

博士学位論文

宇宙環境で想定される放射線影響の解析

令和4年3月

茨城大学大学院理工学研究科

量子線科学専攻

大泉 昂之

要旨

現代社会において、宇宙での活動が盛んになってきている。宇宙飛行士の国際宇宙ステーションでの活動に加え、2021年には民間人の宇宙旅行も行われ、さらには月軌道プラットフォームの建設計画も始動している。今後、宇宙での人類の活動がより活発になることは疑いの余地がない。しかしながら、宇宙環境でヒトが体験するストレスは、人体に大きな影響をもたらす、特に宇宙放射線による生物学的影響は無視できないものと想定される。宇宙空間における放射線は、地上の自然放射線よりも線量率が高く、国際宇宙ステーションにおける一日の被ばく線量は 0.5~1.0 mSv になり、地上における自然放射線の約半年分の被ばく線量に相当する。さらに、宇宙放射線の構成成分である He イオン線や C イオン線などの粒子線は、地上の自然放射線と比較してより複雑な DNA 損傷を与える事がこれまでの研究により報告されている。宇宙放射線による生物学的な影響を正確に捉えるためには、宇宙放射線による DNA 損傷に対する詳細な修復メカニズムの解明が非常に重要である。そこで本研究では、地上での模擬宇宙放射線として、プロトン線、He イオン線、そして、C イオン線を細胞に照射し、DNA 損傷の中でも最も重篤な損傷である DNA 二本鎖切断 (Double Strand Break: DSB) の修復について注目した。

本研究では、正常ヒト胎児肺由来線維芽細胞 TIG-3 に各粒子線を照射し、DSB 修復カイネティクスを調べるために、DSB のマーカーとして知られる γ -H2AX の免疫蛍光染色を経時的に行った。我々のデータは、プロトン線や He イオン線と比較して、LET の高い C イオン線照射で誘導された DNA DSB の修復カイネティクスが顕著に遅いことを明確に示した。興味深いことに、平均 γ -H2AX focus サイズは LET に依存して大きくなることが示された。サイズの大きい γ -H2AX には複数の DSB が含まれていることが報告されていることから、LET に依存して増加する大きいサイズの γ -H2AX focus には複数の DSB が含まれている可能性がある。また、本研究では LET に依存して DSB 末端のリセクションを示す RPA32 focus が増加することが示された。G1 期における DSB 末端リセクションを介した DSB 修復は、誤りがちな修復を表している可能性がある。

宇宙放射線は複数の線種の粒子線が含まれており、より正確な宇宙放射線による影響を調べるためには、異なる粒子線を受けた時の複合影響についても解明する必要がある。そこで、宇宙放射線を構成する He イオン線と C イオン線について、カクテルビーム加速による短時間切り替え照射を利用して、混合照射による DNA 損傷の修復について解析した。興味深いことに、本研究のデータは He イオン線と C イオン線の混合照射サンプルの DSB 修復カイネティクスは He イオン線と C イオン線の間速度であることを示した。

まとめると、本研究は、粒子線の LET に依存して修復が難しい DSB の発生頻度が上昇し、DSB 末端リセクションを介した誤りがちな修復が行われることを示唆した。また、異なる粒子線の被ばくは DSB 修復カイネティクスに影響を与えないことを示した。本研究の結果は、宇宙放射線で生じる DSB の修復機構についての洞察を提供し、宇宙放射線による生物学的影響を理解するうえで有用な知見を提供する。

Abstract

In modern society, space activity has been developing. Astronauts work on the International Space Station, in addition, there were civilian space travel in 2021, and plans are underway to build a lunar orbital platform. There is no doubt that human activity in the space will become more active in the future. However, it is assumed that humans are exposed to various stresses in the space environment. In particular, the biological effects of space radiation cannot be ignored. The space radiation has a higher dose rate than natural radiation on the ground, and the daily exposure dose on the International Space Station is 0.5~1.0 mSv which equivalent to about half a year of the natural radiation on the ground (2.4 mSv/year). Furthermore, there were reported that particle beams such as He ion beams and C ion beams, which are components of the space radiation, cause more complex DNA damage than natural radiation on the ground. It is important to elucidate for the detailed repair mechanisms of DNA damage caused by space radiation to understand the biological impact of the space radiation. In this study, we focused on the repair kinetics of DNA double strand break (DSB) which is the most serious DNA damage, after exposure the cells to proton, He ion, and C ion beams as simulated the space radiation.

TIG-3 cells (normal human fetal lung-derived fibroblast) were performed by immunofluorescent staining for γ -H2AX which is a marker of DSB, to elucidate DSB repair kinetics. Our data clearly show that the repair kinetics of DNA DSBs induced by high linear energy transfer (LET) C-ion irradiation were significantly slower than those induced by proton and He ion beams. Interestingly, the average γ -H2AX focus size increased in the LET-dependent manner. It has been reported that larger sized γ -H2AX contain multiple DSBs, thus it is possible that the number of DSBs in a single γ -H2AX focus may increase depending on the LET. Further, the number of RPA32 focus which indicate DSB end resection also increased in a LET-dependent manner. The DSB repair via DSB end resection during G1 phase might represent error-prone repair.

Since space radiation contain multiple types of particle beams, it is necessary to understand the combined effects of exposure to different types of particle beams. Therefore, we analyzed the repair of DNA DSB after the mixed irradiation of He and C ion beams. The DSB repair kinetics of the mixed beam irradiated samples were intermediate in speed between the He and C ion beam kinetics.

In summary, this study suggests that the frequency of difficult to repair DSBs and error-prone repair due to DSB end resection, increase depending on the LET of the particle beam. Our data also indicate that the mixed irradiation does not affect DSB repair kinetics. Our data provide new insight into the understanding of mechanisms repair of DSB induced by space radiation and the biological effects of space radiation.

目次

1. 序論	1
2. 材料と方法	10
2-1 細胞培養	10
2-2 粒子線の照射	10
2-3 免疫蛍光染色	10
2-4 統計処理	11
3. 結果	12
3-1 粒子線で誘導された DSB の修復カイネティクス	12
3-2 複数種の粒子線の照射による DSB 修復への影響	14
3-3 粒子線で誘導された DSB の修復動態の解析	16
3-4 粒子線で誘導された DSB の修復における DSB 末端リセクションの解析	21
4. 考察	24
5. 引用文献	29
6. 謝辞	36

1. 序論

宇宙飛行士のみならず民間人が宇宙旅行する現代社会において、人類の宇宙活動がさらに活発になることは容易に予想できる。しかしながら、人類が宇宙で活動するうえで問題となるのが宇宙放射線の被ばくである。地上での年間の放射線被ばく線量の平均は 2.4 mSv であるのに対し、国際宇宙ステーション (International Space Station: ISS) では一日で 0.5~1 mSv の被ばくをする[1]。また、3 年間かかると想定される火星ミッションでは 1~2 mSv/day の被ばくが予想されており、被ばく総線量は 1 Sv にも及ぶと推定されている[2]。宇宙放射線は、主に太陽エネルギー粒子 (SEP) と銀河宇宙線 (GCR) から構成されており、地上とは異なり、80~90%のプロトン線と 10~20%のヘリウム (He) イオン線、約 1%のリチウムよりも重い原子番号を持つ重粒子線が含まれる[3] (図 1)。粒子線の大きな特徴の一つがブラックピークを持つことである[4]。粒子線は物質を通過する際に、周囲を電離や励起することでエネルギーを失いながら進み、飛程の終点地点でエネルギー損失が最大になり、粒子線のエネルギーはほぼゼロになる。この飛程終点付近での大きなエネルギーを与える領域はブラックピークと呼ばれる。さらに、粒子線のブラックピーク付近での単位長さあたりの物質に与えるエネルギー (線エネルギー付与, Linear Energy Transfer: LET) は X 線や γ 線よりも高く、重粒子線は高 LET 放射線として知られている。宇宙放射線に含まれる高 LET を持つ粒子線は、DNA 分子の 1~2 ヘルックスターン内に複数の損傷を与えるような複雑な損傷であるクラスター損傷を与えることが知られている[5-9] (図 2)。細胞には DNA 損傷を修復する能力が備わっているが、低 LET である X 線や γ 線と比較して、高 LET である重粒子線は二動原体、転座および欠失などを含む染色体異常をより多く引き起こすことが示されている[10-15]。そのため、ゲノム不安定をより誘導する重粒子線は、生物学的影響が比較的大きい。以上のように、地上よりも高い線量率であり、生物学的影響が大きい重粒子線を含む宇宙放射線は、宇宙活動における人類の健康を脅かす大きな要因である。

電離放射線によって生じる複数の DNA 損傷の中で、最もゲノム安定を脅かすのが DNA の二本鎖切断 (Double Strand Break: DSB) である。放射線によって生じた DSB は、標準的な非相同末端結合 (Canonical Non-Homologous End Joining: NHEJ) もしくは相同組み換え (Homologous Recombination: HR)、代替的な末端結合 (Alternative End Joining: a-EJ)、一本鎖アニーリング (Single-Strand Annealing: SSA) のいずれかの修復経路を利用することで修復される[16-20] (図 3)。いずれの DSB 修復経路においても、DSB 発生後に初期反応として DSB 部位周辺のヒストン H2AX (H2A のバリエーション) のリン酸化が起こる[21,22]。電離放射線によって DSB が誘導された後、リン酸化 H2AX (γ -H2AX) に対する免疫蛍光染色を行った場合 (図 4)、数分以内で γ -H2AX focus が観察され、照射後 30 分から 60 分で focus 数と focus サイズが最大になることが知られている[23]。哺乳類細胞の場合、 γ -H2AX は DSB 周辺の数数千万塩基対の範囲で形成されることが報告されており、 γ -H2AX は DSB 修復タンパク質のリクルートや DSB 修復タンパク質が正しく働くための足場の役割を有している

[22–25]。NHEJではまず、DSB末端にKu70/80ヘテロダイマー (Ku) が結合し、続いてリクルートされるDNA-PKcsはKuと複合体を形成する[18,26,27]。また、DSB発生後、53BP1も直ちにDSB部位にリクルートされ、NHEJの前駆体であるPro-NHEJが形成される[16,18,28,29]。その後、ArtemisによるDSB末端リセクションとXRCC4、XLFおよびDNA ligase IVを含む複合体によってDSB末端同士が再結合される[16,29]。通常、NHEJでのDSB末端リセクションは20塩基以内で行われる[16]。Kuおよび53BP1は広範囲なDSB末端リセクションを抑制すると考えられている因子である[18] (図5)。KuはRNF138依存的なユビキチン化やMRE11によってDSB末端から除去されると考えられている[27,30]。また、DSB末端からの53BP1の除去は、BRCA1とPP4Cによる53BP1の脱リン酸化により起こる[18] (図4)。高解像度イメージングにより、BRCA1依存的に53BP1 focusは、時間経過に伴いDSBの中心から周辺に再配置され、53BP1 focusの拡大が起こることが明らかにされている。拡大した53BP1 focusの中心には、DSB末端リセクション後に形成される一本鎖DNA (single strand DNA: ssDNA) に局在化するRPA focusが形成されることが証明されている[18] (図6)。

CtIPとMRN (MRE11-RAD50-NBS1) 複合体は、二本鎖DNA (double strand DNA: dsDNA) の5'から3'方向へ広範囲のDSB末端リセクションを行い、3'突出の一本鎖DNAを生成することで、a-EJやSSA、HRによる修復経路が利用可能になるための反応を起こす[16,29,31]。NHEJ因子に変異がある、もしくはDSB末端への局在異常が生じて、NHEJが利用できない場合に利用されるa-EJでは、DSB末端リセクションにより生成された3'突出のssDNAのマイクロホモロジーを利用してDSB末端の再結合を行う[16,32]。a-EJではDNA polymerase θ (Pol θ) とDNA ligase IもしくはDNA ligase IIIが利用される[16]。CtIPとMRN複合体によるDSB末端リセクションに続いて、BLMとEXO1はより広範囲に3'突出のssDNAを形成、RPAがssDNAに結合し、相同配列を利用して再結合するSSA、もしくは姉妹染色分体を利用するHRによりDSBが修復される[16,33–35]。

以上のように、電離放射線によって誘発されたDSBの修復には様々な修復経路が存在することが知られている。DSB修復経路の選択には、DSBが生じた周辺のクロマチン構造やクラスター損傷の有無、そして細胞周期が大きく関与している[16–18,20,28–30]。ヘテロクロマチン領域でDSBが生じた場合や、クラスター損傷を伴うDSBに対しては、CtIPやMRN複合体によるDSB末端リセクションが起こりやすい[18,29,36]。また、姉妹染色分体が存在するS/G2期ではHRが利用される頻度が上昇する[20]。しかしながら、宇宙放射線によって生じたDSBに対して、どのような修復機構が働くかは不明な点が多い。特に高LETを持つ粒子線によって生じたDSBは、低LET放射線と比較して、より多くのDNA損傷を含むクラスター損傷がDSB修復タンパク質のリクルートを妨害して、正常なDSB修復のプロセスが行えない可能性が高い[36]。宇宙放射線による生物学的な影響を正確に捉える為には宇宙放射線によるDNA損傷の修復の詳細なメカニズムの解明が非常に重要である。そのため、宇宙放射線を模擬した地上での実験によって、宇宙放射線により生じる

DNA 損傷の修復について詳細に解析を行う必要がある。国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構の高崎量子応用研究所のイオン照射研究施設 (Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application: TIARA) では宇宙放射線を構成するプロトン線、He イオン線そしてカーボン (C) イオン線を細胞に照射することができる[37]。さらに、宇宙放射線が複数のイオン種で構成されていることに関して、TIARA ではカクテルビーム加速による短時間切り替え照射技術により、He イオン線と C イオン線を 30 分以内に同じサンプルに照射することが可能である[37]。

本研究の目的は、宇宙放射線を模擬した地上での実験から宇宙放射線によって生じる DNA 損傷の修復解析を行うことである。そこで本研究では、模擬宇宙放射線として、TIARA においてプロトン線、He イオン線、そして、C イオン線を細胞に照射し、DNA 損傷の中でも最も重篤な損傷である DSB の修復について注目した。まず、各粒子線で生じた DSB の修復カイネティクスを調べるために、照射後 12 時間までで細胞を固定し、DSB マーカーである γ -H2AX に対する免疫蛍光染色を行った。 γ -H2AX は DSB 周辺で形成されるため、免疫蛍光染色で観察できる γ -H2AX focus をカウントすることで、DSB 数を評価することができる[22,23,25] (図 4)。また、 γ -H2AX focus は DSB の修復に伴い消失することが分かっており[22]、 γ -H2AX focus 数から DSB 修復を追跡できる。さらに、 γ -H2AX focus サイズは、focus 内に含まれる DSB 数に依存し、X 線よりも C イオン線照射サンプルで複数の DSB を含む比較的サイズの大きい γ -H2AX focus の数が増加していることが近年報告された[38]。粒子線は、LET に依存して電離の密度が高くなることから、一つの γ -H2AX focus 内に含まれる DSB の数が LET に依存し、 γ -H2AX focus サイズが変化することが予想された。そこで、 γ -H2AX focus サイズへの線種の影響を調べるために、 γ -H2AX focus サイズを各粒子線照射サンプルで比較した。次に、宇宙放射線が複数のイオン種で構成されていることを考慮し、複数の線種を被ばくしたことによる DSB 修復カイネティクスへの影響について調べた。ここでは、30 分以内に He イオン線と C イオン線を同じ細胞に対して照射を行い、 γ -H2AX に対する免疫蛍光染色を行うことで DSB 修復カイネティクスについて解析した。また、粒子線で誘導された DSB の修復について、どのような DSB 修復経路が使われているのかを調べるために、修復経路の選択に重要なタンパク質である 53BP1 と DSB 末端リセクションのマーカーで、RPA のサブユニットである RPA32 について免疫蛍光染色を行った。

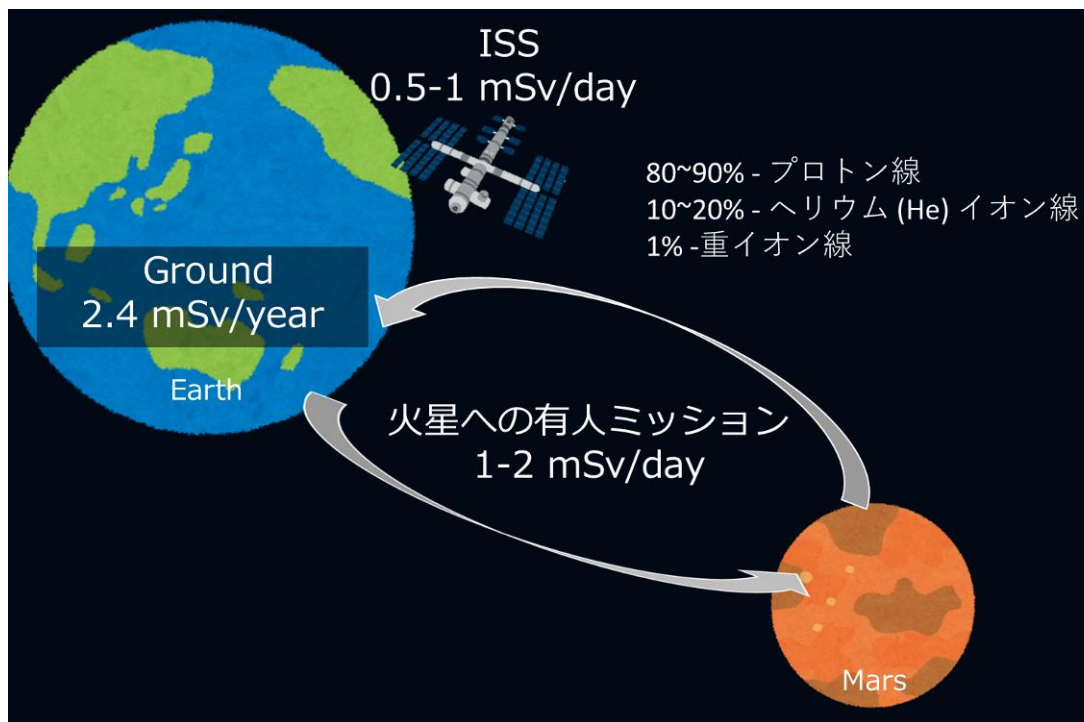


図 1. 宇宙放射線の概要

宇宙環境において人は、太陽エネルギー粒子と銀河宇宙線からなる宇宙放射線にさらされることになる。放射線の線量率は地球の地上では平均 2.4 mSv/year であるが、国際宇宙ステーション (International Space Station: ISS) では 0.5-1 mSv/day である[1]。また、3年間かかると想定される火星ミッションでは 1-2 mSv/day の被ばくが予想されており、被ばく総線量は 1 Sv にも及ぶと推定されている[2]。宇宙放射線には 80~90%のプロトン線と 10~20%の He イオン線、約 1%のリチウムよりも重い原子番号を持つ重粒子線が含まれる[3]。

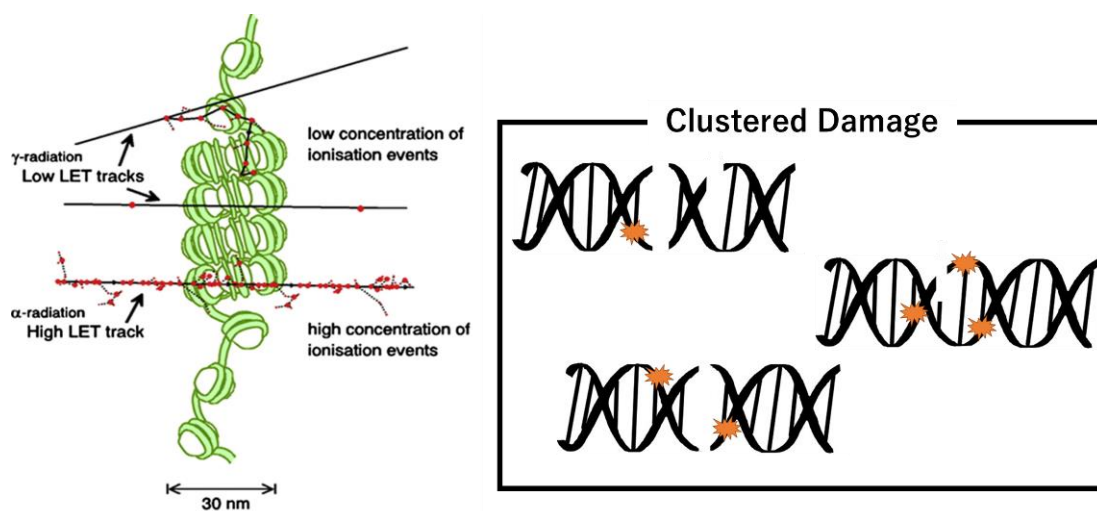


図2. 一本の放射線飛跡の通過で生じる DNA 損傷のタイプの概略図 [参考文献[9]の Figure 1 より引用、一部改変]

低 LET 放射線である X 線や γ 線と比較して、高 LET 放射線は高密度に電離作用を引き起こすため、複数の DNA 損傷が近距離で形成されるようなクラスター損傷を誘導しやすい。右側の概略図の橙色の星印は、DNA の塩基または糖の損傷を表している。本稿において、DNA 分子の 1~2 ヘルックスターン内に複数の DNA 損傷が形成されることを DNA のクラスター損傷として定義する[5]。

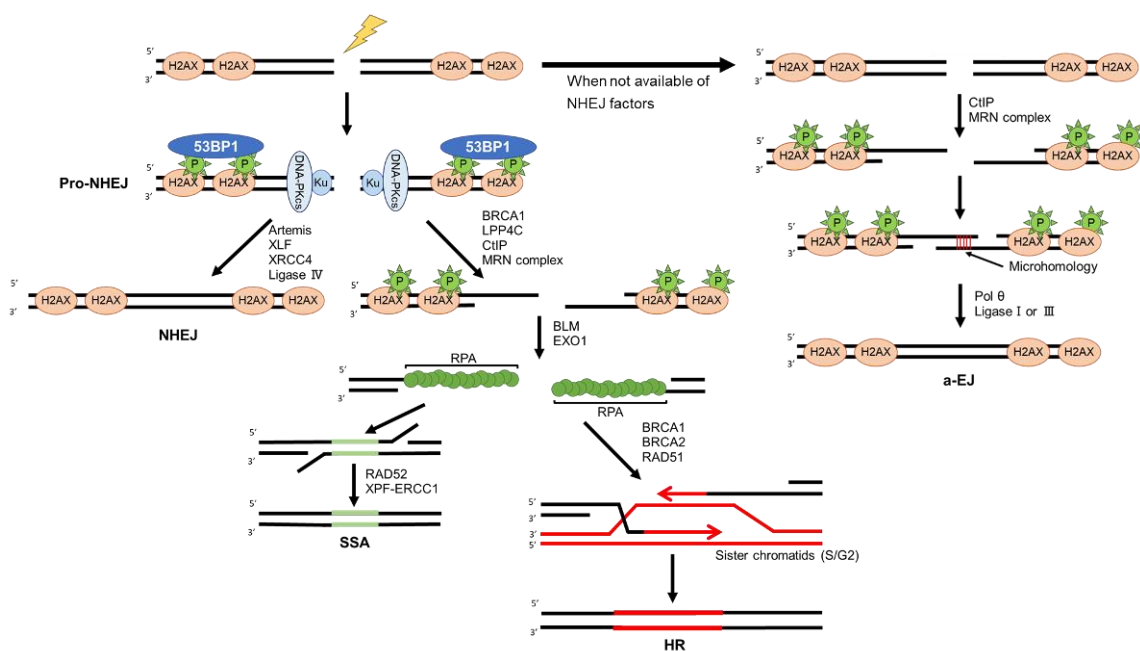


図 3. DSB 修復経路選択の概略図

初めに DSB 末端に Ku と DNA-PKcs および 53BP1 がリクルートされ、NHEJ の前駆体である Pro-NHEJ が形成される[16,18,28,29]。また、DSB が生じた際、DSB 周辺の H2AX がリン酸化され、 γ -H2AX が DSB 周辺に形成される[21–23]。 γ -H2AX は、DSB 修復タンパク質のリクルートや働きを補助する役割を持つ。非相同末端結合 (canonical Non-Homologous End Joining: NHEJ) による修復では、Pro-NHEJ が形成された後、Artemis による DSB 末端リセクションと XRCC4、XLF および DNA ligase IV を含む複合体によって DSB 末端同士が再結合される[16,29]。通常、NHEJ では広範囲なりセクションが必要なく、DSB 末端リセクションは 20 塩基以内で行われる。Ku や 53BP1 は DSB 末端リセクションを制限する役割を持つ[18]。一方、CtIP と MRN 複合体は、Pro-NHEJ の状態から一本鎖アニーリング (Single-Strand annealing: SSA) や相同組み換え (Homologous Recombination: HR) を利用できる環境を作るために ssDNA の伸張を生成する、DSB 末端リセクションを行う[18,39]。CtIP と MRN 複合体に続いて、BLM と EXO1 はさらなりセクションを行い、RPA が ssDNA に結合する。その後、SSA と姉妹染色分体を鋳型として修復を行う HR を促進する[16,33–35]。代替的な末端結合 (alternative End Joining) は NHEJ 因子に変異がある、もしくは DSB 部位への局在異常が生じて NHEJ が利用できないときに利用される。a-EJ では、CtIP と MRN 複合体による DSB 末端リセクション後、25 塩基以下のマイクロホモロジーを利用して DSB 末端の再結合を行う[16,32]。

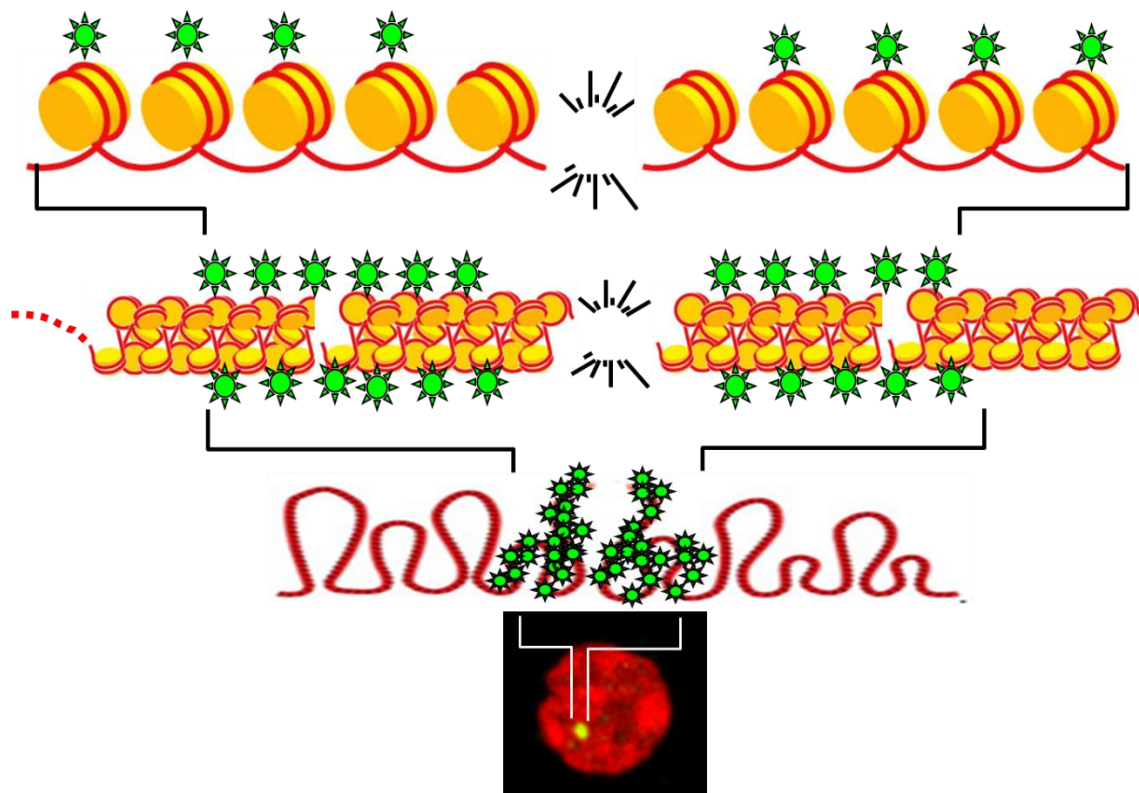


図 4. γ -H2AX focus 形成の概略図

DSB 発生後、直ちに H2AX のリン酸化が DSB 部位周辺で起こる[21–23]。そのため、 γ -H2AX 特異的抗体による免疫蛍光染色を用いると DSB 部位を γ -H2AX focus として検出することが可能であり、 γ -H2AX focus 数は DSB 数を反映している。下の図は実際に γ -H2AX について緑色の蛍光色素を用いて免疫蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した時の写真である。赤色はヨウ化プロピジウムで染色された核 (DNA) であり、緑色 (赤色と重なり、写真は黄色に見える) は γ -H2AX を表している。

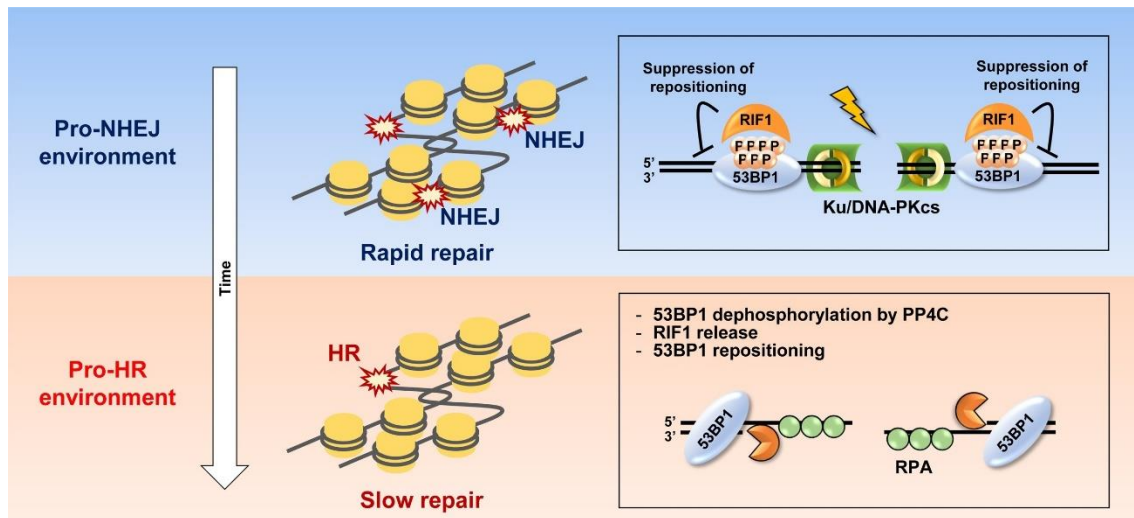


図 5 照射された G2 期細胞における NHEJ 前段階から HR への環境構築の制御 [参考文献 [18]の Figure 4 より引用]

DSB が生じると、DSB 末端に Ku や DNA-PKcs、53BP1 が結合することで、NHEJ の前駆体である Pro-NHEJ が形成される。低 LET 放射線による DSB 誘導から 2 時間以内に、約 70% の DSB は NHEJ によって速やかに修復される。この時間内では、リン酸化された 53BP1 と RIF1 がクロマチン上に維持される。RIF1 の存在は 53BP1 の再配置を抑制する。DSB 誘導後 1-2 時間以上経過すると、53BP1 は PP4C などの脱リン酸化酵素により脱リン酸化される。この反応は BRCA1 によって促進される。この脱リン酸化により RIF1 はクロマチン上から除去され、53BP1 の再配置がおこり、DSB 部位に DSB 末端リセクションに必要な EXO1 などのヌクレアーゼが存在できるようになる。

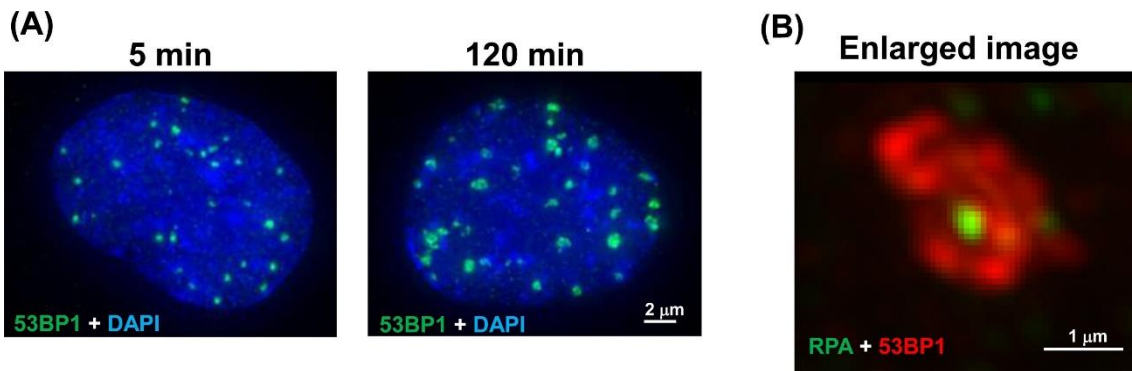


図 6. 高解像度イメージングによる G2 期の 53BP1 focus の再配置 [参考文献[18]の Figure 3 より引用]

(A) 照射後 5 分において、G2 期細胞内の 53BP1 は小さな focus を形成している。一方、照射後 2 時間では、BRCA1 依存的に 53BP1 が DSB 中心から周辺に再配置される。

(B) 照射後 2 時間の G2 期細胞における 53BP1 および RPA の拡大された染色画像。再配置され、拡大した 53BP1 focus の中心に DSB 末端リセクションを示す RPA が局在する。

2. 材料と方法

2-1 細胞培養

ヒト胎児肺線維芽細胞 TIG-3-20 は、国立研究開発法人医薬基盤研究所の JCBR セルバンクから購入した。TIG-3-20 は、10%牛胎児血清 (Lot: 173012, Sigma-Aldrich) 及び 100 µg/ml penicillin/streptomycin (09367-34, ナカライテスク) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (043-30085, Wako) で、37°C、5%CO₂の湿潤下で培養された。TIG-3-20 は 35 から 45 の間の population doubling levels (PDL) のものを使用した。

2-2 粒子線の照射

量子科学技術研究開発機構の高崎量子応用研究所の TIARA において AVF930 サイクロトロン (住友重機械工業) で加速した 20 MeV のプロトン線、63 MeV の He イオン線および 190 MeV の C イオン線を細胞に照射した。細胞表面における LET 値は、プロトン線が 2.73 keV/µm、He イオン線が 13.2 keV/µm、C イオン線が 117 keV/µm である。また、各粒子線の線量率は、プロトン線が 4.0 Gy/min、He イオン線が 1.4 Gy/min、C イオン線が 3.4 Gy/min である。本研究で用いている粒子線はブラックピーク手前の領域を使っているため、サンプルのわずかな位置のずれは、照射された線量にほとんど影響されないように設定されている。また、培地によって粒子線のエネルギーを損失しないように、照射直前に培養容器から培養液を一時的に抜き取った。さらに、室温での照射中に試料が乾燥および汚染されないように、ポリイミドフィルム (東レ・デュポン株式会社) の薄いシートで容器に蓋をした。対照細胞は照射細胞と同時に培地を抜き取り、照射細胞に培地を戻すタイミングで対照細胞にも培地を戻した。照射後、培地を戻された細胞は 5 %の CO₂ 下でインキュベートした後に培地をアスピレートし、1×PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄) で洗浄し、4 % パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) (163-20145, Wako) で 10 分間の固定を室温で行った。RPA32 について染色する場合には PFA 固定の前に、0.2% tween-20 (P-1379, Sigma-Aldrich)/1×PBS 溶液で室温 5 分間処理した。

2-3 免疫蛍光染色

照射後 PFA で固定された細胞を 70 % エタノールを用いて一晩 4°C 下で膜透過処理した。親水処理のために 30 分間室温で 1×PBS 中に浸した後、4 % bovine serum albumin (A7184, Sigma-Aldrich)、0.5 % TWEEN20 及び 0.1% Triton X-100 (X-100, Sigma-Aldrich)/1×PBS の溶液下で 1 時間室温反応させた。その後、一次抗体溶液と 2 時間室温で反応させた: γ-H2AX (1:1000, 05-636, Millipore)、53BP1 (1:500, NB100-305, Novus Biologicals)、RPA32 (1:1000, GTX70258, Gene Tex)。一次抗体反応後、1×PBS の入れ替えを二回行うことで洗浄し、続けて二次抗体溶液と 1 時間室温で反応させた: Anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed secondary Antibody, Alexa 488 (1:400, A-11029, Thermo Fisher Scientific)、Anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed secondary Antibody, Alexa555 (1:500, A-21424, Thermo Fisher

Scientific)、Anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed secondary Antibody, Alexa 555 (1:500, A-21429, Thermo Fisher Scientific)。二次抗体反応後、1×PBS の入れ替えを三回行うことで洗浄し 500 µg/ml RNaseA (740505, Macherey-Nagel) で 37°C、15 分間処理した。一次抗体反応および二次抗体反応、RNaseA 処理は保湿チャンバー内で行った。RNaseA 処理後、1×PBS の入れ替えを二回行うことで洗浄し、マウント剤を滴下した。マウント剤には VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with Propidium Iodide (H-1300, Vector Laboratories) もしくは、VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (H-1200, Vector Laboratories) を使用した。落射蛍光顕微鏡 (BX53, OLYMPUS) を用いて蛍光を観察した。γ-H2AX および 53BP1、RPA32 focus は、無作為で撮影した撮影領域から 100 個の細胞について目視によりカウントし、各実験条件におけるカウントしたすべての細胞で平均化した。γ-H2AX focus や 53BP1 focus サイズは、倍率 400 倍で撮影した画像について ImageJ を用いてピクセル単位で求めた。

2-4 データ処理

γ-H2AX、53BP1 および RPA32 の focus 数について、照射群間の差は、Microsoft excel 2016 を用いて、各時点で F 検定によって二群間の分散について検定した後、等分散の場合は Student の t-test、等分散でない場合には Welch の t-test を用いて解析した。いずれの t-test も両側検定で行った。また、γ-H2AX focus や 53BP1 focus のサイズの分布や中央値をサンプル間で比較するために R version 4.0.2 を用いてボックスプロットを作成した。

3. 結果

3-1 粒子線で誘導された DSB の修復カインेटイクス

宇宙放射線に含まれる重粒子線の占める割合は 1% であるが、重粒子線は DNA にクラスター損傷を誘導するためその生物学的影響は大きいと考えられる [3,5-9] (図 2)。宇宙放射線による生物学的影響を正確に評価するためには、プロトン線や He イオン線、重粒子線の被ばくによって細胞がどのような応答を示すのかを明確にしなければならない。そのため、本研究では、放射線被ばく後の初期イベントである DNA 損傷応答、特に DSB の修復について注目した。初めに、粒子線で生じた DSB の修復カインेटイクスについて調べるために、プロトン線、He イオン線、もしくは C イオン線を TIG-3 細胞に照射し、 γ -H2AX に対する免疫蛍光染色を行った (図 7A)。照射後 1 時間における一細胞あたりの平均 γ -H2AX focus 数はプロトン線が 15.9 ± 2.2 (γ -H2AX foci/cell \pm 標準偏差) 個、He イオン線が 14.0 ± 1.0 個、C イオン線が 11.8 ± 3.0 個であった (図 7B)。いずれの線種による照射においても照射後 1 時間と比較して、照射後 12 時間にかけて γ -H2AX focus 数が減少していることから、DSB の修復が行われていることが示された。照射後 12 時間における細胞あたりの平均 γ -H2AX focus 数はプロトン線が 3.5 ± 0.5 個、He イオン線が 2.5 ± 1.3 個、C イオン線が 5.0 ± 0.5 個であった。照射後 1 時間に対して照射後 12 時間に残存している γ -H2AX focus 数の割合は、プロトン線が 22%、He イオン線が 18%、C イオン線が 42% であり、C イオン線照射によって生じた γ -H2AX focus はプロトン線や He イオン線と比較して多く残存していることが分かった。以上のことから、C イオン線照射によって生じた DSB の修復カインेटイクスは遅いことが示唆された。

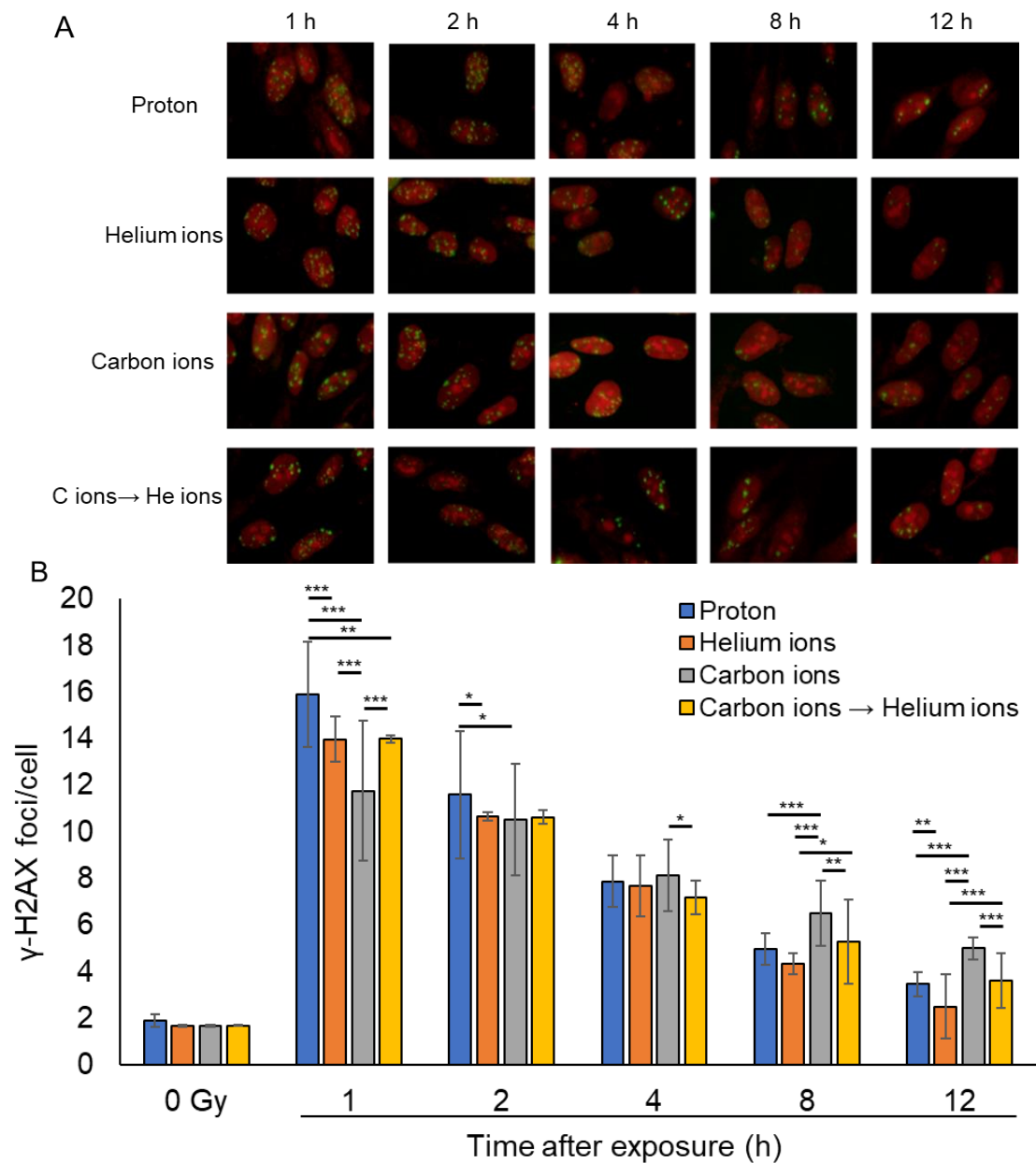


図7. 粒子線照射後の経時的な細胞当たりの平均 γ -H2AX focus 数の変化

(A) γ -H2AX の免疫蛍光画像 (緑: γ -H2AX, 赤: ヨウ化プロピジウム)。TIG-3-20 細胞に、エネルギー20MeV のプロトン線 (LET: 2.73 keV/ μ m)、63MeV の He イオン線 (LET: 13 keV/ μ m)、190MeV の C イオン線 (LET: 117 keV/ μ m) を 1 Gy 照射した。混合照射サンプルは、C イオン線 0.5 Gy を照射した後に He イオン 0.5 Gy を照射した。ビームの切り替えに 20-30 分程度を要した。(B) 1Gy 照射後の細胞あたりの γ -H2AX focus の平均個数。100 個の細胞について γ -H2AX focus をカウントしてデータを取得した (proton: n=2, He ions および C ions: n=3, C ions \rightarrow He ions: n=2, Error bars: SD., t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001)。

3-2 複数種の粒子線の照射による DSB 修復への影響

宇宙においては様々な線種の被ばくを受けるため[3] (図 1)、宇宙放射線によって生じた DSB の修復をより正確に理解するうえで、複数の線種を照射された細胞における DSB 修復について解析を行う必要がある。そこで、本研究では、C イオン線照射後に He イオン線照射を行うことで、複数の線種の混合照射による DSB 修復カインेटイクスへの影響を調べた。C イオン線 0.5 Gy 照射した後、He イオン線 0.5 Gy 照射した混合照射サンプルの γ -H2AX focus 数は、特に照射後 8、12 時間で C イオン線と He イオン線のおよそ中間の値をとることが示された (図 7B)。C イオン線と He イオン線の照射後 8 時間の一細胞あたりの平均 γ -H2AX focus 数はそれぞれ 6.52 ± 1.4 (γ -H2AX foci/cell \pm 標準偏差) 個、 4.4 ± 0.4 個であるのに対し、混合照射では 5.3 ± 1.8 個であった。また、照射後 12 時間後では、C イオン線と He イオン線がそれぞれ 5.0 ± 0.5 個と 2.5 ± 1.3 個であるのに対し、混合照射では 3.6 ± 1.2 個であった。以上のことから、C イオン線と He イオン線の混合照射によって生じた DSB は、それぞれ単一の線種で照射した場合の中間の修復カインेटイクスで修復されることが示唆された。しかしながら、C イオン線と He イオン線の照射の間隔がおよそ 30 分あるため、照射の順番で修復カインेटイクスが変化する可能性が考えられた。そこで、C イオン線照射後に He イオン線を照射されたサンプルと He イオン線照射後に C イオン線を照射されたサンプルについて γ -H2AX の免疫蛍光染色を行い、照射の順番で修復カインेटイクスが変化するのかを調べた。C イオン線照射後に He イオン線を照射されたサンプルと He イオン線照射後に C イオン線を照射されたサンプルの平均 γ -H2AX focus 数はそれぞれ、照射後 1 時間では 19.3 ± 0.6 個と 18.9 ± 1.7 個、2 時間では 16.2 ± 0.9 個と 15.6 ± 0.6 個、4 時間では 11.4 ± 1.0 個と 11.4 ± 1.9 個、8 時間では 7.9 ± 0.4 個と 8.1 ± 1.1 個、12 時間では 5.9 ± 0.7 個と 5.9 ± 0.9 個であった (図 8)。以上のように、細胞当たりの平均 γ -H2AX focus 数は照射の順番で変化しないことが明らかになり、照射の順番で修復カインेटイクスが変化しないことがわかった。以上の結果から、混合照射によって生じた DSB は、それぞれ単一の線種で照射した場合の中間の修復カインेटイクスで修復されることが示され、DSB 修復カインेटイクスに混合照射による影響はないと考えられる。

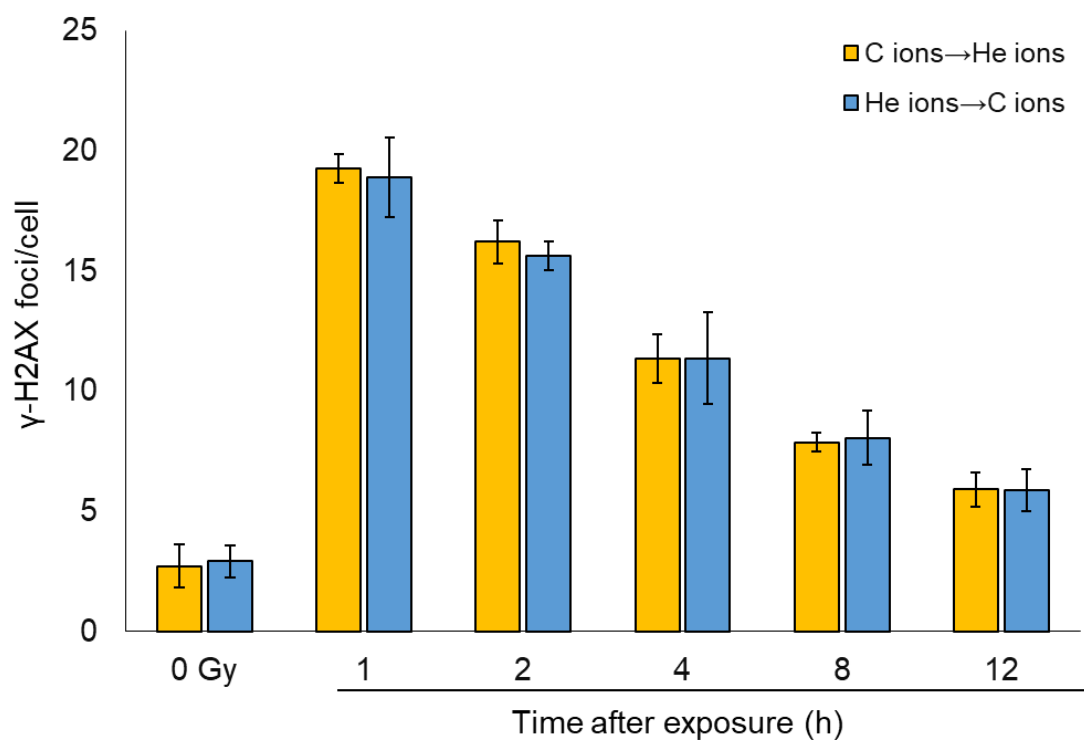


図 8. 異なる線種の粒子線を照射した後の経時的な γ -H2AX focus 数の変化

TIG-3-20 細胞に C イオン線 0.5 Gy を照射した後に He イオン 0.5 Gy を照射 (C ions → He ions)、もしくは He イオン線 0.5 Gy を照射した後に C イオン 0.5 Gy を照射 (He ions → C ions) をした。ビームの切り替えに 20-30 分程度を要した。照射後の細胞あたりの γ -H2AX focus の平均個数は、100 個の細胞について γ -H2AX focus をカウントしてデータを取得した (n=3, Error bars: SD.)。

3-3 粒子線で誘導された DSB に対する γ -H2AX および 53BP1 focus 動態の解析

γ -H2AX focus サイズへの線種の影響を調べるために、 γ -H2AX の focus サイズを各粒子線照射サンプルで比較した。照射後 1 時間における γ -H2AX focus サイズは、プロトン線 (LET: 2.73 keV/ μ m) が 14.1 ± 3.2 (focus の平均 pixel \pm 標準偏差) pixels、He イオン線 (LET: 13.2 keV/ μ m) が 15.0 ± 5.1 pixels、C イオン線 (LET: 117 keV/ μ m) が 21.9 ± 5.3 pixels であった (図 9A)。 γ -H2AX focus サイズは LET のレベルと正の相関性があり、LET が高いほど生じる γ -H2AX focus サイズが大きくなることが示された。

次に、時間経過に伴う γ -H2AX focus サイズの変化を調べるために、個々の focus サイズの分布を表現できるボックスプロットを行った。いずれの照射群においても γ -H2AX focus サイズの中央値は照射後 1 時間から照射後 12 時間まで大きく変化しなかった (図 9B, C, D)。また、プロトン線と He イオン線照射サンプルでは、照射後 1 時間の第三四分位数と比較して、照射後 12 時間の第三四分位数が増加していることから、サイズの大きい γ -H2AX focus の割合が増加していることが示唆された。一方で、プロトン線や He イオン線照射サンプルと比較して、四分位範囲の大きさから C イオン線照射サンプルの focus サイズの分布は照射後 1 時間で、ばらつきが大きく、照射後 12 時間でもばらつきの大きさは変化しなかった。このことは、C イオン線照射によって生じた γ -H2AX focus サイズの分布はほとんど変化しないことを示唆している。

次に、粒子線で誘導された DSB の修復に使われる修復経路について調べるために、53BP1 の免疫染色を行った。53BP1 は、DSB 末端リセクションを制御することで DSB 修復経路のスイッチングを制御する、DSB 修復プロセスにとって重要なタンパク質である [29,39–41]。照射後 1 時間での細胞当たりの平均 53BP1 focus 数は、プロトン線が 14.5 ± 1.0 (53BP1 foci/cell \pm 標準偏差) 個、He イオン線が 12.0 ± 2.9 個、C イオン線が 8.4 ± 1.5 個であった (図 10A, B)。また、照射後 12 時間における細胞当たりの平均 53BP1 focus 数はプロトン線が 2.3 ± 0.2 個、He イオン線が 2.3 ± 0.5 個、C イオン線が 4.8 ± 1.4 個であった。照射後 1 時間に対して照射後 12 時間に残存している 53BP1 focus 数の割合はプロトン線が 16%、He イオン線が 19%、C イオン線が 57%であり、 γ -H2AX focus と同様に、C イオン線照射によって生じた 53BP1 focus はプロトン線や He イオン線と比較して多く残存していることが分かった。これらのデータは、 γ -H2AX focus に見られる C イオン線照射サンプルでの遅い DSB 修復を支持するものである。

照射後 1 時間における 53BP1 focus サイズは、 γ -H2AX と同様に LET 依存的に増加した (図 11A)。興味深いことに、プロトン線および He イオン線照射サンプルでは、53BP1 focus サイズの中央値は照射後 1 時間から 4 時間で増加した (図 11B, C)。プロトン線および He イオン線照射サンプルの第三四分位数が 2 時間から 4 時間で増加していることから、サイズの大きい 53BP1 focus の割合が増加していることが明らかになった。一方、C イオン線照射サンプルでは、照射後 1 時間の 53BP1 focus サイズの中央値は、プロトン線および He イオン線照射後 4 時間と同等であり、時間の経過とともに focus サイズのわずかな増大が見ら

れた(図 10D)。しかしながら、C イオン線照射 1 時間から 12 時間までで四分位範囲の大きさがほとんど変わらないことから、C イオン線によって誘導される 53BP1 focus のサイズのばらつきは変化しないことが示唆された。

これらの結果は、特にプロトン線と He イオン線照射サンプルにおいて、大きな 53BP1 focus は残りやすく、小さな 53BP1 focus は減少しやすい、もしくは時間経過に伴い focus サイズが拡大することを示唆しているのかもしれない。実際、53BP1 focus の拡大に関して、BRCA1 活性化に伴う 53BP1 の再配置により、電離放射線の照射直後よりも照射後 2 時間でより大きな focus サイズをもたらすことが報告されている[18]。

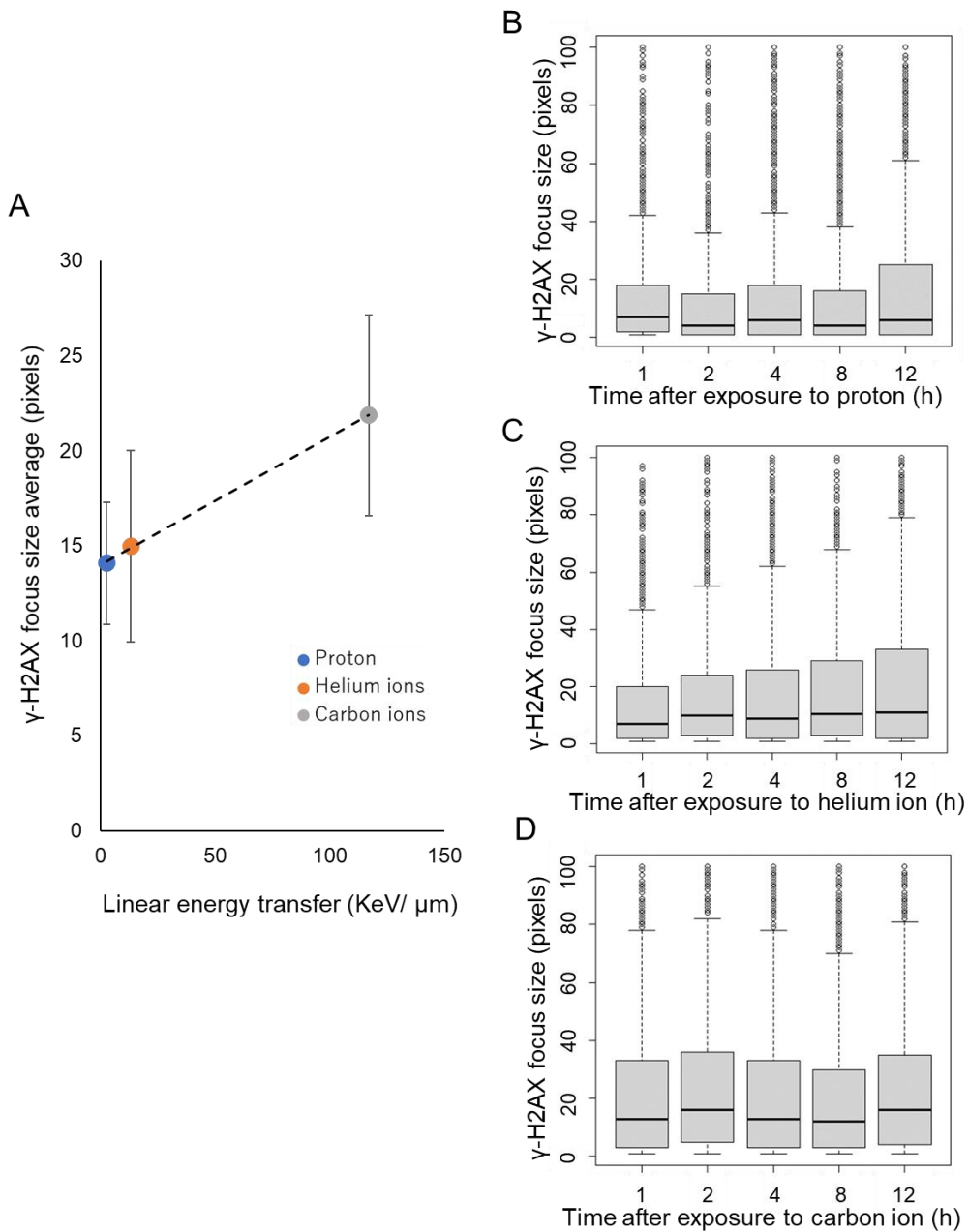


図9. 粒子線照射後の γ -H2AX focus サイズ変化

(A) 照射後 1 時間における平均 γ -H2AX focus サイズと LET の関係。破線は近似直線 ($R^2=0.995$) を示す (proton: $n=2$, He ions および C ions: $n=3$, Error bars: SD.)。 (B-D) 照射後の時間と γ -H2AX focus の大きさの関係についてのボックスプロット: (B)はプロトン線、(C)は He イオン線、(D)は C イオン線について表している。

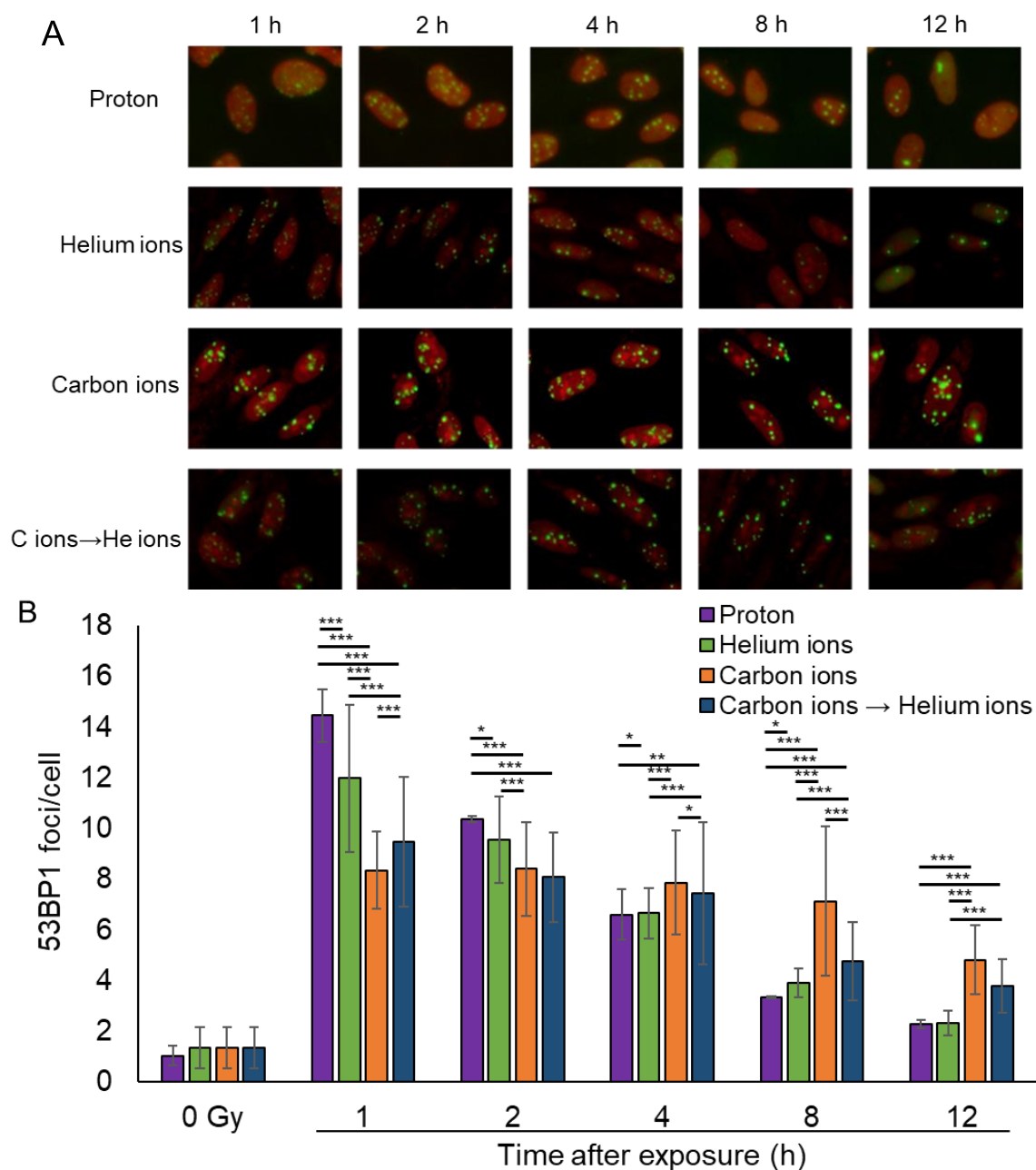


図 10. 粒子線照射後の経時的な細胞当たりの平均 53BP1 focus 数の変化

(A) 53BP1 の免疫蛍光画像 (緑: 53BP1, 赤: ヨウ化プロピジウム)。TIG-3-20 細胞に、エネルギー20MeV のプロトン線 (2.73 keV/ μm)、63MeV の He イオン線 (13 keV/ μm)、190MeV の C イオン線 (117 keV/ μm) を 1 Gy 照射した。混合照射サンプルは、C イオン線 0.5 Gy を照射した後に He イオン 0.5 Gy を照射した。ビームの切り替えに 20-30 分程度を要した。(B) 1Gy 照射後の細胞あたりの 53BP1 focus の平均個数。100 個の細胞について 53BP1 focus をカウントしてデータを取得した (proton: n=2, He ions および C ions, C ions→He ions: n=3, Error bars: SD., t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001)。

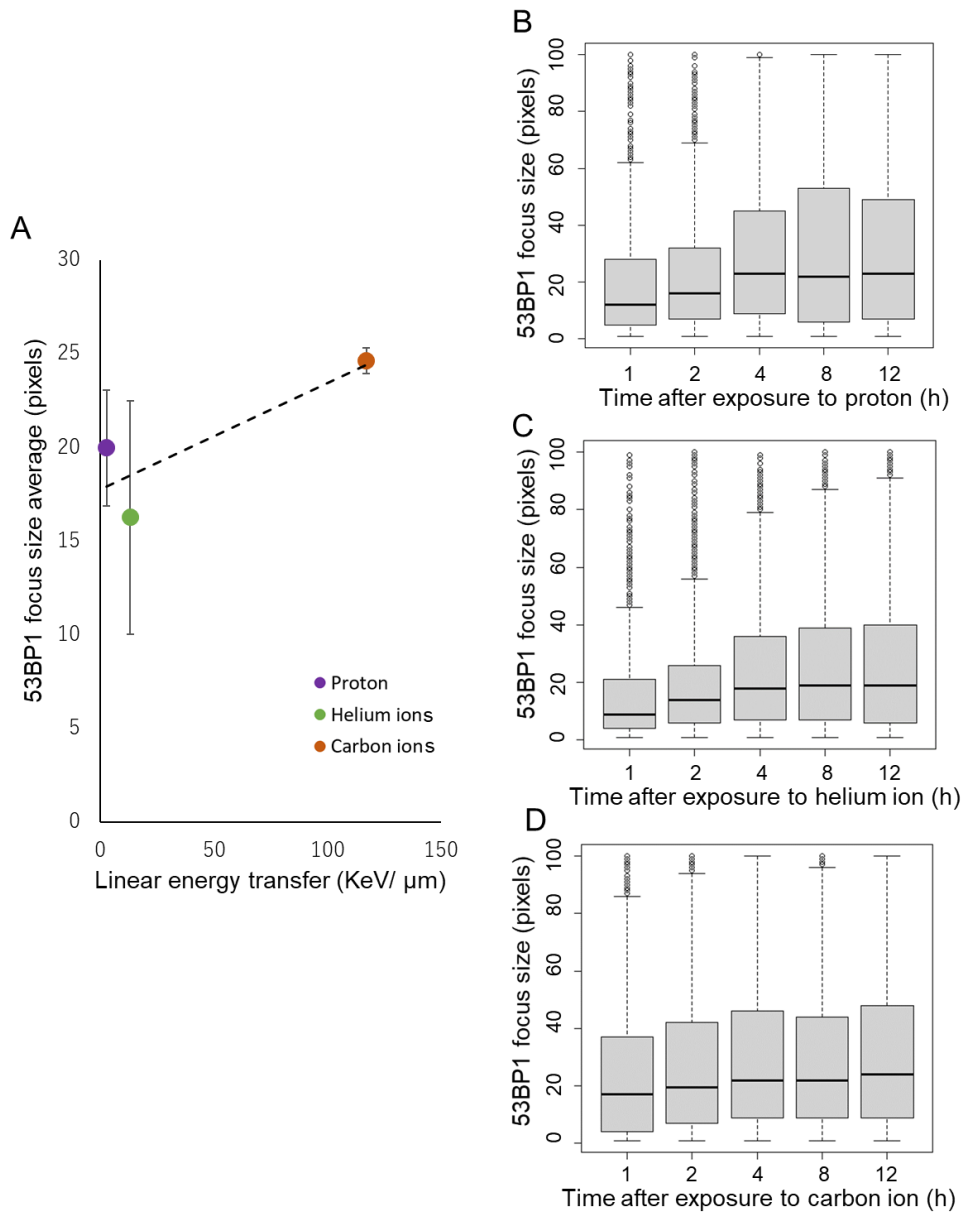


図 11. 粒子線照射後の 53BP1 focus サイズ変化

(A) 照射後 1 時間における平均 53BP1 focus サイズと LET の関係。破線は近似直線 ($R^2=0.7336$) を示す (proton: $n=2$, He ions および C ions: $n=3$, Error bars: SD.). (B-D) 照射後の時間と 53BP1 focus の大きさの関係についてのボックスプロット: (B)はプロトン線、(C)は He イオン線、(D)は C イオン線について表している。

3-4 粒子線で誘導された DSB の修復における DSB 末端リセクションの解析

53BP1 focus サイズの拡大に関して、G2 期細胞では BRCA1 活性化に伴う 53BP1 の再配置により、電離放射線の照射直後よりも照射後 2 時間でより大きな focus サイズをもたらすことが報告されている[18] (図 6)。53BP1 focus の再配置が起きた後、DSB 末端リセクションにより ssDNA が形成され、ssDNA には RPA がローディングされることが知られている[38]。そこで、本研究で確認された時間経過に伴う 53BP1 focus サイズの中央値増加が 53BP1 の再配置を表している可能性について検討した。本研究において、C イオン照射サンプルで 53BP1 focus サイズの最大の中央値が 24 pixels になるため、25 pixels 以上の focus を大きいサイズの focus として扱った。従って、本研究では 53BP1 の再配置が起きていないと考えられる小さいサイズの focus を 1-24 pixels の範囲、53BP1 の再配置を示すと考えられる大きいサイズの focus を 25-100 pixels の範囲と定義して、各サイズに共局在する RPA 陽性率について評価した。

初めに、RPA のサブユニットである RPA32 についての免疫蛍光染色を行った後、細胞当たりの平均 RPA32 focus 数を求めた。He イオン線照射後 1 時間での細胞当たりの平均 RPA32 focus は 1.1 ± 0.4 (RPA32 foci/cell \pm 標準偏差) 個、照射後 4 時間で 2.2 ± 0.5 個、12 時間で 1.2 ± 0.4 個であった。また、C イオン線照射後 1 時間での細胞当たりの平均 RPA32 focus は 1.7 ± 0.4 個、照射後 4 時間で 3.6 ± 0.8 個、12 時間で 2.1 ± 0.3 個であった。いずれのタイムポイントにおいても、細胞当たりの RPA focus は He イオン線よりも C イオン線照射サンプルの方が多いたことが分かった (図 12A, B)。以上の結果は、He イオン線と比較して C イオン線照射サンプルではより多くの DSB 末端リセクションが起こることを示唆している。

本研究で観察された時間経過に伴う 53BP1 focus サイズの中央値の増加が、DSB 末端リセクションのための 53BP1 の再配置を示しているかを調べるために、53BP1 focus と共局在する RPA32 focus の割合に注目した。53BP1 focus サイズの中央値の増加が観察された 4 時間以降において、He イオン線照射サンプルでは、小さいサイズの 53BP1 focus (1-24 pixels) に共局在している RPA32 focus の割合は 20.4% に対して、大きいサイズの 53BP1 focus (25-100 pixels) に共局在している RPA32 focus の割合は 9.2% であった (図 12C)。また、照射後 12 時間で 53BP1 focus に共局在している RPA32 focus の割合はそれぞれ小さいサイズでは 27.8%、大きいサイズでは 22.0% であった (図 12C)。以上のことから、He イオン線照射サンプルにおいて、53BP1 focus サイズの中央値の増加は、DSB 末端リセクションのための 53BP1 の再配置とは関係がないことが示された。一方、C イオン線照射サンプルの照射後 12 時間では、小さいサイズの 53BP1 focus に局在している RPA32 focus の割合が 37.1% に対して、大きいサイズの 53BP1 focus に局在している RPA32 focus の割合は 58.7% であった (図 12D)。このことは He イオン線照射サンプルと異なり、照射後 12 時間において C イオン線照射サンプルでは小さいサイズよりも大きいサイズの 53BP1 focus でより多くの RPA32 focus が共局在していることを示している。しかしながら、C イオン線照射サ

サンプルで見られるわずかな 53BP1 focus サイズの中央値の増加は照射後 1 時間から 4 時間の間で起こり、照射後 4 時間では 53BP1 focus サイズによって RPA32 の共局在の割合は変化しないことから、53BP1 focus の再配置とわずかな 53BP1 focus サイズの中央値の増加は関係ない可能性が高い。

次に、He イオン線照射サンプルと C イオン線照射サンプルの 53BP1 focus に共局在している RPA32 focus の割合について比較を行った。C イオン線照射 1 時間での 53BP1 focus に共局在している RPA32 focus の割合は、それぞれ小さいサイズでは 24.6%、大きいサイズでは 16.8%であった (図 12D)。対して、He イオン線照射 1 時間での共局在の割合はそれぞれ小さいサイズでは 9.1%、大きいサイズでは 9.2%であり (図 12C)、C イオン線照射サンプルの方が 53BP1 により多くの RPA32 focus が共局在していた。さらに C イオン線照射 1 時間での 53BP1 focus に共局在している RPA32 focus の割合は、He イオン線照射 4 時間での共局在の割合 (それぞれ 20.4%と 9.2%) よりも多いことも示された (図 12C, D)。このことは、C イオン線照射サンプルでは He イオン線照射サンプルよりも DSB 末端リセクションが早く起こることを示唆している。

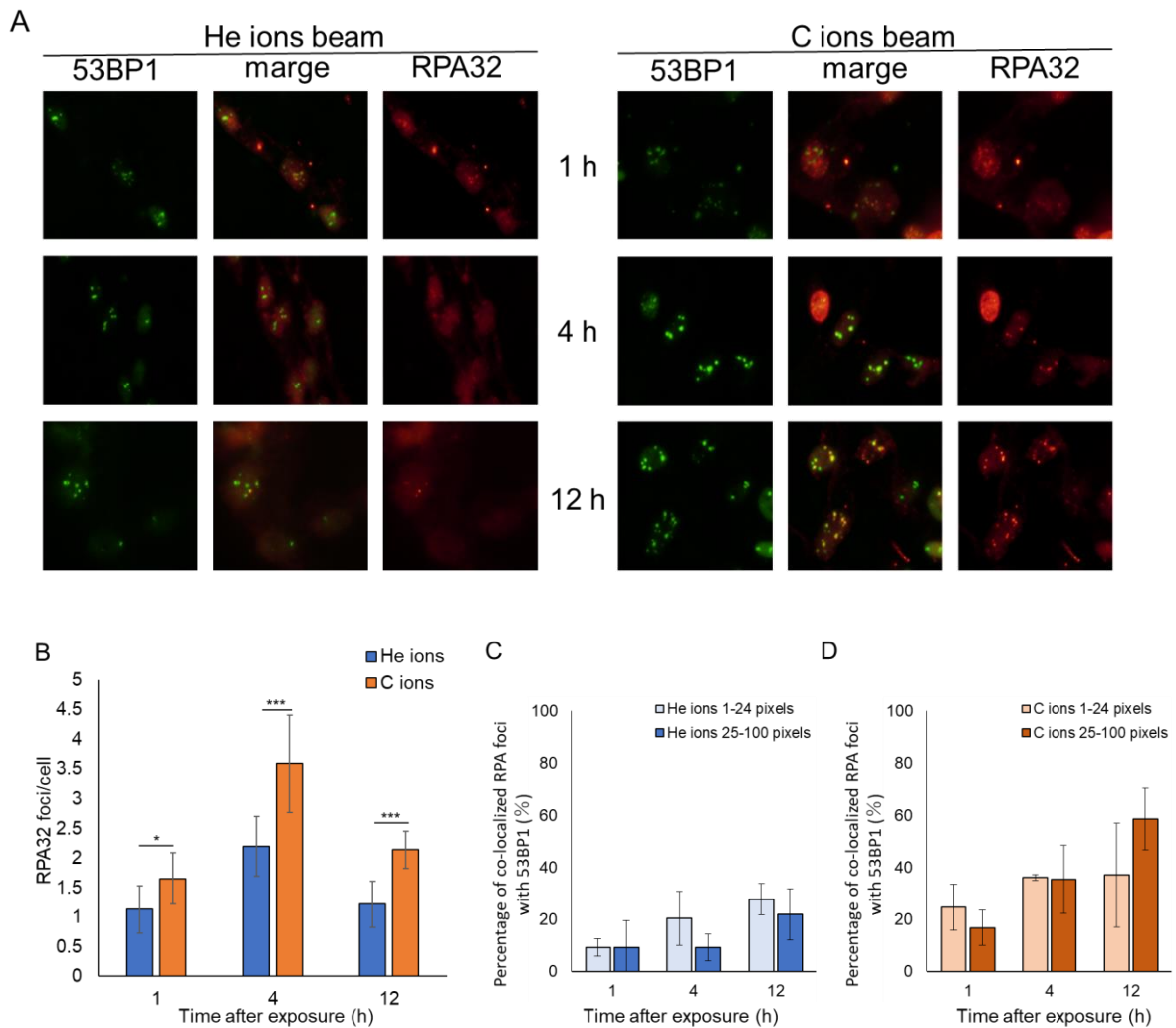


図 12. 粒子線照射後の細胞当たりの平均 RPA focus 数と 53BP1 focus に共局在する RPA32 focus の割合

(A) 53BP1 と RPA32 の免疫蛍光画像 (緑: 53BP1, 赤: RPA32)。TIG-3-20 細胞に、エネルギー 63MeV の He イオン線 (LET: 13 keV/μm) もしくは 190MeV の C イオン線 (LET: 117 keV/μm) を 0.5 Gy 照射した。(B) 0.5 Gy 照射後の細胞あたりの RPA32 focus の平均個数。100 個の細胞について RPA32 focus をカウントしてデータを取得した (n=3. Error bars: SD., t-test: * p < 0.05, *** p < 0.001)。(C, D) Image J で 53BP1 focus サイズを測定した。C イオン照射サンプルで 53BP1 focus サイズの中央値は最大で 24 pixels になるため、本実験では、小さい focus サイズとして 1-24 pixels、大きい focus サイズとして 25-100 pixels に分けて、53BP1 に共局在している RPA32 focus の割合をプロットした (n=3)。

4. 考察

DNA のクラスター損傷は、DNA 分子の 1~2 ヘリックスターン内の複数の DNA 損傷として定義されており、DNA のクラスター損傷の修復は困難であることが知られている[5-9]。そこで、初めに本研究ではプロトン線、He イオン線または C イオン線照射後の DSB 修復カイネティクスについて調べるために、各粒子線照射を行った後、 γ -H2AX に対する免疫蛍光染色を行った。電離放射線によって DSB が誘導された後、 γ -H2AX に対する免疫蛍光染色を行った場合、数分以内で γ -H2AX focus が観察され、照射後 30 分から 60 分で細胞当たりの focus 数が最大になることが知られている[23] (図 4)。また、 γ -H2AX focus は DSB の修復に伴い消失することが分かっており[22]、 γ -H2AX focus 数から DSB 修復を追跡できる。各粒子線照射後の経時的な γ -H2AX focus 数の変化から、プロトン照射または He イオン細胞と比較して、より高 LET の C イオン線が照射された細胞の DSB 修復カイネティクスが有意に遅いことが示された (図 7B)。これらの結果は、比較的より多くのクラスター損傷を誘発すると予想される高 LET の C イオン線によって誘導された DSB は、修復することが難しいことを明確に示している。

今回、粒子線のイオン種に関係なく LET と γ -H2AX focus サイズに正の相関があることが確認された (図 9A)。 γ -H2AX focus サイズに関して、照射後数分間に γ -H2AX focus が形成された後、時間経過とともに focus サイズが拡大することが知られている[22,42]。哺乳類細胞において、最終的に γ -H2AX は DSB 周辺の数千万塩基対の範囲で形成される[23]。 γ -H2AX focus の拡大には MDC1 による ATM シグナル強化が関与することが報告されており、一般的には放射線照射後 1 時間で focus サイズが最大になることが知られている[42,43]。

本研究における γ -H2AX focus サイズの評価は、照射後 1 時間以降で行っているため、今回確認された γ -H2AX focus サイズの違いは、時間経過に伴う MDC1 および ATM による γ -H2AX focus の拡大とは異なる現象であると考えられる。一方で、低 LET 放射線である X 線と高 LET 放射線である C イオン線を照射された細胞の γ -H2AX focus のサイズを比較した研究では、C イオン線照射後の γ -H2AX focus の体積が X 線で観察されたものよりも有意に大きかったことが報告されている[38]。Three-Dimensional Structured Illumination Microscopy (3D-SIM) の超解像度イメージングによる分析は、 γ -H2AX focus の体積の増加と γ -H2AX focus に含まれる RPA focus の数に相関があることを示した。RPA は DSB 末端がリセクションを受けた後の ssDNA に局在するため、RPA focus は DSB 末端を示すといえる。以上の報告から、 γ -H2AX focus のサイズは、focus に含まれる DSB 数に依存する可能性があると考えられる[38]。照射された粒子線の線種によって一つに含まれる DSB 数が異なることを考えると、粒子線照射後 1 時間における γ -H2AX focus 数は、誘導された DSB 数を正確に反映しないかもしれない。しかしながら、照射後 12 時間において、C イオン線照射サンプルの有意な γ -H2AX focus 数の残存は、C イオン線で生じた DSB の修復が遅いことを示している可能性が高い。

電離放射線で誘導された DSB は、早いプロセスおよび遅いプロセスの二相性の動態を介

して修復される[18,44,45] (図 5)。DSB が生じると、DSB 末端には Ku と DNA-PKcs が結合し、続いて DSB 末端に 53BP1 がリクルートされ、NHEJ の前駆体、Pro-NHEJ の状態が形成される[18]。早い修復プロセスでは Pro-NHEJ の状態から Artemis による DSB 末端切除と XRCC4、XLF および DNA ligase IV のリクルートによって NHEJ が進行することで DSB が修復される[16,18,26,27]。遅いプロセスでは pro-NHEJ の状態から BRCA1 の活性化に伴う 53BP1 の再配置によって DSB 末端リセクションが開始され、NHEJ とは別の修復経路が利用される環境になる[18,39]。遅い修復プロセスは、主にヘテロクロマチン領域またはクラスター損傷を伴う DSB 部位で起こることが知られている[26,46]。本研究において、プロトン線や He イオン線と比較して C イオン線が照射された細胞の DSB 修復カイネティクスが有意に遅いため、C イオン線照射サンプルでは遅いプロセスによる修復が多く利用されると示唆された。

次に本研究では、修復経路選択に重要な 53BP1 について免疫蛍光染色をしたところ、53BP1 focus のサイズは照射後 4 時間以降で増加することが示された (図 11)。G2 期細胞の高解像度イメージングにおいて、BRCA1 活性化を介した 53BP1 の再配置は、電離放射線の照射直後よりも照射後 2 時間でより大きな focus サイズをもたらすことが報告されている[18] (図 6)。再配置によってサイズが拡大した 53BP1 focus の内側に、DSB 末端リセクションで生成された ssDNA に局在する RPA が focus を形成することも報告されている[18]。そのため、本研究で確認された時間経過に伴う 53BP1 focus サイズの中央値増加が 53BP1 の再配置を表している可能性について検討した。53BP1 と RPA32 について免疫蛍光染色を行ったところ、He イオン線照射サンプルでは、いずれのタイムポイントにおいても小さいサイズの focus と比較して、大きいサイズの 53BP1 focus に共局在する RPA32 focus の割合が増加しないことが示された (図 12C)。また、C イオン線照射サンプルに関しては、照射後 12 時間でのみ、小さいサイズの focus と比較して大きいサイズの 53BP1 focus に共局在する RPA32 focus の割合が増加していた (図 12D)。特に 53BP1 focus サイズの変化が明らかであった He イオン線照射後 4 時間において、53BP1 focus サイズによって RPA32 の共局在の割合が変化しないことから、本研究で観察された 53BP1 focus サイズの増加は、BRCA1 活性化を介した 53BP1 の再配置とは関係しないことが考えられた。

一方で、本研究では He イオン線と比較してより高い LET を持つ C イオン線で、細胞当たりの平均 RPA32 focus 数が多いことが示された (図 12A)。このことは、LET 依存的に DSB 末端リセクションを伴う修復が利用されやすくなることを示唆している。G1 期細胞において、クラスター損傷を伴う DSB 修復には CtIP のリン酸化が必要であることが示されており、G2 期のみならず G1 期においても DSB 末端リセクションが起こることが報告されている[8,20,39,47]。また、G2 期と同様に G1 期において、DSB 末端リセクションで形成される ssDNA には RPA が局在することも報告されている[26,48]。さらに G1 期における CtIP 依存的な DSB 末端リセクションは、誤りがちな修復が促進されることが報告されている。DSB が近距離に複数ある場合、DSB 末端リセクションで形成された ssDNA がマイク

ロホモロジーなどを利用して間違っただ染色体同士を結合してしまう可能性がある[48,49]。例えば同じ染色体内で間違っただ末端同士の結合は染色体の欠失を引き起こし、異なる染色体間での結合は二動原体及び転座などの染色体間交換などが起こると考えられる。以上のことから、LET 依存的に DSB 末端リセクションを介した誤りがちな修復が起こりやすくなると考えられる。

興味深いことに、He イオン線照射後 4 時間と比較して、C イオン線照射後 1 時間で 53BP1 に共局在する RPA32 focus の割合が高かった (図 12C, D)。このことは、C イオン線を照射されたサンプルでは、He イオン線よりも早い段階で DSB 末端リセクションが起きていることを示唆するのかもしれない。クラスター損傷を伴う DSB において、DSB の付近に DNA 一本鎖切断 (Single Strand Break: SSB) が存在する場合、SSB をきっかけにして EXO1 依存的な DSB 末端リセクションが早い段階で起こる[36]。また、DSB 付近に塩基損傷があり、塩基除去修復によって SSB が発生した場合でも DSB 末端リセクションのきっかけになりうる。DSB 末端リセクションによって形成された ssDNA に RPA がローディングされ、DSB 末端リセクションを介した修復に続くと考えられる。SSB を伴う DSB 部位では、Ku が DSB 末端に結合できない、もしくは 3' から 5' 方向にヌクレアーゼ活性を持つ MRE11 などによってすみやかに Ku が除去されることで[36,50,51]、Pro-NHEJ の状態を省略して、DSB 末端リセクションが起きているのかもしれない。Pro-NHEJ を介さない修復は、NHEJ のバックアップ的役割を持つ a-EJ のような修復につながる。以上のことを踏まえると、より複雑な損傷を誘導する C イオン線を照射されたサンプルで、He イオン線よりも早い段階で DSB 末端リセクションが起きているのも不思議ではない。

本研究ではさらに、宇宙放射線を構成する He イオン線と C イオン線について、TIARA のカクテルビーム加速による短時間切り替え照射技術[37]を利用して、混合照射による DSB 修復カイネティクスへの影響を調べた。混合照射サンプルの γ -H2AX focus 数はそれぞれ He イオン線と C イオン線照射サンプルの中間の値を示した (図 7B)。さらに、照射の順番を入れ替えても DSB 修復カイネティクスが変化しないことから (図 8)、異なる線種の混合照射が DSB 修復のカイネティクスに影響を与えない可能性が示された。しかしながら、本研究では細胞毒性などの他の影響については評価していないため、混合照射が DSB 修復カイネティクス以外の側面に影響を与える可能性を排除すべきではない。Hada M. *et al.* は、混合照射の間隔によって染色体異常の頻度が異なることを報告しており、プロトン線照射と鉄イオン線照射の間隔が 30 分の時に染色体異常の頻度が最大になることを示した [52]。したがって、混合照射の効果は、DSB 修復のカイネティクスではなく修復の精度に影響を与えている可能性がある。

まとめると本研究では、LET に依存して修復の難しい DSB が誘導されることを明確化した。本研究では LET に依存して γ -H2AX focus の平均サイズが増加することを示し、大きいサイズの γ -H2AX focus には複数の DSB とクラスター損傷が含まれていると推察された。さらに LET に依存して DSB 末端リセクションが起こる頻度が高くなることを示し、

DSB 末端リセクションを介した誤りがちな修復が起こる可能性を示した。複数の DSB が近接して形成された場合、DSB 末端リセクションによって形成された ssDNA がマイクロホモロジーを利用して間違った DSB 末端同士を結合してしまう可能性がある。加えて、本研究では、異なる粒子線を被ばくしたことによる DSB 修復カイネティクスへの影響はない可能性をはじめて示した。本研究結果とこれまでの報告から示唆される粒子線で生じた DSB の修復経路の概要を図 13 に示した。

以上の結果から、宇宙放射線に含まれる高 LET を持つ粒子線によって生じた DSB 対しては、DSB 末端リセクションを介した誤りがちな修復を起こしやすいことが明らかになった。本研究で得られた知見は、宇宙放射線で生じる DSB の修復機構についての洞察を提供し、宇宙放射線による生物学的影響の評価や生物学的影響を低減させる方策を考えるうえで有用となるはずである。

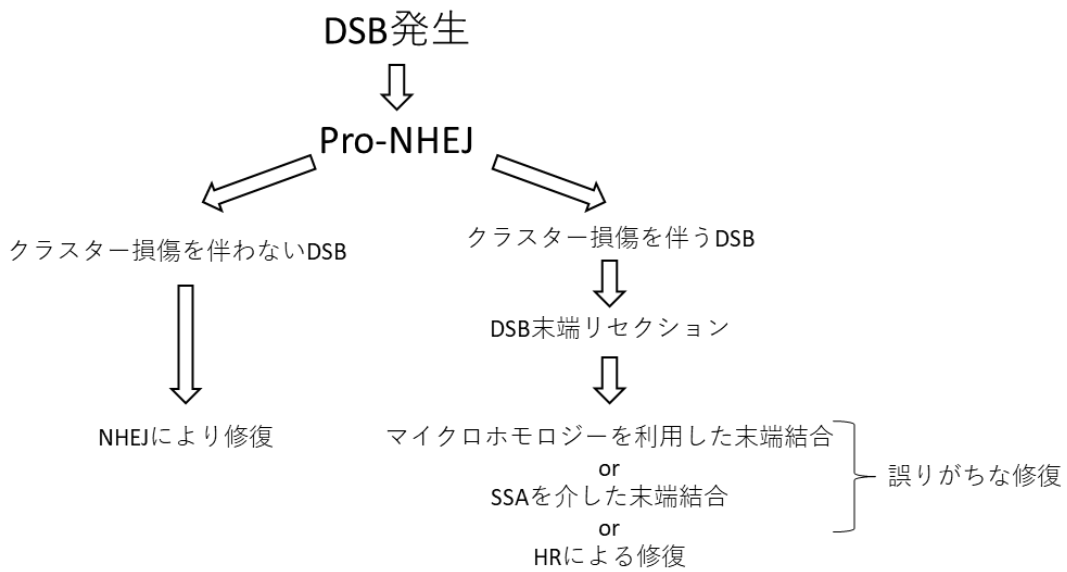


図 13. これまでの報告と本研究結果から考えられる粒子線で生じた DSB の修復経路の概要
放射線によって DSB が発生した場合、DSB 末端には Ku や DNA-PKcs、53BP1 がリクルートされ、NHEJ の前駆体である Pro-NHEJ が形成される[18]。クラスター損傷を伴わない DSB もしくは Artemis による 20 塩基以内の DSB 末端リセクションで末端が再結合できる場合、最終的に NHEJ によって DSB が修復される[16]。一方、クラスター損傷を伴う DSB では、Pro-NHEJ 形成後に、53BP1 や Ku が DSB 末端から除かれ、CtIP や MRN 複合体により DSB 末端リセクションが起こり、3'突出の ssDNA が形成される[18,29,36]。また、図には示していないが Ku などが結合できないような DSB 末端の場合には、Pro-NHEJ の状態を介さずに DSB 末端リセクションが起こる可能性も考えられる[36,50,51]。DSB 末端リセクションが起こる頻度は LET に依存し、さらに LET 依存的に一つの γ -H2AX focus に含まれる DSB 数が増加する可能性[38]を考えると、LET 依存的に異なる DSB 末端同士を結合する確率が上昇することが考えられる。なお、細胞周期が S 期後半から G2 期で、姉妹染色分体が無傷の場合には、DSB 末端リセクション後に HR によって正確に修復されることも考えられる[18]。

5. 引用文献

1. Cucinotta FA, Kim MH, Willingham V, George KA. Physical and biological organ dosimetry analysis for international space station astronauts. *Radiat Res.* 2008 Jul;170(1):127-38. doi: 10.1667/RR1330.1
2. Hassler DM, Zeitlin C, Wimmer-Schweingruber RF, Ehresmann B, Rafkin S, Eigenbrode JL, Brinza DE, Weigle G, Böttcher S, Böhm E, Burmeister S, Guo J, Köhler J, Martin C, Reitz G, Cucinotta FA, Kim MH, Grinspoon D, Bullock MA, Posner A, Gómez-Elvira J, Vasavada A, Grotzinger JP; MSL Science Team. Mars' surface radiation environment measured with the Mars Science Laboratory's Curiosity rover. *Science.* 2014 Jan 24;343(6169):1244797. doi: 10.1126/science.1244797.
3. Ohnishi K, Ohnishi T. The biological effects of space radiation during long stays in space. *Biol Sci Space.* 2004 Dec;18(4):201-5. doi: 10.2187/bss.18.201.
4. Kumari S, Mukherjee S, Sinha D, Abdisalaam S, Krishnan S, Asaithamby A. Immunomodulatory Effects of Radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 31;21(21):8151. doi: 10.3390/ijms21218151
5. Hada M, Georgakilas AG. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res.* 2008 May;49(3):203-10. doi: 10.1269/jrr.07123.
6. Cucinotta FA, Durante M. Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):431-5. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70695-7.
7. Lorat Y, Timm S, Jakob B, Taucher-Scholz G, Rube CE. Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation. *Radiother Oncol.* 2016 Oct;121(1):154-161. doi: 10.1016/j.radonc.2016.08.028.
8. Yajima H, Fujisawa H, Nakajima NI, Hirakawa H, Jeggo PA, Okayasu R, Fujimori A. The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. *DNA Repair (Amst).* 2013 Nov;12(11):936-46. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.08.009.
9. Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2013 Oct;25(10):578-85.

doi: 10.1016/j.clon.2013.06.007.

10. George, K. & Cucinotta, F. A. The influence of shielding on the biological effectiveness of accelerated particles for the induction of chromosome damage. *Adv. Sp. Res.* **39**, 2007. 1076-1081. DOI: 10.1016/j.asr.2007.01.004.
11. Loucas BD, Durante M, Bailey SM, Cornforth MN. Chromosome damage in human cells by γ rays, α particles and heavy ions: track interactions in basic dose-response relationships. *Radiat Res.* 2013 Jan;179(1):9-20. doi: 10.1667/RR3089.1.
12. George K, Willingham V, Wu H, Gridley D, Nelson G, Cucinotta FA. Chromosome aberrations in human lymphocytes induced by 250 MeV protons: effects of dose, dose rate and shielding. *Adv Space Res.* 2002;30(4):891-9. doi: 10.1016/s0273-1177(02)00406-4.
13. Hada M, Ikeda H, Rhone JR, Beitman AJ, Plante I, Souda H, Yoshida Y, Held KD, Fujiwara K, Saganti PB, Takahashi A. Increased Chromosome Aberrations in Cells Exposed Simultaneously to Simulated Microgravity and Radiation. *Int J Mol Sci.* 2018 Dec 22;20(1):43. doi: 10.3390/ijms20010043.
14. Asaithamby A, Hu B, Chen DJ. Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 17;108(20):8293-8. doi: 10.1073/pnas.1016045108.
15. Yamanouchi S, Rhone J, Mao JH, Fujiwara K, Saganti PB, Takahashi A, Hada M. Simultaneous Exposure of Cultured Human Lymphoblastic Cells to Simulated Microgravity and Radiation Increases Chromosome Aberrations. *Life (Basel).* 2020 Sep 10;10(9):187. doi: 10.3390/life10090187.
16. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Aug;18(8):495-506. doi: 10.1038/nrm.2017.48.
17. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Nov;20(11):698-714. doi: 10.1038/s41580-019-0152-0.

18. Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutat Res.* 2017 Oct;803-805:51-55. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.011.
19. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5706-15. doi: 10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003.
20. Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Löbrich M, Jeggo PA. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 2011 Mar 16;30(6):1079-92. doi: 10.1038/emboj.2011.27
21. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998 Mar 6;273(10):5858-68. doi: 10.1074/jbc.273.10.5858.
22. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Dec;8(12):957-67. doi: 10.1038/nrc2523
23. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 1999 Sep 6;146(5):905-16. doi: 10.1083/jcb.146.5.905.
24. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science.* 2002 May 3;296(5569):922-7. doi: 10.1126/science.1069398
25. Redon CE, Nakamura AJ, Sordet O, Dickey JS, Gouliava K, Tabb B, Lawrence S, Kinders RJ, Bonner WM, Sedelnikova OA. γ -H2AX detection in peripheral blood lymphocytes, splenocytes, bone marrow, xenografts, and skin. *Methods Mol Biol.* 2011;682:249-70. doi: 10.1007/978-1-60327-409-8_18.
26. Biehs R, Steinlage M, Barton O, Juhász S, Künzel J, Spies J, Shibata A, Jeggo PA,

- Löbrich M. DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol Cell*. 2017 Feb 16;65(4):671-684.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.016.
27. Chanut P, Britton S, Coates J, Jackson SP, Calsou P. Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nat Commun*. 2016 Sep 19;7:12889. doi: 10.1038/ncomms12889.
 28. Shibata A, Jeggo PA. Roles for the DNA-PK complex and 53BP1 in protecting ends from resection during DNA double-strand break repair. *J Radiat Res*. 2020 Sep 8;61(5):718-726. doi: 10.1093/jrr/rraa053.
 29. Shibata A, Jeggo PA. Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2020 Sep;93:102915. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102915.
 30. Ismail IH, Gagné JP, Genois MM, Strickfaden H, McDonald D, Xu Z, Poirier GG, Masson JY, Hendzel MJ. The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nat Cell Biol*. 2015 Nov;17(11):1446-57. doi: 10.1038/ncb3259.
 31. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*. 2003 Oct 15;22(20):5612-21. doi: 10.1093/emboj/cdg541.
 32. Saito S, Kurosawa A, Adachi N. Mutations in XRCC4 cause primordial dwarfism without causing immunodeficiency. *J Hum Genet*. 2016 Aug;61(8):679-85. doi: 10.1038/jhg.2016.46.
 33. Daley JM, Laan RL, Suresh A, Wilson TE. DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *J Biol Chem*. 2005 Aug 12;280(32):29030-7. doi: 10.1074/jbc.M505277200
 34. Lisby M, Rothstein R. Cell biology of mitotic recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Mar 2;7(3):a016535. doi: 10.1101/cshperspect.a016535.

35. Bhargava R, Onyango DO, Stark JM. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. *Trends Genet.* 2016 Sep;32(9):566-575. doi: 10.1016/j.tig.2016.06.007.
36. Hagiwara Y, Oike T, Niimi A, Yamauchi M, Sato H, Limsirichaikul S, Held KD, Nakano T, Shibata A. Clustered DNA double-strand break formation and the repair pathway following heavy-ion irradiation. *J Radiat Res.* 2019 Jan 1;60(1):69-79. doi: 10.1093/jrr/rry096.
37. Kurashima, S., Satoh, T., Saitoh, Y. & Yokota, W. Irradiation facilities of the takasaki advanced radiation research institute. *Quantum Beam Sci.* 2017 March; 1(1), 2. doi:10.3390/qubs1010002.
38. Hagiwara Y, Niimi A, Isono M, Yamauchi M, Yasuhara T, Limsirichaikul S, Oike T, Sato H, Held KD, Nakano T, Shibata A. 3D-structured illumination microscopy reveals clustered DNA double-strand break formation in widespread γ H2AX foci after high LET heavy-ion particle radiation. *Oncotarget.* 2017 Nov 25;8(65):109370-109381. doi: 10.18632/oncotarget.22679.
39. Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep.* 2017 Jan 10;18(2):520-532. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.042.
40. Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell.* 2010 Apr 16;141(2):243-54. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.012.
41. Kakarougkas A, Ismail A, Katsuki Y, Freire R, Shibata A, Jeggo PA. Co-operation of BRCA1 and POH1 relieves the barriers posed by 53BP1 and RAP80 to resection. *Nucleic Acids Res.* 2013 Dec;41(22):10298-311. doi: 10.1093/nar/gkt802.
42. Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y, Bonner WM. The complexity of phosphorylated

- H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. 2010 Jan 15;9(2):389-97. doi: 10.4161/cc.9.2.10475.
43. Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*. 2006 Jan 20;21(2):187-200. doi: 10.1016/j.molcel.2005.11.025.
 44. Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell*. 2004 Dec 3;16(5):715-24. doi: 10.1016/j.molcel.2004.10.029.
 45. DiBiase SJ, Zeng ZC, Chen R, Hyslop T, Curran WJ Jr, Iliakis G. DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res*. 2000 Mar 1;60(5):1245-53.
 46. Zhao L, Bao C, Shang Y, He X, Ma C, Lei X, Mi D, Sun Y. The Determinant of DNA Repair Pathway Choices in Ionising Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks. *Biomed Res Int*. 2020 Aug 25;2020:4834965. doi: 10.1155/2020/4834965.
 47. Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JT, Tkáč J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD, Xu D, Durocher D. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell*. 2013 Mar 7;49(5):872-83. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.001.
 48. Barton O, Naumann SC, Diemer-Biehs R, Künzel J, Steinlage M, Conrad S, Makharashvili N, Wang J, Feng L, Lopez BS, Paull TT, Chen J, Jeggo PA, Löbrich M. Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. *J Cell Biol*. 2014 Sep 29;206(7):877-94. doi: 10.1083/jcb.201401146.
 49. Zhang Y, Jasin M. An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Jan;18(1):80-4. doi: 10.1038/nsmb.1940.

50. Makharashvili N, Tubbs AT, Yang SH, Wang H, Barton O, Zhou Y, Deshpande RA, Lee JH, Lobrich M, Sleckman BP, Wu X, Paull TT. Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection. *Mol Cell*. 2014 Jun 19;54(6):1022-33. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.011.
51. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):509-14. doi: 10.1038/nature06337.
52. Hada M, Meador JA, Cucinotta FA, Gonda SR, Wu H. Chromosome aberrations induced by dual exposure of protons and iron ions. *Radiat Environ Biophys*. 2007 Jun;46(2):125-9. doi: 10.1007/s00411-006-0083-y.

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、多くのご指導ご鞭撻をいただいた中村麻子教授には深く感謝しております。本研究の博士論文作成において、多くの助言を頂きました田内広教授、立花章教授ならびに国際医療福祉大学の小林純也教授には厚く御礼申し上げます。また、高崎量子応用研究所の TIARA での細胞照射を行う実験では、舟山知夫先生に全面的なご協力をいただきました。ならびに、TIARA サイクロトロンオペレーターの方にも協力して頂きました。この場をお借りして、心よりお礼申し上げます。

本研究においてご指導、ご協力を賜りました皆様に、ここに重ねて厚く御礼申し上げます。