

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和5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5年度研究期間	令和5年4月3日～令和6年2月29日
研究期間	令和3年度 ～ 令和5年度（3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	がん、ゲノム不安定性、DNA 損傷
-------	-------------------

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。従来、放射線ばく露で生じる様々な DNA 損傷の中で、『どの損傷が、どの様に影響を及ぼすのか¹⁾』は不明で、これが人々の不安要因であった。最近我々は、『複製ストレスに伴って蓄積した DSB がゲノム不安定性のリスク要因²⁾となる』こと、『そのリスクは放射線で促進³⁾し、一部の低分子によって抑制⁴⁾される』ことを示した。しかし、『どの様に DSB が修復され難い状態に陥り、どの様にそのリスクは抑制されるのか』は明確でない。

II 目的

本研究では、ゲノム不安定性の高リスク状態、その制御機構を明確にし、放射線リスクの診断法・抑制法の創出への貢献を目指す。主に、共焦点顕微鏡と NGS 解析を用い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明確にする。さらに、放射線リスクの解消に資する“ゲノムスタビライザー”を用い、その作用機序の解明とその効果の検証を目的とする。最終的に、作用機序の明確な放射線発がんに対する“がん予防薬”の創出を目指す。環境保健行政に対しては、放射線発がんの一般概念(リスク抑制法を含む)の構築による貢献を目的とする。

III 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 解析モデルには、ゲノム不安定性の高リスク状態が明確に示されたマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を用いた^{2,3)}。放射線ばく露 (1 Gy) には ¹³⁷Cs を線源とする Gammacell 40 Exactor (Best Theratronics) を用いた。線量率解析は、広島大学田

代聡教授の協力で、広島大学の施設で解析することとした。ゲノムスタビライザーは培養液中に投与し、その影響を解析した。

共焦点顕微鏡解析と次世代シーケンサー（NGS）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、抗体（ γ H2AX や 53BP1 などに対する抗体）を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡（Olympus FV3000 と Leica SP8）で観察した。ゲノムスタビライザー成分の可視化は TAMRA 標識（Cosmobio）で行った。NGS 解析（ChIP-seq、ATAC-seq、DRIP、全ゲノムの各解析）はプロトコールに従ってサンプルを準備し、オックスフォードナノポアあるいはイルミナの機器を用い、国立がん研究センター研究所間野博行研究所長の協力で実施した。

動物実験と倫理面への配慮 動物実験は、「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、「所属研究機関の動物実験に関する指針」に従い、動物実験倫理委員会に計画書を提出し、機関承認（長崎大学）を得た後に実施した。実験は、適切な人道的エンドポイントを見極め、動物の苦痛の軽減に細心の注意を払い、使用動物数を最小限に留めるなど、動物愛護に十分配慮して行った。マウス病理標本解析は研究協力者の国立医薬品食品衛生研究所小川久美子先生、高須伸二先生の協力で行われた。遺伝子組換え実験は、拡散防止措置等の法令に則り、「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」等のルールを遵守し、機関承認（国立がん研究センター）を得た後に実施した。

IV 研究結果、考察及び今後の研究方針

まず、ゲノム不安定性の高リスク状態（DSB 修復され難い状態）の誘導と、そのメカニズムを解析し、不活性化クロマチン形成に関わるヒストン修飾の亢進とそれを介在する因子も明確になった。特に、DSB 修復の中間体に応答し、この修飾が誘導されることが示された。また、この DSB は、ゲノムスタビライザー添加で誘導される“クロマチン動態変化”に伴って修復され、低リスクのクロマチン状態に戻っていく様子が示された。（以上、主任研究者吉岡が実施）

NGS 解析により、高リスク状態では、不活性化クロマチンの亢進と同時に、活性化クロマチンのヒストン修飾も亢進することが示された。メカニズム解析からは、クロマチンの活性化（そのヒストン修飾）を介在する因子も特定され、その阻害物質 x も明確になった。これらの結果は、クロマチンの活性化状態と不活性化状態が混在した背景で高リスク状態に陥ることを示唆している。リスク抑制効果の解析では、ゲノムスタビライザーと阻害物質 x との併用では相乗効果が示された。また、全ゲノム解析で、SV（染色体構造異常）と SNV（一塩基置換変異）の相関^{2,3)}、SBS17 シグネチャー（ROS との関係が指摘されている）の亢進⁶⁾などが見出され、同様の結果はヒトがん細胞ゲノムでも示された^{5,6)}。これらは、MEF をモデルとして認めたリスク影響が、ヒト発がん過程でも現れることを示している。（以上、主任研究者吉岡が実施）

放射線リスクのマウスモデル解析では、体重、血液成分、運動能力、寿命延伸、肝臓腫瘍（病理学的解析）に対するリスク影響と、そのリスクに対するゲノムスタビライザーの効果を検証した。その結果、放射線ばく露によるリスク促進と、ゲノムスタビライザーによるリスク抑制の傾向は殆どの指標で示された（そのうちの幾つかは有意な効果）。さらに、これらの効果は、マウスモデルの肝臓細胞の ChIP-seq 解析でも確認された。（以上、分担研究者益谷が実施）

現段階で、ゲノムスタビライザーのリスク抑制効果は限定的である。しかし、本研究で、“活性クロマチン誘導の阻害物質 x”もリスク抑制効果を示すことが明確になった。今後、阻害物質 x との併用による“がん・ゲノム不安定性のリスク抑制”への相乗効果を検証し、放射線発がんのリスク影響とその

リスクの抑制法を明確にし、それらの成果の論文発表を目指す。最終的に、一般概念を構築することにより、環境保健行政への貢献を目指す。

V 結論

本研究で、放射線による発がんのリスクの促進には、ゲノム不安定性のリスク上昇を伴うクロマチン状態変化が関わることが示された。重要なことに、このリスクは抑制可能である。

引用文献

1. Yoshioka, K. and Matsuno, Y. Genomic Destabilization and its Associated Mutagenesis Increase with Senescence-Associated Phenotype Expression. *Cancer Science*, 2021; 112: 515–522.
2. Matsuno, Y., Atsumi, Y., Shimizu, A., Replication stress triggers microsatellite destabilization and hypermutation leading to clonal expansion in vitro. *Nature Com.*, 2019; 10: 3925.
3. Matsuno, Y., Hyodo, M., Suzuki, M., Replication Stress-Associated DSBs Arisen by Ionizing Radiation Risk Genomic Destabilization and the Associated Clonal Evolution. *iScience*, 2021; 24: 102313.
4. Matsuno, Y., Atsumi, Y., Alauddin, M., Resveratrol and its Related Polyphenols Contribute to the Maintenance of Genome Stability. *Scientific Rep.*, 2020; 10: 5388.
5. Manaka, Y., Kusumoto-Matsuo, R., Matsuno, Y., Single Base Substitution Signatures 17a, 17b, and 40 Are Induced by γ -Ray Irradiation in Association with Increased ROS Levels. *Heliyon*, 2024; 9: e28044.
6. Matsuno, Y., Kusumoto-Matsuo, R., Asai, H., Echoed Induction of Nucleotide Variants and Chromosomal Structural Variants in Cancer Cells. *Scientific Rep.*, 2022; 12: 20964.