

(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。原子炉放射線は高速中性子線、熱外中性子線、熱中性子線そしてガンマ線で構成される。DNA損傷は高速中性子線による影響が大きいと考えられている。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、主として非同源末端結合(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。また、近年ではホウ素と熱中性子線の核反応で生じるアルファ線を利用するホウ素中性子捕捉療法(BNCT)開発が進められている。そのため、本研究では原子炉放射線に加えて、ホウ素中性子捕捉反応による細胞影響についても評価する。

【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 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、これまでに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)に用いる中性子線の線質の評価を近年行っており、ホウ素製剤投与による殺細胞効果が生じることを確認している。本年度は 3 つの細胞株 (HSG 細胞、A375 細胞、SAS 細胞) を用いて、近畿大学原子炉でのホウ素製剤併用による殺細胞効果の程度について明らかとすることを試みた。また、本研究ではそのための基礎データとしての金箔と TLD の照射から、熱中性子線測定とガンマ線線量の測定を試みた。

【本年度の研究経過】

本年度は令和 2 年 10 月 20 日に、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。また、中性子線 2 時間照射サンプルについて、X 線照射装置による X 線 2 Gy の追加照射も試みた。また、細胞サンプルと同時に金箔・TLD も照射し、熱中性子線とガンマ線の測定も試みた。

【材料・方法】

1. 細胞

本年度は、放射線照射実験に用いられている HSG 細胞、ヒトメラノーマ由来 A375 細胞、ヒト扁平上皮がん由来 SAS 細胞を用いた。これらの細胞は、MEM 培地 (ナカライテスク)、DMEM 培地(ナカライテスク)、または DMEM/Ham's F12 培地(ナカライテスク)を用い、それぞれ 10%容の牛胎児血清(Hyclone)と抗生物質として 1%容のペニシリンーストレプトマイシン溶液(ナカライテスク)を添加し、37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。

2. ホウ素製剤及び照射準備

ホウ素製剤として BPA (boronophenylalanine, Katchem Ltd., チェコ共和国) を用い、フルクトース用いて、これまでの論文報告にのっとり調整した。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、ホウ素製剤または PBS を加えた。ホウ素製剤最終ホウ素濃度を 0, 12.5, 25, 50 ppm となるように、1 時間以上培養したのちに照射を行った。各細胞懸濁液は 0.2 ml の PCR チューブに入れて照射を行った。

3. 中性子線照射及び X 線照射

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 9 本の 0.2 ml PCR チューブ中央を合わせて置き、1、2、3、4 時間分照射した。また照射時にサンプル表面に金箔及び TLD を設置した。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、中性子線 2 時間照射を行ったサンプルに対してすぐに 2 Gy の追加 X 線照射を行った。機器の条件は管電圧 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い、線量率は 2.2 Gy/min であった。

4. コロニーフォーメーションアッセイ

照射したサンプルは 6 ウェルプレートに播種し、10 日程度培養を行いコロニーが十分に確認できるようになった時点で、エタノール固定、クリスタルバイオレット染色を行い、計数した。

【結果と考察、今後の展望】

原子炉照射を行った照射体系における金箔の放射化分析から求めた熱中性子線の測定結果と、TLD からガンマ線の影響を評価した。金線の放射化の測定結果から、熱中性子線フラックスは約 $1.1 \times 10^7 / \text{cm}^2 / \text{s}$ であり、1 時間照射による TLD の測定結果は読み取り値で約 260 mSv を示し、これまでの照射結果と近い傾向であった。放射線照射後の細胞生存率や DNA 損傷およびその修復などは解析中である。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。

(業績一覧及び論文要旨)

学会発表、論文発表などなし