

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463052

研究課題名(和文) BRCA2のDSBを介した温熱誘導細胞死における修復経路の選択機構の解明

研究課題名(英文) Selection of DSBs repair pathways in heat-induced cell death mediated by BRCA2

研究代表者

梶原 淳久 (Atsuhisa, Kajihara)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00382317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：温熱誘導DSBはHRの経路で修復されることが示唆されたが、温熱誘導DSBにKuのリン酸化が重要であれば、これらのリン酸化酵素(ATRなど)阻害剤を用いてKuのリン酸化およびDSBからの解離を阻害することができる。コロニー形成法では温熱単独よりもATR阻害剤(VE-821)と温熱の併用で著しい相乗効果が得られた。そこで、ヒト舌扁平上皮癌細胞株を温熱単独およびVE-821と温熱との併用を行い、H2AX抗体で免疫組織蛍光染色法を行った。温熱単独よりもVE-821と温熱処理との併用では倍ほどのH2AXの発現を認めた。よって、温熱誘導DSBにはKuのリン酸化が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We showed that heat-induced DSBs are repaired by HR pathways. If phosphorylation of Ku was important for heat-induced DSBs, these phosphorylated enzyme (ATR etc.) inhibitors could block phosphorylation and disassociation from DSBs of Ku. In the colony forming assays, combination use with ATR inhibitor (VE-821) and heat was more sensitive than heat only. In human tongue squamous cell carcinoma cells, immunocytochemical staining for H2AX following heat showed that the expression in combination use with VE-821 and heat was about twice as much as heat only. This results suggest that phosphorylation of Ku might be important for heat-induced DSBs

研究分野：外科系歯学

キーワード：温熱 相同組み換え修復 DNA二本鎖切断 BRCA2

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の温熱療法について

近年、がんの三大治療法（外科手術・放射線療法・化学療法）が画期的に発展を遂げてきたにもかかわらず、今なお、がんは日本人の死因の一位である。そこで四番目の選択肢の一つとして温熱療法が注目されている。温熱療法とは腫瘍の局所を 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。また、化学療法との併用では抗がん剤の使用量を減量でき、その副作用を少なくする。また、その周辺部の免疫力を高めるといった観点からも注目されている。この治療法は 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適用されるようになっている。

(2) 温熱療法において DNA 二本鎖切断 HR 修復経路を分子標的候補とした経緯

温熱の生物応答については不明な点や再考の余地が多く残されている。例えば、温熱による細胞死の直接的な原因は何かということである。従来の定説によると温熱による細胞死の主因はタンパク質の変性のみと考えられてきた。温熱にさらされると直接的な原子・分子間結合の切断によるタンパク質や脂質を多く含む生体膜の熱変性のみならず、ラジカル反応や生体応答を介して、核酸にも分子損傷を引き起こす。

研究協力者の Takahashi らは温熱で DNA 二本鎖切断 (DSB) が生成することを中性コメットアッセイ法および免疫蛍光染色法によるリン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) フォーカス形成の測定で明らかにし、温熱誘導 DSB 形成率と温熱感受性との間に高い相関性があることを示した (Takahashi A, et al. Cancer Res 64: 8839-45, 2004.)。また、この現象が哺乳類細胞に共通してみられることや (Takahashi A, et al. Mutat Res 656: 88-92, 2008.)、ATM というリン酸化酵素が主要な働きを担うことについても明らかにした (Takahashi A, et al. J Radiat Res 51: 417-22, 2010.)。さらには、各種 DSB 認識タンパクが温熱処理後に γ H2AX と共局在することも明らかにした (Takahashi A, et al. Ann Cancer Res Ther 15: 50-3, 2007.; Takahashi A, et al. J Radiat Res 51: 91-5, 2010.)。また、DSB の修復に関わることが知られている NBS1 を標的すると、温熱感受性が増強することを明らかにした (Ohnishi K, Takahashi A, et al. J Cell Biochem 99: 1642-50, 2006.; Okamoto N, Takahashi A, et al. Int J Hyperthermia 27: 297-304, 2011.)。

(3) 温熱誘導細胞死における BRCA2 経路の選択

DSB 修復には homologous recombination (HR) 修復と non-homologous end joining (NHEJ) 修復の二つの経路が関わっている (図 1)。我々の研究グループは予備的に次の

ような結果を得ていた。

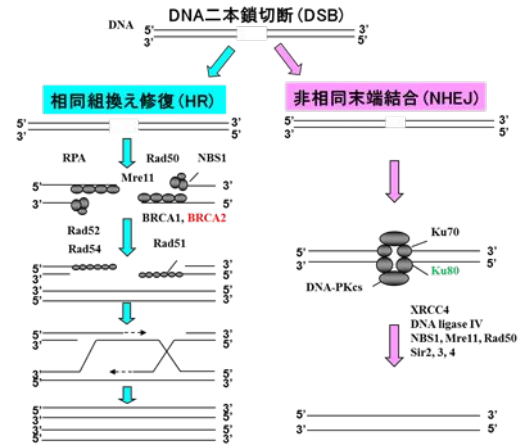


図 1

a. HR 修復関連遺伝子 *BRCA2* 変異型細胞と NHEJ 修復関連遺伝子 *Ku80* 欠損細胞に X 線処理および温熱処理を行った生存率の結果、X 線照射ではどちらにおいてもその親株細胞と比較して高い殺細胞効果が認められた。一方、温熱処理では、*Ku80* において親株細胞と感受性に変化が認められなかったが、*BRCA2* 変異型細胞では、親株細胞よりも高い殺細胞効果が示された (図 2)。このことにより、DNA 修復を標的とする場合、温熱処理では HR 修復が標的となることが示唆された。

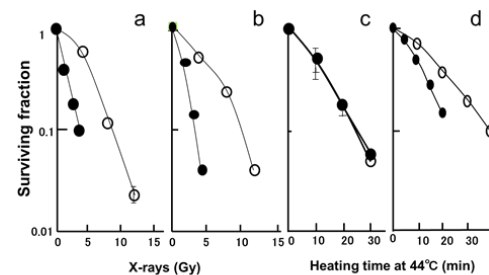


図 2

b. 口腔癌細胞でも siRNA を用いて *BRCA2* を標的に HR 修復を抑制することで、温熱処理後、温熱感受性およびアポトーシス頻度が上昇することが示唆された。

c. γ H2AX 抗体を用いたフローサイトメトリー法にて DSB 量を計測したところ、*BRCA2* 変異型細胞では温熱処理 18 時間後の γ H2AX の消失遅延が生じた。これは *BRCA2* 変異型細胞では DSB 修復が抑制されたものと考えられる。

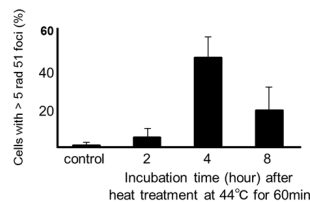


図 3

d. 免疫蛍光染色法にて *BRCA2* と complex を形成する Rad51 の focus 形成を検討したところ、温熱処理後 4 時間をピークに核内に認

められた(図 3)。これは、温熱によって DSB が誘導され、HR 修復が働くと考えられる。すなわち、温熱では HR 修復が標的となりうる可能性がより強く示唆された。

2. 研究の目的

以上より、現時点において、温熱では *BRCA2* の経路が関与していることが示唆された。HR と NHEJ が拮抗して、DSB の修復を行うことが最近明らかになってきたが、温熱処理により生成された DSB が、なぜ最終的に HR に依存した経路によって修復されるのか十分に明らかにされていないのが現状である。本研究では口腔腫瘍の治療効果向上を目指し、温熱療法において DNA 修復経路を標的とした場合に何故、相同組換え(HR)修復が標的となるのかを明らかにすることを目的とした。本研究を遂行することで、温熱による DNA 損傷の認識機構や修復機構に関わる遺伝子が明らかにされ、さらに温熱生物学やがん温熱療法の学術的な理解がより深まることが期待できる。また、温熱における DNA 修復経路の分子標的候補が明らかになれば、今後はその標的候補を抑制することで温熱療法による口腔腫瘍の治療効果の向上に繋がるものと考えられる。

まず、DNA 二本鎖切断(DSB)認識タンパク質と HR 修復因子の温熱処理後の動態を確認し、DSB 修復タンパク質阻害剤を用いることで、HR 修復因子のフォーカス形成にどのような影響を与えるのかを調べた。また、口腔腫瘍細胞において温熱の増感効果が HR 阻害剤によって高まるかどうかについても検討した。

3. 研究の方法

(1) 温熱処理における DSB 認識タンパク質と HR 修復因子との動態の確認。

これまでの研究で HR 修復関連遺伝子の *BRCA2* の pathway が温熱と関連していることが示唆された。そして、HR の一つの指標であり、*BRCA2* と complex を形成する Rad51 の focus が温熱処理後に増加することが確認された。温熱によって DSB が誘導され、HR によって修復されるのが確かであれば、温熱処理後、DSB 認識タンパク質の H2AX と Rad51 との共局在が確認できると考えられる。

チャイニーズハムスター由来の肺線維芽細胞を 44 60 分の温熱処理をし、4 時間後 (Rad51 の focus 形成がピークに達する時間) にサンプリングし、H2AX 抗体および Rad51 抗体による二重染色により、免疫組織蛍光染色法を行った。また、比較対照として X 線照射を 10Gy 行った同細胞にも 4 時間後にサンプリングし、同様の実験を行った。

(2) 温熱による HR 阻害剤を用いた温熱殺細胞効果の確認。

温熱により誘導された DSB がなぜ最終的に HR に依存した経路によって修復されるのかについては未だに不明な点が多い。Ku が最初

温熱誘導 DSB を認識していると仮定すると、何らかの機序によって、DSB 末端から Ku が除去され、end-resection を経て Rad51 のフィラメントが形成されなければならない。このプロセスで DNA-PK、ATM、ATR などのリン酸化酵素によって、Ku がリン酸化されることが想定される。もし、Ku のリン酸化が重要であれば、これらのリン酸化酵素の阻害剤を用いることで Ku のリン酸化および DSB からの解離を阻害することが可能であると考えられる。評価方法として、ATR 阻害剤と温熱処理を併用することで、温熱による殺細胞効果にどのような影響を与えるのかを検討した。

方法として、チャイニーズハムスター由来の肺線維芽細胞を ATR 阻害剤 (VE-821) 単独、44 10 分の温熱処理およびそれらの併用を行い、コロニー形成法によって生存率を算出した。

また、ヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC3 を用いて、温熱単独および VE-821 と温熱との併用を行い、H2AX 抗体を用いたフローサイトメトリー法にて DSB 量を計測した。温熱処理による DSB 修復に Ku のリン酸化が重要であれば、VE-821 と温熱の併用により、温熱単独と比較し、さらに DSB の消失遅延が生じ、H2AX の発現が多く認められると考えられる。

4. 研究成果

(1) チャイニーズハムスター由来の肺線維芽細胞を 44 60 分で温熱処理し、H2AX 抗体および Rad51 抗体による二重染色により、免疫組織蛍光染色法を行ったところ、X 線と同様に温熱でも H2AX と Rad51 との共局在が一部確認できた(図 4)。温熱での Rad51 と H2AX の発現は、温熱でも DSB が誘導され、HR 修復が働くと考えられる。すなわち、温熱では HR 修復が標的となることがより強く示唆された。

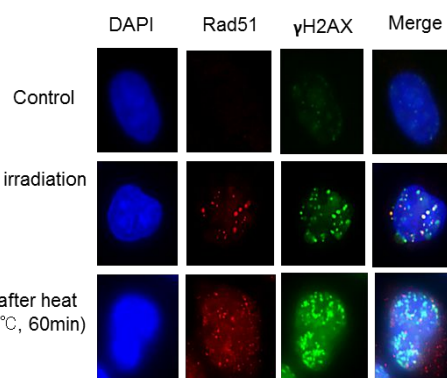
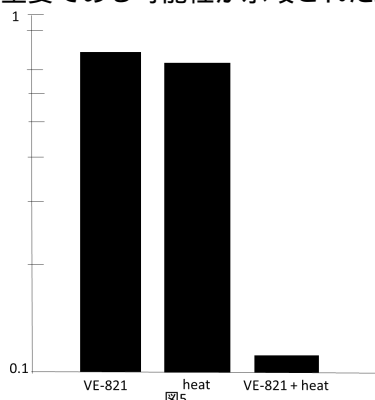


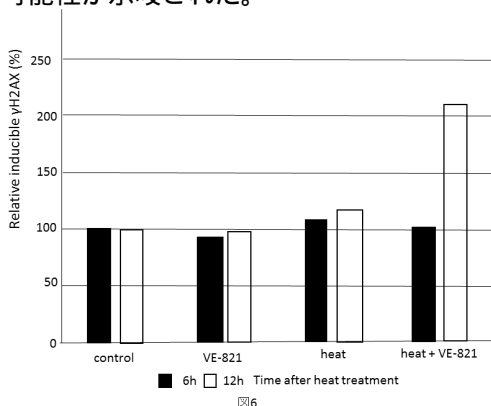
図4

(2) チャイニーズハムスター由来の肺線維芽細胞を ATR 阻害剤 (VE-821) 単独、44 10 分の温熱処理およびそれらの併用を行ったところ、生存率はそれぞれ VE-821 単独で 78%、温熱処理単独で 71%であったのに対し、VE-821 で処理し、同時に温熱処理をすると 11%と著しい相乗効果が得られた(図 5)。す

なわち、温熱誘導 DSB には Ku のリン酸化が重要である可能性が示唆された。



そこで、ヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC3 を温熱(44℃ 10分)単独、VE-821単独およびVE-821と温熱との併用を行い、H2AX抗体を用いたフローサイトメトリー法にてDSB量を計測した。温熱単独およびVE-821単独よりもVE-821と温熱処理との併用では処理後12時間でDSBの消失遅延が認められた(図6)。よって、温熱誘導 DSB には Ku のリン酸化が重要である可能性が示唆された。



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 1 件)

Takahashi A, Mori E, Nakagawa Y, Kajihara A, Kirita T, Pittman DL, Hasegawa M, Ohnishi T.

Homologous recombination preferentially repairs heat-induced DNA double-strand breaks in mammalian cells.

Int J Hyperthermia. 2016 Nov 13:1-7. 査読有り。

DOI:10.1080/02656736.2016.1252989

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Atsuhisa Kajihara

Enhancement of heat sensitivity by depression of homologous recombination repair

The 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology, The 31st Japanese Congress of Thermal Medicine. (Sep 5~Sep 6, 2014, AOSSA)

2. 梶原 淳久

口腔癌細胞に対して相同組み換え修復を標的にすると温熱感受性が増強する

第 59 回 日本口腔外科学会総会・学術大会(平成 26 年 10 月 17 日~19 日、幕張メッセ)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 淳久 (KAJIHARA Atsuhisa)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00382317

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：