

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：31305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26550029

研究課題名(和文) 海馬・網膜神経細胞におけるDNA損傷フォーカスの可視化と放射線・ストレス影響評価

研究課題名(英文) Evaluation of biological effects induced by ionizing radiation and stress using DNA damage foci formation visualized in living hippocampus neuron and retinal ganglion cells.

研究代表者

栗政 明弘 (KURIMASA, Akihiro)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：80343276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線や生体に生じる内外のストレスの結果として、細胞内の活性酸素種(ROS)産生が高まり、核内のDNA損傷が引き起こされる。脳虚血や緑内障に伴う低酸素血症でも、放射線と同様にDNA2本鎖損傷フォーカスを形成することが報告されている。この損傷部位に集積する53BP1タンパク質にGFPを融合させたセンサータンパク質をマウスに発現させ、生きた神経組織でのDNA損傷応答を観察することを試みた。増殖する培養細胞とは異なり、分化した神経細胞の組織内ではDNA損傷応答が抑制されていることが明らかとなり、分化した組織の特殊性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiation and inside or outside stress induced in our body result in a increased ROS production and a induction of DNA double-strand breaks in the cells. A hypoxia caused by cerebral ischemia or glaucoma, nuclear foci formation by DNA double-strand breaks is also reported. A sensor of DNA damage foci formation using EGFP-53BP1 fusion protein makes DNA damage formation visible in the living mouse neuronal tissues or cells. As a result of our research, there is a clear difference of foci formation between differentiated tissue in vivo and culture cells in vitro, suggesting there exist special characteristics of foci formation and DNA damage response in the differentiated tissue cells.

研究分野：放射線影響

キーワード：DNA損傷 放射線 DNA損傷応答 53BP1 海馬 神経細胞 タイムラプス 網膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体の側の種々の要因により、同じ物理量の放射線を受けても、その生物影響は異なっている。増殖の活発な胎児・子供の組織では放射線に感受性が高い。未分化で増殖が活発な細胞が、細胞周期のDNA複製期の状態にある場合である。一方、分化を達成した組織においては、細胞は分裂・増殖を止め、G0と呼ばれる停止期にある。このような細胞は放射線に抵抗性であるか、あるいは多少のDNAの損傷があっても、修復されずに細胞機能を維持していることも示されている。

(2) 特に胎児期の細胞には放射線のダメージは神経系の組織では大きく、精神運動発達遅延を引き起こす。また、小児の髄膜腫に放射線治療を行った際に、生存者では海馬の正常発達が損なわれている。その他の小児癌でも、骨髄移植治療などの治療を受けた子供において、種々の神経発達・行動上の問題が生じる。一方、成人の細胞では同じ線量を浴びても影響は小さく、加齢に伴いさらにその感受性は小さくなる。

(3) 放射線や酸化ストレスによるDNA損傷を、神経組織において発達段階別に、また生きたまま観察した研究はない。一方、同じ神経系組織である眼球の網膜では、緑内障において網膜神経細胞に働く圧力あるいは虚血の低酸素のストレスが、DNA2本鎖切断損傷を引き起こしていることも知られている(1)。このような神経組織におけるDNA損傷の果たす役割は、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

これまで放射線やストレスで生じたDNAの損傷とその修復過程を、「培養細胞」でリアルタイムに定量評価できる測定システムを開発してきた。がんから樹立された細胞株を用いて、細胞周期を同定しDNA損傷を観察できるバイオセンサー細胞の開発に成功している。同様の観察を「分化した組織レベル」で行うために、蛍光発光タンパク質を融合させたタンパク質GFP-53BP1を発現するトランスジェニックマウスの作製を行ってきた。今後、これらのマウスの組織から初代培養あるいは組織構築を保った状態で、生きたまま観察する方法を開発する。これにより、分化した正常組織での放射線やストレスによるDNA損傷・修復の変化を計測し、組織内での生物影響を観察するシステムを開発していく。特に今回は、マウスの海馬・網膜の神経組織において、生きて分化した神経細胞で損傷フォーカスをライブイメージングで観察する。画像からの定量解析で、ストレスや放射線による生物影響を明らかにする。

3. 研究の方法

DNA損傷のうち、2本鎖切断損傷を検出する方法として、これまで注目されているものにリン酸化ヒストンである γ H2AXがある。こ

れは、検出のためにH2AXの139番のセリンのリン酸化を特異的に検出する免疫組織染色が必要となる。そのため、染色に際して組織の固定や免疫染色などの処置が必要であり、手間がかかることと生きた組織での染色や、ライブセルイメージングは困難であった。一方、 γ H2AXとほぼ類似した挙動を示し、DNA2本鎖切断損傷の部位に集積する53BP1を用いたDNA損傷の検出方法も開発されつつある。53BP1タンパク質に蛍光タンパク質GFPを融合させた遺伝子を導入することにより、がん細胞で生きたままDNA損傷を検出することが可能となった。

しかし、この融合タンパク質は細胞に導入することは簡単ではなく、まれに成功した細胞を用いるしか方法がなかった。しかし我々は、53BP1の遺伝子配列を一部改変することにより、融合タンパク質が細胞で安定に発現できる系を開発することに成功した。これにより、まず、どのようながん細胞でも安定してセンサータンパク質が発現できる細胞を作製することが可能となった。

次に、この改変53BP1を用いることで、正常なマウスの生育発達を障害することなくバイオセンサーをいくつかの組織細胞で発現するマウスの作製を試みてきた。GFP-53BP1遺伝子断片を、CMV-IEエンハンサーとChicken β -actinプロモーターの下流につなぎ、マウス受精卵にインジェクションすることでトランスジェニックマウスの作成を行った。我々が作製したマウスでは、現在まで神経系、特に大脳皮質、海馬、ならびに網膜の神経細胞、肺、精巣でGFP蛍光が良好に観察されている。この結果をもとに、マウス個体における海馬と網膜の神経細胞において、放射線照射や放射線類似作用を呈する抗がん剤投与の結果として現れる機能障害を、DNA損傷フォーカスの定量解析から評価する手法の確立を目指した。

さらには、培養細胞系でバイオセンサータンパク質を導入し、さらにPCNA-DsRedの細胞周期を検出するセンサータンパク質を二重に導入したがん細胞で、ライブセルイメージングを行いながら細胞周期を同定し、DNA2本鎖切断損傷を定量解析する解析プログラムを開発してきた(特許取得済み)。この方法により、細胞周期の情報を解析しながら同時に、DNA損傷の形成と修復による消退の過程を定量解析することができる。今後、マウス海馬神経細胞・網膜神経細胞など正常細胞を用いた解析に応用していく。

以上の目的達成のために研究を進めた結果、組織内の細胞と培養条件下の細胞では、DNA損傷応答の仕方が異なっていることが明らかとなった。そのため、次のような研究方法をとって研究を進めた。

(1) 海馬スライス培養でのDNA損傷応答の観察: 大脳を海馬の存在する部位で切断し、スライス培養下にて共晶点レーザー顕微鏡で観察を行う。405nmの波長のレーザー光を照

射して組織細胞の DNA に損傷を引き起こし、その損傷部位に集積する損傷フォーカスを GFP-53BP1 の蛍光から観察する。

(2) 分散培養による海馬神経細胞の DNA 損傷フォーカスの観察：海馬から神経細胞を分散培養により採取し、共晶点レーザー顕微鏡下で損傷フォーカスの形成を観察する。

(3) 網膜神経節細胞の組織下での DNA 損傷応答の観察：網膜神経節細胞を、眼球から直接摘出した状況下で、共晶点レーザー顕微鏡下で損傷フォーカスの形成を観察する。

(4) 分散培養による網膜神経節細胞の DNA 損傷フォーカスの観察：網膜から網膜神経節細胞を分散培養し、培養状況下での共晶点レーザー顕微鏡下で損傷フォーカスの形成を観察する。

(5) 生細胞定量観察プログラムの開発：タイムラプス顕微鏡撮影によって得られた生細胞における DNA 損傷応答と細胞周期の遷移を、画像解析で簡便迅速に定量解析できるプログラムを ImageJ のマクロを用いて作成する。

4. 研究成果

(1) 海馬スライス培養での DNA 損傷応答の観察：スライス培養下で、海馬の顕著に蛍光を発する神経細胞が簡単に認識できる (図 1 A)。しかしながら、これらの細胞にレーザー照射や放射線類似作用薬であるネオカルシノスタチンを投与しても、DNA 損傷フォーカスの形成は認められなかった (図 1 B)。生体の *in vivo* に近い組織の状態では、DNA 損傷フォーカスの形成は生じないと考えられた。

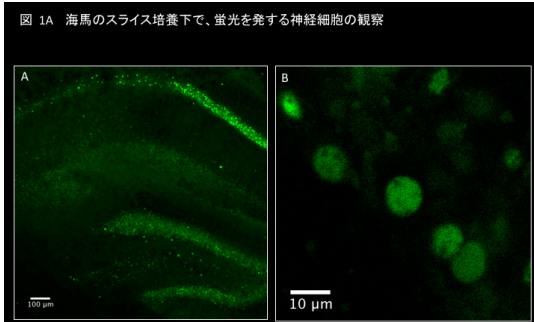


図 1A 海馬のスライス培養下で、蛍光を発する神経細胞の観察
GFP-53BP1 の融合タンパク質を発現するトランスジェニックマウスでは、海馬の神経細胞の核内に一致して、緑色の蛍光を確認できる。(A)海馬の神経細胞層の全体像を弱拡大で示した。(B)CA1領域の神経細胞を拡大した。

(2) 分散培養による海馬神経細胞の DNA 損傷フォーカスの観察：海馬の組織を抽出した状

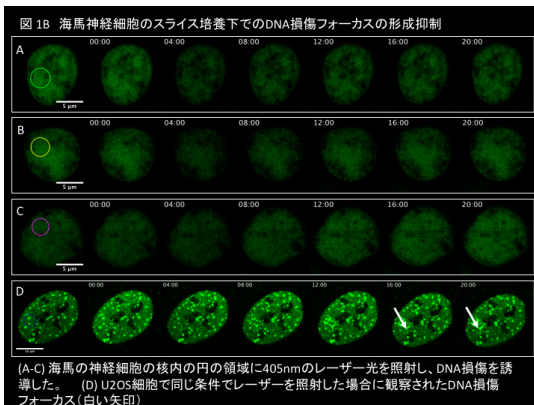


図 1B 海馬神経細胞のスライス培養下での DNA 損傷フォーカスの形成抑制
(A-C) 海馬の神経細胞の核内の円の領域に 405nm のレーザー光を照射し、DNA 損傷を誘導した。(D) U2OS 細胞で同じ条件でレーザーを照射した場合に観察された DNA 損傷フォーカス (白い矢印)

態では、DNA 損傷フォーカスが形成されないのに対して、同じ神経細胞を分散培養下にとっていくことにより、細胞株で観察されるのと同じ DNA 損傷フォーカスの形成が認められた (図 2)。

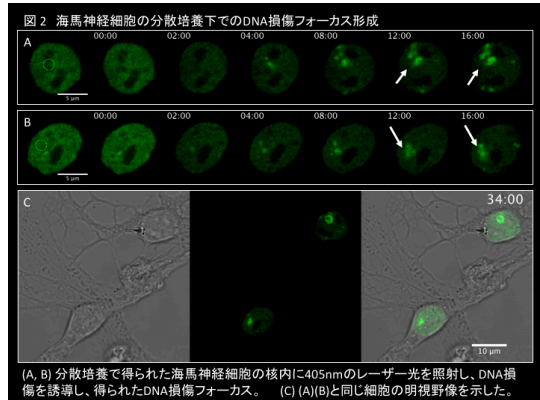


図 2 海馬神経細胞の分散培養下での DNA 損傷フォーカス形成
(A, B) 分散培養で得られた海馬神経細胞の核内に 405nm のレーザー光を照射し、DNA 損傷を誘導し、得られた DNA 損傷フォーカス。(C) (A)(B) と同じ細胞の明視野像を示した。

(3) 網膜神経節細胞の組織下での DNA 損傷応答の観察：海馬の場合と同様に、スライス培養下で網膜の顕著に蛍光を発する神経節細胞が簡単に認識できる。しかしながら、これらの細胞にレーザー照射しても、DNA 損傷フォーカスの形成は認められなかった (図 3)。

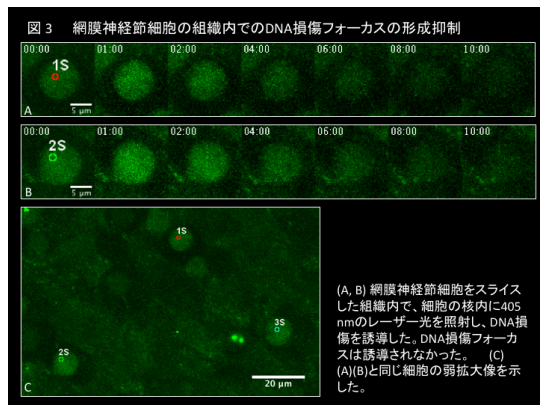


図 3 網膜神経節細胞の組織内での DNA 損傷フォーカスの形成抑制
(A, B) 網膜神経節細胞をスライスした組織内で、細胞の核内に 405 nm のレーザー光を照射し、DNA 損傷を誘導した。DNA 損傷フォーカスは誘導されなかった。(C) (A)(B) と同じ細胞の弱拡大像を示した。

(4) 分散培養による網膜神経節細胞の DNA 損傷フォーカスの観察：網膜の神経節細胞を分散培養することにより、海馬神経と同様に DNA 損傷フォーカスの形成が認められた (図 4)。

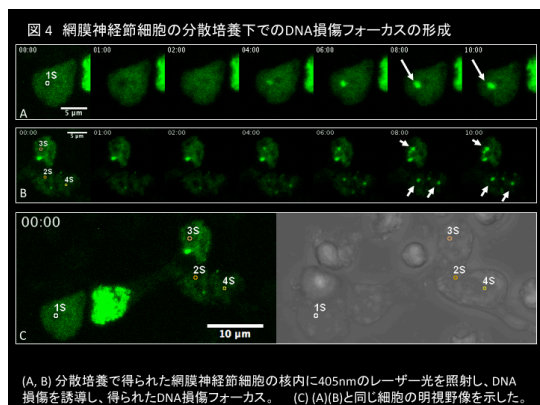
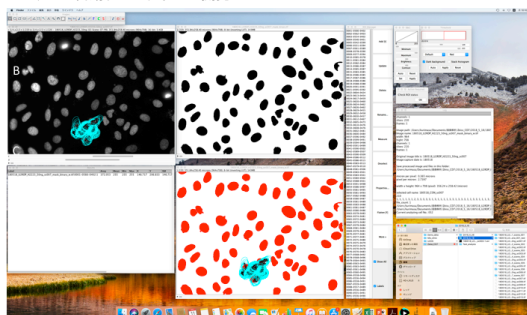


図 4 網膜神経節細胞の分散培養下での DNA 損傷フォーカスの形成
(A, B) 分散培養で得られた網膜神経節細胞の核内に 405nm のレーザー光を照射し、DNA 損傷を誘導し、得られた DNA 損傷フォーカス。(C) (A)(B) と同じ細胞の明視野像を示した。

(5) 生細胞定量観察プログラムの開発：タイムラプス動画による多量の細胞情報を迅速に解析処理を行うための、ImageJ マクロを用いた自動解析プログラムを作成した (図 5)。

図5 細胞内の画像情報を定量解析するための、細胞を追尾し抽出するImageJマクロの自動化プログラムの開発



・考察

当初の目的にある、生体の正常組織において生きた細胞で、DNA 損傷応答である DNA 損傷フォーカスを観察することはできなかった。そのため、当初の目的通りには研究を達成できなかったが、理由は未だ明らかではないが同じ細胞を培養下におくことで、培養細胞で観察できるような DNA 損傷フォーカスを再度観察することができることが明らかとなった。このような違いを新たに発見できたことで、培養系とは異なる組織における DNA 損傷応答の分子メカニズムを明らかにする手がかりとなるのではと考えられ、この分野での新しい展開が得られたと思われる。

<引用文献>

(1) Glimm and Wilmann, High Alt Med Biol, 2012

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Lin YF, Nagasawa H, Little JB, Kato TA, Shih HY, Xie XJ, Wilson PF Jr, Brogan JR, Kurimasa A, Chen DJ, Bedford JS, Chen BP. Differential Radiosensitivity Phenotypes of DNA-PKcs Mutations Affecting NHEJ and HRR Systems following Irradiation with Gamma-Rays or Very Low Fluences of Alpha Particles. *PLoS One*. 2014 Apr 8; 9(4): e93579. doi: 10.1371/ journal. pone. 0093579. eCollection 2014. (査読有)
- ② 桑原義和、漆原祐介、斎藤陽平、山本由美、富田和男、佐藤友昭、山本文彦、栗政明弘、福本学、放射線で誘発される細胞死：アポトーシス、オートファジー、ネクロプトーシス、*東北医科薬科大学研究誌* 63, 63-70, 2016(査読有)
- ③ Nagasawa H, Lin YF, Kato TA, Brogan JR, Shih HY, Kurimasa A, Bedford JS, Chen BP, Little JB. Coordination of the Ser2056 and Thr2609 Clusters of DNA-PKcs in Regulating Gamma Rays and Extremely Low Fluences of Alpha-Particle Irradiation to G₀/G₁ Phase Cells. *Radiat Res*. 2017 Feb; 187(2): 259-267. doi: 10.1667/ RR 14679.1. Epub 2017 Jan 24. PMID: 28118114(査読有)
- ④ Tomita K, Kuwahara Y, Takashi Y,

Tsukahara T, Kurimasa A, Fukumoto M, Nishitani Y, Sato T. Sensitivity of mitochondrial DNA depleted $\rho 0$ cells to H₂O₂ depends on the plasma membrane status. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Aug 19;490(2):330-335. doi: 10.1016/ j. bbrc. 2017.06.044. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28619507(査読有)

⑤ Kuwahara Y, Roudkenar MH, Urushihara Y, Saito Y, Tomita K, Roushandeh AM, Sato T, Kurimasa A, Fukumoto M. Clinically relevant radioresistant cell line: a simple model to understand cancer radioresistance. *Med Mol Morphol*. 2017 Dec;50(4):195-204. doi: 10.1007/s00795-017-0171-x. Epub 2017 Oct 24. Review. PMID: 29067564(査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kurimasa A. Live cell imaging of DNA double-strand breaks (DSBs) foci and evaluation of cell cycle perturbation induced by Topoisomerase inhibitors. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto Japan, 25-29 May 2015
- ② Ihara M, Kobayashi J, Kurimasa A, Kudo T, Komatsu K. Association of ATM with the rejoining of DNA double-strand breaks in cells lacking non-homologous end-joining. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto Japan, 25-29 May 2015
- ③ Kai Y., Kurimasa A., Iwata K., Yumoto K., Iba Y., Mio Y., The spatiotemporal dynamics of centrosomes and the genome during first cleavage in human trippronuclear zygotes *in vitro*. European Society of Human Reproduction and Embryology Annual Meeting 2015, Portugal, Lisbon, 14-17 June 2015
- ④ 栗政明弘、中根裕信、加藤晃弘、桑原義和 神経細胞における DNA 損傷と臨床に及ぼす影響 ワークショップ7：基礎から臨床にみる神経細胞の特殊性と普遍性(W7) 日本放射線影響学会第 59 回大会 2016 年 10 月 26 日~28 日、広島市 JMS アステールプラザ
- ⑤ 桑原義和、漆原祐介、富田和男、佐藤友昭、栗政明弘、福本学 これまでに分かった放射線耐性細胞の特徴と X 線照射で誘発される細胞死 第 2 回治療耐性がん細胞研究協議会セミナー 2017 年 2 月 2 日 東京
- ⑥ 桑原義和、漆原祐介、富田和男、佐藤友昭、栗政明弘、福本学：「臨床的放射線耐性細胞の特徴と放射線耐性研究について」鹿児島大学 歯科応用薬理学セミナー 2017 年 5 月 25 日。鹿児島県鹿児島市、鹿児島大学歯学部
- ⑦ 富田和男、桑原義和、高裕子、五十嵐健人、漆原祐介、山西沙祐里、宮脇正一、栗政明弘、西谷佳浩、福本学、佐藤友昭：CRR 細胞における過酸化水素耐性メカニズムの解

析 第3回治療耐性がん細胞研究協議会セミナー 2018年2月24日 千葉県成田市 成田富里徳洲会病院

〔図書〕(計 1 件)

栗政明弘：細胞周期とDNA損傷を検出するバイオセンサーとその画像解析システム バイオセンサーの迅速・簡易・高機能化技術と課題解説書 第8章 第10節：医療用バイオセンサー開発における課題と解決策の取り組み事例 がん化学療法剤スクリーニングのためのバイオセンサーシステムの開発事例 技術情報協会 平成26年4月 発刊

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 1 件)

名称：DNA二本鎖切断損傷の解析装置及び解析方法

発明者：栗政明弘、富田祐一郎

権利者：国立大学法人鳥取大学

種類：特許

番号：特許第5938764号

取得年月日：平成28年5月27日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗政 明弘 (KURIMASA, Akihiro)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：80343276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし