

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591490

研究課題名(和文)

損傷修復遺伝子抑制とクロマチン損傷解析による放射線感受性増強法の開発

研究課題名(英文)

Effect of repair gene inhibitor with radiation on tumor cells

研究代表者

川田 哲也 (KAWATA TETSUYA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60234077

研究成果の概要(和文):

正常細胞、ATM、NBS1細胞、癌細胞を用いて放射線感受性を染色体損傷から解析した。正常細胞、癌細胞では非増殖期の細胞にX線を照射し修復させた場合とすぐに細胞周期を進行させた場合では、修復の効率は同様であったが前者ではより正確に修復された。ATM、NBS1細胞では修復の正確な修復頻度は低く、照射後修復時間を与えても、修復の正確性に欠陥がみられ、いずれの遺伝子欠損は修復の不正確につながることがわかった。腫瘍に含まれる低酸素細胞は非増殖期で生存していると考えられ、細胞周期を進行させることで腫瘍感受性を高めることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):

We have studied the function of ATM and NBS1 on the repair of radiation-induced DNA damage by using the technique of premature chromosome condensation (PCC) and the fluorescence in situ hybridization (FISH). It is known that both ATM and NBS1 have important roles on cell cycle checkpoint control and, due to the lack of this function, ATM and NBS1 deficient cells are thought to be hyper-sensitive to ionizing radiation. It is also demonstrated that ATM and NBS1 cells are very radio-sensitive under non-growing G0 phase. To understand this mechanism we have studied chromosome aberrations under G0 and G1 conditions. The cells we used are normal human fibroblast cells, ATM deficient cells, NBS1 deficient cells and human osteosarcoma cells. When non growing cells were irradiated and either allowed to repair or subculture immediately after irradiation, it was found that normal fibroblast cells, NBS1 cells and tumor cells showed higher survival rate compared to immediate plating condition. To study the efficiency and the fidelity of repair, PCC and FISH technique were applied on G0 and G1 cells. The normal fibroblast cells and tumor cells showed much higher fidelity under G0 condition compared to G1 growing condition, whereas ATM cells show similar low fidelity of repair under each cell growth condition. NBS1 cells showed more fidelity under G0 condition but less accurate than normal cells. Similar phenomena like ATM cells were observed in normal cells when cells were pretreated with ATM inhibitor. Since G1 and G0 cells repair double strand breaks through non-homologous end joining, ATM seems to have function of repair fidelity of NHEJ. We have studied the effect of heavy ion beams on PLDR. It was found that even normal cells showed similar inaccurate fidelity of repair between G0 and G1 repair. It shows that high-LET induced DNA damage can not be accurately repaired even under G0 condition. ATM and NBS1 inhibition of G0 tumor cells may result in more tumor cell death. Further studies using mice are undergoing.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：放射線治療学

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：放射線増強、遺伝子抑制、染色体

### 1. 研究開始当初の背景

放射線に対する修復遺伝子には Ataxia Telangiectasia の原因遺伝子である ATM や Nijmegen syndrome の原因遺伝子である NBS1 遺伝子が知られている。いずれも細胞周期のチェックポイントで重要な働きを有すると考えられている。最近、これらの遺伝子は、細胞周期コントロールの他に静止期細胞における DNA 損傷修復にも重要な働きを持つことが知られている。以前の研究で、正常細胞と比較して静止期の AT 細胞では、修復効率よりも修復の正確性が著しく低下しており、誤修復が静止期 AT 細胞の放射線感受性と関係することを報告した (Radiat Res 159:597-603 2003)。一方で、静止期から増殖期に移行した増殖期細胞の放射線感受性に関する詳細な研究は正常細胞、癌細胞を含めてこれまで報告されていない。ATM 遺伝子、NBS1 遺伝子の欠損した細胞、正常細胞、癌細胞を用いて、静止期および増殖期の感受性の違いを染色体解析でおこなうことは上記研究の目的にそつものと考えられる。最近、腫瘍幹細胞という概念が広く認められつつあるが、腫瘍幹細胞は非増殖状態と考えられており、非増殖状態での感受性の正確な評価、細胞周期を進行させた状態での感受性の変化をすることは、放射線治療の進歩にとって不可欠と考えている。

### 2. 研究の目的

放射線治療は正常組織細胞が癌細胞よりも感受性が低いことが前提で行われる。正常組織の特徴として、静止期細胞の分画が腫瘍組織よりも多い可能性がある。この非増殖分画の多さが放射線治療を成立させる一つの要因となっている可能性がある。一方で、癌放射線治療が困難となっている理由の一つは、放射線抵抗性を示す低酸素細胞の存在があげられる。低酸素環境は細胞にとって好都合とはいえない環境であり、このような悪条件下では、静止期細胞の状態で存在すると考

えられている。

非増殖期の細胞と増殖している細胞の放射線感受性の違いに関しては、いまだ、不明なことが多い。本研究では、正常細胞、AT、NBS1 異常細胞、癌細胞において、非増殖期である静止期と非増殖期から細胞周期を進行させた増殖期細胞の放射線感受性の違いを染色体解析から解明する。正常細胞、癌細胞で非増殖期に比べ、増殖期細胞の感受性が高いことが証明されれば、癌細胞においても非増殖期にいる細胞の細胞周期を動かすことにより放射線治療成績を向上させる手がかりになると推測される。静止期細胞に関する放射線感受性研究成果はこれまでのところ乏しく、静止期細胞の制御が治療成績向上につながる可能性がある。

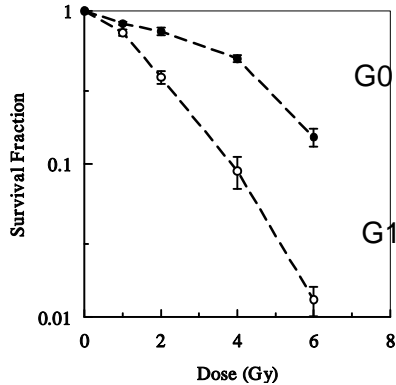
現在のところ、放射線の初期に働く遺伝子として ATM、NBS1 の存在が知られている。本研究では ATM、NBS1 遺伝子それぞれの DNA 損傷修復における役割、そして相互関係を解析する。また、正常組織および腫瘍細胞の細胞周期による修復の違いを解析し、放射線治療成績向上につながりうる治療方法の開発を目的とする。また、静止期における重粒子線の効果も検討を加える。

### 3. 研究の方法

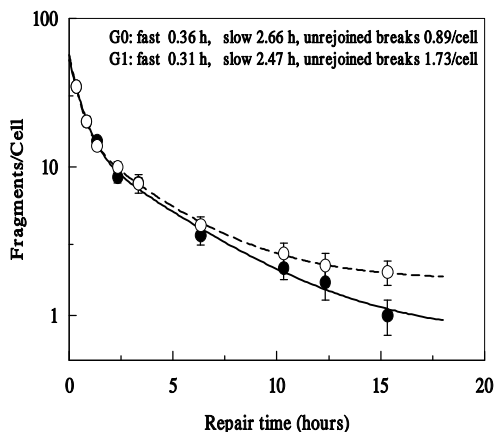
正常ヒト線維芽細胞、AT および Nijmegen syndrome 由来の線維芽細胞である GM02052、GM01829 細胞、およびヒト骨肉種細胞である MG 細胞を用いた。以上の細胞は、通常の培養にて静止期への誘導が可能であり、主な対象細胞として実験を行った。ATM および NBS1 遺伝子異常細胞、正常線維芽細胞、MG 細胞を非対数増殖の静止期に誘導し、X 線および重粒子線照射を行った。静止期の細胞の放射線照射後の修復力をみる目的に従来から放射線生物学的に知られている現象である Potentially Lethal Damage Repair (PLDR) から放射線感受性に与える ATM、NBS1 遺伝子の影響を検討した。また、ATM、NBS1 遺伝子抑制による効果についても検討を加えた。

#### 4. 研究成果

以下に非対数増殖期 (G0 期) の正常細胞に X 線照射を行い、G0 期で修復させた場合と照射後すぐに subculture し G1 期で修復させた場合の生存率を示す。



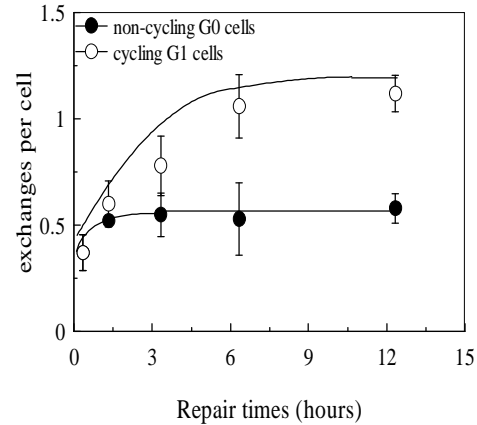
上記から非対数増殖細胞のほうが、非増殖期から増殖期に誘導された細胞よりも、明らかに生存率が高く、修復の程度 (効率、正確性) が異なることが示唆された。修復の正確性と効率を調べるために、G0 期、G1 期の染色体解析を行った結果が以下のグラフである。この結果は、未熟染色体凝集法である premature chromosome condensation 法とギムザ染色を用いて、非増殖期 (G0) および細胞を増殖させた (G1 期) における染色体断片数を経時的に数えることにより得られたものである。



Closed circle は静止期、open circle は X 線 6Gy 照射後に細胞周期を進行させた細胞の経時的修復過程を示す。この結果からは G0 期、G1 期では修復の効率には殆ど違いがないことがわかる。

次に G0, G1 期染色体の修復過程を FISH 法で観察した結果を以下に示す。FISH 法に

は 1 番と 3 番の染色体プローブを用いて観察した。この方法により異なる染色体間の誤った修復である exchange が容易に観察でき、早期の誤修復が生存率と関連するかを観察することができる。



この結果から、静止期での修復は、細胞周期が動いた場合よりも明らかに正確に修復することができることを示唆する。本実験の詳細は、2010 年度の Radiation Research に掲載されている。(Radiat Res 174:566-573, 2010)

本実験は放射線感受性の高い AT 細胞、NBS1 異常細胞でも行った (未発表)。AT 細胞では G0 期、G1 期いずれにおいても修復の効率性は保たれていたが、正常細胞と明らかに異なる点として、非増殖期、増殖期いずれにおいても修復の不正確性があることがわかった。AT 細胞では PLDR の欠損があることが知られており、この細胞周期によらない高い頻度の誤修復が、著しい放射線感受性メカニズムと関連すると考えられた。NBS1 には PLDR が見られ、正常細胞と AT 細胞の間の正確性を有する結果が得られている。腫瘍細胞である MG 細胞でも増殖期に移行させると感受性が高まり、修復の正確性も低下することがわかった (未発表)。この結果から腫瘍に含まれる非増殖期 (G0) 期細胞の存在が治療抵抗性につながる可能性が示唆され、実際、腫瘍に含まれる低酸素細胞が G0 期の可能性も示唆されており、この静止期細胞の細胞周期を進行させる方法の確立が腫瘍感受性を高めることにつながる可能性が示唆された。

重粒子線の実験は、正常線維芽細胞のみでおこなったが、得られた結果は、G0 期、G1 期でも細胞生存率は殆ど変わらないこと、また、染色体損傷修復の正確性は非増殖期、増殖期で修復させても変化しないことがわかった。重粒子線の感受性は細胞周期によらないことは、生存曲線からはこれまで報告され

ているが、重粒子線で誘発された傷は、静止期で修復させても正確に修復できないことが原因であると考えている。重粒子線により引き起こされる DNA の傷は ATM, NBS1 が正常であっても修復が困難であることを強く示唆する結果と考えている。

#### 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 1 件) 査読あり

A comparison of chromosome repair kinetics in G0 and G1 reveals that enhanced repair fidelity under noncycling conditions accounts for increased potentially lethal damage repair. Liu C, Kawata T et al Radiat Res 174:566-573, 2010

[学会発表](計 2 件)

三島眞代、川田哲也 他 “照射された静止期細胞でカフェインにより誘導される染色体損傷からみた ATM 遺伝子の役割に関する研究” 日本放射線影響学会 京都テルサ 2010 年 10 月 20 日～10 月 22 日

川田哲也、伊東久夫 他 “X 線または粒子線照射後の正常細胞、NBS1 および ATM 遺伝子異常細胞における染色体損傷に関する研究” 日本放射線影響学会 北九州国際会議場 2008 年 11 月 19 日～11 月 21 日

[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  
なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

川田 哲也 (KAWATA TETSUYA)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：60234077

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし