

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21536

研究課題名（和文）遺伝子領域間に引き起こされる転写共役型染色体転座経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of transcription-coupled chromosomal translocation pathways between gene loci

研究代表者

柴田 淳史（Shibata, Atsushi）

群馬大学・未来先端研究機構・准教授

研究者番号：30707633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：発がんに関与する染色体転座は、DNA二本鎖切断（DSB）の修復エラーにより生じる。しかしながら、発がんに関与する遺伝子領域間での染色体転座がどのような過程で生じるかは未だ多くが明らかになっていない。本研究課題では、任意の場所とタイミングでDSBを人為的に誘導するヒト培養細胞実験系を確立し、転写活性を有する遺伝子間における染色体転座アッセイ系を構築することで、染色体転座を引き起こす分子機構解明を目指した。タモキシフェン誘導体4OHTにて制限酵素AsiSIが核内に誘導されるシステムを網膜色素上皮細胞において構築し、DSB染色体転座の検出手法を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA二本鎖切断（DSB：DNA double strand break）は、その修復エラーにより重篤なゲノム不安定化を引き起こす。実際、DSB修復異常によって引き起こされるゲノム不安定化はがん発症に強く関することから、DSB修復研究は人の健康維持に必要な研究課題である。本研究課題では、発がんに関与するゲノム不安定化の中でも特に重篤な染色体転座の発生機構の研究を行った。その原理解明は、人体における発がん抑制のための治療戦略の開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Chromosomal translocations that are critical to tumorigenesis are caused by misrepair of DNA double-strand break (DSB). However, the processes by which chromosomal translocations between gene loci that lead to tumorigenesis is largely unknown. In the research project, we aimed to examine DSB-induced chromosomal translocation between transcriptionally active loci by establishing a human cultured cell experimental system that artificially induces DSBs at arbitrary locations and timings. We constructed a system in which the restriction enzyme AsiSI is induced into the nucleus by tamoxifen analog, 4OHT, in retinal pigment epithelial cells, and created an assay for detecting DSB chromosomal translocation.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：DNA二本鎖切断 放射線 染色体転座

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは二人に一人が罹患する国民病であり、その発症予防方法の確立は国民の健康維持のためには必要不可欠である。ゲノム不安定化は発がんの原因の一つとして挙げられ、特に二つの異なる染色体が融合する染色体転座は様々ながんの発症に関わることが分かっている。染色体転座は、二つの異なる染色体に DNA 二本鎖切断 (DSB: DNA double strand break) が発生することから始まる。それぞれの DSB が正確に修復されれば問題が生じないが、DSB 修復は時に修復エラーを引き起こし、染色体転座を発生させる。しかしながら現在まで、DSB 誘発の染色体転座発生メカニズムは明らかになっていない。その原因として、染色体転座を解析するための解析手法が確立されていないことが挙げられる。そこで本研究では簡便かつ高感度の染色体転座解析方法の確立を目標として研究を行った。

2. 研究の目的

発がんに大きく関わる染色体転座は、DSB の修復エラーにより生じる。しかしながら、発がんに繋がる遺伝子領域間での染色体転座がどのような過程で生じるかは未だ多くが明らかになっていない。我々は、DSB 修復の際の R-loop 解消異常が染色体転座に関わることを示唆するデータを得ていたが (Yasuhara et al. & Shibata*, Cell, 2018)、転写共役型 DSB 修復と遺伝子領域間転座を繋ぐ分子メカニズムの解明までには至っていない。そこで本研究課題では、任意の場所とタイミングで DSB を人為的に誘導するヒト培養細胞実験系を確立し、転写活性を有する遺伝子間における染色体転座アッセイ系を構築することで、染色体転座を引き起こす分子機構解明を目指した。本研究の達成により、人体における転座を介したゲノム安定性の分子機構を解明するための染色体転座解析方法が確立され、その方法を介して分子メカニズムを解明することにより、実際に人体がどのようにして発がんを抑制しているかの一端が明らかになると考えている。

3. 研究の方法

タモキシフェン誘導体 4OHT にて制限酵素 AsiSI が核内に誘導されるシステムを、網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞: Retinal Pigment Epithelium) において構築し、また DSB 発生を停止させるための AID タグ法を組み合わせた実験系を確立した。RPE 細胞は接触阻害法により G0/G1 期に同調することが出来、G0/G1 期に 4OHT を処理することで DSB を誘導することに成功した。これらのアッセイ系を用いて染色体転座アッセイ系の構築を中心に行い、染色体転座が起こりやすい DSB 部位の組み合わせの同定を試みた。さらに CRISPR によりゲノムの 2 か所を切断し、染色体転座アッセイ系の構築を試みた。

細胞培養: RPE 細胞および A549 細胞は 10%FBS および抗生物質を含む、DMEM または MEM により培養した。

4OHT 処理: 最終濃度が 300 nM となるように添加した。

ゲノム DNA の回収: DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) にて回収した。

qPCR: PowerTrack™ SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用い、StepOne™ リアルタイム PCR システムにて行った。

4. 研究成果

(1) RPE 細胞における ER-AsiSI 発現細胞の樹立

タモキシフェン誘導体 4OHT にて制限酵素 AsiSI が核内に誘導されるシステムを構築するため、Neomycin 耐性プラスミドに ER-AsiSI 発現遺伝子を挿入したベクターを作製した。RPE 細胞に対し当該ベクターをエレクトロポレーション法により導入し、G418 存在下で ER-AsiSI 発現細胞を樹立した。4OHT 処理により、DSB が経時的に上昇することを確認した。

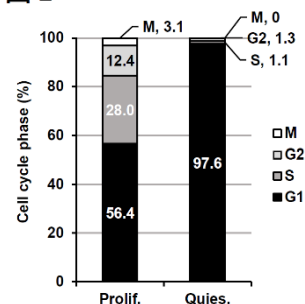
(2) G0/G1 期同調の確認

ヒト細胞の多くは G0/G1 期にあり、染色体転座は G0/G1 期において生じると考えられる。そこで本研究では RPE 細胞を G0/G1 期に同調し (図 1)、以下の実験を行った。

(3) AsiSI により DSB を誘導後、PCR による染色体転座部位の検討

RPE 細胞を G0/G1 期に同調し、4OHT 処理後 72 時間の時点でゲノム DNA を回収した。図 2 に示す 24 か所の AsiSI 切断部位を選択し、他予備実験で切断が確認された部位 (PIP5K1L, CHIC1, RXRA, UBE2G1, LYRM2, LINC00271, ASXL1, TIM37) を中心に、染色体転

図 1



座後に PCR で増幅されるようにプライマーを設定し、PCR の増幅確認を行った。その結果、予測される塩基対サイズで増幅された組み合わせを陽性とした。図 3 に PCR にて増幅が認められた組み合わせの遺伝子を赤字とし、いずれの組み合わせにおいても増幅されなかった遺伝子を青字として示す。これらの結果から、図 3 の赤で示す遺伝子間においては、AsiSI による DSB 誘導の染色体転座が起こりえる可能性が示唆された。今後の研究により、これらの増幅が転座領域間の特異的増幅であるかどうかを精査する。

図 2

1	CCDC47-int
2	PIP5KL1
3	CHIC1
4	RXRA
5	UBE2G1 int
6	LYRM2
7	LINC00271
8	ASXL1
9	TRIM37
10	RBMXL1
11	ALAS1
12	PTGES2
13	WSCD1
14	CSNK1D
15	USP22
16	BCKDHA
17	SRSF6
18	KDEL3
19	AGA
20	NR3C1
21	TRPS1
22	LINGO2
23	VSTM2B
24	Anp32a

(4) 既知の遺伝子融合部位に DSB を誘導した場合の染色体転座アッセイの構築

ALK および EML4 遺伝子間では DSB 依存的な染色体転座が起こることが知られている。本研究では ALK および EML4 遺伝子の領域に対し CRISPR-Cas9 を用いて DSB を誘導し、染色体転座頻度を Droplet digital PCR にて検出した。さらに分子メカニズム解明のため、非相同末端結合因子である DNA-PKcs に対する阻害剤 (図 4A)、一本鎖切断修復因子である PARP に対する阻害剤の存在下にて本アッセイを行った (図 4B)。その結果、DNA-PKcs 阻害剤存在下では ALK-EML4 の転座頻度の低下が認められた。この結果から、ALK-EML4 の転座には非相同末端結合が必要であることが示唆された。

図 3

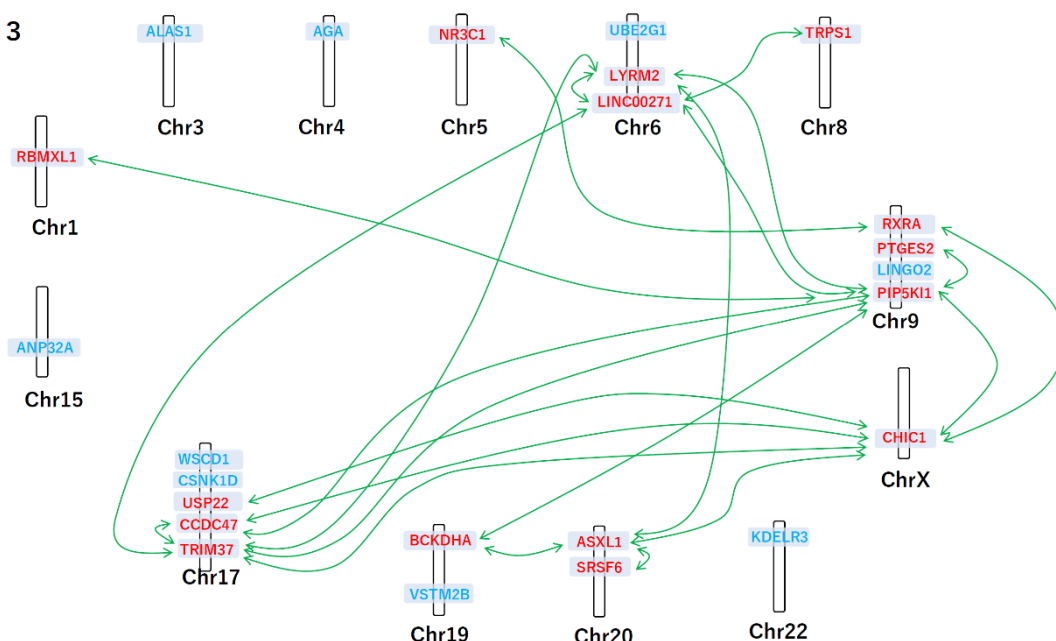
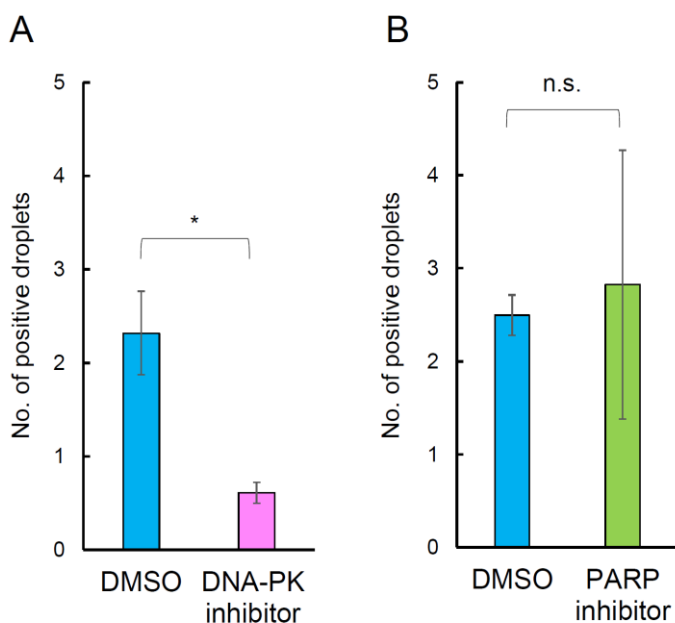


図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 15件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuhara Takaaki, Kato Reona, Yamauchi Motohiro, Uchihara Yuki, Zou Lee, Miyagawa Kiyoshi, Shibata Atsushi	4. 巻 38
2. 論文標題 RAP80 suppresses the vulnerability of R-loops during DNA double-strand break repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110335 ~ 110335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110335	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 該当する
1. 著者名 Kumazawa Takuya, Mori Yasumasa, Sato Hiro, Permata Tiara, Uchihara Yuki, Noda Shin-Ei, Okada Kohei, Kakoti Sangeeta, Suzuki Keiji, Ikota Hayato, Yokoo Hideaki, Gondhowiardjo Soehartati, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Expression of non-homologous end joining factor, Ku80, is negatively correlated with PD-L1 expression in cancer cells after X?ray irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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) 10.3892/ol.2021.13147	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 該当する
1. 著者名 Nachankar Ankita, Oike Takahiro, Hanaoka Hirofumi, Kanai Ayaka, Sato Hiro, Yoshida Yukari, Obinata Hideru, Sakai Makoto, Osu Naoto, Hirota Yuka, Takahashi Akihisa, Shibata Atsushi, Ohno Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 64Cu-ATSM Predicts Efficacy of Carbon Ion Radiotherapy Associated with Cellular Antioxidant Capacity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6159 ~ 6159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13246159	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 該当する
1. 著者名 Takatsuka Hirotomo, Shibata Atsushi, Umeda Masaaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Genome Maintenance Mechanisms at the Chromatin Level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10384 ~ 10384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910384	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 Shibata Atsushi, Jeggo Penny A.	4. 巻 12
2. 論文標題 ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1370 ~ 1370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12091370	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 該当する

1. 著者名 Kot Palina, Yasuhara Takaaki, Shibata Atsushi, Hirakawa Miyako, Abe Yu, Yamauchi Motohiro, Matsuda Naoki	4. 巻 572
2. 論文標題 Mechanism of chromosome rearrangement arising from single-strand breaks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 191 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.001	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 該当する

1. 著者名 Permata Tiara Bunga Mayang, Sato Hiro, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, Uchihara Yuki, Yoshimatsu Yukihiko, Sato Itaru, Kato Reona, Yamauchi Motohiro, Suzuki Keiji, Oike Takahiro, Tsushima Yoshito, Gondhowiardjo Soehartati, Ohno Tatsuya, Yasuhara Takaaki, Shibata Atsushi	4. 巻 62
2. 論文標題 High linear energy transfer carbon-ion irradiation upregulates PD-L1 expression more significantly than X-rays in human osteosarcoma U2OS cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 773 ~ 781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrab050	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 該当する

1. 著者名 Uchihara Yuki, Permata Tiara Bunga Mayang, Sato Hiro, Shibata Atsushi	4. 巻 104
2. 論文標題 Modulation of immune responses by DNA damage signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103135 ~ 103135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2021.103135	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 該当する

1. 著者名 Mori Yasumasa, Sato Hiro, Kumazawa Takuya, Permata Tiara, Yoshimoto Yuya, Murata Kazutoshi, Noda Shin-Ei, Kaminuma Takuya, Ando Ken, Oike Takahiro, Okonogi Noriyuki, Okada Kohei, Kakoti Sangeeta, Suzuki Keiji, Ikota Hayato, Yokoo Hideaki, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Analysis of radiotherapy-induced alteration of CD8+ T cells and PD-L1 expression in patients with uterine cervical squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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) 10.3892/ol.2021.12707	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 該当する

1. 著者名 Akagawa Remi, Trinh Hai Thanh, Saha Liton Kumar, Tsuda Masataka, Hirota Kouji, Yamada Shintaro, Shibata Atsushi, Kanemaki Masato T., Nakada Shinichiro, Takeda Shunichi, Sasanuma Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101027 ~ 101027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101027	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 Nakajima Nakako Izumi, Yamauchi Motohiro, Kakoti Sangeeta, Cuihua Liu, Kato Reona, Permata Tiara Bunga Mayang, Iijima Moito, Yajima Hirohiko, Yasuhara Takaaki, Yamada Shigeru, Hasegawa Sumitaka, Shibata Atsushi	4. 巻 91-92
2. 論文標題 RNF8 promotes high linear energy transfer carbon-ion-induced DNA double-stranded break repair in serum-starved human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102872 ~ 102872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2020.102872	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 該当する

1. 著者名 Shibata Atsushi, Jeggo Penny A.	4. 巻 93
2. 論文標題 Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102915 ~ 102915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2020.102915	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 該当する

1. 著者名 Kakoti Sangeeta, Sato Hiro, Laskar Siddhartha, Yasuhara Takaaki, Shibata Atsushi	4. 巻 7
2. 論文標題 DNA Repair and Signaling in Immune-Related Cancer Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2020.00205	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 Shibata Atsushi, Jeggo Penny A	4. 巻 61
2. 論文標題 Roles for the DNA-PK complex and 53BP1 in protecting ends from resection during DNA double-strand break repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 718 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa053	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 該当する

1. 著者名 Oike Takahiro, Uchihara Yuki, Permata Tiara Bunga Mayang, Gondhowiardjo Soehartati, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Quantitative volumetric analysis of the Golgi apparatus following X-ray irradiation by super-resolution 3D-SIM microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	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) 10.1007/s00795-020-00277-z	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 該当する

1. 著者名 Mori Yasumasa, Sato Hiro, Kumazawa Takuya, Permata Tiara, Yoshimoto Yuya, Murata Kazutoshi, Noda Shin-Ei, Kaminuma Takuya, Ando Ken, Oike Takahiro, Okonogi Noriyuki, Okada Kohei, Kakoti Sangeeta, Suzuki Keiji, Ikota Hayato, Yokoo Hideaki, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Analysis of radiotherapy induced alteration of CD8+ T cells and PD-L1 expression in patients with uterine cervical squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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) 10.3892/ol.2021.12707	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 Immune responses regulated by DNA damage signaling
3. 学会等名 12th International Symposium Gunma University Initiative for Advanced Research (GIAR)、Hybrid conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 放射線の細胞への影響
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 第12回放射線生物学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 Radiation-induced DNA damage and repair: a look into carbon-ion dependent Clustered DNA Double Strand Breaks
3. 学会等名 International Training Course on Carbon Ion Radiotherapy 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 放射線照射が誘発する免疫応答の分子機構からみた放射線免疫治療併用の可能性.
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 修復：線量によって変化するDNA修復機構.
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第34回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 正確なDNA修復へと導くDNA二本鎖切断修復経路の決定メカニズム.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 放射線治療時に生じるDNA損傷を起因とする腫瘍免疫活性化の分子メカニズム.
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 放射線分子生物学の知見をどのようにして私たちの健康に役立てるのか？
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第64回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 放射線照射により惹起される免疫応答系リガンドの発現制御機構.
3. 学会等名 第49回放射線による制癌シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 ゲノムの安定性維持機構の破綻による細胞影響から病態理解へ
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 生命科学の最前線～生命の神秘を解き明かし、世界の医療発展に貢献する～
3. 学会等名 群馬大学グローバルフロンティアリーダー（GFL）先端研究学際講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 G1期細胞におけるDNA二本鎖切断修復選択機構
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田 淳史
2. 発表標題 転写活性領域におけるDNA二本鎖切断修復の経路選択機構
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

柴田研究室HP https://shibataxlab.com/ 柴田研究室HP https://shibataxlab.com/
--

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	山内 基弘 (Yamauchi Motohiro) (60437910)	九州大学・アイソトープ統合安全管理センター（馬出地区）・准教授 (17102)	
研究分担者	安原 崇哲 (Yasuhara Takaaki) (90757056)	東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教 (12601)	

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
---------	---------