課題番号　2009A-E18

レーザー駆動プラズマ X 線の放射線生物学への展開

Radiation biological application of laser plasma x-ray

佐藤　克俊[1)]　錦野　将元[2)]　岡野　泰彬[3)]　大島　慎介[3)]　長谷川　登[2)]
石野　雅彦[2)]　沼崎　穂高[1)]　河内　哲哉[2)]　手島　昭樹[1)]　西村　博明[3)]

Katsutoshi SATO　Masaharu NISHIKIINO　Yasuaki OKANO　Shinsuke OHSHIMA　Noboru HASEGAWA Masahiko ISHINO
Hodaka NUMASAKI　Tetsuya KAWACHI　Teruki TESHIMA　Hiroaki NISHIMURA

[1)]大阪大学大学院医学系研究科　[2)]日本原子力研究開発機構
[3)]大阪大学レーザーエネルギー学研究センター

培養条件下のがん細胞株に 90 eV 軟 X 線レーザーを照射し、その後誘発される DNA 二本鎖切断の有無を免疫蛍光染色法により評価した。その結果、核内に明確なリン酸化型 ATM および DNA-PKcs フォーカス形成が検出された。

キーワード：軟X線レーザー、培養細胞、DNA二本鎖切断

１．目的

本研究では、軟X線レーザーをがん細胞に照射することにより、誘発する DNA 損傷応答やがんの浸潤、転移へ与える影響、超短パルス X 線の放射線生物学的影響を解明することを目的とする。

２．方法

培養細胞としてヒト肺腺がん細胞株 A549 を用いた。細胞培養ディッシュによる X 線吸収を最小限に抑えるため、培養基質として厚さ 100 nm の窓を持つ窒化シリコン膜(SiN 膜)を用いた。この SiN 膜の細胞が培養された面の反対側を軟 X 線レーザー発生用ターゲットチャンバーの真空窓として利用した。

照射 2 日前、SiN 膜に対する培養細胞の接着を促進させるため I 型コラーゲンにより SiN 膜をコーティングし、37 °C, 5 % CO_2 インキュベータにて約 24 時間培養した。照射 1 日前に A549 を SiN 膜に播種した。照射直前、軟 X 線レーザー照射専用ディッシュに SiN 膜を設置し、実験室にて 1 から 10 ショットの軟 X 線レーザーを照射した。照射終了後、抗リン酸化型 ATM (phosohorylated Ataxia Telangiectasia Mutated; p-ATM)抗体および抗リン酸化 DNA-PKcs（phosphorylated DNA dependent protein kinase catalytic subunit; p-DNA-PKcs）抗体を用いた免疫蛍光染色法を行い、軟 X 線レーザーの照射により誘発された DNA 二本鎖切断の有無を評価した。対照実験として平均エネルギーが 1.7 MeV である 4 MV X 線を用いて細胞を照射し、その後上記抗体を用いた免疫蛍光染色法を行うことにより、軟 X 線レーザー照射により得られた結果と比較した。

３．研究成果

軟 X 線レーザーおよび 4 MV X 線照射後の抗 p-ATM, 抗 p-DNA-PKcs 抗体を用いた蛍光免疫染色の結果、1 ショットの軟X線レーザーによって核内に明確な p-ATM および p-DNA-PKcs フォーカス形成が示された(Fig. 1)。さらに、ショット数の増加と一致して核内のフォーカス数および核当たりの p-ATM および p-DNA-PKcs フォーカスの蛍光強度は増加した。4MV X 線の照射によって得られるフォーカスと比較すると、軟 X 線レーザーを照射された細胞におけるフォーカスは核内に不均一に分布していることが示された。

４．結論・考察

放射線の照射により様々な形態の DNA 損傷が誘発されるが、その中でも DNA 二本鎖切断が細胞にとって最も致命的となる。本研究では、DNA 二本鎖切断が誘発されたときに活性化されるタンパク質として ATM と DNA-PKcs に着目した。ATM は DNA 二本鎖切断の発生に応じてリン酸化されるタンパク質であり、細胞周期の停止や DNA 修復に関連するタンパク質を活性化させる役目を持つタンパク質である。また、DNA-PKcs は非相同末端修復と呼ばれる DNA 二本鎖切断の修復方法に関与するタンパク質である。核内におけるこれらの集積部位は DNA 二本鎖切断発生部位と一致することが一般的に知られている(1, 2)。本研究では軟 X 線レーザーの照射を受けた細胞の核内において p-ATM および p-DNA-PKcs フォーカス形成が確認された。この結果は 90 eV という非常に低いエネルギーの X 線にも関わらず DNA 二本鎖切断を誘発されたことを示している。培養条件下の細胞の厚さは約 5 μm 程度であり、核はその中心に位置していると考えられる。DNA 二本鎖切断が誘発されるためには放射線が核へ到達することが必須条件となる。しかし、90 eV 軟 X 線の水中での飛程は 1 μm 未満であることから、ほとんどの光子は核に到達することができず、細胞膜や細胞表面近傍で吸収される。つまり、本研究により得られた結果は、細胞膜や細胞質に対する多大なエネルギー付与は DNA 二本鎖切断の発生に応答するタンパク質を何らかの分子機構によって活性化させる可能性があることを示している。今後は、本研究より得られた実験結果の再現性を確認すると共に、SiN 膜へ播種する細胞の密度、培養液の温度、SiN 膜をコーティングする細胞外基質を調整して照射し、どの条件下で ATM や DNA-PKcs が活性化するか評価する必要がある。

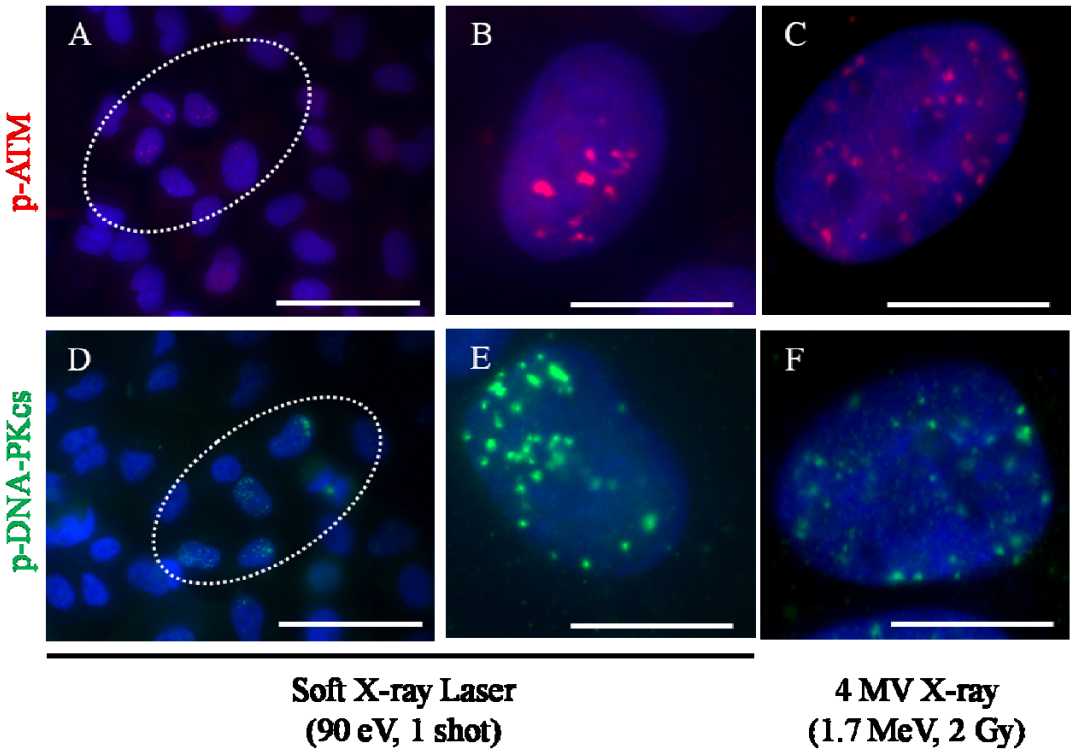

Fig. 1 軟 X 線レーザーの照射による DNA 二本鎖切断の発生

1 ショットの軟 X 線レーザーの照射 30 分後における p-ATM、p-DNA-PKcs フォーカスを示す。長径約 90 μm の領域(白破線)に p-ATM (赤) および p-DNA-PKcs (緑) フォーカス陽性細胞が確認された (A, D)。この領域の大きさは軟 X 線レーザーのスポットサイズとほぼ一致している。また、軟 X 線レーザーの照射により誘発されたフォーカス（B, E）は 4 MV X 線を照射した場合（C, F）と比較して核内に不均一に分布している。

５．引用(参照)文献等

(1) C. J. Bakkenist, and M. B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature, Vol.421, 499-506, 2003.

(2) J. Faclck, J. Coates, and S. P. Jackson, Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites ofDNA damage. Nature, Vol.434, 605-611, 2005.