

熱中性子照射におけるDNA-PKcs阻害剤の生物学的効果

木梨 友子 増永慎一郎 鈴木 実 永田 憲司 小野 公二

京都大学原子炉実験所

The Biological Effect of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Wortmannin Following Thermal Neutron Irradiation

Yuko Kinashi, Shinichiro Masunaga,
Minoru Suzuki, Kenji Nagata and Koji Ono

Purpose: Wortmannin, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, has been found to inhibit DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) and to be an efficient radiosensitizer. We investigated the radiosensitizing effect of wortmannin on cell killing by thermal neutrons and the occurrence of mutations at the HPRT locus of CHO cells.

Materials and Methods: Wortmannin was added to cells at a final concentration of 20 μ M two hours before irradiation. Cells were irradiated with thermal neutrons. The biological end point of cell survival was measured by colony formation assay. Mutagenicity was calculated from the mutation frequency at the HPRT locus.

Results: Wortmannin promoted cell death following thermal neutron irradiation especially in the absence of boron. However, mutagenicity was decreased by the wortmannin treatment.

Conclusion: Our results suggest that the inhibition of DNA-PKcs by wortmannin would be an effective radiosensitizer for BNCT and might bring about a reduction in the frequency of mutation by blocking the mis-joining of DNA damage during the repair process.

Research Code No.: 6.4.

Key words: Wortmannin, DNA-PKcs, BNCT, Neutron, HPRT mutation

Received Mar. 31, 2003; revision accepted Jul. 14, 2003
Research Reactor Institute, Kyoto University

別刷請求先
〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町野田
京都大学原子炉実験所
木梨 友子

はじめに

熱中性子捕捉療法は、腫瘍細胞に ^{10}B を含むアミノ酸などの化合物を取り込ませ、熱中性子を照射して $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ の原子核反応により腫瘍細胞だけを殺すことを目的とした治療法である。 $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ の原子核反応により放出される α 粒子の生体内での飛程が約十数 μm と細胞の大きさとほぼ同じであるため原子核反応が起きた細胞が α 粒子によりヒットされ細胞死が起きる。 α 粒子のエネルギーは1.47MeV、 ^7Li 反跳核は0.84MeVであり、いずれも高LET粒子で生物効果が大きく、RBEが2.5~5.05である^{1), 2)}。

PI-3 キナーゼの阻害剤のwortmannin は、DNA-PKcs(DNA-dependent protein kinase)に対しても阻害作用があり、放射線照射時にDNA二本鎖切断の修復を阻害することが知られている³⁾。この二本鎖切断の修復を阻害することで、増感作用を示すことが ^{60}Co γ 照射において従来より報告されてきた⁴⁾。

今回、熱中性子照射におけるwortmanninの殺細胞効果への影響および、HPRT突然変異誘発に対するDNA-PKcs阻害剤の効果を調べた。殺細胞効果抑制効果については、増感効果が認められた。突然変異誘発については、抑制効果があり、また、wortmanninの存在下で突然変異の変位形態に特徴が認められた。

材料と方法

1. 細胞とwortmannin処理

細胞はCHO(Chinese hamster ovary)細胞を用いた。wortmannin(Sigma-Aldrich Co., Japan)はDMSOで100mMのstock solutionとし、照射2時間前に培地に最終濃度20 μM で添加し、照射後16時間目に除去した。また、照射前30分にホウ酸を最終濃度が10ppmおよび20ppmとなるように添加した。

2. 熱中性子照射

熱中性子照射は、京都大学原子炉実験所の重水設備(5MW)で、テフロンチューブを用い、室温で熱中性子を照射した。中性子のエネルギースペクトルは、カドミウムおよびボーラ

ル熱中性子フィルターにより調節される⁵⁾。実際の照射時の中性子フルエンスは、テフロンチューブに金箔を貼り、照射後に金箔の放射化量により求めた。吸収線量はボロン濃度と中性子フルエンスの値より計算式により求めた^{6),7)}。

3. 生存率と突然変異発生頻度

照射後、細胞の一部を細胞生存率を求めるために、コロニーアッセイ法で培地に蒔いた。残りは、照射7日後に6-thioguanineを加えた選択培地に蒔き、10日後にコロニーを数え、HPRT突然変異発生頻度と細胞死亡率の関係を求めた。実験結果の統計処理は、Student's t-testを用いて検討し、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありとした。

4. 突然変異細胞のDNA解析

HPRT突然変異のコロニーを選別し、この細胞のDNAを生理食塩法で抽出した。突然変異の変位形態を調べるために、PCR (polymerase chain reaction) 増幅法を用いて、HPRT遺伝子の9個のExonについて解析を行った^{8),9)}。Exonの欠損パターンについては、Exon 1~9が保たれているものをno change, Exon 1~9のうち1つ以上8個以下が欠失しているものをpartial deletion, Exon 1~9すべてが欠失しているものをtotal deletionとして3つに分類した。また、PCR増幅効果は、EF2バンドの増幅が正常であるかどうかで判定した¹⁰⁾。PCR増幅効率率は、98.5%であった。

結 果

1. 熱中性子照射におけるwortmanninによる生存率の変化

熱中性子照射におけるwortmanninの存在下でのCHO細胞の生存曲線をFig. 1に示した。熱中性子照射においては生存曲線は肩を持たない右下がりの急勾配の傾きを持った直線となる。生存率曲線より求めたD0およびD10値をTable 1に示す。Fig. 1およびTable 1よりwortmanninの存在下での生存率は、wortmanninの存在しない時のコントロールの生存率に比べて有意に低下している。ボロン濃度との関係については、ボロン濃度が低いほど増感効果は著明であった。

2. 熱中性子照射におけるwortmanninによる突然変異発生頻度の変化

熱中性子照射におけるwortmanninの存在下での突然変異

発生頻度をFig. 2に示した。左(A)では吸収線量に対する突然変異発生頻度を、右(B)では生存率に対する突然変異発生頻度を表示した。突然変異発生頻度は、細胞致死効果と相関関係にあるので、吸収線量よりも同じ生存率をもたらす線量(iso-survival dose)での発生頻度は、より相対的に比較できる利点がある。wortmanninの存在下での突然変異発生頻度は、wortmanninの存在しない時のコントロールに比べて、有意に低下していた。

3. wortmannin存在下での熱中性子照射に誘発された突然変異細胞のDNA解析

突然変異細胞のDNA解析の結果をTable 2に示した。これまでのわれわれの研究より、熱中性子照射では突然変異細胞のDNA解析で部分欠損や全欠損型の変異形態を示す突然変異細胞の誘発が⁶⁰Coによるγ線照射に比べて高頻度に認められ、さらに、これらの変異形態を示す突然変異細胞は

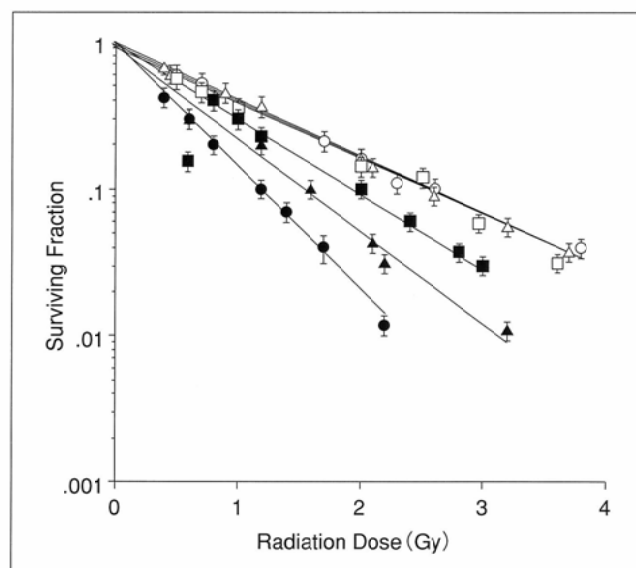


Fig. 1 Effect of wortmannin treatment on cell killing following thermal neutron irradiation.

The boron concentration was 0 ppm with (●) and without (○) wortmannin treatment.

The boron concentration was 10 ppm with (▲) and without (△) wortmannin treatment.

The boron concentration was 20 ppm with (■) and without (□) wortmannin treatment.

Points and error bars represent the means $\pm$ SE of three independent experiments.

Table 1 Survival parameters* (D0, D10) calculated from dose-survival fraction curves of CHO cells irradiated with a thermal neutron beam

Boron concentration (ppm)	0	0	10	10	20	20
Wortmannin treatment	no	yes	no	yes	no	yes
D10 (Gy)	2.6 $\pm$ 0.2	**1.2 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.2	**1.6 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.2	**2.0 $\pm$ 0.1
D0 (Gy)	1.2 $\pm$ 0.1	**0.5 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	**0.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1

*Survival curve parameters: D0 (inverse of slope) and D10 (dose necessary to reduce survival to 10%) $\pm$ SE of the mean of three separate experiments for each study.

**Significantly low ($p < 0.05$) compared with no wortmannin treatment.

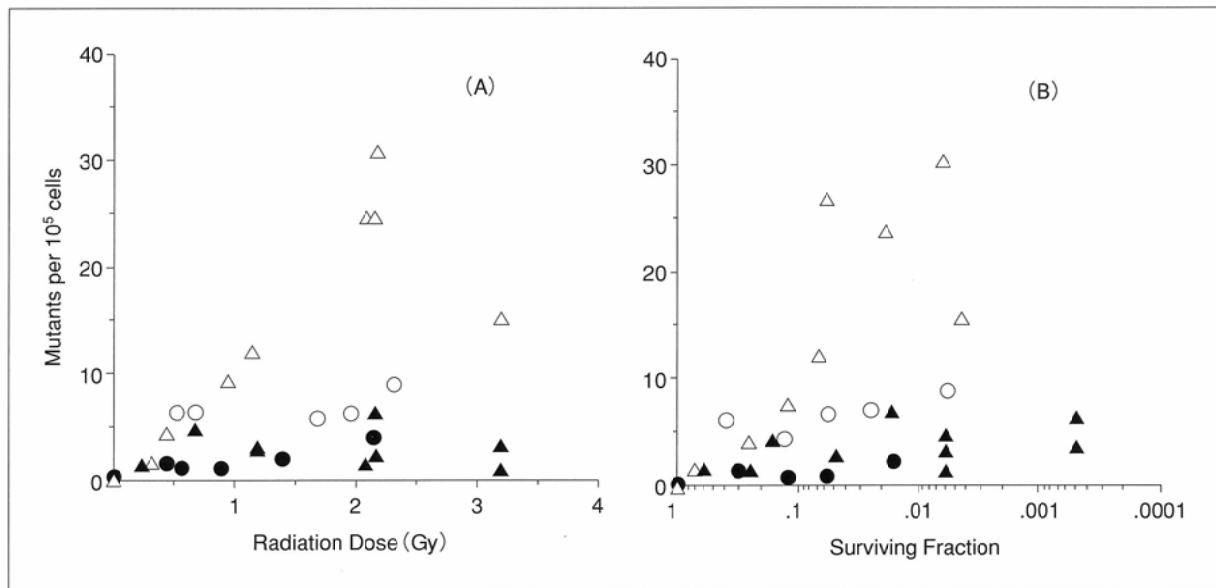


Fig. 2 Effect of wortmannin treatment on mutation at the HPRT locus in CHO cells irradiated with thermal neutrons. A : mutation frequency as a function of dose. B : mutation frequency as a function of survival. The boron concentration was 0 ppm with (●) and without (○) wortmannin treatment. The boron concentration was 10 ppm with (▲) and without (△) wortmannin treatment.

Table 2 Molecular structure analysis of HPRT mutations induced by thermal neutron irradiation

Treatment	Boron Concentration (ppm)	Dose (Gy)*	Mutats per 10 ⁵ survivors**	Molecular structure of mutants per 10 ⁵ survivors**		
				Total Deletions	Partial Deletions	No change
Thermal neutron irradiation with						
No wortmannin	0	2.6	6.0±3.0	1.7±1.0	3.8±1.0	0.5±0.2
20 μM of Wortmannin	0	1.2	***3.0±2.0	2.4±1.0	0.5±0.2	0.1±0.1
No wortmannin	10	2.6	18.0±4.0	9.7±2.0	7.2±2.0	1.1±0.5
20 μM of Wortmannin	10	1.2	***4.0±2.0	2.2±1.0	1.6±1.0	0.2±0.1

* :10%-survival radiation dose.

** : Mean of mutant frequency ± SE from three or more experiments.

*** : Significantly low ($p < 0.05$) compared with no wortmannin treatment.

ボロンの存在下で特に高率に誘発されることが分かっている。wortmanninの存在下では部分欠損や全欠損型の変異形態を示す突然変異細胞の突然変異細胞に占める割合に変化はなかったが、突然変異発生頻度が著明に低下することで、部分欠損や全欠損型の変異形態を示す突然変異細胞の誘発頻度は有意に低下した。この効果は、ボロンの存在下で特に効率よく認められた。

考 察

哺乳類の細胞では放射線障害などの外的要因により生じたDNA二重鎖切断は、非相同末端結合によりそのほとんどが修復されている。DNA-PKcs (DNA dependent protein

kinase)は、この非相同末端結合において修復シグナルの伝達経路に関与している。wortmanninはDNA-PKcsの活性を阻害する作用があるので、DNA-PKcsの関与する非相同末端結合を介するDNA二重鎖切断の修復が阻害され、その結果、放射線照射後の細胞死が増強されると考えられている。実際、低LETの放射線を用いた研究で、多施設からwortmanninの放射線増感効果が報告されている^{4), 11), 12)}。

Brittenらは、速中性子を用いてDNA二重鎖切断の修復とLETの関係を調べ、DNA-PKcsの関与する修復経路は、LETが100keV/mm以下の領域でその役割が重要であり、LETが100keV/mm以上では、細胞死へのDNA-PKcsの関与する修復経路の関与は少ないと報告している¹³⁾。京都大学原子炉実験所の研究炉の中性子エネルギースペクトルは、10⁻⁷～

10⁴keVと広域である。熱中性子のエネルギースペクトルは、ボロンなしでは0.6eV以下、平均エネルギー0.025eVであり、この時のLETは20keV/mm以下である。ボロンが存在すると、¹⁰B(n, α)⁷Li反応によりエネルギーは1.47MeV(α-particle)および0.84MeV(⁷Li-particle)となり、LETはそれぞれ50~231keV/mm, 65~266keV/mmとなる。今回の実験でも、熱中性子による細胞死についてwortmanninの増感効果は、ボロン濃度のより低い範囲、すなわちLETの低い範囲で認められた。

われわれは、従来より熱中性子照射による突然変異誘発について、低LETの放射線よりも誘発頻度が高く、突然変異細胞のDNA解析により部分欠損や全欠損型の変異形態を示す突然変異細胞の割合が低LETの放射線より多いことを報告してきた¹⁴⁾。今回の実験では、wortmannin処理により、突然変異誘発については発生頻度が減少し、さらに突然変異細胞のDNA解析では、部分欠損や全欠損型の変異形態を示す細胞の割合が低下した。この結果は、放射線照射に誘発される突然変異は、主にDNA二重鎖切断の修復過程におけるエラーが原因となるが、wortmannin処理によりDNA-PKcsの関与する非相同末端結合を介するDNA二重鎖切断の修復が阻害され、その結果として修復過程においてエラーが減少したためではないかと推察している。

放射線照射によるDNA二重鎖切断の修復機構には非相同末端結合と相同組換え、単鎖アニーリングの三経路が知られ

ている。実際、非相同末端結合と相同組換えに関しては、競合反応モデルが提唱されており¹⁵⁾、非相同末端結合が阻害されると、相同組換えによる修復の割合が増加し、その結果、エラーの発生が少なくなったと考えることができる。

あるいは、非相同末端結合が阻害され、DNA二重鎖切断が修復されず、P53を経由するアポトーシス機構により細胞死が起こり、その結果、突然変異細胞が生き残れなかったのかもしれない¹⁶⁾。

結 語

DNA-PKcs阻害剤の存在下では、熱中性子照射による生存率が低下し、殺細胞効果での放射線増感効果が認められたが、DNA-PKcs阻害剤での処理により突然変異発生頻度は反対に低下した。HPRT突然変異細胞のDNA解析による突然変異の変異形態を調べた結果、DNA-PK阻害剤の存在下で、欠失型変異の発生頻度が有意に低下した。これらの結果より、DNA-PKcs阻害剤は熱中性子照射において増感剤としての効果が期待される。さらに、低LET放射線に比べて熱中性子照射により多く引き起こされる細胞レベルでの欠失型変異は、DNAの不安定性を引き起こし、正常組織に対しては放射線晩発傷害の二次性発癌につながる重篤な変異形態であるので、DNA-PKcs阻害剤により熱中性子照射による晩発傷害の癌の発症が抑制され得るかもしれない。

文 献

- 1) Ujeno Y.: Physical modification of thermal neutron induced biological effects. In: Modification of Radiosensitivity in Cancer Treatment. Ed.T Sugahara, Academic Press, 477-486, Tokyo, 1984
- 2) Fukuda H, Kobayashi T, Matsuzawa K, et al: RBE of a thermal neutron beam and the ¹⁰B(n, α)⁷Li reaction on cultured B-16 melanoma cells. *Int J Radiat Biol.* 51: 167-175, 1987
- 3) Boulton S, Kyle L, Yalcintepe L, et al: Wortmannin is a potent inhibitor of DNA double strand break but not single strand break repair in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 17: 2285-2290, 1996
- 4) Okayasu R, Suetomi K, Ullrich RL: Wortmannin inhibits repair of DNA double strand breaks in irradiated normal human cells. *Radiat Res* 149: 440-445, 1998
- 5) Kobayashi T, Kanda K, Fujita Y, et al: The upgrade of the heavy water facility of the Kyoto University Reactor for neutron capture therapy. In: Larsson B, Crawford J and Weinreich R. editors Volume I, Medicine and Physics in Advances in Neutron Capture Therapy. Amsterdam: Elsevier Science p321-325, 1997.
- 6) Kobayashi T, Kanda K: Analytical calculation of boron-10 dosage in cell nucleus for neutron capture therapy. *Radiat Res* 91: 77-94, 1982.
- 7) Kitao K: A method for calculating the absorbed dose near-interface from ¹⁰B(n, α)⁷Li reaction. *Radiat Res* 61: 204-315, 1975
- 8) Kinashi Y, Nagasawa H, Little JB: Molecular structural analysis of 417 HPRT mutations induced by restriction endonucleases in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat Res* 326: 83-92, 1995
- 9) Rossiter BJF, Fuscoe JC, Muzny DM, et al: The Chinese hamster hpert gene: Restriction map, sequence analysis, and multiplex PCR deletion screen. *Genomics* 9: 247-256, 1991
- 10) Foley BT, Moehring JM: Moehring TJ: A mutation in codon 717 of CHO-K1 elongation factor 2 gene prevents the first step in biosynthesis of diphthamide. *Somat Cell Mol Genet* 18: 227-231, 1992
- 11) Rosezweig KE, Youmel MB, Palayoor ST, et al: Radiosensitization of human tumor cells by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2 delay. *Clin Cancer Res* 3: 1149-1156, 1997
- 12) Chernikova SB, Wells RL, Elkind MM: Wortmannin sensitizes mammalian cells to radiation by inhibiting the DNA-dependent protein kinase-mediated rejoining of double-strand breaks. *Radiat Res* 151: 159-166, 1999
- 13) Britten RA, Murray D: Constancy of the relative biological effectiveness of 42 MeV (p→Be⁺) neutrons among cell lines with different DNA repair proficiencies. *Radiat Res* 148:308-316, 1997
- 14) Kinashi Y, Sakurai Y, Masunaga S, et al: Molecular structure analysis of HPRT mutations induced by thermal and epithermal neutrons in Chinese hamster ovary cells. *Radiat Res* 154: 313-318, 2000
- 15) Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, et al: DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3758-3763, 2002
- 16) Akyuz N, Boehden GS, Susse S, et al: DNA substrate dependence of double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22: 6306-6317, 2002