

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)

研究費：物件費 30万円

[2] 研究経過

放射線によって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線に比べると、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、complex DSB などと呼ばれる。このよう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 X線より細胞致死効果は高い。この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、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ように異なった反応が起き、それがどのようにして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。損傷構造の複雑さの違い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 complex DSB が直接結合に不都合な構造であるためと考えられる。そのためまず昨年度までに、HR へのシグナルが昂進しているかを調べた。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

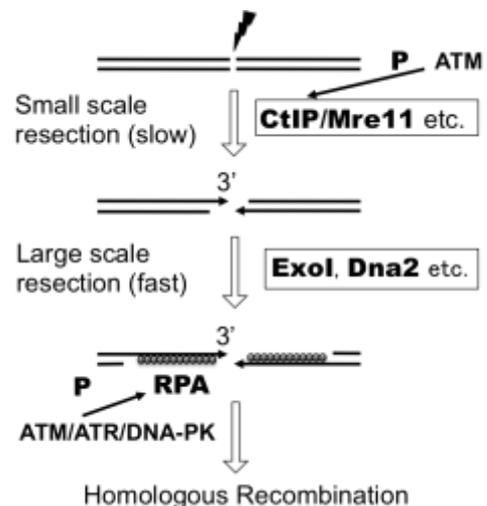


図1. HRの初期過程、DNA末端リセクションの模式図。P: リン酸化反応。

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線よりはるかに強いシグナルが観察できた。また、これらの反応がATM依存的事であることも示した。蛍光抗体法によるリセクション活性(RPAフォーカス形成)の観察により、G2期で生じたDSB全体の20%程度だけがHRによる修復を受ける(リセクションを受ける)と考えられているX線(simple DSB)の場合とは異なり、重粒子線によって粒子線の飛跡上に生じたDSBの~85%はリセクションを受けていることを明らかにした。以上から、complex DSBによってリン酸化を含む特異的な反応が惹起されていることを示すことができた。さらに細胞周期を解析した結果、G1期細胞の約30%が重粒子線照射の後にリセクション活性を示すことが明らかになり、マイクロホモロジーを利用した末端結合(MMEJ)等によって修復されると考えられる。

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。さらに、加齢研側で必要なプラスミド構築等が進められており、密接な共同研究として進展している。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下の研究成果を得た。

G1期細胞に見られるリセクション反応をさらに解析し、これもCtIPに依存していることを明らかにした。この結果を加え、本研究課題の基盤となる成果をまとめてDNA repair誌に発表した。概略を図2に示す。さらに、照射後の高度リン酸化の時期を過ぎた後にCtIPがフォーカスを形成し長時間に渡って維持されており、その間に低レベルのリン酸化を受けているなど、CtIPの新たな機能を示唆する結果も得られており解析を進めている。

また、重粒子線照射によって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、その修飾の実態や相互作用タンパク質を解明していくために加齢研において検討を進めた。CtIPの誘導発現細胞株の樹立を試みたがうまくいかず、おそらく細胞に対する毒性(CtIP自体のヌクレアーゼ活性も示唆されている)のためだと思われる。代わって、一過性発現その他の方法を進めていく計画である。

(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complex DSBが特異的に誘発する強いリン酸化反応が明らかになり、DSB構造の複雑さが修復経路選択に影響を及ぼす重要な因子であることを示した。さらにCtIPの新規の機能や関連因子を発見・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、Penelope A. Jeggo (サセックス大学) 教授との共同研究の基盤ともなった。さらに発展させていくために、新年度からは新規課題として加齢研共同研究を新たに申請中である。

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。

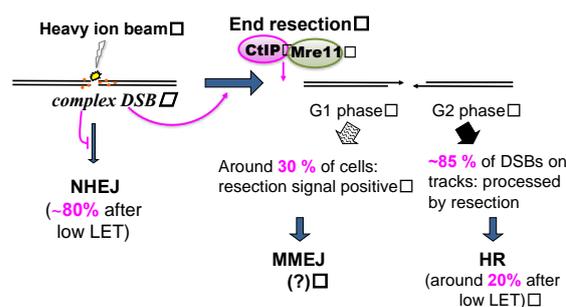


図2. これまでの成果のまとめ。

[4] 成果資料

本研究の成果は分子生物学会や放射線影響学会、国際ミーティングなどで招待講演を含めて発表した。また、基本的な部分を以下の通り論文発表した。

原著論文

Yajima, H., Fujisawa, H., Nakajima, NI., Hirakawa, H., Jeggo, PA., Okayasu, R., Fujimori, A. The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. *DNA Repair (Amst)*, 12:936-946, 2013.