

論文要旨

ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC2 細胞と放射線抵抗性
細胞 HSC2-R への DNA-PKcs 阻害剤 NU7441 と Rad51
阻害剤 IBR2 を用いた DNA 修復機構の検討

令和 5 年度

北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科

大内 健太郎

【背景】

放射線治療は近年の物理学的精度の向上から、正常組織に対し非侵襲的で高い局所制御を実現し、癌治療において重要な役割を果たしている。しかし放射線治療後に局所再発や転移を起こすことがあり、その原因の一つとして、エックス線分割照射中に放射線抵抗性を示す細胞が残存し、これら放射線抵抗性細胞が再発および転移を引き起こすと考えられている。

電離放射線の主な細胞殺傷効果は DNA 損傷、なかでも DNA 二本鎖切断であると考えられている。この DNA 損傷に対して細胞は修復機構(DDR : DNA-Damage Response)があり、その主な修復機序として非同末端結合または非同組換えの 2 つがある。非同組換えはエラーの少ない修復とされているが、エラーが発生しやすい非同末端結合は、ゲノムの不安定性を誘発し、放射線抵抗性クローンの拡大を引き起こすことが報告されている。しかし、癌細胞の放射線抵抗性獲得の根底にある生物学的作用機序の詳細は不明である。そこで、放射線抵抗性細胞発生の作用機序を検討するため、DNA 損傷修復タンパク質特異的阻害剤を使用し、エックス線分割照射によって樹立された放射線抵抗性細胞株の DNA 障害に対する反応を研究した。

【方法】

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 を親株とし、この親株にエックス線 1 日 2 Gy を 30 回(総線量 60 Gy)照射し、生存した放射線抵抗性口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2-R を使用した。HSC2 細胞ならびに HSC-R 細胞は、東北大学加齢医学研究所生物医学研究用細胞リソースセンター(仙台、日本)から提供された。HSC2 細胞および HSC2-R 細胞に、非同末端結合(NHEJ)に關与する DNA-PKcs の阻害剤である NU7441 および非同組換え(HR)に關与する Rad51 の阻害剤である IBR2 を添加し、その後エックス線照射することで、DNA 損傷修復機構を検討した。

初めに HSC2 細胞に対し HSC2-R 細胞が放射線抵抗性を有することをコロニー形成アッセイにて確認した。次に HSC-2 細胞と HSC-2R 細胞へ NU7441 または IBR2 を培養液に添加し、コロニー形成アッセイで細胞生存率を求め、これら阻害剤の毒性を評価した。次に毒性を示さない濃度に調整した NU7441 または IBR2 を添加し、1 時間後にエックス線を 6 Gy 照射し細胞生存率を比較検討した。また照射後 24 時間と 48 時間のアポトーシス細胞の割合を FITC で標識されたアネキシン V および Propion Iodide(PI)を用いて、フローサイトメトリーにより分析した。さらに照射後 1,6,24,48 時間後に、FITC- γ H2AX および Propion Iodide(PI)を用いて、DNA 損傷修復動態と細胞周期分析をフローサイトメトリーにより分析した。統計的有意差検定は、2 群の場合、Mann-Whitney の U 検定、3 群以上の場合 Steel-Dwass 検定を使用し、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

【結果および考察】

エックス線照射単独処理した HSC2-R 細胞の細胞生存率は HSC2 細胞よりも有意に高く、HSC2-R が HSC2 に比較して放射線抵抗性を有する事が確認された。

阻害剤を培養液に添加し、細胞生存率を計測したところ、NU7441 では 5 μ M,

IBR2 では 10 μ M において生存率低下を認めなかった。そこで NU7441(5 μ M)、および IBR2(10 μ M) に調整して添加した後、エックス線照射を行い、影響を観察した。その結果、NU7441 添加エックス線照射において HSC2 細胞および HSC2-R 細胞では、コロニー観察されなかった。この結果は、DNA-Pkcs 阻害剤である NU7441 が HSC2-R 細胞の修復を低下させ、放射線抵抗性を減弱させたと考えられた。

FITC-アネキシン V および PI 染色を使用し、処理後 24 時間と 48 時間におけるアポトーシス細胞の割合を測定した。エックス線照射単独での HSC2-R 細胞のアポトーシスは、HSC2 細胞よりも有意

に低かった。阻害剤(NU7441 または IBR2)添加後エックス線照射すると、阻害剤添加により HSC2-R のアポトーシスは増加した。

DNA 損傷の指標である γ H2AX 陽性細胞の検出と細胞周期の分析の為に、PI と FITC- γ H2AX(BioLegend)による二重染色を行い、フローサイトメトリーで経時的に測定した。エックス線照射単独において、HSC2 細胞および HSC2-R 細胞の γ H2AX 陽性分画は、照射 1 時間後で増加したが、照射 6 時間後に急速に減少した。これは細胞内の DNA 損傷が、エックス線照射後 1 時間程度で最大であり、その後 DNA 修復により γ H2AX 陽性分画が減少したと考えられる。NU7441 添加エックス線照射では、同様に HSC2 細胞および HSC2-R 細胞の γ H2AX 陽性分画は、照射 1 時間後で増加した。さらに HSC2 細胞では照射 6 時間後にも γ H2AX 陽性分画は高値を示したが、照射 24 時間後には減少した。それに対し HSC2-R 細胞では照射 48 時間後まで γ H2AX 陽性分画は高値を示した。IBR2 添加エックス線照射では、HSC2 細胞および HSC2-R 細胞の γ H2AX 陽性分画は、エックス線照射単独とほぼ同様の傾向を示した。以上の結果は、HSC2-R 細胞において NU7441 が DNA 修復を妨げ、 γ H2AX 陽性分画が減少しなかったと考えられる。

細胞周期分析では、HSC2 細胞ではエックス線照射単独後、細胞周期分布は 6 時間後まで変化しなかったが、24 時間後、G2/M 期の細胞の割合は増加し、G0/G1 および S 期の細胞の割合は減少した。その後 G2/M 期停止が確認され、48 時間後、この停止は解除される傾向がみられた。それに対し HSC2-R 細胞では、G2/M 期の細胞は顕著には増加せず、G0/G1 の細胞も大きな減少はみられなかった。NU7441 添加エックス線照射では両細胞ともに、G2/M 期の細胞数が経時的に増加する一方で、G0/G1 期の細胞数は照射後 1 時間後まで連続的に減少した。また G2/M 期で停止し 48 時間まで停止は延長した。また HSC2-R 細胞では、倍数体細胞集団が時間とともに多く増加した。この結果は NU7441 を添加すると、HSC2-R 細胞において、G2/M チェックポイントで細胞周期が停止したまま DNA 修復が進行せず、倍数体細胞が増加していると考えられる。IBR2 添加エックス線照射ではエックス線照射単独と比較して、両細胞ともに大きな傾向の違いはみられなかった。

【結論】

HSC2-R 細胞の放射線抵抗性は DNA -PKcs が関与する非相同末端結合修復へ依存していると考えられた。