

25. 低酸素性腫瘍における放射線誘発致死ゲノム損傷の解析

井出 博

広島大学 大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻

Key words : 放射線, 低酸素腫瘍, DNA-タンパク質クロスリンク, DNA 修復

緒 言

腫瘍には血流がとどかない低酸素分画が存在する。低酸素分画に含まれる低酸素性細胞は、周辺の正常組織（常酸素細胞）に比べ放射線感受性が低く、放射線治療効果を下げる要因となっている。一般に、放射線の致死効果は、照射された細胞のゲノム損傷に由来する。ゲノム損傷としては、塩基損傷（Base damage）、一本鎖切断（SSB）、二本鎖切断（DSB）、DNA-タンパク質クロスリンク（DPC）などが明らかにされているが、遺伝学的・生化学的解析から、主要な致死損傷はDSBであると考えられている。DSB生成には酸素濃度依存性があり、低酸素下では生成量が減少する。一方、低酸素下では、特徴的な損傷としてDPCが生成する。我々は、DPCがDNA複製や転写を強く阻害することから、DSBと同様に致死性の高い損傷であることを示した^{1,2)}。したがって、低酸素性細胞の放射線照射では、DSBに加え、DPCが細胞致死に関わっている可能性がある。さらに、このことは、正常組織（常酸素細胞）と腫瘍組織（低酸素性細胞）で放射線致死メカニズムが異なっていることを示唆する。また、がんの放射線治療では、陽子線や炭素イオン線などの粒子線ビームが用いられるようになり、高い治療実績をあげている。この要因一つは、腫瘍に対する物理的なビームの収斂性である。しかし、X線や γ 線と粒子線ビームでは線エネルギー付与（LET）に違いがあり、LETとDPC生成、さらに治療効果が生物学的にどのようにリンクしているかは明らかにされていない。本研究では、マウス腫瘍をX線および炭素イオン線ビームで照射し、DPCとDSBの生成量、修復動態、DPC生成のLET依存性を解析した。

方 法

C3H/Heマウスの下肢にSCCⅦ腫瘍を移植し、直径が約10mmになるまで飼育した。このサイズの腫瘍は低酸素分画を含まないことから（常酸素腫瘍）、大腿部を15分間結紮し人為的に低酸素状態にした（低酸素腫瘍）。常酸素および低酸素腫瘍をX線（LET = 9.4 keV/ μ m）あるいは炭素イオン線（80 keV/ μ m, Spread-Out Bragg Peak）で照射した。炭素イオン線照射は、放射線医学総合研究所の重粒子加速器HIMACを用いて行った。照射後、低酸素腫瘍は結紮を取り除き常酸素状態に戻した。その後、経時的に腫瘍を摘出し、DPCは蛍光標識法、DSBはstatic-field gel electrophoresis法で分析した³⁾。

結 果

1. X線照射によるDPC生成

X線照射した腫瘍のDPCを蛍光測定により分析した結果を図1に示す。常酸素および低酸素のいずれの腫瘍においても、DPC量は線量依存的に増加した。DPC生成の線量依存直線の勾配からDPC生成効率を比較したところ、低酸素腫瘍におけるDPC生成効率は常酸素腫瘍に比べ2.8倍高かった。このことから、低酸素腫瘍では、常酸素腫瘍に比べ高い効率でDPCが形成されることが明らかとなった。また、未照射の腫瘍においても、DPCに由来する蛍光シグナルが観察されたことから、内在性DPCの存在が示唆された。

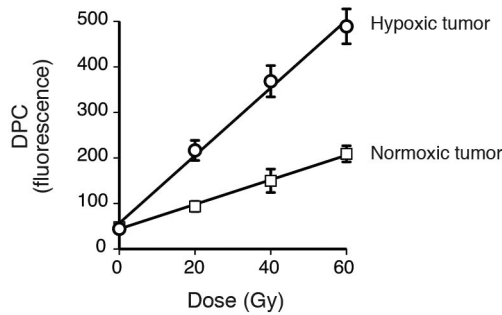


図1. X線照射した常酸素および低酸素腫瘍におけるDPC生成

□: 常酸素腫瘍 (Normoxic tumor)、○: 低酸素腫瘍 (Hypoxic tumor)、エラーバー: 標準偏差 (SD)。DPCは蛍光標識法で分析した。

2. X線誘発DPCおよびDSBの修復

X線照射 (40 Gy) した腫瘍におけるDPCおよびDSBの修復動態を調べた結果を図2に示す。常酸素・低酸素腫瘍ともに、DPCは時間とともに二相的に減少した。DPCの時間依存的な減少は、二重指数関数モデルでよく近似され、そのパラメータ解析から、速やかに修復されるDPC (半減期 0.65 h) の割合が32%、ゆっくり修復されるDPC (半減期 70 h) の割合が68%と見積もられた。一方、DSBは、DPCに比べ非常に速やかに修復された。DSBの減少も二重指数関数モデルでよく近似され、そのパラメータ解析から、速やかに修復されるDSB (半減期 0.18 h) の割合が51%、ゆっくり修復されるDSB (半減期 3.9 h) の割合が49%と見積もられた。この結果から、X線誘発DPCは、DSBに比べ長期にわたりゲノムに残留することが示された。

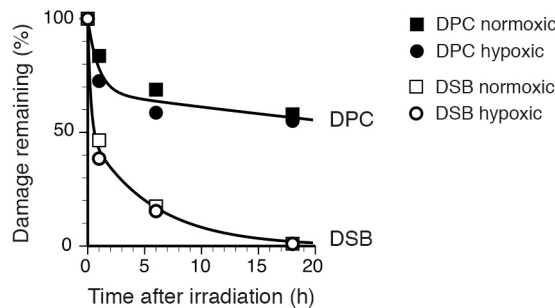


図2. 常酸素および低酸素腫瘍におけるX線誘発DPCとDSBの修復

■: 常酸素腫瘍 DPC、●: 低酸素腫瘍 DPC、□: 常酸素腫瘍 DSB、○: 低酸素腫瘍 DSB。DPCは蛍光標識法、DSBはstatic-field gel electrophoresis法で分析した。

3. 炭素イオン線照射によるDPC生成

炭素イオン線照射した腫瘍のDPCを蛍光測定により分析した結果を図3に示す。DPC生成の線量依存直線の勾配からDPC生成効率を比較したところ、低酸素腫瘍におけるDPC生成効率は常酸素腫瘍に比べ2.4倍高かった。さらに、X線と炭素イオン線のDPC生成効率を直線の勾配から比較した結果、常酸素・低酸素腫瘍ともに、炭素イオン線のDPC生成効率はX線に比べ、有意に高いことが明らかとなった (常酸素腫瘍 1.5倍、低酸素腫瘍 1.3倍、 $p < 0.05$ (ANCOVA))。この結果から、高LETの炭素イオン線が低LETのX線に比べ、効率よくDPCを形成することが示された。

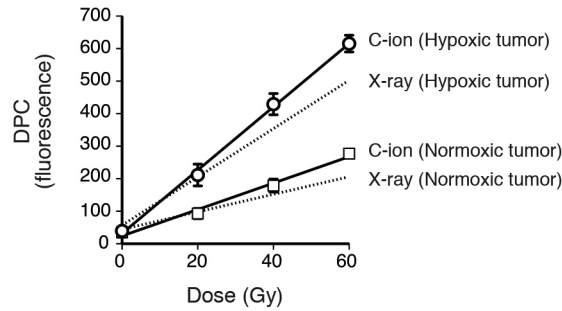


図3. 炭素イオン線照射した常酸素および低酸素腫瘍における DPC 生成

□：常酸素腫瘍 (Normoxic tumor)、○：低酸素腫瘍 (Hypoxic tumor)、エラーバー：標準偏差 (SD)。破線は、対応する腫瘍における X 線誘発 DPC (図 1) を示す。DPC は蛍光標識法で分析した。

考 察

本研究の結果、放射線照射により、低酸素腫瘍では常酸素腫瘍に比べ高い効率で DPC が形成されることが明らかとなった (図 1)。放射線照射を受けた細胞では、生体分子が電離し、DNA やタンパク質のラジカルが生成する。酸素濃度が低い低酸素腫瘍では、DNA ラジカルとタンパク質ラジカルが再結合し DPC を形成する (図 4)。一方、酸素濃度が高い常酸素腫瘍では、DNA ラジカルとタンパク質ラジカルは、酸素と優先的に反応し不活性化するため、DPC を形成するラジカル再結合が起こりにくく、DPC 生成量が低下したと考えた (図 4)。また、高 LET の炭素イオン線が低 LET の X 線に比べ、効率よく DPC を形成することが明らかとなった (図 3)。我々は以前の研究で、プラスミドの放射線誘発 DSB が LET 増加とともに減少することを明らかにし、この傾向と OH ラジカル生成の LET 依存性には正の相関関係があることを示した⁴⁾。一方、今回得られた結果は、DPC 生成が OH ラジカル生成ではなく、放射線の電離密度に依存して増加することを示唆する。高 LET 放射線は飛跡に沿って高密度に DNA およびタンパク質ラジカルを誘発すると予想されることから、ラジカルの再結合反応が効率よく起こり DPC 生成効率が上昇したと推定される。

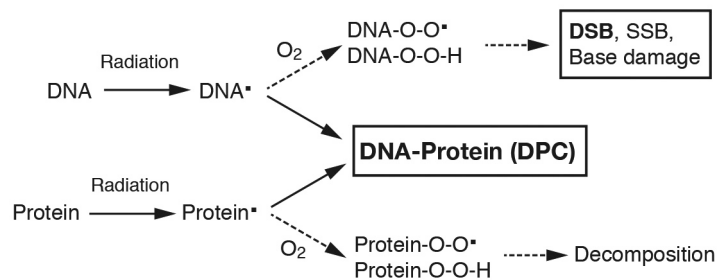


図4. 常酸素腫瘍および低酸素腫瘍における DPC 生成機構

破線矢印：常酸素腫瘍、実線矢印：低酸素腫瘍。詳細は本文参照。

さらに、本研究により、X 線誘発 DPC は、DSB に比べ長期にわたりゲノムに残留することが明らかとなり、複製や転写に影響を与える可能性が示唆された (図 2)。X 線誘発 DSB は、非同末端結合 (NHEJ) と相同組換え修復 (HRR) で修復されることが知られており、本研究で認められた DSB の時間に依存した二相的な修復は、速い修復が NHEJ、遅い修復が HRR に由来すると考えられる。X 線誘発 DPC でも時間に依存した二相的な修復が認められたが、関与する修復機構の違いによるものか、あるいは異なったタイプの DPC (例えばクロスリンクしたタンパクの違いなど) の修復に由来するものなのか今後明らかにしていく必要がある。最近、酵母およびアフリカツメガエル卵抽出物を用いた研究から、DPC に含まれるタンパク質特異的に作用するプロテアーゼの存在が報告された^{5,6)}。DPC にプロテ

アーゼが働くと、サイズが小さい DNA-ペプチドクロスリンクに変化するため、損傷乗り越え合成やヌクレオチド除去修復など既知の修復機構により修復できる可能性がある。また、類似した機構として、プロテアソームによる DPC 分解を介した修復について検討が行われているが、否定的な結果が得られている⁷⁾。

今後、放射線誘発 DPC の修復機構および広い範囲での LET 依存性などを解析し、放射線誘発致死損傷としての DPC の位置づけを明らかにしていく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、放射線医学総合研究所の平山亮一である。本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nakano T, Miyamoto-Matsubara M, Shoulkamy MI, Salem AHM, Pack SP, Ishimi Y, Ide H. Translocation and stability of replicative DNA helicases upon encountering DNA-protein cross-links. *J. Biol. Chem.*, 2013;288(7):4649-4658. doi: 10.1074/jbc.M112.419358. PMID: 23283980.
- 2) Nakano T, Ouchi R, Kawazoe J, Pack SP, Makino K, Ide H. T7 RNA polymerases backed up by covalently trapped proteins catalyze highly error prone transcription. *J. Biol. Chem.*, 2012;287(9):6562-6572. doi: 10.1074/jbc.M111.318410. PMID: 22235136.
- 3) Shoulkamy MI, Nakano T, Ohshima M, Hirayama R, Uzawa A, Furusawa Y, Ide H. Detection of DNA-protein crosslinks (DPCs) by novel direct fluorescence labeling methods: distinct stabilities of aldehyde and radiation-induced DPCs. *Nucleic Acids Res.*, 2012;40(18):e143. doi: 10.1093/nar/gks601. PMID: 22730301.
- 4) Terato H, Tanaka R, Nakaarai Y, Nohara T, Doi Y, Iwai S, Hirayama R, Furusawa Y, Ide H. Quantitative analysis of isolated and clustered DNA damage induced by gamma-rays, carbon ion beams, and iron ion beams. *J. Radiat. Res.*, 2008;49(2):133-146. PMID: 18219183.
- 5) Stinglee J, Schwarz MS, Bloemeke N, Wolf PG, Jentsch S. A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell*, 2014;158(2):327-338. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.053. PMID: 24998930.
- 6) Duxin JP, Dewar JM, Yardimci H, Walter JC. Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis. *Cell*, 2014;159(2):346-357. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.024. PMID: 25303529.
- 7) Nakano T, Katafuchi A, Matsubara M, Terato H, Tsuboi T, Masuda T, Tatsumoto T, Pack SP, Makino K, Croteau DL, Van Houten B, Iijima K, Tauchi H, Ide H. Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance to DNA-protein crosslinks in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 2009;284(40):27065-27076. doi: 10.1074/jbc.M109.019174. PMID: 19674975.