

# 放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和4年度研究報告書

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
令和4年度研究期間	令和4年4月1日～令和5年2月28日
研究期間	令和3年度 ～ 令和5年度（2年目）

	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/分子標的医学研究センター）・教授/センター長
若手研究者		

キーワード	ゲノム不安定性、DNA 複製ストレス、クロマチン修飾
-------	----------------------------

## 本年度研究成果

### I 研究背景

放射線ばく露は、がんのリスク要因である。近年の我々の研究で、『そのリスクには、“複製ストレスに伴う DNA 損傷（放射線ばく露後の細胞周期 S 期に現れる）”に起因したゲノム不安定性リスクが含まれる<sup>1,2)</sup>』ことが示された。しかし、『この時、どうしてゲノム不安定性（大規模な修復エラー）に陥るのか？』、背景のメカニズムには不明な点が多い。これは、放射線発がんのリスクに関わる点に鑑み、放射線健康管理・健康不安対策には極めて重要な問題である。実際、ここで認められるゲノム不安定性の特徴は、ヒトのがん細胞でも広く認められる<sup>3)</sup>。そこで我々は、放射線ばく露で誘導される高リスク状態の特定、その誘導機構を解析している。一方で最近の研究で、そのリスクを抑制する成分の存在が示唆されたことから<sup>4)</sup>、その効果を示す成分のスクリーニングを実施し、さらにゲノムスタビライザーを構築した。現在、その作用機序の解析、その効果の検証を進めている。

### II 目的

本研究では、『放射線ばく露で誘導される“ゲノム不安定性高リスク状態”の特定、その誘導機構の解明、さらに、そのリスクを抑制する成分（ゲノムスタビライザー）の作用機序の解明、その効果の検証』を目的としている。昨年度までの研究により、放射線ばく露による“ヘテロクロマチン形成の亢進”に伴うリスク上昇と、ゲノムスタビライザーの投与に伴うリスク抑制が示された。そこで今年度は、主任研究者の研究では、『ChIP-seq 解析（次世代シーケンサーによるゲノム解析）等により、詳細な高リスク状態を明確にし、その高リスク状態に対するゲノムスタビライザーの効果を明確にする』ことを目的とした。また、分担研究者の研究では、マウスモデルを用いたゲノムスタビライザーの効

果の検証を目的とした。

### **III 研究方法**

**<主任研究者の担当>** マウス胎仔線維芽細胞に対し、ゲノム不安定性の高リスク状態は放射線（照射 1 Gy）で誘導し、ばく露後 24 時間に現れる高リスク状態を解析した。解析は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫染色による解析と、次世代シーケンサーを用いた ChIP（クロマチン免疫沈降）-seq 解析によって実施した。両解析では、ヘテロクロマチン形成に関わるヒストン修飾の“H3K9-3me（トリメチル）”とこれと拮抗する“H3K9-Ac（アセチル）”を指標として実施し、顕微鏡解析では  $\gamma$ H2AX および HP1 $\alpha$  も併せて解析した。

**<分担研究者の担当>** 6-10 週齢のマウスに対して放射線照射（1Gy X 4 回、及び、1.75Gy X 4 回）した後の経過を観察した（体重変化、ローターロードを用いた運動能力テスト、カプランマイヤーによる生存解析）。一方で、生存影響に差異が認められない場合、生き残っている個体に対しての“各臓器レベルでの影響の病理解析”に変更することも含めて検討することとした。動物実験に関しては、倫理委員会の承認を受け(承認番号 2107261735-4)、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「3R の原則」、「長崎大学 動物実験規則」を遵守し実施した。

### **IV 研究結果、考察及び今後の研究方針**

**<主任研究者の担当>** 『ヒストン H3K9-3me に対する ChIP-seq 解析で、その修飾レベルが局所で変化している』ことが示された。各々の細胞状態によって異なる領域にシグナルが現れるが、この中で、『放射線で誘導されたシグナルについては、ゲノムスタビライザーによって抑制される』ことが見出された。これに対し、『ヒストン H3K9-Ac のレベルは、全体に修飾レベルが大きく亢進している』ことが示された。『この H3K9-Ac レベルの亢進も、ゲノムスタビライザーによって抑制される』ことが示された。重要なことに、『これらの変化領域は、SV（ゲノム再編）の多い領域との相関が認められる』ことが示された。以上の結果は、『これらのヒストン修飾の変化がゲノム不安定性のリスクに関与する』こと、『このリスクを伴う修飾異常はゲノムスタビライザーによって抑制される』ことを示唆している。

また、蛍光免疫染色による解析では、放射線ばく露によって“H3K9-3me のフォーカス”の蓄積を認めたが、H3K9-Ac のシグナル増強では“フォーカスの形成を伴わない”ことが示された。一方で、ゲノム不安定性リスクは、DNA 複製ストレスに DSB の蓄積に起因すると考えられるが、この DSB 自体は全ての S 期の細胞で現れるため、この背景がリスク状態の判定を難しくしていると考えられる。実際、今年度の解析で、この弊害が認められた。そこで現在、S-G2 期の細胞集団を対象を絞って“高リスク状態の解析”を進めており、『どの様な S-G2 期の細胞集団が、放射線ばく露に伴うゲノム不安定性のリスク上昇に関係しているのか』の解析を進めている。さらに、『その集団が、ゲノムスタビライザーの投与によって、どの程度抑制されているのか』、『この時、ゲノムスタビライザーが、どの様に作用しているのか』の解析を進めている。

メカニズム解析では、現在までに、複数の“高リスク状態誘導に関わる因子”の特定に至っている。今後、ゲノム不安定性の高リスク状態の誘導・制御機構の解明を目指す。さらに、これまでの解析では、主に MEF（マウス胎仔線維芽細胞）をモデルとして実施してきたが、今後、『ヒト細胞でも同様の効果が現れるかどうか』を明確にするための解析を予定している。

**<分担研究者の担当>** 現在、マウスモデルを用い、放射線発がんリスクに対する“ゲノムスタビライザーの効果”の検証を進めている。放射線影響の経過観察では、放射線ばく露に伴う体重の抑制と、

運動能力（ローターロッド解析）の低下を認めた。これに対し、一部のゲノムスタビライザーの投与条件では、それらの“放射線で誘導される影響”に対する有意な抑制効果を認めた。しかし、 Kaplan-Meier解析では、一部の条件でゲノムスタビライザーの投与に伴う生存曲線が回復する傾向が示されたが、有意な差異を認めるには至らなかった。そこで、生存している全てのマウス個体につき、全臓器の病理解析を実施し、腫瘍形成への影響を解析することとし、現在、この病理解析を進めている。また、今後、各臓器のゲノムを解析し、ゲノム不安定性のリスク状態との関係の解析を予定している。

## **V 結論**

今年度、『ゲノム不安定性の高リスク状態では、特定のクロマチン修飾の状態に変化が現れる』こと、『この状態が、放射線ばく露によって誘導される』ことが示された。重要なことに、『この高リスク状態は、特定の化学物質によって抑制が可能』なことが示唆された。今後、ゲノムスタビライザーによる作用機序解析、マウスの放射線発がんに対する影響解析を進める予定である。

## 引用文献

1. 1, 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. doi:10.1038/s41467-019-11760-2.
2. 2, 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. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102313>.
3. 3, Matsuno, Y., Kusumoto-Matsuo, R., Asai, H., Manaka, Y., and Yoshioka, K. Echoed Induction of Nucleotide Variants and Chromosomal Structural Variants in Cancer Cells. *Scientific Reports*, **12** (2022) 20964. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25479-6>.
4. 4, Matsuno, Y., Atsumi, Y., Alauddin, M., Rana, M.M., Fujimori, H., Hyodo, M., Shimizu, A., Ikuta, T., Tani, H., Torigoe, H., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Komai, M., Shirakawa, H., and Yoshioka, K. Resveratrol and its Related Polyphenols Contribute to the Maintenance of Genome Stability. *Scientific Reports*, **10** (2020) 5388. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62292-5>.