

DNA損傷により誘発される 遺伝的不安定性

Induction of genetic instability by DNA damage

漆原 あゆみ 放射場生体分子科学研究グループ



- 細胞への電離放射線照射による遺伝的不安定性誘発の原因を解明するため、微小核細胞融合法を用いてDNA損傷を非照射細胞に移入する研究を行いました。
- DNA損傷を移入した非照射細胞で遺伝的不安定性が誘発されました。
- この結果は、DNA損傷が遺伝的不安定性誘発原因であることを示唆しています。

概要

細胞に対する電離放射線の照射によって引き起こされる遺伝的不安定性は、実際に照射された1世代目の細胞ではなく、細胞分裂後の、数世代～数十世代目の細胞で起こります。そのため、放射線による放射線発がん等の晩発影響に関与すると考えられている現象です。しかし、その誘発機構に関する詳細は未だ明らかにされていません。本研究では、遺伝的不安定性誘発の様々な原因候補の中から、放射線照射により生じるDNA損傷に着目し、DNA損傷が遺伝的不安定性の原因であるかどうかを明らかにする事を目的としました。DNA損傷と遺伝的不安定性誘発との関係を解明するため、DNA損傷を非照射細胞に移入し、染色体の異常を調べました。その結果、DNA損傷を移入した非照射細胞では、移入した照射染色体だけでなく非照射の染色体においても異常な染色体の増加が確認されました。さらに、染色体の形態的な異常だけでなく、染色体数の増加といった数的な異常も起こることが明らかになりました。これらの結果は、DNA損傷が遺伝的不安定性を誘発する事を示唆しています。

1. 研究の背景

電離放射線の細胞への照射は、DNA二重鎖切断(DSBs; Double-Strand Breaks)等の損傷を引き起こします。このような損傷が修復されない、あるいは間違った修復をされると、染色体異常や遺伝子の突然変異となり、細胞死に繋がります。一方、正確に

修復が行われることにより生存した細胞では、このような異常は見られず、放射線非照射細胞と同様の形質を有すると考えられます。しかし、実際には放射線照射後の生存細胞には、非照射細胞と比べて遺伝子突然変異や染色体異常、細胞致死等を高頻度に誘発する事が多数報告されています[1, 2]。その原因として、放射線照射によりゲノム安定性維持機構に乱れが生じる遺伝的不安定性の誘発が示唆されています[3]。放射線により誘発される遺伝的不安定性は、特に放射線発癌の過程で重要な役割を果たしていると考えられている現象です[4]。そのため、遺伝的不安定性の誘発メカニズムを解明することは、発癌予防の面からも大きな期待が寄せられているのですが、その詳細は未解明です。何故なら、電離放射線の細胞照射がもたらす影響は、DNA損傷だけでもDSBsや一重鎖切断、酸化型塩基損傷、脱塩基部位の生成等多岐に亘る上に、タンパク質や細胞内の様々な小器官といったDNA以外にまで広範囲に及ぶため、原因を特定することが非常に困難だからです(図1)。しかし、これまで行われてきた様々な研究により、一般的に遺伝的不安定性の誘発にはDSBsが関与することが示唆されています[5]。しかし、DSBsに対する細胞の監視機構は特に厳しく、稀に1~2回の細胞分裂であれば乗り越えるかもしれませんが、数十回の細胞分裂を乗り越え続けることは不可能です。さらに、細胞が有するDSBs修復機構の一部を欠損する細胞では、より少ないDSBs量でも高い遺伝的不安定性を誘発する事が報告されています[6]。このことから、欠損したDSBs

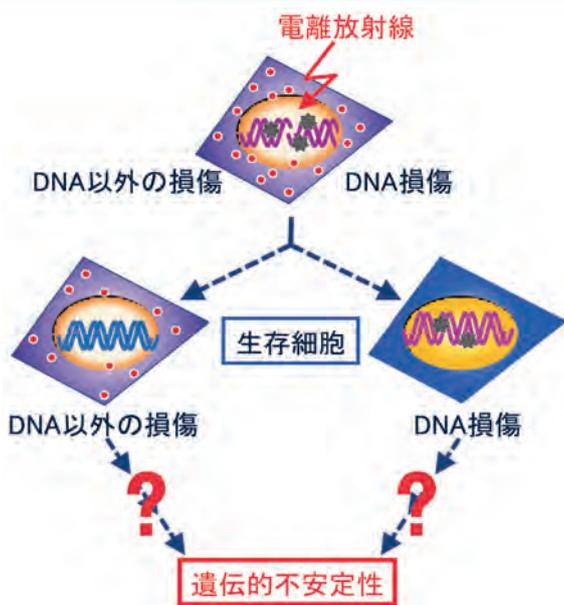


図1 電離放射線の照射による遺伝的不安定性の誘発
電離放射線の照射は細胞に対してDNAだけでなくDNA以外にも何かしらの損傷を与える。生存細胞へのこのような損傷の残存が遺伝的不安定性を誘発すると考えられる。しかし、遺伝的不安定性がDNA損傷か、あるいはDNA以外によって誘発されるのかは不明である。

修復機構を補うための正確性の低い修復が行われ、その結果として生成した非DSBs型の修復産物（非DSBs型DNA損傷）が遺伝的不安定性の誘発原因となっている可能性が考えられます。というのも、非DSBs型DNA損傷は、通常であれば容易に修復されるのですが、中には複数の損傷が近接して存在するクラスターDNA損傷と呼ばれる難修復性の損傷の存在が報告されているからです[7, 8]。

2. 研究の経緯

電離放射線による遺伝的不安定性の誘発において、非DSBs型DNA損傷が誘発原因である可能性を検討するため、細胞内に電離放射線の照射に因らずに非DSBs型DNA損傷を移入することにしました。損傷移入後の細胞で遺伝的不安定性の誘発の有無を調べることで、非DSBs型DNA損傷が遺伝的不安定性を誘発する原因であることを証明できます(図1)。細胞に外来の非DSBs型DNA損傷を移入する方法として、微小核細胞融合法を用いました(図2)。微小核細胞融合法とは、染色体のドナーとなる細胞から染色体を含有する微小核細胞と呼ばれる細胞を抽出し、レシピエントとなる細胞と融合させます。これによって、外来(ドナー由来)の染

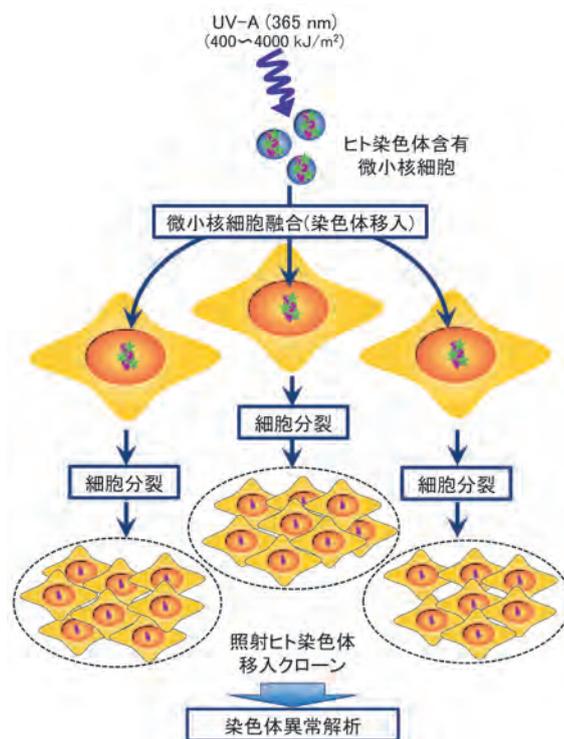


図2 微小核細胞融合法を用いたDNA損傷の移入
ヒト染色体を含む微小核細胞にUV-Aを照射後、レシピエントである非照射マウス細胞に移入した。その後、各ヒト染色体含有細胞はそれぞれ個別に分裂増殖させ、照射ヒト染色体含有クローンを作製した。作製したクローンのそれぞれの染色体異常を解析した。

色体を他の細胞(レシピエント細胞)に移入する方法です。この方法を用いる事により、抽出した微小核細胞の染色体にDNA損傷を生じさせた後に、非照射のレシピエント細胞に移入することでDNA損傷が遺伝的不安定性の誘発に与関するのかが調べることが可能となります。本研究では、DNA損傷を生成させるために、波長が365 nmの長波長紫外線(UV-A; Ultra Violet-A)を用いました。DNA損傷を生成させるだけであれば、X線やγ線の様に遺伝的不安定性を誘発するものを用いる方法もありますが、それではDSBsも同時に生成してしまうため、非DSBs型DNA損傷による影響を知ることが出来なくなってしまいます。それに対して、UV-Aは、X線やγ線の照射でも生成する酸化型塩基損傷(非DSBs型損傷)を生成する一方で、DSBsや短波長の紫外線で生じる光産物やシクロブタン型ピリミジンダイマー等の紫外線特有の損傷を生成し難いことから、非DSBs型DNA損傷の生成に適しています。UV-A照射によりDNA損傷を生成させた染色体を非照射のレシピエント細胞に移入した後、遺伝的不

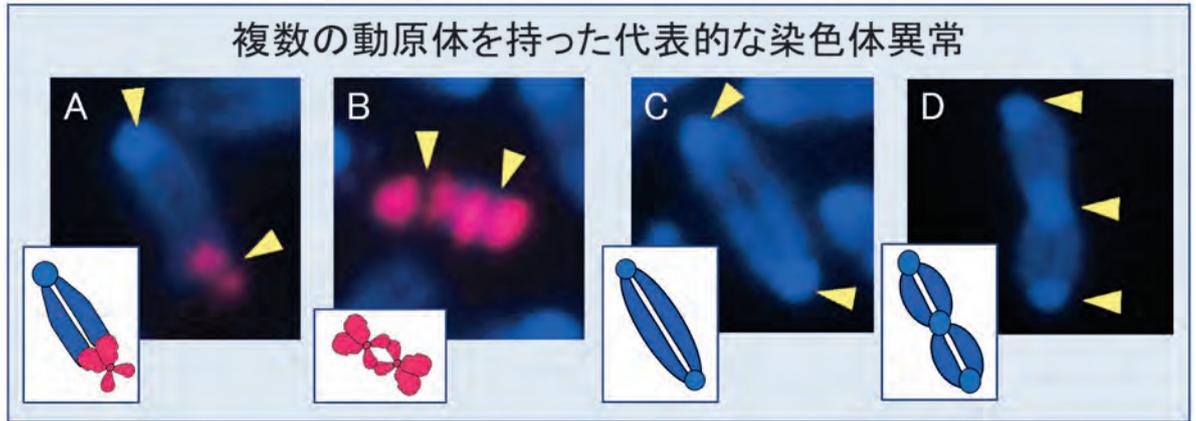


図3 WCP-FISH法を用いた染色体異常の写真

WCP-FISH法により、ヒト染色体は赤、マウス染色体は青に染色されている。黄色の矢印はそれぞれ動原体を示している。これらはいずれも複数の動原体を有した異常な形態の染色体（染色体異常）の写真と、それぞれの染色体異常を模式的に表した図である。(A) マウス染色体とヒト染色体の融合した染色体異常、(B) 2本のヒト染色体同士の融合した染色体異常、(C) 2本のマウス染色体が融合した染色体異常、(D) 3本のマウス染色体が融合した染色体異常である。

安定性誘発の有無を遅延性染色体異常の生成を指標として調べ、遺伝的不安定性誘発機構の原因の解明を試みました(図2)。

3. 研究の内容

まず始めに、微小核細胞融合法を用いて、ヒト染色体を含有するマウス細胞を作製しました。移入するヒト染色体は予め、それぞれ0 kJ/m²、400 kJ/m²、4000 kJ/m²のUV-Aを照射したものを用いました。UV-A照射後のヒト染色体を、レシピエントであるマウス細胞に移入した後、それぞれ単一細胞を由来とするクローン細胞をそれぞれ複数作製しました。各クローンはいずれも、個別のヒト染色体含有細胞に由来しています。作製したクローンは、ヒト染色体に対する特異的な試薬による染色法(WCP-FISH; Whole Chromosome Painting Fluorescence *in situ* Hybridization)により、レシピエント細胞由来のマウス染色体との染め分けを行いました。その後、照射歴の有るヒト染色体と照射歴の無いマウス染色体のそれぞれがどのような影響を受けているのかを調べました(図3)。遺伝的不安定性の解析は、遅延性染色体異常を指標として行いました。遅延性染色体異常とは、照射直後ではなく数回~数十回の細胞分裂後に観察される染色体の構造的な異常のことです。WCP-FISHによりヒト染色体を赤、それ以外のマウス染色体を青く染め分けることにより、図3に示した様な染色体異常を調べる事が出来ました。図3 A及びBで示した様なUV-A照射されたヒト染色体の関与する染色体異常の生成頻度を調べた結果、未照射(0 kJ/m²)ヒト染色体移入クローンではいずれも低く、染色体異常を持つ細胞の出現

率は平均3%でした。それに対して、400 kJ/m²及び4000 kJ/m²照射染色体を移入したクローンでは、ヒト染色体に異常を持つ細胞の出現率がそれぞれ平均6.38%、及び50.8%と、照射線量に依存して増加しました。この結果から、UV-A照射によって染色体の安定性が低下する事が分かります。

次に、非照射であるレシピエント細胞由来のマウス染色体について調べた結果、ヒト染色体を介さず、非照射マウス染色体間のみ生じる染色体異常(図3 C及びD)の生成頻度は、ヒト染色体の場合と同様に、UV-A照射線量に依存して増加していることが分かりました。この結果により、UV-A照射染色体の移入は、非照射染色体にも影響を及ぼすことが分かりました。そこで、非照射環境における影響を更に調べる為に、ヒト染色体移入クローンにおける染色体数の総数を調べました。レシピエントのマウス細胞の染色体数は42本であるため、正常なヒト染色体移入細胞の場合42+1=43本の染色体を有しています。実際に、非照射ヒト染色体を移入したクローンはいずれも43本に近い染色体数を持っていました。一方、UV-A照射ヒト染色体移入クローンでは、400 kJ/m²、4000 kJ/m²とヒト染色体への照射線量が増加するにつれて移入後の細胞の染色体数が増加していました(図4)。これらの結果は、DNA損傷を有する染色体の移入が細胞の恒常性を乱すことを示唆しています。

4. 成果の意義と波及効果

本研究は、未だ解明されていない遺伝的不安定性の誘発メカニズムに対して、非DSBs型DNA損傷が原因となって細胞の恒常性が崩されることを示し

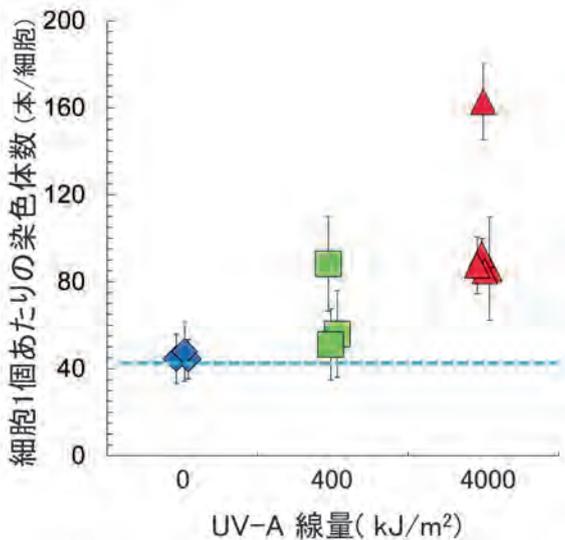


図4 ヒト染色体移入クローンの染色体数の変化
 正常な細胞の場合、ヒト染色体移入により43本の染色体を有する(破線)。(◆)非照射ヒト染色体移入クローン。(■)400 kJ/m²のUV-Aを照射したヒト染色体を移入したクローン。(▲)4000 kJ/m²のUV-Aを照射したヒト染色体を移入したクローン。

た点において、非常に重要な意味を持ちます。なぜなら、遺伝的不安定誘発機構の最初の引き金となる原因が明らかになったことは、その後に引き続いて起こる影響の研究に繋がるからです。さらには、遺伝的不安定性の誘発抑制や、放射線発癌機構の解明、そして癌治療の研究に対しても大きな影響を及ぼすことが期待されます。

5. 今後の予定

本研究によって、遺伝的不安定性の最初の要因が明らかになりました。しかし、その次にどのような現象が続くのかは未だ不明です。そこで、移入した非

DSBs型DNA損傷が、(1)どの様に染色体の数的な異常を引き起こしていくのか、また、(2)どの様に染色体異常を生成しているのか、について明らかにし、(3)非DSBs型DNA損傷により遺伝的不安定性が誘発される経路を明らかにしていく、ということが今後の課題となっています。

参考文献

- [1] J. B. Little *et al.*, *Int. J. Oncol. Biol. Phys.* **19**, 1425 (1990).
- [2] M. A. Kadhim *et al.*, *Nature* **355**, 738 (1992).
- [3] J. B. Little *et al.*, *Carcinogenesis* **21**, 397 (2000).
- [4] C. Lengauer *et al.*, *Nature* **396**, 643 (1998).
- [5] C. L. Limoli *et al.*, *Cancer Res.* **57**, 4048 (1997).
- [6] A. Urushibara *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 1037 (2004).
- [7] A. Urushibara *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 23 (2008).
- [8] M. Noguchi *et al.*, *Mutat. Res.* **732**, 34 (2012).

用語の説明

1. WCP-FISH法 ; Whole Chromosome Painting Fluorescence *in situ* Hybridization

ある染色体に対して、その染色体特有のDNA配列と相補的な配列を持つ一本鎖DNAに蛍光色素でマーカしたものをハイブリダイズさせることにより、目的の染色体のみを検出(可視化)する染色方法である。染色体(Chromosome)全体(Whole)を着色(Painting)するために、蛍光色素(Fluorescence)をその場所(*in situ*)にハイブリダイズする(Hybridization)ことからWCP-FISHと呼ばれる。検出には蛍光顕微鏡を用いる。

2. DSBs型損傷と非DSBs型損傷

2重らせん構造を取るDNAにおいて、2本の鎖の両方が近接した箇所において切断されることを二重鎖切断(DSBs; Double strand breaks)と言う。これによ

りDNA鎖は完全に切断された状態となり、このような形のDNA損傷をDSBs型損傷と呼ぶ。それに対して、鎖切断が2本の鎖のどちらか一方だけに生じた場合や、酸化型塩基損傷等の鎖切断を伴わないようなDNA損傷で構成されたものを非DSBs型損傷と呼ぶ。

3. 微小核細胞融合法

染色体を別の細胞に移入する方法の一つ。染色体のドナーとなる細胞から特殊な方法によって染色体を含んだ微小核細胞を取り出す。その後、染色体のレシピエントとなる細胞に対して、抽出した微小核細胞を融合させることで、染色体を他の細胞に移入する。微小核細胞融合法の利点は、通常の遺伝子移入法では困難な遺伝子も安定に移入可能であることや、移入後の細胞内での安定性が高く、遺伝子移入の効率が良いこと等である。