

重粒子線照射に特異的なタンパク質リン酸化反応の探索

[1] 組織

代表者：矢島 浩彦
(放射線医学総合研究所 重粒子セ)

対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：藤森 亮
(放射線医学総合研究所 重粒子セ)

研究費：物件費 20万円

[2] 研究経過

放射線で誘発される損傷の中でも DNA 二本鎖切断 (DSB) は重篤な損傷であり、重粒子線治療における癌細胞殺傷効果も DSB 誘発が主たる要因になっていると考えられる。X線と比べると、重粒子線は線エネルギー付与 (LET: Linear Energy Transfer) が高いため、イオン粒子の飛跡に沿って短い距離の間に多くのエネルギーを放出する (高LET)。X線やガンマ線は低LET放射線である。そのため、重粒子線によって生じた DSB は近傍に塩基損傷などが同時に生じている場合が多く、「複雑な損傷」などと呼ばれる。この様な違いが重粒子線に特異的な生物効果を生むと考えられ、同じ線量でもアポトーシスや突然変異、染色体異常の頻度はX線とは異なり、細胞致死効果は高い。このような性質が、重粒子線癌治療の優れた成績に結びついている。しかしこれら生物学的エンドポイントの違いは細胞側の応答反応が進んだ後の結果であり、照射によって生じた損傷構造の違いに応じて実際に分子レベルでどの様に異なった反応が起き、それがどの様にエンドポイントの違いへと繋がっているかは未だに明らかではない。DNA 損傷応答 (DDR: DNA Damage Response) としてはDNA修復や細胞周期チェックポイントが知られているが、さらに両者に影響を与える要素として近年ではクロマチン構造の変換も着目されている。LETの差によってこれらの初期反応にどのような違いが生じるかを明らかにする事で、初めてエンドポイントの違いがどのように生じるかが解き明かされると考えられる。

これまでに研究が進んでいる重要な初期反応は、タンパク質のリン酸化やユビキチン化、アセチル化などの翻訳後修飾である。中でもリン酸化は多くの反応経路で他の修飾を制御しており、最上流で機能している。これまでに多くの知見が得られているが、そのほとんどがX線 (ガンマ線) を用いて行われたものであり、重粒子線照射に対する初期反応の研究は極めて乏しい。こうした観点から本研究の目的は、重粒子線によってもたらされる DNA 損傷に特異的なリン酸化反応をX線と比較しながら明らかにすることである。こうした分子レベルでの解析を着実に進める事は、増感標的分子の探索を含めた重粒子線治療の高度化や、多くの重粒子線を含む宇宙放射線に対する防護のための基礎研究として重要であると考えられる。

ヒト細胞において主要な DSB の修復系は非相同末端結合 (NHEJ: Non-Homologous End Joining) と相同組換え (HR: Homologous Recombination) によるものである。重粒子線によって生じる DSB は NHEJ による修復の効率が低いことが知られており、おそらく「複雑な DSB」が直接結合に不都合な構造であるためと考えられるが、実際に両修復経路の寄与のバランスがX線と比べてどの様に違っているか、詳細な検討はなされていなかった。そのた

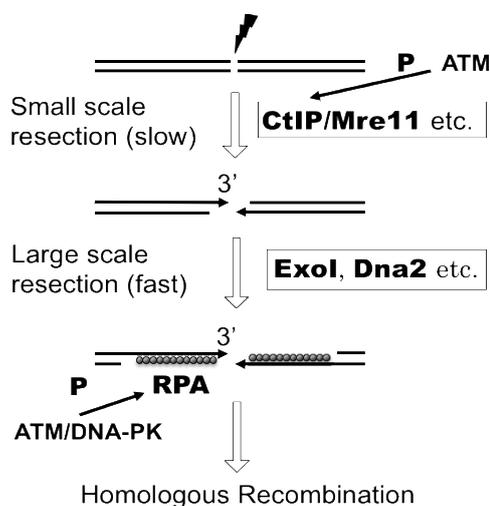


図1. HRの初期過程、DNA末端リセクションの模式図。P: リン酸化反応。

年度は、まず HR 経路のリン酸化シグナルの検証から始めた。HR の初期過程は DNA 末端リセクションとして知られており、そこで中心的な役割を果たすことが明らかになっている CtIP のリン酸化のレベルと、その後生じる RPA のリン酸化レベルをリセクション活性の指標として検証した (図 1)。その結果、ヒト細胞に重粒子線を照射すると、同じ線量では X 線よりはるかに多くの CtIP と RPA のリン酸化が観察され、さらに炭素線と鉄線を比べると、より LET の大きな鉄線で炭素線よりも強いシグナルが観察され、LET に依存してリセクションへのシグナルが上昇していくことが示唆された。また、これらの反応が ATM 依存的事であることも示された。蛍光抗体法によっても、明瞭なリセクションの活性 (RPA foci 形成) が観察できた。一方で X 線と異なり、ヘテロクロマチン内に限らずユークロマチンに生じた DSB でもリセクション反応を受けていることが明らかになった。

重粒子線の照射には放医研の施設、HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) を利用し、放医研にてウェスタン・ブロットや蛍光抗体法による細胞染色などを行った。共同研究計画に関しては、必要に応じて電子メールによる議論をし、学会会場での会談に加えて代表者が加齢研を訪問し、議論を重ねた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

抗 RPA 抗体、抗リン酸化 RPA 抗体による検出に加えて、BrdU 抗体を利用して核内の一本鎖 DNA を検出する方法で、RPA foci が実際にリセクション反応を表していることが確認できた。

増殖中のヒト細胞では、重粒子線照射後に ~80 % の細胞がリセクション活性を示した。細胞周期マーカーを使った実験によりリセクション反応の細胞周期依存性を詳細に検討したところ、重粒子線照射後の G1 期細胞の 20-40 % がリセクション活性を示す事が明らかとなった。この結果は、ヒト G1 細胞の少なくとも一部はリセクションの機能を保持していることを示す初めての報告となる。

一方 G2 期細胞では、ヒト細胞を重粒子線で水平照射するとイオン粒子の飛跡 (トラック) 上に生じた DSB の約 85 % がリセクションのシグナルを示し、大多数が HR によって修復されると推定される。X 線等の低 LET 線によって生じた G2 期の DSB では、逆に 70 % 以上が NHEJ で修復される事が報告されており、顕著な対比を示した。以上から、重粒子線

によって生じる複雑な DSB は、その構造の違いによって低 LET 線の場合とは大きく異なる反応を引き起こしていることを明瞭に示すことが出来た。

さらに、重粒子線照射直後に CtIP 分子が多様な修飾を受けていることが本研究で明らかになり、その修飾の実態を質量分析によって解明していくために、内在性 CtIP を高効率で回収する方法として免疫沈降法の条件検討を進めている。また、修飾型 CtIP に特異的に結合する新規タンパク質を探索するため、必要なプラスミド構築などを始めた。当初は CtIP の cDNA を PCR で増幅することを試みたが不調だったため、かずさ DNA 研究所由来のクローンを購入した。すでにこのクローンをプロテオミクス解析用のベクターに導入してあり、発現用細胞株の樹立に取り組んでいる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、重粒子線によって生じる複雑な DSB が特異的に誘発する強いリン酸化反応が明らかになった。新規の関連因子を発見・同定できれば、DSB 認識から始まる DDR 機構の解明に大きく寄与すると考えられ、重粒子線の研究領域のみならず、DSB 応答研究全般への波及効果は大きい。放医研内組織の「国際オープンラボラトリー」でも本研究を推進し、海外著名研究者との共同研究としても発展しつつある。

また本研究の結果はリセクションと HR の経路が重粒子線治療で有効な増感標的となる可能性を示唆しており、臨床への応用を展望した基礎研究への発展も期待される。

[4] 成果資料

本研究の成果は放射線影響学会や分子生物学会、国際ミーティングなどで発表している。また、得られた知見の基本的な部分を論文として投稿中である。