

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：82641

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21681006

研究課題名（和文）X線マイクロビームを用いたクラスターDNA損傷による生物効果の解明

研究課題名（英文）Analysis of biological effect of clustered DNA damage induced by X-ray microbeam

研究代表者

富田 雅典（TOMITA MASANORI）

（財）電力中央研究所・原子力技術研究所・主任研究員

研究者番号：00360595

研究成果の概要（和文）：X線マイクロビームを用い、低線量ではDNA単鎖切断を修復するタンパク質が照射部位に集積するが、線量を高くすると2本鎖切断を修復するタンパク質に置き換わることを見出した。DNA2重鎖切断の修復時間がX線のエネルギーに大きく依存しないことを、エネルギーの異なるX線マイクロビームを用いることで示した。また、照射細胞の周辺に存在する非照射細胞に生じるバイスタンダー応答が、がん抑制遺伝子 *p53* に依存することを解明した。

研究成果の概要（英文）：DNA single-strand break (SSB) repair proteins were localized in the irradiated region of the cells with low doses of X-ray microbeam. When the irradiated doses became higher, DNA double-strand break (DSB) repair proteins were localized in the irradiated region instead of SSB repair proteins. Repair efficiency of DSBs did not depend on the energy of X-ray. In addition, X-ray-induced bystander response depended on the tumor suppressor *p53* status.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	17,700,000	5,310,000	23,010,000

研究分野：放射線生物物理学

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：クラスターDNA損傷、マイクロビーム、X線、放射線影響、バイスタンダー応答

1. 研究開始当初の背景

放射線が細胞に照射されると、遺伝子であるDNAに、単鎖切断(SSB)、2重鎖切断(DSB)、塩基損傷などのさまざまな損傷が生じるが、細胞周期に応じて最適なDNA修復タンパク質が損傷を速やかに認識して修復するため、ゲノムの恒常性が維持される。一方、これらのDNA損傷が、DNA上のごく短い領域(20-30塩基対)に複数重複して生じた場合には、クラ

スターDNA損傷と呼ばれ、損傷の誤修復や未修復の原因となり、染色体異常、突然変異、細胞死などの重篤な放射線生物影響を誘導すると考えられている。

DNA損傷に依存した放射線生物効果を、正確にかつ時間経過による変化まで解析するためには、個々の細胞を放射線で狙い撃ちすることができ、かつ細胞を追跡して観察することができる、顕微鏡と一体化したマイクロ

ビーム照射装置が必要である。報告者らは、可搬型のマイクロビームX線照射システムを、国内で初めて完成させた(2007年9月新聞発表、放射線生物研究(2008)、他)。X線を用いたことにより、ピンポイントで照射する時間を変えることによって、生成するクラスターDNA損傷の重篤度を連続的に変化することが可能となった。クラスターDNA損傷を効率的に生成することによって、がん細胞をより低い線量で死に至らしめる可能性も期待される。

2. 研究の目的

X線マイクロビームを用いることにより、線量に応じたクラスターDNA損傷の質的变化とそれに伴って生じる生物効果を、バイオイメージングを用いた動的観察と細胞生化学的なシグナル伝達機構等の解析を通じて解明することを目的とし、以下の検討を行う。

- (1) 線量依存的なクラスターDNA損傷の質的变化を、DNA修復タンパク質の応答変化から明らかにする。
- (2) タイムラプス観察によるクラスターDNA損傷の動的変化と損傷が生じた細胞の変化の解析。
- (3) クラスターDNA損傷とバイスタンダー応答の誘導による*p53*変異型腫瘍細胞致死線量の低減。
- (4) X線飛跡端で生じるクラスターDNA損傷の重篤度とその生物効果の解析。

3. 研究の方法

(1) 細胞

細胞には、ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞WI-38、ヒト子宮頸がんHeLa細胞、およびチャイニーズハムスターV79細胞を用いた。

GFPおよびGFP-Ku86を発現したチャイニーズハムスター由来Ku86欠損細胞*xrs-5*は、松本義久准教授(東工大)より分与を受けた。

ヒト肺非小細胞ガン由来H1299細胞(*p53*欠損)に正常*p53*遺伝子を導入したH1299/*wtp53*細胞、37°Cでは変異型*p53*を発現するが、33°Cでは野生型*p53*を発現するH1299/*mp53-143ts*細胞は、松本英樹准教授(福井大)より分与を受けた。

(2) 遺伝子発現

GFP-NBS1(茨城大・田内広教授より分与)、GFP-ヒストンH2B、DeRed-ヒストンH2Bを発現するベクターをFuGENE6(Roche)を用いてHeLa細胞に導入して発現させた。

(3) X線、X線マイクロビーム照射

X線の照射は、250 kVp X線照射装置(線量率0.9 Gy/min)を用いて行った。

X線マイクロビーム(1.49 keV アルミニウムK殻特性X線、278 eV 炭素K殻特性X線)

の照射は、(財)電力中央研究所のマイクロビームX線照射システムを用いて行った(図1)。

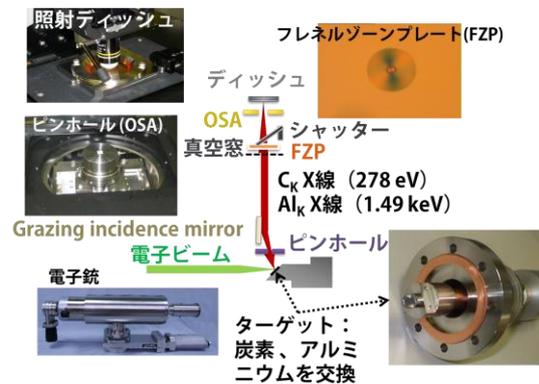


図1 マイクロビームX線照射システム

(4) 免疫抗体染色

照射後の細胞を、冷メタノールを用いて固定し、DNA損傷の修復に関与するさまざまなタンパク質に対する抗体(リン酸化部位特異的抗体を含む)を用いて免疫抗体染色を行った。DAPIで細胞核を染色した後、マイクロビームX線照射システムに装備した共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(5) 細胞生存率の測定

照射後、照射容器上のすべての細胞を、トリプシン処理によって回収した。希釈後、細胞培養ディッシュに細胞を播種し9-14日間培養してコロニーを形成させた。50細胞以上から成るコロニーを計数し、未処理の細胞のコロニー数との比から、細胞生存率を求めた。

4. 研究成果

(1) クラスターDNA損傷の線量依存性な質的变化の解析

1.49 keVのアルミニウムK殻(Al_K)特性軟X線マイクロビームを、HeLa細胞の細胞核の一部に線量を変えて局所的に照射することにより、クラスターDNA損傷の線量依存的な変化を解析した。数10 Gyの高線量軟X線を局所照射した場合には、照射後長時間経過しても修復されない重篤なクラスターDNA損傷が生じることを明らかにした。

次に、1個1個の細胞に異なる線量のX線を照射できるマイクロビームX線照射システムの特徴を生かし、1, 5, 10, 20, 30 GyのX線を個々の細胞核に照射した。照射30分後、SSBの修復に関与するPARP-1とDSBの修復に関与する53BP1に対する抗体を用い、免疫抗体法による多重染色を行い、照射部位への局在変化を解析した。その結果、X線マイクロビームで照射した領域内の線量が1 Gy以下ではPARP1が集積するSSBタイプのクラ

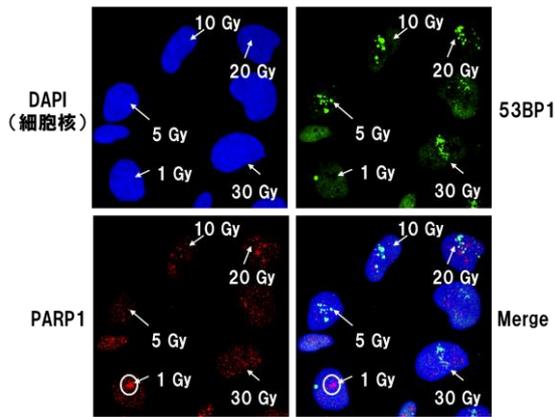


図2 X線マイクロビーム照射後の DNA 修復タンパク質の局在変化。矢印で示した細胞核の一部に、それぞれ異なる線量の X 線マイクロビームを照射し、PARP1、53BP1 の集積を観察した。

スター損傷となり、それ以上の線量 (5 Gy 以上) では、53BP1 等の DSB 修復タンパク質が集積する DSB タイプのクラスター損傷として認識されることを見出した (図 2)。この結果は、線量が低い場合は、個々の DNA 切断が離れて (個々の SSB として) 生じているが、線量を高くすると DNA 切断数が多くなり、互いに近接するため、DSB として認識されることを意味する。

以上から、軟 X 線マイクロビームを、細胞核の一部に照射することによって、局所的に DNA 損傷が生じるが、その DNA 損傷の生成密度が、DNA 損傷認識・修復機構と密接に関連することが示唆された。この結果は、世界で唯一恒常的に標的照射を行うことができる、X 線マイクロビームを用いることによって初めて見出された現象であり、DNA 修復の機構研究においてこれまで十分に検討されていなかった、DNA 損傷の生成密度の重要性を示すものとなった。

(2) クラスター DNA 損傷のタイムラプス観察による解析

軟 X 線 (A_{1k} -X 線) マイクロビームを照射するために、マイクロビーム照射用ポリプロピレンフィルムディッシュ上に HeLa 細胞を培養し、蛍光タンパク質である GFP、DsRed と融合したヒストン H2B や DSB 修復タンパク質である NBS1 を発現させる方法を確立した。ポリプロピレンフィルム上では、細胞はフィルムに接着することができないが、ファイブロンネクチンでコーティングすることによって、最も良好な状態で接着・増殖する条件を見出した。

軟 X 線マイクロビームを、細胞核の一部に照射後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、各タンパク質の局在変化を一定時間ごとに観

察した。予想に反し、ヒストン H2B と Ku80 は、照射線量をどれだけ高くしても、照射部位に集積する様子を捉えることはできなかった。一方、NBS1 は照射部位に蓄積するものの、明確な局在化は免疫抗体染色により観察した場合よりもかなり遅れて認められることから、線量依存性を見るには至らなかった。国外の研究施設において、粒子線マイクロビームを用いた研究では、GFP-PARP1 や GFP-53BP1 の局在変化が観察されており、今後これらの利用についても検討を継続していきたい。

(3) クラスター DNA 損傷とバイスタンダー応答の誘導による *p53* 変異型腫瘍細胞致死線量の低減

放射線誘発バイスタンダー応答は、放射線がヒットした細胞の周辺に存在する、放射線がまったくヒットしなかった細胞にも、放射線がヒットした細胞と類似した細胞応答が生じる現象である。

まず、ヒト正常細胞に生じる影響を明らかにするため、ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞 WI-38 を用いて検討を行った。ファイブロンネクチンでコーティングしたマイクロビーム照射用マイラーフィルムディッシュ上に WI-38 細胞を播種し、1 週間培養してコンフルエントにした。全体で約 70 万細胞の内、中心の 5 細胞の細胞核にのみ、X 線マイクロビームを照射し、照射 24 時間後に細胞を回収してコロニー形成法により生存率の変化を解析した。その結果、0.1-2 Gy の線量域で、細胞生存率は約 10% 程度低下するが、線量が高くなると非照射レベルまで回復し、さらに 10 Gy よりも高くなると、再び約 10% 低下して一定となる、2 層性の線量応答関係を示すことを明らかにした (図 3)。

(1) の結果と合わせて考察すると、バイスタンダー細胞死は、DSB タイプのクラスター

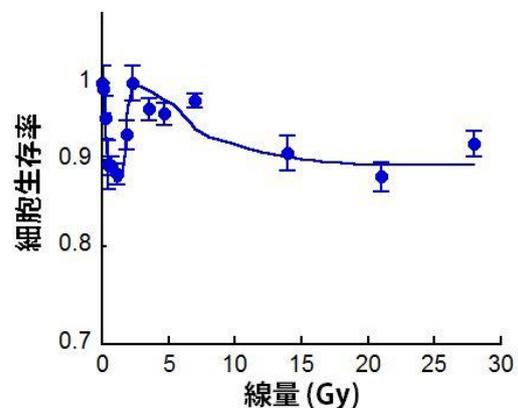


図3 ヒト正常線維芽細胞 WI-38 におけるバイスタンダー細胞死の線量応答関係

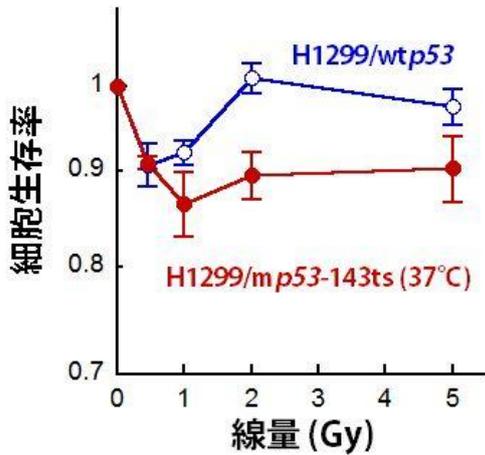


図4 バイスタンダー細胞死の *p53* 遺伝子の状態による違い

損傷が生じる線量域で生じるようになるが、致死線量に近くなるとバイスタンダー応答シグナルの放出が抑制される。しかしながら、さらに線量が高くなり、修復困難なクラスター損傷が生じるようになると、粒子線によるバイスタンダー応答で認められる、線量に依存しない応答が誘導されるようになると推測された。

次に、ヒトのガン細胞で多く認められるガン抑制遺伝子 *p53* の変異が、線量応答関係に及ぼす影響を検討した。*p53* 変異ガン細胞は、放射線に抵抗性を示すことが知られている。野生型 *p53* 遺伝子を発現した H1299/wtp53 細胞は、WI-38 細胞と同様に、線量が 2 Gy よりも高くなるとバイスタンダー細胞死が抑制される線量応答関係を示した。一方、変異型 *p53* 遺伝子を発現した H1299/mp53-143ts 細胞では、線量が 2 Gy より高くなっても、細胞死の抑制は認められなかった (図 4)。また H1299/mp53-143ts 細胞を、マイクロビーム照射後から 33°C で培養し、野生型 *p53* を発現させた場合、2 Gy においてバイスタンダー細胞死が抑制された。

次に、照射ディッシュ上で H1299/wtp53 細胞と H1299/mp53-143ts 細胞を共培養し、バイスタンダー応答の伝達を解析した。H1299/mp53-143ts 細胞に X 線マイクロビームを照射した場合に、非照射の H1299/wtp53 細胞に、バイスタンダー応答による細胞生存率の低下は認められなかった。

また、さまざまな薬剤を用いて検討した結果、照射細胞から放出された一酸化窒素が、非照射細胞に COX-2 タンパク質を誘導することにより、バイスタンダー細胞死が生じることを明らかにした。

以上の結果から、ガン細胞に多くみられる変異型 *p53* 細胞は、放射線治療において用いられる 2 Gy の照射によって、バイスタンダ

ー細胞死を生じやすいことが明らかとなり、放射線がん治療においてバイスタンダー応答が生じるとしても、その効果はガン細胞により高く現れる可能性を示した。

(4) X線飛跡端で生じるクラスターDNA 損傷の重篤度とその生物効果の解析

X線によって生じる2次電子が停止する飛跡末端での局所的なエネルギー付与によって生じるクラスターDNA 損傷は、より重篤な損傷となる可能性が考えられる。この解明のために、これまでの研究に用いてきた Al_K -X線に加え、炭素 K 殻 (C_K) 特性X線を照射できるようにマイクロビームX線照射システムを再構築した。 Al_K -X線は、垂直方向に細胞数個を貫通する飛跡長があるが、278 eV の C_K -X線は飛跡長が短く、1 細胞核内に吸収される。

まず、炭素、アルミニウムのターゲットを交換可能なホルダーを導入した。 C_K -X線用にピンホールを新たに設置するとともに、専用のフレネルゾーンプレート、OSA と組み合わせて集光光学系を構築した (図 1)。構築した集光光学系をマイクロビームX線照射システムに実装し、 C_K -X線を発生させた。しかしながら、ビーム強度が非常に弱く、検出器のノイズの影響を受けるため、正確な線量測定は極めて困難であった。そのため、HeLa 細胞の細胞核への標的照射を行い、DSB 修復タンパク質の照射部位への集積を蛍光抗体法によって観察し、マイクロビームの形成と照射を確認した (図 5)。また、 Al_K -X線を照射した場合と比較して、集積した DSB 修復タンパク質のスポットの大きさや消失に要する時間などに大きな違いは認められなかった。

次に、 Al_K -X線を用いて飛跡の影響を見るために、照射用ディッシュの底面に利用しているポリプロピレンフィルムの厚みを変えて (3 μ m、5 μ m) 照射し、DSB 修復タンパク質の集積を解析した。その結果予想に反し、薄いフィルムを用いた (残飛程が長い) 方が、集積した DSB 修復タンパク質のスポットが明瞭であるとともに、3 時間後においてもより

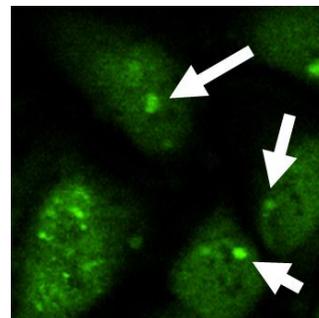


図5 C_K -X線マイクロビーム照射部位への 53BP1 の局在。60 秒照射し、30 分後に固定した。

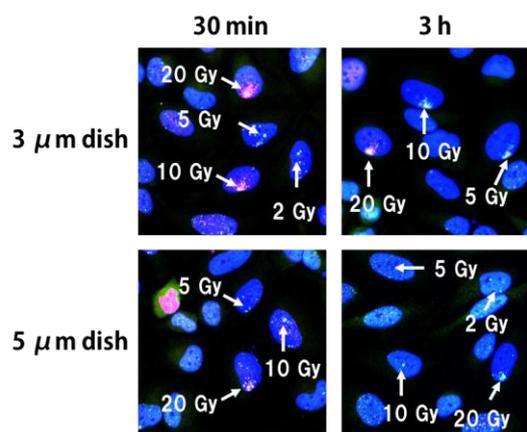


図6 X線マイクロビーム照射後のDSB修復タンパク質の局在変化。3 μ m厚、5 μ m厚のポリプロピレンディッシュ上のHeLa細胞に、矢印で示した線量のX線マイクロビームを照射し、53BP1、リン酸化ヒストンH2AXの集積を観察した。図は、細胞核(DAPI、青)、53BP1(緑)、 γ -H2AX(赤)の画像を合わせたもの。

低い線量でスポットの残存が認められた(図6)。

以上の結果から、2次電子の飛跡端において生物効果が高められることはなく、DSBの修復に関しては、むしろ細胞核内の照射領域の大きさ(体積)に依存することが示唆された。

本研究を通じて、現状において世界で唯一恒常的な照射実験が可能なX線マイクロビームを用いることにより、DNA修復機構の応答が、DNA損傷の生成密度と細胞核内の照射領域の大きさに依存することが明らかになった。また、バイスタンダー応答の線量依存性を利用することによって、変異型p53がん細胞に、バイスタンダー細胞死を効果的に誘導できることを見出した。これらの結果は、近年世界的に注目されているマイクロビームを用いた放射線治療において有用な知見となる。今後は、培養細胞を用いて得られた本研究成果を、ヒトの放射線影響評価に活用するため、3次元組織培養モデル等を用いた研究に発展させる予定である。

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3件)

- ① Masanori Tomita, Katsumi Kobayashi, Munetoshi Maeda, Microbeam studies of soft X-ray induced bystander cell killing using microbeam X-ray cell irradiation system at CRIEPI.

Journal of Radiation Research 2012; DOI:10.1269/jrr.11055, 査読有

- ② Masanori Tomita, Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death.

Journal of Radiation Research 2010; 51:493-501

DOI:10.1269/jrr.10039, 査読有

- ③ Masanori Tomita, Munetoshi Maeda, Hiroshi Maezawa, Noriko Usami, Katsumi Kobayashi, Bystander cell killing in normal human fibroblasts is induced by synchrotron X-ray microbeams.

Radiation Research 2010;173:380-385

DOI:10.1667/RR1995.1, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① Masanori Tomita, Development of Microbeam X-ray Cell Irradiation System at CRIEPI and its use in studying bystander response.

10th International Workshop Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, 2012年3月15日, Columbia University (米国)

- ② 富田雅典, X線照射によって生じるバイスタンダー細胞死におけるp53の役割、第49回日本生物物理学会年会、2011年9月18日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス(兵庫県)

- ③ Masanori Tomita, Microbeam studies of X-ray induced bystander cell killing effect. 14th International Congress of Radiation Research, 2011年8月29日, The Palace of Culture and Science (ポーランド)

- ④ 富田雅典, X線マイクロビーム照射によって生じたDNA損傷に対するDNA修復タンパク質の応答、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日、東北大学(宮城県)

- ⑤ Masanori Tomita, Microbeam X-ray irradiation system at CRIEPI and its use in bystander response.

9th International Microbeam Workshop, 2010年7月15日, Technical University of Darmstadt (ドイツ)

- ⑥ 富田雅典, X線マイクロビームを用いた放射線誘発DNA損傷修復機構の解析、第47回日本生物物理学会年会、2009年11月1日、アスティとくしま(徳島県)

[その他]

ホームページ等

<http://criepi.denken.or.jp/jp/ldrc/information/result/paperL.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 雅典 (TOMITA MASANORI)

(財) 電力中央研究所・原子力技術研究所・主任研究員

研究者番号：00360595