

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11644

研究課題名(和文) 初期胚における放射線細胞応答としてのエピジェネティクス変化が細胞分化に与える影響

研究課題名(英文) The effects of epigenetics and cell differentiation caused by irradiation during early development

研究代表者

本庶 仁子 (Honjo, Yasuko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：80614106

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)：発生初期は、放射線に対して感受性が高いと考えられている。しかし、どのような違いがあるのかがあまり詳しく知られていない。申請者は、これまでのゼブラフィッシュを用いた胚細胞への放射線照射による実験から、短時間で細胞応答が変化することがわかった。これらの結果は、論文として発表した。さらに、ごく初期の放射線照射によって、かなり時間が経ってから胚の頭部に細胞死が多くみられる現象を見つけた。また、このアポトーシスが、DNA損傷が記憶として残ったために起こっている可能性を考え人為的にDNA損傷・修復を起こすことによってエピジェネティクスが変化することを確認した

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生のごく初期における放射線影響がどのようなものかは非常に重要な問題である。哺乳類ではある時期までは、産まれないか産まれれば正常であるとされてきた。ごく初期の胚でどのようなことが起こっているかあまりよくわかっていなかったため、ゼブラフィッシュを用いて調べ、成体とは異なる反応をすることがわかった。さらに、放射線照射を受けると、その"記憶"のようなものがDNA上に残る可能性について現在も検討中である。

研究成果の概要(英文)：Although early embryos are very sensitive to irradiation, it is not known how different the response are. I found the cellular response differ in short time during early development. Irradiation at very early embryos caused the apoptosis more than 10 hours after irradiation. I hypothesized this is because DNA damage left "scar" on genomic DNA. I examined the status of epigenetic modification and found the changes after artificially damage DNA (and presumably DNA repaired).

研究分野：発生生物学

キーワード：zebrafish radiation cellular response

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発生期は活発な分裂と分化の精密な制御が行われ、それぞれの細胞がいつ・どこで・どのように分裂・分化・移動するのかが制御されている。ゼブラフィッシュの胚細胞における放射線照射の影響については、受精後1時間ほどが最も感受性が高いとの報告があった(McAlear et al., 2005)ものの、細胞応答が体細胞と同じかどうか、どのように異なっているのかについて網羅的には調べられていなかった。この時期は放射線などの環境因子に対する感受性が高いことが知られており、細胞応答も分化した細胞とは異なっていると考えられた。

### 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ胚細胞に関してその細胞応答が体細胞と同様かどうかを網羅的に解析した。また、受精後1~2時間に放射線照射すると、細胞応答性が一旦潜在化され、アポトーシス機構が働き始める受精後8時間頃に一度細胞死(アポトーシス)を起こし、発生が進んだ後の組織形成の時期に再度顕在化し、主に頭部の細胞がアポトーシスを起こす現象を見出した。近年、この時期にはエピジェネティックな変化もダイナミックに起こっていることが明らかになってきており、遺伝子の発現と密接に関わっていると考えられている。細胞応答としてエピジェネティクスが通常とは異なった変化を起こし、その異なるエピジェネティクス修飾として記憶され、後の細胞分化・組織形成に影響を及ぼしたのではないかと考えた。そこで、放射線によるDNA修飾の変化を、新世代シーケンス技術を用いて検出、定量化することで、細胞分化・組織形成に現れる放射線影響のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

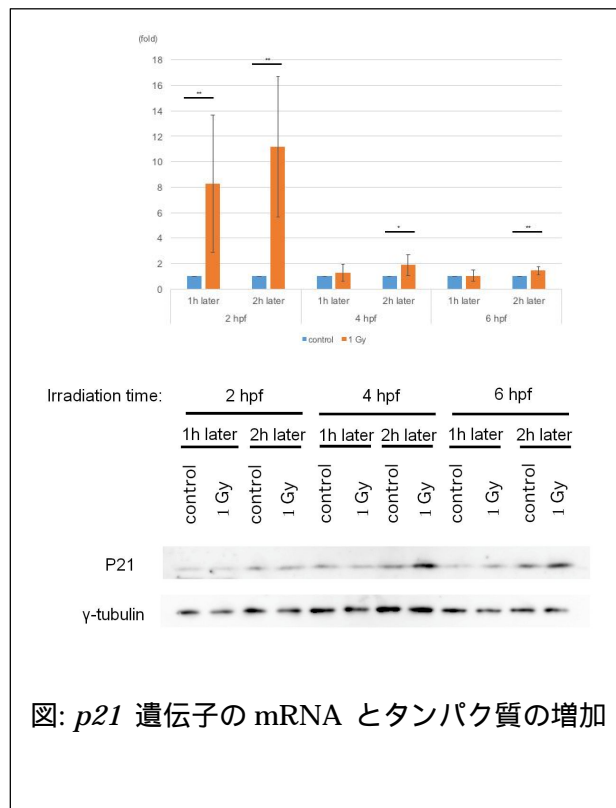
ゼブラフィッシュを用いて受精後2、4、6時間に放射線を1 Gy照射し、gamma-H2AX fociの形成、細胞周期の停止及び*p21*遺伝子のmRNAとタンパク質の増加を調べた。gamma-H2AX fociの形成に関しては、照射後15分ごとに2時間後までのサンプルを抗体で染色し、そのFociの形成を計測した。細胞周期の停止の有無は、M期に発現するリン酸化ヒストンH3を抗体で検出し、放射線照射後1時間ごとに3時間後までのM期の細胞の数を計測した。また、*p21*遺伝子のmRNAは1時間ごと2時間のサンプルでqPCRを行った。タンパク質はP21タンパク質に対する抗体を作成の上、ウェスタンブロッティングにて解析を行った。

アポトーシスの検出は、放射線照射の後、トランスジェニック個体を用いてタイムラプスイメージングなどを用いて継続的に解析を行っている。また、DNA修飾はオックスフォードナノポアテクノロジー社MinONを用いて、まずはCRISPRを用いて人為的にイントロン部分を2本鎖切断したのち、受精後24時間でゲノムDNAを抽出し、第3世代シーケンスを行った。

### 4. 研究成果

ゼブラフィッシュを用いた発生のごく初期の胚細胞への放射線照射による実験から、6時間の差で、個体への影響が著しく異なることを見出した。これらの時間の中に、細胞周期の停止やgamma-H2AX fociの形成などの細胞応答が変化することがわかった。受精後2時間や4時間で照射した場合、gamma-H2AX foci形成や細胞周期の停止が起こらないことを見出した。また、*p53*遺伝子の下流である*p21*遺伝子は、mRNAの増加が受精後2時間でも顕著に見られたが、タンパク質は、受精後6時間での照射の時のみ増加が見られた。このことから、P53シグナリングは働いており、*p21*のmRNAの増加は見られるものの、何らかの理由でタンパク質は安定的に増加せ

ず(図)、その後の細胞応答を引き起こすシグナルが伝わらないことが示唆された。これらの結果は、論文として発表した(Honjo and Ichinohe, 2019)。これらの細胞がどのような細胞であるか、なぜこれほど時間が経ったのちにアポトーシスを起こすのかを調べるために、放射線照射の後、タイムラプスイメージングなどを用いて継続的に解析を行っている。アポトーシスを起こす細胞数は線量依存的に変化するため、アポトーシスは放射線による影響であると考えられる。また、このアポトーシスが、DNA損傷が記憶として残ったために起こっている可能性を考え、人為的にDNA損傷・修復を起こし、第3世代シーケンスを行った。その予備実験の結果、エピジェネティクスが通常の場合から変化することを確認した。この変化がどのようにアポトーシスと結びついているのかは現在検討中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honjo Yasuko, Ichinohe Tatsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Cellular responses to ionizing radiation change quickly over time during early development in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbin.11117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 本庶仁子, 一戸辰夫.	4. 巻 93
2. 論文標題 ゼブラフィッシュの初期発生過程における放射線応答機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 長崎医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 344-345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuko Honjo, Tatsuo Ichinohe
2. 発表標題 Differential cellular responses of zebrafish embryos to ionizing radiation according to developmental stage
3. 学会等名 放射線影響学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Honjo Y and Ichinohe T
2. 発表標題 Effects of ionizing radiation on zebrafish early embryogenesis.
3. 学会等名 3rd International symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Honjo Y and Ichinohe T
2. 発表標題 Characterization of novel Major histocompatibility complex genes in zebrafish.
3. 学会等名 Nanopore community meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	一戸 辰夫  (Ichinohe Tatsuo)  (80314219)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授    (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------