍および正常組織の感受性が個々の患者に応じて線量を増減することが可能となり、治療成績改善のみならず副作用軽減にもつながる新たな治療戦

略の確立につながる。これまで、正常組織、癌細胞の放射線感受性に関するアッセイとして、微小核形成、コメットアッセイ、ギムザ染色による染色体異常、最近ではマイクロアレイを用いた遺伝子レベルの解析まで行われているがいまだに、放射線感受性のメカニズムは不明であり、実用的な感受性アッセイは開発されていない。放射線感受性の違いが修復の効率と正確性に依存すると考えられており、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による詳細な染色体解析をおこなう必要があると考えている。これまで得られた

研究成果をさらに進めるために、DNA 損傷部位に鋭敏に反応して特異的にフォーカスを形成する  $\gamma$ -H2AX に対する蛍光抗体法を FISH 法、PCC 法と併用する新たなアッセイを開発し、個々の腫瘍および正常組織の放射線感受性に応じた新しい治療方法を開発することは個々の患者の感受性を考慮した治療法の開発につながりうると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、放射線感受性メカニズム解明に個別に寄与してきた3種の同定法、PCC 法、FISH 法、 $\gamma$ -H2AX によるアッセイ、の相互の関係は明らかにする。次いで、異なる放射線感受性を有する線維芽細胞を用いて、修復効率および正確性の違いを、3種のアッセイの組み合わせにより、これまでの報告以上に鋭敏に感受性の違いを検出できることを明らかにしていきたい。

## 3. 研究の方法

上記目的を達成するため、以下のような実験計画を作成した。

### 1. 線維芽細胞および癌細胞の放射線感受性の解析

a) ヒト由来の3種の正常線維芽細胞、放射線に対して著しく高感受性を示す AT 由来の細胞、NHEJ (non-homologous end joining) の欠損細胞 180Br、ナイミーヘン症候群の遺伝子 NBS1 異常細胞、9種類の腫瘍細胞を使用する。

b) 対数増殖期にある細胞を 10%の血清を含む培地で培養容器 (T25)に継代し、contact-inhibition の状態になるまで培養する。

c) これら細胞周期を G0 期にそろえた癌細胞にX線または放射線医学総合研究所で粒子線照射を行い G0 期で一定時間 (~24 時間) 修復させる。修復は 24 時間の間にはほぼ完結すると考えられ、修復能を染色体異常解析より明らかにする。

d) 以上の実験により線維芽細胞、癌細胞ごとに放射線に対する感受性を分類する。

### 2. Fusion-PCC による G0/G1 PCC と FISH および $\gamma$ -H2AX 抗体のフォーカス形成の比較解析。

a) fusion-PCC サンプルの作成: 静止期の細胞の放射線感受性を決定した上記条件における修復を評価するため、fusion-PCC を行い G0/G1 期の染色体を凝集させ可視化する。

b) G0/G1 PCC に FISH および  $\gamma$ -H2AX 抗体を作用: G0/G1 PCC 法により得られた染色体を染色体 1 番および 3 番に対するプローブで染色する。H2AX に対する抗体を同時に反応させ、修復されずに残っているフラグ

メントおよび誤修復との関係を解明する。

c) 上記、a) b)より、G0/G1 期における染色体異常と FISH および H2AX が、放射線誘発損傷を反映しているかを解明する。

d) 1 の実験にて感受性ごとに分類した線維芽細胞、癌細胞、すべてに本手技を適応して FISH におけるフラグメント、誤修復、H2AX フォーカス残存数より生存率との相関を見出し G0/G1 期細胞における感受性予測を行う。

## 4. 研究成果

### 1) G0/G1 PCC (premature chromosome condensation)

G0/G1 PCC は、M 期の細胞と仙台ウイルスを介して融合させることにより得ることができる。M 期細胞から染色体を凝集させる因子である mitotic promotion factor が間期細胞へ移行し間期染色体を凝集させる。その結果、通常は見ることの出来ない G0/G1 期の染色体を観察することが可能となる。図 1 および図 2 に正常、図 3 に照射後の G1 染色体を提示する。

図 1



図 2

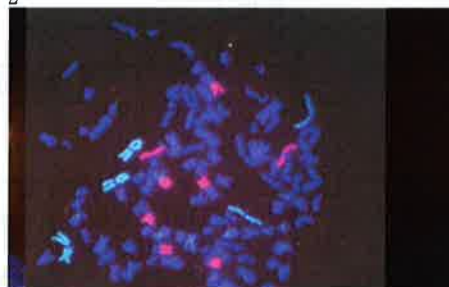


図 3

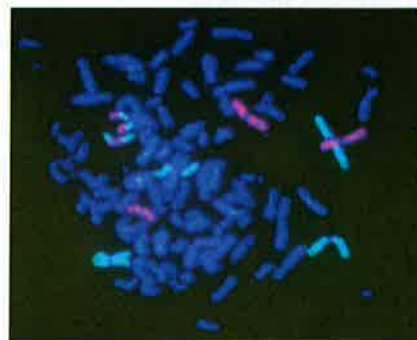


図1には2本の染色分体からなるM期細胞と糸状にのびたG1期の染色体が観察される。図2は、1番および3番の染色体に対する特異的なプローブを用いた蛍光染色である。1番が緑、オレンジが3番の染色体を示し、他の染色体はブルーで表示されている。図3には鉄イオン(200keV/micron)2Gyに照射された染色体を提示する。1番と3番の染色体間にmisrepairが見られる。

## 2) 低 LET および高 LET 放射線による染色体損傷

図4

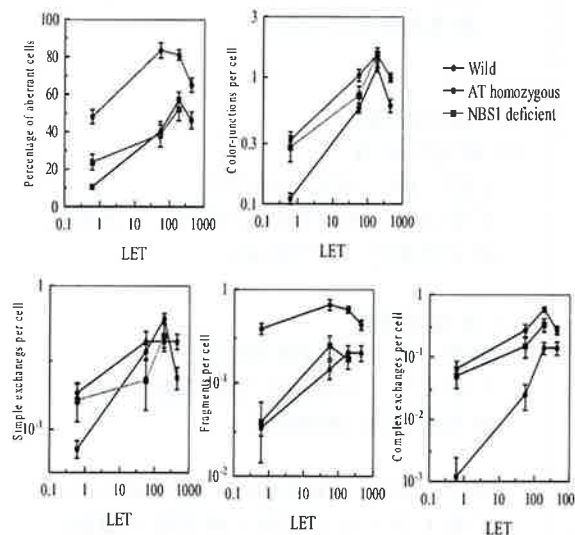
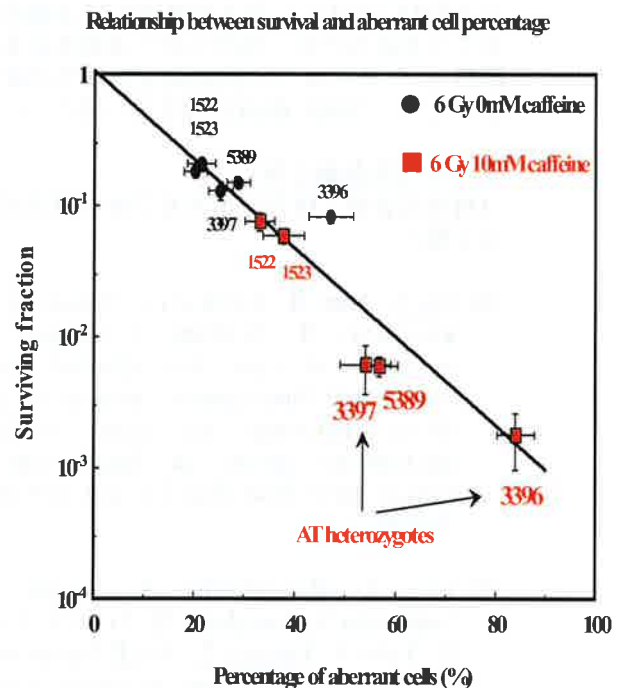


図4に正常細胞(Wild)、放射線高感受性細胞(AT homozygousおよびNBS1 deficient)細胞の様々なLET(linear energy transfer)を有する放射線照射後の染色体損傷を提示する。染色体損傷として図3に示した異なる染色体間の誤結合であるcolor-junction数、染色体相互の転座(simple exchange)、修復されずに染色体断片として検出されるfragmentさらに、より複雑な損傷の結果として引き起こされる誤結合であるcomplex exchangeの一細胞あたりの数を示す。使用した粒子線は55keV/micronの珪素線、145keV/micronの鉄線、440keV/micronの鉄線で照射線量は2Gyである。上記の少なくとも一つの異常を有する細胞の割合をpercentage of aberrant cellsとしてプロットした。本結果から、高LET放射線では、正常細胞とAT、NBS1細胞の放射線感受性の違いは、著しく縮小することがわかり、しかも、misrejoiningの頻度も同程度となることがわかった。NBS1異常細胞はX線では正常細胞とAT細胞の間の感受性が見られた。理由ははっきりしないがAT細胞で、より多

くのfragmentsが見られたことから、修復されないこの染色体がAT細胞の著しい高感受性を反映している可能性が示唆された。本研究では、静止条件下で修復を行わせたが、NBS1異常細胞はAT細胞と比較してX線に対しては低感受性であることが示された。これはNBS1異常細胞ではAT細胞と異なりpotentially lethal damage repairが保持されていることを裏付ける結果と考えることができる。ATM, NBS1のNHEJにおける役割に関する分子生物学的アプローチを今後は続ける予定である。

## 3) 修復遺伝子抑制による感受性の変化からみる放射線感受性の予測

図5



放射線に対する初期反応としてATM遺伝子が重要であることが報告されているが、本研究からもATM遺伝子の働きは低LET放射線において特に重要であることがわかった(図4参照)。そこで、X線6Gy照射後にATMの阻害剤であるカフェイン(cafeine)10mM存在下で24時間修復させた後の生存率、染色体損傷を解析した。使用細胞は正常細胞であるAG1522, AG1523, GM05389とATのヘテロ接合体細胞のGM03396, 3397である。

図6にて黒のプロットは照射後カフェインを

作用させずに修復させた場合の染色体損傷と生存率で、赤のプロットはカフェインを作用させたときの値を示す。正常細胞のAG1522, AG1523ではカフェインの増感効果は低かったが、ATヘテロ接合体細胞であるGM03396, GM03397では大きな増感効果が得られた。ATヘテロ接合体の放射線感受性は正常細胞よりやや低い程度で検出は困難であるがATM阻害剤の使用で検出できる可能性があることが示唆された。また、正常とされている細胞でもATM阻害剤に高感受性を示す細胞があり(GM05389)、正常とされる細胞を有する癌患者の中にも、ATヘテロ接合体と同様な治療経過をたどる可能性があり今後の検討が必要である。今後は分子生物学的手法を活用し、ATM, NBS1遺伝子の損傷修復の役割を検討したい。

今回の研究では、間期細胞の染色体切断部位に $\gamma$ H2AXのフォーカスを確認して定量化することを試みたが、残念ながら染色体凝集とH2AXのフォーカスの同時視覚化は不可能であった。今後も検討を加えていきたい。

#### 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)

- (1) Uno T, Sumi M, Ishihara Y, Numasaki H, Mitsumori M, Teshima T Changes in patterns of care for limited-stage small-cell lung cancer: results of the 99-01 patterns of care study—a nationwide survey in Japan. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71: 414-419 2008 査読有
- (2) Uno T, Mitsuhashi A, Isobe K, Yamamoto S, Kawakami H, Ueno N, Usui H, Tate S, Kawata T, Ito H Concurrent daily cisplatin and extended field radiation therapy for carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 18: 80-84 2008 査読有

#### [学会発表] (計 1 件)

川田 哲也、宇野隆、伊東久夫 他  
High-LET radiation induced chromosome aberrations in normal and Ataxia Telangiectasia fibroblast cells. 国際宇宙学会 (COSPAR; Committee on Space Research) モントリオール カナダ 発表日 2008年7月16日

#### [図書] (計 3 件)

- ① 宇野隆 医学のあゆみ別冊 がん放射線治療 UPDATE、膀胱癌の化学放射線療法の問題点 227巻9号6頁 2008年 医歯薬出版株式会社
- ② 川田 哲也 医学のあゆみ別冊 がん放射線治療 UPDATE、放射線の作用-DNA切断および染色体損傷とその修復 227巻9号5頁 2008年 医歯薬出版株式会社
- ③ 磯部 公一 医学のあゆみ別冊 がん放射線治療 UPDATE、悪性リンパ腫での放射線治療の役割—この組織型には放射線治療を! 227巻9号6頁 2008年 医歯薬出版株式会社

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宇野 隆 (UNO TAKASHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号 30302540

##### (2) 研究分担者

伊東 久夫 (ITO HISAO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号 20095574

川田 哲也 (KAWATA TETSUYA)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号 60234077

磯部 公一 (ISOBE KOUICHI)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 80334184