

機関番号：82110

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20710047

研究課題名（和文） 重イオン照射による DNA 局所損傷メカニズムの解明に関わる研究開発

研究課題名（英文） Development of a Technique for Quantitative Analysis of Heavy-ion Induced DNA Double-strand Breaks

研究代表者

横田 裕一郎 (YOKOTA YUICHIRO)

独立行政法人 日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員

研究者番号：30391288

研究成果の概要（和文）：高 LET の重イオンビームは低 LET の放射線と比べて線量あたりの生物効果が大きい。これは、重イオンビームが照射細胞内に修復し難い局所的な DNA 損傷を誘発するためと考えられている。一方で、パルスフィールドゲル電気泳動法などの従来実験手法では、放射線照射により誘発される 10 kbp より短いゲノム DNA 断片化を定量できなかった。本研究では、その原因として、10 kbp より短い DNA 断片の多くはゲノム DNA 調整時に実験系から失われることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Biological effects of ionizing radiation per dose are larger in high-LET heavy ions than in low-LET radiations. As a reason of this phenomenon, radiation biologists believe that heavy ions induce localized DNA damage which is difficult to repair in irradiated cells. However, the conventional experimental techniques such as pulsed-field gel electrophoresis could not quantify radiation-induced DNA fragmentation that cuts genomic DNA shorter than 10 kbp. In the present study, I have found that most of DNA fragments shorter than 10 kbp were lost during genomic DNA preparation.

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	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：重イオンビーム、高 LET、DNA2 本鎖切断、パルスフィールドゲル電気泳動、生物学的効果比、限外ろ過

## 1. 研究開始当初の背景

線エネルギー付与 (LET) は放射線の効果を左右する重要な因子の一つである。吸収線量あたりの生物効果（染色体異常や細胞死など）は、重イオンビームなどの高 LET 放射線では X 線や  $\gamma$  線などの低 LET 放射線と比べて

大きいことが知られている。この原因として、重イオンビーム照射した細胞内には修復困難な DNA 損傷が誘発されるという考え方が一般的に受け入れられている。また、コンピュータシミュレーション研究では、重イオンビームの飛跡に沿った高密度電離域と染色体

高次構造の相互作用によって照射細胞内にクラスター状のDNA損傷が誘発されると予測されているが、重イオンビーム照射した細胞内にそのようなDNA損傷が生じることを実験的に証明した論文はほとんどない。

DNA2本鎖切断(DSB)は染色体を断片化することで生物のゲノム情報を破壊するため、DSBは生物にとって非常に深刻なDNA損傷であると考えられている。1990年代以降、電場の向きを繰り返し変えることで数メガ塩基対(bp)までの巨大DNA断片を分離することができるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)技術を用いて、放射線照射後に細胞内に生じるDNA断片の数と長さ(DSBの生成数と生成間隔に一致する)の定量研究が進められた。これまでの研究では、照射細胞をあらかじめアガロース小片に包埋してから穏やかな条件で時間をかけてDNA調整を行うことで、ピペッティングなどの実験操作によるゲノムDNAの断片化を防ぎ、放射線照射により生じた数MbpまでのDNA断片を定量することに成功してきた。その一方で、これまでの方法では平均的な遺伝子の大きさに相当する10 kbpあるいはそれより短いDNA断片の定量が極めて困難であることがわかってきた。

## 2. 研究の目的

本研究は、重イオンビームが照射されたヒト培養細胞内に誘発されるDNA局所損傷を定量的に解析するための実験法を開発するとともに、重イオンビームの生物作用の初期過程を解き明かすことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞生存率の測定

ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット(hTERT)の過剰発現により不死化したヒト二倍体正常線維芽細胞BJ-hTERT株(図1)を用いた。

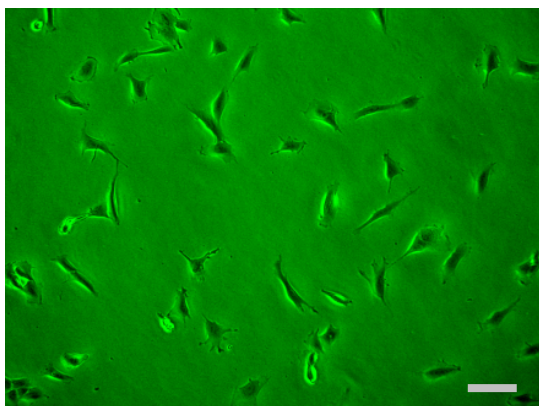


図1 増殖中のBJ-hTERT細胞の写真  
バーは100  $\mu\text{m}$

単層培養した細胞に $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線(LET=0.2 keV/ $\mu\text{m}$ )、 $^4\text{He}$  (12.1 MeV/u, 17 keV/ $\mu\text{m}$ )、 $^{12}\text{C}$

(7.4-25.9 MeV/u, 70-212 keV/ $\mu\text{m}$ )、 $^{20}\text{Ne}$  (10.8-15.8 MeV/u, 310-430 keV/ $\mu\text{m}$ )および $^{40}\text{Ar}$ イオンビーム(7.8-9.9 MeV/u, 1320-1530 keV/ $\mu\text{m}$ )を照射した。照射後、細胞を回収・再播種し、コロニー形成法により細胞生存率を求めた。単一ヒット・多標的あるいは単一ヒット・単一標的モデルでフィッティングして生存曲線を得るとともに、照射細胞の生存率が10%に低下する線量( $D_{10}$ )を求めた。 $\gamma$ 線に対するイオンビームの $D_{10}$ の比として、生物学的効果比(RBE)を得た。

### (2) アガロース小片からバッファー中へのDNA流出量の解析

ゲノムDNAの代替として市販のDNA分子サイズスタンダード(500 bpラダーと5 kbpラダーの混合)を0.75%アガロース溶液と混合してアガロース小片を作成した。アガロース小片は、従来のDNA調整法を模倣した処理(0.5 M EDTA溶液中で24時間、0.5  $\times$  TBEバッファー中で2時間のインキュベート)を行った。PFGE実験後、電気泳動ゲルをSYBR Green I高感度DNA染色剤で染色し、紫外線トランスイルミネータ上でDNAのバンドパターンを可視化した。DNAバンドパターンを冷却CCDカメラシステムで撮像し、蛍光強度分布解析により各バンドのDNA量を測定した。

### (3) DNA溶液の濃縮実験

DNA分子サイズスタンダードを0.5  $\times$  TBEバッファーで希釈した後、異なる分画分子量を有する限外ろ過フィルターユニット(ミリポア社製、アミコンウルトラシリーズ)に移した。遠心分離後、フィルター上に少量の0.5  $\times$  TBEバッファーを加えてフィルター上に残ったDNAを溶解し、回収した。フィルター上のDNA試料とろ過液をアガロースゲル電気泳動し、上述の方法でバンドあたりのDNA量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 放射線の細胞致死効果はLETに依存した

はじめに、重イオンビームの細胞致死効果がLETに依存することを確認するため、 $\gamma$ 線と異なるLETを有する重イオンビームを細胞に照射し、それぞれの放射線の細胞致死効果を調べた。生存曲線の末端部直線領域の傾きはLETに依存し、LETが110 keV/ $\mu\text{m}$ の炭素イオンで最大になった(図2)。

また、 $D_{10}$ 値に基づくRBEはLETとともに増加し、100 keV/ $\mu\text{m}$ 前後の炭素イオンで最大値の4に達し、その後はLETの増加につれて減少した(図3)。この結果は、有限の分裂寿命を持つヒト正常線維芽細胞に対する重イオンビームの細胞致死効果で認められたLET依存性とほぼ一致する。BJ-hTERT細胞は

hTERT 遺伝子の過剰発現により不死化しているが、DNA 損傷修復系や細胞周期チェックポイント系などは正常に機能しており、がん細胞特有の形質を示さないことに加えて、正常細胞と類似の放射線応答を示すことから、放射線生物学研究への応用が期待される。

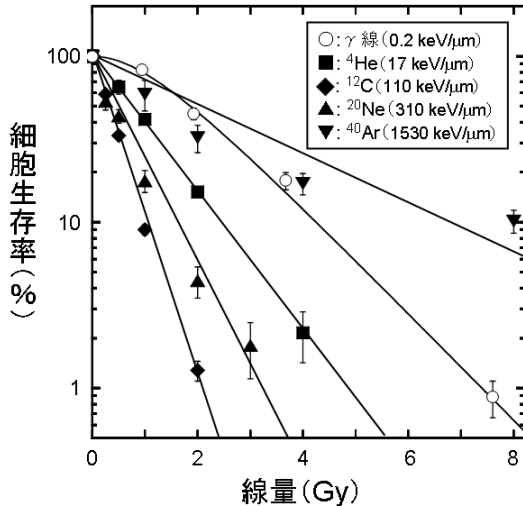


図2 本研究で得られた生存曲線の一部

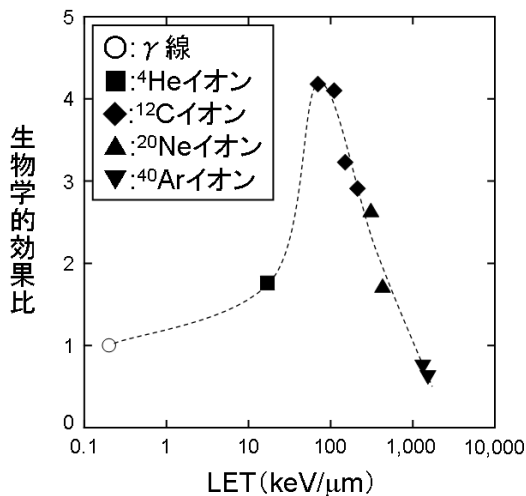


図3 細胞致死効果のLET依存性

(2) 短い DNA 断片はアガロース小片から流出する

放射線照射による DNA 断片化の定量解析試験を進める中で、ゲノム DNA の調整に掛ける時間を延長した場合、短い DNA 断片が見かけ上減少することを発見した。そこで、ゲノム DNA の代替として DNA サイズスタンダードをアガロース小片に包埋したものをゲノム DNA 調整用の模擬バッファーに浸漬した後、無処理のアガロース小片と DNA のバンドパターンを比較した (図 4A)。バッファーに浸漬したアガロース小片では、短い DNA 断片ほどバンドあたりの DNA 量が減少した (図 4B)。この

実験結果から、従来のゲノム DNA 調整法では、アガロース小片から短い DNA 断片が失われることを明らかにした。この現象は、これまで放射線により誘発される 10 kbp より短い DNA 断片の定量解析ができなかったことの原因であると考えられる。

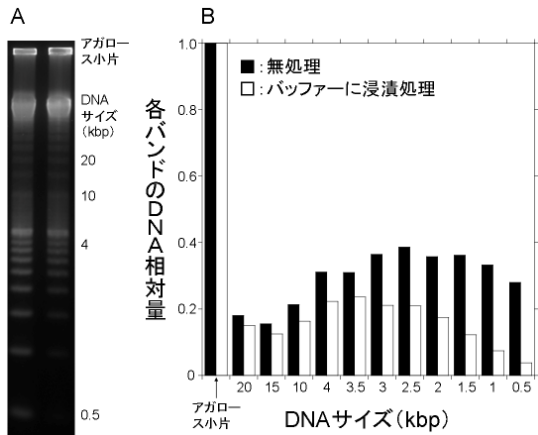


図4 アガロース小片からの DNA 断片流出の定量解析

A : ゲノム DNA 調整用の模擬バッファーに浸漬した (右レーン) あるいは浸漬していない (左レーン) アガロース小片に残存する DNA 分子サイズスタンダードをパルスフィールドゲル電気泳動で分析した。B : 蛍光強度から各バンドの DNA 相対量を測定した。

(3) DNA 溶液は限外ろ過フィルターを用いて濃縮できる

DNA 調整時にアガロース小片から周囲のバッファー中へ流出すると考えられる DNA 断片を収集することを目的として、限外ろ過フィルターを用いた DNA 溶液の濃縮実験を行った (図 5)。実験では、アガロース小片から流出したゲノム DNA の代替として 50 から 2,000 bp の DNA サイズスタンダードを 0.5×TBE バッファーに希釈した溶液を用いた。分画分子量が 10、30、50 kD の限外ろ過フィルターのいずれにおいても、50 bp より長い DNA 断片はフィルター上に残存し、全くろ過されなかった。この結果から、限外ろ過フィルターを用いた DNA の濃縮操作により、DNA 調整時にアガロース小片から周囲のバッファー中へ流出する短い DNA 断片を実験系に戻して解析することにより、重イオンビームが特異的に誘発すると考えられる局所的な DNA 断片化を定量的に解析することができると考えられる。

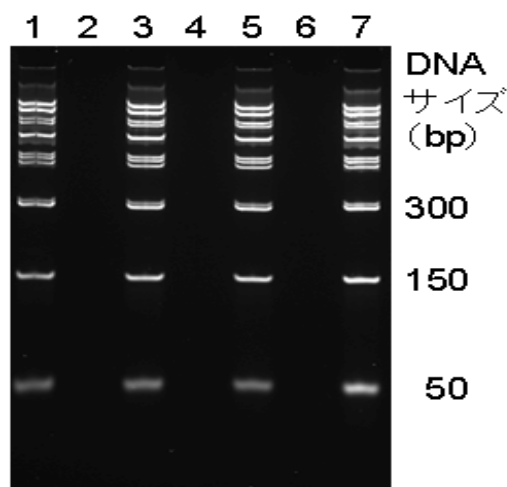


図5 限外ろ過フィルターを用いた DNA 溶液からの DNA 分子の回収

分画分子量がそれぞれ 10、30、50 kDa の限外ろ過フィルター上に残った DNA 試料（レーン 1、3、5）とろ過液（レーン 2、4、6）、無処理の DNA 試料（レーン 7）をアガロースゲル電気泳動で分析した。

(4) 本研究課題で得られた成果のまとめ

①ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子の強制発現により不死化させたヒト二倍体正常繊維芽細胞の致死効果における重イオンビームの LET 依存性を確認した。

②放射線誘発 DSB の定量解析に広く用いられるパルスフィールドゲル電気泳動法では、照射細胞からゲノム DNA を調整する際に、高 LET 重イオンビームが特徴的に誘発すると考えられる短い DNA 断片の大半が、実験系から失われてしまうことが示された。

③上記により失われる DNA 断片は限外ろ過フィルターを用いた DNA 濃縮技術により回収できることが示された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yuichiro Yokota, Tomoo Funayama, Yasuko Mutou, Tetsuya Sakashita, Michiyo Suzuki, Masahiro Kikuchi, Yasuhiko Kobayashi, A quantitative study of DNA double-strand breaks induced by heavy-ion beams: a problem

on the conventional DNA-sample preparation. JAEA Takasaki Annual Report 2009, 査読無, (2010) 87

- ② Yuichiro Yokota, Tomoo Funayama, Nobuyuki Hamada, Kana Fukamoto, Tetsuya Sakashita, Masahiro Kikuchi, Michiyo Suzuki, Yasuhiko Kobayashi, Cell-killing effect of heavy ions having different LETs in immortalized human cells. JAEA Takasaki Annual Report 2007, 査読無, (2008) 89

[学会発表] (計 7 件)

- ① 横田裕一郎他、重粒子線誘発 DNA2 本鎖切断定量のための研究開発—パルスフィールドゲル電気泳動を用いた従来の定量法の問題点—、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年 10 月 21 日、京都市、京都テルサ
- ② 横田裕一郎他、重粒子線誘発 DNA2 本鎖切断の定量研究：細胞 DNA 回収における従来法の問題点、第 5 回高崎量子応用研究シンポジウム、2010 年 10 月 15 日、高崎市、高崎シティギャラリー
- ③ 横田裕一郎他、重イオンビームによる DNA 損傷生成と植物細胞の DNA 修復作用、第 6 回イオンビーム育種研究会大会、2009 年 5 月 22 日、和光市、理化学研究所鈴木梅太郎ホール
- ④ 横田裕一郎他、ヒト正常繊維芽細胞における重イオンの細胞致死効果、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 20 日、北九州市、北九州国際会議場
- ⑤ Yuichiro Yokota et al., Cell-killing effect of light- to heavy-ions in normal human fibroblasts. The Forth International Symposium on Biomedical Research Using Accelerator Technology, 2008 年 11 月 17 日、前橋市、グリーンドーム前橋
- ⑥ 横田裕一郎他、テロメラーゼ触媒サブユニットを過剰発現させたヒト正常繊維芽細胞における重イオンビームの細胞致死効果、第 3 回高崎量子応用研究シンポジウム、2008 年 10 月 10 日、高崎市、高崎シティギャラリー
- ⑦ 横田裕一郎他、ヒト正常繊維芽細胞における重イオンビームの細胞致死効果、京都大学原子炉実験所専門研究会、2008 年 9 月 10 日、大阪府泉南郡、京都大学原子

炉実験所

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 裕一郎 (YOKOTA YUICHIRO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量

子ビーム応用研究部門・研究員

研究者番号：30391288