

(1) 中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構

東京工業大学科学技術創成研究院

松本 義久、島田 幹男

国立がん研究センター研究所

今道 祥二

近畿大学原子力研究所

山西 弘城、松田 外志朗

【目的】

本研究の目的は、DNA 修復遺伝子欠損細胞、DNA 修復酵素阻害剤等を用いて、中性子線の DNA 損傷の特徴とその DNA 修復機構を明らかにすることである。種々の DNA 損傷の中で最も重篤と考えられる DNA 二本鎖切断(double-strand break; DSB)は、主として非相同末端結合(non-homologous end joining; NHEJ)と相同組換え(homologous recombination; HR)の二つの機構で修復される。NHEJ は HR に比べて誤りを起こしやすいと考えられているが、一方で、HR は姉妹染色分体を必要とするため S 期から G2 期に限定される。G0/G1 期の細胞の割合が高く、ゲノム上でタンパク質をコードする領域が少ないヒトなどの細胞では、NHEJ の重要性が高いと考えられる。NHEJ では、最初に Ku70、Ku86(Ku80)からなるヘテロダイマーが DSB に結合し、タンパク質リン酸化酵素である DNA-PKcs を動員する。ここで、PAXX が Ku と DSB との結合を安定化させる。必要に応じて末端の整形(プロセッシング)が行われた後、DNA ligase IV が末端同士を連結して修復が完了する。XRCC4、XLF は DNA ligase IV の機能を調節、補佐する。

本研究では、NHEJ に関わる分子群の欠損細胞、部分欠失体や変異体発現細胞、阻害剤などを用い、原子炉照射後の細胞生存率、突然変異率、分子の存在量および存在状態を解析することより、原子炉中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構の特徴を明らかにすることを目的とする。

【これまでの経過と今年度の目的】

本研究は平成 17 年度から行っている。まず、近大原子炉で XRCC4 欠損細胞および変異体発現細胞の照射を行い、コロニー形成法による生存率を求め、これまでに得られている X 線照射の結果と比較した。近大炉での照射は、(i)中性子線とγ線が混ざっている点、(ii)線量率が低い点においてこれまでの X 線と大きく異なるが、感受性の傾向は概ね同じであった。さらに、DNA-PK の阻害剤 NU7026、類縁分子 ATM の阻害剤 KU55933、DNA-PK と ATM の両者を阻害する wortmannin の効果を検討し、更に、原子炉照射と X 線照射の比較を行った。その結果、原子炉照射で生じた DNA 損傷の修復に XRCC4 の調節に DNA-PK と ATM の両方が相補的に関わっていること、更に、原子炉で生じた DNA 損傷は、X 線で生じた DNA 損傷と比較して、DNA-PK、ATM、XRCC4 の連携による修復が難しい、あるいは修復しても間違いを起こしやすいことが示唆された。この理由として、中性子線は電離密度が高く、密集した DNA 損傷(クラスター損傷)を生成することが考えられた。そこで、中性子線によって生じた DNA 損傷の修復における誤りの起こりやすさを測定し、その特徴を解析するため、6-thioguanine 耐性を指標として、HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 遺伝子

の突然変異検出を試みた。平成 25 年度～28 年度にかけては、X 線照射に関するデータを収集した。平成 28 年度は、NHEJ における最初の因子である Ku、DNA-PKcs の役割を探るため、Ku70 欠損マウスおよび DNA-PKcs 欠損(scid)マウス由来の胎児線維芽細胞を用いた基礎検討を行った。平成 29-30 年度は、原子炉運転再開を受けて新しい細胞群に照射を行い、細胞増殖や生存率を指標とした感受性と DNA 損傷応答分子群の解析のための試料を取得した。今年度は、平成 28-30 年度にかけて基礎的検討を行った細胞群について原子炉での照射実験を行い、生存率、DNA 損傷などの検討を行った。また、ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)に用いる中性子線線質の評価を近畿大学原子炉及び他の中性子線源による、細胞の損傷度と線量の関係から明らかにすることを目的とする。本研究ではそのための基礎データとしての細胞生存率と DNA 損傷の特徴について解析を試みた。

【本年度の研究経過】

本年度は令和元年 5 月 30 日(木)～31 日(金)、9 月 19 日(木)～20 日(金)、12 月 19 日(木)～20 日(金)に、近畿大学原子力研究所の原子炉を用いた細胞照射を行った。合わせて、中性子と X 線の影響を比較するため、X 線照射装置を用いた照射を試みた。

【材料・方法】

1. 細胞

本年度は、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ヒト B リンパ球由来 TK6 細胞、放射線照射実験に用いられている HSG 細胞及びヒト乳がん由来 MCF-7 細胞を用いた。これらの細胞は、RPMI1640 培地(ナカライテスク)あるいは DMEM(4.5g/L glucose) 培地(ナカライテスク)、または MEM 培地 (ナカライテスク) に 10%容の牛胎児血清(Hyclone)と抗生物質として 1%容のペニシリン・ストレプトマイシン溶液(ナカライテスク)を添加し、MCF-7 について非必須アミノ酸、ピルビン酸及びインシュリンをさらに添加し、37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。

2. 照射

細胞を必要に応じてトリプシン処理、遠心によって回収し、1.5ml の凍結チューブに入れて照射した。原子炉照射では、中性子束密度が最大となる点(下端から 33cm)にチューブを置き、1、2、3 時間照射した。また照射時にサンプル表面に金箔及び TLD を設置した。BNCT で用いるホウ素製剤である BPA は照射 1 時間前に細胞懸濁液に加えた。X 線照射は近畿大学原子力研究所の生物照射用 X 線発生装置を用い、管電圧 140 kV、管電流 5 mA、フィルター 1 mm 厚アルミニウムの条件で行った。線量率は 2.2 Gy/min であった。γ線照射は東京工業大学コバルト照射施設を用いて行った。線量率は 0.8-1.0 Gy/min であった。

また、タンパク質の発現量、翻訳後修飾(リン酸化)状態は、ウェスタン・ブロッティング法によって検討した。放射線照射後、細胞を 1,200 rpm、5 分の遠心によって回収し、Ca²⁺、Mg²⁺-free PBS で 2 回洗浄した。運搬はドライアイス中で行い、保存は-85℃で行った。

【結果と考察、今後の展望】

原子炉照射を行った細胞における XRCC4 タンパク質のリン酸化を引き続き検討中である。特に、マウス胎児線維芽細胞を用いた XRCC4 のリン酸の検出は X 線、γ線の場合も成功し

ていないため、今年度はヒト細胞に絞ってサンプルを収集した。また、最近、免疫沈降によりリン酸化の感度を上げることに成功したので、適用を予定している。

中性子線照射における熱中性子線の測定結果を表1、表2に示す。放射線照射後の細胞生存率や影響評価は解析中である。今後、近畿大学原子炉の照射場に含まれる高速中性子線等の成分の解析を行う。また、加速器 BNCT システム等の他の中性子源でも中性子線照射を行い、それぞれの線質による細胞影響評価を比較する。

表1 2019年9月20日金線測定結果

Irradiation time [min]	Thermal neutron flux [cm^2/s]	Thermal neutron fluence [cm^2]
60	1.08.E+07	3.88E+10
30	1.09.E+07	1.96E+10
60	1.05.E+07	3.78E+10

表2 2019年12月12日金線測定結果

Irradiation time [min]	Thermal neutron flux [cm^2/s]	Thermal neutron fluence [cm^2]
60	1.05.E+07	3.79E+10
120	1.01.E+07	7.24E+10
180	9.83.E+06	1.06E+11

(業績一覧及び論文要旨 記載例)

学会発表、論文発表などなし

(学生等氏名リスト 記載例)

実験・測定補助者

神元 梨穂

(計 1 名)