

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00547

研究課題名(和文) 相互補完型マルチハイスループット技術による次世代放射線影響研究

研究課題名(英文) Advanced radiation research using comprehensive multi-high-throughput technologies

研究代表者

河合 秀彦 (Kawai, Hidehiko)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(薬)・准教授

研究者番号：30379846

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)：低線量(率)の放射線被曝による生物影響とその発現機構は未だ不明な点が多い。本研究では、低線量(率)放射線被曝の生物影響を解明することを目的に、ガンマ線持続照射設備を用いて、幅広い線量率のガンマ線を異なる種類の培養細胞に持続照射し、照射線量率や照射期間に依存して現れる細胞応答や細胞運命の変化を2種類のハイスループット解析機器を用いて網羅的にデータ取得、解析を行った。本研究のヒトの初代培養細胞を含む複数の培養細胞と相互補完型ハイスループット解析を用いた研究によって、低線量率の持続放射線照射によって現れる生物影響に関与する細胞応答と複数の制御因子を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ不明な点が多い低線量(率)の放射線被曝の人体影響について、低線量率の持続放射線照射によって現れる細胞への影響と細胞の応答機構及びそれらに関与する、或いは、直接制御する複数の因子を明らかとすることができた。これらの因子と人体への影響やがんなどを含む疾病との関わりを新たな視点から研究することによって、今後、放射線影響の分子機構を解明することが可能となることが期待される。また、本研究によって、細胞老化を制御する因子を同定したことから、老化メカニズムの研究への貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)： Low dose and low dose-rate radiation-induced biological effects and their underlying mechanisms are not fully understood yet. In this research project, to better understand the biological effects of low dose and low dose-rate radiation exposures, we have obtained and analyzed comprehensive biological data using two different types of high-throughput techniques by subjecting various cultured cell lines to chronic gamma-irradiation in a facility to allow for exposure at a wide range of dose-rates. By using this complementary comprehensive multi-high-throughput approach, and different types of cell cultures, including primary cell lines, we have been able to identify several factors and cellular radiation responses involved in cell fate decisions and biological effects triggered by chronic gamma-irradiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：持続放射線照射 ハイスループットスクリーニング 細胞応答 細胞運命

## 1. 研究開始当初の背景

放射線被曝による健康障害は人体の細胞に生じた放射線被曝の影響に起因して発現するものであると考えられる。放射線障害には、被曝直後に影響が発現する急性障害と被曝から数十年経過しても影響が発現する晩発性障害が存在する。これまでの放射線被曝による人体への生物学的影響研究では、原爆被ばく者の疫学データや大規模な動物実験データの統計学的解析による研究と、多様な生化学的解析手法や分子細胞生物学的解析手法を用いた詳細な実験生物学的研究によって、非常に多くの重要な知見が蓄積されてきた (*Rad. Res.*, 168:1-64, 2007、*Radiobiology For The Radiologist, 7th Edition*, 2012)。特に近年では、放射線照射によって誘導される細胞応答とそれらを制御する複雑な分子応答のネットワークについて、その詳細が明らかにされつつある。しかし、これまでに得られている知見の多くは、高線量、高線量率被曝による確定的な生物影響の研究から見出されたものであり、低線量(率)の放射線被曝の生物学的影響や晩発性障害の発現機構に関しては実験的には未だ解明されていない部分が多い。

低線量被曝による健康障害や晩発性障害の実態は、がんなど、ヒト集団で加齢に伴って自然発症する疾患と同じであるものが多く、放射線の影響はそれらの疾患の発症率の上昇として検出されている。このことは、低線量放射線被曝および晩発性の生物学的影響は、さまざまなストレス環境の下で自然に発生する細胞運命変化と直結したものであることを示唆するものである。そのため、放射線による生物学的影響の全貌を明らかにするためには、自然環境のもとで細胞に確率的に発生する細胞の運命変化そのものの機構を理解することが重要であると考えられる。ヒトを含む地球上の生命は、放射線被曝に限らず、活性酸素種やDNA傷害性の化学物質など、さまざまな種類のDNA損傷ストレスが恒常的に存在する環境で、個体として遺伝情報の安定性を維持しながら生命活動を行っている。質的にも量的にも多様なストレスが存在する環境での生命の最小構成単位である細胞の運命選択とその制御機構を理解することは、放射線の生物学的影響の理解だけでなく、がんをはじめとする加齢に伴う疾患、生命の老化現象、あるいは、生命そのものを理解することにつながるものである(図1)。

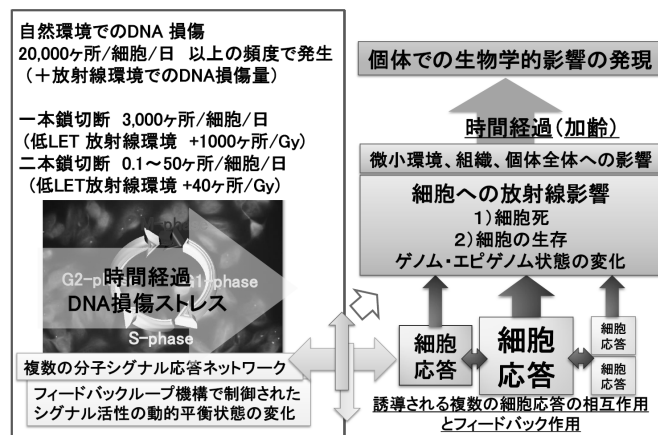


図1. 自然環境と放射線照射環境におけるDNA損傷生成量と生物学的影響

## 2. 研究の目的

持続的な放射線被ばく環境を用いて、持続的な異なるDNA損傷レベルに対する分子応答と細胞応答のさまざまなデータを経時的に取得し、それらの変化と細胞に確率的・確定的に誘導される細胞運命との関連性に注目して研究を行うことを目的とした。研究には、広島大学原爆放射線医科学研究所に整備された異なる線量率(0.007~1.388 mGy/min)の線照射をしたまま細胞培養や動物飼育が可能な実験施設を用いることとした。これまでの研究で、線照射環境での培養細胞と遺伝子改変マウスを用いた実験を行い、低線量率(0.069 mGy/min~)の線照射環境がヒトの線維芽細胞に特異的に増殖抑制を誘導すること、また、照射線量率に依存して

細胞には可逆的または不可逆的な細胞周期の進行停止が誘導されること、更に、それらの細胞応答には ATM/TP53/P21 経路が必須であり、照射線量率に依存した細胞の運命決定においても同じ経路が重要な役割を果たしていることなどを明らかにしている (Plos One, 9(8):e104279, 2014 (図 2))。このような研究から、申請者は持続的な放射線照射環境を用いることによって、細胞や生物の時間経過の中での DNA 損傷の生成量と生成率、分子応答、細胞応答、生体反応のそれぞれの関係性を定量的に解析することが可能である。更に近年では、次世代シーケンサや全自動画像撮影装置などのハイスループットの研究機器と、それらによって得られる大量なデータを解析する技術が進歩したことによって、生物学的データを網羅的に大量取得、解析することが可能となっている。そこで、本研究では、異なる線量率の放射線照射環境で誘導される分子応答と細胞応答を複数のハイスループット技術によってデータ化し、更に、siRNA ライブラリのハイスループットスクリーニングによって生物学的応答決定の責任遺伝子群候補を探索することとした。研究期間内で、放射線照射環境での細胞の生物学的応答に重要な役割を果たす分子機構を網羅的に同定し、その役割を包括的に分析することで放射線の生物学的影響の発現機構を明らかにすることを目的とした。

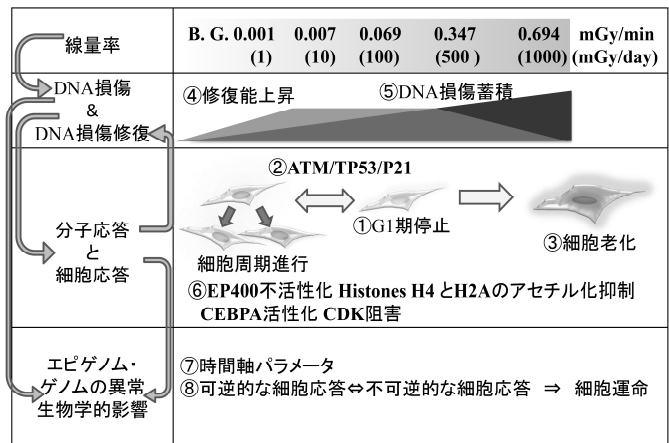


図2. ハイスループット技術を用いた持続放射線照射環境での線量率に依存した生物学的応答に関してこれまで得られた知見 (①~⑧)

### 3. 研究の方法

異なる線量率の線照射環境 (未照射、0.069、0.347、0.694、1.388 mGy/min) でヒト線維芽細胞を培養し、線量率と時間に依存して生じる多様な分子応答と細胞応答に関するデータを取得した。異なる線量率と照射時間におけるヒト線維芽細胞の次世代シーケンサ (Illumina 社) を用いた RNA シーケンスデータについて、バイオインフォマティクスツール (JMP Genomics、SAS 社) による統合解析を行い、線量率と照射時間に依存した遺伝子発現データの解析を行った。共焦点レーザー顕微鏡システムを搭載した全自動画像撮影解析装置 (Opera Phenix、Perkin Elmer 社) によって多重染色画像を取得し、画像解析ソフト (Harmony、Perkin Elmer 社) を用いて、より詳細な解析を行い、細胞応答、分子応答の解析を行った。

線照射環境の照射線量と照射時間依存的にヒト線維芽細胞に誘導される生物学的応答と影響について、それぞれに対する責任遺伝子を、ヒト siRNA ライブラリ (ThermoFisher Scientific 社) とハイスループットイメージング技術を用いて、遺伝子スクリーニングを行った。

また、siRNA ライブラリから同定された放射線持続照射に対する細胞応答責任候補遺伝子である可能性がある遺伝子について、siRNA による機能抑制及び CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術による遺伝子機能欠損細胞株を用いた遺伝子機能解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 1. ハイスループット技術による線照射下の細胞の生物学的指標の解析

ヒト由来線維芽細胞や異なる組織がん細胞株、iPS 細胞を未照射、0.007、0.069、0.347、0.694、1.388 mGy/min の線量率の異なる 線持続照射環境で培養し、DNA 損傷修復とストレス応答に関わる複数の因子 (P53、P21、Ki67、53BP1、-H2AX など) について免疫蛍光染色を行い、全自動共焦点レーザー顕微鏡画像撮影装置を用いて蛍光画像取得し、それぞれの発現量や発現変動について画像解析を行った。その結果、急照射の場合と比較して、持続照射に対する細胞の応答性と細胞への影響は、細胞の種類によって全く異なることが明らかとなった。線量率依存的な細胞への影響、細胞応答として、線維芽細胞では細胞周期の G1 期停止から細胞老化誘導が増加するのに対し、多くのがん細胞では増殖に影響は観察されず mitotic catastrophe の増加、iPS 細胞ではアポトーシスをおこす細胞が顕著に増加した。また、-H2AX や 53BP1 などの DNA 損傷認識タンパク質の線量 (率) 依存性に関しては、持続照射環境では細胞周期やアポトーシスや分裂異常などの細胞応答性に依存した影響が、放射線による DNA 損傷量よりも顕著にみられることが明らかとなった。ただし、0.069 mGy/min 以下の線量率下では、長期培養した場合においても分子応答を検出することはできなかった。また、画像解析のデータを、平均値と分散及び時間変化を同時に解析することが可能な独自の解析ソフトの開発し、複数のハイスループットデータ解析を可能にするシステムを構築した。

#### II. siRNA ライブラリによる細胞運命決定責任遺伝子の網羅的逆遺伝学スクリーニング

0.694 mGy/min の照射環境下で線維芽細胞に特徴的に現れる細胞応答機構は細胞老化であった。細胞老化を指標に siRNA ライブラリをハイスループット装置である全自動蛍光画像撮影装置を用いてスクリーニングした結果、その責任遺伝子としてこれまで同定されていた P53 と P21、ATM に加えてクロマチン制御複合体の構成因子を複数種類同定した。クロマチン制御複合体の構成因子について発現抑制細胞の放射線応答性の解析を行い、RNA-seq 解析を行ったところ、上皮間葉転換 (EMT) を制御する遺伝子群の発現によって細胞老化の感受性が変化する可能性が示唆された。このことは、細胞種間で持続照射に対する細胞老化の感受性の違いが生じる原因となっている可能性も考えられる。

#### III. 細胞運命決定の責任遺伝子の機能解析

クロマチン制御複合体を含む細胞応答責任遺伝子候補群について、照射された細胞での発現量変化を解析した結果では、急照射、持続照射ともに発現量や局在の変化は認められなかった。また、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子欠損細胞の樹立し、細胞老化を制御する遺伝子機能の解析を行った。遺伝子発現抑制によって、増殖に関わる転写因子の主要な抑制因子の発現量の増加が認められたことから、エピゲノムの変化による下流の一連の遺伝子群の転写制御が、細胞の増殖性を制御することで放射線照射から誘導される細胞老化の感受性を制御している可能性が示唆された。こうしたエピゲノムの変化による一連の遺伝子群の変動制御は、細胞の性質、細胞の放射線応答性、がん化への感受性などへの関与が十分に考えられることから、今後の解析によってそれらの役割が明らかとなることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Masuda Y, Kanao R, Kawai H, Kukimoto I, Masutani C. Preferential digestion of PCNA-ubiquitin and p53-ubiquitin linkages by USP7 to remove polyubiquitin chains from substrates. J Biol Chem. 査読有、294(11)、2019、4177-4187. DOI:10.1074/jbc.RA118.005167.

Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N.

Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGF Signaling. *Mol Cancer Res.* 査読有、2018、16(11)、1676-1686. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-18-0321.

Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, Takata M. Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. *Nucleic Acids Res.* 査読有、2018、46(6)、2932-2944. DOI:10.1093/nar/gky058.

Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle.* 査読有、2017、16(24)、2345-2354. DOI:10.1080/15384101.2017.1387697.

Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva EK, Kamiya K. Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level. *Carcinogenesis.* 査読有、2017、38(5)、570-578. DOI:10.1093/carcin/bgw208.

Iizuka D, Yoshioka S, Kawai H, Izumi S, Suzuki F, Kamiya K. Metabolomic screening using ESI-FT MS identifies potential radiation-responsive molecules in mouse urine. *J Radiat Res.* 査読有、58(3)、2017、273-280. DOI:10.1093/jrr/rrw112.

Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle.* 査読有、16(6)、2017、565-573. DOI:10.1080/15384101.2017.1284716.

清水 なつみ、河合 秀彦、笹谷 めぐみ、遠藤 充浩、稲葉 俊哉、神谷 研二、低線量放射線が着床前期胚の発生に与える影響、長崎医学会雑誌、査読無、91 巻、2016、290-292  
河合 秀彦、曹 麗麗、金井 昭教、稲葉 俊哉、神谷 研二、ガンマ線持続照射環境での細胞運命制御メカニズムの解析、長崎医学会雑誌、査読無、91 巻、2016、193-196

〔学会発表〕(計他 23 件)

河合秀彦、笹谷めぐみ、ザハリエバエレナ、紙谷浩之、神谷 研二、持続的 DNA 損傷に対する細胞応答の解析、日本環境変異原学会第 47 回大会、2018 年、京都市

河合秀彦、紙谷浩之、ユビキチン化による 新たな TP53 の機能制御機構の解析、日本薬学会第 138 年会、2018 年、金沢市

河合秀彦、佐藤健一、紙谷浩之、TP53 制御と細胞運命決定、第 41 回日本分子生物学会年会、2017 年、横浜市

河合秀彦、笹谷めぐみ、金井昭教、稲葉俊哉、神谷研二、持続放射線照射環境を用いた細胞老化の分子機構解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年、神戸市

河合秀彦、曹麗麗、笹谷めぐみ、ザハリエバエレナ、金井昭教、稲葉俊哉、神谷研二、ガンマ線持続照射環境を用いた細胞運命制御メカニズムの解析、第 60 回日本放射線影響学会、2017 年、千葉市

河合秀彦、笹谷めぐみ、ザハリエバエレナ、紙谷浩之、神谷研二、持続的な DNA 損傷による生物影響の網羅的解析研究、日本環境変異原学会第 46 回大会、2017 年、東京都

河合秀彦、異なる線量率の持続放射線照射を用いた放射線生物学、第 58 回原爆後障害研究会（シンポジウム）、2017 年、広島市

河合秀彦、Biological effects of low-dose radiation on cells and their implications in cancer risk、Consultancy Meeting on Science, Technology and Society Perspectives on Nuclear Science, Radiation and Human Health - The International Perspective、2017 年、広島市

河合秀彦、曹麗麗、金井昭教、笹谷めぐみ、飯塚大輔、ザハリエバエレナ、稲葉俊哉、神谷研二、ガンマ線持続照射による細胞老化の分子機構解析、第 59 回日本放射線影響学会、2016 年、広島市

河合秀彦、曹麗麗、金井昭教、稲葉俊哉、神谷研二、ガンマ線持続照射環境での細胞運命制御メカニズムの解析、第 57 回原子爆弾後障害研究会、2016 年、長崎市

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。