

令和 4 年 5 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：2019～2021

課題番号：19K12322

研究課題名(和文)放射線とがんをつなぐ老化細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of the senescent cells for exploring the link between ionizing radiation and carcinogenesis

研究代表者

河合 秀彦 (Kawai, Hidehiko)

広島大学・医系科学研究科(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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線発がんのメカニズムを解明するため、放射線被曝によって幹細胞特異的に誘発される変異を明らかとすることを目的に、放射線照射したiPS細胞、また、放射線照射によって細胞老化を誘導した線維芽細胞と共培養したiPS細胞について、その細胞応答性と変異について解析を行った。その結果、iPS細胞で生じる変異は、特殊なDNA複製機構を介して生じるものが多いことが明らかとなった。幹細胞では、体細胞と比較して放射線による変異が誘発されにくい状態であるものの、そうした変異は微小環境やp53およびその他の状況や環境によって増加することも明らかとなった。本研究の成果は、放射線発がんの機構解明につながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線被曝によるがんでは、被曝の爪痕としての特異的な変異が検出されず、その発がんプロセスは未解明である。本研究では、放射線によって幹細胞特異的に誘発される細胞応答性と変異に注目し、解析を行った。その結果、幹細胞におけるp53の機能、および、放射線により細胞老化が誘導された間質系細胞の幹細胞への影響、の2つの観点から、放射線によって幹細胞に誘発される変異に関し、新たな知見を得た。放射線によって幹細胞特異的に誘発される変異とその誘発機構の解明は、放射線発がんメカニズムの解明へとつながり、新しい発がんの予防法やがん治療法の開発へと貢献できるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of radiation carcinogenesis, we analyzed the radiation-induced cellular responses and mutations of irradiated iPS cells or iPS cells co-cultured with fibroblasts in which cellular senescence was induced by radiation, in order to investigate stem cell-specific mutations induced by radiation exposure. The results revealed that the mutations occurring in iPS cells were mediated by a certain DNA replication mechanism. Although stem cells were much less prone to radiation-induced mutations, such mutations were increased by cellular microenvironment, p53-status, and other many factors. The results of this study provide a new insight into the mechanism for radiation carcinogenesis.

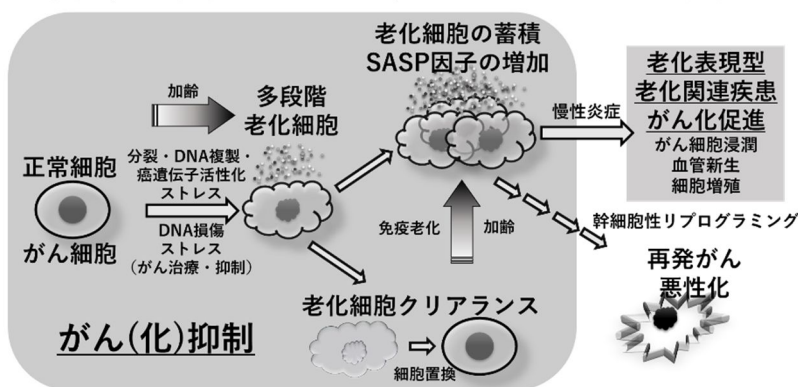
研究分野：放射線影響

キーワード：放射線 発がん 幹細胞 変異 微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

放射線被曝と発がんリスクとの関係に関しては、広島・長崎の原爆被ばく者の貴重な疫学データの解析やマウスの大規模な発がん実験など、非常に多くの研究によって丁寧な理解がなされてきた。放射線発がんのメカニズムに関しても長年に亘って精力的な研究が行われてきたが、がんそのものの多様さと複雑さから、未だ全容解明には至っておらず、線量率効果、線量しきい値、遺伝的背景の影響、また何故がん年齢に至ってから発がんリスクが増加するのかなど、明らかにすべき課題が多く残されている。古典的な放射線生物学では、DNA損傷の修復過程で生じたエラーが確率的ながんリスク増加の原因であると考えられてきた。しかしながら、ほとんどのがんにおいては放射線被曝による直接的な遺伝子変異が原因であることを示唆するデータは得られていない。一方、細胞老化は放射線被曝で誘導される主な細胞運命の一つであり、その存在は古くから知られていたものの、細胞老化の運命決定後に細胞増殖しないとの定義と認識から細胞死の一つとして理解されていた。最近、細胞老化はゲノムにプログラムされた主ながん抑制機構であると同時に、生体内での蓄積は慢性的な炎症を引き起こし、ひいては発がん要因になることも明らかになってきている。現在、世界規模で高齢化が進んでいる社会背景から、アンチエイジングや健康寿命延伸法の開発の標的として老化細胞に注目が集まり、世界的に精力的な研究が行われている。近年では、老化細胞に人工的に細胞死が誘導できる遺伝子改変マウスを用いた研究などから、加齢に伴って現れる様々な老化症状やがんを含む老化関連疾患の発症への老化細胞の直接的な関与が明らかにされている (Nature Medicine, 22: 78-83 (2016)、Nature, 530: 184-189 (2016))。更に最近では、がん細胞の化学療法誘発性の細胞老化時に幹細胞性リプログラミングが同時に生じており、細胞老化ががんの悪性化に直接寄与していることも報告された (Nature, 553: 96-100 (2018))。また、ニッチや免疫の老化など、細胞老化は発がんとがん悪性化のプロセスに多様な形で影響を与える可能性も示唆されている (図1)。

図1) 老化細胞と発がん、再発がん-がんの悪性化



## 2. 研究の目的

本研究では、これまで申請者が行ってきた放射線誘発細胞老化研究の知見を基に、老化細胞と幹細胞性に関する最近の知見から以下の2点を明らかにすべき課題とした。

持続照射環境の幹細胞への影響

持続照射環境の周辺幹細胞の幹細胞への影響

これらについて、iPS細胞を組織幹細胞のモデル細胞とし、がん抑制遺伝子 *TP53* をロックアウトしたiPS細胞を用いて、持続放射線照射で誘発される変異に着目した解析を行い、これまでに解明されていない放射線被曝の老化細胞を介した“発がん・再発がん・がんの悪性化”への影響とその分子機構の解明を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

研究方法の概略を図2に示した。

・ガンマ線照射: ガンマ線の持続照射には広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置された低線量率ガンマ線持続照射設備(137Cs線源、線量率: ~1.388 mGy/min)を用いた。

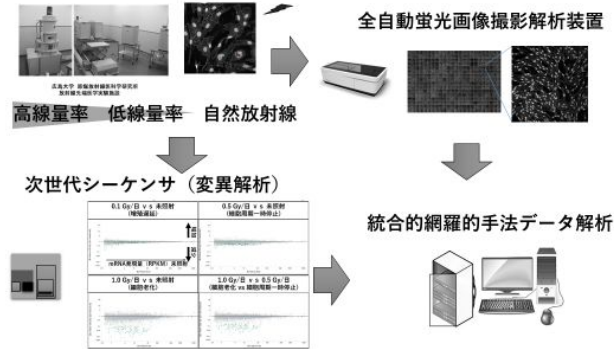
・細胞と培養条件: iPS細胞はHuman Episomal iPS Line (Thermo Fisher Scientific)を用

い、Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (Takara Bio)で培養した。ヒト由来初代培養正常線維芽細胞、又は、hTERTによって不死化したヒト由来正常線維芽細胞を用いた。また、iPS細胞から、CRISPR-Cas9を用いて、TP53遺伝子のノックアウト細胞株を樹立した。

・細胞のイメージング解析: 細胞等解析は、蛍光染色したiPS細胞について、全自動蛍光画像撮影装置Opera Phenix (PerkinElmer)で蛍光画像データを取得し、画像解析ソフトHarmony (PerkinElmer)によって解析を行った。

・次世代シーケンス(NGS)変異解析: *supF* 遺伝子シャトルベクタープラスミドをLipofectamin 3000を用いて、iPS細胞に導入した。ガンマ線の持続照射環境でiPS細胞を培養、あるいは、持続照射によって細胞老化を誘導した線維芽細胞と共培養実験を行い、iPS細胞からプラスミドDNAを抽出して、変異体頻度とDNBSeq-G400 (MGITech社)を用いた変異配列の解析を行った。

図2) 持続放射線誘発による幹細胞への影響の解析

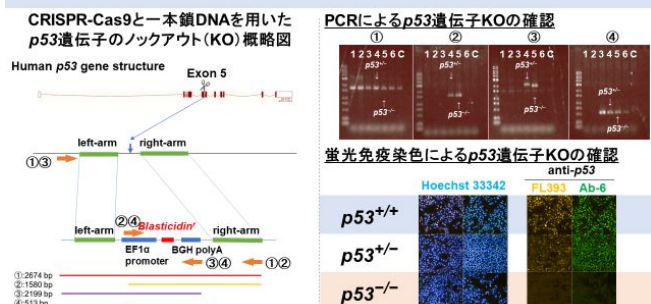


### 4. 研究成果

組織幹細胞のモデル細胞として用いたiPS細胞のガンマ線照射に対する細胞応答性について、ハイコンテンツハイスループットイメージング装置を用いた解析を行った。その結果、iPS細胞では、異なる照射条件に対し、分化した細胞と比較して顕著な細胞応答性と感受性の違いがあることが明らかとなった。これまでの研究結果から、線維芽細胞や培養がん細胞株を含む分化した細胞の持続照射に対する細胞応答は細胞増殖に伴う細胞死、あるいは、細胞老化であることが明らかとなっている。特に、線維芽細胞のような間葉系細胞では、細胞周期チェックポイントはG1/S期に集中しており、DNAの複製の遅延が認められ、細胞老化が高頻度に誘発されることが明らかとなっている。しかし、iPS細胞では持続放射線に対して細胞死は誘導されるもの

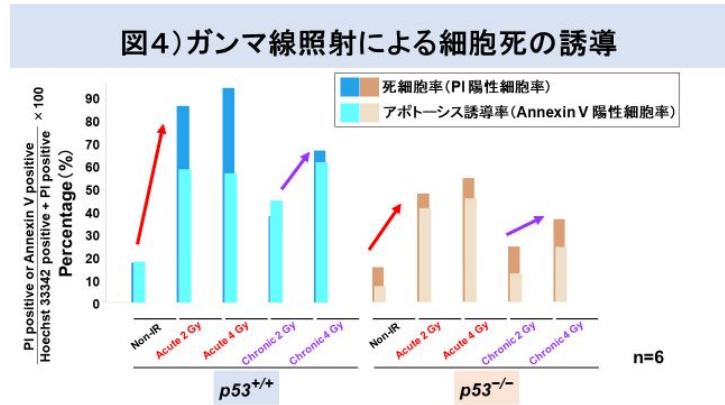
の、DNA複製期での遅延は認められず、M期での分裂機構の遅延が認められた。また、持続照射によって誘発される細胞死についても、M期のチェックポイント機構が関与する可能性を示唆する実験結果が得られた。細胞周期チェックポイントと細胞死の細胞の種類に依存した違い

図3) p53ノックアウトiPS細胞の樹立

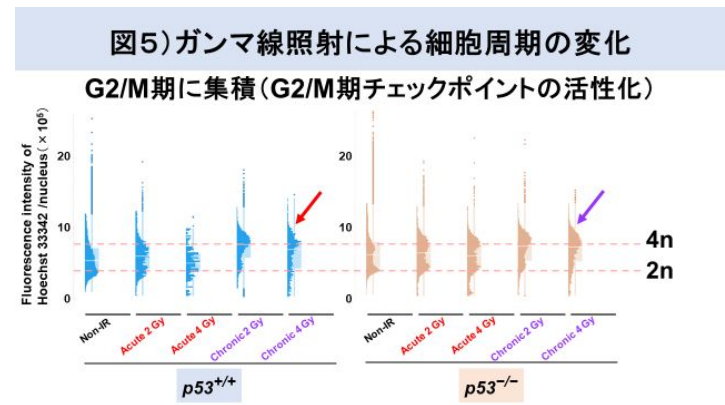


は、幹細胞において持続的に生じる DNA 損傷やがん化の過程で生じる DNA 損傷に特異的な細胞応答機構が存在している可能性を示唆するものである。そこで、次に放射線被曝によって誘発される細胞の種類に依存した細胞応答性と発がんメカニズムの関係について明らかにすることを目的に、TP53 ノックアウト iPS 細胞を用いて比較解析を行った(図3)。

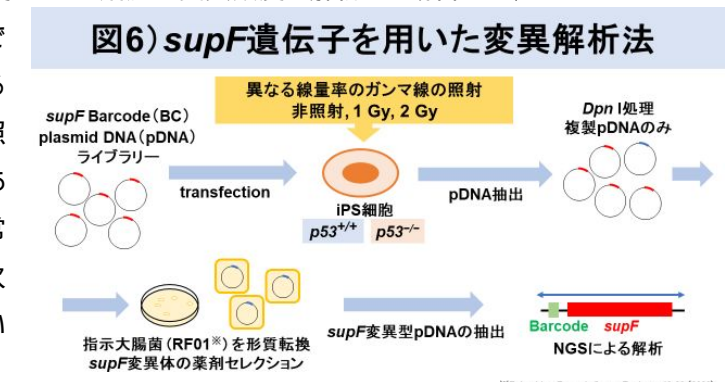
正常 iPS 細胞と TP53 ノックアウト iPS 細胞のそれぞれに異なる線量率でガンマ線を照射し、誘発される細胞死について詳細な解析を行ったところ、それぞれの細胞で特徴的な細胞死の誘発傾向があることが明らかとなった(図4)。特にアポトーシスへの感受性は、正常 iPS 細胞では、線量率に依存せず、線量のみで依存して誘発された。また、TP53 ノックアウト iPS 細胞では、急照射と持続照射のどちらにおいても、細胞死誘発が抑制されており、特に持続照射に対しては、高い細胞死抵抗性を示した。しかし、大



変興味深いことに、TP53 に非依存的に細胞死は一定頻度で誘発された。これらの結果によって、iPS 細胞には、放射線で誘発される DNA 損傷に限らず、持続的に誘発されている酸化損傷などに対して、p53 非依存的な細胞死を誘発する経路が存在する可能性が示唆された。そこで、それぞれの細胞について細胞周期の解析を行ったところ、iPS 細胞では持続照射によって顕著に G2/M 期での蓄積が認められ、TP53 ノックアウト細胞においてはそれが顕著となることが明らかとなった(図5)。



次に、こうした DNA 損傷に対する幹細胞の反応性が、変異誘発に与える影響を明らかにすることを目的として、持続照射によって低頻度に生じる可能性が考えられる変異を検出することが可能な、iPS 細胞で複製されるシャトルベクターと NGS を用いた変異解析法を開発し、放射線による変異誘発頻度と変異スペクトラムの解析を行った(図6)。その結果、iPS 細胞では持照射線量に依存してな変異頻度の増加が検出された。また、iPS 細胞とその他に用いたがん細胞株とは生じる変異スペクトルが異なり、iPS 細胞に特徴的な変異が生じることが明らかとなった。また、未照射の iPS 細胞では、 $10^6$  塩基あたり1カ所程度の頻度で変異が検出され、同じ検出系でがん細胞の変異頻度を解析した場合には、 $10^5$  塩基あたり1カ所程度に検出されており、iPS 細胞では変異が生じにくい機構が存在するものと考えられた。iPS 細胞を持続照射環境で培養した場合には、1Gy あたり  $10^6$  塩基に1カ所程度ずつ、非常に低い頻度で変異数が増加した。次に、TP53 ノックアウト iPS 細胞を用いて、同様の変異解析実験を行った。



その結果、大変興味深いことに、持続照射された正常 iPS 細胞において回収されたプラスミドが、TP53 ノックアウト細胞では、同じ照射線量によって回収されなくなることが明らかとなった(図 7)。この結果から、TP53 が持続的な DNA 損傷に対する何らかの防御機構で機能している可能性を示唆するものと考えられた。変異解析を行った結果、TP53 ノックアウト細胞では、iPS 細胞に特徴的な変異の増加が認められたことから、持続照射など低レベルの DNA 損傷によって誘発される変異に TP53 が寄与している可能性も示唆された。

また、iPS 細胞と未照射あるいは持続照射することで細胞老化を誘導した線維芽細胞

とを共培養した場合に、iPS 細胞で誘発される変異頻度の解析を行ったところ、共培養した場合に iPS 細胞での変異頻度が数倍増加することも明らかとなった。このことは、iPS 細胞が周辺細胞から影響を受けることによって、変異誘発頻度が上昇する可能性を示唆する結果となった。しかし、線維芽細胞への持続照射による影響は、iPS 細胞での変異誘発頻度に認められなかったことから、共培養によるその他の影響が大きく検出されたものと考えられる。

本研究の結果から、以下のことが明らかとなった。

幹細胞(幹細胞モデルとして用いた iPS 細胞)では、持続的に生じる DNA 損傷から誘発される変異を抑制している機構が存在し、その一部は TP53 に依存する経路である

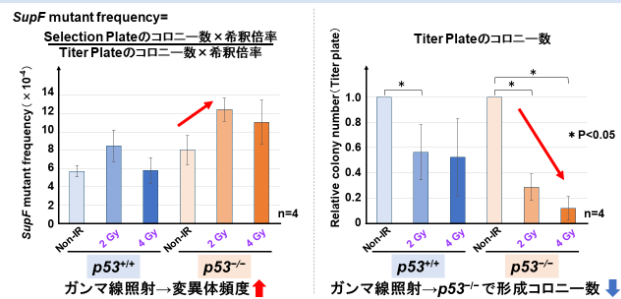
変異誘発を抑制する経路の一部は細胞死であると考えられ、iPS 細胞の DNA 損傷による細胞死誘導には少なくとも2つの経路が存在する

ガンマ線照射によって誘発された変異の多くは、自然に誘発された(バックグラウンドの)変異と同じであったことから、DNA の酸化損傷が主な原因である

未照射であっても線維芽細胞との共培養は iPS 細胞での変異誘発頻度を、iPS 細胞に対するガンマ線照よりもさらに上昇させたことから、微小環境の周辺細胞などが変異誘発に与える影響が大きい可能性がある

本研究によって、幹細胞特異的な変異誘発機構、および、その周辺細胞によって幹細胞特異的に変異を誘発する機構があることが明らかとなった。今後、その変異誘発機構の詳細を解明することによって、放射線発がんメカニズムの解明や、新しい発がんの予防法やがん治療法の開発に貢献できることが期待される。

図7) 持続照射による変異体頻度とコロニー数の変化



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawai H, Yazama K, Yanai Y, Kamitsubo R, Kamiya H.	4. 巻 132(6)
2. 論文標題 Gene correction by 5'-tailed duplexes with short editor oligodeoxyribonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 552-559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.08.012.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Shimabukuro K, Fukazawa T, Kanai A, Kawai H, Mekata K, Hirohashi N, Kakimoto N, Tanimoto K.	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 Low-Dose-Rate Irradiation Suppresses the Expression of Cell Cycle-Related Genes, Resulting in Modification of Sensitivity to Anti-Cancer Drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030501.	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 Kawai Hidehiko, Sato Kento, Shirahama Wataru, Suzuki Tetsuya, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Single-stranded DNA versus tailed duplex in sequence conversion of lacZ DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1245 ~ 1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2020.1790596	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Tsunematsu Takaaki, Arakaki Rieko, Kawai Hidehiko, Ruppert Jan, Tsuneyama Koichi, Ishimaru Naozumi, Earnshaw William C., Pagano Michele, Kudo Yasusei	4. 巻 133
2. 論文標題 APC/CCdh1 is required for the termination of chromosomal passenger complex activity upon mitotic exit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 251314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.251314	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 該当する

1. 著者名 Ueda M, Matsuura K, Kawai H, Wakasugi M, Matsunaga T.	4. 巻 24(4)
2. 論文標題 Spironolactone-induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCFFBXL18 E3 ligase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 284-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12674	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Masuda Y, Saeki Y, Arai N, Kawai H, Kukimoto I, Tanaka K, Masutani C.	4. 巻 294(41)
2. 論文標題 Stepwise multipolyubiquitination of p53 by the E6AP-E6 ubiquitin ligase complex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 14860-14875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005167	査読の有無 有
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20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 上坪諒太郎、佐藤健斗、矢間顕太郎、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集ツールTailed Duplexの編集効率の向上
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海老駿吾、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 NGSと低線量放射線環境を用いた遠隔作用変異の分子機構解析
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉原竜誠、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 DNA損傷に対するp53依存的、非依存的な細胞応答によるiPS細胞のゲノム安定性維持機構
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益谷央豪、金尾梨絵、河合秀彦、谷口俊恭、高田穰
2. 発表標題 PCNAのコピキチン化によって制御されるヒト細胞の新規DNA損傷トレランス経路の検出
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会放生研シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵、河合秀彦、谷口俊恭、高田穰、益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞においてRFWD3はPCNAの翻訳後修飾依存的なDNA損傷トレランスに関与する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯塚大輔、泉俊輔、河合秀彦、神谷研二、鈴木文男
2. 発表標題 プロテオーム解析による放射線被ばくのマウス尿中バイオマーカー探索
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 佐藤健斗、矢間顕太郎、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集法の開発：ミスマッチ塩基数の影響
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会（沼津）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 財間悠大、鈴木哲矢、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 8-dihydroguanine による遠隔作用変異誘発への OGG1 と WRN のダブル ノックダウンの影響の解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会（沼津）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田翔吾、鈴木哲矢、河合秀彦、紙谷 浩之
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたsupF遺伝子変異解析系の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島瑠里子、鈴木哲矢、河合秀彦、紙谷 浩之
2. 発表標題 変異シグネチャー解析による8-hydroxyguanineにより誘発される遠隔作用変異誘発機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上坪諒太郎、佐藤健斗、矢間顕太郎、河合秀彦、紙谷 浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集ツールTailed Duplexにおける配列依存性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河合 秀彦 , 紙谷 浩之
2. 発表標題 DNA 損傷による細胞運命決定での MDM2-MDMX を介した TP53 の発現変動の役割
3. 学会等名 第6回アジア環境変異原学会 / 日本環境変異原学会第48回大会合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井昭教、清水なつみ、長町安希子、河合秀彦、稲葉俊哉
2. 発表標題 放射線が着床前期胚に与える影響
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷浩之、柳井優里、鈴木哲矢、河合秀彦
2. 発表標題 核酸のみで行うゲノム編集法確立に向けた high throughput 解析法
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷浩之, 河合秀彦, 柳井優里, 鈴木哲矢
2. 発表標題 Tailed duplex による培養細胞でのゲノム編集: 染色体上 copepod GFP 遺伝子の修復
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 健斗, 鈴木 哲矢, 河合 秀彦, 紙谷 浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集: 一本鎖DNAとTailed Duplexの比較
3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢間 顕太郎, 鈴木 哲矢, 河合 秀彦, 紙谷 浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集: 蛍光タンパク質を用いたハイスループットアッセイ系の確立
3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutomu Shimura, Megumi Sasatani, Hidehiko Kawai, Kenji Kamiya, Akira Ushiyama
2. 発表標題 The role of fibroblasts in tumor microenvironment formation associated with radiation-induced cancer.
3. 学会等名 Joint type-Network the of Symposium International 4th T (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢間顕太郎、鈴木哲矢、河合秀彦、紙谷浩之
2. 発表標題 人工ヌクレアーゼを用いない遺伝子編集
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）（中止）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島瑠里子、河合秀彦、鈴木哲矢、紙谷浩之
2. 発表標題 supF遺伝子変異解析のための新規大腸菌株の作製
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）（中止）
4. 発表年 2020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

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