

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550034

研究課題名(和文) 低分子化合物ライブラリーを用いた放射線障害防護剤HTPスクリーニング

研究課題名(英文) HTP screening of radiation protectors using chemical libraries

研究代表者

鈴木 啓司 (SUZUKI, Keiji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：00196809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死を誘導する細胞内情報伝達経路の障害を基本原理として、放射線防護剤のハイスループット(HTP)スクリーニングを目指したのが本研究である。まず、DNA損傷部位に集積する53BP1を利用してDNA損傷情報活性化を可視化し、画像解析により53BP1のフォーカス形成を384穴プレートで評価する実験系を確立した。次に、東京大学創薬オープンイノベーションセンター(現創薬機構)より入手した低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした。

研究成果の概要(英文)：The study aimed at performing the high-throughput screening of radiation protectors using low-molecular weight chemical libraries. We succeeded in developing a system, by which DNA damage-dependent focus formation of 53BP1 protein is detectable on live-cell imaging. Then, we have screened the core chemical libraries obtained from the Tokyo University Open Innovation Center.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 防護 DNA損傷 情報伝達

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、放射線による住民の健康影響が懸念されているが、事故後数ヶ月以内の子供たちの甲状腺被ばく線量や、現存被ばくの状態にある福島県民などの原子力被災者は、その被ばく線量のレベルから、明らかな健康影響は想定しにくい。一方で、今後 30～40 年はかかると予想されている原子炉の廃止措置完了に向けては、原子力作業員の放射線障害の防止が喫緊の課題である。これまで多くの放射線障害防護剤が開発されてきたが、その大半がラジカル消去を目指して開発されてきたため、生命活動の中で必要なラジカルも消去してしまい、結果として回避できない副作用を生み、そのことが実用化への大きな障害になっている。このため、緊急被ばく医療の現場では、放射線被ばくの初期障害ではなく、造血障害の回復を目指した増殖因子投与などの対処療法が行われており、根本治療に向けた革新的な基盤原理が求められているところである。

我々は、放射線被ばくにより細胞死に、ATM 機能に依存した DNA 損傷情報の増幅が必須の役割を果たしていることを見いだしたことから、この分子プロセスを阻害することにより、副作用の全くない、新規放射線障害防護剤の開発ができると考えるに至った。さらに、この DNA 損傷情報増幅の過程で、応答因子が蛍光顕微鏡下で可視化できるような斑点状の存在形態（以降フォーカスと呼ぶ）を示し、*in vivo* でさえもこれが DNA 損傷の分子マーカーとして検出できることを発見した。このような背景から、本申請課題では、細胞死を誘導する細胞内情報伝達の阻害を基盤原理にして、未だ誰も試みたことのない低分子化合物ライブラリーのハイスループット・スクリーニングを目指す挑戦的研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、21 万種を超える低分子化合物が収載されたライブラリーより、その出発点となるコアライブラリーのスクリーニングを行うことを計画し、新規放射線防護剤開発への突破口を切り拓く革新的な研究となることを証明しようとした。

具体的には、1) DNA 損傷応答因子である 53BP1 のフォーカス形成阻害を指標にしたライブセルイメージング・スクリーニング実験系を確立し、2) 東京大学創薬オープンイノベーションセンターのコアライブラリー（9600 種）をスクリーニングし、放射線防護剤の候補化合物の探索を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ライブセルイメージング用細胞の樹立

本申請課題では、放射線被ばくにより誘発する DNA 二重鎖切断に起因した DNA 損傷

応答を可視化するため、DNA 損傷応答因子のフォーカス形成を指標にしたスクリーニング実験系の確立を計画した。特に、一連の DNA 損傷応答反応の中でも最も後期に起こる反応を検出する目的で、53BP1 フォーカス形成をライブイメージングにより解析することを決定した。

具体的な方法としては、53BP1 蛋白質のフォーカス形成に關与する Tudor 領域を含む DNA 断片に蛍光タグを融合した形でクローン化した発現ベクター（pmCherry-BP1-2）を、hTERT 遺伝子の導入により無限増殖化した正常ヒト二倍体細胞に導入した。フォーカス形成可視化の確認は、放射線（¹³⁷Cs 線）を 1Gy 照射し、1 時間後および 24 時間後に細胞を固定し、内在性の 53BP1 を抗 53BP1 抗体を用いて検出し、共局在する mCherry のシグナルの有無を確認することで、53BP1 フォーカスを疑似的に検出するに最も適した細胞を選別した。

(2) フォーカス形成判別自動化プロトコルの構築

ハイスループット・スクリーニングを可能にするためには、384 穴プレートを使用して、各ウェルの情報を瞬時に取得するシステムの確立が必要である。そこで、イメージングアナライザー（IN Cell Analyzer2000）を用いた画像解析により、フォーカス形成の判別を自動化するプロトコルを構築した。フォーカス形成の判別には、細胞核の把握、フォーカスの数の計測、およびフォーカスのサイズの計測が必要とされるパラメータとなるため、Hoechst33342 で染色した核を楕円として認識し、その領域内で検出される赤色蛍光シグナルのピクセル数と各ピクセルの明度を算出して、フォーカスの数とそれぞれのフォーカスの蛍光量をサイズとしてデータ取得するプロトコルを確立した。

(3) ライブセルイメージング・スクリーニング実験系によるコアライブラリーのスクリーニング

確立したライブセルイメージングシステムを用いてスクリーニング実験系を実施するため、pmCherry-BP1-2 を導入した細胞（ 2×10^3 個）を、細胞分注機（RAPIDSTAK/Multidrop Combi）を用いて 384 プレートに播種し、24 時間培養後に、放射線 1Gy 照射し、さらにその 24 時間後に、IN Cell Analyzer により各ウェルのデータを入力するプロトコルを確定した。

低分子化合物のコアライブラリーは、東京大学創薬オープンイノベーションセンターから入手した。384 プレートに 10 mM の濃度で分注された状態のライブラリーを入手し、10 μ M の濃度に希釈したライブラリーでスクリーニングを実施した。具体的には、まず、pmCherry-BP1-2 を導入した細胞（ 2×10^3 個）を細胞分注機（RAPIDSTAK/Multidrop

Combi)を用いて384プレートに播種して24時間培養した。翌日、照射1時間前からライブラリーの希釈を化合物希釈・分注機(EDR-384SX)で行い、化合物分注機(RAPIDSTAK/Multidrop Combi)により384プレートで培養した細胞培養液に添加した。添加終了から30分後に、放射線1Gy照射し、さらに24時間培養を続けた。陽性コントロールウェルとして、10 μMのKU55933(ATM阻害剤)を添加したウェルを、また陰性コントロールウェルとして化合物無添加のウェルを準備した。照射24時間後にウェルを取り出し、IN Cell Analyzer2000により既に構築したプロトコルを用いて解析を行い、フォーカス形成が抑制されたウェルの同定を試みた。

4. 研究成果

(1) ライプセルイメージング用細胞の樹立

53BP1蛋白質のTudor領域にmCherry蛍光タグを付した融合蛋白質を発現する発現ベクター(pmCherry-BP1-2)を、無限増殖化した正常ヒト二倍体細胞に導入した。ピュロマイシン耐性を指標にクローンを選別し、フォーカス形成可視化の確認を、1Gyの放射線照射後1時間および24時間で細胞を固定し、内在性の53BP1を抗53BP1抗体を用いて検出し、共同在するmCherryのシグナルの有無を確認することで行った(以下このフォーカスをmCherry-53BP1フォーカスと標記)。その結果、いくつかのクローンで、内在性53BP1フォーカスと同一のmCherry蛍光シグナルを確認し、これらのクローンの中から最も蛍光の強いものを選別した。

つぎに、放射線照射後のmCherry-53BP1フォーカスの動態を、内在性の53BP1フォーカスと比較した。放射線照射の1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後および24時間後に細胞を固定し、蛍光顕微鏡下で、mCherry-53BP1フォーカスを赤色蛍光で、内在性の53BP1フォーカスをAlexa488標識抗体により緑色蛍光で確認し、両者を比較した。内在性の53BP1フォーカスは、照射後1時間でその数がピークになり、その後時間を追って数が減少し、照射24時間後で細胞あたり1個程度のフォーカスが残存するタイムコースであった。これに対し、mCherry-53BP1フォーカスも、内在性の53BP1と全く同じ局在性を示し、その動態も全く同じ消長を示した。

以上の実験により、mCherry-53BP1フォーカスを用いたライプセルイメージング細胞の樹立を完了した。

(2) フォーカス形成判別自動化プロトコルの構築と実験系の検証

ハイスループット・スクリーニングは、384穴プレートを使用する行うため、イメージングアナライザーによる画像解析により、フォーカス形成判別の自動化プロトコルを構

築した。フォーカス形成の判別には、Hoechst33342で染色した核を楕円として認識し、その領域内で検出される赤色蛍光シグナルのピクセル数と各ピクセルの明度を算出して、フォーカスの数とそれぞれのフォーカスの蛍光量をサイズとしてデータ取得するプロトコルを確立して用いた。

確立したライプセルイメージングシステムを用いたスクリーニング実験系が放射線防護剤の探索に適応可能であることを実証するため、既存のDNA損傷応答経路阻害剤を用いて確認を行った。阻害剤にはATMの特異的阻害剤として利用されているKU55933を用いた。各種濃度(1 μM~40 μM)のKU55933を細胞に処理後、3Gyの放射線を照射し、24時間後に53BP1フォーカス形成について評価を行った。その結果、KU55933の濃度依存的にフォーカス形成が抑制され、20 μM以上の濃度で、フォーカス形成シグナルの完全消失を確認した。通常の蛍光染色法による評価でも、20 μMのKU55933は、内在性の53BP1フォーカスを完全に抑制することから、確立したライプセルイメージングシステムを用いたスクリーニング実験系は、ハイスループットスクリーニングにおいて十分な検出感度を発揮することが実証された。

(3) 低分子化合物コアラライブラリーのスクリーニング

低分子化合物のコアラライブラリーは、東京大学創薬オープンイノベーションセンターに利用を申請し、課題評価を受けてから入手した。まず、384プレートに10 mMの濃度で分注された状態のライブラリーを10 μMの濃度に希釈してスクリーニングを実施した。具体的には、pmCherry-BP1-2を導入した細胞(2×10^3 個)を細胞分注機(RAPIDSTAK/Multidrop Combi)を用いて384プレートに播種して24時間培養し、翌日、照射1時間前からライブラリーの希釈を化合物希釈・分注機(EDR-384SX)で行い、化合物分注機(RAPIDSTAK/Multidrop Combi)により384プレートで培養した細胞培養液に添加した。添加終了から30分後に、放射線3Gy照射し、さらに24時間培養を続け、照射24時間後にウェルを取り出し、IN Cell Analyzer2000により既に構築したプロトコルを用いて解析を行い、フォーカス形成の抑制の有無について、9600種の低分子化合物を対象としてスクリーニングを終了した。

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6件)

Keiji Suzuki, Norisato Mitsutake, Vladimir Saenko, Shunichi Yamashita,

Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: Possible roles of radiation in carcinogenesis. Cancer Sci, 査読有, 106, 2015, 127-133.

Keiji Suzuki, Shunichi Yamashita, Radiation-induced bystander response: Mechanism and clinical implications. Adv Wound Care, 査読有, 3, 2014, 16-24.

〔学会発表〕(計9件)

Keiji Suzuki, DNA damage and tissue reaction in tissues/organs exposed to low-dose and low-dose-rate radiation in mice. 第52回日本癌治療学会、2014,8月28日-30日,横浜.

Keiji Suzuki, Clustered DNA damage and ATM-dependent residual DNA damage foci. International AT-workshop, 2013, 7月28日-31日,Birmingham.

〔図書〕(計1件)

(1) Keiji Suzuki, Neurotoxicity of radiation, Brain Nerve, 67, 2015, 63-71.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/drms/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 啓司(SUZUKI, Keiji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：00196809