

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度～令和5年度実施総括報告書

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
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		

1. 研究の概要

放射線ばく露は、がん・ゲノム不安定性のリスク要因である。しかし、放射線で生じる様々なタイプの DNA 損傷の中で、『どの損傷が、どの様にリスクに関わるのか？』など、メカニズムには不明な点が多く、これが、人々の“放射線に対する不安要因”となってきた。最近我々は、『放射線ばく露後、複製ストレスに伴う DNA 二重鎖切断（DSB）が蓄積し、これがゲノム不安定性のリスク要因となっている』ことを見出した。また、ゲノム安定性を促進する成分を解析し、ゲノムスタビライザーを構築した。本研究では、放射線が“DSB 修復能”に与える影響の解明と、ゲノムスタビライザーによる“放射線発がんの抑制効果”の検証を目指した。その結果、『リスクが、クロマチン状態変化（これを伴うヒストン修飾）に伴って上昇している（その修飾を介在する因子の特定を含む）』ことが示された。放射線ばく露後は、まず、『活性クロマチン状態が亢進するため、この背景で、複製ストレスに伴う DSB（相同組み換え HR の標的）が誘導される』ことが示された。さらに、この HR 中間体が蓄積した背景では、『DSB 修復能が低いクロマチン状態（不活性なクロマチン状態）が誘導され、結果的に、ゲノム不安定性（修復エラーの起こりやすい状態）に陥っている』ことが示された。一方、ゲノムスタビライザーは“不活性クロマチンの動態変化”を誘導し、この背景で DSB が修復されることが示された。また、マウスモデル解析からは、放射線リスクの影響と、そのリスクに対するゲノムスタビライザーによる抑制効果（体重、血液成分、運動能力、寿命延伸、肝臓腫瘍に対して）の傾向が示された（そのうち幾つかは有意な効果）。以上の本研究の知見からは、放射線ばく露により、クロマチン状態変化に伴ってゲノム不安定性リスクが上昇していること、このリスクはゲノムスタビライザーなどによって抑制可能なことが示された。

2. 研究期間内に実施した内容

年目／実施年度	実施した内容
1 年目	令和3年度は、まず、高リスク状態の特定のため、“高解像共焦点レーザー顕微

令和3年度	鏡解析”と“CTCF（クロマチン構造の結節点に結合する因子）を標的とした ChIP-seq 解析”を実施した。その結果、放射線ばく露で現れるゲノム不安定性リスクが高い状態では、ヘテロクロマチンのフォーカス形成が亢進することを認めた。これに対し、CTCF の結合部位では、基本的に放射線ばく露では殆ど影響がない（僅かな差異のみ）。これらの結果は、『放射線ばく露による“ゲノム不安定性の高リスク状態”はヘテロクロマチン形成の亢進に伴って誘導され、これには CTCF 結合の部位の変化を伴う大規模なクロマチン構造変化は伴わない（或いは、限られる）』ことを示唆している。また、ゲノムスタビライザーの作用機序を解析するため、ゲノムスタビライザーの主成分を赤色蛍光色素（TAMRA）で標識し、細胞内の局在を解析した。その結果、主成分 X の“ヘテロクロマチン領域”への優先的な局在が示された。このことから、『ゲノムスタビライザーの主成分が直接にヘテロクロマチンに作用している』との可能性が考えられる。これは、ゲノムスタビライザーの、リスク抑制に対する作用機序を明確にする上で、重要な手掛かりと考えられる。 一方で、マウスモデルを用い、放射線発がんリスクに対し、“ゲノムスタビライザー”によるリスク抑制効果の検証の準備を進め、実験が開始した。これは、1年目としては予定通りである。
2年目	前年度の予備的解析を基盤とし、主に ChIP-seq 解析によって、放射線ばく露に起因して形成されるヘテロクロマチン領域を明確にし、それに対するゲノムスタビライザーの効果を解析した。特に、ヘテロクロマチン形成に関わるヒストンのメチル化修飾（クロマチン不活性化に関わる）と、これと拮抗するヒストンのアセチル化修飾（クロマチン活性化に関わる）を指標として解析した。その結果、放射線ばく露によってヒストン・メチル化の修飾部位が局所で変化し、実際にメチル化が亢進している領域が明確になった。また、そのメチル化修飾の亢進はゲノムスタビライザーの投与によって抑制されることも示された。一般に、今回解析したメチル化とアセチル化の修飾は、各々、クロマチンの不活性化と活性化に関わる拮抗する影響であるが、予想外なことに、本研究で、ゲノム不安定性リスクの高い背景では、その両方が亢進している領域が現れていることが示された。この両者が亢進した領域の影響もゲノムスタビライザーによって抑制された。一方、ゲノムスタビライザーの作用機序の解析では、ゲノムスタビライザーの投与によって“ヘテロクロマチン領域の動態変化”に伴って DSB 修復が誘導されることが示された。
令和4年度	マウスモデルを用いた“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”の実験が進行している。4 Gy 照射と 7 Gy 照射で解析したところ、7 Gy では、ゲノムスタビライザーの効果は認められなかった。近年、この線量では炎症の影響（一部の腸内細菌が介在する影響）が現れることが示されており、本解析知見からは、ゲノムスタビライザーはこのタイプの炎症には、効果を示さないと考えられる。4 Gy 照射の解析は進行中である。
3年目	前年度から進めていたメカニズム解析から、クロマチンの不活性化と活性化を

令和5年度	介在する責任因子（メチル基転移酵素と脱アセチル化酵素）が明確になった。また、ヒストン・アセチル化の亢進は DNA 複製ストレス誘導に関係するのに対し、ヒストン・メチル化の亢進は DSB の蓄積（修復能の低下）に関係していることも示された。ゲノムスタビライザーは、『ヒストン・メチル化（これに伴うヘテロクロマチン形成）の亢進に対し、その動態に作用して、DSB 修復を可能にしている』ことが示唆されたが、ヒストン・アセチル化亢進（これに伴う DNA 複製ストレス誘導）に対しては効果を示さなかった。一方で、今年度の解析で、ヒストン・アセチル化亢進に対し、抑制効果を示す成分 x が見出された。実際、ゲノムスタビライザーのみでのリスク抑制効果は限定的であるが、成分 x との併用では相乗効果が認められた。これまでの解析では、主に、マウス胎仔線維芽細胞を用いて実施されたが、令和5年度の解析で、ヒト上皮細胞でも同様の影響が現れることが確認された。さらに、全ゲノム解析で、ROS（活性酸素種）に伴う SBS シグネチャーを伴う SNV（一塩基置換変異）が SV（染色体構造変異）とは無関係に誘導されていることが示された（一部、ヒト放射線発がん細胞でも認められた）⁵⁾。 マウスモデルを用いた“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”の実験（4Gy 照射）では、ゲノムスタビライザーの効果が明確になってきた。特に、放射線ばく露により、体重、血液成分、運動能力、寿命延伸、肝臓腫瘍に対して影響が現れたが、ゲノムスタビライザーの投与により、リスク抑制の傾向が認められた。重要なことに、現段階では限定的ではあるものの、幾つかの指標では有意な効果が示された。
-------	--

3. 研究終了時に得られた結果・結論

① 研究結果・結論（総括）・成果など

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、そのメカニズム解析を行い、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の介在因子が示された。特に、この修飾が、DSB 修復の中間体に起因して誘導されていることが示された。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、クロマチン状態が“低リスク状態に近い状態”に戻る様子が示された。（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ヒストン修飾と活性化クロマチンのヒストン修飾の両方の亢進が示された。メカニズム解析からは、活性化クロマチンのヒストン修飾の介在因子も特定され、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⁹⁾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。

② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

本研究目標を、意気込みを含め、**放射線発がん（ゲノム不安定性のリスク）要因の“メカニズム解明”**としていたが、これは達成されていない。一方、実施予定であった全ての解析を成功裏に終えることが出来た。全ての解析を成功裏に終えたにも関わらず、メカニズム解明に至らなかった主な理由は、放射線ばく露による“ゲノム不安定性のリスク誘導”の作用点に、当初考えられた作用点（ヒストン・メチル化亢進に伴う DSB の蓄積）の他に、『**もう一つの作用点（ヒストン・アセチル化亢進に伴う DNA 複製ストレス誘導）が含まれていた**』ためである。

本研究では、『メカニズムが正しく解明された場合、その作用点の抑制で予防が可能』と考えて、予防効果を明確にすることまでを到達目標としてきた。現段階で、ゲノムスタビライザー（ヒストン・メチル化亢進に伴って蓄積した DSB を標的とした予防）による予防効果は様々な指標で示されつつあるが、その効果は限定的である。本研究からは、もう一つ独立の作用点の“ヒストン・アセチル化亢進に伴う過剰な DNA 複製ストレス”が明確になり、そのアセチル化を抑制する成分 x も明確になった。実際、現段階までの *in vitro* 解析から、成分 x との併用によってリスク抑制に対する相乗効果も認められている。このことは、当初考えていた作用点の他に、『もう一つ独立の作用点の“ヒストン・アセチル化亢進に伴う過剰な DNA 複製ストレス”が含まれる』との、メカニズム解析から見出された知見からも矛盾がない。このため、この知見は“**メカニズム解明**”に向けた重要な手掛かりであると考えられる。

本研究は、『研究協力者の広島大学田代聡教授の協力で示された広い線量率（1Gy/min～1Gy/12hr）で同様の影響が現れる³⁾』との知見を基盤とし、その範囲で実施した。実際は、必要に応じて線量率影響の解析を実施予定であったが、本研究期間内では実現されなかった。今後の実施を検討している。

③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

当初、『放射線ばく露後、ヒストン・メチル化の亢進に伴って“DSB が修復され難い状態で蓄積”するため、ゲノム不安定性のリスクが上昇している』ことが示され、そのメチル化亢進のメカニズムの解明を目指し、さらに、それを作用点としたリスク抑制法の創出を目指してきた。実際、本研究により、そのメカニズムは明確になり、ゲノムスタビライザーの作用機序とそのリスク抑制効果も示された。しかし、このヒストン・メチル化亢進に伴うリスク上昇に加え、複製ストレスが生じ易い背景（これに伴う DSB が誘導され易い要因）の形成に関わる“ヒストン・アセチル化亢進”に伴うリスクも明確になった。これは当初は全く予想していなかったことであり、この発見は“当初の計画で予定した成果以上”の成果である。この発見に加え、本研究の実施により、このアセチル化亢進を介在する因子も明確になり、メチル化亢進の因果関係も示唆された。これらも、“当初の計画で予定した成果以上”の

成果である。

また、このアセチル化亢進の抑制法では、既に、アセチル化抑制に資する成分 x も明確になった。さらに、*in vitro* ではゲノムスタビライザーと成分 x との併用で、リスク抑制の相乗効果も認められており、この点も“当初の計画で予定した成果以上”の成果である。現段階で、ゲノムスタビライザーと成分 x の併用による放射線発がんに対する予防効果の解析準備が整っている。この点でも、“当初の計画には無いレベルの進捗である。

本研究では詳細なメカニズムが明確になってきたが、これにはゲノム解析の成果が大きく貢献している。これは、研究協力者の国立がん研究センター研究所の間野博行研究所長の協力・アドバイスで実施された成果である。

4. 研究成果の活用方策の提案

本研究をさらに発展させる新たな研究や事業化の提案

従来、放射線発がんのリスクについては、『放射線で生じる“様々な DNA 損傷”の中で、どの損傷が、どの様にリスクに関わるのか?』など、メカニズムには不明な点が多かった。これが人々の“放射線に対する不安要因”となってきたと考えられる。本研究では、特に、『メカニズムが正しく解明された場合、その作用点の抑制によって予防が可能となる』と考え、予防効果の検証までを到達目標としてきた。この点は、本研究で非常に近づいたと考えられる。これを基盤とし、さらに発展させることで、ゲノムスタビライザーと成分 x の併用で、目標に到達する可能性が高いと考えられる。このため、本研究の発展からは、人々の“放射線に対する不安要因の解消（リスク要因・リスクの抑制法が明確になるため）”への貢献が期待される。

我々の解析からは、『放射線発がんは、基本的に“老化がリスク要因に含まれる一般的ながん（大腸がん、卵巣がん、膵臓がんなど）”と同様、複製ストレスで生じるゲノム不安定性リスクに起因している』こと、『放射線ばく露はその促進要因である』と考えられる^{2,3,6)}。このため、ゲノム不安定性リスクの抑制を作用点とした“ゲノムスタビライザーと成分 x”では、放射線発がん以外のがんに対しても予防効果が期待される（大腸がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がんなど）。このため、“ゲノムスタビライザーと成分 x”の研究をさらに発展させることで、これらのがんの予防の可能性が期待され、さらに、がん予防薬・サプリメントの開発に向けた事業化も期待される。

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.