

博士論文

高 LET 放射線を用いた線量分布および

DNA 修復タンパク質の挙動と放射線増感に関する研究

(Studies on dose distribution, dynamics of DNA repair proteins and
radio-sensitization associated with high LET radiation)

藤澤 寛

目次

第 1 章 序論.....	5
1.1 はじめに.....	5
1.2 背景.....	6
1.2.1 がん治療.....	6
1.2.2 放射線治療.....	7
1.2.3 粒子線の線量分布と治療施設の現状.....	8
1.2.4 放射線抵抗性.....	9
1.2.5 高 LET 放射線.....	9
1.3 本研究の目的.....	12
1.4 本論文の構成.....	12
第 2 章 線量分布に着目した炭素イオン線と陽子線の脊索腫細胞での生物効果の比較.....	14
2.1 背景.....	14
2.1.1 粒子線について.....	14
2.1.2 脊索腫とは.....	14
2.1.3 OptiCell について.....	15
2.2 目的.....	16
2.3 実験方法.....	17
2.3.1 細胞および細胞培養.....	17
2.3.2 放射線照射.....	17
2.3.3 OptiCell を用いた細胞生存率測定.....	17
2.3.4 培養ディッシュを用いた細胞生存率測定.....	18
2.4 結果.....	19
2.4.1 水中での深さに対する細胞生存率.....	19
2.4.2 低 LET と高 LET での細胞生存率.....	19
2.4.3 U-CH1-N 細胞の RBE.....	19
2.4.4 細胞培養ディッシュでの細胞生存率と RBE.....	19
2.5 考察.....	21
2.6 まとめ.....	22
第 3 章 DNA 末端リセクションに関わる修復タンパク質 CtIP のフォーカス挙動.....	27
3.1 背景.....	27
3.1.1 DNA 二本鎖切断修復.....	27
3.1.2 DNA 二本鎖切断の修復経路選択.....	27
3.1.3 CtIP とは.....	28
3.1.4 複雑な DNA 損傷構造と DNA 末端リセクション.....	28
3.2 目的.....	29
3.3 実験方法.....	31

3.3.1	細胞培養	31
3.3.2	放射線照射および薬剤処理.....	31
3.3.3	蛍光免疫染色.....	31
3.3.4	蛍光顕微鏡撮影および画像取得	31
3.3.5	ウェスタンブロッティング	32
3.3.6	抗体	32
3.4	結果と考察	33
3.4.1	CtIP フォーカスは長時間 DSB 箇所 で維持される	33
3.4.2	CtIP は高リン酸化のピーク の後にフォーカスとして集積する。	33
3.4.3	フォーカスを形成し維持されて いる CtIP 分子は照射後早期に 集積した分子とは異なる。 .	34
3.4.4	ATM 依存の高リン酸化後は長 時間に渡り ATM/ATR を通して 低リン酸化状態を維持する	35
3.4.5	通常の SSD 伸長は CtIP フォーカス形成には必須では ない。	36
3.5	まとめ	37
第 4 章	高 LET 放射線と ATR 阻害による放射線増感作用	49
4.1	背景	49
4.2	目的	51
4.3	実験方法.....	52
4.3.1	細胞培養	52
4.3.2	放射線照射と薬剤処理	52
4.3.3	細胞周期解析.....	52
4.3.4	細胞成長曲線.....	53
4.3.5	小核試験	54
4.3.6	細胞生存率曲線	55
4.4	結果と考察	56
4.4.1	VE-821 薬剤は放射線誘発 G2 細胞周期チェックポイントを解 除する	56
4.4.2	ATR 阻害により細胞増殖が抑 制される.....	57
4.4.3	炭素イオン線による DNA 損傷 は ATR 阻害により高頻度に小 核を誘発する	58
4.4.4	ATR 阻害は細胞生存率を低下 させる.....	59
4.5	まとめ	61
第 5 章	結論.....	77
5.1	本研究の総括.....	77
5.2	今後の課題と展望.....	78
参考文献	80
謝辞	90
本研究に関わる研究業績	92
本研究以外の研究業績	94

図表目次

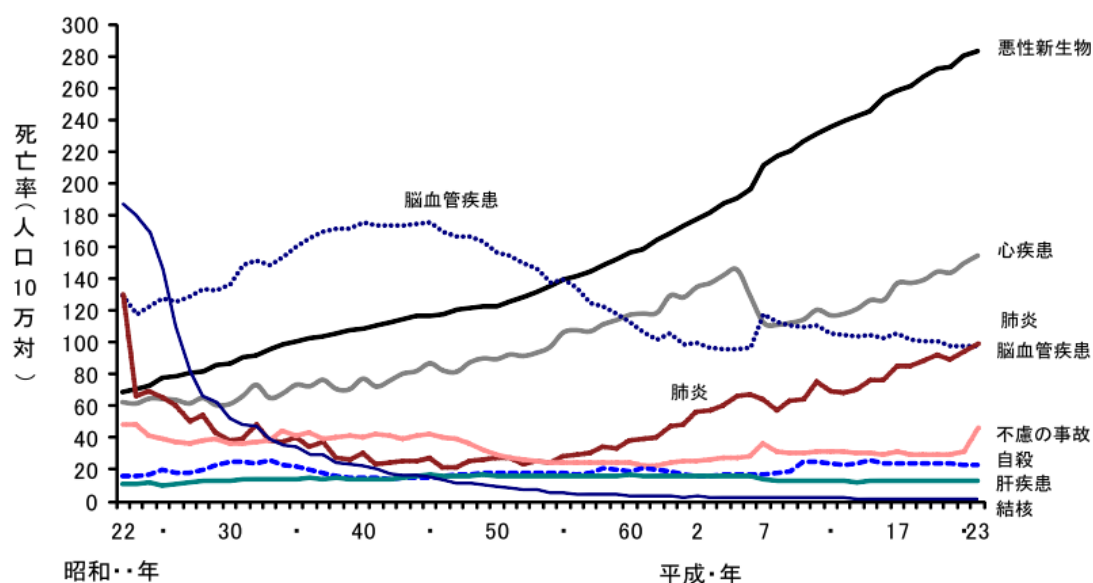
図 1-1 主な死因別にみた死亡率の年次推移	5
図 1-2 主な死因別死亡数の割合(平成 23 年)	6
図 1-3 日本の粒子線治療施設 (出典:独立行政法人 放射線医学総合研究所)	10
図 1-4 世界の粒子線治療施設 (出典:独立行政法人 放射線医学総合研究所)	11
図 1-5 重粒子線加速器 HIMAC (出典:独立行政法人 放射線医学総合研究所)	11
図 2-1 OptiCell 細胞培養チャンバー	18
図 2-2 ビーム進行方向に垂直になるような OptiCell の配置	18
図 2-3 水中での各深さにおける細胞生存率曲線	23
図 2-4 水中での各深さにおける相対線量と LET(一部改編)	24
図 2-5 炭素イオン線と陽子線の線量-生存率曲線	25
図 2-6 ブラックピーク近傍と遠方に分けた時の炭素イオン線と陽子線の細胞生存率曲線.....	26
図 3-1 主な DNA 二本鎖切断の修復経路.....	30
図 3-2 相同組換え修復経路における DNA 末端リセクション	30
図 3-3 炭素イオン線 10Gy 照射後の CtIP の高リン酸化	38
図 3-4 U2OS 細胞に炭素イオン線 2Gy 水平照射後、各時間での CtIP と RPA の集積の様子	39
図 3-5 鉄イオン線 10Gy 照射時の各細胞での CtIP の挙動	40
図 3-6 1BR-hTERT 細胞に鉄イオン線 2Gy 照射後 4 時間での CtIP と RPA 集積.....	41
図 3-7 U2OS に炭素イオン線 1Gy 垂直照射時の CtIP、リン酸化 RPA フォーカス数の変化...	42
図 3-8 各細胞にサイクロヘキシミドを処理した時の CtIP と Mre11 のタンパク質量.....	43
図 3-9 炭素イオン線 10Gy 照射しサイクロヘキシミド処理後の各タンパク質量.....	43
図 3-10 サイクロヘキシミド処理時の CtIPトラックの観察	44
図 3-11 サイクロヘキシミド処理時の CtIP、RPA および Rad51 のフォーカス数	44
図 3-12 サイクロヘキシミド処理時の U2OS 細胞での CtIPトラックの観察	45
図 3-13 Phos-tag を用いた CtIP のリン酸化バンドの検出	46
図 3-14 ATM 阻害時の CtIP のリン酸化.....	47
図 3-15 CtIP リン酸化に対する ATM および ATR の関与の検討	47
図 3-16 CtIP および RPA のフォーカス形成への ATM および ATR の関与の検討.....	48
図 4-1 BD FACSCalibur™ フローサイトメーター	53
図 4-2 コールターカウンター	53
図 4-3 蛍光顕微鏡 Olympus BX51、対物レンズ PlanApo 60 (NA=1.40)およびカメラ	54
図 4-4 炭素イオン線および X 線照射時の HeLa 細胞の細胞周期	62
図 4-5 炭素イオン線および X 線照射時の U2OS 細胞の細胞周期	63
図 4-6 炭素イオン線および X 線照射時の 1BR-hTERT 細胞の細胞周期	64
図 4-7 薬剤処理のみ(未照射時)の細胞成長曲線	65
図 4-8 炭素イオン線 3Gy 照射後の HeLa 細胞成長曲線.....	66

図 4-9 X線 6Gy 照射後の HeLa 細胞成長曲線	66
図 4-10 炭素イオン線 3Gy 照射後 5 日までの HeLa 細胞の観察	67
図 4-11 炭素イオン線 3Gy 照射後の U2OS 細胞成長曲線	68
図 4-12 X線 6Gy 照射後の U2OS 細胞成長曲線	68
図 4-13 炭素イオン線 3Gy 照射後 5 日までの U2OS 細胞の観察	69
図 4-14 炭素イオン線 3Gy 照射後の 1BR-hTERT 細胞成長曲線	70
図 4-15 X線 6Gy 照射後の 1BR-hTERT 細胞成長曲線.....	70
図 4-16 炭素イオン線 3Gy 照射後 5 日までの 1BR-hTERT 細胞の観察	71
図 4-17 小核形成法による炭素イオン線およびX線照射 24 時間後の小核数.....	72
図 4-18 炭素イオン線およびX線照射 24 時間後の小核数のヒストグラム.....	73
図 4-19 照射後 VE-821 を 8 時間処理した HeLa 細胞生存率曲線.....	74
図 4-20 照射後 VE-821 を 8 時間処理した U2OS 細胞生存率曲線.....	74
図 4-21 照射後 VE-821 を 8 時間処理した 1BR-hTERT 細胞生存率曲線	75
図 4-22 照射後 VE-821 を 24 時間処理した HeLa 細胞生存率曲線	75
図 4-23 照射後 VE-821 を 24 時間処理した U2OS 細胞生存率曲線	76
図 4-24 照射後 VE-821 を 24 時間処理した 1BR-hTERT 細胞生存率曲線.....	76

第1章 序論

1.1はじめに

日本の医療においてがんによる死亡数および罹患数は共に増加し続けており、厚生労働省のデータによると平成23年には35万人以上の方ががんで亡くなっている。我が国の死因の年次推移をみると、悪性新生物であるがんが一貫して増加しており(図1-1)、平成23年の全死亡者に占めるがんの割合は28.5%に達し、3.5人に1人はがんで亡くなっていることになる(図1-2)。また、国立がんセンターがん対策情報センターの推計によると、日本人男性は2人に1人、日本人女性は3人に1人は生涯において何らかのがんに罹患すると言われている。図1-2にある悪性新生物の死亡数・死亡率を部位別にみた場合、男性は「肺」が第1位でその割合の上昇傾向が著しい。また女性は「大腸」と「肺」がそれぞれ第1位と2位であり、共にその割合は上昇傾向となっている。高齢化率が25.0%(出典:「人口推計」(総務省統計局))という4人に1人が65歳以上の高齢者を持つ高齢社会の日本において、がん医療の重要性が増すとともに喫緊の課題となっている。



注：1) 平成6・7年の心疾患の低下は、死亡診断書(死体検案書)(平成7年1月施行)において「死亡の原因欄には、疾患の終末期の状態としての心不全、呼吸不全等は書かないでください」という注意書きの施行前からの周知の影響によるものと考えられる。
2) 平成7年の脳血管疾患の上昇の主な要因は、ICD-10(平成7年1月適用)による原死因選択ルールの明確化によるものと考えられる。

図 1-1 主な死因別にみた死亡率の年次推移

(出典:厚生労働省平成23年人口動態統計月報念年計(概数)の概況

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai11/>)

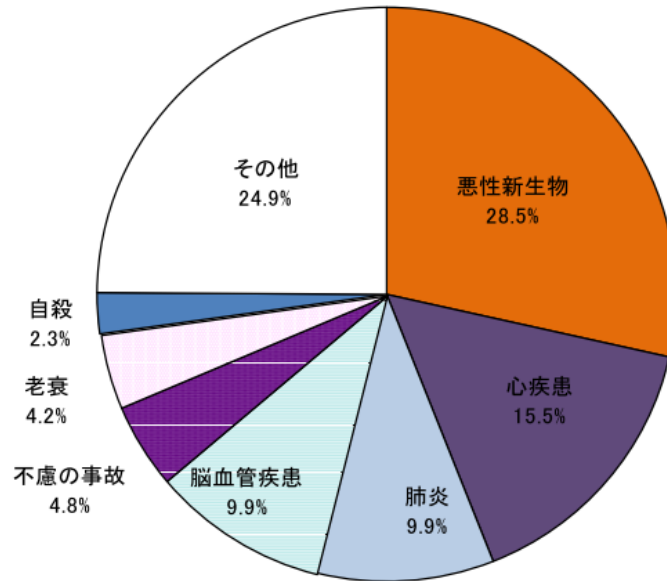


図 1-2 主な死因別死亡数の割合(平成 23 年)

(出典:厚生労働省平成 23 年人口動態統計月報念年計(概数)の概況

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai11/>)

1.2 背景

1.2.1 がん治療

近年のがん治療は様々な手法が研究・開発されてきているが、大きく分けると三つに分類することが出来る。一つ目は外科的ながん組織を取り除く外科的手術療法であり、二つ目が抗がん剤や制がん剤と言われる薬を用いた治療を行う化学療法であり、そして三つ目が放射線をがん患部に照射することにより治療を行う放射線療法である。

外科的手術療法では、がん病巣およびリンパ節などの周辺組織を取り除くことで治療ができる一方で、メスを使った侵襲性の高い治療のため、体への負担や手術後の消化管や血管の障害および腹腔内での癒着などの合併症が課題である。そのため内視鏡を用いた胸腔鏡・腹腔鏡下手術を行うことで、切開する箇所を小さくして侵襲性を下げる試みがなされている。また最近では IT 技術とロボット技術を取り入れた手術支援ロボットを用いることで、術者の手の震え(振戦)を抑えたり、三次元画像を見ながらの操作が出来たりしている。また遠隔操作が可能のため、手術支援ロボットを持った大病院と持っていない地域の病院をオンラインでつなぐことで遠隔医療が期待されている。

化学療法では、がん細胞の増殖の抑制やがん細胞の死滅を目的にした薬剤を投与することによって治療する。薬剤の種類には、DNA の二重らせん構造に結合して DNA 複製を阻害する白金製剤や、がん細胞の DNA 合成を阻害することで代謝を阻害する代謝拮抗剤、がん細胞の分裂・増殖を抑制するアルキル化剤等、作用の仕方によって分類がなされている。これらの薬剤は血液に乗って全身を回るため、がん原発巣だけでなく転移巣にも有効であるが、健康な正常細胞にも作用を及ぼ

す可能性があるため副作用が課題となっている。これらを解決するために、分子標的治療薬というがん細胞に特異的に発現している遺伝子やタンパク質をターゲットとした薬剤の開発が進められている。

放射線療法は、体の外から放射線を照射する外部照射と、内から照射する内部照射に分けられるが、放射線のエネルギーを局所に集中させて照射することでがん細胞を死滅させることを目的とする。がん細胞周辺の健康な細胞や、放射線が通過する領域に存在する健康な細胞も一部照射される可能性があるため、皮膚などへの副作用が課題となっている。これらを解決するために、様々な角度から様々な強度の放射線を照射することによって、がん細胞には集中的に、正常細胞には一箇所に当たる線量を出来るだけ少なくさせる努力がなされている。

上記の治療法は単独で用いる場合もあるが、併用することでそれぞれの治療法の長所を生かし、患者の健康状態やがんの進行状態に合わせた治療がなされている。様々な治療方法が選択できるようになった現在において、特に放射線療法の需要は年々増加している。本研究では放射線療法に着目している。それは現在の日本社会の高齢化にともない外科的手術が困難な場合も多く、より「低侵襲」、「低負担」の治療方法が選択されるようになってきているからである。放射線は治療中に痛みを感じることはなく低侵襲な治療とされ、また臓器の機能や形態を保存できる場合があるため、治療後も生活の質(Quality of life: QOL)を維持することが出来、近年需要が高まっている。

1.2.2放射線治療

1895年にドイツの物理学者ヴィルヘルム・レントゲン博士によってX線が発見され、1898年にはフランスのマリー・キュリー博士によってラジウムが発見されて以降、放射線は医療・工業・農業・環境など多くの分野に応用されている。現在ではレントゲン撮影と呼ばれる一般単純X線検査から、X線CT検査、放射線同位元素を用いたPET (positron emission tomography)やSPECT (single photon emission computed tomography)などの放射線診断や、放射線同位元素を用いた内部療法、放射線治療におけるまで放射線は利用されており、現在の医療に欠かすことが出来ないものになっている。

放射線のがん治療に用いることが出来るのは、放射線は物質を透過し電離・励起させる作用があるからである。放射線は細胞のDNAに損傷を与えることでがん細胞を死に至らしめることが可能である。がん組織周辺の正常組織も損傷させる恐れがあるが、細胞自身にはDNA損傷修復機構を持っており、修復可能な傷であれば元通りに修復することが出来る。一般的に細胞分裂頻度が高い細胞は放射線感受性が高くなる。がん細胞の致死線量と正常細胞の耐用線量を考慮して適切な治療線量が決められている。

放射線治療にはX線やγ線の光子線(電磁波)を用いる場合と、陽子線や炭素イオン線などの粒子線を用いる場合がある。放射線治療の多くは光子線であるX線が用いられている。電子を線形加

速器 LINAC (linear accelerator) で加速しターゲット金属に当てることで X 線を発生させる。発生した X 線はマルチリーフコリメータと呼ばれる多段階絞りにより照射箇所に合わせて照射野に整形された後、患部に照射される。放射線治療技術は、コンピュータやネットワーク技術の発展と共に大きく進化した。がん患部に放射線線量を集中させ、正常組織には出来るだけ線量を少なくするために強度変調放射線治療(Intensity Modulated Radiation Therapy: IMRT)の開発や、より正確な照射を可能にするために画像誘導放射線治療(Image Guided Radiation Therapy: IGRT)が開発され、実際の治療現場において使用されている(Bhide & Nutting, 2010)。さらに呼吸による体内臓器の動きを考慮した動体追尾照射や呼吸同期照射システムの研究も進められている。

上記の方法によりがん患部への線量集中性を高めることが可能になってきているが、X や Y 線の線量分布は体表面近くで最も高く、深さに従い減衰するので、がん組織周辺に消化管や脊髄などの重要臓器がある場合、投与線量を高くすることが難しくなる。そこで近年目覚ましい発展を遂げているのが粒子線治療である。粒子線治療は炭素イオンや陽子などの粒子を高速に加速し腫瘍に照射することで、がんを治療する放射線療法の一つである。

1.2.3 粒子線の線量分布と治療施設の現状

粒子線の特徴の一つに優れた線量分布が挙げられる。X 線や Y 線の線量は体の表面近くが最も高く、深部に行くに従い線量は指数関数的に低くなる。つまり体表面である皮膚への副作用が問題となる。一方、炭素イオン線や陽子線は光子線とは異なる挙動を示す。粒子線は体内を透過しながら、停止直前に最大のエネルギーを付与する。これをブラッグ(Bragg)曲線といい、ピークの部分をブラッグピークと呼ぶ。粒子線の停止する位置はエネルギーによって変わるため、加速エネルギーを調節することで停止位置を決定するか、粒子の進行領域にレンジシフタを入れることで停止位置を調整している。また体表面の入り口からブラッグピークまでの線量が低く抑えられるため、正常組織への被ばくを少なく出来るといった利点がある。がんのような厚みを持ったものに様に照射するために、ブラッグピークを重ね合わせることで深部方向の幅を調整する方法があり、幅を持ったピークを拡大ブラッグピーク Spread-out Bragg peak: SOBP と呼ぶ。この SOBP の幅と深さを腫瘍の大きさと位置に合わせることで、高い線量集中性を実現している。1.2.2 で述べたようにがん組織周辺に重要臓器があり X 線で治療しづらい腫瘍に対しても、粒子線では高い治療効果が期待されている(Durante & Loeffler, 2010)。

図 1-3 に日本の粒子線治療施設を示す。2014 年 6 月において治療が受けられる施設としては、陽子線治療施設が筑波大学付属病院や国立段センター東病院など 9 箇所、炭素イオン線治療施設が放射線医学総合研究所(放医研)など 4 箇所であり、治療施設の数で日本は世界で最も多くなっており、粒子線治療大国といえる。図 1-4 は世界の粒子線治療施設を示す。ヨーロッパやアメリカを中心に粒子線がん治療が行われていることが分かる。炭素イオン線に関しては、世界中で約 12000 人が日本やヨーロッパ、中国の炭素イオン線施設において治療されており、その中でも放医研では 8000 人以上にもおよぶ患者を治療している(Marx, 2014)。放医研においては図 1-5 に示

す重粒子線加速器 HMAc (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba)を用いて炭素イオンを光速の 6 から 8 割以上に加速し治療に用いている。

1.2.4放射線抵抗性

X 線などの放射線に対してあまり治療効果を示さないがんが存在し、これを放射線抵抗性がんという。放射線の感受性は細胞分裂周期や酸素濃度、細胞分化度などに依存する。分裂周期の中では分裂 M (mitosis) 期が最も感受性が高く、頻繁に分裂を繰り返すような細胞・組織が感受性となる。一方、ある程度分化が進み、分裂が遅くなった細胞・組織では抵抗性となり、骨軟部肉腫などが放射線抵抗性を示す。酸素が放射線感受性に影響を与えることを酸素効果という。酸素存在下の方が効果は大きく、これは酸素存在下では反応性の高いラジカルを産生することと、放射線により出来た損傷部位が酸素と反応して固定化され修復がされにくくなっているからと考えられている(杉浦紳之 & 山西弘城, 2013a)。腫瘍内部では正常の組織の血管と異なり太さの違う未発達な血管が不規則に分布し低酸素領域となっているため、腫瘍細胞は放射線に抵抗性を示す。陽子線の細胞致死効果は X 線に近い値であることから、X 線抵抗性がんには陽子線の効果も低いと考えられる。

これらの課題を解決するためには、質量の大きい粒子、すなわち重粒子線が注目されている。放射線の種類間での相対的な生物学的効果を表す指標に、相対的生物学的効果 Relative Biological Effectiveness: RBE があり、以下の式で定義される(Hall & Giaccia, 2012; 杉浦紳之 & 山西弘城, 2013b)。

$$RBE = \frac{\text{ある効果を得るのに必要な基準放射線の線量}}{\text{同じ効果を得るのに必要な試験放射線の線量}}$$

基準放射線として X 線や γ 線が用いられる。そのため X 線や γ 線の RBE は 1 となる。RBE は放射線の線量や線量率、細胞生存率などのどのエンドポイントで評価するかにも依存する。試験放射線に炭素イオン線を用いた場合、細胞生存率が 10% になるときの線量 D_{10} で RBE を計算すると約 2 から 3 の値を取るため、炭素イオン線は X 線や γ 線に比べて細胞致死効果が大きいといえる(Asaithamby *et al*, 2008; Durante & Cucinotta, 2008; Rydberg *et al*, 2005)。実際、骨肉腫や脊索腫のような放射線抵抗性がんに対しても重粒子線は効果的という臨床での報告がある(Imai *et al*, 2011; Kamada *et al*, 2002)。

1.2.5高 LET 放射線

RBE に加えて、放射線の線質を表現する指標に線エネルギー付与 Linear Energy Transfer: LET (keV/ μm)がある(Hall & Giaccia, 2012)。これは単位長さ当たりに物質に付与するエネルギーを意味しており、炭素イオン線などの重粒子線は高 LET 放射線に分類され、陽子線や X 線、 γ 線は低 LET 放射線に分類される。高 LET 放射線は低 LET 放射線に比べて密な電離を起こして

物質にエネルギーを付与し、狭い領域に塩基損傷や一本鎖切断、二本鎖切断 (Double-strand break: DBS) などの複数の傷を生じさせる。このような傷を複雑な DNA 損傷またはクラスターDNA 損傷と呼んでいる。また DNA の末端が複雑に切断されている場合も複雑な DNA 損傷と呼ぶことができる。この複雑な DNA 損傷は修復が困難であるため細胞致死効果が大きいとされている。また高 LET 放射線は低酸素細胞や細胞分裂周期の影響が小さいため、1.2.4 で示した放射線抵抗性のがんにも治療効果が期待できる。

高 LET 放射線により生じる DNA 損傷は、X 線のような低 LET 放射線により出来る傷とは質的に異なるということができ、DNA 損傷そのものやその後の DSB 修復過程も、これまで明らかにされてきた低 LET 放射線の知見と異なると考えられている。複雑な DNA 損傷は修復されにくく、修復が困難な場合は分裂異常やアポトーシスなどにより細胞死へと導かれといわれているが、例えば炭素イオン線や鉄線の高 LET 放射線を照射した場合は γ 線に比べて多くの細胞に老化現象を示した報告 (Jinno-Oue *et al*, 2010; Mukherjee *et al*, 2008) から言えるように、複雑な DNA 損傷を受けた細胞がどのような細胞運命を辿るのか、または選択するのかまだまだ分かっていないことが多い。

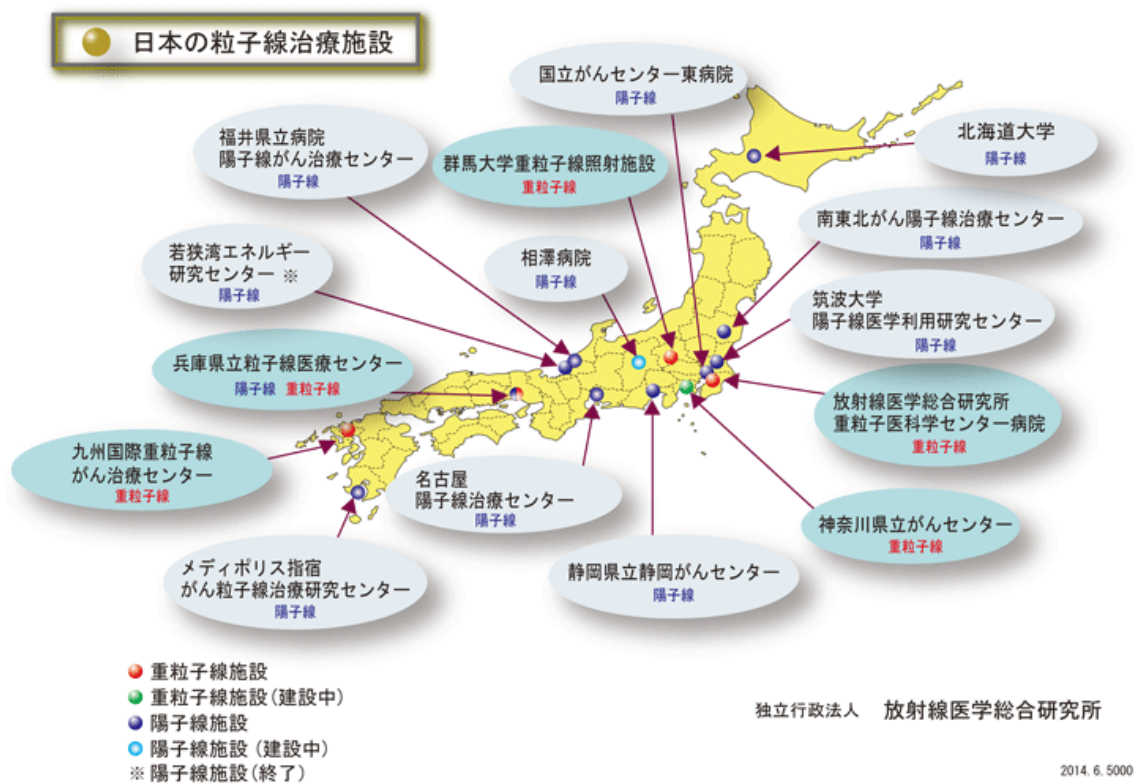


図 1-3 日本の粒子線治療施設 (出典:独立行政法人 放射線医学総合研究所)

世界の粒子線治療施設

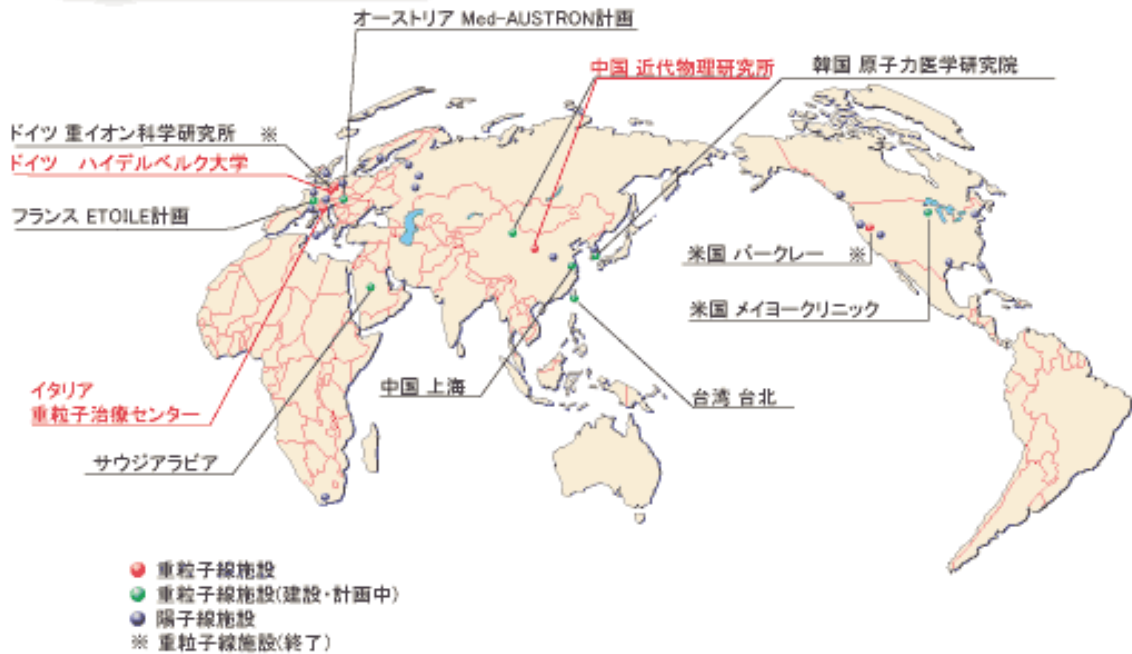


図 1-4 世界の粒子線治療施設 (出典:独立行政法人 放射線医学総合研究所)

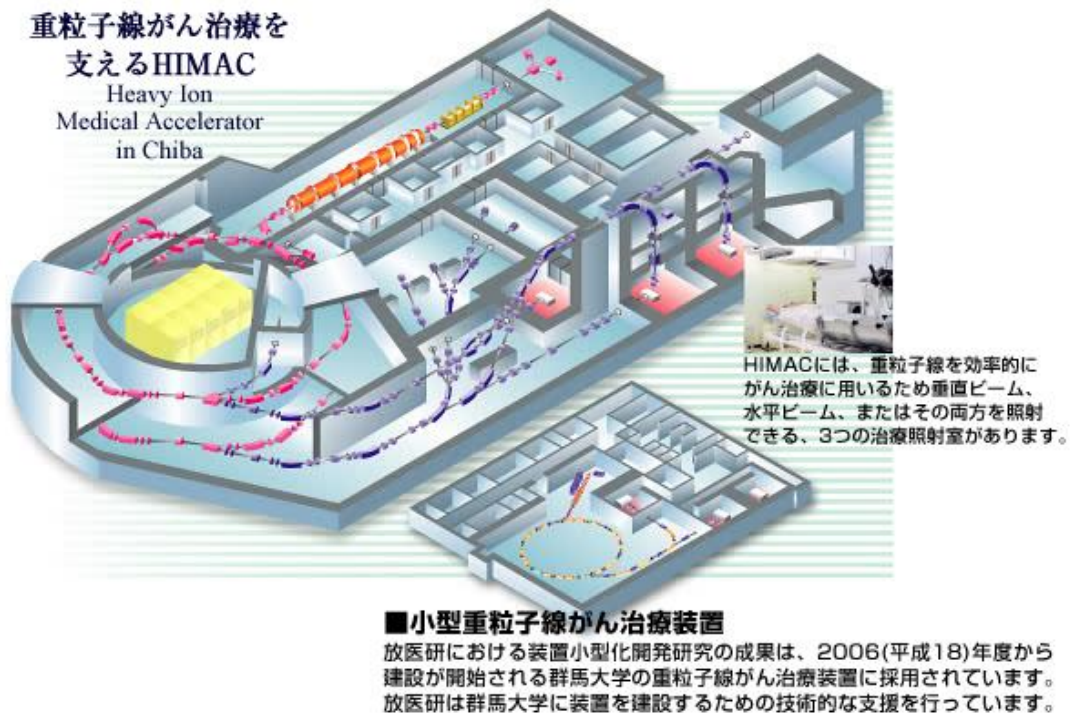


図 1-5 重粒子線加速器 HIMAC (出典:独立行政法人 放射線医学総合研究所)

1.3 本研究の目的

本研究では放射線治療の発展に貢献することを最大の目的とする。炭素イオンのような重粒子線ががん治療に用いられる利点は主として二つあり、①体内で優れた深部線量分布を形成できる点、②X線のような光子に比べてがん細胞に高い生物致死効果を与えることができる点である。

停止点付近で大きなエネルギー付与を起こすブラッグピークの性質を持つ粒子線は、日本やヨーロッパを中心に治療に用いられ、骨腫瘍の一つである脊索腫は重粒子線治療が効果的である。脊索腫は頭蓋底や仙骨等の深部の骨から発生し、周辺には重要臓器が存在するため、通常のX線放射線治療は難しく、また脊索腫は放射線抵抗性である。さらに外科的切除により摘出出来た場合でも、仙骨と取り除いてしまうとQOLを著しく低下させる懸念がある。そのため深部線量分布がよく、生物効果の高い重粒子線が用いられ、臨床において良い治療成績を上げている。さらに陽子線も優れた深部線量分布を持つことから脊索腫治療に用いられている。しかしながら、脊索腫細胞自体の特徴と細胞株数が少ないなどの理由によって基礎的な放射線生物学的データがほとんど報告されておらず、炭素イオン線と陽子線の放射線感受性を直接比較されていない。そこで本研究において、粒子線の特徴である優れた線量分布に着目し、三次元 *in vitro* モデルを用いて炭素イオン線と陽子線の生物効果を直接比較し、脊索腫細胞への有効性を示すことを目的とする。

また、重粒子線の生物効果を考えるうえで物理的要素のLETが重要であり、高LET放射線である炭素イオン線が生じさせる複雑なDNA損傷が高い生物効果を生んでいると考えられている。細胞にはDNAの修復機構が備わっており様々な刺激からDNAを保護していることが分かっているが、DNAの修復経路、特にDNA二本鎖切断に対する修復経路のメカニズムの解明が重要となっている。それはDNA修復メカニズムが解明されることで修復経路を阻害するようながん治療に応用できるからである。しかしながら、現在においてもどのようにDNA修復経路が選択され、制御されているのかそのメカニズムは分かっていない。近年、高LETと低LET放射線では修復経路が異なる可能性も報告されており、炭素イオン線を用いた修復経路の研究は重要になってきている。また炭素イオン線を用いても完全に治療できない腫瘍が存在するため炭素イオン線の治療効果をより高めるための効果的な薬剤、つまり放射線増感剤の探索も必要とされている。そこで本研究において、DNA修復経路選択に重要なCtIPタンパク質の挙動を調べることで、修復経路選択メカニズムを明らかにし、さらに複雑なDNA損傷とその後活性化されるATRリン酸化酵素に着目し、放射線増感作用の有無を明らかにすることを目的とする。

1.4 本論文の構成

本論文は5章より構成される。第1章(本章)では日本のがん医療の現状を述べ、実践されているがん治療の種類や方法について示した。がん治療法の一つである放射線治療の現状と課題を述べ、近年注目を浴びている粒子線治療については、粒子が持つ特徴や性質をX線などの電磁波と比較をしながら説明し、日本や世界での粒子線治療研究・施設の現状を示した。そして本研究で着目している高LET放射線における課題を述べた。第2章では、粒子線の持つ優れた深部線量分布に

着目し、未だ基礎的な放射線生物学データの少ない脊索腫細胞を用いて、炭素イオン線と陽子線の放射線感受性を比較する。そのために3次元 *in vitro* システムを構築し粒子線ビームのブラッグピーク近傍での細胞応答や LET 依存性などを、細胞生存率を測定することにより検討する。第3章ではDNA修復の経路選択に関わる「DNA末端リセクション」で機能する CtIP タンパク質の挙動を、高 LET 放射線を用いて、ウェスタンブロット法によるタンパク質発現解析や蛍光免疫染色法によるタンパク質集積(フォーカス形成)を検出することにより評価する。そして CtIP の新たな挙動がDNA修復にどのように関与する可能性があるのか議論する。第4章では高 LET 放射線により複雑なDNA損傷を生じさせ、ATRリン酸化酵素を阻害した場合にどのような細胞反応を示すのか、細胞周期解析や小核の形成、細胞生存率を低 LET 放射線と比較することで評価する。そして最後の第5章では本研究の総括と今後の課題と展望を述べる。

第2章 線量分布に着目した炭素イオン線と陽子線の脊索腫細

胞での生物効果の比較

2.1 背景

2.1.1 粒子線について

がん治療は大きく分けて外科的手術、化学療法、放射線療法は三つに分類できる。放射線療法には古くから⁶⁰Co 放射性同位元素から放出されるγ線やLINACで発生させたX線が用いられてきた。X線が発見されて以来急速に発達し、コンピュータやネットワーク技術などの科学技術の進歩と共に放射線治療も進化した。光子を用いた例ではIMRTやIGRTが挙げられ、腫瘍には多くの線量を集中させ、周囲の正常組織への線量は出来るだけ少なくするよう工夫されている(Bhide & Nutting, 2010)。さらに、治療効果を高めた最も注目すべき方法の一つが、炭素イオン線や陽子線等の荷電粒子を用いた放射線治療である。これらの加速粒子は固形がんの治療に大変優れた成績を示しており、その理由は優れた物理線量分布とブラッグピーク近傍での大きなエネルギー付与が挙げられる(Durante & Loeffler, 2010; Tobias *et al*, 1971)。最近の報告によると、荷電粒子放射線治療は外科的手術と比べて同等あるいは優れた成績を上げており、それは前立腺がん、肺がん、頭頸部がん、そして骨軟部肉腫などの症例である(Imai *et al*, 2011; Jingu *et al*, 2012)。

骨腫瘍の一つである脊索腫は荷電粒子線治療の良いターゲットであるといえる。それは脊索腫は体の深部に発生するため侵襲的な手術での摘出は形態の維持や機能の維持が困難になる場合があるが、粒子線治療では脊索腫発生部位の骨や発生部位近くの重要臓器の形態や機能を守ることが出来る可能性があるからである。(Imai *et al*, 2010; Kamada *et al*, 2002; Schulz-Ertner *et al*, 2002; Schulz-Ertner *et al*, 2003b)。

2.1.2 脊索腫とは

脊索腫は悪性の骨腫瘍の一つである。脊索の遺残組織から発生し、頭蓋・脊椎に沿ってあらゆる部位に発生する可能性があるが、高頻度に発生する部位は仙骨や頭蓋底骨(斜台)である(Casali, 2007; Mendenhall *et al*, 2005)。脊索腫は全ての悪性腫瘍の中で1から4%程度であり、その特徴は転移が少なく、腫瘍の成長速度が遅いことである(Azzarelli *et al*, 1988; Sundaresan, 1986; Walcott *et al*, 2012)。脊索腫の治療の第一選択は外科的手術であるが、放射線治療も行われている(Henderson *et al*, 2009; Imai *et al*, 2011; Schulz-Ertner *et al*, 2003a)。脊索腫は解剖学的に体内の深部に位置しているため、仮に手術により外科的切除が可能であった場合でも、仙骨から発生した脊索腫を手術で取り除いた場合、車椅子での生活になる可能性がある。この場合は生活の質QOLを著しく低下させてしまうことになる。また頭蓋底に発生した脊索腫の場合、周囲の正常な脳組織や神経組織を傷付けることなく取り除くことは難しく、また周囲の血管を巻き込んでいる時は全てを摘出することは困難となり再発の危険が生じる。そこで近年、炭素イオン線や陽子線を含む荷

電粒子ビームが骨軟部腫瘍の治療に注目を浴びている。実際、炭素イオン線と陽子線は脊索腫の治療に用いられ、臨床現場からは優れた治療成果の報告がなされている(Combs *et al*, 2010; Schulz-Ertner *et al*, 2003b)。

しかし、粒子線を用いた脊索腫の治療に目まぐるしい進歩があるにも関わらず、脊索腫細胞の基礎的な生物データがあまりにも少ないという課題がある。なぜこのような脊索腫細胞の生物学的データが不足しているかという点、まず細胞株の種類が少ないことが挙げられる。米国の非営利組織 Chordoma Foundation には脊索腫細胞が保管されているが、その数は三つしかなく、U-CH1 と U-CH2 と MUG-Chor1 だけである。脊索腫の好発部位は仙骨、脊椎、頭蓋底などであるが、三つの細胞株は仙骨から採ったものであるため種類も少ないといえる。次の特徴として、腫瘍細胞であるのに細胞の倍加時間が長いことである(Kato *et al*, 2011; Scheil *et al*, 2001)。ヒトの細胞株の倍加時間は 24 時間前後のものが多いが、U-CH1 細胞は約 7 日であり、24 時間に比べれば大変ゆっくり成長することが分かる。細胞実験を行うには細胞の数やある程度の増殖速度を持った細胞が扱いやすい。特に放射線生物学における細胞生存率をコロニー形成法を用いて評価する場合は、7 日で一回分裂するような細胞は大変扱いづらい。このように、細胞株の少なさと細胞倍加時間の長さが、放射線生物学データの不足の原因の一部であると考えられる。もちろんこの限られた状況においても、マルチフィッシュ法やアレイ法を用いた核型や染色体異常を示した細胞遺伝学研究が報告されている(Hallor *et al*, 2008; Kuzniacka *et al*, 2004)。我々もこれまでに脊索腫細胞 U-CH1(Scheil *et al*, 2001)から新たに樹立させた U-CH1-N が、炭素線、ネオン線、シリコン線、アルゴン線、鉄線のような高 LET 荷電粒子放射線にとっても感受性であることを報告している(Kato *et al*, 2011)。炭素イオン線や陽子線が優れた深部線量分布を示すため脊索腫の治療に用いられているが、これまで *in vitro* での炭素イオン線と陽子線の感受性の直接比較は行われていない。

2.1.3 OptiCell について

本研究ではヒト脊索腫細胞 U-CH1-N に対し炭素イオン線と陽子線の細胞生存率や相対的生物学的効果比 RBE を、OptiCell 細胞培養システムを用いて比較・評価を行った。OptiCell とは市販のカセット状細胞培養装置であり、少ないスペースでの細胞培養や、モニタリング、運搬がしやすいように設計されている(Duong *et al*, 2005)。板状の形状であり、並行な二枚のガス透過なポリスチレン膜により囲まれた空間を作り、片面の 50 cm² の面積で細胞培養が行える。大きさは、2×65×150 mm で最大 10 ml の容積があり、薄い設計でインキュベータ内の使用スペースを軽減できる利点がある。OptiCell に培地を入れた時の幅が 2 mm という細さになる。この幅の利点を生かして OptiCell を積層して三次元 *in vitro* システムを構築することにより、粒子ビームの進行方向に細かい配置が可能となり、それぞれの深さ位置での生物学データを詳細に取得することが可能になる。

2.2目的

これまで脊索腫に対する炭素イオン線と陽子線の深部線量分布に関する生物効果の比較が明確に調べられていないことから、本研究では両粒子線の深部線量分布に着目し、290 MeV/n エネルギーの炭素イオン線と70 MeV エネルギーの陽子を用いて、細胞生存率やRBEを算出することで、脊索腫細胞に対する細胞致死効果を OptiCell *in vitro* システムで直接比較し有用性を示すことを目的とする。

2.3実験方法

2.3.1細胞および細胞培養

ヒト脊索腫細胞株 U-CH1 は米国の Chordoma Foundation より提供を受けたものである。2.1.2 で示したように我々のグループは U-CH1-N という細胞株を樹立させた。本実験で使用した U-CH1-N 細胞は放射線医学総合研究所 (National Institutes of Radiological Sciences) においてオリジナルの U-CH1 細胞から取り出した分集団である。U-CH1 細胞の細胞倍加時間が約 7 日なのに対し、U-CH1-N の細胞倍加時間は約 3 日である。細胞は 10%ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS)、1%抗生物質入りの α MEM 培地を用い、インキュベータ内 5%CO₂、37°C の環境下で培養した。

2.3.2放射線照射

炭素イオン線および陽子線の照射は放医研において行われた。炭素イオン線は重粒子線加速器 HIMAC によって 290 MeV/n のエネルギーにまで加速され、陽子線は放医研のサイクロトロンによって 70 MeV に加速して照射された。炭素イオン線と陽子線の線量率はおよそ 1 Gy/min であった。単一エネルギーの 290 MeV/n 炭素イオン線は物質の入り口付近で LET は 13 keV/ μ m を示す。単一エネルギー 70 MeV 陽子線は入口付近で LET は 1 keV/ μ m を示す。炭素イオン線と陽子線はそれぞれ水中では深さ 14 cm、4 cm で最大線量を示す (Genet *et al*, 2012)。

X 線照射は放医研にある TITAN-320 型 X 線照射装置を使用し、管電圧 200 kVp、管電流 20 mA に設定し、0.5 mm のアルミニウムと銅のフィルターを用いた。線量率はおよそ 1 Gy/min であった。 γ 線照射はコロラド州立大学にある放射性同位元素 ¹³⁷Cs 線源を用い、線量率は 2.5 Gy/min であった。全ての照射は室温で行われた。

2.3.3OptiCell を用いた細胞生存率測定

炭素イオン線および陽子線照射の 3 時間前に培養しておいた脊索腫細胞をトリプシンで剥がし、10 ml 培地に 8000 個の細胞が含まれるように濃度調整し、各々の OptiCell チャンバーにシリンジと専用の針を使って注入した (図 2-1)。その後すぐにインキュベータに戻し、OptiCell の片側のメンブレンに細胞が接着するようにした。照射直前に OptiCell チャンバーをビーム進行方向に垂直に層になるよう設置し、一番手前の OptiCell の線量が 1、2、3Gy となるよう照射し、照射後すぐにインキュベータに戻し 3 週間静置培養した。 γ 線照射の場合は積み重ねることはせず、個々の OptiCell 対し 2、4、6、8Gy を照射した。3 週間の培養の後、細胞の接着していない片側のポリスチレン膜を切り取り、細胞を 0.9%NaCl 溶液で洗浄し、100%エタノールで固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。50 個以上の細胞が含まれるコロニーを 1 個として計測し、出来たコロニーの数を、0Gy 照射条件で出来たコロニーの数で割ることで、細胞生存率曲線を描いた。

2.3.4 培養ディッシュを用いた細胞生存率測定

ファルコン T12.5 フラスコで培養した U-CH1-N 細胞に対し、ブラッグピーク近傍の LET が 70 eV/ μm となる炭素イオン線と、入口付近の陽子線、および X 線により照射した。照射後すぐにトリプシンで細胞を剥がし、任意の細胞濃度によるよう希釈調整し、100 mm 細胞培養ディッシュに播種した。3 週間インキュベーター内で静置培養し、細胞の固定・染色は上記と同じ方法を用いた。50 個以上の細胞が含まれるコロニーを 1 個として計測し、細胞生存率曲線を描いた。

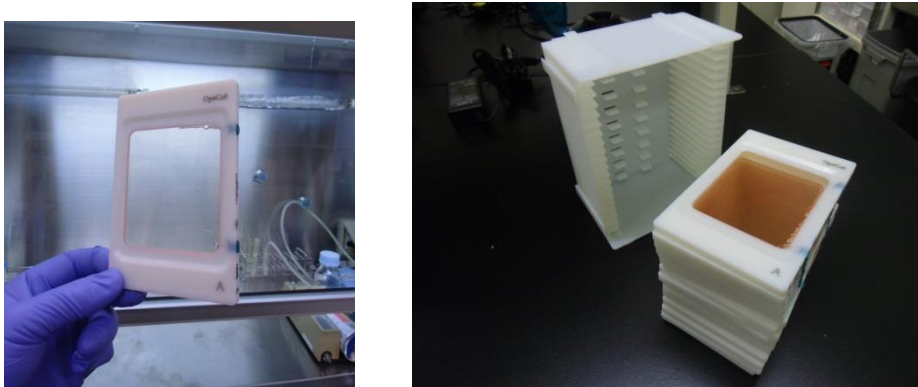


図 2-1 OptiCell 細胞培養チャンバー

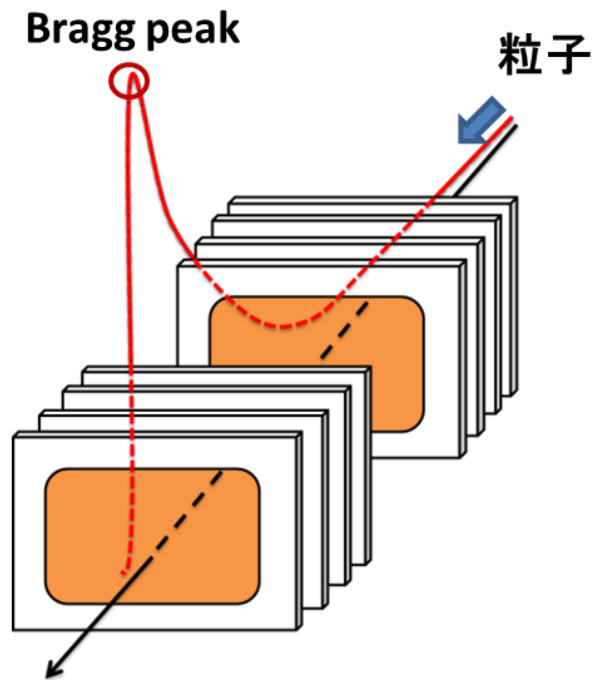


図 2-2 ビーム進行方向に垂直になるような OptiCell の配置

2.4 結果

2.4.1 水中での深さに対する細胞生存率

OptiCellを重ねて層にして図 2-2 のように粒子を照射することで各深さにおける細胞生存率を得た。我々が以前報告したレポートの中の物理パラメータ(Genet *et al*, 2012)を用いて、OptiCell チャンバーのそれぞれの配置位置を水中での深さに変換した。OptiCell により得られた各深さでの細胞生存率は、水中を進むに従い徐々に低下し、ブラッグピーク付近で最小になった。線量が 1Gy, 2Gy, 3Gy と大きくなるに従い細胞生存率が小さくなっていることから、線量依存性が確認できた。ブラッグピークを超えると急激に生存率は高くなっていることから、粒子の進行は停止し細胞に照射されていないことが分かる。ブラッグピーク近傍での生存率を同じ線量と比較すると、炭素イオン線は陽子線より大きな生存率低下を示した(図 2-3)。炭素イオン線と陽子線のブラッグピークはそれぞれ深さ 14 cm, 4 cm であった(図 2-4)。

2.4.2 低 LET と高 LET での細胞生存率

炭素イオン線および陽子線は、水中のある深さでどの LET の値を持っているのかが分かっている(図 2-4)。OptiCell チャンバーを用いた脊索腫細胞の細胞生存率を、炭素イオン線は LET 値で 3 つのグループに分けて評価を行った。LET 値は①13-20 keV/μm、②20-30 keV/μm、③30 keV/μm 以上の 3 グループとした。LET が高くなるに従い細胞致死効果が高くなる細胞生存率曲線が得られた(図 2-5)。この実験で用いた陽子線は 1-10 keV/μm の LET を持っているが、この範囲での細胞致死効果の差は見られなかった。炭素イオン線による細胞致死効果は二つのパラメータ、線量と LET に依存することが確認され、一方で陽子線による致死効果は我々の実験の 1-10 keV/μm の LET の範囲では、線量のみ依存する結果となった。

2.4.3 U-CH1-N 細胞の RBE

RBE 値は細胞生存率が 10%に低下する線量である D₁₀ 値をもとに算出された。RBE 値は 1.2.4 で述べたように、γ 線での D₁₀ 値を炭素イオン線と陽子線それぞれの粒子の D₁₀ 値で割ることで算出した。炭素イオン線については 30 keV/μm 以上の LET では 1.69 の高い値を示し、13-20 keV/μm、20-30 keV/μm ではそれぞれ 0.86 および 1.27 の値を示した。また陽子線については 0.89 となり、13-20 keV/μm 炭素線と近い値を示した。

2.4.4 細胞培養ディッシュでの細胞生存率と RBE

よく細胞培養で用いられている標準的な細胞培養ディッシュを使用し U-CH1-N の細胞生存率曲線を取得した。γ 線や X 線は光子線として RBE の計算に使用した。U-CH1-N 細胞はどちらの光子線でも同様な感受性を示した(図 2-5)。放射線の線量の増加に従い細胞生存率は低下した。陽子線ビームの入り口領域(プラトー領域)を照射した時の細胞生存率は γ 線や X 線と近い挙動を示したが、一方炭素イオン線はより大きな感受性を示した。どの放射線を照射した場合も、細胞培養ディッシュ

シュよりも OptiCell の方が放射線抵抗性を示した。この培養ディッシュを用いた *in vitro* システムでの γ 線と X 線に対する炭素イオン線と陽子線の D_{10} 値を用いた RBE 値は OptiCell システムで得られた値より高くなり、その値はそれぞれ 2.27 および 0.9 であった。

2.5 考察

脊索腫細胞は *in vitro* では他の細胞に比べ相対的に増殖速度が遅く、ヒト脊索腫細胞 U-CH1 の倍加時間は 7 日であることが報告されている(Kato *et al*, 2011)。この増殖速度が遅いという特徴故に、多くの臨床試験が行われかつ結果も報告されているにも関わらず、脊索腫細胞の放射線生物学データが不足している現状がある(Imai *et al*, 2010; Kato *et al*, 2011)。しかしコロラド州立大学の加藤氏らによって 3 日という短い倍加時間を持った細胞株を作ることによって、脊索腫細胞の増殖や放射線や抗がん剤に対する感受性に関する情報が *in vitro* で得られるようになった。

本研究で我々は 2 つの異なる粒子線である炭素イオン線と陽子線を用いて三次元 *in vitro* での脊索腫細胞の細胞生存率に着目した。両荷電粒子線は現在世界の中でも限られた施設において使用できる粒子である(Akanuma *et al*, 1982; Hiraoka *et al*, 1990; Jingu *et al*, 2012; Kanai *et al*, 1999)。質的にも量的においても炭素線治療施設が世界で数少ないことを考慮しても、我々の脊索腫への理解および炭素線治療のデータは陽子線に比べてまだ少ない。本研究において炭素イオン線照射によりブラッグピーク付近での細胞生存率の低下が陽子線に比べて大きいことを示した。OptiCell システムでは γ 線に対する RBE 値は LET 30keV/ μm 以上の炭素イオン線で 1.69 を示し、LET13-20 keV/ μm では 0.85 を、LET20-30 keV/ μm では 1.27 を示した。また陽子線では全ての領域である LET1-10 keV/ μm において 0.89 を示した。このことは炭素イオン線の脊索腫細胞に対する致死効果が陽子線に比べて高いことを表している。

本研究における炭素イオン線の脊索腫細胞致死効果の検討は、三次元 *in vitro* システムで放射線の線量と LET 値に依存していることを示した最初の報告である。これらの研究は我々が以前報告しているような標準的な組織培養環境(培養ディッシュ)での炭素イオン線の効果を改良し、新たな知見を付け足すものである。OptiCell チャンバーに U-CH1-N 細胞を培養し、ビーム進行方向に並べた OptiCell を照射したことの利点は、ブラッグピーク近傍の高 LET 粒子と遠方の低 LET 粒子を同時に含む状態で評価が出来たことである。本研究では、現在臨床で使用されている高 LET 炭素イオン線ビーム(Matsufuji *et al*, 2007)が、低 LET 炭素イオン線よりも U-CH1-N 細胞の致死効果が高いことを示している。さらに低 LET 放射線として知られる陽子線は、プラトー領域とブラッグピーク領域で分けて細胞線損率を比較しても両者に差はなかった。つまり低 LET の陽子線と炭素イオン線は脊索腫細胞の致死効果は同様である。これは陽子線の D_{10} 値 0.89 と LET13-20 keV/ μm 炭素イオン線の D_{10} 値 0.85 からいえる。陽子線の細胞致死効果が線量にのみ依存する結果は、LET と線量の二つのパラメータに依存する炭素イオン線と比べるとビーム条件設定の自由度という点において炭素イオン線の方が応用が効く。脊索腫の粒子線治療に炭素イオン線を用いることは LET 依存性と高い致死効果という効果と効率の点からはっきりとした利点が存在するといえる。この傾向は脊索腫だけでなく、チャイニーズハムスター CHO 細胞(Duong *et al*, 2005)やヒト唾液腺腫 HSG 細胞(Kagawa *et al*, 2002)においても確認されている。

OptiCell 細胞培養チャンバーは細胞スペースを最大限に利用できるようにチャンバー幅を細く設計しており、積み重ねることで単層培養細胞の三次元モデルとして使用できる(Duong *et al*, 2005;

Smith *et al*, 2010)。我々は本研究で三次元 *in vitro* OptiCell システムを解剖学的構造に近づけて、各深さにおける細胞生存率を測定した。このような粒子ビームの経路に沿って配置できるライブセルの生物ファントムを開発できれば、体内構造を疑似した実験体系を作ることができる。もちろんこれまでも他の方法を用いて様々な深さでの相対的な *in vitro* 生存率が検討されてきた。例えばペトリディッシュを特別な装置に固定させる方法(Courdi *et al*, 1994)や、「cell stack chamber」を用いる方法(Ando *et al*, 2001)である。これらの細胞培養方法と比べて、積層した三次元 OptiCell システムの最大の利点はより多くの詳細なデータ点を取得できることといえる。この研究で用いた 70 MeV 陽子線ではブラッグピークの位置が深さは 4cm に相当するので、陽子線のブラッグピーク近傍のデータを取得するためにはより深さ方向に詳細なデータ点を設定する必要があった。OptiCell の幅 2 mm を生かし詳細なデータを取ることができた。

本研究の OptiCell の細胞生存率の測定では、よく使用される方法とは異なるプロトコルを用いており、それは放射線照射と細胞を播くタイミングである。コロニー形成法には基本的に二つの異なる手法があり、一つは放射線や薬剤処理をする前に細胞を播く。他方は生じるコロニー形成活性を評価するために照射後ある程度時間を於いてから細胞を播く方法である(Franken *et al*, 2006)。細胞生存率は放射線照射前か照射後のどちらで細胞を播種するかに依存することが分かっている(Buch *et al*, 2012; Franken *et al*, 1997)。本研究では、放射線照射前に播種し、照射後は処理を加えず三週間培養したものである。OptiCell チャンバーでの炭素イオン線と陽子線照射後の細胞生存率は、細胞培養ディッシュで得られた生存率と比べて放射線抵抗性を示した(図 2-5)。両培養条件での生存率の差は播種と照射の順序の違いによるものであるといえる。

2.6 まとめ

ヒト脊索腫細胞を用いて炭素イオン線と陽子線の細胞致死効果を治療に近い *in vitro* 体系で直接比較することができた。我々の用いた実験体系は高 LET 炭素イオン線を含め他の電荷粒子線や光子線の評価するのにも用いることができる。OptiCell システムは *in vivo* の脊索腫環境に近い状態で細胞の生物学を理解でき、これからの脊索腫研究に役立つといえる。我々の脊索腫モデルは、異なる性質の放射線(高 LET 対低 LET 炭素イオン線または陽子線と光子線)と、荷電粒子ビームの線量に対する細胞反応や抵抗性に関する評価方法であるといえる。今回示した結果から、稀で治療が困難な脊索腫に対し炭素イオン線を治療に用いることが *in vitro* 生物学的観点から優れていることが確認できた。それは炭素イオン線が LET と線量に依存して細胞致死効果を示すからである。

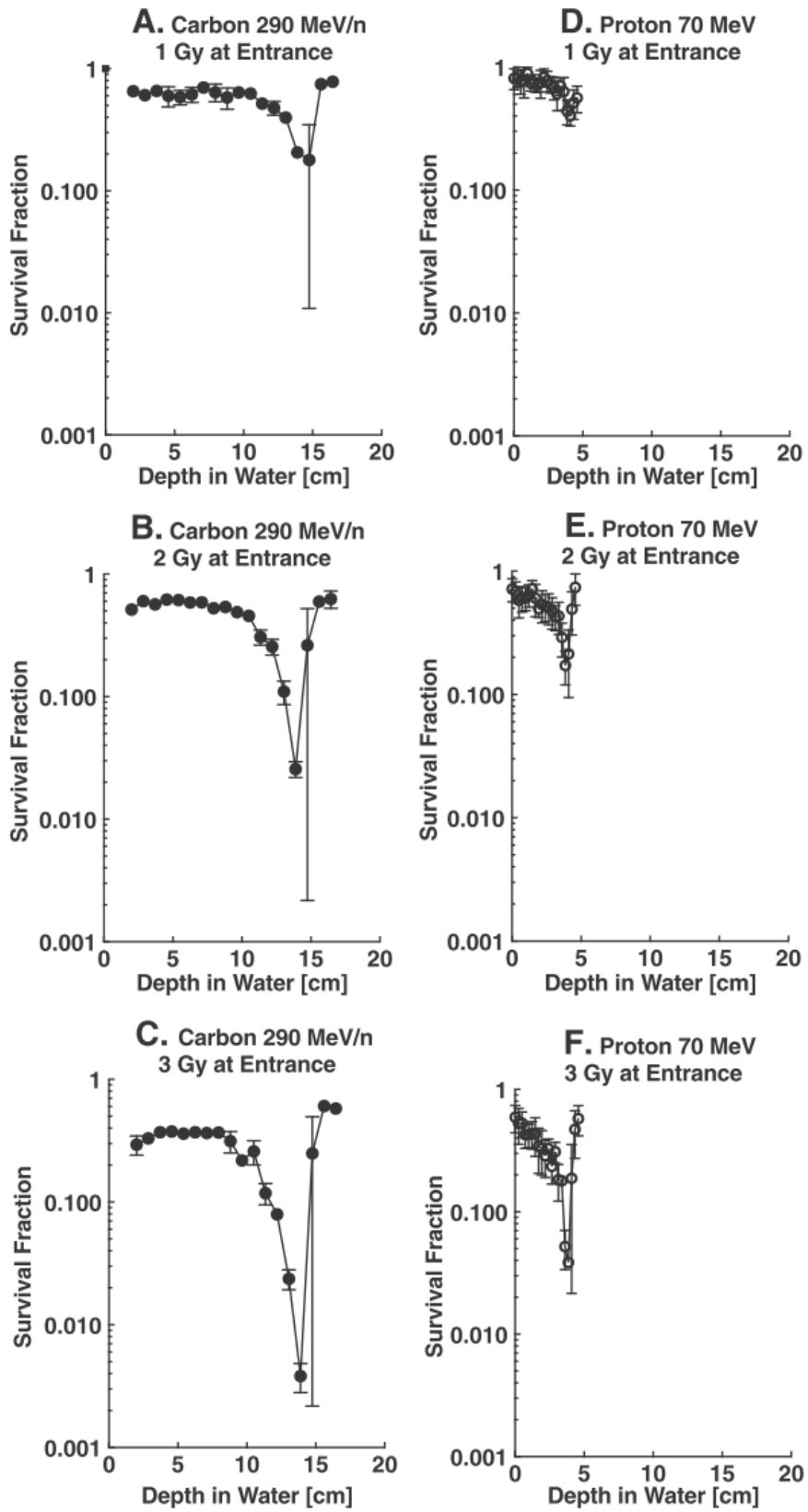


図 2-3 水中での各深さにおける細胞生存率曲線

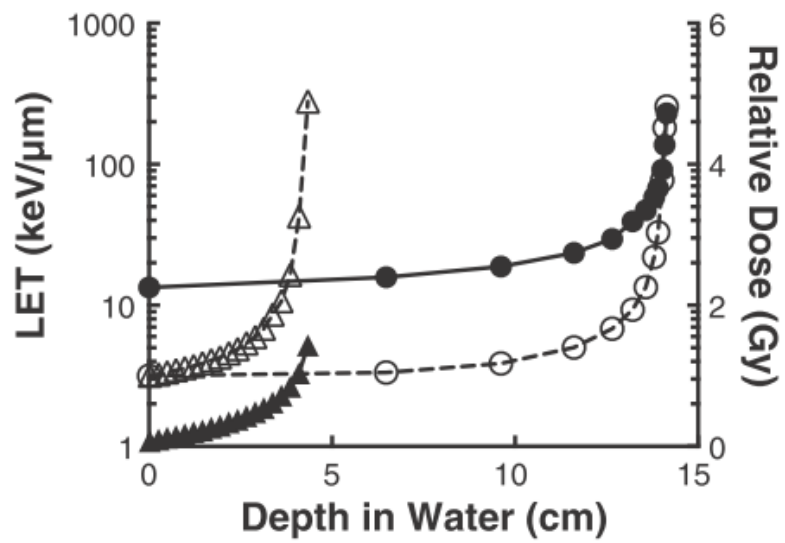


図 2-4 水中での各深さにおける相対線量と LET(一部改編)

△陽子線の入射口に対する相対線量、○炭素イオン線の入射口に対する相対線量

▲陽子線の深さに対する LET 値、●炭素イオン線の深さに対する LET 値

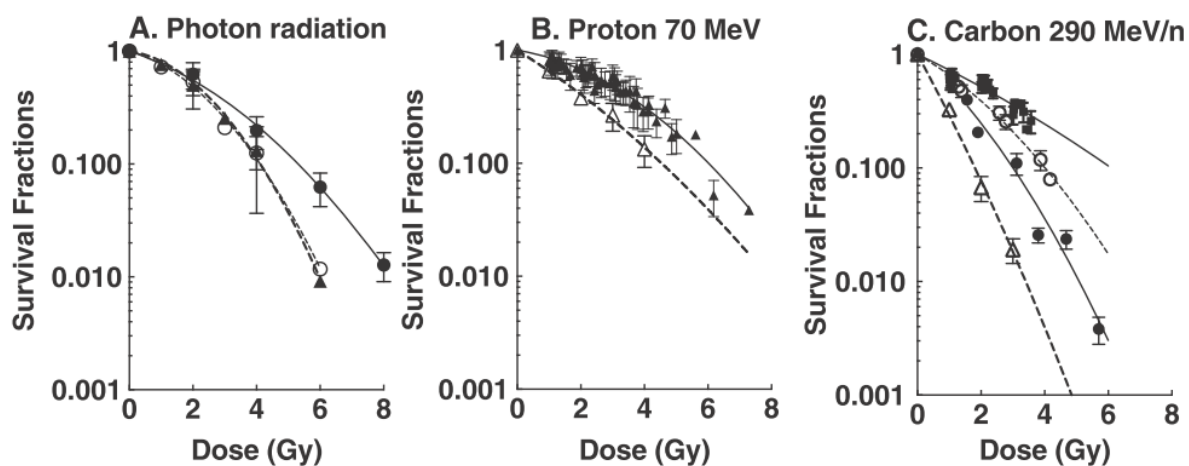


図 2-5 炭素イオン線と陽子線の線量-生存率曲線

- A: 光子線 ● γ 線と OptiCell、○ γ 線と培養ディッシュ、▲ X 線と培養ディッシュ
- B: 陽子線 ▲ OptiCell、△ 培養ディッシュ
- C: 炭素イオン線 ■ 13-20 keV/ μm 、○ 20-30 keV/ μm 、● > 30 keV/ μm 、
△ 培養ディッシュ (LET 70 keV/ μm)

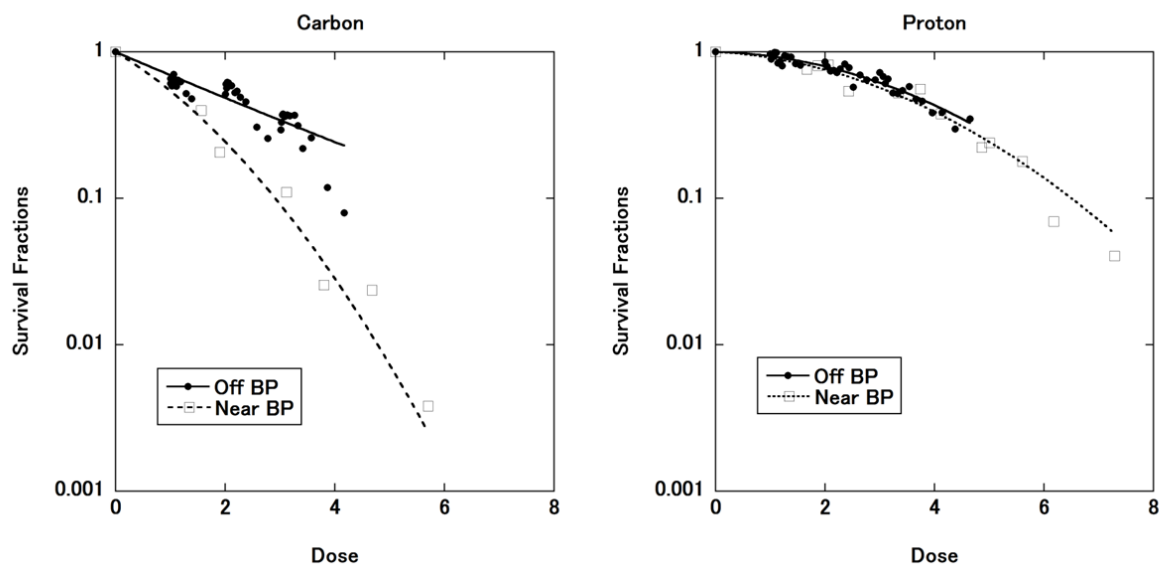


図 2-6 ブラックピーク近傍と遠方に分けた時の炭素イオン線と陽子線の細胞生存率曲線
 炭素イオン線 ●深さ 12 cm 未満をブラックピーク(BP)遠方、□12 cm 以上を BP 近傍とした。
 陽子線 ●深さ 3 cm 未満を BP 遠方、□3 cm 以上を BP 近傍とした。

第3章 DNA 末端リセクションに関わる修復タンパク質 CtIP の フォーカス挙動

3.1 背景

3.1.1 DNA 二本鎖切断修復

我々の細胞 DNA は常に細胞内外からの活性酸素や化学物質、紫外線、放射線等の様々な刺激に曝されており、DNA 損傷に起因したゲノム不安定性は、細胞死や老化、発がんを引き起こす要因と考えられている(Ciccia & Elledge, 2010)。この様々な刺激から DNA 損傷を保護するため、我々の細胞内には DNA の損傷を正確かつ効率的に修復する機能が備わっており、関連するタンパク質により速やかに処理されゲノム恒常性・安定性を維持している。DNA 損傷には、塩基の酸化やメチル化などによる塩基損傷、DNA 鎖間、鎖内での架橋形成、一本鎖切断 (Single-strand break: SSB) や二本鎖切断 (Double-strand break: DSB) の鎖切断などが挙げられる。これらの中でも、DSB は細胞にとって有害かつ致命的な損傷であり、染色体損傷をはじめ、突然変異やゲノム不安定性を引き起こす。この DSB に対してヒトの細胞には主に二つの修復経路が確認されている。一つが非相同末端結合 (Non homologous end joining: NHEJ) であり、他方が相同組換え (Homologous recombination: HR) 修復である (図 3-1)。NHEJ 経路は細胞周期に依存せず機能し、Ku や DNA-PKcs 等の関連タンパク質が DNA 切断末端を認識し結合させることで、速やかに修復される (Lieber *et al*, 2003; Mahaney *et al*, 2009)。一方、HR 経路は細胞周期 S および G2 期のみで働き、Mre11- Rad50 - NBS1 (MRN) 複合体が DNA 切断末端を認識した後、DNA 末端リセクションとよばれる DNA 切断末端の削り込みを行い、RPA や Rad51 タンパク質を介して姉妹染色分体を鋳型にした修復を行うと考えられている (San Filippo *et al*, 2008; Sung & Klein, 2006)。細胞にとってどちらの修復経路を選択するかは、その後の細胞の運命を決める重要な因子である (Brandsma & Gent, 2012; Chapman *et al*, 2012)。しかしこの DNA 修復経路の選択を制御する詳細なメカニズムはまだ分かっていない。

3.1.2 DNA 二本鎖切断の修復経路選択

DNA 修復経路の HR と NHEJ 経路のバランス制御には、HR 経路の初期段階である「DNA 末端リセクション」が重要な働きを持っていると考えられている (Huertas *et al*, 2008; Huertas & Jackson, 2009; Yun & Hiom, 2009)。この DNA 末端リセクションとは、DNA 鎖の 5'末端から 3'末端にかけて DNA 切断末端を削り取り、3'末端が遊離した一本鎖 DNA を生じさせることを指す (図 3-2)。その後、RPA (Replication protein A) とよばれるタンパク質が一本鎖 DNA にリクルートされ、ATR (ataxia telangiectasia mutated (ATM) and Rad3-related) キナーゼを介した細胞周期チェックポイントが働く一方、HR 経路のキータンパク質である Rad51 に置換され、姉妹染色分体を鋳型として後半の HR 修復へと進行する。このリセクションの過程において CtIP (C-terminal binding protein interacting protein) とよばれるタンパク質が、ヒト細胞で重要な役割を果たすことが報告さ

れて以降(Sartori *et al*, 2007)、CtIP の機能や役割に注目が集まるようになった(Chen *et al*, 2008; Eid *et al*, 2010; Helmink *et al*, 2011; Huertas & Jackson, 2009; Takeda *et al*, 2007; Wang *et al*, 2013; You & Bailis, 2010; You *et al*, 2009; Yun & Hiom, 2009)。

3.1.3 CtIP とは

CtIP は CtBP-interacting protein として最初に同定され(Schaeper *et al*, 1998)、転写制御のために Brca1 と相互作用する(Li *et al*, 1999; Yu *et al*, 1998)。CtIP の DNA 損傷応答(DNA damage response: DDR)での役割に関しての最初の報告は、電離放射線に反応して ATM によりリン酸化されることである(Li *et al*, 2000)。その後、CtIP は Mre11 と協力して DNA 末端リセクションを始動し(Sartori *et al*, 2007)、DNA 切断末端に小さな削り込みを入れると考えられている。一旦小規模な削り込みが行われた後、Exo1 等のヌクレアーゼにより大規模に削り取られて一本鎖 DNA が露出する。一本鎖 DNA によって ATR キナーゼが活性化され、またリセクションが開始された後は、NHEJ 経路ではなく HR 経路により修復がなされると考えられる。すなわち、CtIP はリセクションに重要であると同時に、DNA 修復経路選択にも重要な役割を持つ(Huertas & Jackson, 2009; Yun & Hiom, 2009)。CtIP の Mer11 と共に DNA 切断末端に小さく削るといったリセクションの初期過程で役割は確立しているが、リセクションや HR 経路におけるその他の役割は未だ分かっていない。

3.1.4 複雑な DNA 損傷構造と DNA 末端リセクション

これまでの研究において DNA 末端リセクションが、DNA 修復経路選択を制御している可能性が示されているが、DNA 末端リセクションを誘発する因子は示されていない。我々は DNA 末端リセクションに影響を与える因子として、「複雑な DNA 損傷構造」に着目し、DSB 末端の修復過程を変化させる重要な因子であることを報告している(Shibata *et al*, 2011; Yajima *et al*, 2013)。複雑な DNA 損傷構造とは、1.2.5 で述べたように、ある狭い領域に二本鎖切断を含め、一本鎖切断、塩基損傷など様々な損傷が含まれるものや、DNA 切断末端が細断されて複雑になっているものをいい、コンプレックス損傷またはクラスター損傷とも呼ばれている。X 線による DNA の傷はこのような傷は起こさず、炭素イオン線や鉄イオン線などの重イオン線によって起こすことが知られている。我々は、「複雑な DNA 損傷が効率よく DNA 末端リセクションを引き起こす」ことを示した報告の中において、低 LET 放射線として X 線および γ 線、そして高 LET 放射線として炭素イオン線および鉄線を用いて CtIP と RPA タンパク質のリン酸化をウェスタンブロットティングにより調べている。そしてタンパク質発現を調べていることで DNA 末端リセクションの誘導を検証している(Yajima *et al*, 2013)。その結果によると、高 LET 放射線によって CtIP のリン酸化が照射後早い時間でしかも強く検出されている。一方、低 LET 放射線では照射後のリン酸化は遅く、リン酸化していないタンパク質も多く検出されている。また、リセクションマーカーである RPA の発現を調べると、高 LET では多くのタンパク質で RPA のリン酸化が確認できるのに対し、低 LET ではほとんど確認できない。つまり、DNA 末端リセクションや CtIP タンパク質の挙動を検証するには高 LET 放射線を用いた方が効率が良いことが分かる。さらに我々の予備的な実験として DBS 箇所に集積する CtIP のフォーカス数を X 線 2Gy と炭素

イオン線 1Gy で比較したところ、炭素イオン線の方が線量が少ないにも関わらず、照射後 4 時間で比べると二倍もフォーカスの数が多い結果が得られている。また別の報告においても X 線 2Gy と炭素イオン線 2Gy を細胞に照射した際に、RPA または Rad51 のフォーカスについて明らかに炭素イオン線の方が数が多い結果となっている(Shibata *et al*, 2011)。この結果から CtIP や RPA のフォーカスを調べることにしても高 LET 放射線を用いることが適しているといえる。

3.2 目的

電離放射線によって引き起こされる DNA 損傷の中でも DSB が特に重要であり、この DSB の修復メカニズムの解明が必要とされている。DNA 修復過程において修復経路の選択が細胞の運命に大きく関わっている。本研究では複雑な DNA 損傷を起こすモデルとして炭素イオン線を用い、DNA 損傷修復の経路選択の制御メカニズムを解明するため、複雑な DNA 損傷によって DNA 末端リセクションを引き起こす。そしてリセクションに深く関与する CtIP がどのような反応を起こすのかを、ウェスタンブロットティングや蛍光免疫染色法などを用いて検証し、リセクションや HR 修復での CtIP の新しい挙動を明らかにすることを目的とする。

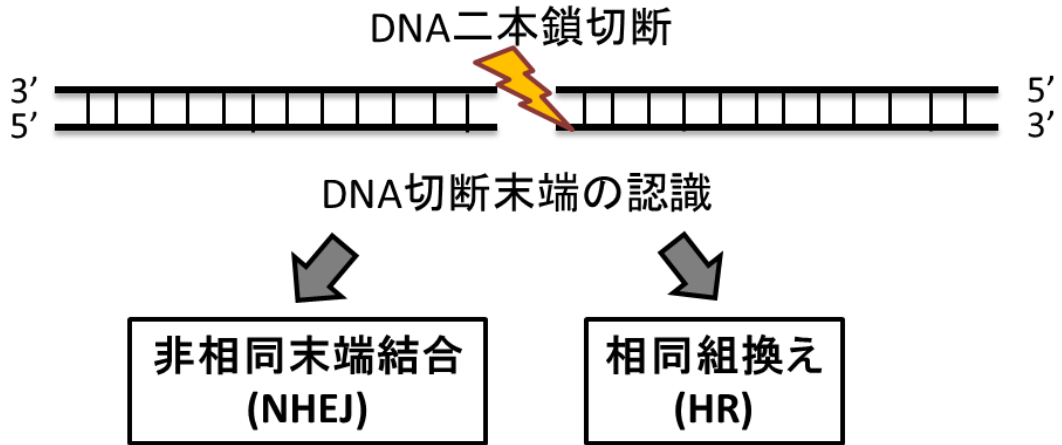


図 3-1 主な DNA 二本鎖切断の修復経路

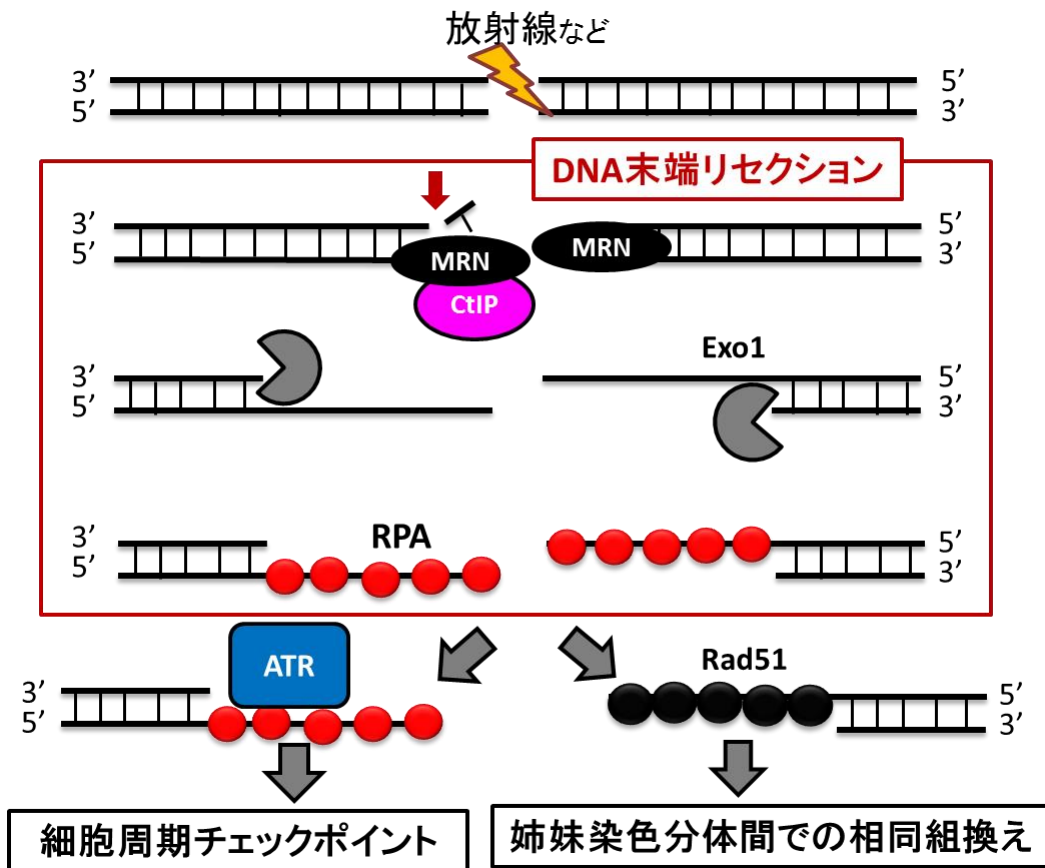


図 3-2 相同組換え修復経路における DNA 末端リセクション

3.3実験方法

3.3.1細胞培養

U2OS (ヒト骨肉腫)、HeLa (ヒト子宮頸ガン)、1BR-hTERT (ヒト正常線維芽細胞-ヒト逆転写酵素発現)、HFL-III (ヒト初代線維芽細胞)を用いた。1BR-hTERT 細胞は英国 Sussex 大学の Penny Jeggo 教授より提供を受けたものである。MEM Eagle 培地に FBS が 10%、抗生物質が 1%となるよう調整し細胞培養に用いた。全ての細胞は細胞インキュベータを用いて、温度 37°C、二酸化炭素濃度 5%、湿度 100%の条件下で管理された。

3.3.2放射線照射および薬剤処理

放射線照射は放射線医学総合研究所(放医研)で行われた。290 MeV/n のエネルギーを持つ LET 値が 70 keV/μm の炭素線、500 MeV/n のエネルギーを持つ LET 値が 200 keV/μm の鉄線を重粒子加速器 HIMAC を用いて加速した。イオンビームの線量率は照射条件により様々であった。上記粒子線を照射する場合、通常は細胞接着面に垂直になるよう照射(垂直照射)するが、イオンの飛跡を集積タンパク質で検出する実験の場合は、細胞接着面に平行(並行照射)になるようサンプルを設置した。

ATM 阻害剤として KU55933 (20 μM)を、ATR 阻害剤として VE-821 (10 μM)を、タンパク質合成阻害剤としてサイクロヘキシミド (Cycloheximide: 200 μg/ml)を培地に溶解して使用した。

3.3.3蛍光免疫染色

細胞を 2 または 4 ウェルチャンバースライドに播き接着させた。重粒子線照射後はすぐにインキュベータに戻し、必要な培養時間を経てから、冷 4%パラホルムアルデヒドまたは冷 100%メタノールで 20 分間固定処理を行った。その後 0.5%Triron X-100 で 10 分間透過処理を行い、3%ウシ血清アルブミン BSA で 20 分間ブロッキング処理を行った。そして、一次抗体を 1 時間 37°Cで反応させ、PBS でよく洗浄した後、Alexa-488 または Alexa-594 が結合した二次抗体を 1 時間 37°Cで反応させた。PBS でよく洗浄した後、DAPI で核を染色し、カバーガラスで封入した。

3.3.4蛍光顕微鏡撮影および画像取得

タンパク質の局在や核の観察は、落射型オリンパス BX51 蛍光顕微鏡を用いた。オリンパス油浸対物レンズ PlanApo 60 (NA=1.40)、デジタル CCD カメラ DP30BW を用いて撮影し、DP Controller ソフトウェアにより画像を取得した。DBS 箇所にタンパク質が集積すると小さな丸い形状の蛍光画像が観察されるが、これをフォーカスと呼んでいる。フォーカスの数をモニター上で観察および評価する際には、Adobe Photoshop を用いて行った。

3.3.5ウェスタンブロッティング

細胞を重粒子線で照射した後必要な時間だけ培養し、セルスクレーパーにより細胞を回収した。細胞を冷 PBS で洗浄し、RIPA バッファー (タンパク質分解酵素阻害剤および脱リン酸化酵素阻害剤入り) で溶解し、遠心分離することで全細胞溶解液 (Whole cell lysate: WCL) を上澄み液に得た。ポリアクリルアミド電気泳動 SDS-PAGE によりタンパク質を分子量ごとに分離した後、タンパク質を電気泳動ゲルからニトロセルロース膜に転写した。転写した膜に抗体が非特異的に結合することを防ぐためにブロッキング処理を行い、TBS バッファーで洗浄した後、各抗体を反応させた。本研究の一部ではタンパク質のリン酸化を詳細に調べるために、リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離できる機能性低分子 Phos-tag を用いた。Phos-tag は SDS-PAGE ゲル中で 20 μ M の濃度で使用した。Phos-tag を SDS-PAGE ゲル中に入れておくとリン酸化タンパク質が Phos-tag にトラップされるため、リン酸化タンパク質の泳動が遅くなり、非リン酸化タンパク質と分離することが出来る (Kinoshita *et al*, 2009)。そのゲルをメンブレンに転写し抗体で検出すると、リン酸化部位の部位や数が異なった場合はそれに応じた異なるバンドが検出されることになる。

3.3.6抗体

本研究で用いた抗体は以下の通りである。CtIP (Cell Signaling)、RPA2 (Abcam)、phosphoT21-RPA (Abcam)、phosphoS4/8-RPA2 (Bethyl)、CyclinB1 (Millipore)、Ku70 (Thermo)、Rad51 (Santa Cruz)、Ku80 (Thermo)。

3.4 結果と考察

3.4.1 CtIP フォーカスは長時間 DSB 箇所でも維持される

最近の報告において、我々は CtIP が放射線照射後 30 分以内に高リン酸化され、その後 2 時間でリン酸化レベルが低下することを示した(Yajima *et al*, 2013)。このリン酸化状態の遷移を調べるために、U2OS 細胞および HeLa 細胞を炭素イオン線を用いて 10Gy 照射し、CtIP のリン酸化をウェスタンブロッティングにより 8 時間まで評価した。30 分後に見られる CtIP の高リン酸化は 8 時間後では非照射 U2OS 細胞と同様なリン酸化状態に戻っているのが確認できた(図 3-3)。また鉄イオン線照射の HeLa 細胞およびヒト線維芽細胞 HFL-III 細胞においても同様の結果が得られた(図 3-5)。これらの結果から CtIP の高リン酸化状態の消失は細胞株や二本鎖切断の複雑性には無関係で生じることを示している。

CtIP に依存した DNA 末端リセクション開始に起こる RPA のリン酸化は、照射 30 分後までには生じており、4 時間までにはプラトーに達していることが分かる(図 3-3)。RPA のフォーカスのいくつかは、シグナル強度は後半の時間帯で観察されるものに比べると弱い、重粒子線ビーム照射 30 分後までには観察することが出来た(Yajima *et al*, 2013)。これらの結果は、CtIP の高リン酸化はリセクションの開始に相関があると言える。さらに照射後 4 時間以降では、DNA 末端はかなりの程度削り取られて一本鎖となっている。DNA 末端リセクションの開始における CtIP の役割と CtIP の高リン酸化の低下を考えると、照射後遅い時間帯では CtIP フォーカスは検出されないと予想していた。しかし、CtIP 特異的な抗体(図 3-5)を用いて U2OS 細胞の蛍光免疫染色を行うと照射後 30 分で CtIP フォーカスのトラックを観察することが出来、さらに驚くことに少なくとも 8 時間はフォーカス形成を維持し続けていることを確認した(図 3-4)。つまり CtIP は高リン酸化状態が終わった後も集積してフォーカスという形で存在し続けている。CtIP フォーカスは RPA との細胞核内において共局在を示し、これは DNA 末端に CtIP が集積しそしてフォーカスを形成していることを意味している。CtIP フォーカス形成は U2OS に特異的ではなく、ヒト正常線維芽細胞 1BR-hTERT においても RPA と一緒に観察されている(図 3-6)。これらの結果は CtIP のフォーカス形成はヒト細胞における一般的な反応の一つであることを示している。

3.4.2 CtIP は高リン酸化のピークの後にフォーカスとして集積する。

CtIP フォーカス形成の動態を調べるために、U2OS 細胞を炭素イオン線 1Gy 照射し CtIP および CyclinB1 抗体で、またはリン酸化 RPA および CyclinB1 抗体で染色を行った。CyclinB1 は S 期後半および G2 期の細胞周期マーカーとして用い、細胞質で輝度の高い CyclinB1 の細胞は G2 期として分別した(Pines & Hunter, 1991)。CtIP と CyclinB1 で染色した典型的な画像を図 3-7 上部に示す。CyclinB1 シグナルを示す 1 細胞当たりの CtIP またはリン酸化 RPA フォーカスの数を計測した。予想に反し、CtIP フォーカス数は照射後 4 時間まで増加し、多少は減少するが、少なくとも 15 時間は維持された(図 3-7)。注目すべきは CtIP フォーカス形成の動態は RPA フォーカス形成の動態と似ており(図 3-7)、両者の動態は重粒子線照射による複雑な DNA 二本鎖切断の修復動態を反映していることである(Shibata *et al*, 2011)。これは DNA 末端リセクションがすでに開始

されてからでも CtIP フォーカスは形成され、二本鎖切断修復が完了するまで維持されることを意味している。これらの結果から CtIP フォーカス形成は何らかの理由で維持されていることが推測でき、これまでの知見である「DNA 末端リセクションの初期過程での作用」とは違った理由であることが考えられる。

3.4.3 フォーカスを形成し維持されている CtIP 分子は照射後早期に集積した分子とは異なる。

我々は CtIP 分子は DNA 末端リセクション開始で作用した後、DSB 箇所に受動的に留まっていると予想した。しかし、CtIP フォーカスの集積の動態(図 3-7)が示すことには、CtIP は DSB 箇所に集積し続けているということである。これは CtIP が照射後遅い時間に DSB 箇所において置き換わっている可能性がある。最近の文献においても GFP 付き CtIP タンパク質がヒト細胞において急速にターンオーバーをしているという報告がある(Steger *et al*, 2013)。そこでこのターンオーバーの可能性を GFP 付き CtIP タンパク質ではなく、内因性の CtIP で調べるために、タンパク質合成阻害剤であるサイクロヘキシミドを用いて検証をおこなった。その検証はウェスタンブロッティングにより細胞全体を、蛍光免疫染色により細胞内の DSB 箇所において実施した。GFP 付き CtIP の状況とは異なり、内因性の CtIP 量も Mre11 量も非照射の U2OS、HeLa および 1BR-hTERT 細胞の照射 8 時間までのサイクロヘキシミド処理によって減少することはなかった(図 3-8)。しかし、10Gy の炭素イオン線照射およびサイクロヘキシミド処理した 1 および 4 時間の条件の U2OS または HeLa 細胞において、CtIP タンパク質量はサイクロヘキシミド未処理と比べて明らかに減少した。一方、その他のタンパク質はサイクロヘキシミド処理による変化は観察されなかった(図 3-9)。リン酸化 RPA2 のレベルがこの期間において同等もしくは少し増加したことは、サイクロヘキシミドの有無に関わらず、DNA 末端リセクションが進行していることを示している。

次に、我々はサイクロヘキシミド処理が CtIP フォーカス形成維持にどのように作用するかを調べた。CtIP と RPA フォーカスの形成と共局在は照射 1 時間後ではサイクロヘキシミド処理無しの条件で確認できた。この 1 時間はフォーカス形成数がピークになる前の時間帯である。しかし、照射後 1 時間の時点からサイクロヘキシミド処理を行った細胞では、照射 4 時間後(言い換えればサイクロヘキシミドは 3 時間処理である)の DSB 箇所での CtIP フォーカスは数および大きさの点で明らかに減少した(図 3-10 図 3-12)。これらの結果は、図 3-11 と良く相関する。図 3-11 は炭素イオン線を垂直照射した結果であり、図中に示すように CtIP は 15 個以上、RPA と Rad51 は 10 個以上のフォーカスが確認されるときに陽性細胞とし、フォーカス陽性細胞の割合で定量化した結果である。面白いことに、RPA フォーカスはサイクロヘキシミド処理の有無に関わらず大きさおよび数の点において変化がなかったが、Rad51 フォーカス陽性細胞の割合がサイクロヘキシミド処理において大きく減少していることである。これは通常 DNA 末端リセクションは進行しているが、Rad51 を介する反応までは進んでいないことを示している。これらの結果をまとめると、DSB 箇所でのフォーカス形成している CtIP 分子は安定的に局在しているわけではなく、新しく合成された CtIP タンパク質の供給が CtIP フォーカスの形成と維持に必要であるということである。Rad51 フォーカスの集積がサイクロヘキシミド処理により減少したことは、CtIP フォーカス形成が DNA 末端リセクション後の Rad51 の集

積過程において何らかの役割を持っているためかもしれないが、さらなる検討が必要である。

以上これらの結果は、DNA 末端リセクションの開始のために DSB 箇所にリクルートされた CtIP 分子はタンパク質分解により早急に処理され、新しい CtIP タンパク質が CtIP フォーカスを維持するためにリクルートされることを示している。つまりこれらの結果は役目を終えた CtIP タンパク質がただ単に DSB 箇所に残っているの可能性を否定している。今のところ、DNA 損傷後の CtIP タンパク質レベルが制御されるメカニズムは不明である。図 3-3、図 3-9、および我々の以前の文献(Yajima *et al*, 2013)に見られるように、CtIP タンパク質レベルが放射線照射後に減少する現象が見られている。その多くは比較的照射後早い時間帯(30 分)であった。これは放射線照射後早い時間で CtIP 分解が引き起こされている可能性が考えられる。しかし CtIP タンパク質レベル全体においては新たな合成により効率良く維持されていると考えられる。DNA 損傷に誘導された CtIP のユビキチン化の報告はあるが、その報告では CtIP の分解は考慮していない(Yu *et al*, 2006)。放射線照射後の CtIP 発現を制御しているメカニズムを解明するためにはさらなる検証が必要である。その他の考えられるリン酸化状態の CtIP 分子を制御している機構はタンパク質脱リン酸化酵素による脱リン酸化である。我々が行った準備実験において、非照射細胞をタンパク質脱リン酸化酵素 2A/1 阻害剤であるオカダ酸で処理すると、未処理細胞よりも高いリン酸化レベルを示した。これは CtIP のリン酸化レベルは脱リン酸化により制御されているかもしれないが、CtIP タンパク質の分解と脱リン酸化の機構を明らかにするためには、さらなる解析が必要である。

3.4.4 ATM 依存の高リン酸化後は長時間に渡り ATM/ATR を通して低リン酸化状態を維持する

放射線照射後遅い時間において CtIP のリン酸化状態は非照射細胞で見られるリン酸化状態と類似しているが、ウェスタンブロッティングの結果をより詳細に観察すると、非照射細胞の CtIP と比べて、ほんの少し高いバンドが存在しているかのように見える(図 3-3)。これは CtIP は長時間に渡り低リン酸化状態を維持している可能性を示している。非照射細胞の CtIP とは異なる CtIP の低リン酸化状態の現象を確かめるために、Phos-tag を用いた電気泳動を利用することにした。この過程は電気泳動のゲル上においてタンパク質を細かなリン酸化状態で分離・検出することが出来るものである(Kinoshita *et al*, 2009)。図 3-3 で用いた全細胞ライセートを使用し、Phos-tag を用いて電気泳動を行うと、遅い時間の CtIP のリン酸化状態は非照射細胞の CtIP リン酸化状態とは分離出来ることが分かった(図 3-13)。重要なことは、非照射細胞では CtIP の非リン酸化タンパク質を示す底のバンドは明らかであるが、照射 4 および 8 時間後の条件では観察されないことである。これらの結果から、CtIP 分子は一つまたはいくつかの箇所が少なくとも照射 8 時間後まではリン酸化されていることを示している。

次にこの低リン酸化の責任キナーゼを明らかにするため、放射線照射前後において ATM 阻害剤である KU55933 を用いて細胞の処理をした。予想の通り、Phos-tag を用いた照射 30 分後に観察される CtIP 高リン酸化は U2OS および HeLa 細胞で ATM 阻害剤により完全に抑えることが出来た(図 3-14)。この結果から CtIP の初期の多くのリン酸化は ATM 活性に依存すると考えた。一方、

照射後時間が経った時の低リン酸化は、ATM 阻害により完全には阻害されなかった。その他のキナーゼ候補を調べるために、U2OSとHeLa細胞を用いてATM阻害剤単独、ATR阻害剤(VE-821)単独、その両方を用いた二重阻害による評価を行った。処理条件は照射30分前から4時間までである。ATM阻害剤単独では、放射線誘導の低リン酸化を完全には抑えることは出来なかった。ATR阻害剤処理では理由は不明だが少しだけリン酸化レベルが上昇した。一方、ATM阻害剤およびATR阻害剤の二重阻害では、非照射細胞で観察される低リン酸化状態と同様の状態に戻った(図3-15)。これは照射後遅い時間で観察されるCtIPの低リン酸化はATMまたはATRによる部分的に重複したかたちで実行されていることを示している。これは照射後初期で観察されるATM依存の高リン酸化とは明らかに異なっているといえる。

これらの結果が強く示すことは、CtIPは放射線照射後すぐにATMにより高リン酸化作用を受け、その後長時間に渡りATMおよびATRの重複した活性により低リン酸化状態を維持することである。この遅い時間帯では、図3-10、図3-11に示すようにCtIP分子のターンオーバーが生じている。上記の低リン酸化状態および制御キナーゼが初期で機能している時とは異なるという知見から、DNA末端リセクションの開始における役割を終えた後、CtIPはさらなる役割・機能を持っている可能性が考察できる。

3.4.5 通常の SSD 伸長は CtIP フォーカス形成には必須ではない。

次に我々はRPAフォーカス形成へのキナーゼ阻害の影響を調べた。U2OSに対しATM単独阻害、ATR単独阻害、二重阻害の処理を行った後に放射線を照射した。ATM単独阻害またはATR単独阻害の細胞は、阻害剤なしの細胞に比べ、明らかにRPAのフォーカス数が減少した。一方、CtIPフォーカスはどちらの阻害剤を用いた場合も、未処理の条件と同様なフォーカス形成を示した。しかし、二重阻害をした細胞では、RPAフォーカスは単独阻害の条件と比べて、大きさおよび数において減少した。同時にCtIPフォーカスは不明瞭になった(図3-16)。興味深いことは二重阻害した細胞においてもCtIPフォーカスの強度が相対的にRPAフォーカスより良いことである。さらに二重阻害した場合、RPAフォーカスはCtIPフォーカスとの共局在箇所において、とても小さく、もしくは検出できなくなる。これはリセクションによって削り取られたDNA一本鎖の長さが短いことを表しているのかもしれない(図3-16)。UVレーザー照射システムを用いて示されている過去の文献(You *et al.*, 2009)と一致してCtIPのフォーカス形成は照射後早い時間帯(30分)においてはATMに強く依存しているのに対し、遅い時間帯(4時間)ではATMへの依存が小さくなっていることは興味深い。この結果から、ATMおよびATRキナーゼの活性が適切な末端リセクションの進行に必要であることを示している。一方でCtIPフォーカス形成においてATMおよびATRの機能は重複している。さらに一本鎖DNA領域の伸長はCtIPフォーカス形成には必須ではない。相対的に短いSSD領域はCtIPフォーカスの検出と維持に対して十分であるといえる。以上の考察から、少なくともDNA末端リセクションが抑制された時、CtIP分子が集積する領域は一本鎖DNA領域を超えて伸展しているかもしれない。

3.5まとめ

この研究において、我々は複雑な DSB に応答して CtIP の新しい挙動を示し、DNA 末端リセクションの始動というこれまでの役割とは異なる可能性を示した。ここで考えられるいくつかの CtIP の役割や機能の考えられる可能性を示すとすると、以下のことが挙げられる。1) CtIP は DSB 末端に生じるリセクションの長さや終点を制御しているのかもしれない。2) CtIP は既に Sae2 で報告のあるように DSB 末端を繋ぎとめる機能を持っているのかもしれない。3) CtIP は ATR 自身やそのシグナルタンパクと相互作用して ATR シグナル伝達の制御を助けているのかもしれない。4) CtIP は RPA の Rad51 との置き換わりの制御に関わっているのかもしれない。これまでのところ、いくつかの CtIP の ATM/ATR リン酸化箇所が示されているので、残されたリン酸化箇所や CtIP との相互作用タンパク質を明らかにすることで、CtIP の新しい役割・機能の発見につながるのではないかと期待できる。CtIP の新たな機構が見つかり DNA 末端リセクションの制御がより明確になり、それにより DNA 損傷修復の経路選択や修復機構そのものの理解につながると期待できる。

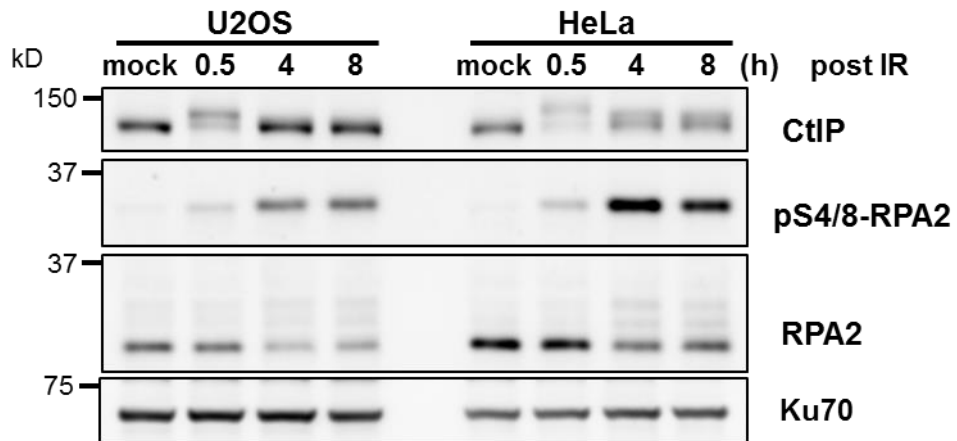


図 3-3 炭素イオン線 10Gy 照射後の CtIP の高リン酸化

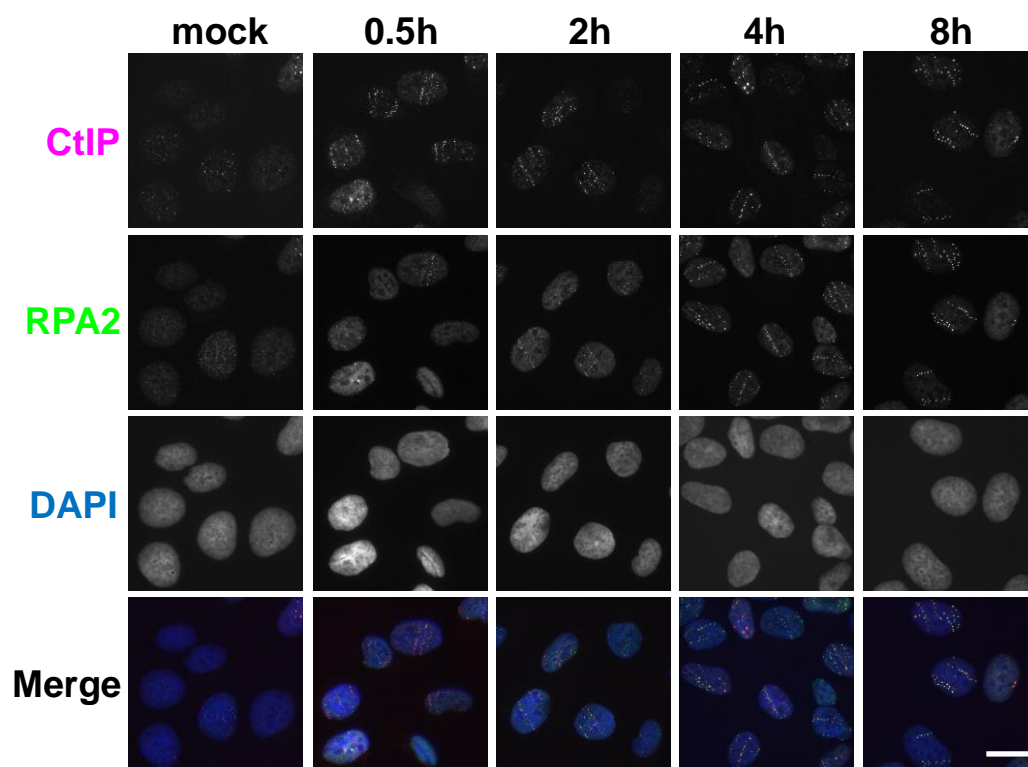


図 3-4 U2OS 細胞に炭素イオン線 2Gy 水平照射後、各時間での CtIP と RPA の集積の様子
Bar: 20 μ m

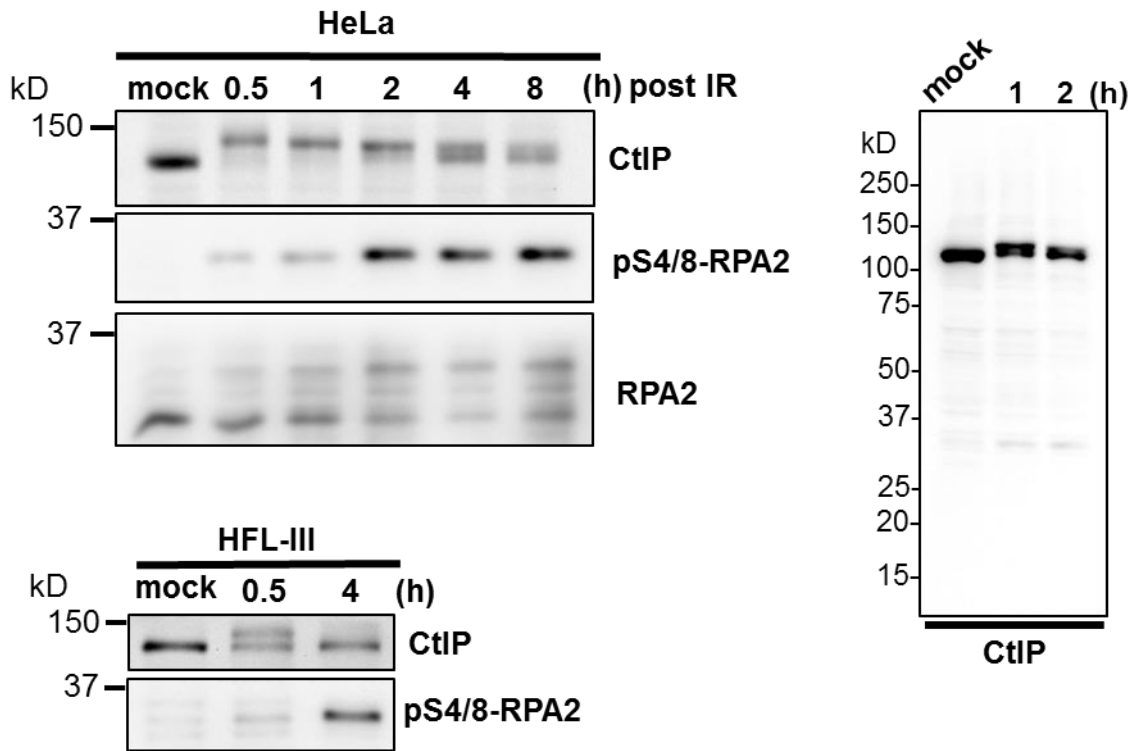


図 3-5 鉄イオン線 10Gy 照射時の各細胞での CtIP の挙動

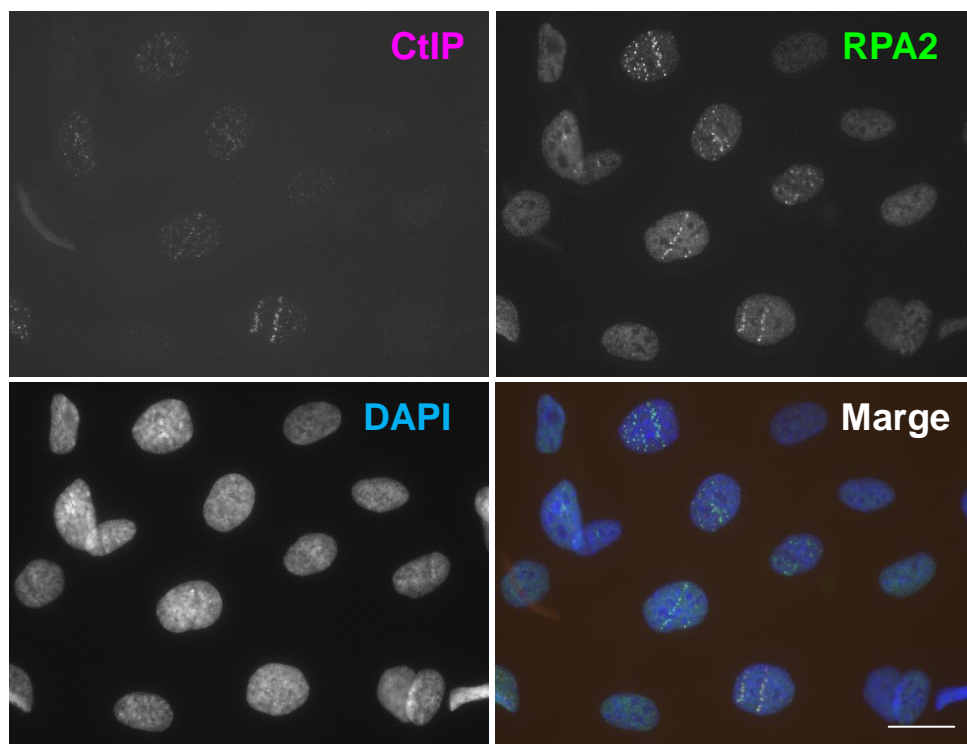
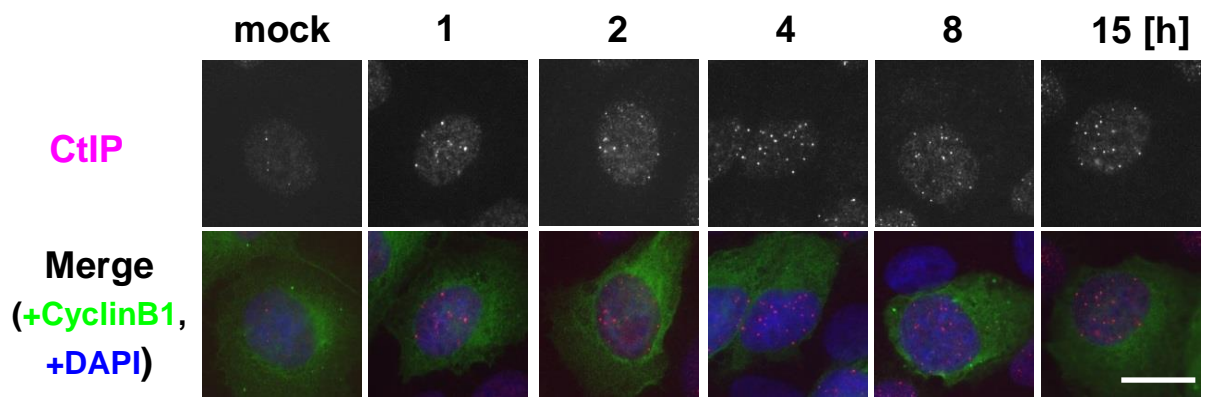


図 3-6 1BR-hTERT 細胞に鉄イオン線 2Gy 照射後 4 時間での CtIP と RPA 集積
Bar: 20 μ m



Bar: 20 μ m

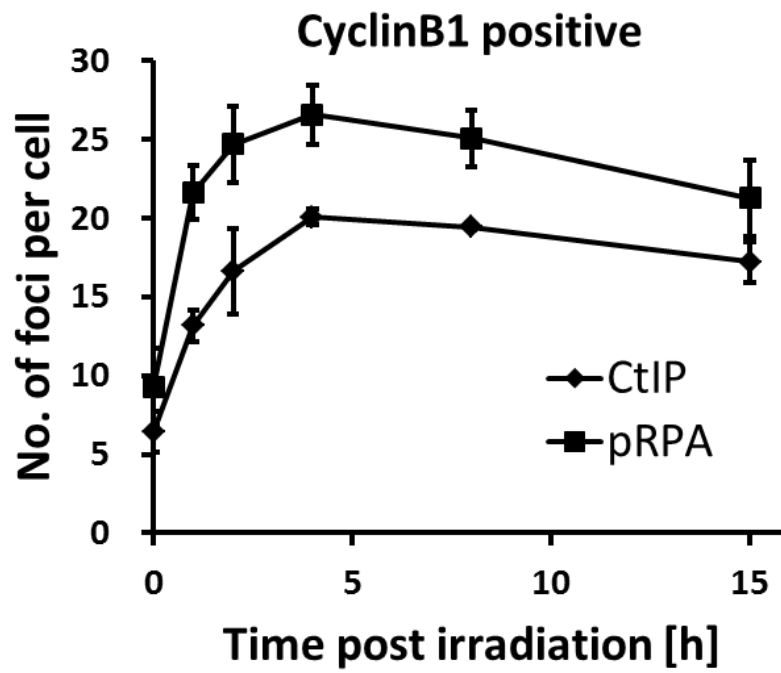


図 3-7 U2OS に炭素イオン線 1Gy 垂直照射時の CtIP、リン酸化 RPA フォーカス数の変化

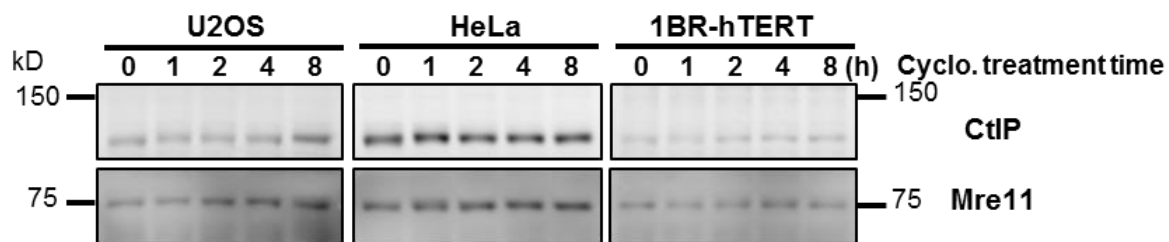


図 3-8 各細胞にサイクロヘキシミドを処理した時の CtIP と Mre11 のタンパク質量

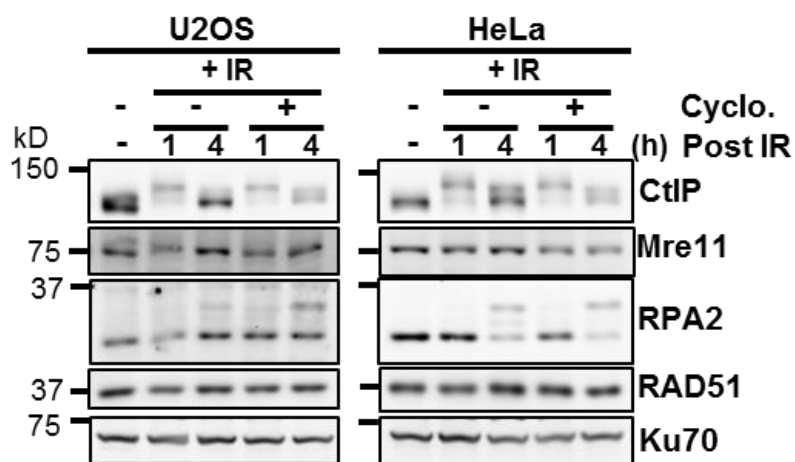


図 3-9 炭素イオン線 10Gy 照射しサイクロヘキシミド処理後の各タンパク質量

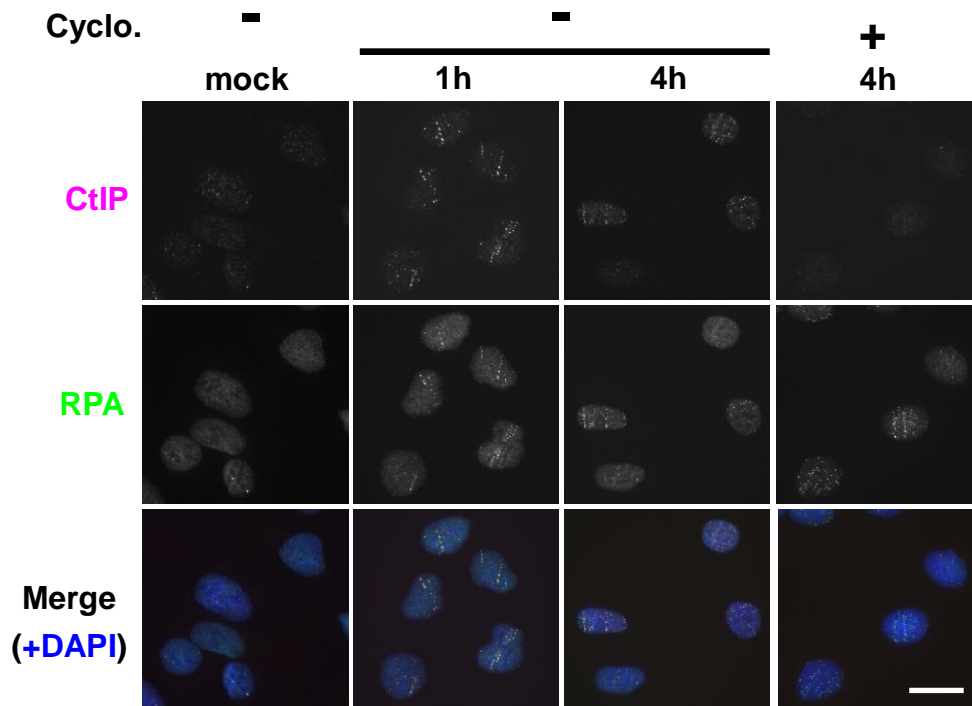


図 3-10 サイクロヘキシミド処理時の CtIPトラックの観察
Bar: 20 μ m

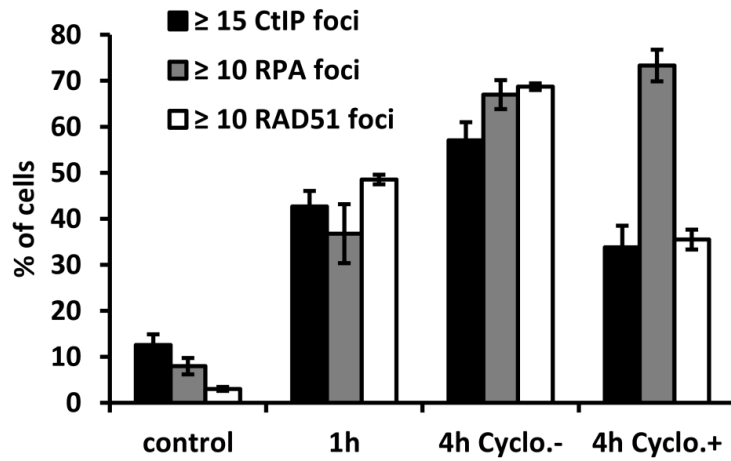


図 3-11 サイクロヘキシミド処理時の CtIP、RPA および Rad51 のフォーカス数

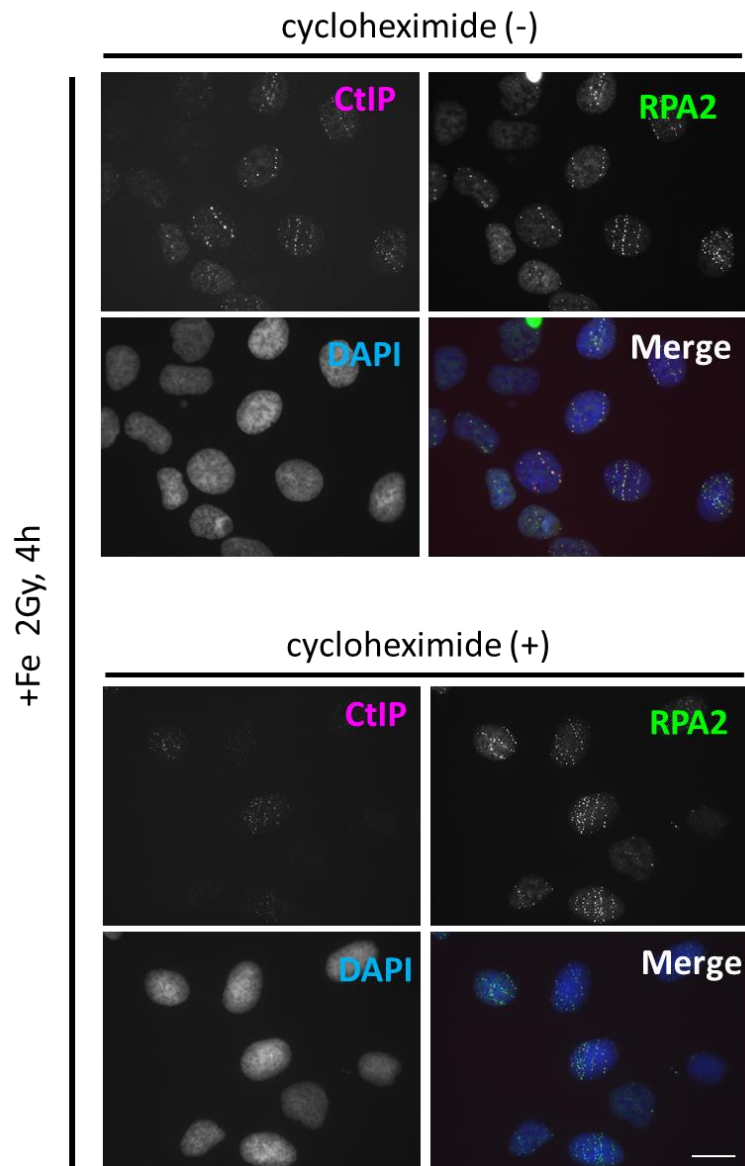


図 3-12 サイクロヘキシミド処理時の U2OS 細胞での CtIP トラックの観察
Bar: 20 μ m

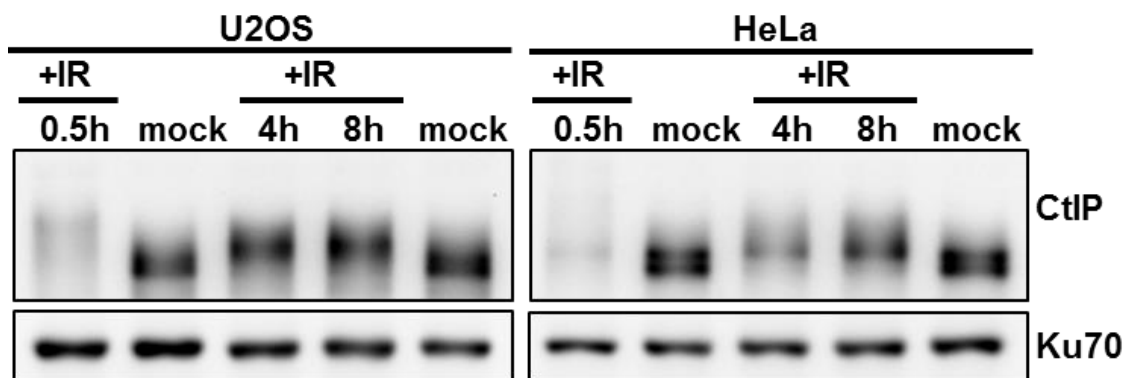


図 3-13 Phos-tag を用いた CtIP のリン酸化バンドの検出

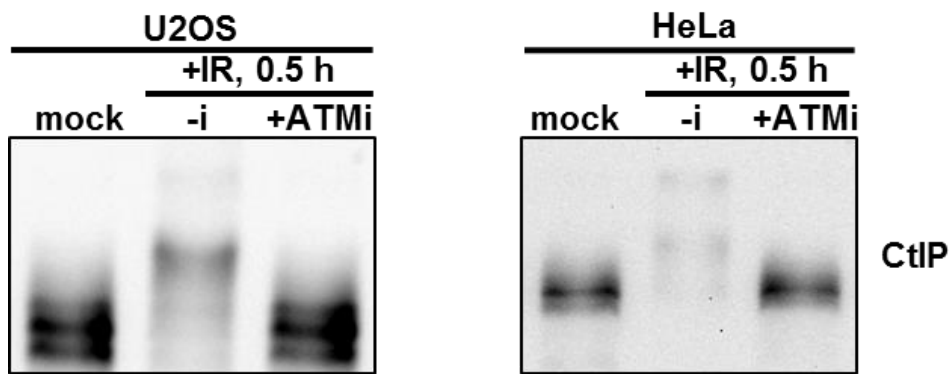


図 3-14 ATM 阻害時の CtIP のリン酸化

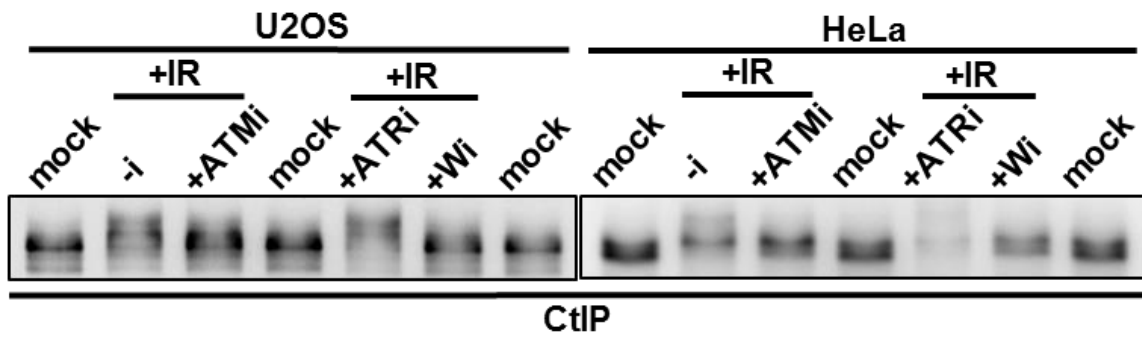


図 3-15 CtIP リン酸化に対する ATM および ATR の関与の検討

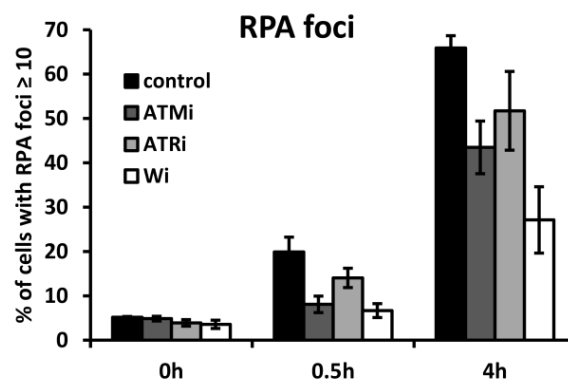
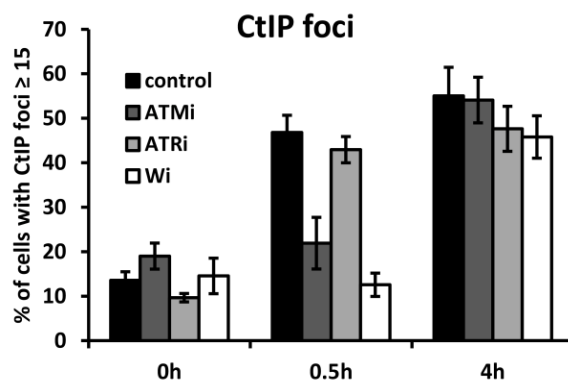
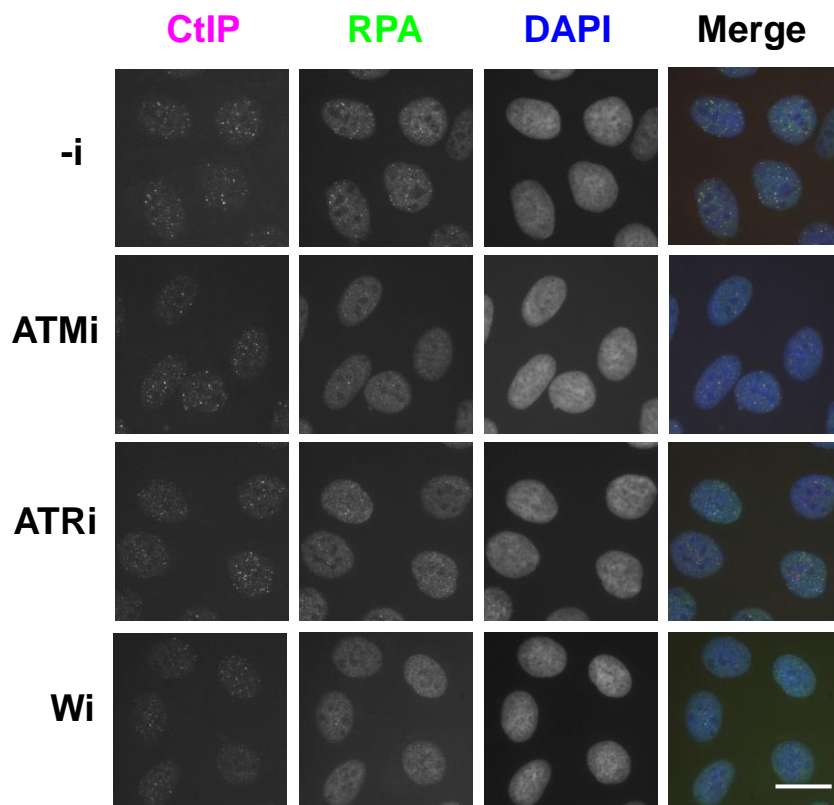


図 3-16 CtIP および RPA のフォーカス形成への ATM および ATR の関与の検討
Bar: 20 μ m

第4章 高 LET 放射線と ATR 阻害による放射線増感作用

4.1 背景

第3章 3.1.1 で述べたように我々の細胞の DNA は常に細胞内外からの様々な要因、活性酸素や化学物質、紫外線、放射線などから刺激を受けている。これらの刺激による DNA の損傷は突然変異や染色体異常のような遺伝的不安定性を引き起こすことがあるため、細胞には様々な防御機構が存在している。DNA 損傷チェックポイント機構もその一つである。細胞周期は G1 期 (G は gap) → S 期 (synthesis phase) → G2 期 → M 期 (mitotic phase) と進行し、S 期では染色体の複製が行われ、M 期では核と細胞質がそれぞれ分裂し、一つの親細胞から二つの娘細胞が生じる。DNA が損傷を受けると DNA 損傷チェックポイントの活性化を受けて細胞周期が停止することが知られている (Bartek & Lukas, 2007; Jackson & Bartek, 2009)。細胞周期を次の周期へ移行できるようにするために一旦細胞周期を止めて DNA 修復を行う。仮に修復が困難な場合はアポトーシスや細胞老化を促進し、損傷の蓄積や細胞の突然変異を防いでいる。細胞周期 G1、S、G2 期のそれぞれにおいてチェックポイントが存在し、DNA が損傷を受けた時に細胞がどの周期にいるかによって働くチェックポイントが異なる。DNA 損傷チェックポイントの活性化には傷を感知する DNA 損傷センサー、シグナルを伝達するトランスデューサー、効果を発揮するエフェクターが働いている。このシグナル伝達経路において PI3K (phosphoinositide 3-kinase) 関連キナーゼ (PIKK) が重要な役割を果たしている。PIKK ファミリーには ATM や DNA-PKcs、ATR などがあり、細胞周期停止や DNA 損傷修復で作用する (Lukas *et al*, 2004)。ATM は Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体が DNA 二本鎖切断末端 (DSB) を認識した後リクルートされ (Lee & Paull, 2007)、DNA-PKcs は Ku70-80 複合体にリクルートされる (Smith & Jackson, 1999) というふうに、DSB が生じた時に活性化される。ATR は DNA 一本鎖切断 (SSB) や DNA 複製フォークの進行停止が生じた場合に活性化する (Ciccio & Elledge, 2010; Flynn & Zou, 2011)。DNA 損傷チェックポイントでは ATM と ATR が重要であり、ATM は Chk2 をリン酸化し、ATM と Chk2 は転写因子 p53 をリン酸化して p21 などを制御することで G1/S チェックポイントを引き起こす。一方、ATR は Chk1 をリン酸化・活性化させることで G2/M チェックポイントを引き起こす。

DNA 損傷応答やチェックポイントに欠かせない ATM および ATR の遺伝子に変異がある場合は遺伝病を引き起こす原因となる。毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasis, AT) は 11 番常染色体の遺伝子欠損が引き起こす劣性遺伝病であり、小頭症や免疫不全症、高頻度な悪性腫瘍の発生などが特徴として挙げられる (Lavin, 2008; Shiloh & Ziv, 2013)。さらに放射線に対し高率に感受性である。ATR 遺伝子の変異は稀であるが、セッケル症候群 (Seckel Syndrome) の原因の一つが ATR 遺伝子の変異と考えられている (O'Driscoll & Jeggo, 2003; O'Driscoll *et al*, 2003)。セッケル症候群は常染色体劣性疾患であり、小頭症や知的障害などが特徴として挙げられる (Goodship *et al*, 2000)。また ATR は胚発生初期に必要である (Brown & Baltimore, 2000)。ATR の遺伝子変異はゲノムの不安定を引き起こす一方で、ATR のシグナル経路は細胞分裂に着目したがん治療のターゲットとして利用されている (Collins & Garrett, 2005; Thompson &

Eastman, 2013)。

がん細胞ではがん遺伝子が活性化し、またはがん抑制遺伝子が不活性化することで異常な増殖を繰り返している。そのため正常な細胞とは DNA 損傷応答や細胞周期チェックポイントが異なる。代表的ながん抑制遺伝子の一つに p53 遺伝子がある。がん細胞の多くに p53 遺伝子変異が確認されており(Beroud & Soussi, 2003; Hussain & Harris, 1998; Soussi, 2000)、p53 を介した G1 チェックポイントの機能が低下していると考えられる。G1 チェックポイント機能が働けない細胞は電離放射線や抗がん剤により DNA 損傷を受けた時は ATR-chk1 経路を介した G2 チェックポイントが働き細胞周期を停止させる。つまりがん細胞では正常細胞と比べて ATR-chk1 経路の活性が高く、抗がん剤や放射線治療への応用が期待される。このため、合成致死 (Synthetic lethality) (Kaelin, 2005)という単独の修復経路(もしくは遺伝子)が働けない状態では生き残るが、複数の修復経路が同時に働けなくなると死に至るという考え方が、細胞周期チェックポイントと細胞分裂を制御するがん治療に応用されている(Medema & Macurek, 2012)。現在では多くの chk1 が開発され前臨床や臨床試験に用いられている(Thompson & Eastman, 2013)。

電離放射線は水を電離し生じるフリーラジカルで DNA に二本鎖切断 (DSB) を生じさせ、または DNA が直接エネルギーを吸収することで DSB を生じさせることができる。X 線や γ 線が広く放射線治療で使用されているが、近年では高速に加速した荷電粒子を治療に用いる粒子線放射線治療が注目されている。特に炭素イオン線を用いた治療が固形腫瘍に対し良い成績を上げている。しかし炭素イオン線でも効果を示さない症例も存在し、この粒子線治療法により効果を持たせるためには、照射技術の改良と同時に、高 LET 放射線に対する細胞応答の基礎的な生物研究が必須である。我々はこれまでに「重粒子線に起因する複雑な DNA 損傷はその修復過程で DNA 末端リセクションを効率良く引き起こす」ことを報告した(Yajima et al, DNA Repair 2013)。この報告の中では複雑な DNA 損傷によってより多くの RPA がリン酸化されていることを示した。この結果は高 LET 放射線に照射された細胞は、ATR リン酸化酵素の活性が高いことを示唆している。なぜなら DNA 末端リセクションが起きると RPA がリクルートされ、さらに ATR リン酸化酵素が ATRIP と共に RPA 箇所にリクルートされるからである(Lee Zou et al, Science 2003)。他の文献では高 LET 放射線照射後 24 時間経ても RPA の集積が観察されることが報告されている(Shibata et al, 2011)。さらに高 LET 放射線の鉄線を照射した場合に、 γ 線と比べて長い時間細胞周期が G2/M 期に集積していることが報告されている(Asaithamby et al, 2011)。これらの結果からも高 LET 放射線と ATR が重要な関係にあることが示唆される。これまで X 線などの放射線が引き起こす DSB には ATM が重要であることから放射線と ATM の関係について熱心に検討が行われてきた。一方 ATR は SSB や複製フォーク進行停止により活性化されることから放射線と関係は ATM に比べるとその報告は少ない。しかも高 LET 放射線と ATR の関係はまだ分かっていない。

4.2目的

複雑な DNA 損傷と ATR タンパク質リン酸化酵素との関係を明らかにし、炭素イオン線のような高 LET を用いた治療の効果を向上させることを目的とし、特異的な ATR 阻害剤 VE-821 を用いて炭素イオン線照射後の細胞周期や小核の発生頻度、細胞生存率を X 線の結果と比較しながら放射線増感効果の有無を検討する。

4.3実験方法

4.3.1細胞培養

U2OS (ヒト骨肉腫)、HeLa (ヒト子宮頸ガン)、1BR-hTERT (ヒト正常線維芽細胞-ヒト逆転写酵素発現)を用いた。1BR-hTERT 細胞は英国 Sussex 大学の Penny Jeggo 教授より提供を受けた。U2OS と HeLa 細胞の培養には MEM Eagle 培地に FBS が 10%、抗生物質が 1%となるよう調整したものを用いた。1BR-hTERT 細胞の培養には DMEM 培地に FBS が 15%、抗生物質が 1%となるよう調整したものを用いた。全ての細胞は細胞インキュベータを用いて、温度 37°C、二酸化炭素濃度 5%、湿度 100%の条件下で管理された。

4.3.2放射線照射と薬剤処理

放射線照射は全て放射線医学総合研究所(放医研)で行われた。LET 値 70k eV/μm の炭素線 (290 MeV/n)は HIMAC 重粒子線加速器を用いて生成された。イオンビームの線量率は照射条件により様々であった。X線照射は TITAN-320 型 X線照射装置を用いて行った。照射条件は管電圧 200 kVp、管電流、20 mA であり、低エネルギー成分除去のため 0.5 mm のアルミニウムおよび 0.5 mm の銅フィルターを用いた。ATR 阻害剤として VE-821 (1 μM)を培地に溶解して使用した。放射線照射の 1 時間前に元の細胞培地を VE-821 が溶解した培地と交換することで、薬剤処理を行った。薬剤処理のコントロールとしては VE-821 の溶媒である DMSO を用いた。小核法ではサイトカラシン B を培地に溶かし 2 μg/ml の濃度で使用した。サイトカラシン B はアクチン重合阻害剤である。細胞質分裂を阻害するが核分裂は進行するため、一細胞に二核が存在する二核 BN (binucleate) 細胞を作ることが出来る(Fenech, 2000; Fenech, 2007)。

4.3.3細胞周期解析

T25 フラスコに播いた細胞 (HeLa, U2OS, 1BR-hTERT) に対し、放射線 (X 線、炭素イオン線) 照射 1 時間前から VE-821 (1 μM) 薬剤処理を行い、放射線照射後すぐに細胞をインキュベータに戻し、6, 12, 24 時間培養した。実験条件は、①薬剤処理、放射線照射を行わない control、②薬剤処理のみ、③放射線照射のみ、④薬剤と放射線の併用処理の 4 条件とした。①の control には薬剤処理のコントロールをして DMSO を用いた。各時間培養した後トリプシン処理で細胞を剥がし 15 ml チューブに回収した。1500 rpm で 5 分間遠心した後、PBS で細胞を洗浄した。再度遠心した後、最終濃度が 70%となるようにエタノールで細胞を固定した。固定する際はボルテックスで攪拌しながらエタノールを加え、徐所にエタノール濃度が高くなるように注意した。固定後 2500 rpm で 5 分間遠心し、PBS で細胞を洗浄した。1000 rpm で 5 分間遠心し、PBS を捨てた後 RNase と PI (Propidium Iodide) がそれぞれ 200 μg/ml および 50 μg/ml となるように調整した後、これらを加えることで DNA を染色した。室温で 30 分以上静置した後、フローサイトメーター FACS Calibur (図 4-1)を用いて測定した。PI 蛍光色素は細胞中の DNA に結合しレーザー励起による蛍光量は DNA 含有量に比例する。

FACS Calibur は細胞を一つずつ流路に流すことが可能で、蛍光色素で標識された 1 つの細胞にレーザーを照射し、放出される特定の波長の蛍光を検出すること可能である。本実験では PI で DNA を染色し、488 nm レーザーで励起し、617 nm 付近の蛍光を検出した。

細胞周期解析には FlowJo 解析ソフトを使用した。前方散乱光 FS (Forward Scatter) および側方散乱光 SS (Side Scatter) を軸とした図、横軸 PI 強度および縦軸カウント値としたヒストグラムの図を作成し、ゲーティング処理により各細胞周期の割合を算出した。



図 4-1 BD FACSCalibur™ フローサイトメーター

4.3.4 細胞成長曲線

6 穴プレートに細胞 (HeLa, U2OS, 1BR-hTERT) を播き、放射線 (X 線、炭素イオン線) 照射 1 時間前に VE-821 (1 μ M) 薬剤処理を行った。放射線照射後すぐに細胞をインキュベータに戻し、各時間条件において図 4-2 のコールターカウンターを用いて細胞数を測定した。時間条件は、照射直後とその後 24 時間毎の最長 5 日までの計 6 点とした。6 点それぞれの細胞数を照射直後の細胞数で割ることで、細胞成長曲線を算出した。照射線量は細胞表現型としての細胞生存率が同じ程度になるよう RBE を考慮し、X 線を 6Gy、炭素イオン線は 3Gy とした。放射線照射しない薬剤処理だけの細胞成長曲線も作成した。薬剤処理した培地の交換は行わなかった。



図 4-2 コールターカウンター

4.3.5 小核試験

4 穴チャンバースライドに U2OS 細胞を播き、放射線 (X 線、炭素イオン線) 照射 1 時間前に VE-821 (1 μ M) 薬剤処理を行った。放射線照射後すぐに、サイトカラシン B (2 μ g/ml) と VE-821 または DMSO が入った培地と交換し、その後インキュベータ内で培養した。24 時間培養した後、培地を捨て PBS で洗浄し、冷メタノールで 20 分間細胞固定処理を行った。0.5% TritonX-100 で 10 分間処理することで細胞膜の透過性を亢進させた。続いて 3% BSA でブロッキングした後、抗体として Alexa 488 が付いた β -Actin を 1 時間反応させ、PBS で洗浄した後、蛍光色素 DAPI 入り封入剤で封入した。 β -Actin は細胞質を、DAPI は細胞核を染色するために用いた。

細胞観察には蛍光顕微鏡 Olympus BX51、対物レンズ PlanApo 60 (NA=1.40) を用いて観察を行った。1 回の実験で 500 個の二核細胞を測定し、3 回の実験で計 1500 個の二核細胞を測定した。各実験において小核の合計数を二核細胞の合計数で割ることで、二核細胞 1 個当たりの小核数を算出した。

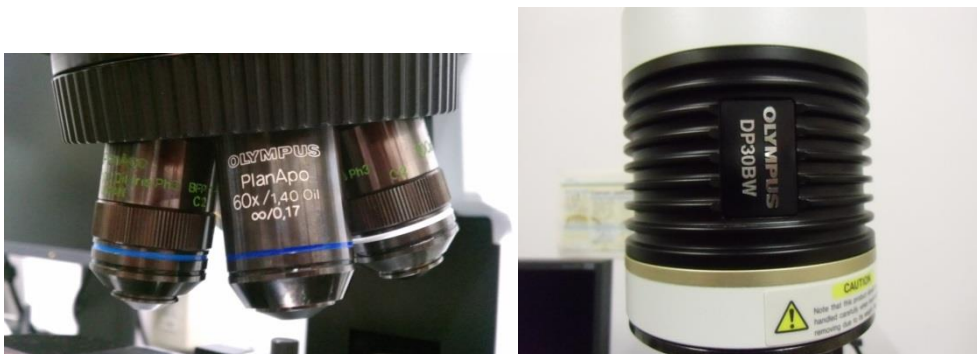
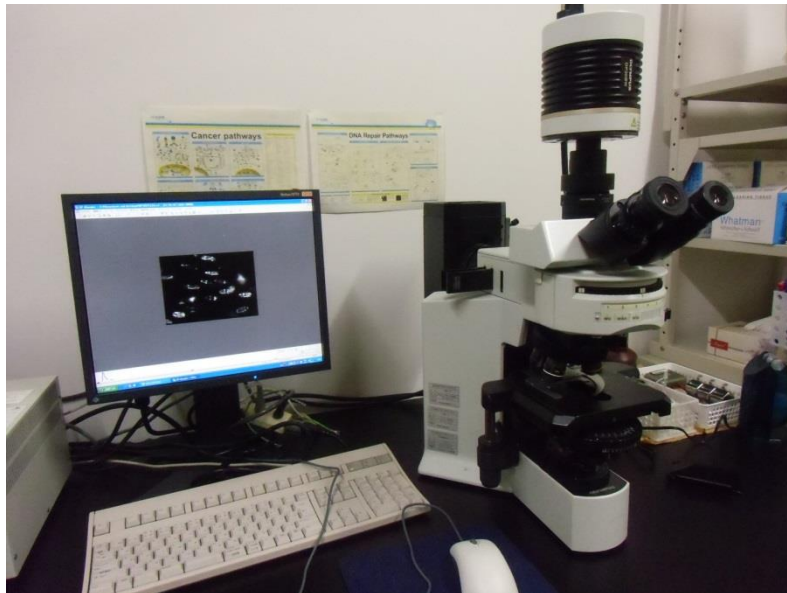


図 4-3 蛍光顕微鏡 Olympus BX51、対物レンズ PlanApo 60 (NA=1.40) およびカメラ

4.3.6細胞生存率曲線

T25 フラスコ細胞 (HeLa, U2OS, 1BR-hTERT) を播き、放射線 (X 線、炭素イオン線) 照射 1 時間前に VE-821 (1 μM) 薬剤処理を行った。放射線照射後すぐにインキュベータに戻し 8 または 24 時間細胞を培養した。トリプシン処理により細胞をフラスコから剥がし、適当な細胞数濃度になるよう希釈し、6 cm ディッシュまたは 10 cm ディッシュに播き、12 日~14 日インキュベータ内で培養した。コロニー形成後、100% エタノールで細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色した。50 個以上の細胞で構成されるコロニーを生存能力があるとしてカウントし、以下に示す式で細胞生存率 SF (Survival Fraction) およびコロニー形成率 PE (Plating Efficiency) を算出した。

$$\text{SF} = \frac{\text{50 個以上の細胞で構成されるコロニー数}}{\text{播いた細胞数} \times \text{コロニー形成率 (PE)}}$$

$$\text{PE} = \frac{\text{0Gy 条件で出来たコロニー数}}{\text{0Gy 条件で播いた細胞数}}$$

放射線を用いた生存率曲線は以下の式で示す線形—二次モデルで近似できる。D を照射線量、 α および β はそれぞれ Gy^{-1} 、 Gy^{-2} の単位を持った係数である。

$$\text{SF} = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

放射線増感作用の指標の一つに増感率 SER (Sensitizer Enhancement Ratio) がある。SER は、増感剤が有る場合のある生存率を示す照射線量と、増感剤が無い場合のある生存率を示す照射線量の比をとったもので以下の式で表わされる。ある生存率を示す照射線量には、細胞生存率が 10% となる線量 (D_{10}) を使用することが多い。

$$\text{SER} = \frac{D_{10} (\text{増感剤無し})}{D_{10} (\text{増感剤有り})}$$

4.4結果と考察

4.4.1VE-821 薬剤は放射線誘発 G2 細胞周期チェックポイントを解除する

VE-821 薬剤処理が放射線照射後に生じる細胞周期チェックポイントに与える影響を調べるために、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。炭素イオン線 3Gy および X 線 6Gy 照射後、6、12、24 時間の条件で細胞周期解析を行った。この検討では炭素イオン線の RBE を 2 とし、X 線の線量が炭素イオン線の倍の値に設定した。

炭素イオン線照射の HeLa 細胞の場合、照射 12 時間後の細胞周期は G2 期の割合が増え、これは G2/M チェックポイントが働いていることを示している。一方、炭素イオン線照射と VE-821 薬剤処理を併用した条件では、炭素イオン線照射単独の条件と比べて G2 期の割合が減少し、G1 期の割合が増加した。これは VE-821 薬剤処理による ATR 阻害が生じ、炭素イオン線照射による G2/M チェックポイントの解除が起きたと考えられる。照射 24 時間後では、炭素イオン線照射単独の条件ではまだ G2 期の割合が多いのに対し、VE-821 薬剤処理と併用した条件では未処理のコントロールと近い割合になった(図 4-4)。X 線照射の HeLa 細胞の場合、炭素イオン線と似た挙動を示し、照射 12 時間後の細胞周期は G2 期の割合が増えるが、VE-821 薬剤処理と併用した場合には G2/M チェックポイントが解除され、G2 期の割合が減り G1 期の割合が増えた。照射 24 時間後では、X 線照射単独の条件ではまだ G2 期の割合が多いのに対し、VE-821 薬剤処理と併用した条件では未処理のコントロールと近い割合になった。炭素イオン線と X 線を比較した場合、細胞周期の挙動に大きな差は得られなかった(図 4-4)。

炭素イオン線照射の U2OS 細胞の場合、照射 12 時間後には G2 期の割合が増えるが、HeLa 細胞に比べてその上昇割合は小さくなった。VE-821 薬剤処理と併用した条件では炭素イオン線照射単独の条件と比べて G2 期の割合が減少し G1 期の割合が増加した。照射 24 時間後では、炭素イオン線照射単独の条件ではまだ G2 期の割合が多いのに対し、VE-821 薬剤処理と併用した条件では未処理のコントロールと近い割合になった(図 4-5)。X 線照射の U2OS 細胞の場合、炭素イオン線と似た挙動を示し、照射 12 時間後の細胞周期は G2 期の割合が増えるが、VE-821 薬剤処理と併用した場合には G2 期の割合が減り G1 期の割合が増えた。照射 24 時間後では、X 線照射単独の条件ではまだ G2 期の割合が多いのに対し、VE-821 薬剤処理と併用した条件では未処理のコントロールと近い割合になった。炭素イオン線と X 線を比較した場合、細胞周期の挙動に大きな差は得られなかった(図 4-5)。

炭素イオン線照射の 1BR-hTERT 細胞の場合、HeLa や U2OS 細胞と同様に照射 12 時間後の細胞周期は G2 期の割合が増え、VE-821 薬剤処理を併用した場合、炭素イオン線照射単独の条件と比べて G2 期の割合が減少した。この時 S 期の割合が大きく減少した。照射 24 時間後では、炭素イオン線照射単独の条件ではまだ G2 期の割合が多いが、VE-821 薬剤処理と併用した条件では G1 期が増え、未処理のコントロールよりもその割合は多くなった(図 4-6)。X 線照射の 1BR-hTERT 細胞の場合、炭素イオン線と似た挙動を示した。24 時間後では VE-821 薬剤処理と X 線照射を併用した条件では G1 期の割合が未処理のコントロールより多くなった。炭素イオン線と

X線を比較した場合、細胞周期の挙動に大きな差は得られなかった(図 4-6)。

ATR は DNA の SSB や DNA 複製フォークの進行停止により生じた RPA タンパク質が結合した一本鎖 DNA にリクルートされて活性化する。その後下流の Chk1 をリン酸化し、活性化 Chk1 が下流に働きかけることで G2/M 移行期で細胞周期が止まる。VE-821 は特異的な ATR 阻害剤であり、ATR のタンパク質量には変化しないが、リン酸化の相手である Chk1 のリン酸化を阻害する(Prevo *et al*, 2012)。本研究ではウェスタンブロッティングによる Chk1 のリン酸化を調べていないが、他の文献により VE-821 の Chk1 のリン酸化を抑える効果は報告されている(Reaper *et al*, 2011; Vavrova *et al*, 2013)。炭素イオン線とX線との間に細胞周期解析の差は見られなかったが、これは細胞死という表現型を揃えるために照射線量を変えたためだと考えられる。U2OS、1BR-hTERT 細胞と HeLa 細胞の違いは放射線照射 12 時間後の G1 期の割合である。HeLa 細胞の G1 期の割合が U2OS、1BR-hTERT の割合に比べて少なくなっている。これはがん抑制遺伝子 p53 の発現に関係している。U2OS、1BR-hTERT 細胞は p53 遺伝子が野生型であるため p53 タンパク質は作用し、p53 が関係する G1 チェックポイント機構が働く。G2 期にいる細胞は G2 チェックポイント機構が働いている。HeLa 細胞では p53 タンパク質は作るが E6 タンパク質発現により分解が起きている(Mantovani & Banks, 2001)。そのため G1 期でのチェックポイントが働かず、G1 期の割合が減少したと考えられる。

4.4.2 ATR 阻害により細胞増殖が抑制される

ATR 阻害が炭素イオン線やX線に照射された細胞増殖にどのように影響するかを調べるために、VE-821 処理と DMSO 処理(コントロール)をした細胞数の変化を比較した。放射線を照射しない場合の細胞数も測定し、その結果は HeLa 細胞には VE-821 の影響は観察されなかったが、U2OS 細胞は 5 日に、1BR-hTERT 細胞は 4 日以降に細胞増殖の速度の低下が見られた(図 4-7)。

炭素イオン線照射 24 時間後で比較した場合、全ての細胞株において VE-821 処理群の方が DMSO 処理群に比べて高い細胞数比を示した。VE-821 処理群は DMSO 処理群に比べて HeLa 細胞で 1.35 倍、U2OS 細胞で 1.74 倍、1BR-hTERT 細胞で 1.44 倍となった。HeLa 細胞では、照射 1 日後では細胞数比が多かった VE-821 処理群が照射 3、4 日後に DMSO 処理群と同程度の細胞数比となり、照射 5 日後では逆転し 1.56 倍低い値を示した。U2OS 細胞では、HeLa 細胞と同様に照射 3、4 日後で両条件群の細胞数比は同程度となった。しかし、VE-821 処理群の HeLa 細胞は増殖し続けたのに対し、U2OS 細胞は 2 日後をピークにその後は減少した。1BR-hTERT 細胞では、照射 24 時間後で VE-821 処理群が高い細胞数比を示し、その後は増殖速度が遅くなり、5 日後には DMSO 処理群と同程度の細胞数比となった(図 4-8、図 4-11、図 4-14)。細胞数を測定した時の細胞の顕微鏡画像を示す(図 4-10、図 4-13、図 4-16)。

X線照射 24 時間で比較した場合、炭素イオン線と同様全ての細胞株において VE-821 処理群が DMSO 処理群に比べて高い増殖率を示した。VE-821 処理群は DMSO 処理群に比べて HeLa 細

胞で 1.39 倍、U2OS 細胞で 1.54 倍、1BR-hTERT 細胞で 1.15 倍となった。HeLa 細胞および U2OS 細胞は、VE-821 処理群は照射 3、4 日後で DMSO 処理群と同程度の細胞数比となり、HeLa 細胞は増殖し続けるのに対し、U2OS 細胞は 2 日後をピークにその後は減少した。1BR-hTERT 細胞は、VE-821 処理群は照射 5 日後には DMSO 処理群と同程度の細胞数比となったが、両群の細胞数の差は炭素イオン線照射された細胞の方が大きい値を示した(図 4-9、図 4-12、図 4-15)。

放射線照射 1 日後に測定した細胞数に差が生じた理由は DNA 損傷チェックポイントが働いたかそうでないかである。DMSO 処理の場合は放射線照射時 G1 期にいた細胞は G1/S 移行期に、S 期にいた細胞は S 期に、G2 期にいた細胞は G2/M 移行期のそれぞれのチェックポイントが作用し、最も放射線感受性の高い M 期には修復が完了するまで進行しないようになっている。しかし VE-821 処理により ATR を阻害することで G2/M 期で細胞周期が止まらなくなり、M 期を通じて分裂し G1 期に移行したため、結果的に細胞数が多くなったと考えられる。つまりチェックポイントが機能していないといえる。照射直後の細胞数に比べて 24 時間経つとどの程度細胞が増えているかを調べると、炭素イオン線照射 HeLa 細胞では DMSO 処理 1.81 倍、VE-821 処理 2.43 倍、X 線照射 HeLa 細胞では DMSO 処理 1.45 倍、VE-821 処理 2.02 倍、炭素イオン線照射 U2OS 細胞では DMSO 処理 1.05 倍、VE-821 処理 1.83 倍、X 線照射 U2OS 細胞では DMSO 処理 1.03 倍、VE-821 処理 1.59 倍、炭素イオン線照射 1BR-hTERT 細胞では DMSO 処理 1.09 倍、VE-821 処理 1.58 倍、X 線照射 1BR-hTERT 細胞では DMSO 処理 1.04 倍、VE-821 処理 1.20 倍となり、いずれも VE-821 処理により放射線照射による増殖停止が解除されている結果となった。

U2OS 細胞において照射 2 日後まで VE-821 処理群の方が細胞数の比が上昇し、その後低下していることが分かる。これは無理に分裂することにより細胞に損傷を与え、アポトーシスなどの経路を経て細胞死が起きた結果であると考えられる。4.4.1 で述べたように、U2OS 細胞は p53 タンパク質が機能しているために、p53 を介したアポトーシスが生じているといえる。顕微鏡画像を見ると、DMSO 処理群と VE-821 処理群では観察された細胞形態が異なり、DMSO 処理群では細胞自体が扁平な形態で張り付いているように見えるが、VE-821 処理群では細胞全体が小さく尖っているように見える(図 4-13)。扁平な形態をしている細胞は分裂能力を失っているが生き続けることが出来る老化様細胞増殖停止 SLGA (Senescence-like growth arrest) の状態にあると思われる(Suzuki *et al*, 2001)。

4.4.3 炭素イオン線による DNA 損傷は ATR 阻害により高頻度に小核を誘発する

VE-821 薬剤処理は ATR 阻害により G2 期チェックポイントを解除することから、強制的に M 期へ移行すると考えられる。DNA 修復が完了しないまま細胞分裂に進行すると、正常な染色体分配が行われず、分裂異常を引き起こし、遺伝的毒性を示すことが考えられる。そこで DNA 鎖切断や染色体分裂異常を検出するために小核試験により評価を行った。炭素イオン線および X 線照射した後は、ある程度細胞周期が回り分裂が起きるように 24 時間インキュベータ内で培養させた。小核試験では

細胞分裂した細胞集団で小核の有無を評価するので、1細胞に2核存在する二核細胞のみを計測に使用した(Fenech, 2007)。

1個の二核細胞当たりの小核数を図4-17に示す。炭素イオン線1Gyを照射した場合、DMSO処理では1個の二核細胞当たり平均1.44個の小核が確認された。一方、ATRを阻害した条件では、1個の二核細胞当たりの平均3.36個の小核が確認され、約2.3倍多い小核が確認された。X線1Gyおよび2Gyを照射した場合、DMSO処理では1個の二核細胞当たりそれぞれ平均0.61個、1.32個の小核が確認された。一方、ATRを阻害した条件では、1個の二核細胞当たりのそれぞれ平均1.38個、2.44個の小核が確認され、約2.4倍および1.9倍多い小核が確認された。DMSO処理の炭素イオン線1GyとX線2Gyの小核数が近く、X線1Gyが炭素線1Gyの約半分の小核数であることから、小核数は線量に依存的であり、炭素イオン線の相対的な生物効果は2前後であるといえる。DMSO処理の小核数が同じ炭素イオン線1GyとX線2Gyの場合を、ATRを阻害すると炭素イオン線の方がより多くの小核を生成した。これは図4-18の横軸に小核の個数、縦軸にその頻度をとったヒストグラムからも読み取れる。ATRを阻害することにより1細胞に出来る小核の数が上昇している。炭素イオン線照射でATR阻害した場合は最大で1細胞中に11個の小核が確認された。X線2Gyの場合は最大9個の小核が4回確認されたが、炭素イオン線では9個が15回、10個が2回、11個が4回確認された。一つの核であっても遺伝情報を失うことになるが、複数の小核が生成するとかなり遺伝毒性が大きいといえる。これらの分裂中の異常は分裂カタストロフィ(Mitotic catastrophe)と呼ばれる(Vakifahmetoglu *et al*, 2008; Vitale *et al*, 2011)。X線より炭素イオン線はLETが大きく複雑なクラスターDNA損傷を引き起こすので、損傷の質が小核の数に影響を及ぼしている可能性がある。

4.4.4 ATR阻害は細胞生存率を低下させる

VE-821薬剤によるATR阻害が放射線増感にどう作用するか、また低LETと高LET放射線で差が生じるかどうかを調べるために、コロニー形成法を用いて細胞生存率曲線による評価を行った。全ての細胞株は放射線照射1時間前からVE-821(1 μM)薬剤処理を行い、照射8時間後と24時間後に細胞を播き直しコロニーを形成させた。細胞をディッシュに播いた後の培地には薬剤は除かれている。

放射線照射後8時間で細胞を播いた条件では、合計9時間のVE-821が処理されていることになる。これらの条件では、HeLa細胞は炭素イオン線およびX線において細胞生存率の低下が見られ放射線増感効果が確認された(図4-19)。炭素イオン線のRBEはDMSO処理のD₁₀値で計算して2.05であった。一方、U2OS細胞および1BR-hTERT細胞ではATR阻害の有無での細胞生存率の低下はほとんど見られなかった(図4-20、図4-21)。炭素イオン線のRBEは同様に計算して、それぞれ2.31および1.71であった。D₁₀値での増感比SERを計算すると、HeLaの炭素イオン線SERは1.36、X線SERは1.21、U2OSの炭素イオン線SERは1.29、X線SERは1.17、1BR-hTERTの炭素イオン線SERは1.13、X線SERは1.10であった。

放射線照射後 24 時間で細胞を播いた条件では、合計 25 時間の VE-821 が処理されていることになる。これらの条件では、HeLa 細胞と U2OS 細胞のがん細胞においてどちらの放射線でも細胞生存率の低下が見られ放射線増感効果が確認された(図 4-22、図 4-23)。炭素イオン線の RBE は DMSO 処理の D₁₀ 値で計算してそれぞれ 2.54 と 2.45 であった。一方、1BR-hTERT 細胞では ATR 阻害の有無での細胞生存率の低下はがん細胞の低下分と比べてかなり小さかった。炭素イオン線の RBE は同様に計算して 1.85 であった。D₁₀ 値での増感比 SER を計算すると、HeLa の炭素イオン線 SER は 1.74、X 線 SER は 1.93、U2OS の炭素イオン線 SER は 1.72、X 線 SER は 1.78、1BR-hTERT の炭素イオン線 SER は 1.23、X 線 SER は 1.09 であった。

本実験では ATR 阻害剤として VE-821 を用いた。VE-821 は特異的な ATR 阻害剤であり、近年では低 LET 放射線の γ 線や抗がん剤のゲムシタビン(Gemcitabine)での膵臓がん細胞に対する増感作用が報告されている(Prevo *et al*, 2012)。また 3D スフェロイドを用いて放射線抵抗性である低酸素状態にも効果があることや ATR と低酸素誘導因子 HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) の関係が報告されている (Pires *et al*, 2012)。他には VE-821 を用いて白血病細胞 HL-60 と γ 線を用いた放射線増感の研究や (Vavrova *et al*, 2013)、*in vivo* の膵臓がん細胞移植モデルを用いた VE-821 と類似体の VE-822 と放射線または抗がん剤の増感作用の報告がある (Fokas *et al*, 2012)。我々は主に重粒子線の一つ炭素イオン線を用いて X 線と比較しながら ATR 阻害の効果の検討を行った。重粒子線照射による細胞応答は X 線が γ 線の反応とは異なると考えている。なぜなら局所的な高密度の電離に起因する複雑なクラスター DNA 損傷が生じるからである。この DNA 損傷は修復経路にも影響を与え、例えば NHEJ 経路で Ku 修復タンパク因子が複雑な DNA 切断末端には結合しにくいという報告 (Wang *et al*, 2008)があり、NHEJ 経路での修復確率が減って HR 経路を選択している可能性がある。また、重粒子線照射後の RPA や Rad51 タンパク質の集積の結果から、X 線照射後の挙動とは異なることを報告している(Shibata *et al*, 2011)。また我々は複雑な DNA 損傷がより効率良く DNA 末端リセクションを引き起こすことを報告し(Yajima *et al*, 2013)、このことは約七割から八割が NHEJ で修復されるといわれている低 LET 放射線による傷とは質的に異なることを示している。ATR 阻害による低 LET での放射線増感作用はすでに報告があるため、本実験での HeLa や U2OS 細胞の X 線増感作用は予想していた結果である。また炭素イオン線の放射線増感効果の確認は期待通りであった。しかし、低 LET と高 LET 放射線で比べた時に炭素イオン線の方がより大きな増感率(SER)になるだろうと思っていたが、実際は放射線照射後細胞を播くタイミングにより異なった。8 時間条件の SER は、HeLa 細胞では(X 線 1.21→炭素イオン線 1.36)、U2OS 細胞では(1.17→1.29)というような高 LET 放射線の方が増感効果が高くなった。一方 24 時間では逆転し HeLa 細胞では(1.93→1.74)、U2OS 細胞では(1.78→1.72)というような高 LET 放射線の方が増感効果が低くなった。これは照射後の薬剤処理が長い方が ATR 阻害の効果が表れるが、高低 LET 間の増感率は小さくなるといえる。この結果から LET の大きさに依らず放射線による DNA の損傷は G2/M チェックポイントによる細胞周期を停止させ、長い時間 ATR 活性を阻害し周期を再開させることにより分裂異常が生じ細胞生存率が低下する。しかし DNA 損傷が起きてから初期の段階では高 LET 照射のがん細胞に ATR 阻害の効果が大きいといえる。

4.5まとめ

VE-821 薬剤を用いて ATR リン酸化酵素を阻害すると、放射線の DNA 損傷に応答した G2/M チェックポイントが強制的に解除されるため、M 期に進行して細胞分裂を起こす。DNA 損傷が修復されないまま細胞分裂を起こすと分裂異常を起こし細胞死に至ると考えられる。細胞増殖曲線における照射 24 時間後の細胞数の比や、細胞周期解析における G2 期の割合の減少の結果から、ATR 活性が阻害され細胞周期に変化が起きていることが確認され、そして一つの細胞に複数の小核の発生し、細胞生存率曲線を低下させた結果から、分裂異常が細胞死を導いていることを示している。本実験で用いた ATR 阻害剤 VE-821 はがん細胞では大きな放射線増感効果を示したが、正常細胞ではほとんど確認されなかった。これはがん治療において最も重要な因子の一つである。またがん細胞の中でも p53(-)の HeLa 細胞において大きな放射線増感効果が見られたことも、多くのがんが p53(-)である事実(Soussi *et al*, 2000)から考察して利点といえる。いくつかの chk1 阻害剤が開発され前臨床や臨床試験で使用されているが(Thompson & Eastman, 2013)、高 LET とこれらの chk1 阻害剤の組み合わせの検討が期待される。ATM が放射線に関して高感受性であることはよく知られているが、薬剤を用いた研究において ATM 阻害より ATR 阻害の方がより高い細胞致死効果を示している結果は興味深い (Gamper *et al*, 2013)。本研究において、全ての条件で高 LET の方が低 LET 放射線よりも ATR 阻害効果が大きいという結果にはならず薬剤処理時間によって変わるという結果となったが、これまで示されていない高 LET 放射線と ATR の関係を示し放射線増感効果を確かめることができた。

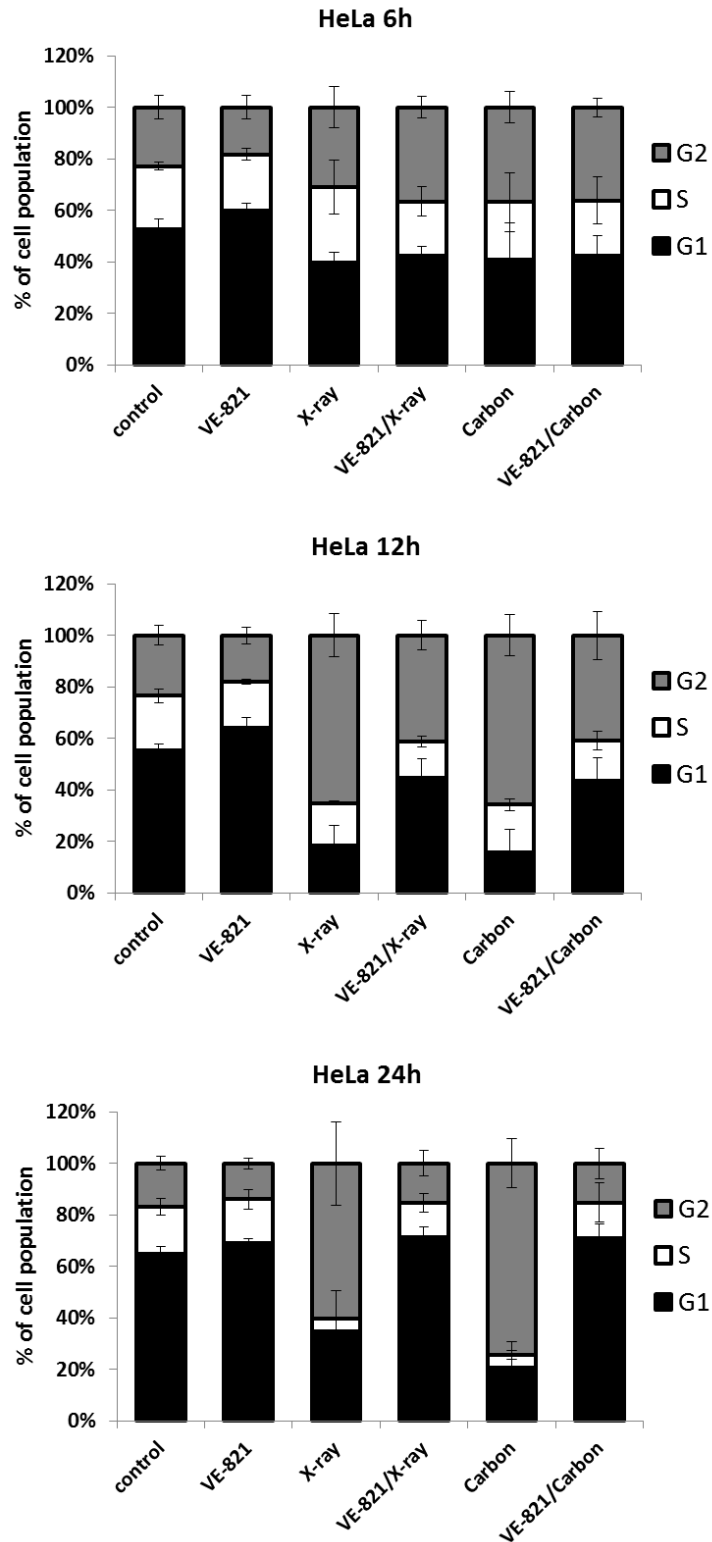


図 4-4 炭素イオン線および X 線照射時の HeLa 細胞の細胞周期

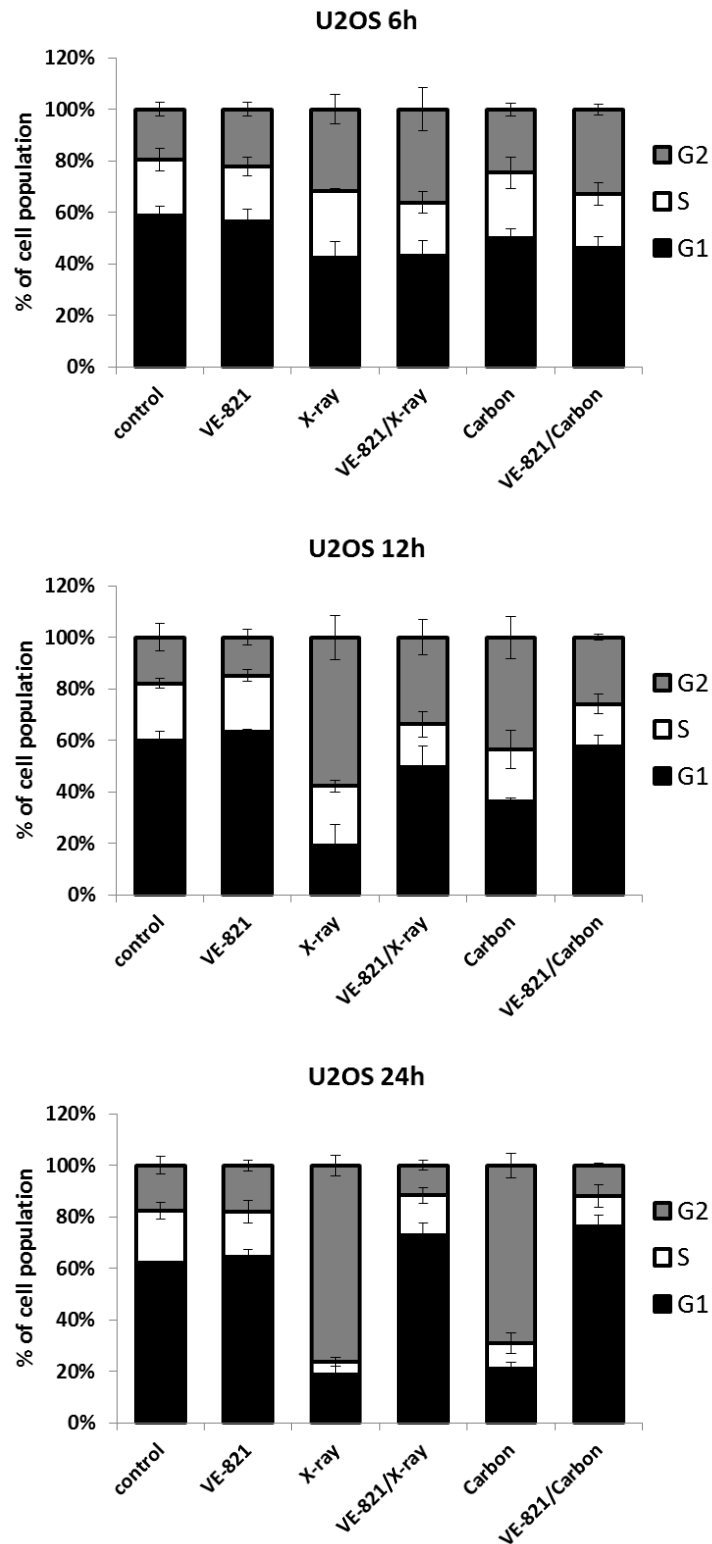


図 4-5 炭素イオン線および X 線照射時の U2OS 細胞の細胞周期

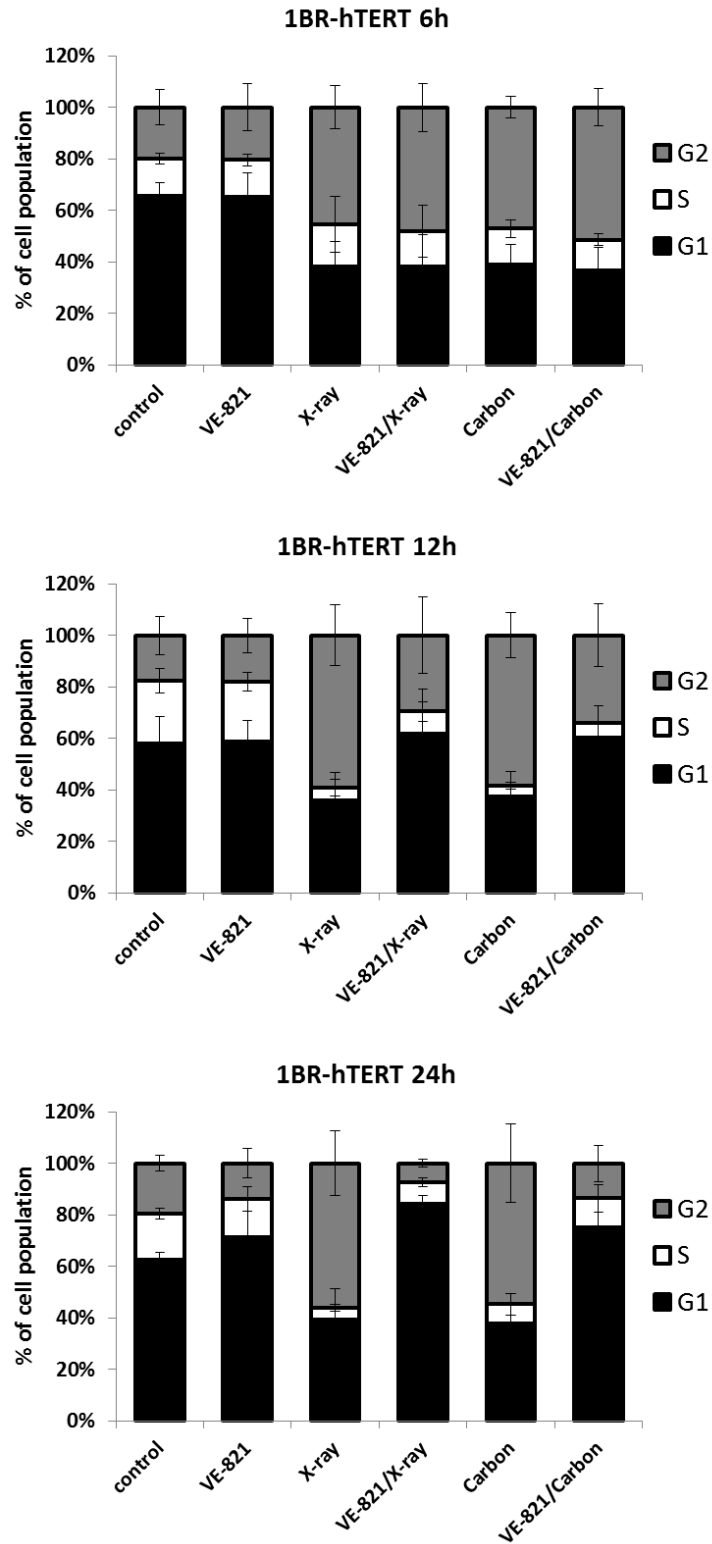


図 4-6 炭素イオン線および X 線照射時の 1BR-hTERT 細胞の細胞周期

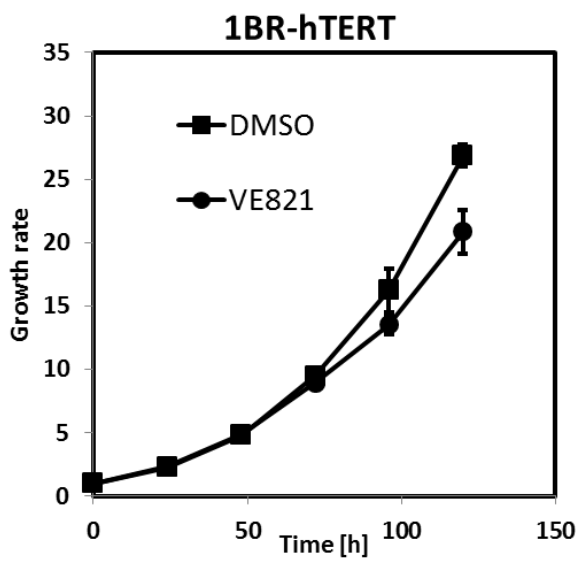
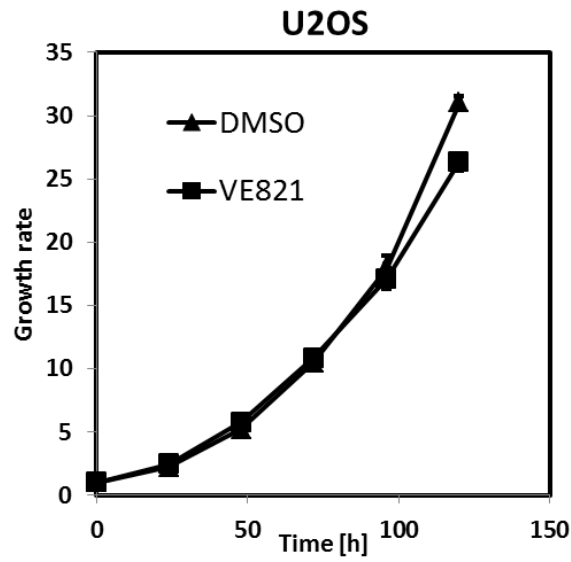
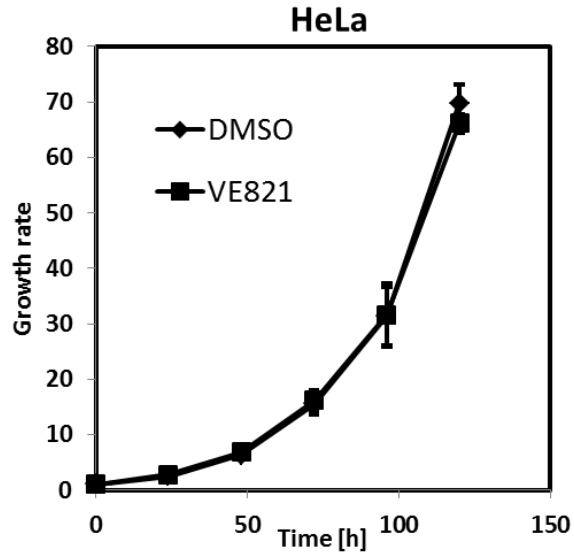


図 4-7 薬剤処理のみ(未照射時)の細胞成長曲線

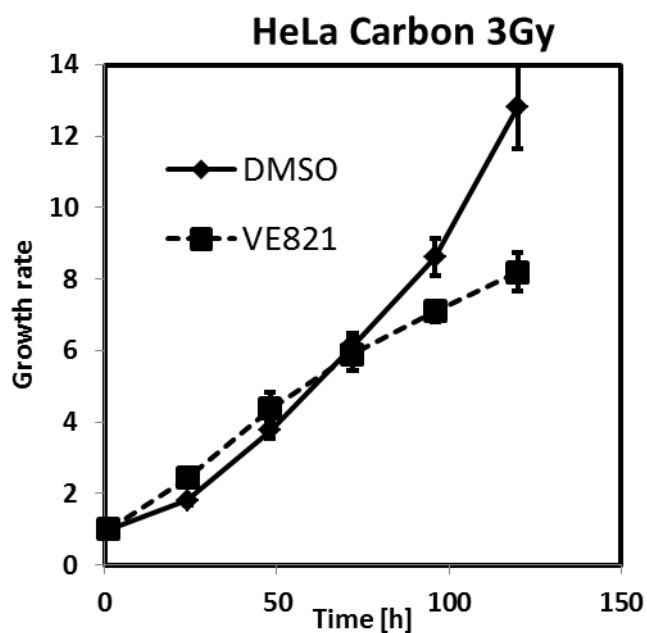


図 4-8 炭素イオン線 3Gy 照射後の HeLa 細胞成長曲線

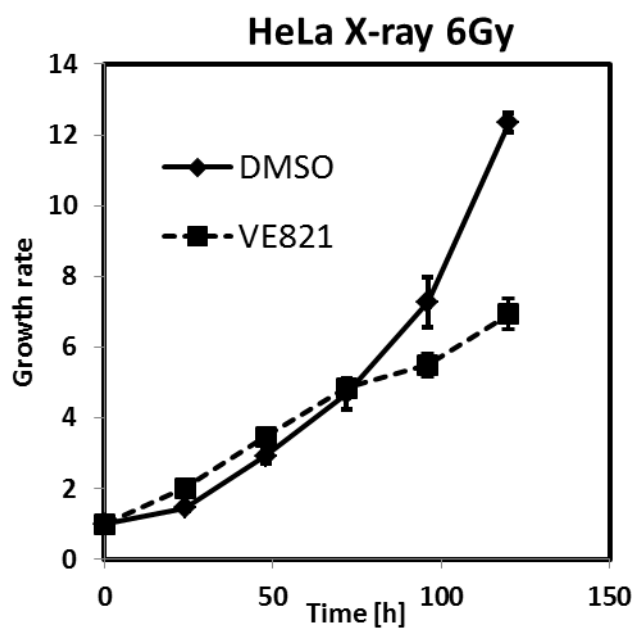


図 4-9 X線 6Gy 照射後の HeLa 細胞成長曲線

HeLa, Carbon 3Gy

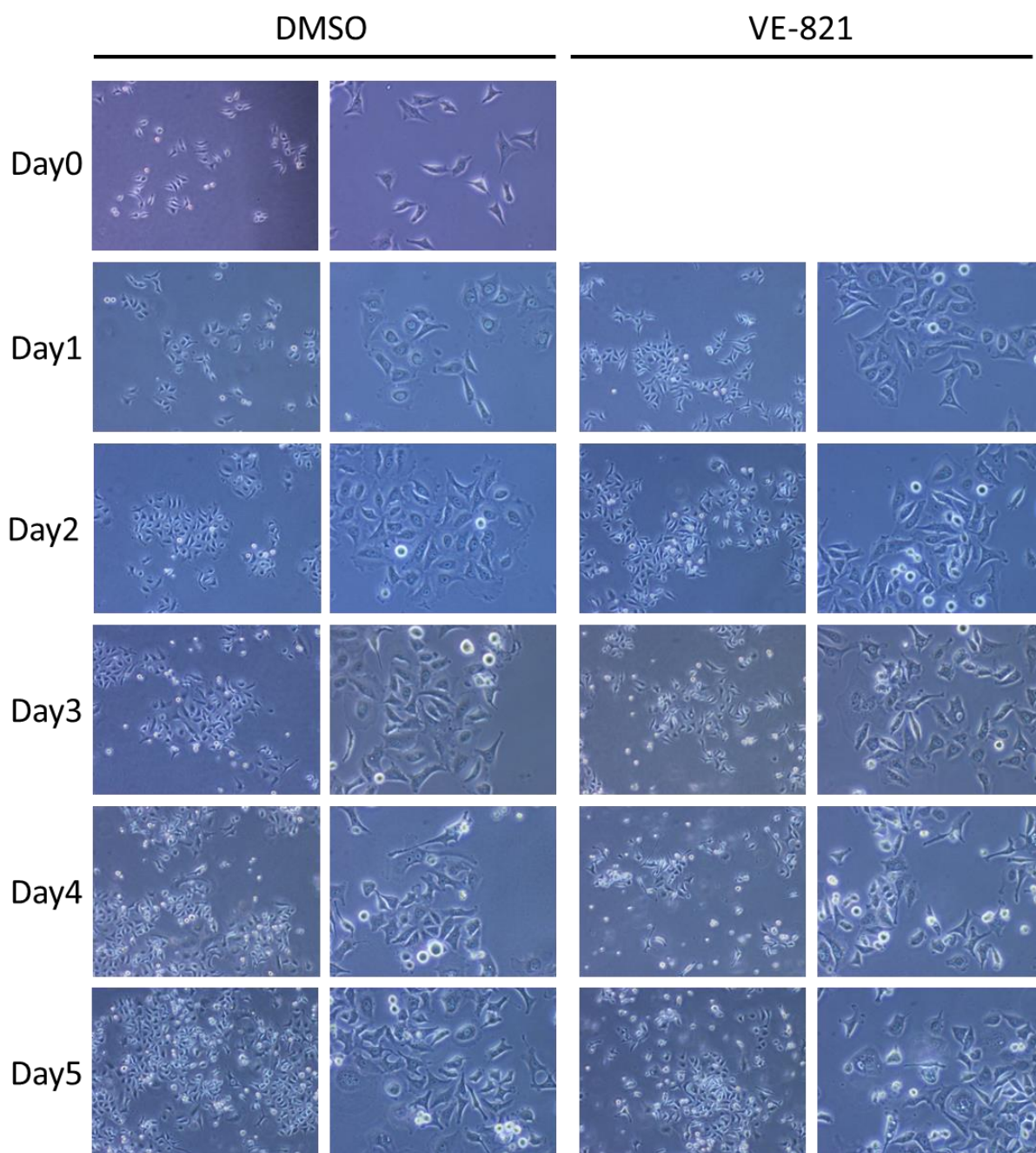


図 4-10 炭素イオン線 3Gy 照射後 5 日までの HeLa 細胞の観察

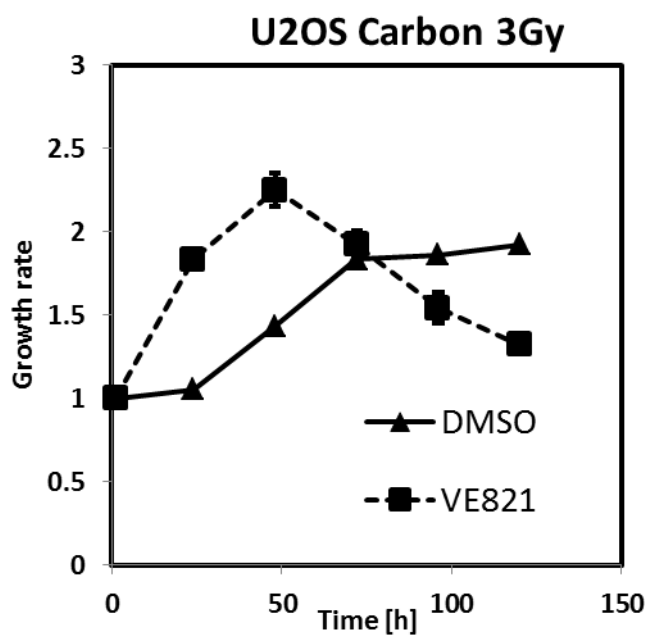


図 4-11 炭素イオン線 3Gy 照射後の U2OS 細胞成長曲線

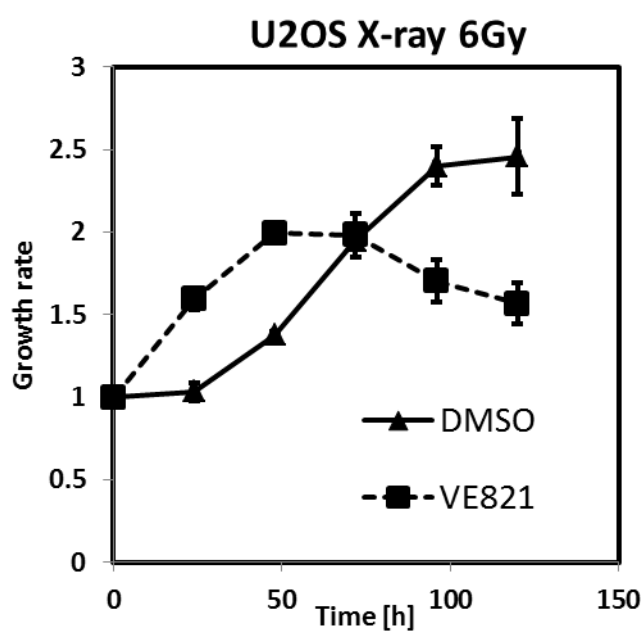


図 4-12 X線 6Gy 照射後の U2OS 細胞成長曲線

U2OS, Carbon 3Gy

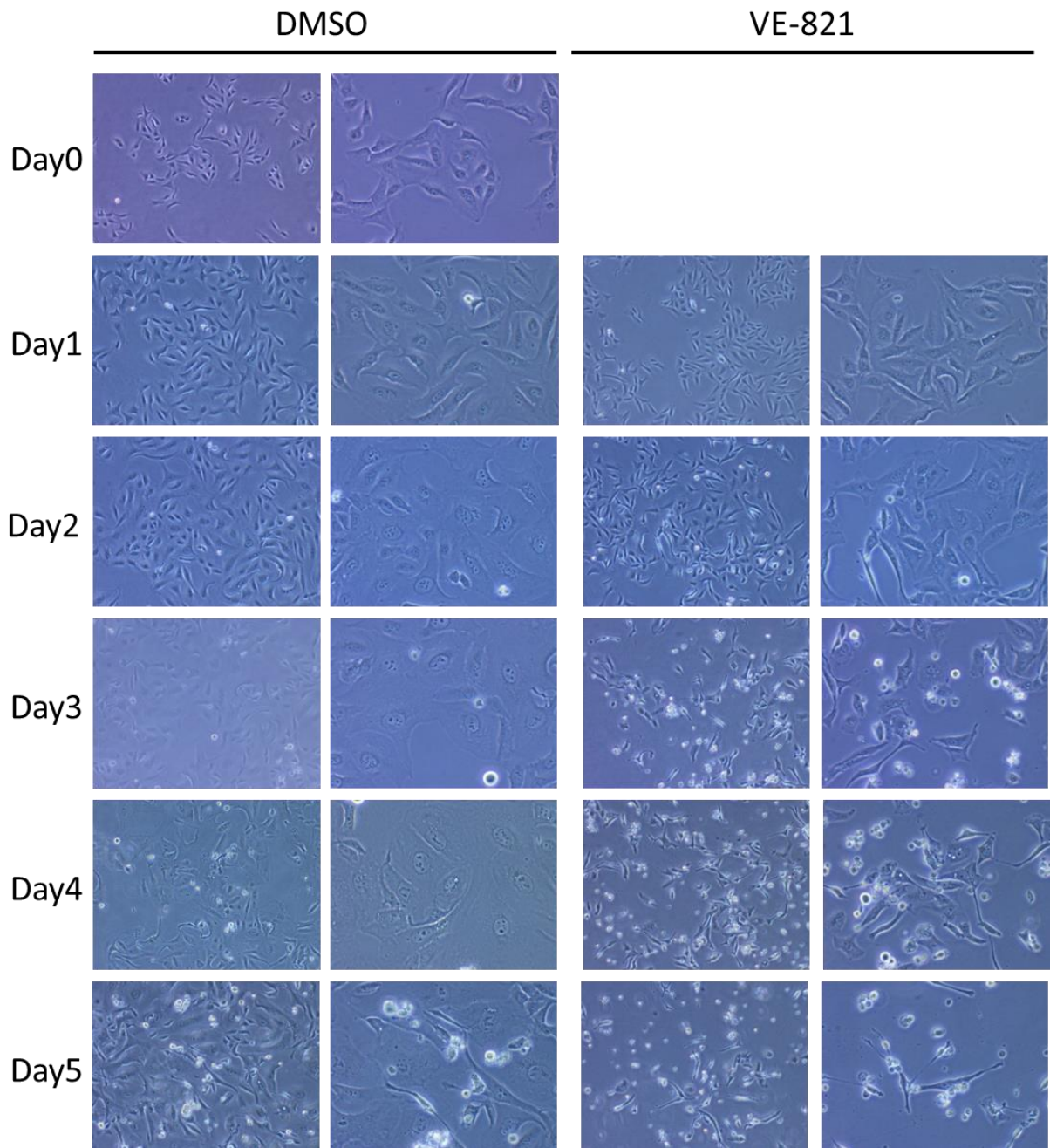


図 4-13 炭素イオン線 3Gy 照射後 5 日までの U2OS 細胞の観察

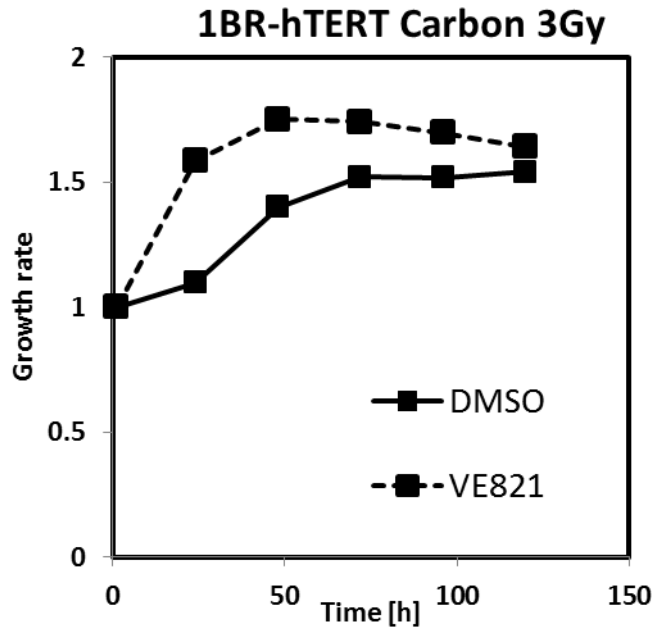


図 4-14 炭素イオン線 3Gy 照射後の 1BR-hTERT 細胞成長曲線

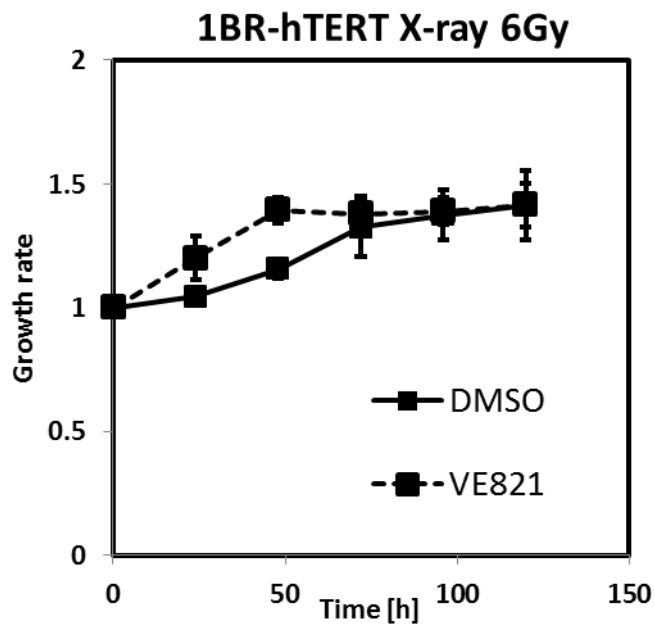


図 4-15 X線 6Gy 照射後の 1BR-hTERT 細胞成長曲線

1BR-hTERT, Carbon 3Gy

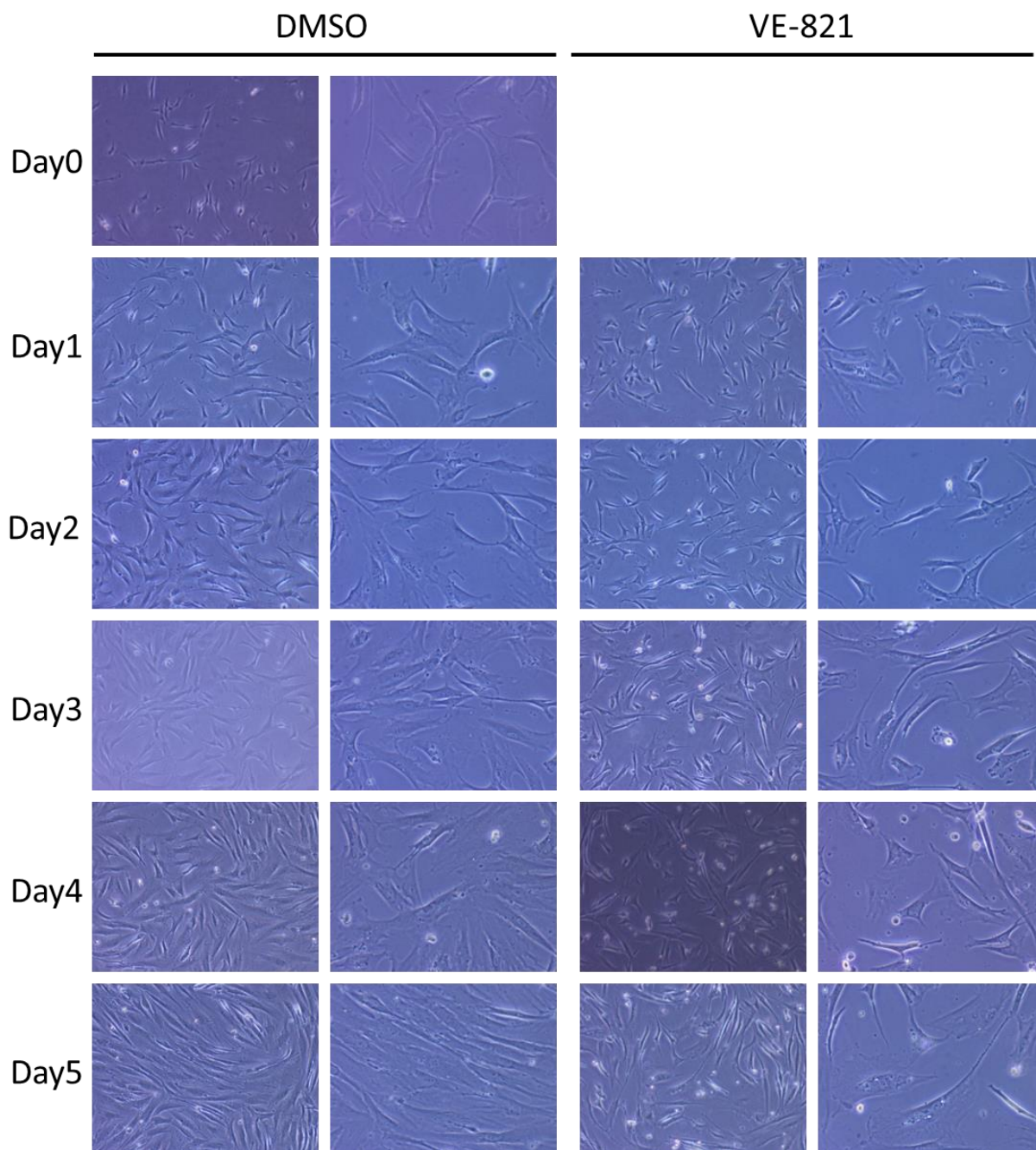


図 4-16 炭素イオン線 3Gy 照射後 5 日までの 1BR-hTERT 細胞の観察

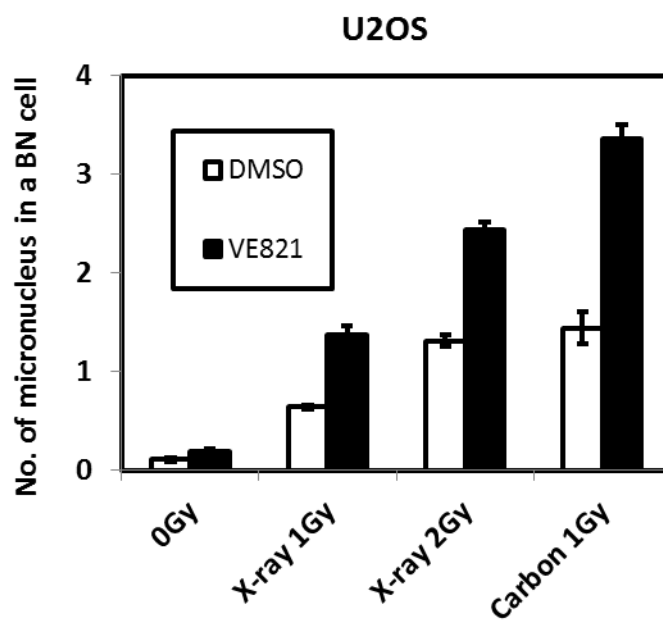
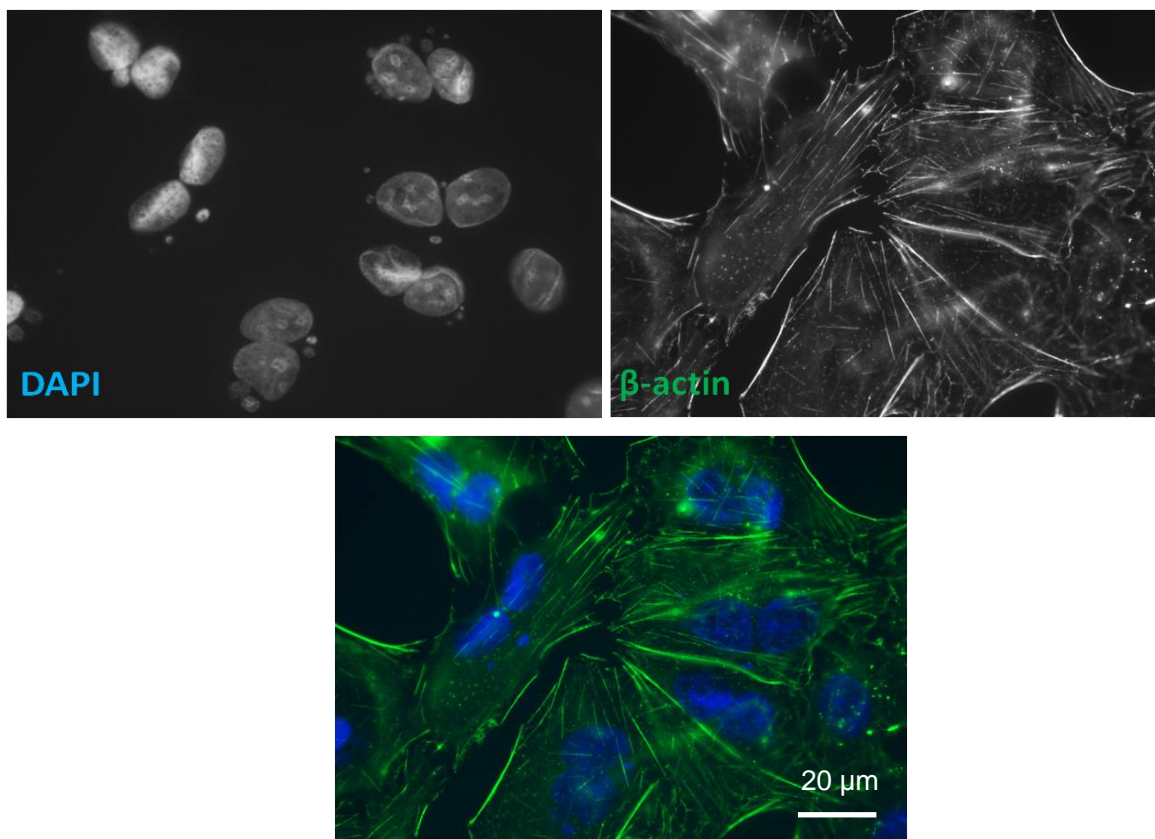


図 4-17 小核形成法による炭素イオン線およびX線照射 24 時間後の小核数

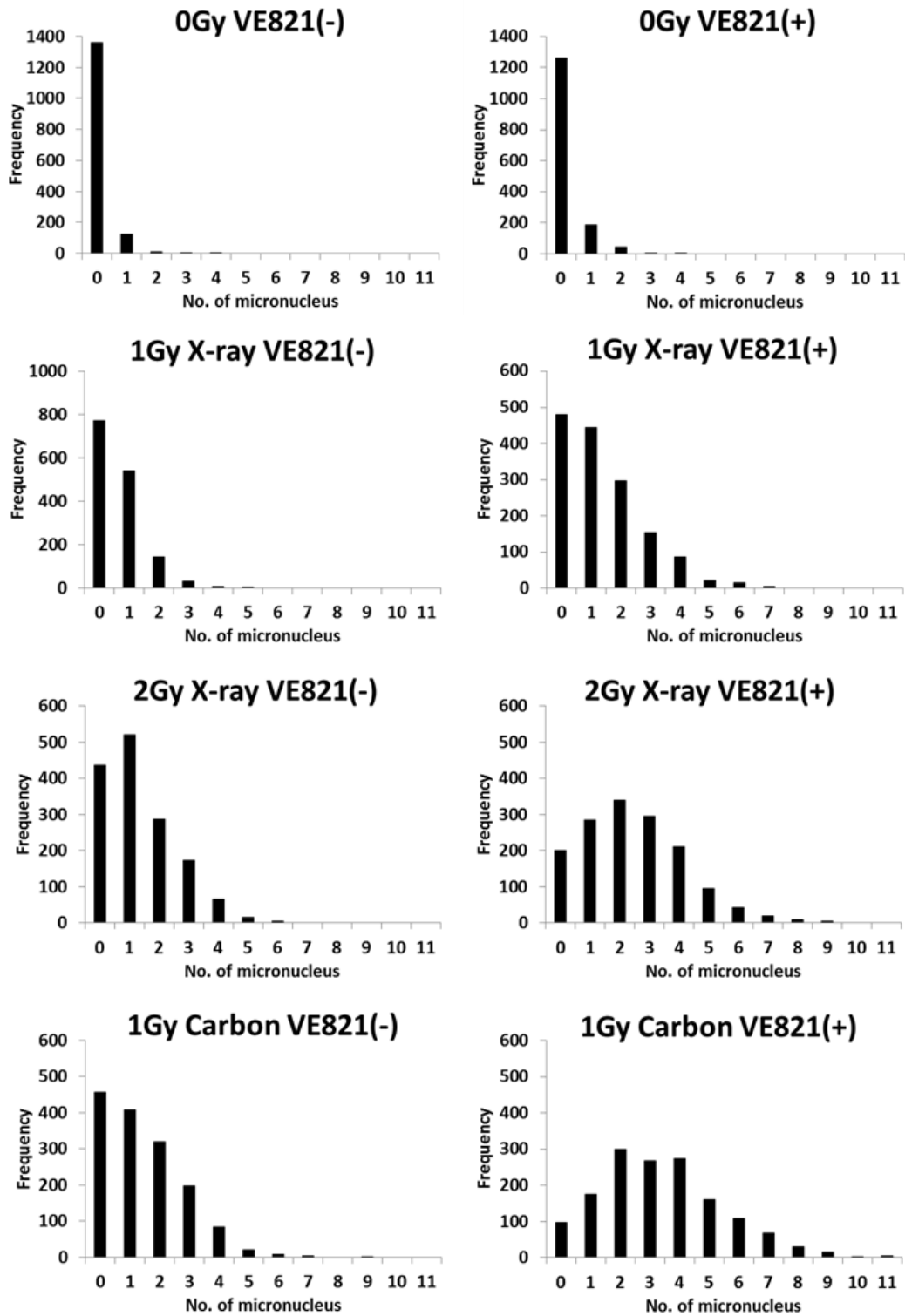


図 4-18 炭素イオン線およびX線照射 24 時間後の小核数のヒストグラム

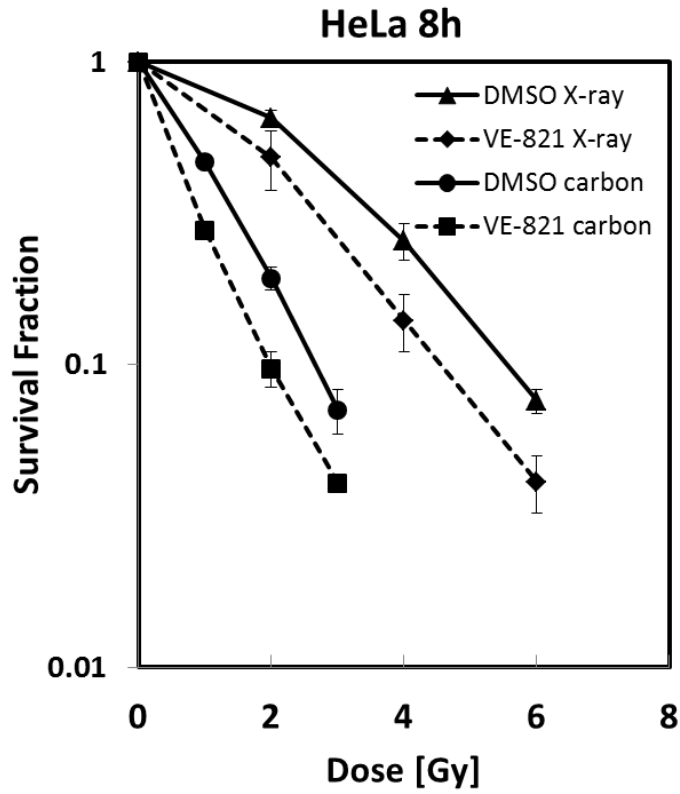


図 4-19 照射後 VE-821 を 8 時間処理した HeLa 細胞生存率曲線

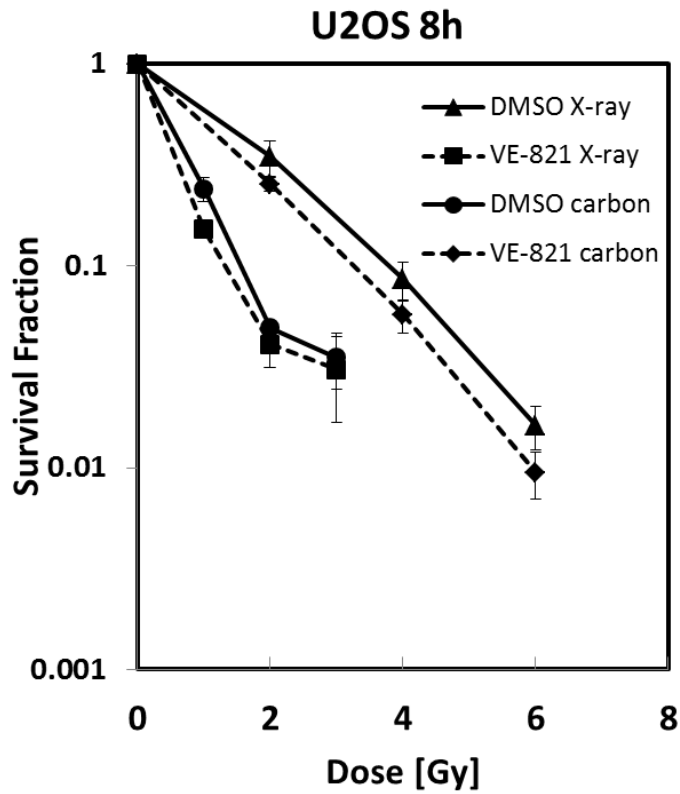


図 4-20 照射後 VE-821 を 8 時間処理した U2OS 細胞生存率曲線

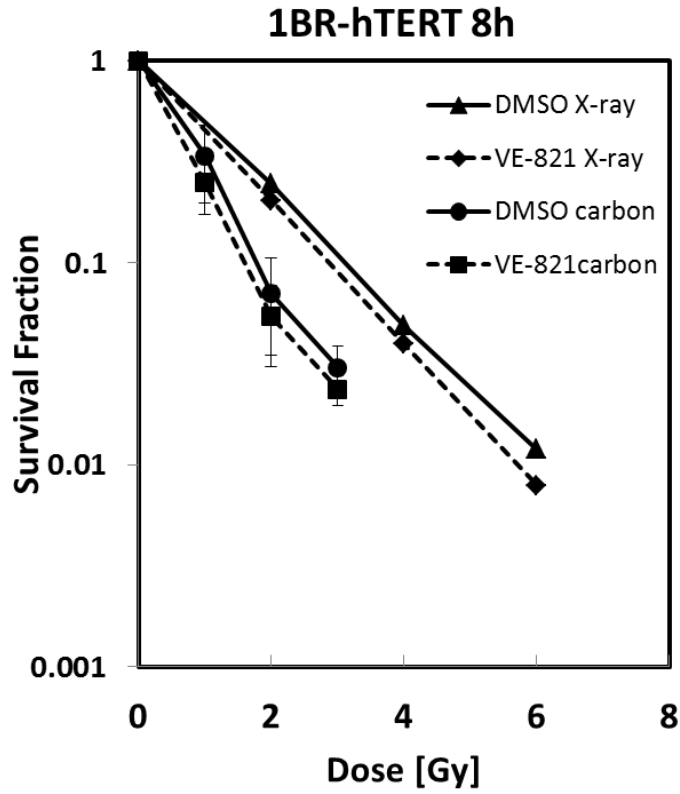


図 4-21 照射後 VE-821 を 8 時間処理した 1BR-hTERT 細胞生存率曲線

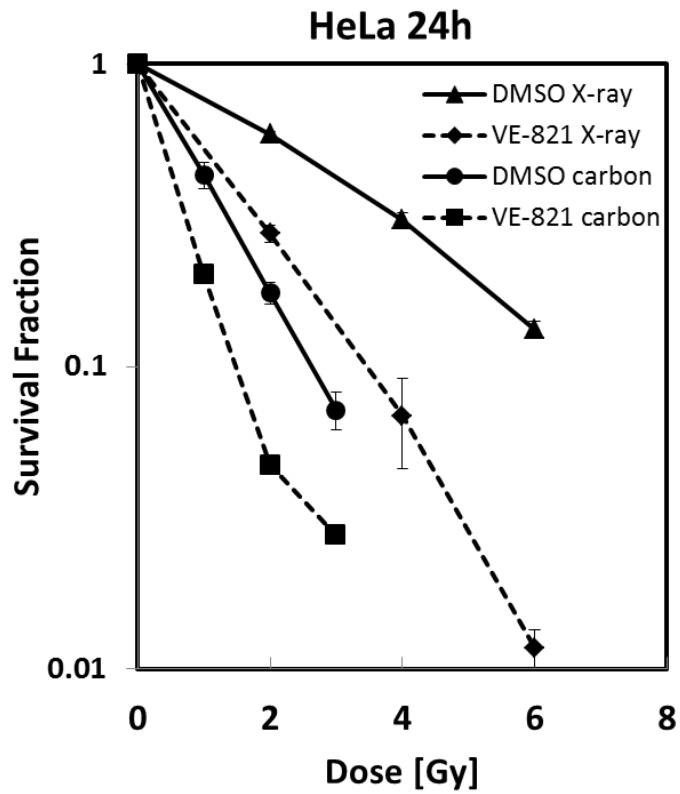


図 4-22 照射後 VE-821 を 24 時間処理した HeLa 細胞生存率曲線

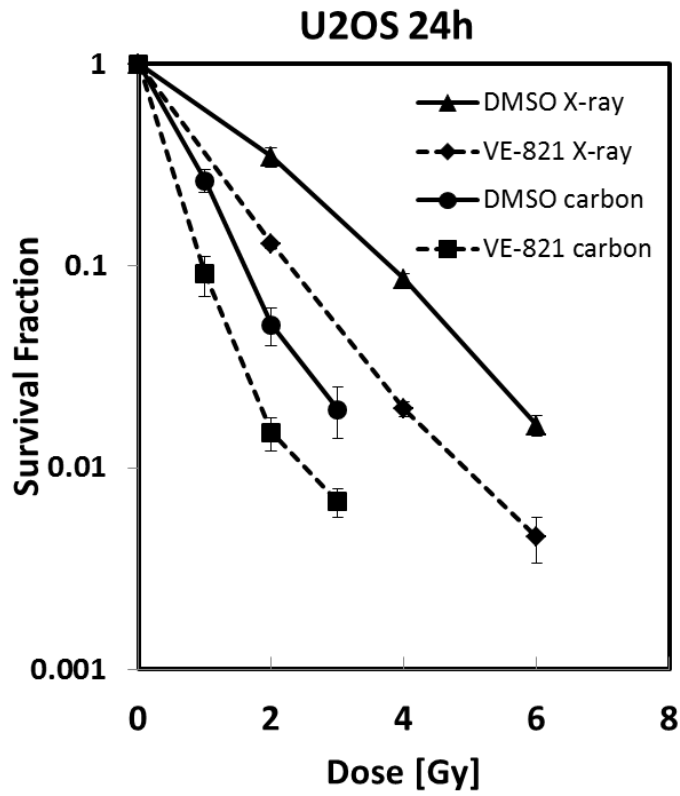


図 4-23 照射後 VE-821 を 24 時間処理した U2OS 細胞生存率曲線

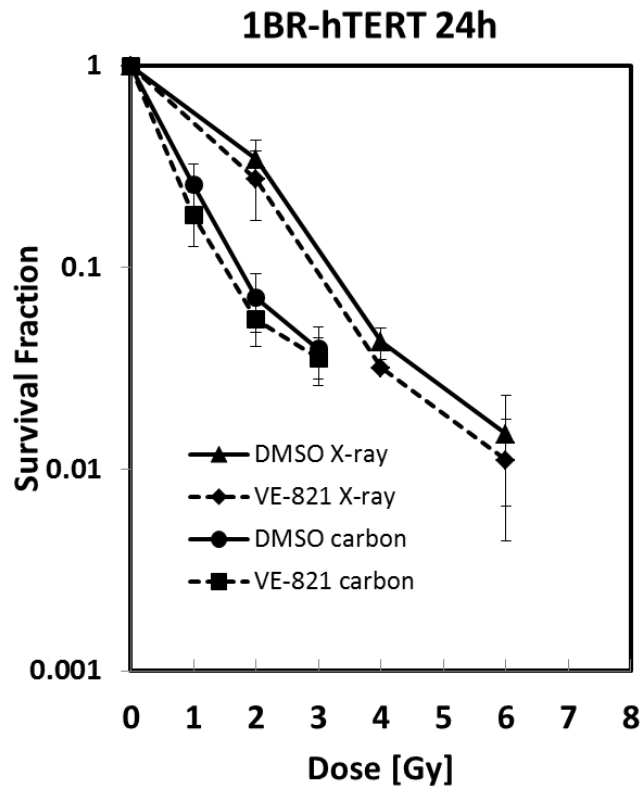


図 4-24 照射後 VE-821 を 24 時間処理した 1BR-hTERT 細胞生存率曲線

第5章 結論

5.1 本研究の総括

本研究では、炭素イオン線に代表される荷電粒子の物理特性である、①優れた体内深部線量分布と②高い生物効果に着目し、放射線治療の発展に貢献することを最大の目的とした。①の深部線量分布の検証では炭素イオンと陽子の二種類の粒子線を使用し、臨床の成績が先行し基礎的なデータが不足している脊索腫細胞についての課題を克服するため、三次元 *in vitro* モデルを用いて炭素イオン線と陽子線を直接比較し脊索腫細胞への効果を示すことを目的とした。②の高い生物効果を生んでいる要因の一つ、高 LET 放射線が DNA 対し複雑な損傷を与えることに着目し、DNA 修復経路選択に重要な CtIP タンパク質の挙動を調べ、修復経路選択メカニズムを明らかにし、さらに複雑な DNA 損傷を引き起こす高 LET 放射線に ATR 阻害が放射線増感効果を示すかどうかを明らかにすることを目的とした。本研究により得られた成果は次の通りである。

第 2 章では、OptiCell 細胞培養システムを積層し三次元 *in vitro* モデルを構築することで、290 MeV/n エネルギーの炭素イオン線と 70 MeV エネルギーの陽子線の深部線量分布に対する細胞生存率の値と取得し、炭素イオン線と陽子線の脊索腫細胞への感受性を臨床に近い *in vitro* な環境で比較することができた。このモデルは高 LET 炭素イオン線を含め他の電荷粒子線や光子線を評価するのにも用いることが可能であり、脊索腫細胞だけでなく他の腫瘍組織でも検証できることを示した。発生率が稀で治療が困難な脊索腫の放射線治療は世界において、重粒子線や陽子線により行われているが、脊索腫細胞に対し炭素イオンが LET と線量に依存した細胞致死効果を持つことを示したことにより、*in vitro* 生物学的観点から炭素イオン線が優れていることを明らかにした。

第 3 章では複雑な DSB に応答して CtIP の新しい挙動を示し、DNA 末端リセクションの始動とこれまでの役割とは異なる可能性を示した。DNA 修復メカニズムを明らかにするためには、修復経路の選択がどのように制御されバランスを保っているのかに関心が置かれており、修復経路を決定している一つの因子「DNA 末端リセクション」、において重要な CtIP の新たな挙動を示したことは、今後の CtIP の研究を推し進めるきっかけとなる。今後注目すべきは CtIP の新たな機能の発見であり、我々はいくつか提案を行った。例えば、CtIP の DSB 末端に生じるリセクションの長さや終点を制御している可能性、CtIP の DSB 末端を繋ぎとめる機能の可能性、CtIP の RPA と Rad51 と置き換わりを制御している可能性など、である。本研究で示した CtIP の新しい挙動は、DNA 末端リセクションの制御や DNA 修復機構を明らかにするための手掛りを示したといえる。

第 4 章では炭素イオン線と特異性のあるリン酸化酵素 ATR の阻害剤を用いて、高 LET 放射線と ATR の関係を細胞周期解析や小核法、細胞生存率を評価することで、放射線増感効果を明らかにした。ATR 阻害剤 VE-821 による放射線誘導 DNA 損傷 G2/M チェックポイントが解除され、強制的に M 期に移行させ、DNA 損傷を持ったまま細胞分裂を引き起こすことで分裂異常による細胞死を導いた。本研究で示したがん細胞で大きな放射線増感効を持ち、正常細胞ではほとんど示さない

増感効果の結果は、がん治療の戦略の最も困難な課題の一つに理想的な答えを示すことができた。全ての結果で複雑な DNA 損傷を引き起こす高 LET 放射線の方が低 LET 放射線よりも ATR 阻害効果が大きい結果は得られていないが、高 LET 放射線に照射されたがん細胞は比較的初期の段階で ATR 阻害が有効なことや、より重篤な分裂異常を引き起こすことを明らかにすることができ、まだ分かっていない高 LET 放射線と ATR の関係をより深める知見を得ることができた。

このように本研究の実施は DNA 修復メカニズムの解明から粒子の線量分布と放射線増感作用までを検討し、高 LET 放射線のがん治療に用いることの有用性を示し、放射線治療の発展に大きく貢献すると考えられる。

5.2 今後の課題と展望

今後の課題として以下のことが挙げられる。

(1)本研究で用いた三次元 *in vitro* モデルは粒子ビームの入り口からブラックピークまでを含むことができるため、実際の臨床で用いられている SOBP での評価が必要である。SOBP の前方と後方では生物効果が異なるという報告があるため、本研究で用いたモデルが活用できる。今回は *in vitro* での検討と行ったが、今後は *in vivo* での評価が必要である。脊索腫細胞 U-CH1-N は倍加時間が約 3 日というオリジナル細胞 U-CH1 の 7 日に比べると短いものの、通常のがん細胞に比べるとまだ長いといえる。マウスを用いて粒子線の増殖抑制効果を調べるためには、腫瘍を作る際に細胞が生体内で接着しやすく増殖しやすい環境を工夫しなければならない。

(2)本研究ではこれまで報告されていない新たな CtIP の挙動を示すことができたが、具体的な CtIP の機能・役割の発見までには至っていない。過去の研究により CtIP のリン酸化部位が示されているので、残されたリン酸化箇所を特定したり、免疫沈降法を用いて CtIP と相互作用するタンパク質を明らかにしたりすることで、CtIP の新しい役割・機能の発見につながるのではないかと考える。

(3)放射線の増感作用を臨床に使用できるように進展させるには、*in vitro* 実験に加えて *in vivo* 実験の結果が必要とされる。VE-821 と似た薬剤の VE-822 を用いた低 LET 放射線の *in vivo* の報告があるので、このプロトコルを参考にして高 LET 放射線でも検討しなければならない。本研究では小核法を用いて分裂カタストロフィを観察したが、複数の小核ができた細胞はどのような細胞死を迎えるのか、またどの種類の細胞死がどの割合で生じるのかを検討し、X 線や γ 線の低 LET と比較することが必要である。

世界中で広く使用されている X 線や γ 線に比べて、重粒子線を加速し研究や治療に使用できる施設はごく限られている。そのため高 LET 放射線の細胞反応、組織反応、人体に対する影響などの知見がまだまだ足りていないといえる。言い換えれば新たな発見の可能性を秘めている。技術の発展と過去に得られた多くの知見と経験を生かして、現在では粒子加速器の小型化や、スポットスキヤニング照射というビームを細くしたまま移動させながら腫瘍を塗りつぶすように照射する方法の開発

が進められている。粒子線治療の保険適応の疾患が増えるとますます粒子線治療が普及すると考えられる。ドラッグデリバリーシステムの研究が進み、既存の抗がん剤や核酸をより効率良くがん組織に届けることができるようになってきている。そのためドラッグデリバリーシステムと放射線の併用による化学放射線療法が今後期待される。炭素イオン線と併用されることを考え、がん細胞特異的な増感剤の研究と DNA 修復メカニズムの解明が進展することが必要である。他方、粒子線の生物反応の研究は放射線防護研究にも繋がり、宇宙開発のために必要な、陽子線、鉄イオン線、炭素イオン線などからの宇宙線被ばくの低減にも貢献することになる。

参考文献

- Akanuma A, Majima H, Furukawa S, Okamoto R, Nakamura YK, Tsunemoto H, Morita S, Arai T, Kurisu A, Hiraoka T, Kawachi K, Kanai T (1982) Compensation techniques in NIRS proton beam radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 8(9): 1629-35
- Ando K, Furusawa Y, Suzuki M, Nojima K, Majima H, Koike S, Aoki M, Shimizu W, Futami Y, Ogino T, Murayama S, Ikeda H (2001) Relative biological effectiveness of the 235 MeV proton beams at the National Cancer Center Hospital East. *J Radiat Res* 42(1): 79-89
- Asaithamby A, Hu B, Chen DJ (2011) Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(20): 8293-8
- Asaithamby A, Uematsu N, Chatterjee A, Story MD, Burma S, Chen DJ (2008) Repair of HZE-particle-induced DNA double-strand breaks in normal human fibroblasts. *Radiation research* 169(4): 437-46
- Azzarelli A, Quagliuolo V, Cerasoli S, Zucali R, Bignami P, Mazzaferro V, Dossena G, Gennari L (1988) Chordoma: natural history and treatment results in 33 cases. *Journal of surgical oncology* 37(3): 185-91
- Bartek J, Lukas J (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current opinion in cell biology* 19(2): 238-45
- Beroud C, Soussi T (2003) The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Human mutation* 21(3): 176-81
- Bhide SA, Nutting CM (2010) Recent advances in radiotherapy. *BMC medicine* 8: 25
- Brandsma I, Gent DC (2012) Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome integrity* 3(1): 9
- Brown EJ, Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & development* 14(4): 397-402
- Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P (2012) Determination of cell

survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. *Radiat Oncol* 7: 1

Casali PG (2007) Chordoma. *Current Opinion in Oncology*

Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* 47(4): 497-510

Chen L, Nievera CJ, Lee AY, Wu X (2008) Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *The Journal of biological chemistry* 283(12): 7713-20

Ciccia A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* 40(2): 179-204

Collins I, Garrett MD (2005) Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Current opinion in pharmacology* 5(4): 366-73

Combs SE, Ellerbrock M, Haberer T, Habermehl D, Hoess A, Jakel O, Jensen A, Klemm S, Munter M, Naumann J, Nikoghosyan A, Oertel S, Parodi K, Rieken S, Debus J (2010) Heidelberg Ion Therapy Center (HIT): Initial clinical experience in the first 80 patients. *Acta oncologica* 49(7): 1132-40

Courdi A, Brassart N, Herault J, Chauvel P (1994) The depth-dependent radiation response of human melanoma cells exposed to 65 MeV protons. *The British journal of radiology* 67(800): 800-4

Duong HS, Le AD, Zhang Q, Messadi DV (2005) A novel 3-dimensional culture system as an in vitro model for studying oral cancer cell invasion. *International journal of experimental pathology* 86(6): 365-74

Durante M, Cucinotta FA (2008) Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nature reviews Cancer* 8(6): 465-72

Durante M, Loeffler JS (2010) Charged particles in radiation oncology. *Nature reviews Clinical oncology* 7(1): 37-43

Eid W, Steger M, El-Shemerly M, Ferretti LP, Pena-Diaz J, Konig C, Valtorta E, Sartori AA, Ferrari S (2010) DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability.

EMBO reports 11(12): 962-8

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation research* 455(1-2): 81-95

Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols* 2(5): 1084-104

Flynn RL, Zou L (2011) ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends in biochemical sciences* 36(3): 133-40

Fokas E, Prevo R, Pollard JR, Reaper PM, Charlton PA, Cornelissen B, Vallis KA, Hammond EM, Olcina MM, Gillies McKenna W, Muschel RJ, Brunner TB (2012) Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell death & disease* 3: e441

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* 1(5): 2315-9

Franken NA, Van Bree CV, Kipp JB, Barendsen GW (1997) Modification of potentially lethal damage in irradiated Chinese hamster V79 cells after incorporation of halogenated pyrimidines. *International journal of radiation biology* 72(1): 101-9

Gamper AM, Rofougaran R, Watkins SC, Greenberger JS, Beumer JH, Bakkenist CJ (2013) ATR kinase activation in G1 phase facilitates the repair of ionizing radiation-induced DNA damage. *Nucleic acids research* 41(22): 10334-44

Genet SC, Maeda J, Fujisawa H, Yurkon CR, Fujii Y, Romero AM, Genik PC, Fujimori A, Kitamura H, Kato TA (2012) Comparison of cellular lethality in DNA repair-proficient or -deficient cell lines resulting from exposure to 70 MeV/n protons or 290 MeV/n carbon ions. *Oncology reports* 28(5): 1591-6

Goodship J, Gill H, Carter J, Jackson A, Splitt M, Wright M (2000) Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22. 1-q24. *American journal of human genetics* 67(2): 498-503

Hall JE, Giaccia JA (2012) Radiobiology for the radiologist, 7th Edition. *Lippincott Williams & Wilkins*

Hallor KH, Staaf J, Jonsson G, Heidenblad M, Vult von Steyern F, Bauer HC, Ijszenga M,

Hogendoorn PC, Mandahl N, Szuhai K, Mertens F (2008) Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. *British journal of cancer* 98(2): 434-42

Helmink BA, Tubbs AT, Dorsett Y, Bednarski JJ, Walker LM, Feng Z, Sharma GG, McKinnon PJ, Zhang J, Bassing CH, Sleckman BP (2011) H2AX prevents CtIP-mediated DNA end resection and aberrant repair in G1-phase lymphocytes. *Nature* 469(7329): 245-9

Henderson FC, McCool K, Seigle J, Jean W, Harter W, Gagnon GJ (2009) Treatment of chordomas with CyberKnife: georgetown university experience and treatment recommendations. *Neurosurgery* 64(2 Suppl): A44-53

Hiraoka T, Hoshino K, Fukumura A, Kawashima K (1990) Dosimetry of 70 MeV proton beams from the NIRS cyclotron. *Medical dosimetry : official journal of the American Association of Medical Dosimetrists* 15(2): 79-81

Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A, Jackson SP (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455(7213): 689-92

Huertas P, Jackson SP (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of biological chemistry* 284(14): 9558-65

Hussain SP, Harris CC (1998) Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer research* 58(18): 4023-37

Imai R, Kamada T, Sugahara S, Tsuji H, Tsujii H (2011) Carbon ion radiotherapy for sacral chordoma. *The British journal of radiology* 84 Spec No 1: S48-54

Imai R, Kamada T, Tsuji H, Sugawara S, Serizawa I, Tsujii H, Tatezaki S (2010) Effect of carbon ion radiotherapy for sacral chordoma: results of Phase I-II and Phase II clinical trials. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 77(5): 1470-6

Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461(7267): 1071-8

Jingu K, Tsujii H, Mizoe JE, Hasegawa A, Bessho H, Takagi R, Morikawa T, Tonogi M, Tsuji H, Kamada T, Yamada S, Organizing Committee for the Working Group for Head-and-Neck C (2012) Carbon ion radiation therapy improves the prognosis of unresectable adult bone and soft-tissue

sarcoma of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 82(5): 2125-31

Jinno-Oue A, Shimizu N, Hamada N, Wada S, Tanaka A, Shinagawa M, Ohtsuki T, Mori T, Saha MN, Hoque AS, Islam S, Kogure K, Funayama T, Kobayashi Y, Hoshino H (2010) Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 76(1): 229-41

Kaelin WG, Jr. (2005) The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature reviews Cancer* 5(9): 689-98

Kagawa K, Murakami M, Hishikawa Y, Abe M, Akagi T, Yanou T, Kagiya G, Furusawa Y, Ando K, Nojima K, Aoki M, Kanai T (2002) Preclinical biological assessment of proton and carbon ion beams at Hyogo Ion Beam Medical Center. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 54(3): 928-38

Kamada T, Tsujii H, Tsuji H, Yanagi T, Mizoe JE, Miyamoto T, Kato H, Yamada S, Morita S, Yoshikawa K, Kandatsu S, Tateishi A, Working Group for the B, Soft Tissue S (2002) Efficacy and safety of carbon ion radiotherapy in bone and soft tissue sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20(22): 4466-71

Kanai T, Endo M, Minohara S, Miyahara N, Koyama-ito H, Tomura H, Matsufuji N, Futami Y, Fukumura A, Hiraoka T, Furusawa Y, Ando K, Suzuki M, Soga F, Kawachi K (1999) Biophysical characteristics of HIMAC clinical irradiation system for heavy-ion radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 44(1): 201-10

Kato TA, Tsuda A, Uesaka M, Fujimori A, Kamada T, Tsujii H, Okayasu R (2011) In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CH1 following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs. *Radiat Oncol* 6: 116

Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature protocols* 4(10): 1513-21

Kuzniacka A, Mertens F, Strombeck B, Wiegant J, Mandahl N (2004) Combined binary ratio labeling fluorescence in situ hybridization analysis of chordoma. *Cancer genetics and cytogenetics* 151(2): 178-81

Lavin MF (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and

cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 9(10): 759-69

Lee JH, Paull TT (2007) Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26(56): 7741-8

Li S, Chen PL, Subramanian T, Chinnadurai G, Tomlinson G, Osborne CK, Sharp ZD, Lee WH (1999) Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 274(16): 11334-8

Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH (2000) Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* 406(6792): 210-5

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews Molecular cell biology* 4(9): 712-20

Lukas J, Lukas C, Bartek J (2004) Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair* 3(8-9): 997-1007

Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical journal* 417(3): 639-50

Mantovani F, Banks L (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20(54): 7874-87

Marx V (2014) Cancer treatment: Sharp shooters. *Nature* 508(7494): 133-8

Matsufuji N, Kanai T, Kanematsu N, Miyamoto T, Baba M, Kamada T, Kato H, Yamada S, Mizoe JE, Tsujii H (2007) Specification of carbon ion dose at the National Institute of Radiological Sciences (NIRS). *Journal of Radiation Research* 48: A81-A86

Medema RH, Macurek L (2012) Checkpoint control and cancer. *Oncogene* 31(21): 2601-13

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Lewis SB, Villaret DB, Mendenhall NP (2005) Skull base chordoma. *Head & neck* 27(2): 159-65

Mukherjee B, Camacho CV, Tomimatsu N, Miller J, Burma S (2008) Modulation of the DNA-damage response to HZE particles by shielding. *DNA repair* 7(10): 1717-30

O'Driscoll M, Jeggo PA (2003) Clinical impact of ATR checkpoint signalling failure in humans. *Cell Cycle* 2(3): 194-5

O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature genetics* 33(4): 497-501

Pines J, Hunter T (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *The Journal of cell biology* 115(1): 1-17

Pires IM, Olcina MM, Anbalagan S, Pollard JR, Reaper PM, Charlton PA, McKenna WG, Hammond EM (2012) Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition. *British journal of cancer* 107(2): 291-9

Prevo R, Fokas E, Reaper PM, Charlton PA, Pollard JR, McKenna WG, Muschel RJ, Brunner TB (2012) The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer biology & therapy* 13(11): 1072-81

Reaper PM, Griffiths MR, Long JM, Charrier JD, McCormick S, Charlton PA, Golec JM, Pollard JR (2011) Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nature chemical biology* 7(7): 428-30

Rydberg B, Cooper B, Cooper PK, Holley WR, Chatterjee A (2005) Dose-dependent misrejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts: experimental and theoretical study for high- and low-LET radiation. *Radiation research* 163(5): 526-34

San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry* 77: 229-57

Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450(7169): 509-14

Schaeper U, Subramanian T, Lim L, Boyd JM, Chinnadurai G (1998) Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. *The Journal of biological chemistry* 273(15): 8549-52

Scheil S, Bruderlein S, Liehr T, Starke H, Herms J, Schulte M, Moller P (2001) Genome-wide

analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. *Genes, chromosomes & cancer* 32(3): 203-11

Schulz-Ertner D, Haberer T, Jakel O, Thilmann C, Kramer M, Enghardt W, Kraft G, Wannemacher M, Debus J (2002) Radiotherapy for chordomas and low-grade chondrosarcomas of the skull base with carbon ions. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 53(1): 36-42

Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Didinger B, Karger CP, Jakel O, Wannemacher M, Debus J (2003a) Treatment planning intercomparison for spinal chordomas using intensity-modulated photon radiation therapy (IMRT) and carbon ions. *Phys Med Biol* 48(16): 2617-31

Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Thilmann C, Haberer T, Jakel O, Karger C, Scholz M, Kraft G, Wannemacher M, Debus J (2003b) Carbon ion radiotherapy for chordomas and low-grade chondrosarcomas of the skull base. Results in 67 patients. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]* 179(9): 598-605

Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Lobrich M, Jeggo PA (2011) Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO journal* 30(6): 1079-92

Shiloh Y, Ziv Y (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews Molecular cell biology* 14(4): 197-210

Smith GC, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development* 13(8): 916-34

Smith R, Smith KA, Biggs CA, Scheck AC (2010) In vitro biological dosimeter modeling of the glioblastoma response to radiation delivered by the Gamma Knife. Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery* 113 Suppl: 222-7

Soussi T (2000) The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 910: 121-37; discussion 137-9

Soussi T, Dehouche K, Beroud C (2000) p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Human mutation* 15(1): 105-13

Steger M, Murina O, Huhn D, Ferretti LP, Walser R, Hanggi K, Lafranchi L, Neugebauer C,

Paliwal S, Janscak P, Gerrits B, Del Sal G, Zerbe O, Sartori AA (2013) Prolyl Isomerase PIN1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair by Counteracting DNA End Resection. *Molecular cell* 50(3): 333-43

Sundaresan N (1986) Chordomas. *Clinical orthopaedics and related research*(204): 135-42

Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 7(10): 739-50

Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, Miyakoda M, Kodama S, Watanabe M (2001) Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiation research* 155(1 Pt 2): 248-253

Takeda S, Nakamura K, Taniguchi Y, Paull TT (2007) Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Molecular cell* 28(3): 351-2

Thompson R, Eastman A (2013) The cancer therapeutic potential of Chk1 inhibitors: how mechanistic studies impact on clinical trial design. *British journal of clinical pharmacology* 76(3): 358-69

Tobias CA, Lyman JT, Chatterjee A, Howard J, Maccabee HD, Raju MR, Smith AR, Sperinde JM, Welch GP (1971) Radiological physics characteristics of the extracted heavy ion beams of the bevatron. *Science* 174(4014): 1131-4

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation* 15(7): 1153-62

Vavrova J, Zarybnicka L, Lukasova E, Rezacova M, Novotna E, Sinkorova Z, Tichy A, Pejchal J, Durisova K (2013) Inhibition of ATR kinase with the selective inhibitor VE-821 results in radiosensitization of cells of promyelocytic leukaemia (HL-60). *Radiation and environmental biophysics* 52(4): 471-9

Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews Molecular cell biology* 12(6): 385-92

Walcott BP, Nahed BV, Mohyeldin A, Coumans JV, Kahle KT, Ferreira MJ (2012) Chordoma: current concepts, management, and future directions. *The lancet oncology* 13(2): e69-76

Wang H, Shi LZ, Wong CC, Han X, Hwang PY, Truong LN, Zhu Q, Shao Z, Chen DJ, Berns MW, Yates JR, 3rd, Chen L, Wu X (2013) The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. *PLoS Genet* 9(2): e1003277

Wang H, Wang X, Zhang P, Wang Y (2008) The Ku-dependent non-homologous end-joining but not other repair pathway is inhibited by high linear energy transfer ionizing radiation. *DNA repair* 7(5): 725-33

Yajima H, Fujisawa H, Nakajima NI, Hirakawa H, Jeggo PA, Okayasu R, Fujimori A (2013) The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. *DNA repair* 12(11): 936-46

You Z, Bailis JM (2010) DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends in cell biology* 20(7): 402-9

You Z, Shi LZ, Zhu Q, Wu P, Zhang YW, Basilio A, Tonnu N, Verma IM, Berns MW, Hunter T (2009) CtIP links DNA double-strand break sensing to resection. *Molecular cell* 36(6): 954-69

Yu X, Fu S, Lai M, Baer R, Chen J (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes & development* 20(13): 1721-6

Yu X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R (1998) The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *The Journal of biological chemistry* 273(39): 25388-92

Yun MH, Hiom K (2009) CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459(7245): 460-3

杉浦紳之, 山西弘城 (2013a) 放射線生物学. *通商産業研究社刊*: 34-35

杉浦紳之, 山西弘城 (2013b) 放射線生物学. *通商産業研究社刊*: 92

謝辞

本研究を行うにあたり、学内外の非常に多くの方々にお世話になりました。このような博士論文をまとめることができたのは、多くの方々からのご指導、ご支援があったからです。心から感謝いたします。

指導教員の上坂充教授には、学術的かつ社会的に何が重要な課題であって、何が必要とされているのがを充分考慮されたうえで、私のこれまでの背景を踏まえて、最も適切なご指導をしていただきました。私の進むべき方向をしっかりと考えてくださり、それに適した環境を整えてくださいました。研究室旅行や食事会など、研究以外での人との交流も重要であることを教えていただきました。上坂研究室で大学院生活を過ごして得た経験と知識は必ず社会に出てからの基礎となり、役に立つと確信しております。心から御礼申し上げます。

助教の藤原先生には、研究室全般に関わる多くのことでお世話になりました。研究室会において、どうすれば相手に分かりやすく言いたい事が伝わるのか、私の発表の仕方やスライドの作り方を指導していただきました。コンピュータネットワークに関してもいろいろお世話になり、藤原先生のご指導で私も少しはネットワークに詳しくなりました。

秘書の関口さんには、博士論文や学振 DC に関する数々の書類のやり取りの際にお世話になりました。書類の提出の仕方やメールのやり取りのマナーなどを教えてくださり、私が社会人になってからも参考にすべきことを多く教えていただきました。

上坂研究室の学生のメンバーにも感謝しています。D2 の Ritu さんは数少ないバイオエンジニアリング専攻の仲間です。私の拙い英語の文章を修正してくださり、また海外発表の練習を助けてくださいました。D1 の砂田さんには研究に関する助言や実験のサポートをしていただきました。夜中の遅い時間に実験をすることもあり、お互い助け合いながら研究を進めることができました。研究室の他のメンバーにも研究室ミーティングの準備や研究室旅行の幹事、食事会の設定など、私の研究生活を有意義なものにしてくださったことに深く感謝いたします。

浅野キャンパス、東海キャンパスの先生方、スタッフの方々にも大変お世話になりましたことを御礼申し上げます。

また、この博士論文をまとめるにあたり、上坂研究室以外の方からも多大なるご支援・ご助言をいただきました。

独立行政法人放射線医学総合研究所の放射線防護研究センターの藤森先生、岡安先生、劉先生、平川先生、重粒子医科学センターの矢島先生、中島先生、赤石澤様、研究基盤センターの北村先生には、大変お世話になりました。私が博士論文の研究を円滑に行えるよう、素晴らしい研究環境を整えていただきました。また学術論文の研究指導や執筆指導をしていただきました。大学とは異なる環境での研究・実験・生活は、私の視野を大きく広げてくれました。海外で長く過ごされた先生方が多いので日本に居ながら海外での研究や生活、大学システムを知ることができました。

アメリカ・コロラド州立大学の加藤宝光先生には、放射線生物学の細胞実験の基礎から研究者の

在り方ついてまで数多くのご指導をしていただきました。これまで計3回の留学先として受け入れてくださいました。短い期間でしたがアメリカでの研究は大変貴重な経験になりました。留学中は多くの仲間ができ、今後も長く付き合っていきたいと感じています。

最後に、仕事を辞めて大学院に進学しようとする私に対し、力強く背中を押し、いつも温かく見守ってくれた両親、兄妹、親族、友人に心から感謝いたします。私がこうして色んな事に挑戦することができるのは、いつでも温かく迎え入れてくれる家族がいて、いつでも変わらない場所に実家という帰れる場所があるからです。これからも温かく見守っていただけたらと思います。

2015年1月

藤澤 寛

本研究に関わる研究業績

【論文発表】

(査読有り)

- **Hiroshi Fujisawa**, Akira Fujimori, Ryuichi Okayasu, Mitsuru Uesaka, Hirohiko Yajima, “Novel characteristics of CtIP at damage-induced foci following the initiation of DNA end resection”, **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2015;771:36-44. (第3章研究)
- **Hiroshi Fujisawa**, Paula C Genik, Hisashi Kitamura, Akira Fujimori, Mitsuru Uesaka and Takamitsu A Kato. "Comparison of human chordoma cell-kill for 290 MeV/n carbon ions versus 70 MeV protons in vitro" **Radiation Oncology**, 2013;8(1):91. (第2章研究)

【国際会議における発表】

(ポスター発表 査読有り ○発表者)

- ○**Hiroshi Fujisawa**, Akira Fujimori, Ryuichi Okayasu, Mitsuru Uesaka, Hirohiko Yajima. “Novel characteristics of CtIP at the site of DNA double-strand breaks following the initiation of DNA end resection” Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology – Genomic Instability and DNA Repair, British Columbia in Canada, March. 2015 (発表予定) (第3章研究)
- ○**Hiroshi Fujisawa**, Nakako Izumi Nakajima, Hirokazu Hirakawa, Hirohiko Yajima, Akira Fujimori, Ryuichi Okayasu, Mitsuru Uesaka. “ATR inhibitor, VE-821 causes heavy ion-induced G2 cell cycle checkpoint abrogation and enhances radiation sensitivity” 60th Annual International Meeting Radiation Research Society, Las Vegas in USA, September. 2014 (第4章研究)

【国内学会・シンポジウム等における発表】

(口頭発表 査読有り ○発表者)

- **藤澤寛**、藤森亮、岡安隆一、上坂充、○矢島浩彦 「DNA 二本鎖切断部位において CtIP は end resection 始動後に興味深い挙動を示す」 第37回日本分子生物学会年次会、横浜、2014年11月 (第3章研究)
- ○**藤澤寛**、藤森亮、岡安隆一、上坂充、矢島浩彦 「DNA 相同組換え修復の末端リセクションにおける CtIP タンパク質フォーカスに関する研究」日本放射線影響学会第57回大会、鹿児島、2014年10月 (第3章研究)

- ○**Hiroshi Fujisawa**, Hirokazu Hirakawa, Mitsuru Uesaka, Ryuichi Okayasu, Akira Fujimori, Hirohiko Yajima, Study of DNA end Resection in Response to Double Strand Breaks、日本放射線影響学会第 56 回大会、青森、2013 年 10 月（第 3 章研究）

（口頭発表 査読無し ○発表者）

- ○**藤澤寛**、平川博一、中島菜花子、矢島浩彦、岡安隆一、藤森亮、上坂充「相同組換え修復に
関与する修復タンパク質の挙動に関する研究」平成 25 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表
会、ホテルポートプラザちば(千葉)、2014 年 4 月（第 4 章研究）
- ○**藤澤寛**、矢島浩彦、藤森亮、上坂充、「相同組換え修復に
関与する修復タンパク質の挙動に関する研究」平成 24 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会、ホテルポートプラザちば(千葉)、
2013 年 4 月（第 4 章研究）

（ポスター発表 査読無し ○発表者）

- ○**藤澤寛**、上坂充「放射線による DNA 損傷修復メカニズムおよび放射線増感効果に関する
研究」バイオエンジニアリング専攻と親しむ会 東京大学 2013 年 12 月 18 日（第 3 章および
4 章研究）
- ○**Hiroshi Fujisawa**, “Study of DNA repair proteins in homologous recombination
repair pathway in response to radiation ” 1st GPLLI Colloquium, Takeda Building,
The University of Tokyo Nov. 2013（第 4 章研究）
- ○**Hiroshi Fujisawa**, Paula C. Genik, Hisashi Kitamura, Akira Fujimori, Mitsuru
Uesaka, Takamitsu A Kato, “Comparison of biological effects among charged ion
particles in human chordoma cell in vitro” 疾患生命工学センター発足 10 周年記念シン
ポジウム、東京大学、2013 年 9 月（第 2 章研究）
- ○**Hiroshi Fujisawa**, Paula C. Genik, Hisashi Kitamura, Akira Fujimori, Mitsuru
Uesaka, Takamitsu A Kato, “Study of biological effects of charged heavy ions and
protons on human chordoma cell-kill in vitro ” 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム、
東京大学、2013 年 6 月（第 2 章研究）

【その他】

- 日本学術振興会特別研究員 DC2
研究課題名:「相同組換え修復における DNA 末端リセクションに関する研究」(第 3 章研究)
- 文部科学省・博士課程教育リーディングプログラムにおける東京大学「ライフイノベーションを先
導するリーダー養成プログラム(GPLLI)」1 期生

本研究以外の研究業績

【論文発表】

(査読有り)

- Junko Maeda, Chuck R. Yurkon, Yoshihiro Fujii, **Hiroshi Fujisawa**, Sayaka Kato, Colleen A. Brents, Mitsuru Uesaka, Akira Fujimori, Hisashi Kitamura, Takamitsu A Kato, “Solution radioactivated by hadron radiation can increase sister chromatid exchanges”, **International Journal of Radiation Oncology, Biology, and Physics (in revision)**
- Junko Maeda, Yoshihiro Fujii, **Hiroshi Fujisawa**, Hirokazu Hirakawa, Ian M. Cartwright, Mitsuru Uesaka, Hisashi Kitamura, Akira Fujimori, Takamitsu A Kato, “The Hyperthermia induced radiosensitization in CHO wild type, NHEJ repair mutant, and HR repair mutant after proton and carbon-ion exposure”, **Oncology Letters (in press)**
- Hirokazu Hirakawa, **Hiroshi Fujisawa**, Aya Masaoka, Miho Noguchi, Ryoichi Hirayama, Momoko Takahashi, Akira Fujimori, Ryuichi Okayasu, “The combination of Hsp90 inhibitor 17AAG and heavy-ion irradiation provides effective tumor control in human lung cancer cells”, **Cancer Medicine** 2015
- Shigeaki Sunada, **Hiroshi Fujisawa**, Ian M. Cartwright, Junko Maeda, Colleen A. Brents, Kazue Mizuno, Yasushi Aizawa, Takamitsu A. Kato, Mitsuru Uesaka, “Monoglucosyl-rutin as a possible radioprotector in mammalian cells”, **Molecular Medicine Reports**, 2014;10(1):10-4.
- Hirohiko Yajima, **Hiroshi Fujisawa**, Nakako Izumi Nakajima, Hirokazu Hirakawa, Penelope A. Jeggo, Ryuichi Okayasu, Akira Fujimori, “The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection” **DNA Repair**, 2013;12(11):936-46.
- Junko Maeda, Charles R Yurkon, **Hiroshi Fujisawa**, Masami Kaneko, Stefan C Genet, Erica J Roybal, William H Hanneman, Douglas H Thamm, Takamitsu A Kato, Ph.D. "Genomic Instability and Telomere Fusion of Canine Osteosarcoma Cells" **PLoS ONE**, 2012;7(8):e43355.
- Stefan C. Genet, Junko Maeda, **Hiroshi Fujisawa**, Charles R. Yurkon. Yoshihiro Fujii, Ashley M. Romero, Paula C. Genik, Akira Fujimori, Hisashi Kitamura, Takamitsu A.

Kato. “Comparison of cellular lethality in DNA repair-proficient or –deficient cell lines resulting from exposure to 70 MeV/n protons or 290 MeV/n carbon ions” **Oncology Reports**, 2012;28(5):1591-6.

【国際会議における発表】

(ポスター発表 査読有り ○発表者)

- ○**Hiroshi Fujisawa**, Kazue Mizuno, Horacio Cabral, Kazuko Toh, Takahiro Nomoto, Yu Matsumoto, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Mitsuru Uesaka. “ Effect of Radiation on Tumor Vascular Permeability and Accumulation of Nano-sized Drugs Toward Chemoradiotherapy” , ICTR-PHE 2012, Geneva in Switzerland, Feb. 2012
- ○**Hiroshi Fujisawa**, Kazue Mizuno, Horacio Cabral, Kazuko Toh, Takahiro Nomoto, Yu Matsumoto, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Mitsuru Uesaka. “ Observation and Analysis of Radiation-Induced Vascular Permeability to Improve the Delivery of Polymeric Micelles by IVRTCLSM” The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems Conference, Hawaii in USA, Dec. 2011

【国内学会・シンポジウム等における発表】

(口頭発表 査読有り ○発表者)

- ○Shigeaki Sunada, Takamitsu Kato, Kazue Mizuno, **Hiroshi Fujisawa**, Mitsuru Uesaka, Yasushi Aizawa, “Antioxidant effect of transglycosylated rutin for irradiated CHO cell”, 第 105 回日本医学物理学会学術大会、パシフィコ横浜会議センター(神奈川)、2013 年 4 月
- ○砂田成章、**藤澤寛**、水野和恵、相澤恭、加藤宝光、上坂充、“糖転移ルチンの正常細胞に対する放射線防護効果の検討”、日本原子力学会 2014 年春の大会、東京都市大学(東京)、2014 年 3 月
- ○矢島浩彦、**藤澤寛**、中島菜花子、平川博一、岡安隆一、藤森亮 「重粒子線治療における癌増感標的としての DNA end resection/HR」 第 15 回癌治療増感研究シンポジウム、奈良市、2013 年 2 月
- ○Kazue Mizuno, **Hiroshi Fujisawa**, Horacio Cabral and Kazunori Kataoka. “SRXRF analysis on the accumulation of DACHPt-loaded polymeric micelles in tumor before and after irradiation” ICTR-PHE 2012, Geneva in Switzerland, Feb. 2012

- ○水野和恵、藤澤寛、西島陽祐、Horacio Cabral、上坂充 「蛍光 X 線を用いた次世代抗がん剤の分析」第 4 回日本原子力学会関東・甲越支部学生研究発表会 芝浦工業大学 2011 年 3 月
- ○水野和恵、藤澤寛、西島陽祐、Horacio Cabral、及川将一、小西輝昭、伊藤友紀、松山成男、石井慶三、上坂充 「蛍光 X 線分析による白金製剤含有高分子ミセルの体内動態解明」日本原子力学会 2011 年春の年会 2011 年 3 月

(口頭発表 査読無し ○発表者)

- ○Hiroshi Fujisawa, Kazue Mizuno, Mitsuru Uesaka “Study on Tumor Vascular Permeability and Accumulation of Nano-drug for Chemoradiotherapy” CMSI student seminar, The University of Tokyo, Jul. 2011

(ポスター発表 査読有り ○発表者)

- ○矢島浩彦、藤澤寛、中島菜花子、平川博一、Jeggio Penny、岡安隆一、藤森亮 「複雑な構造を持つ DNA 二本鎖切断は DNA 末端リセクション反応を促進する」日本放射線影響学会 第 56 回大会、青森市、2013 年 10 月
- ○矢島浩彦、藤澤寛、中島菜花子、平川博一、岡安隆一、藤森亮 「複雑な損傷構造を持つ DNA 二本鎖切断の誘発による DNA 末端の削り込み反応の解析」第 35 回日本分子生物学会年会、福岡市 2012 年 12 月
- ○矢島浩彦、藤澤寛、平川博一、中島菜花子、岡安隆一、藤森亮 「重粒子線による DNA 二本鎖切断が誘発する DNA 末端リセクション」、日本放射線影響学会 第 55 回大会、仙台、2012 年 9 月

(ポスター発表 査読無し ○発表者)

- ○砂田成章、加藤宝光、山下真一、水野和恵、室屋裕佐、藤澤寛、相澤恭、勝村庸介、上坂充、“糖転移ルチンの生体への放射線防護効果の検討”、東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、2013 年 6 月
- ○砂田成章、加藤宝光、山下真一、水野和恵、室屋裕佐、藤澤寛、相澤恭、勝村庸介、上坂充、“糖転移ルチンの生体への放射線防護効果の検討”、日本原子力学会北関東支部若手研究者発表会、東海会館(茨城)、2013 年 4 月
- ○藤澤寛、水野和恵、Horacio Cabral、西山伸宏、片岡一則、上坂充、「放射線によるナノサイズ薬剤の送達効率化に関する研究」第 12 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、2012 年 6 月

○Junko Maeda, Chuck Yurkon, Yoshihiro Fujii, Hiroshi Fujisawa, Sayaka Kato, Hisashi Kitamura, Takamitsu Kato. “Radioactivities in Solution by Particle Radiation can Increase Sister Chromatid Exchanges” US department of energy, Low dose radiation research program, DOE Low Dose Radiation Research Investigators' Workshop, Bethesda MD USA, May 2011

- ○藤澤寛、上坂充 「放射線照射後の血管透過性変化によるナノ薬剤伝達の評価」 バイオエンジニアリング専攻と親しむ会 東京大学 2010年12月9日

【その他】

- 独立行政法人放射線医学総合研究所 平成 23 年度理事長裁量経費における萌芽的研究の採択
研究課題名:「粒子線照射により放射化した水による細胞への影響評価」180 万円 代表者:藤澤寛