

令和元年6月4日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00543

研究課題名(和文) マルチモーダル解析による低線量放射線細胞応答機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of low-dose radiation-induced cellular responses by multimodal analyses

研究代表者

津山 尚宏 (Tsuyama, Naohiro)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10335747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低線量放射線照射により生じる細胞環境の変動について、蛍光プローブにより細胞内環境を測定し、液体クロマトグラフィー-質量分析による代謝物変動解析を行い、多面的な理解を試みた。DNA損傷応答遺伝子を標的としてヒト繊維芽細胞の遺伝子ノックダウンを行い、我々が以前に報告した核酸代謝物や脂質代謝物などの変動を解析したところノックダウンにより変動が失われており、ミトコンドリア活性やレドックス状態なども正常細胞に比べ応答が低下していた。また、CRISPR/Cas9による特異的DNA配列切断系を作成し、低線量被曝に相当するDNA損傷や突然変異誘発が生じることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低線量放射線照射による細胞応答について、正常細胞の系統的なノックダウンによる同一の実験系を使い、DNA損傷応答シグナル伝達機構からの細胞内環境や代謝調節への関与を、複数の解析モードにより結果を得ることができた。特定のシグナル分子と細胞内環境を並行して解析できたことから、今後シグナルのクロストーク解析に有用であると考えられた。また電離放射線を使わず、DNA二本鎖切断を誘導できるCRISPR/Cas9系を作成したことで、低線量で生じる反応を高感度に定量的に解析できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of multidimensional understandings of intra-cellular environmental changes after low-dose ionizing radiation, we made multimodal analyses using molecular species-specific fluorescent probes and liquid chromatography-mass spectrometry. After the knockdown of DNA damage response genes in human fibroblasts, we found the loss of alteration of nucleic acids metabolites and lipid derivatives which we reported previously, and loss of response in mitochondrial activity and redox state by low-dose irradiation. In addition, we made a system of DNA sequence specific digestion using CRISPR/Cas9, and confirmed DNA damages and induction of mutation which corresponds to low dose irradiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：低線量放射線 細胞応答 メタボローム 蛍光分子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の放射線応答は、高線量域においては多数の報告があるものの、低線量域での詳細で集学的な報告はなく、また様々な実験系をもちいた結果であるため比較を行うことが難しい。

我々は、低線量域での細胞応答解析のため液体クロマトグラフィー/質量分析を用いた網羅的代謝物解析(メタボローム解析)を行ってきた(Tsuyama N, J Rad Res, 2014)。100 mGy以下のX線照射により、高線量域で増加が報告されていた核酸代謝物や報告のないミトコンドリアの脂肪酸シャペロンであるアシル化カルニチンなどの数十分子種の変動を確認した。これらの分子変動の機構や変動の結果をシグナル応答分子の挙動と合わせて理解することは、生体影響の解明に重要であり、同一の実験系を使い複数の指標を分子変動と組み合わせることで比較分析することで相関が明確になると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 培養細胞を用いて、低線量放射線のもたらす代謝変動と細胞内環境を分子標的蛍光プローブによる細胞内活性酸素、pH、ミトコンドリア調節の可視化を行い、低線量照射による代謝変動の際の細胞内環境について明らかにする。

(2) 同一の細胞を用いて DNA 鎖切断センサー分子や代謝制御分子のノックダウンを行い、我々がこれまでに観察してきた低線量放射線応答への遺伝子ノックダウンの影響や細胞環境の影響について検討する。

(3) 低線量放射線被ばくを模するために、以下の CRISPR/Cas9 を用いた DNA 配列特異的 DNA 二本鎖切断誘導系の開発研究を追加した。DNA 二本鎖切断は放射線の体分子損傷の中でも放射線特徴的に観察される事象であるが、低線量放射線では頻度が低いうえ、他分子の励起・損傷により生じる事象と区別して追跡することが難しい。ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 を用いて、配列特異的に DNA 二本鎖切断を作成し、低線量被ばくに相当する少数の DSB がもたらす影響の観察を試みる。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞メタボローム解析

ヒト繊維芽細胞 TIG-3 を用い、DNA 二本鎖切断シグナル応答因子である ATM, ATR, DNAPK, KU70, NBS1, H2AX や代謝調節にも関与する AMPK, MTOR などに対する shRNA 発現レトロウイルスベクターを構築して感染細胞を作製した。RT-Q-PCR により、それぞれの感染細胞で標的の遺伝子 mRNA がノックダウンされていることを確認し、X線照射実験(0, 0.1, 3 Gy)に供した。照射細胞は一定時間経過後に回収し、メタノール抽出・濃縮の後、親水クロマトグラフィー(Amide80)で分離し、Orbitrap Elite で質量分析を行った。質量スペクトルは MZmine2 でピーク抽出およびアラインメントを行った後、MS-Excel にて KEGG 探索マクロを用いて精密質量から分子候補抽出を行い、in house database から分子同定した。変動分析は MeV を用いた。

(2) 蛍光イメージング解析

上記のノックダウン細胞をガラスボトムディッシュに巻き込み、放射線照射を行った後に Rhodamine1-2-3 や DCF, BCECF などの蛍光色素で染色して画像を取り込み、複数細胞の蛍光強度の定量化を行った。

(3) CRISPR/Cas9 を用いた配列特異的 DNA 二本鎖切断

配列特異的 DNA 二本鎖切断の標的として、14 番染色体末端の IgH M 鎖のエンハンサーとスイッチ領域の間、および 11 番染色体長腕の CCND1 遺伝子の 5' 上流 10-15kbp に 20 塩基の標的配列を切断効率とオフターゲットを考慮してデザインした。5 種類の標的配列候補をそれぞれ lentiCRISPRv2 に導入し特異的 DNA 二本鎖切断切断ベクターとした。切断活性をモニターするため、pCAG-EGFP に標的 genome 領域を含む PCR 断片をクローニングしたベクターを作成した。293T 細胞に導入し、切断ベクターの特異的 DSB により EGFP の蛍光回復を指標として標的配列を選択した。同時に二箇所を切断するベクターを作成するため、CCND1 gRNA 発現配列を IgH gRNA 発現ベクターにクローニングし、IgH および CCND1 切断ベクターとした。

4. 研究成果

(1) 遺伝子ノックダウン細胞の代謝変動解析

我々が以前に報告した低線量代謝変動代謝物の多くが、DNA 二本鎖切断シグナル分子 ATM, DNAPK, KU70, NBS1 の shRNA によるノックダウンの結果、X線照射による代謝変動を示さなくなった(図1)。ATR については応答性を維持している分子もあり、DNA 一本鎖切断では異なる代謝調節を受けている可能性が考えられた。また、AMPK や MTOR など代謝調節とのクロストークを担う分子のノックダウンでも X線応答性を失う代謝物があり、X線応答シグナルの下流にはこれら分子の関与する代謝調節機構があると考えられたが、各々のノックダウンに伴う変動の影響については、さらに解析が必要と考えられた。例示した代謝物は、ミトコンドリア機能(acylcarnitine)や核酸代謝(hypoxanthine)に関与する分子であり、これら代謝物の放射線応答への寄与が示された。

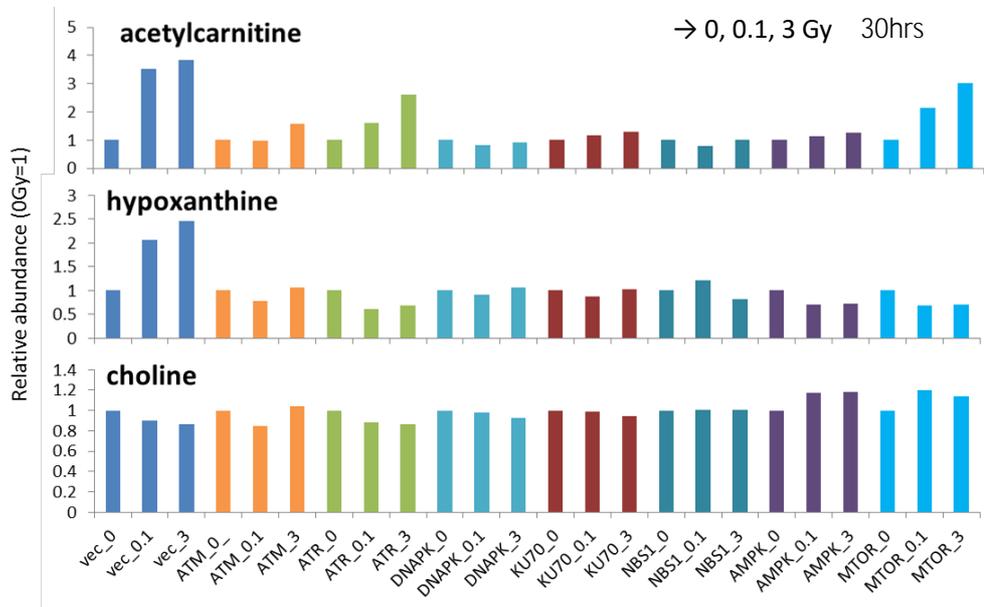


図1．遺伝子ノックダウン細胞を用いた代謝物変動解析の例

(2) 遺伝子ノックダウン細胞の蛍光イメージング解析

上記のノックダウン細胞を用いて、X線照射後のミトコンドリア活性や量、活性酸素量、pHを蛍光顕微鏡を用いて解析した。DNA二本鎖切断シグナルのノックダウンにより、蛍光プローブで観察されるX線による変動は低下した(図2)。代謝調節キナーゼでは、低線量照射のみノックダウンの効果が認められた。

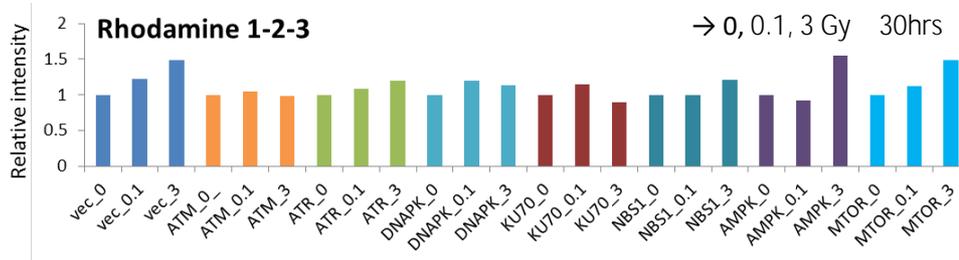


図2．遺伝子ノックダウン細胞を用いた細胞機能変動解析の例

(3) 遺伝子ノックダウン細胞のCRISPR/Cas9を用いた配列特異的DNA二本鎖切断

IgH/CCND1の二箇所を切断するベクターを培養細胞に導入し標的DNA領域をPCR増幅したところ、mismatch cleavage assayにより切断バンドが認められ、ゲノム編集により突然変異が生じていることが確認された。DNA配列解析の結果、IgH, CCND1それぞれの標的領域に、2つのアレルそれぞれに別々の欠損が生じており、配列特異的なDNA二本鎖切断が生じていることが確認された。また、ベクター導入後にDNA二本鎖切断部位に生じるgH2AXを染色したところ、対照と比較して有意な増加が検出された。以上より、このベクターを用いることで特定のDNA配列に二本鎖切断を誘導できることから、これまで放射線照射後にランダムに生じていたDNA二本鎖切断によるシグナル応答の解析を行っていたが、ゲノム上の特定領域のDSBの影響を観察することが可能となった。また、このデザインでは相同染色体上のそれぞれの標的配列を切断するので、1細胞あたりDSB4箇所と、線では100mGyの低線量放射線照射に相当し、少数のDSBが誘導するDNA損傷応答の解析も可能と考えられた。

さらに導入細胞を単離し、genome DNAから染色体転座特異的プライマーによるPCRとFISH(図3)を行って、14番染色体のIgHと11番染色体のCCND1の間で染色体転座t(11;14)による遺伝子再構成が起きていることを確認した。異常頻度は約1000分の1で、低線量被曝に相当する特定のDSBから、腫瘍化に参与するような染色体転座による遺伝子異常の発生頻度は低いことがわかった。

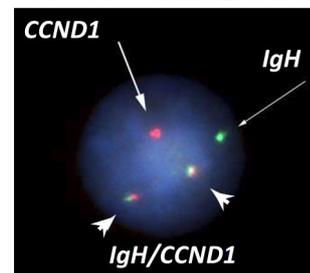


図3 t(11;14) FISH

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

Fujii T, Matsuda S, Tejedor ML, Esaki T, Sakane I, Mizuno H, Tsuyama N, Masujima T. Direct metabolomics for plant cells by live single-cell mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2015 Sep;10(9):1445-56. doi: 10.1038/nprot.2015.084. 査読有

Abe Y, Miura T, Yoshida MA, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Muto S, Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Increase in dicentric chromosome formation after a single CT scan in adults. *Sci Rep.* 2015 Sep 9;5:13882. doi: 10.1038/srep13882. 査読有

Abe Y, Miura T, Yoshida MA, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Kawamura F, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Muto S Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Analysis of chromosome translocation frequency after a single CT scan in adults. *J Radiat Res.* 2016 Jun;57(3):220-6. doi: 10.1093/jrr/rrv090. 査読有

Kawamura F, Inaki M, Katafuchi A, Abe Y, Tsuyama N, Kurosu Y, Yanagi A, Higuchi M, Muto S, Yamaura T, Suzuki H, Noji H, Suzuki S, Yoshida MA, Sasatani M, Kamiya K, Onodera M, Sakai A*. Establishment of induced pluripotent stem cells from normal B cells and inducing AID expression in their differentiation into hematopoietic progenitor cells. *Scientific Reports.* 2017 May 10 ; 7 (1) : 1659. 査読有

Mizuno H, Ueda K, Kobayashi Y, Tsuyama N, Todoroki K, Min JZ, Toyo'oka T. The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. *Biomed Chromatogr.* 2017 Jan;31(1). doi: 10.1002/bmc.3864. Epub 2016 Nov 16. 査読有

Abe Y, Yoshida MA, Fujioka K, Kurosu Y, Ujiie R, Yanagi A, Tsuyama N, Miura T, Inaba T, Kamiya K, Sakai A. Dose-response curves for analyzing of dicentric chromosomes and chromosome translocation following doses of 1,000 mGy or less based on irradiated peripheral blood samples from 5 healthy individuals. *J Radiation Research.* 59 : 35-42, 2018. 査読有

[学会発表](計 18 件)

Tsuyama N. Low-dose radiation metabolomics in human cells. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan. May 27, 2015.

Abe Y, Miura T, Yoshida M, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Analyses of dicentric chromosome formation and chromosomal translocation after a single CT scan in adults. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan. May 28, 2015.

Abe Y, Miura T, Yoshida M, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Kawamura F, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Analysis of chromosome translocation frequency after a single CT scan in adults. *EPRBioDose 2015 Conference.* Hanover, NH, USA. 2015.10.6.

阿部悠, 三浦富智, 吉田光明, 氏家里紗, 黒須由美子, 柳亜希, 津山尚宏, 川村文彦, 藤岡来実, 稲葉俊哉, 神谷研二, 坂井晃. 低線量 線照射による細胞遺伝学的線量評価用線量応答曲線の作製. 第 59 回日本放射線影響学会 広島市 2016. 10. 26-28.

津山尚宏, 三角宗近, 村上秀子, 大石和佳, 長町安希子, 稲葉俊哉, 丹羽保晴, 児玉和紀, 高橋規郎. 高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた放射線に相関した高血圧における代謝物変動追跡. 第 59 回日本放射線影響学会 広島市 2016. 10. 26-28.

阿部悠, 三浦 富智, 吉田 光明, 黒須 由美子, 菅井 美咲, 柳 亜希, 柳井 祐佳里, 津山尚宏, 稲葉 俊哉, 神谷 研二, 坂井 晃. シンポジウム: 染色体解析による線量評価のオートメーション化 - 現在の到達点と残る課題 - 第 60 回日本放射線影響学会. 千葉市. 2017. 10. 28.

津山尚宏, 水野 初, 山本 健太, 植田 一樹, 三角 宗近, 村上 秀子, 大石 和佳, 長町 安希子, 稲葉 修, 高橋 規郎. 高血圧自然発症ラット (SHR) 血漿/血清を用いた放射線と相関する高血圧症の経時変動指標分子探索. 第 60 回日本放射線影響学会. 千葉市. 2017. 10. 26.

阿部悠, 菅井 美咲, 黒須 由美子, 津山尚宏, 柳 亜希, 柳井 祐佳里, 吉田 光明, 大葉 隆, 野地 秀義, 石川 徹夫, 神谷 研二, 坂井 晃. 継続的な CT 検査による染色体異常形成数の累積性の検討. 第 60 回日本放射線影響学会. 千葉市. 2017. 10. 26.

Yu Abe, Hideyoshi Noji, Misaki Sugai, Yumiko Kurosu, Takashi Ohba, Naohiro Tsuyama, Aki Yanagi, Yukari Yanai, Tetsuo Ishikawa, Tomisato Miura, Kenji Kamiya, Mitsuaki A Yoshida, Akira Sakai. Investigation of the cumulative number of chromosome aberrations induced by three consecutive CT scans. *American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018.* Chicago. USA. 2018.4.15.

Yu Abe, Mitsuaki A Yoshida, Kurumi Fujioka, Yumiko Kurosu, Risa Ujiie, Aki Yanagi, Naohiro Tsuyama, Tomisato Miura, Toshiya Inaba, Kenji Kamiya, Akira Sakai. Construction of dose response curves for cytogenetic biodosimetry in the low dose range based on five persons. EPRBioDose 2018. Munich, Germany. 2018.6.11-15.

Hajime Mizuno, Kenichiro Todoroki, Naohiro Tsuyama, Iwao Sakane, Shinobu Kudoh Live Single-cell MS Analysis for Cellular Phospholipid Dynamics 66th ASMS Conference by American Society for Mass Spectrometry 3-7 June 2018

水野 初、津山尚宏. 1 細胞質量分析法の開発, 第 31 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS) 2018.8.28-29

Abe Y, Noji H, Sugai M, Kurosu Y, Tsuyama N, Yanagi A, Yanai Y, Ohba T, Ishikawa T, Miura T, Kamiya K, Yoshida MA, Sakai A. Analysis of the number of chromosome aberrations induced by three consecutive CT examinations. 第 61 回日本放射線影響学会. 長崎県長崎市. 2018.11.7.

津山尚宏、阿部悠、柳亜紀、菅井美咲、坂井晃. CRISPR/Cas9 を用いた t(11; 14) 染色体転座誘発. 第 61 回日本放射線影響学会. 長崎県長崎市. 2018.11.7.

Hajime Mizuno, Naohiro Tsuyama, Kenichiro Todoroki, and Shinobu Kudo. Development and improvement of “ Live single-cell mass spectrometry ” for single cell level metabolomics 第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.28-30

Yu Abe, Hideyoshi Noji, Misaki Sugai, Yumiko Kurosu, Naohiro Tsuyama, Aki Yanagi, Yukari Yanai, Takashi Ohba, Tetsuo Ishikawa, Tomisato Miura, Kenji Kamiya, Mitsuaki A. Yoshida, Akia Sakai. Analysis of the number of chromosome aberrations induced by three consecutive CT examinations. 放射線災害・医科学研究拠点 第 3 回国際シンポジウム. 福島県福島市. 2019.1.13.

Naohiro Tsuyama, Yu Abe, Aki Yanagi, Misaki Sugai*, Kenji Kamiya, Akira Sakai. Induction of t(11;14) IgH enhancer/promoter-cyclin D1 gene translocation using CRISPR/Cas9. 放射線災害・医科学研究拠点 第 3 回国際シンポジウム. 福島県福島市. 2019.1.13.

水野 初、津山尚宏、轟木 堅一郎、工藤 忍、Live Single-cell MS による細胞内リン脂質分析、第 10 回 JBF シンポジウム 2019.2.12-14

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：阿部悠

ローマ字氏名：Yu Abe

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号：00722402

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。