

論文の内容の要旨

論文題目 哺乳類及びニワトリ培養細胞における温熱、放射線併用効果
の分子メカニズムに関する研究

指導教官 細井 義夫 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 尹 洪蘭

【背景と目的】

温熱は古くからしばしば放射線との組み合わせで癌治療に用いられてきた。温熱と放射線を組み合わせる生物学的根拠としては、放射線感受性が低い S 期細胞や低酸素性細胞が温熱処理に対し高感受性であることと、温熱が放射線によって生じた DNA 傷害の修復を抑制することが挙げられるが、分子メカニズムは明らかになっていない。放射線によって生じる様々な DNA 傷害の中でも、DNA 二重鎖切断は最も致命的なものと考えられている。近年の研究から、哺乳類を含む高等真核細胞においては、DNA 二重鎖切断は主に 2 つの経路で修復されると考えられている。1 つは Ku70、Ku86 と DNA-PKcs から成る DNA-PK 複合体と、XRCC4-DNA ligaseIV 複合体などが関わる非相同末端再結合経路 (NHEJ) であり、もう一方は Rad51/Rad52 複合体、Rad50/Mre11/Nbs1 複合体などが関わる相同組み換え経路 (HR) である。

本研究室では数年前に、ヒト白血病細胞 MOLT-4 から精製した DNA-PK が温熱処理によって活性を著しく失うこと、DNA-PKcs ではなく Ku が温熱不安定性の原因であることを見出し、温熱による放射線増感のメカニズムの 1 つの仮説として提示した。この仮説に関係して、いくつかのグループが Ku86 あるいは DNA-PKcs を欠損する細胞で温熱による放射線増感が見られるかどうか

か検討しているが、結論は一致していない。

本研究では温熱による放射線増感作用のメカニズムを探ることを目的とし、Ku 及び他の DNA 修復関連分子を欠損する哺乳類、ニワトリ細胞を用いて検討を行った。

また、DNA-PKcs や Ku86 欠損細胞が温熱感受性であること、一方、XRCC4 欠損細胞が若干温熱抵抗性であることなど、NHEJ が温熱単独の感受性に関与することを示唆する報告もある。そこで、本研究ではこれらの細胞の温熱単独処理に対する感受性もあわせて検討した。

【材料と方法】

1. 本研究で用いた細胞を以下に示す。
 - ・チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1、及びそれに由来する Ku86 欠損細胞 *xrs5*
 - ・チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞 V79、及びそれに由来する Ku86 欠損細胞 XR-V15B
 - ・マウス白血病細胞 L5178Y 由来の XRCC4 欠損細胞 M10 にコントロールベクターあるいは正常ヒト XRCC4 cDNA を導入した細胞（それぞれ M10+Vector、M10+wtXRCC4）
 - ・ニワトリ B リンパ球細胞 DT40 及びその KU70、DNA-PKcs、RAD54 破壊株と KU70 と RAD54 二重破壊株（それぞれ *KU70*^{-/-}、*DNA-PKcs*^{-/-}、*RAD54*^{-/-}、*KU70*^{-/-}/*RAD54*^{-/-}細胞）
2. 温熱処理は 44.0～48.0℃に設定した電子制御恒温水槽（精度±0.05℃以内）中に培養フラスコを沈めることにより行い、X 線照射は、Shimadzu-Pantak 社製 X 線発生装置 HF-350（通常出力 200kV-20mA、1.4～2Gy/min）を用いて行った。
3. 細胞生存率はコロニー形成法により求めた。付着細胞はプラスチック製培養皿上に、浮遊細胞はアガロース中にコロニーを形成させた。細胞の生存曲線は LQ モデル式 $SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$ にあてはめ、10%生存率を与える線量 D_{10} を求めた。TER(thermal enhancement ratio)は温熱処理していない細胞の D_{10} を温熱処理した細胞の D_{10} で割ることによって求めた。
4. DNA-PK の活性は DNA-pull-down 法によって測定した。

【結果と考察】

1.NHEJ 欠損細胞の温熱感受性と温熱による放射線増感

xrs5 細胞の温熱感受性はコントロールの CHO-K1 細胞に比べほとんど変わらなかったが、XR-V15B 細胞はコントロールの V79 細胞に比べて若干温熱感受性を示した。また、*xrs5* 細胞では CHO-K1 細胞に比べ TER 値が小さい傾向が見られたが、XR-V15B 細胞では V79 細胞とほとんど違いが見られなかつ

た。M10+Vector 細胞は M10+wtXRCC4 細胞に比べ、わずかながら温熱抵抗性を示した。TER 値は両細胞の間ではほぼ同じであった。以上の結果から、温熱による放射線増感作用は少なくとも NHEJ の阻害だけでは説明できず、HR、あるいは他のメカニズムが関与する可能性があると考えられる。

2. DT40 とその修復欠損細胞の温熱感受性と温熱による放射線増感

ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞からは、二つの DNA 二重鎖切断修復経路の種々の遺伝子の欠損細胞が作製されており、温熱の放射線増感効果のメカニズム研究に有用な材料であると考えた。まず、DT40 及び変異株の温熱単独処理に対する感受性を調べたところ、DT40 は哺乳類細胞に比べて著しく温熱抵抗性であることが分かった。また、*KU70*^{-/-}と *DNA-PKcs*^{-/-}は野生型 DT40 とほぼ同等の温熱感受性を示した。*RAD54*^{-/-}は若干温熱感受性を示したが、*KU70*^{-/-}/*RAD54*^{-/-}細胞の感受性は野生型とほとんど変わらなかったため、HR が温熱感受性に重要な役割を果たすかどうかについては、今後の更なる検討が必要である。

次に野生型細胞を 46°C 温熱処理した後、DNA-PK 活性と放射線感受性を調べた。DT40 細胞においても温熱処理による DNA-PK 活性の低下は見られたが、その程度は小さく、また、放射線増感の程度とも一致しなかった。さらに、温熱による放射線増感が *KU70*^{-/-}及び *DNA-PKcs*^{-/-}細胞でも見られた。これらのことから、DT40 において DNA-PK の活性低下は温熱による放射線増感の主因ではないと考えられた。

KU70^{-/-}及び *DNA-PKcs*^{-/-} 細胞の放射線に対する生存率曲線は 2 相性を示した。70~80%を占める放射線感受性の画分は G1 期および S 期初期の細胞で、残りの放射線抵抗性の画分は S 期後期から G2 期の細胞と考えられている。これは、G1 期及び S 期初期の細胞に生じた DNA 二重鎖切断は NHEJ で修復しなければならないが、S 期後期から G2 期の細胞に生じた切断は HR によって修復可能であるためと説明されている。*KU70*^{-/-}及び *DNA-PKcs*^{-/-} 細胞の温熱処理後の放射線感受性を詳細に解析すると、放射線感受性画分の感受性はほとんどあるいは全く変化せず、放射線抵抗性画分の感受性のみが顕著に促進されていることが分かった。この結果から、温熱が S 期後期から G2 期における HR 経路を介した DNA 二重鎖切断の修復を抑制している可能性が考えられた。

温熱による放射線増感には HR に欠陥を持つ *RAD54*^{-/-}及び *KU70*^{-/-}/*RAD54*^{-/-} 細胞でも見られた。この結果から温熱による放射線増感には HR と NHEJ によるものだけではないという解釈も可能であるが、これらの細胞では HR が完全に欠損してはいないことを示す状況証拠もある。また、上述のように *KU70*^{-/-}や *DNA-PKcs*^{-/-}細胞の G1 期から S 期初期の集団の放射線感受性は温熱処理し

でも変化しなかったという結果は、NHEJ も HR もできない状況では温熱による放射線増感が起こらない可能性を示している。従って、これらの細胞で見られた温熱による放射線増感には RAD54 非存在下で残存する HR 活性の阻害によるもので、温熱は RAD54 以外の HR 分子の機能を阻害しているのであろうという解釈が現時点では最も妥当と考えられた。

【まとめと今後の展望】

本研究では、温熱と放射線の併用効果の分子メカニズムを明らかにするために、DNA-PKcs、Ku をはじめとする DNA 二重鎖切断修復関連分子を欠損する哺乳類及びニワトリ由来培養細胞を用いた検討を行った。

温熱による放射線増感において DNA-PK、Ku の失活が主要な役割を担うことを示す結果は得られなかった。しかし、DT40 の *KU70*^{-/-} 及び *DNA-PKcs*^{-/-} 細胞の G1 期から S 期初期の集団では温熱による放射線増感がほとんど見られないという結果からは、HR を行うことができないこの時期において NHEJ が温熱による放射線増感作用の担い手となっている可能性も考えられる。今後、細胞周期の同調を行い、野生型細胞がこの時期において増感されるかどうか調べることにより、この点を明らかにできると思われる。

また、これらの NHEJ 欠損細胞の感受性解析から、もう一方の HR による DNA 二重鎖切断修復が抑制されていることを示唆する結果が得られた。このメカニズムは現時点では明らかでないが、DT40 からは多くの HR 関連遺伝子の変異株が作製されており、この問題の解明に有用なツールとなることが期待される。