

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10013

研究課題名(和文) 生体内被ばく細胞追跡システムの開発研究

研究課題名(英文) Development of radiation exposed-cell tracking system for imaging within living cells

研究代表者

須藤 仁美 (Sudo, Hitomi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・研究員(任常)

研究者番号：10415416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：放射線による生体への影響、特に放射線発がんのメカニズムを正しく理解するには、細胞を“群”として捉えるのではなく、細胞ひとつひとつを“個別に観察する”ことが重要である。それには、個々の細胞について放射線被ばくの有無を区別し、生体内で長期間に渡って追跡できるシステムが必要であるが、現時点では有効なものは報告されていない。そこで本研究では、放射線被ばくに対して鋭敏かつ特異的に応答する遺伝子プロモーターとレポーター遺伝子とを細胞内に組み込み、個々の細胞における被ばくの有無を細胞が生きた状態で可視化する「生体内被ばく細胞追跡システム」を確立した。

研究成果の概要(英文)：In order to accurately understand the biological effects of radiation, especially the mechanism of radiation-induced cancer, it is important to observe cells individually as “individual cells”, not “group of cells”. Therefore, it is necessary a system that distinguishes the presence or absence of radiation exposure within individual living cells and follows up over long period. However, it has not been reported a suitable system at the present time. In this study, we constructed the expression vectors including radiation-responsive sequences inducing the expression of a downstream reporter genes and developed “radiation exposed-cell tracking system”, which allow to visualize irradiated cells individually within living cells

研究分野：分子生物学、放射線生物学

キーワード：放射線応答遺伝子 Cre/loxP発現制御システム

1. 研究開始当初の背景

放射線の生体影響、特に放射線発がんに関しては、これまで様々な研究が行われてきたが、未解明な部分が多く残されている。原発事故以来、国民は放射線の人体への影響、特に食物などを通じて放射性物質を体内に取り込むことにより生ずる内部被ばくについて、大きな関心を寄せているが、アカデミアは国民を完全に納得させられる知見を持ち合わせていない。

これまでの放射線の生体影響研究では、放射線は数多く存在する細胞に対して『均一に照射されたと仮定』して解析されている場合が多かった。しかしながら、実際には照射は不均一であり、被ばくした細胞としていない細胞が存在する。特に内部被ばくでは、体内に入った放射性同位体の種類によって臓器間での集積に差があり、さらに臓器内における分布も不均一であると考えられている。このことは、同じ臓器内の細胞であっても個々の細胞では被ばく量が異なることを意味している。一方、被ばくした細胞が放出する物質により、被ばくしていない細胞の染色体不安定性が増加することから、放射線に誘発されるリンパ腫は、被ばくしていない細胞から生ずるとの報告もある¹。以上のように、生体内では被ばくをした細胞と被ばくをしていない細胞が存在すると共に、放射線発がんは必ずしも被ばくを受けた細胞から生ずるのではないことが判明しつつある。放射性発がん、特に内部被ばくによる発がんを理解するには、被ばくした個々の細胞がどのような運命を辿り、また被ばくしなかった細胞との関係性について長期間に渡り追跡することが必要である。しかし、現時点ではこのようなシステムは報告されていない。

2. 研究の目的

放射線被ばくに対して鋭敏に反応する遺伝子プロモーターによって Cre 遺伝子を発現させ、それにより loxP 配列をもつレポーター遺伝子の発現を変化させることにより、個々の細胞における被ばくの有無を細胞が生きた状態で可視化できる「生体内被ばく細胞追跡システム」を構築する。構築したシステムが培養細胞レベルで有効に機能することを実証する。

3. 研究の方法

(1) 放射線応答プロモーターの選択

既に放射線応答遺伝子として報告されている、Early Growth Response 1 (EGR1)²、Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 α (Gadd45a)³、Tissue-type plasminogen activator (PLAT)⁴ をプロモーター候補として使用した。これら 3 遺伝子のプロモーター領域に放射線応答配列をもつことが明らかになっている⁵。そこで、これら遺伝子の放射線応答領域を PCR で増幅し、pGL4.10[luc2] ベクター (プロメガ) のマルチクローニング

サイトに組み込むことで、放射線に反応して Firefly ルシフェラーゼを発現するベクターを作成した。内部コントロールとして Renilla ルシフェラーゼ発現ベクター (pRL-SV40 ベクター, プロメガ) を使用した。これらのベクターを、Lipofectamin 3000 (インビトロジェン) を用いて HeLa 細胞にトランスフェクションした。3 日後、これらの細胞に X 線 10Gy を照射し、1, 4, 8, 24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイを行い、放射線応答遺伝子のプロモーター活性を評価した。

(2)

各遺伝子をプロモーターとした Firefly ルシフェラーゼベクターを安定的に発現する HeLa 細胞を樹立した。それぞれの細胞をヌードマウスに皮下移植し、形成された皮下腫瘍に X 線 20Gy 照射し、照射後 2, 4, 8, 24 時間後のルシフェラーゼ活性を IVIS Imaging System にて測定した。最も反応性に優れた細胞の皮下腫瘍では、さらに 5, 10, 60Gy の X 線を照射し、線量依存性を評価した。

(3) Cre/loxP を用いたデュアル蛍光レポーターシステムの構築

①放射線応答遺伝子-Cre ベクターの作成

pCSCer ベクター (Addgene) を用いた。In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて、ベクターの Cre 配列の上流に、上記 (1) (2) で最も放射線に対する反応性が優れていた EGR1 を組み込み、放射線照射により Cre リコンビナーゼが発現するベクターを作成した。

②loxP-ZsGreen1-loxP-mCherry を安定発現する HeLa 細胞の樹立

pcDNA3.1/Hygro(+) ベクター (インビトロジェン) のマルチクローニングサイトに、Stoplight 2.4 ベクター (Addgene) から制限酵素処理により切り出した loxP-ZsGreen1-loxP-mCherry 配列を組み込んだ。このベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、Hygromycin による選択とクローニングにより、loxP-ZsGreen1-loxP-mCherry 配列を安定的に発現する細胞 (ZsGreen1/Cherry-HeLa) を樹立した。

③デュアル蛍光レポーターシステム細胞の作成

上記①で作成した放射線応答遺伝子-Cre ベクターを②で樹立した ZsGreen1/Cherry-HeLa 細胞にトランスフェクションし、X 線 20Gy を照射した。照射 1, 4, 8, 24, 48 時間後に蛍光顕微鏡で細胞を観察し、X 線照射により細胞の発する蛍光の変化 (図 1) を確認した。次に、照射線量による蛍光変化への影響をみるために、0, 5, 10, 20Gy の X 線を照射し、細胞を観察した。また、

蛍光の変化をフローサイトメーターでも確認した。

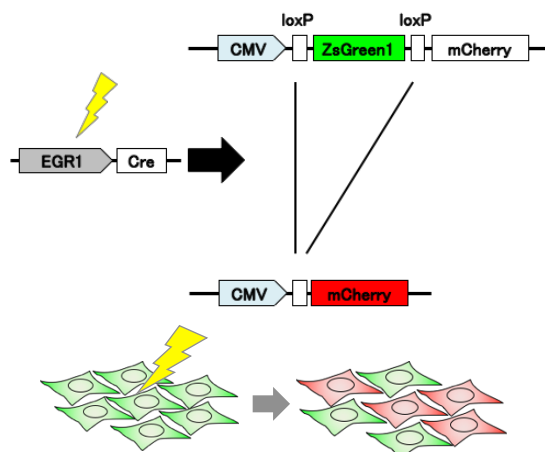


図1 デュアル蛍光レポーターシステム

4. 研究成果

(1) 放射線応答プロモーターの選択

放射線応答プロモーターの活性を、内部コントロールのRenillaルシフェラーゼに対するFireflyルシフェラーゼの活性で評価した。

EGR1 をプロモーターにした細胞では、X線照射後4時間にFireflyルシフェラーゼの活性が、未照射時の2.3倍に上昇し、このレベルを少なくとも24時間維持していた(図2a)。Gadd45a をプロモーターにした細胞では、X線照射後のFireflyルシフェラーゼの活性は未照射時に比べて最大で1.7倍上昇した(図2b)。PLAT をプロモーターにした細胞では、Fireflyルシフェラーゼの活性がX線照射24時間後に未照射時の3.3倍に上昇した(図2c)。

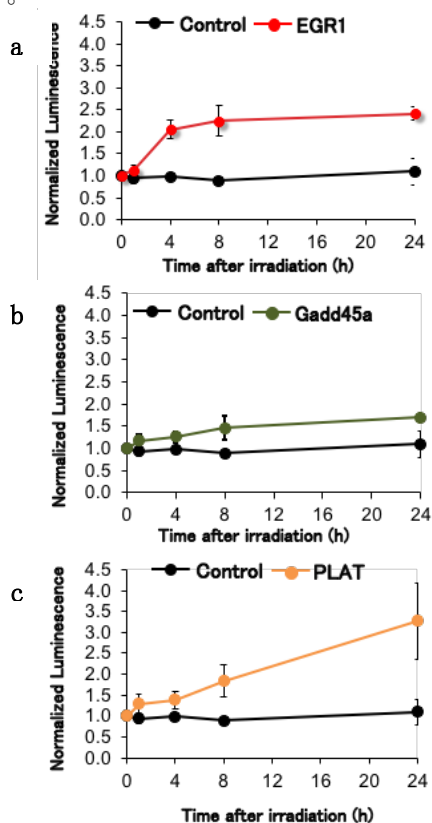


図2 放射線応答遺伝子プロモーターの活性

(2) in vivo

In vivo でのプロモーター活性を評価するため、各遺伝子をプロモーターとしたルシフェラーゼベクターを安定的に発現する HeLa 細胞 (EGR1-, Gadd45a-, PLAT-Luc/HeLa) を樹立した。この細胞をヌードマウスの皮下に移植し、形成された腫瘍に X 線を照射した。最もルシフェラーゼの活性が高かったのは、EGR1 をプロモーターとした細胞の腫瘍で、照射2時間後から腫瘍のルシフェラーゼ活性は上昇し、4時間後にピークに達した。また、EGR1-luc/HeLa 腫瘍のルシフェラーゼ活性は、線量依存的に上昇した。

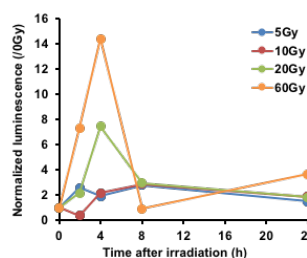


図3 in vivo における EGR1 のプロモーター活性

(3) Cre/loxP を用いたデュアル蛍光レポーターシステムの構築

上記(1)および(2)の結果より、EGR1 を放射線応答プロモーターとして選択した。pCSCer ベクターの Cre リコンビナーゼ配列の上流に EGR1 の放射線応答領域を組み込んだ EGR1-Cre ベクターを作成した。作成したベクターは、シーケンス解析により、EGR1 と Cre リコンビナーゼの配列を確認した。

Stoplight 2.4 ベクターから切り出した loxP-ZsGreen1-loxP-mCherry 配列を、pcDNA3.1/Hygro(+) ベクターに組み込み、loxP-ZsGreen1-loxP-mCherry/pcDNA3.1 ベクターを作成した。このベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、loxP-ZsGreen1-loxP-mCherry を安定発現する ZsGreen1/Cherry-HeLa 細胞を樹立した。樹立した細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、すべての細胞が ZsGreen タンパク質の緑色蛍光を発していた。(図4)

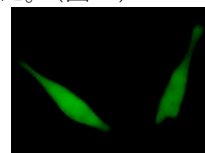


図4 ZsGreen1/Cherry-HeLa 細胞

この細胞に、作成した EGR1-Cre ベクターをトランスフェクションした。導入した細胞 (EGR1-Cre/ZsGreen1/Cherry-HeLa 細胞) に 20Gy の X 線を照射し、1、4、8、24、48 時間

後の細胞を、蛍光顕微鏡で観察した。未照射の細胞は、緑色蛍光を発していた (図 5a)。X 線 20Gy を照射した細胞は、照射 1 時間後から赤色蛍光を発する細胞が観察された。照射後、1 から 8 時間では、赤色と緑色、両方の蛍光を発する細胞が観察されたが、照射 24 時間後では、両方の蛍光を発する細胞は減少し、緑色もしくは赤色蛍光のどちらか一方の蛍光を発する細胞が観察された。また、照射 24 時間後から 48 時間後にかけて、赤色蛍光を呈する細胞数が増加するとともに、その蛍光強度も増加する傾向にあった (図 5b)。

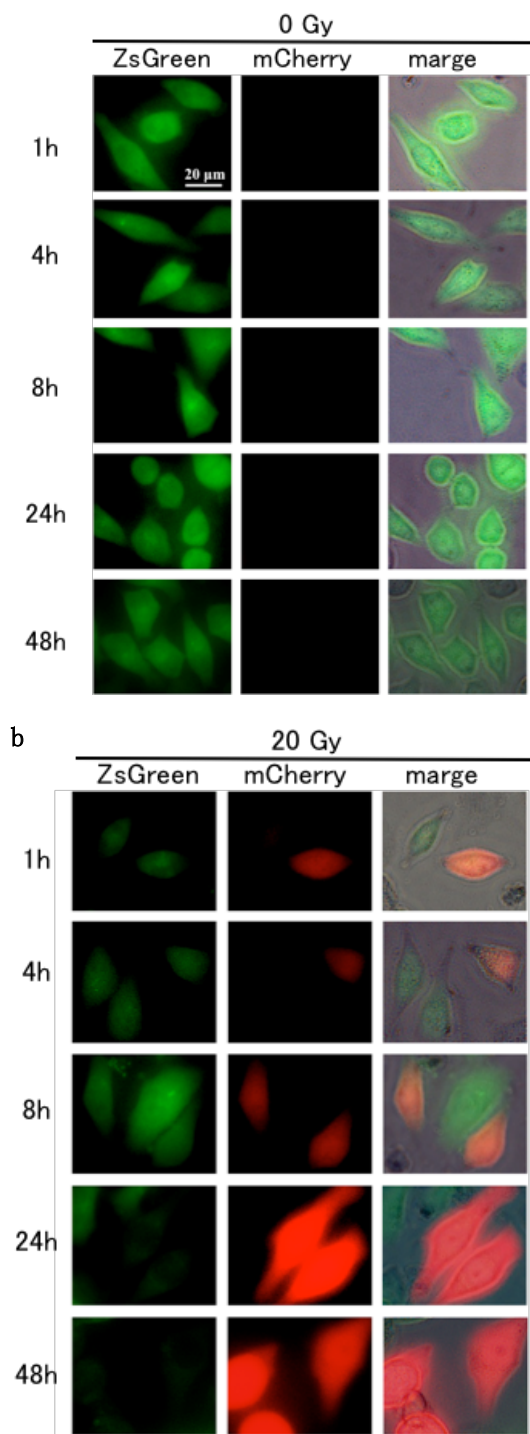


図 5 20Gy 照射後の EGR1-Cre/ZsGreen1/mCherry-HeLa 細胞の蛍光スイッチング

次に、EGR1-Cre ベクターをトランスフェクションした ZsGreen1/Cherry-HeLa 細胞に、0、5、10、20Gy の X 線を照射し、蛍光顕微鏡による細胞観察とフローサイトメーターによる解析を行なった。照射 1 時間後では、照射線量による赤色細胞の割合に著しい差はなかった。照射 24 時間後では、20Gy 照射群の赤色蛍光細胞が、5、10Gy 照射群の赤色蛍光細胞に比べて、多い傾向にあった。フローサイトメーターによる解析でも、蛍光顕微鏡による観察の結果と同様の結果が得られた。

以上の結果から、EGR1 の放射線応答配列は、Cre/loxP 発現制御システムによる放射線照射により蛍光が変化するデュアル蛍光レポーターシステムのプロモーターとして期待できる。

しかしながら、EGR1 は放射線のほかに、サイトカインなどの炎症性刺激によっても発現が誘導されることが知られており、実際、EGR1-Cre ベクターを安定発現する細胞の樹立を試みたが、途中で細胞の蛍光が変化してしまい、安定発現細胞を樹立することができなかった。そのため、より優れたシステムを構築するためには、今回プロモーターとして検討した EGR1、Gadd45a、PLAT 以外の遺伝子から、プロモーター候補を選択する必要があるが、このシステムが、放射線に被曝した細胞の長期間の挙動の解析に役立つツールとなる可能性が示された。

<引用文献>

1. Tsuji H, *et al.*, Nature of nontargeted radiation effects observed during fractionated irradiation-induced thymic lymphomagenesis in mice. *J. Radiat. Res.* 2013, 54, 453-466
2. Joki T, *et al.*, Activation of the radiosensitive EGR-1 promoter induces expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and sensitivity of human glioma cells to ganciclovir. *Hum Gene Ther* 1995, 6, 1507-13.
3. Daino K, Comprehensive search for X-ray-responsive elements and binding factors in the regulatory region of the GADD45a gene. *J Radiat Res*, 2003, 44, 311-8
4. Miskin R, *et al.*, Plasminogen activator: Induction of synthesis by DNA damage. *Cell*, 1980, 19, 217-24
5. Maignol L, *et al.*, Radiation to Control Transgene Expression in Tumors. *Cancer Biol. Therapy*, 2007, 6, 1005-1012

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 須藤仁美, 須堯綾, 相良雅史, 辻厚至, 東達也, 放射線被ばく細胞のデュアル蛍光レポーターイメージングシステムの構築, 日本分子生物学会, 2017年
- ② Sudo H, *et al.*, Effects of alpha-emitting meta-211At-astato-benzylguanidine (211At-MABG) on tumor growth suppression in a pheochromocytoma mouse model with histological analysis, Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting, 2017年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 仁美 (SUDO, Hitomi)
放射線医学総合研究所・分子イメージング
研究センター・研究員
研究者番号：10415416

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

辻 厚至 (TSUJI, Atsushi)
放射線医学総合研究所・分子イメージング
研究センター・チームリーダー
研究者番号：60303559

須堯 綾 (SUGYO, Aya)
放射線医学総合研究所・分子イメージング
研究センター・技術員
研究者番号：00415415