

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度年次報告書（詳細版）

研究課題名	放射線による“ゲノム不安定性・がん”のリスク上昇メカニズムと、リスク診断法・制御法の研究
研究期間	令和3年4月1日～令和4年2月28日

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	吉岡研一	国立がん研究センター研究所・ゲノム安定性制御研究ユニット・ユニット長
分担研究者	益谷美都子	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子標的医学分野・教授

	氏名	所属機関・職名
研究協力者	田代聡	広島大学・原爆放射線医学研究所・研究所長・教授
研究協力者	間野博行	国立がん研究センター研究所・研究所長
研究参加者	松野悠介	国立がん研究センター・研修生
研究参加者	鈴木真扶果	国立がん研究センター・研修生

研究要旨	放射線ばく露は、がんのリスク要因である。我々は、放射線照射された細胞では、『直接に生じた DNA 二重鎖切断 (DSB) が修復された後に、複製ストレスに伴う DSB が蓄積する』ことを見出した。さらに、“複製ストレスに伴う DSB”がゲノム不安定性の引き金となること、ゲノム不安定性が“変異細胞のクローン進化”を誘導することなどの知見を合わせて鑑み、『放射線で誘導される“複製ストレスに伴う DSB”がゲノム不安定性のリスク要因となるため、変異、クローン進化、がん化のリスクが上昇している』と考えるに至った。疑問なのは、放射線照射された細胞が、『どの様にしてゲノム不安定性リスクの高い細胞状態（即ち、複製ストレスに伴う DSB が蓄積し、修復され難い状態）に陥るのか』ということである。そこで本研究では、まず、放射線照射後に陥る“ゲノム不安定性リスクの高い細胞状態”を特定し、その誘導メカニズムの解明を目指す。また、このリスクは“ゲノム安定性の保持”によって解消されることから、論理的に“放射線ばく露に伴うがんのリスクは、ゲノム安定性の保持によって抑制可能である”と考えられることは重要な点である。そこで最終的には、ゲノム安定性の保持・制御メカニズムを明確にし、“放射線発がんリスクの診断法・抑制法の創出”を目指す。
キーワード	ゲノム不安定性、DNA 二重鎖切断、クローン進化、DNA 修復、がん

I 研究目的

〈背景〉 放射線ばく露は、がんのリスク要因である。放射線ばく露によって様々なタイプの DNA 損傷の誘導が確認されているが、これまで、『どのタイプの損傷が、どの様に発がんリスクに影響しているのか』は、明確でなかった。最近我々は、『修復され難い DSB は複製ストレスに伴って誘導され（広い線量率域で出現）、これがゲノム不安定性（及び、これに伴うクローン進化）のリスク要因になっている』ことを見出した（Matsuno et al., 2021）。しかし、疑問なのは、放射線照射された細胞で、『どの様にゲノム不安定性の高リスク状態（即ち、複製ストレスに伴う DSB が蓄積しやすい状態）に陥ってしまうのか』という点である。

〈目的〉 本研究では、高リスク状態の細胞で誘導され得る“ゲノム安定性の保持・制御メカニズム”を解明し、最終的に、放射線リスクの診断法・抑制法の創出を最終ゴールとする。具体的には、超高解像共焦点顕微鏡とNGSの解析によって高リスクのクロマチン状態を特定し、その誘導メカニズムを解明することを目指す。さらに、放射線によって生じた“ゲノム不安定性リスクの解消”に資する“ゲノムスタビライザー”を用い、その制御メカニズムの解明を目的としている。また、ゲノムスタビライザーの効果の検証も目的とする。最終的には、作用機序の明確な放射線発がんに対する“がん予防薬”の創出を目的とする。環境保健行政に対しては、放射線発がんの新規概念の創出、放射線発がんのリスク抑制法の創出、放射線発がんのリスク診断法の創出、に対しての貢献を目的としている。

II 研究方法

細胞培養と放射線照射によるゲノム不安定性の高リスク状態の誘導

解析に用いる細胞は、過去の研究において“ゲノム不安定性の高リスク状態誘導”を確認したマウス胎仔線維芽細胞（MEF）とし、3T3 培養法によって細胞培養を行った（Matsuno et al., 2019）。初代培養から継代し、パッセージ 3 あるいは 4 の段階のものを用いてすべての解析を実施した。

放射線ばく露による“ゲノム不安定性の高リスク状態”を誘導するためには、¹³⁷Cs の Gammacell 40 Exactor（Best Theratronics）を用い、1Gy を照射した。以前の解析で明確にした 24 時間後に現れる“ゲノム不安定性の高リスク状態”を指標として、照射前の状態と比較することで、放射線ばく露の影響を解析した。また、ゲノムスタビライザーの影響は、放射線照射の折に、培養液中に同時に投与することで実施した。

免疫染色による細胞のイメージング解析

細胞は、0.1% TritonX100/PBS を含む4%パラホルムアミドで固定し、0.3% TritonX100と2%ゴート血清を含むPBSでブロックした後に、一次抗体、二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。顕微鏡は、Olympus FV10i、Olympus FV3000、Leica SP8を用いた。このとき、抗体はγH2AX（9718, Cell Signaling Technology）、53BP1（PC712-100ULCN, Merck）などを用いた。また、TAMRA標識のFACTOR-Xは合成品を作成した（Cosmobio）。

次世代シーケンサー解析

ChIP-seq解析はCUT&RUNキット（Cell Signaling）のプロトコールに従ってサンプルを準備し、ATAC-seq解析はATAC-seq Kit（Active motif）のプロトコールに従ってサンプルを準備し

た。得られたDNAは、MiiinION Mk1C（オックスフォードナノポアテクノロジー社）によって解析した。

倫理面への配慮

本研究プロジェクトにおける動物実験の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守した。また、「所属研究機関における動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、機関長の実施承認を得た。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認（長崎大学）を得た後に実施した。

本研究には遺伝子組換え実験が含まれる。遺伝子組換え実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認（国立がん研究センター）を得た後に、ルールを遵守しつつ実施した。

III 研究結果

令和3年度の研究では、放射線ばく露で現れる“ゲノム不安定性の高リスク状態”を特定するため、共焦点高解像顕微鏡によるイメージングと、次世代シーケンサーによる解析を実施した。また、ゲノムスタビライザーを用い、そのリスク抑制の影響を明確にすることを目指した。さらに、マウスモデルでの解析を“がん予防への影響を検証する実験”を開始した（分担者益谷グループ）。以下に、現段階までの研究成果を列挙する。

- ・これまでの解析で、『高リスク状態で、特定のクロマチン状態の形成が亢進していることが明確になっていた』が、今年度の共焦点高解像顕微鏡による解析で、『その特定のクロマチン状態の形成は、初期には多数のマイクロフォーカスとして現れている』ことが示された。重要なことに、この“マイクロフォーカスとして現れた特定のクロマチン構

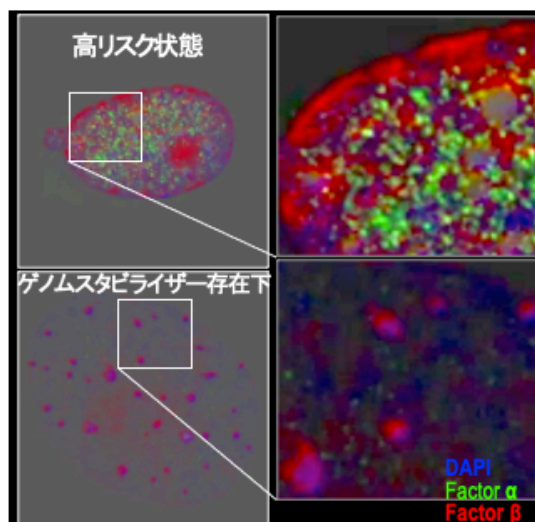


図1、高リスクのクロマチン状態とゲノムスタビライザーの効果。(A)高リスク状態でのクロマチン状態変化と、ゲノムスタビライザーによる抑制。

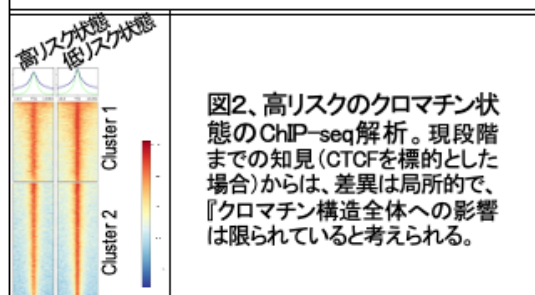


図2、高リスクのクロマチン状態のChIP-seq解析。現段階までの知見(CTCFを標的とした場合)からは、差異は局所的で、『クロマチン構造全体への影響は限られていると考えられる。

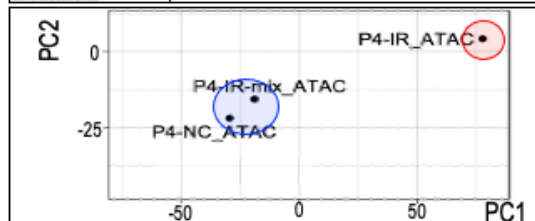
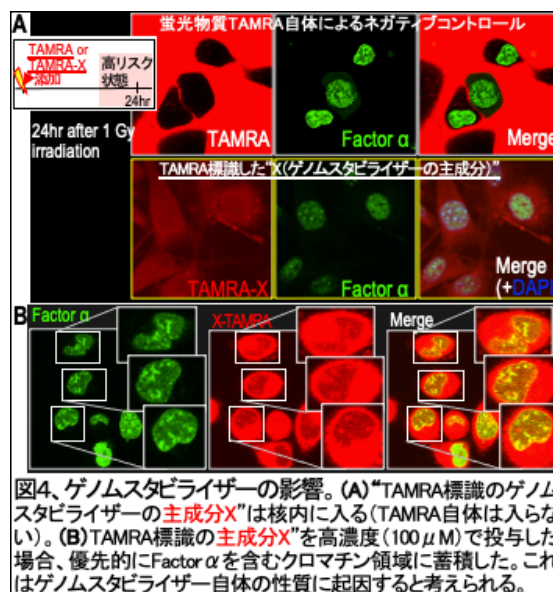


図3、高リスクのクロマチン状態のATAC-seq解析。主成分解析で確認したところ、『放射線ばく露による“高リスク状態”は(赤丸内)、照射前やゲノムスタビライザー存在下(mix)の放射線ばく露の状態とは異なっている(青丸内)』ことが示された。

造”はゲノムスタビライザーによって抑制されることがわかった (図1)。

- ナノポアシーケンサーのシステムを導入し、ChIP-seq 解析を実施した。まず、高次のクロマチン構造の形成に関わる CTCF について実施した (図2)。その結果、高リスク状態では、局所での“認識部位の変化”が誘導されるが、クロマチン構造の全体には大きな違いが現れないことが明確になった。
- ATAC-seq 解析を実施した (図3)。その結果、高リスク状態では、大きくシグナルが異なっているが、ゲノムスタビライザー存在下では、概ね、元の状態に戻っていることが明確になった。
- ゲノムスタビライザーの主成分“X”について、TAMRA (蛍光色素) で標識し、その細胞内での局在性について解析した。その結果、核内に導入され、優先的に高リスク状態で形成される“特定のクロマチン領域 α ”に局在していることが示された。TAMRA 自体では核内に入らない性質であるから、これはゲノムスタビライザーの主成分“X”の性質による影響と考えられる。
- マウスモデルを用いた、放射線発がんに対する影響解析は現在予定通り進行中である。ゲノムスタビライザーの摂取は、引水中に混入して実施している。現段階で、飲水の摂取量には影響は認められないことを確認している。また、現段階までに、ゲノムスタビライザー摂取群では、放射線ばく露による“体重の増加率の抑制”への影響が軽減されていることを確認している。



IV 考察

現段階までの本研究により、『放射線ばく露により、クロマチン構造の変化に伴ってゲノム不安定性の高リスク状態が誘導されている』ことが明確になった。また、ゲノムスタビライザーを処理することにより、概ね、元のクロマチン状態に戻ることが示された。『放射線ばく露により、クロマチン構造の変化に伴ってゲノム不安定性の高リスク状態が誘導されている』ことから、放射線リスクの作用点になっている可能性が強く考えられるが、今後、これを明確にし、さらに、ゲノムスタビライザーの作用機序を明確にすることが求められる。

V 結論

現段階では結論が導かれるには至っていないが、少なくとも以下の2点が確認できた。(1) 放射線ばく露により、クロマチン構造の変化に伴ってゲノム不安定性の高リスク状態が誘導される。(2) ゲノムスタビライザーによるゲノム不安定性が解消される効果が現れている。ただし、(2)についてはそのメカニズムを明確にする必要があり、さらに、がんのリスク制御に伴う効果かどうかを検証する必要があると考える。

VI 次年度以降の計画

- NGS 解析：当初、解析は外部発注の予定であった。しかし、この場合、解析条件を整えつつ研究を実施する過程のサイクルが 2-3 ヶ月となってしまうと、研究開発の目的を達成するために、数回の“条件検討”がボトルネックのリスク要因となってしまうと考え、“ナノポアシーケンサーのシステム”を導入した。実際、既に ChIP-seq 解析では、一定の結果を得るに至っている。令和 4 年度も同様に、NGS 解析では、主に、導入した“ナノポアシーケンサーのシステム”を用いる予定である。
- 核内因子の動態解析：これまでに（令和 3 年度）、様々な因子（DSB 修復に関わる Rad51 と 53BP1 およびクロマチン因子やその修飾状態など）に対し、解析を実施した。実際には、Rad51 と 53BP1 では、GFP 融合タンパク質を発現した場合、蛍光は認められるものの、FRAP 解析が出来ないことが示された（photobleaching 後に蛍光が戻ってこない：固体の特徴）。これは、これらの因子は GFP 融合タンパク質として発現した場合、機能的でないことを示している。それに対し、クロマチン因子ファクター α は、FP 融合タンパク質として機能的に発現されたため、令和 4 年度以降の解析では、ファクター α を標的として動態解析を進める予定である。

この研究に関する現在までの研究状況、業績
現段階ではなし

引用文献

- Matsuno, Y., Hyodo, M., Suzuki, M., Tanaka, Y., Horikoshi, Y., Murakami, Y., Torigoe, H., Mano, H., Tashiro, S., and Yoshioka, K.* Replication Stress-Associated DSBs Arisen by Ionizing Radiation Risk Genomic Destabilization and the Associated Clonal Evolution. **iScience**, **24** (2021) 102313.
- Matsuno, Y., Atsumi, Y., Shimizu, A., Katayama, K., Fujimori, H., Hyodo, M., Nakatsu, Y., Kaneko, S., Hamamoto, R., Shimamura, T., Miyano, S., Tsuzuki, T., Hanaoka, F., and Yoshioka, K.* Replication stress triggers microsatellite destabilization and hypermutation leading to clonal expansion in vitro. **Nature Communications**, **10** (2019) 3925.

Genomic destabilization and the resulting cancer risks arisen by radiation exposure and those regulation

Yusuke Matsuno,¹ Rika Kusumoto-Matsuo,¹ Mitsuko Masutani,² and Ken-ichi Yoshioka¹

¹ Laboratory of Genome Stability Maintenance, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan

² Department of Frontier Life Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Sakamoto, Nagasaki, Japan

Keywords: genomic instability; cancer; DNA double strand break; clonal evolution; DNA repair

Abstract

Radiation exposure is associated with cancer risk. Our recent study revealed that cells exposed to radiation accumulate persistent DNA double strand breaks (DSBs) in association with replication stress after DSBs directly induced by the radiation are repaired. Such DSBs subsequently risk genomic destabilization and the resulting clonal evolution of cells mutated in cancer-driver genes. However, remaining questions include how the resulting cells accumulate replication stress-associated DSBs in association with genomic destabilization and how the genomic destabilization-associated risk can be suppressed. Here we are trying to characterize the cellular and genomic states at higher risk of genomic destabilization, which is arisen by the radiation exposure, and the regulation to suppress those risks. Importantly, those genomic destabilization risks arisen by the radiation exposure are theoretically suppressible with genome stability maintenance. Currently, we have observed massive chromatin-state alteration at high-risk state of genomic destabilization, which is induced after radiation exposure. Importantly, such high-risk state induced by the radiation is suppressed in the presence of genome stabilizer what we have recently constructed.