

解禁日時: 2020年11月30日(月)午後7時(日本時間)

プレス通知資料 (研究成果)



国立大学法人
東京医科歯科大学
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

報道関係各位

2020年11月27日

国立大学法人 東京医科歯科大学

「放射線感受性の細胞周期依存性に新知見」 —HeLa細胞のG1/S期境界付近での急激な感受性の変化を発見—

【ポイント】

- 経時変化撮影^{※1}データのみから、放射線感受性の細胞周期^{※2}依存性を調べる手法を考案し、より高精度、高解像度な評価が可能となりました。
- 本手法により、HeLa細胞において、G1期初期から後期にかけて放射線抵抗性となり、S期初期にかけて急激に感受性に変化するというこれまでの定説とは異なる知見を見出しました。
- G1期後期とS期初期では、放射線感受性に大きな違いはないと考えられていましたが、臨床的には、それぞれに停止する状況が存在し、放射線照射の分割タイミングに重要な示唆を与える知見と考えられます。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔放射線腫瘍学分野の三浦雅彦教授、下野宏晃大学院生(顎口腔外科学分野)らの研究グループは、同研究科顎口腔外科学分野の原田浩之教授との共同研究により、HeLa細胞の放射線感受性における細胞周期依存性について、新たな方法論を導入して再検証したところ、G1期後期で抵抗性を示し、S期初期で急激に感受性に変化するというこれまで定説とされてきた知見とは異なる結果を見出しました。この研究は、文部科学省科学研究費補助金などの支援のもとで遂行され、その研究成果は、国際科学誌 *Scientific Reports* に2020年11月30日午前10時(英国時間)にオンライン版で発表されます。

【研究の背景】

今から60年ほど前、日本人放射線生物学者である寺島東洋三らによって、細胞がM期に入ると、培養皿への接着が低下し球状になることを利用して、培養皿を振盪させることでM期細胞のみを集めるという世界初となるM期同調法(Shake-off法)が開発されました。この手法を用いて、同調しつつ細胞周期を回るHeLa細胞集団に、経時的に放射線を照射し、コロニー形成法^{※3}でそれぞれの細胞周期相における生存率を調べると、M期が最も感受性、G1期初期で抵抗性を示し、その後G1/S期境界からS期にかけて感受性となり、S期後期に向かって再び抵抗性にシフトしていくことが初めて報告されました(Terasima & Tolmach, *Nature*, 1961)。この実験では、G2期も抵抗性を示しましたが、その後の研究で、S期後期細胞の混入があり、それを排除してG2期

細胞のみにすると、感受性を示すことがわかっています。HeLa 細胞の様に G1 期の長い細胞では、ほぼ同様な細胞周期依存性が確認され、この結果が定説となり、放射線治療における”4 つの R”^{※4} の1つ、Redistribution(再分布)の概念が生まれるに至っています。現在では、特定の細胞周期相に同調させる薬剤も存在しますが、多くは DNA 損傷等の副作用を引き起こすことが多く、Shake-off 法はそうしたストレスもなく、同調度も高いため、優れた同調法であるとされてきました。一方、同調度は比較的早期に崩れてしまうことがわかっていたのですが、それを克服して放射線感受性の変化を改めて追求するアプローチはほとんどなされてきませんでした。

【研究成果の概要】

G1、S、G2 および M 期の全ての細胞周期相を、蛍光の色と分裂期の形態から区別して可視化できる Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)^{※5} システムを発現する HeLa-Fucci(CA)2 細胞を用いて、個々の細胞の細胞周期進行に関する経時変化撮影データを取得し、細胞を M 期で一斉にスタートさせる仮想集団を構築しました。その後の変化をシミュレーションすると、9 時間後には G1、S 期の割合がほぼ 1:1 になることがわかりました。このことは、Shake-off 法で分離された M 期に同調した細胞集団は、実はかなり早い段階で同調度が崩壊しており、そのような細胞集団を用いて放射線感受性が調べられていたこととなります。

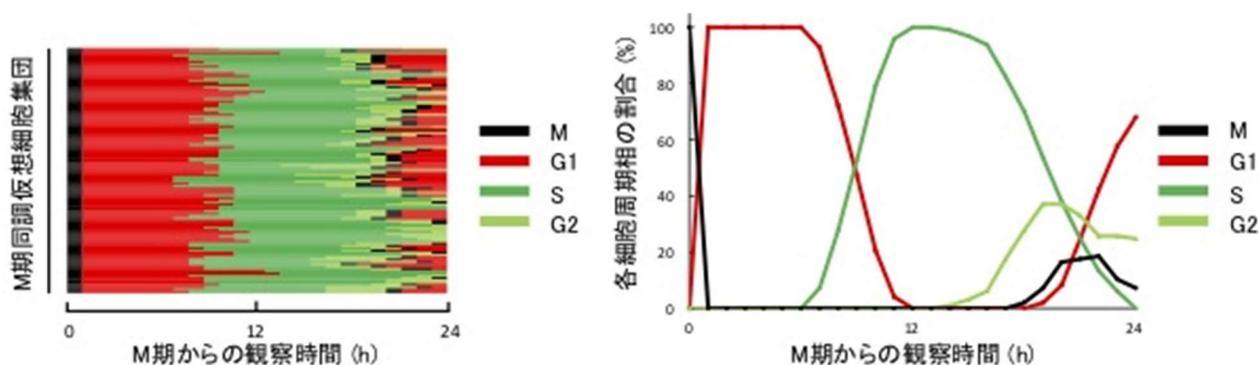


図 1 M 期細胞における同調度の崩壊シミュレーション

そこで、このシステムを利用し、まず照射時に赤色(G1 期)であった細胞集団を同定して、その後の追跡によって、次の緑色(S 期)に進行する順に個々の細胞をソートしました。この集団をほぼ同数になるように 3 グループに分類すれば、S 期細胞が混入していない G1 期の前期、中期、後期に照射された亜集団が得られると想定し、これを S 期で照射された細胞にも同様に適用しました(図 2)。経時変化撮影では、照射後、次の M 期を介して G1 期に至る画像も取得できるので(図 3)、その際に生じる微小核^{※6} 形成頻度の定量化も可能でした。こうして得られた微小核形成頻度は、コロニー形成法によって求められる放射線感受性とよく相関することから、それぞれの亜集団の放射線感受性を、他相の混入がない状態で推定することができ、その結果、G1、S 期いずれにおいても、それぞれ後期に近づくにつれ抵抗性を示すことがわかりました。特筆すべきは、G1 期後期から S 期初期にかけて急激に変化したことで、これまで、このような変化は検出されていませんでした。さらに、Fucci(SA)は、S 期と G2 期を区別できない第 1 世代のシステムですが、S 期初期を蛍光の色で区別することが

でき、この系でも同じ結果が得られました(図 4)。Fucci の特性として、同じ色の蛍光を発している時期では、時間が経過するにつれ、すなわちその相の後半に近づくにつれ蛍光強度が次第に増加します。そこで、HeLa-Fucci(CA)2 細胞を用いて、照射時に、赤色(G1 期)あるいは緑色(S 期)であった細胞を蛍光強度の順にソートし、同様にそれぞれ3つの亜集団に分け、低い順に前期、中期、後期とした場合も、同様な結果が得られました。

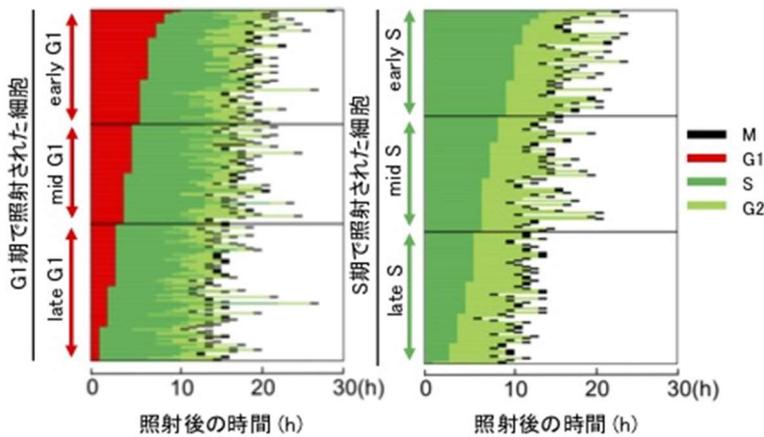


図 2 G1 期または S 期の前期、中期、後期で 2 Gy 照射された亜集団の同定

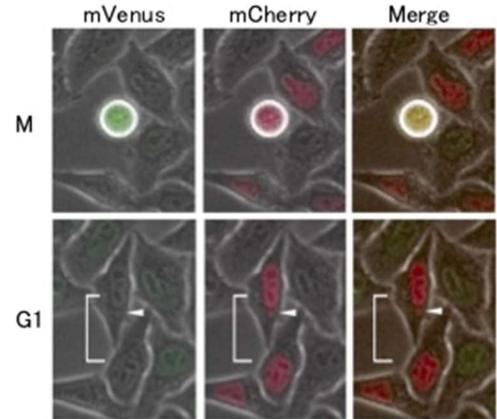


図 3 M 期から G1 期にかけて形成される微小核(矢頭)

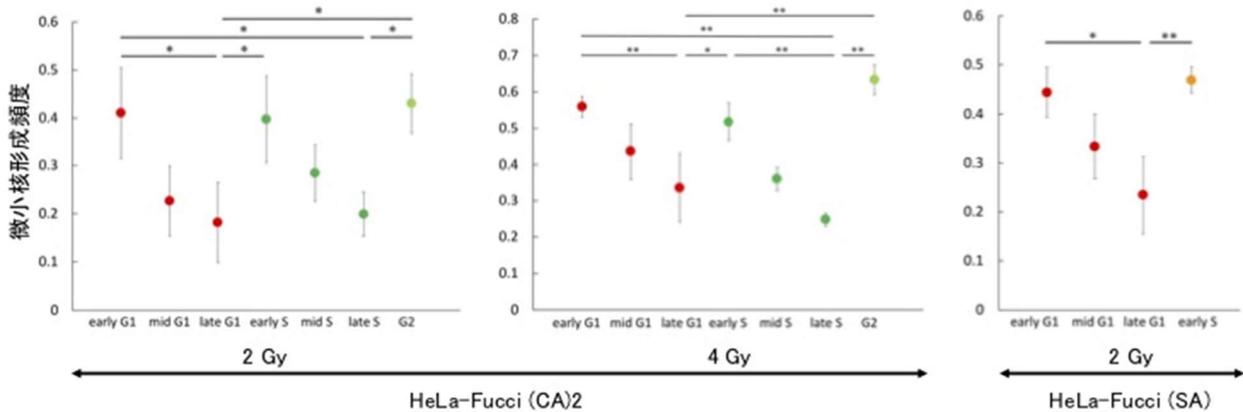


図 4 2 Gy または 4 Gy で種々の細胞周期相にて照射された細胞の微小核形成頻度 * , p<0.05; ** , p<0.01

【研究成果の意義】

これまで、G1 期後期と S 期初期で放射線感受性に特に違いはないと考えられてきましたが、本研究において、精度の高い手法を導入することで、この間に抵抗性から感受性に急激に変化することが新たにわかりました。p53^{*7} の機能やある種の抗がん剤によって、G1 期後期あるいは S 期初期に細胞が停止する場合があります、分割照射を行う放射線治療において、その照射タイミングに示唆を与える知見であると考えられます。細胞周期内での感受性変動の一部は、非相同末端結合^{*8} と S 期に起こる相同組換え^{*9} の働きによって説明できますが、現在のところ、前者しか働かない G1 期内での変動や S 期初期での感受性の分子メカニズムは依然不明であり、今後解決すべき課題となります。

【用語解説】

※1 経時変化撮影

蛍光顕微鏡に小さな培養チャンバーを搭載し、細胞を培養しながら蛍光タンパク質から発する蛍光の様子などを定期的に撮影する装置。動画を構成することも可能。

※2 細胞周期

細胞が2つの娘細胞を生み出す際に、G1期、S期(DNA複製期)、G2期、M期(分裂期)を繰り返す一連の事象。

※3 コロニー形成法

照射された一定数の細胞を培養皿に播いて一定期間培養し、50個以上の細胞からなるコロニー数を数えて、その生存率で放射線感受性を判定する方法。

※4 4つのR

放射線治療で行われる分割照射において、放射線感受性に影響を与える4つの細胞動態で、Recovery/Repair(回復/修復)、Reoxygenation(再酸素化)、Redistribution(再分布)、Repopulation(再増殖)の頭文字をとったもの。Redistributionは、1回目の照射によって抵抗性相の細胞が残存しますが、同調しつつ次の感受性相に移行することを表します。このタイミングで次の照射が行われれば、効率よく細胞死を引き起こすことができます。

※5 Fucci

理研の宮脇博士らが開発した細胞周期を細胞が生きのまま観察できるようにしたシステム。細胞周期依存的にユビキチン化を受け分解されるタンパク質 Cdt1 と Geminin の性質を利用して、赤色および緑色蛍光タンパク質が細胞周期内でそれぞれ Cdt1 と Geminin と同様な制御を受けるようにしたもの。第1世代のプロープ(SA)は、S期とG2期の区別ができませんが、次世代(CA)では可能になっています。

※6 微小核

放射線によってDNA二重鎖切断(DSB)が生じ、修復不全のままM期に進行して核分裂を起こす時に生じる核の断片。この形成頻度は、コロニー法による生存率と相関することが知られています。

※7 p53

がん抑制遺伝子の1つ。様々な機能がありますが、細胞周期をG1後期で止める作用を有します。多くのがん細胞では、この遺伝子に変異を生じており、機能しません。

※8 非相同末端結合

放射線はDSBを引き起こしますが、それを修復する機構の1つ。細胞周期に無関係に働き、誤りがちな修復を行います。

※9 相同組換え

非相同末端結合と並びDSBを修復する機構の1つ。S期でDNA複製が起こり同じ配列を持った染色体が形成された状態でDSBが生じると、DNA損傷のない一方を鋳型として、正確な修復を行います。

【論文情報】

掲載誌: Scientific Reports

論文タイトル: Fluctuation in radioresponse of HeLa cells during the cell cycle evaluated based on micronucleus frequency

著者: Shimono H, Kaida A, Homma H, Nojima H, Onozato Y, Harada H, Miura M

【研究者プロフィール】

下野 宏晃 (シモノ ヒロアキ) Shimono Hiroaki

東京医科歯科大学

顎口腔外科学分野 大学院生

・研究領域

口腔外科学、放射線生物学



三浦 雅彦 (ミウラ マサヒコ) Miura Masahiko

東京医科歯科大学

口腔放射線腫瘍学分野 教授

・研究領域

放射線腫瘍学、放射線生物学



【問い合わせ先】

<研究に関すること>

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

口腔放射線腫瘍学分野 氏名 三浦 雅彦(ミウラ マサヒコ)

TEL:03-5803-5897 FAX:03-5803- 5897

E-mail: masa.mdth@tmd.ac.jp

<報道に関すること>

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp