

MS4-3

放射線被ばく細胞における遅延性 DNA 切断 の誘導とその意義

岡泰由、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線生物学、大阪府立大学
先端科学研究所

Delayed induction of DNA double strand breaks on X-irradiated surviving cells
Oka Yasuyoshi, Suzuki Keiji, Kodama Seiji, and Watanabe Masami
Div. Radiat. Biol., Grad. Sch. Med., Nagasaki Univ., Res. Instit. Adv. Sci. Tech.,
Osaka Pref. Univ.

【緒言】

電離放射線は細胞内に DNA の二重鎖切断を誘導することが知られている。DNA 二重鎖切断は細胞にとって致命的な損傷であるが、その傷を修復することができれば細胞は生存していくことができる。しかし、最近の報告から放射線被ばく後に生存した細胞に遅延的に突然変異、染色体異常、細胞増殖停止などの様々な形質を誘導することが明らかとなってきた。いわゆる放射線による遺伝的不安定性状態の誘導である。現在、遅延型影響が誘導される機構は明らかになっていないが、本研究では遅延性細胞増殖停止に遅延的に生ずる DNA 二重鎖切断の誘導が関与しているのではないかと考えて、DNA 二重鎖切断に応答してリン酸化され DNA 二重鎖切断部位でフォーカスを形成することが知られているヒストン H2AX および ATM を指標として用い、X 線生存細胞における遅延性 DNA 二重鎖切断の誘導動態を検討した。

【材料と方法】

本研究では、正常ヒト二倍体細胞である HE49 細胞を用いた。4 Gy の X 線を照射後すぐに 100mm φ ディッシュに細胞を播種しコロニー形成させた。2 週間培養後、形成されたコロニーを単離し解析に用いた。

クローン化後にそれぞれの細胞を抗リン酸化 H2AX 抗体と抗リン酸化 ATM 抗体を用いて蛍光免疫染色法を行いそれぞれのリン酸化型蛋白質のフォーカスを観察した。

蛍光免疫染色法による検討を行った日にそれぞれの細胞のコロニー形成率を求めるために 100mm φ ディッシュに細胞を播種した。2 週間培養後にギムザ染色を行い 50 個以上の細胞で形成されているコロニーを数えた。

【結果】

4 Gy の X 線照射後に生存した細胞を抗リン酸化

H2AX 抗体と抗リン酸化 ATM 抗体を用いて蛍光免疫染色法を行った。X 線未照射細胞では、リン酸化 H2AX、リン酸化 ATM のフォーカス陽性細胞の割合は、総てのクローン由来の細胞で 10%未満であった。しかしながら、X 線照射後に生き残ってきたクローンの中には 20%以上の割合でフォーカスを保持している細胞が存在するものが全クローンの 25%で観察された。また、リン酸化 H2AX とリン酸化 ATM のフォーカスは大部分が局在性を一致していた。

核あたりのフォーカス数は、高頻度にフォーカス陽性細胞が観察されたクローンの細胞でも非照射の細胞の場合と同様に 1~3 個が大部分を占めていた。

X 線照射後生存した細胞のコロニー形成率を算出した。その結果、X 線照射生存クローンの細胞には非照射細胞と同程度のコロニー形成率(30%)を示すものが存在する一方で、10%程度のコロニー形成率を示すものが存在することが判った。そのようなクローンの細胞集団にはリン酸化 H2AX、リン酸化 ATM のフォーカスを形成する細胞が高頻度に存在することが判った。

【考察】

本研究結果より、X 線照射生存クローンの中にリン酸化 ATM、リン酸化 H2AX のフォーカス陽性細胞を高頻度を含むクローンが観察され、そのクローンでは遅延性の細胞増殖停止が誘導されていることが明らかとなった。しかし、リン酸化 ATM、リン酸化 H2AX のフォーカスが高頻度に生じているクローンの細胞において、核内あたりのフォーカス数は大部分が 1~3 個程度であった。これらの結果は、放射線照射直後に生じた DNA 損傷を修復し再び細胞分裂を繰り返すことができた細胞に、遅延的に核あたり数個の DNA 二重鎖切断が生じ、再度、ATM あるいは p53 など細胞周期停止に関与する因子が活性化されることが遅延性の細胞増殖停止の原因であることを示唆している。