

# 平成24年度エンライトニングセミナー 若手プレゼンテーション 優秀賞紹介

(2012年7月11, 12日開催 日本アイソトープ協会 理工学部会, ライフサイエンス部会主催)

## ATP シグナリングを介した 新規 $\gamma$ 線誘発 DNA 鎖損傷修復 メカニズムの検討

西巻 奈央子

Nishimaki Naoko

(東京理科大学大学院 薬学研究科)



### 1 はじめに

近年行われている進行がんの治療法として放射線療法が挙げられる。しかし、がん細胞特有の放射線抵抗性により高線量照射での治療が必要となり、結果として被ばくによる正常組織への放射線障害が生じてしまう。そこで、がん細胞の放射線感受性を上げることで、より低い線量での治療を行い副作用を軽減させていくことが今後の重要な課題となっている。

$\gamma$ 線などの電離放射線を照射すると細胞内ではDNAが損傷し、細胞死や細胞周期の停止、DNA修復等を誘導することがよく知られている。特にDNA修復は放射線抵抗性に関与する細胞生存のために重要な機構であることから、詳細なメカニズムの解明が必要と思われる。

### 2 研究目的

ヌクレオチドの1つであるアデノシン-3-リン酸 (ATP) は細胞内でエネルギー供与体として働くことがよく知られている。さらに近年、様々な刺激に応じてATPは細胞外へ放出され、細胞膜上に発現しているATP受容体 (P2受容体) に作用することで細胞間情報伝達物質として働くことが明らかになっている。

私たちの研究室ではこれまでに、 $\gamma$ 線照射に

より細胞外へ放出されたATPがP2受容体を介した様々なシグナル伝達に関与することを報告している<sup>1,2)</sup>。そこで本研究では、P2受容体阻害薬による新規放射線抵抗性改善を目的とし、放射線誘発DNA損傷からの修復メカニズムでのATP及びP2受容体活性化との関連性について、ヒト肺がん細胞株であるA549細胞を用いて検討した。

### 3 研究結果

$\gamma$ 線照射によるDNA損傷後の修復メカニズムを調べるために、始めに $\gamma$ 線照射後のDNA損傷部位で形成される $\gamma$ H2AXの集積 (Focus形成) を免疫染色法で検討した。その結果、2.0 Gy  $\gamma$ 線照射1~3時間後に $\gamma$ H2AXのFocus形成の増加が観察された。

次に、 $\gamma$ 線照射による $\gamma$ H2AXのFocus形成増加に細胞外ATPが関与するの否かを検討した。まず、 $\gamma$ 線照射前に細胞外ATP分解酵素を添加したところ、放射線誘発 $\gamma$ H2AXのFocus形成の増加は有意に抑制された。一方、 $\gamma$ 線照射前の細胞外ATP分解酵素阻害薬添加及び照射後のATP (1, 10  $\mu$ M)、ウリジン-3-リン酸 (UTP) (1, 10  $\mu$ M) 添加によりFocus形成増加は有意に増強された。これらの結果から、

放射線誘発  $\gamma$ H2AX 形成に ATP などのヌクレオチドが関与する可能性が示唆された。

細胞外へ放出された ATP が作用する P2 受容体は次の 2 つに大きく分類される。1 つはイオンチャネル介在型の P2X1-7 受容体であり、ほかの 1 つは G タンパク共役型の P2Y1-14 受容体である。放射線誘発  $\gamma$ H2AX の Focus 形成に関与する P2 受容体を特定するために各 P2 受容体阻害薬を用いて検討した。その結果、P2X7, P2Y6 及び P2Y12 受容体各阻害薬により  $\gamma$  線誘発  $\gamma$ H2AX の Focus 形成は有意に抑制された。次に、放射線照射による DNA 損傷後の修復機構での各阻害薬の異なる効果を検討するために、DNA 損傷部位で生じる血管拡張性失調症変異たんぱく質 (ATM) 活性化及び DNA 修復因子 (53BP1) 集積との関与を  $\gamma$ H2AX との共染色により検討した。その結果、 $\gamma$  線照射による  $\gamma$ H2AX, ATM, 53BP1 の Focus 形成の増加は P2X7, P2Y6 及び P2Y12 受容体各阻害薬の添加により有意に抑制された。そこで、私たちは放射線誘発 DNA 損傷修復機構において P2X7, P2Y6 及び P2Y12 受容体との関与に着目することとした。

当研究室は以前、B16メラノーマ細胞において  $\gamma$  線照射による細胞外への ATP 放出に P2X7 受容体が関与することを報告している<sup>3)</sup>。そこで、A549 細胞においても  $\gamma$  線誘発 ATP 放出と P2X7 受容体が関与するの否かを検討した。その結果、 $\gamma$  線照射 1~2.5 分後の ATP 放出が P2X7 受容体阻害薬により有意に抑制され、 $\gamma$  線誘発 ATP 放出に P2X7 受容体が関与する可能性が示唆された。

放射線誘発 DNA 損傷部位での  $\gamma$ H2AX, ATM, 53BP1 の Focus 形成と P2Y6, P2Y12 受容体との関与をより明らかにするために、P2Y6 受容体 siRNA 又は P2Y12 受容体 shRNA の遺伝子移入により P2Y6 又は P2Y12 受容体の発現を抑制させた細胞 (P2Y6 KD 細胞/P2Y12 KD 細胞) をそれぞれ作製し、 $\gamma$  線誘発  $\gamma$ H2AX, ATM, 53BP1 の Focus 形成との関与

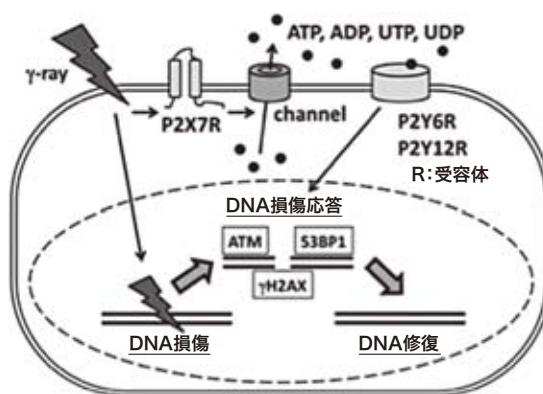


図 新規放射線誘発 DNA 損傷修復メカニズム  
ADP: アデノシン-2-リン酸, UDP: ウリジン-2-リン酸

を検討した。その結果、P2Y6 KD 細胞及び P2Y12 KD 細胞において  $\gamma$  線誘発  $\gamma$ H2AX, ATM, 53BP1 の Focus 形成は有意に減少し、 $\gamma$  線照射による  $\gamma$ H2AX, ATM, 53BP1 の Focus 形成に P2Y6, P2Y12 受容体が関与することが確認された。

以上の結果より  $\gamma$  線照射により P2X7 受容体を介して ATP が放出、その後 P2Y6, P2Y12 受容体活性化を介して  $\gamma$ H2AX, ATM, 53BP1 の Focus が形成され、DNA 損傷が修復されるものと考えられる (図)。

#### 4 今後の展望

放射線照射による DNA 損傷修復機構において、ATP 及び P2 受容体を介した ATP シグナリングが重要な役割を果たすことが示唆された。この結果、この ATP シグナリングを阻害することで、がん細胞への放射線感受性を高める可能性がある。今後は、放射線の有する種々の生体影響での ATP シグナリングの関与についても検討していく予定である。

#### 参考文献

- 1) Tamaishi, N., *et al.*, P2Y6 receptors and ADAM17 mediate low-dose gamma-ray induced focus sormation (activation) of EGF receptor, *Radiat. Res.*, **175**, 193-200 (2011)

- 2) Tsukimoto, M., *et al.*, Involvement of purinergic signaling in cellular response to gamma radiation, *Radiat. Res.*, **173**, 298-309 (2010)
- 3) Ohshima, Y., *et al.*, Gamma-irradiation induces

P2X (7) receptor dependent ATP release from B16 melanoma cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1800**, 40-46 (2010)

## ポジトロニウム挙動による シリカガラスの空隙分析



青山 周平

Aoyama Syuhei



藤浪 真紀

Fujinami Masanori

(千葉大学大学院 工学研究科)

### 1 はじめに

非晶質材料であるシリカガラスは Si-O-Si ネットワーク構造 (図 1) を有し, その体積の半分を空隙が占めている。その空隙は力学的性質や光学的性質などの物性に影響を与えることが分子動力学計算により指摘されている。一方で実験的に空隙を評価する方法としては古典的なガス吸着法のみであり, 有効な手段がないのが現状である。陽電子はガラス中で電子との束縛

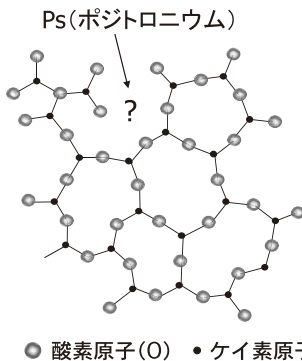


図 1 シリカガラスの Si-O-Si ネットワーク構造

状態であるポジトロニウム (Positronium, Ps) を数十%の割合で形成する。Ps は多孔質材料のサブナノメートル空隙を評価するプローブとして, 高分子の自由体積や SiO<sub>2</sub> 系低誘電体などの評価に使われている。これまでも Ps によるガラスへの応用は試みられてきたが, 照射欠陥の分析や網目修飾イオンを添加した際の変化を分析したものであり, 実際にどのような空隙を Ps が検出しているのかは未解明なままであった。Ps の挙動は空隙のみならず化学組成により変化するため, 本研究ではシリカガラスの密度を変化させ, *o*-Ps (電子と陽電子のスピンが平行の三重項状態) の寿命依存性を調べることを目的とした。さらに, ガラスの空隙に対する力学的応答を調べるためには, 微小領域に大きなひずみを与える必要がある。そこで, 表面にスクラッチ (傷) を導入し, その周囲の数  $\mu\text{m}$  に発生する構造欠陥を陽電子プローブマイクロアナライザー (Positron probe microanalyzer, PPMA) により調べた。