

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659224

研究課題名（和文） 温熱による放射線増感機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the radio-sensitization mechanism by heat

研究代表者

高橋 昭久 (TAKAHASHI AKIHISA)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授

研究者番号：60275336

研究成果の概要（和文）：

温熱感受性の主要因は放射線と同様にDNAのDSBであることを我々は提唱してきた。DSB修復のHR欠損または変異した細胞がそれぞれの親株細胞に比べて温熱に感受性であることを見出した。また、HR欠損細胞は、NHEJ欠損細胞や親株細胞に比べてDSBが修復されにくいこと、温熱でHR修復がはたらくことを見出した。これらのことから温熱による放射線増感にDNA修復の障害が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We already proposed the formation of DNA double-strand breaks (DSBs) by heat-treatment. Here we found that the HR-deficient cells were sensitive, and were low efficiency of DSB repair by heat when compared to the NHEJ-deficient cells and their parental cells. In addition, we demonstrated that heat-induced DSBs were repaired by HR. Our novel findings suggest that the HR exerts an important role in the radio-sensitization mechanism by heat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	630,000	3,330,000

研究分野：放射線生物

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：放射線治療、温熱治療、感受性、放射線増感、DNA二本鎖切断

1. 研究開始当初の背景

ハイパーサーミアとは腫瘍の局所を 42～43℃以上に 30～60 分加温する治療法で、放射線療法と併用することによって、その効果を著しく高める。この治療法は厚生省では電磁波温熱療法というかたちで、昭和 60 年に新しく出来た高度先進医療という制度に早速とり入れられ、さらに平成 2 年（1990 年）から、放射線併用電磁波温熱療法が健康保険の適用になり、現在では温熱単独治療でも保険が適用されるようになってきている。細胞レベルでも、細胞致死でみた放射線感受性は温熱処理によって顕著な増感作用を受ける。温熱が放射線照射による DNA 損傷の修復を阻害することなどがこれまで考えられてきたが、非相同組換え修復(NHEJ)および相同組換え修復(HR)の機能欠損した細胞を用いて、必ずしも温熱による放射線増感効果(TER)が低減しないことが報告されている。しかし、従来調べられてきた細胞は変異原物質(Mutagen)を用いた遺伝子の突然変異による機能欠損の細胞のため、他の遺伝子背景が異なることも容易に考えられる。それ故、本当に DNA 損傷修復機構が TER に寄与していないとはい切れないのが現状であった。

2. 研究の目的

従来、温熱による細胞死の主要因はタンパク質変性であると信じられてきた。最近、我々は科学的新事実に基づき、温熱による細胞死の主要因がDSBであることを提唱している。このような独創的な研究アプローチからDNA損傷認識および修復機構関連遺伝子のノックアウトマウス由来の細胞を用いて、温熱による放射線感受性の増感機構の解明を目指している。この増感メカニズムにおける各種遺伝子の関与を明らかにするばかりか、①DSB生成過程の促進によるものなのか、②DSB修復

過程の抑制によるものなのかが解明され、放射線生物学の学術的な理解がより深まることが期待できる。どの遺伝子が本当に温熱による放射線増感効果に関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①ヒストンH2AXリン酸化フォーカスの自動計測システムの開発：免疫組織蛍光染色法による蛍光顕微鏡観察の画像処理がフォーカス数の計測において、適切かどうかを検証し、最適条件を確立する。

②各種欠損細胞を用いたDNA損傷認識および修復機構関連遺伝子と温熱感受性：DSB認識および修復機構と温熱感受性については十分な検討がなされていなかったのが現状である。DNA二本鎖切断の損傷認識、非相同組換え修復、相同組換え修復、DNA架橋除去、乗換え修復、除去修復について、それぞれのノックアウトマウスから確立されたMEF細胞を用い、温熱処理後の生存率を、コロニー形成法で調べ、温熱感受性における各種遺伝子の関与を明らかにする。

③各種欠損細胞を用いたDNA損傷認識および修復機構関連遺伝子と温熱による放射線感受性の増感についての解明：DNA二本鎖切断の損傷認識、非相同組換え修復、相同組換え修復、DNA架橋除去、乗換え修復、除去修復について、それぞれのノックアウトマウスから確立されたMEF細胞を用い、放射線照射後、温熱43℃処理後の生存率を、コロニー形成法で調べ、温熱による放射線感受性の増感機構における各種遺伝子の関与を明らかにする。

④ヒストンH2AXリン酸化フォーカス数の自動計測システムを用いた、温熱・放射線併用におけるDSBの生成量および修復量についての解明：温熱による放射線感受性に差の認

められた細胞のセット(正常細胞と各種 DNA 損傷認識および修復機構関連遺伝子欠損細胞の組み合わせ)を用いて、処理直後および経時的にサンプリングする。免疫蛍光染色法による γ H2AX フォーカス数を調べる。これにより温熱による放射線感受性について、DSB 生成および修復過程における各種遺伝子の関与を明らかにする。

4. 研究成果

ヒストン H2AX リン酸化フォーカスを指標とした DSB 量の計測は高感度な手法として、多くの研究室で実施されている。しかし、その計測は手動なため、手間がかかることと、計測の精度に難点があるのも事実である。大量の実験サンプルを測定する方法として Flow cytometry を用いた方法などもあるが、これは γ H2AX 量を計測できるがフォーカスの数と本当に対応しているのかどうかは疑問が残るものである。そこで、DSB 量の計測において、ヒストン H2AX リン酸化フォーカスの自動計測システムの開発が待ち望まれていた。免疫組織蛍光染色法による蛍光顕微鏡観察画像 (DAPI 画像、ヒストン H2AX リン酸化フォーカス画像) を画像処理 (白黒画像変換、二値化) し、ヒストン H2AX リン酸化フォーカス数のカウントを自動計測することのできるシステムを開発した。

温熱の殺細胞効果における各種遺伝子の関与を明らかにするため、DNA 二本鎖切断非相同末端結合修復 (LIG4)、相同組換え修復 (Rad54) などにかかわる遺伝子のノックアウトまたは変異細胞およびそれぞれの親株細胞を用い、各種細胞を温熱処理し、コロニー形成法で調べた。また、DNA 二本鎖切断をヒストン H2AX のフォーカスを指標に温熱処理後の修復について調べた。その結果、非相同末端修復 Lig4 欠損しても、温熱では正常型と

感受性が変わらないのに対して、組換え修復 Rad54 欠損すると増感することを明らかにした。このことは相同組換え修復が温熱の殺細胞効果を高める標的となることが示唆された。また、組換え修復 Rad54 欠損すると温熱処理後のヒストン H2AX のフォーカスが消失しないことを明らかにした。

各種 DNA 修復の遺伝子欠損 MEF 細胞と遺伝子変異 CHO 細胞およびそれらの親株細胞を用い、45.5°C 温熱処理後の生存率をコロニー形成法で調べた。対照として X 線照射後の生存率を調べた。CHO 細胞由来の SPD8 細胞は *hprt* 遺伝子の exon7 が重複している。この細胞は HR 修復されると正常型の *hprt* 遺伝子に戻り、増殖培地に 50 mM hypoxanthine, 10 mM L-azaserine, 5 mM thymidine を添加した HaST 培地中で選択的にコロニー形成できる。SPD8 細胞を 42°C 温熱 3 時間処理後、HaST 培地と増殖培地に形成されたコロニー数を比較することで、HR 修復能を調べた。これまでに調べた中で、DSB 修復の HR にかかわる NBS1、BRCA1/2、BLM および XRCC2 が欠損または変異した細胞がそれぞれの親株細胞に比べて温熱に感受性であることを見出した。また、温熱処理で HR 修復能が高まることを見出した。以上のことから腫瘍特異性の高い HR 修復が温熱感受性を高めるための標的になることが示唆された。

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 27 件)

- ① Watanabe K, Miyagawa R, Tomikawa C, Mizuno R, Takahashi A, Hori H, Ijiri K.: Degradation of initiator tRNA^{Met} by Xrn1/2 via its accumulation in the nucleus of heat-treated HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **41**: 4671-4685, **2013**. DOI: 10.1093/nar/gkt153 査読有
- ② Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Takahashi

- A, Fukumoto M.: Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. *Oncogenesis*. **1**: e12, **2012**. DOI: 10.1038/oncsis.2012.12 査読有
- ③ Furusawa Y, Fujiwara Y, Campbell P, Zhao Q-L, Ogawa R, Hassan MA, Tabuchi Y, Takasaki I, Takahashi A, Kondo T.: DNA double-strand breaks induced by cavitation mechanical effects of ultrasound in cancer cell lines. *PLoS ONE*. **7**: e29012, **2012**. DOI: 10.1371/journal.pone.0029012 査読有
- ④ Okamoto N, Takahashi A, Ota I, Ohnishi K, Mori E, Kondo N, Noda T, Nakagawa Y, Uemura H, Yane K, Hosoi H, Ohnishi T.: siRNA targeted for nbs1 enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Int J Hyperthermia*. **27**: 297-304, **2011**. DOI: 10.3109/02656736.2010.545365 査読有
- ⑤ Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, Taniguchi S.: Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status. *Int J Oncol*. **37**: 1001-1010, **2010**. DOI: 10.3892/ijo_00000751 査読有
- ⑥ Takahashi A, Mori E, Su X, Nakagawa Y, Okamoto N, Uemura H, Kondo N, Noda T, Toki A, Ejima Y, Chen JD, Ohnishi K, Ohnishi T.: ATM is the predominant kinase involved in the phosphorylation of histone H2AX after heating. *J Radiat Res (Tokyo)*. **51**: 417-422, **2010**. DOI: 10.1269/jrr.10015 査読有
- ⑦ Takahashi A, Mori E, Ohnishi T.: The foci of DNA double strand break-recognition proteins localize with γ H2AX after heat treatment. *J Radiat Res (Tokyo)*. **51**: 91-95, **2010**. DOI: 10.1269/jrr.09111 査読有

[学会発表] (計 77 件)

- ① 高橋昭久, 馬洪玉, 久保誠, 中川彰子, 吉田由香里, 桑原義和, 福本学: 放射線抵抗性がん幹細胞様細胞に対する温熱感受性. 第17回関東ハイパーサーミア研究会/全身ハイパーサーミア研究会合同学術研究会, 2013.3.2, 東京厚生年金病院 (東京都)
- ② Takahashi A, Mori E, Chen DJ, Ohnishi T.: ATM is the predominant kinase involved in the phosphorylation of histone H2AX after heating. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, 2012.8.29, ハイアットリージェンシー京都 (京都府)
- ③ Kajihara A, Nakagawa Y, Mori E, Takahashi A, Kirita T, Ohnishi T.: Hyperthermic

sensitization efficacy as a target of homologous recombination repair pathways in the oral cancer cells. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, 2012.8.29, ハイアットリージェンシー京都 (京都府)

- ④ Takahashi A, Ohnishi T.: A priming heat treatment can induce the development of heat- and radio-resistance via HSPs, regardless of p53-gene status. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, 2012.8.29, ハイアットリージェンシー京都 (京都府)
- ⑤ 高橋昭久, 馬洪玉, 久保誠, 中川彰子, 吉田由香里, 桑原義和, 福本学: 放射線抵抗性細胞における温熱感受性についての検討. 第18回癌治療増感研究シンポジウム, 2012.6.9, 大阪大学 (大阪府)
- ⑥ 高橋昭久: 温熱感受性を決定する分子機構. 第16回関東ハイパーサーミア研究会/全身ハイパーサーミア研究会合同学術研究会, 2012.3.24, 埼玉医科大学かわごえクリニック (埼玉県)
- ⑦ Takahashi A: Target genes deciding heat sensitivity. 第70回日本癌学会学術総会, 2011.10.4, 名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑧ 高橋昭久: 温熱感受性に対するDNA二本鎖切断修復の役割について. 日本ハイパーサーミア学会第28回大会, 2011.9.10, ウィンクあいち (愛知県)
- ⑨ 高橋昭久, 森英一朗, 近藤夏子, 野田太一, 梶原淳久, 長谷川正俊, 大西武雄: DNA修復を標的とした温熱増感研究. 第17回癌治療増感研究シンポジウム, 2011.6.8, 赤門鍼灸柔整専門学校 (宮城県)

[図書] (計 2 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

http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/atahashi/akihisa_takahashi.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 昭久 (TAKAHASHI AKIHISA)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授

研究者番号 : 60275336