

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670549

研究課題名(和文) 部位特異的制限酵素I-PpoIを応用したPCRによる染色体転座検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel assay for detecting chromosomal translocation

研究代表者

柴田 淳史 (Shibata, Atsushi)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号：30707633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射後の突然変異の中でも染色体転座は最も重篤な変異であるが、その検出は染色体実験に関する熟練した技術が必要であり、その技術を臨床現場に広く普及させることは極めて困難である。本研究では部位特異的制限酵素I-PpoIを用いて、迅速かつ簡便な転座検出法の開発を目指した。タモキシフェン誘導体4-OHTによりI-PpoIを誘導するHT1080細胞を用いて、rDNA部位およびDAB1遺伝子間での染色体転座をPCRにより検出することを試みたが、明らかな増幅は認められなかった。その他の実験結果を合わせた総合的解釈として、転座検出のためにはより高い効率でI-PpoI部位を切断する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Among the several IR-induced mutations, chromosomal translocation is one of the critical mutations, however, the conventional assay requires a highly-trained skill. Here, we aim to establish a new method to measure chromosomal translocation by using a site specific endonuclease, I-Ppo1. HT1080 cells, which express an inducible I-Ppo1 vector, were used in this study. I-Ppo1 was induced by 4-OHT treatment. The efficiency of translocation was accessed by PCR using primer sets between rDNA and DAB1 locus, however, an obvious signal was not detected by the primer sets. By considering other data, we concluded that more efficient digestion is required to detect I-Ppo1 induced translocation.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 染色体転座 ゲノム不安定性

### 1. 研究開始当初の背景

2000年代から革新的に進歩している DNA 修復研究の中でも染色体転座発生機構の解明は大きな目標の一つである。転座は DNA 二本鎖切断 (DSB: DNA double strand break) 末端の削り込み (resection) から始まる。申請者はこれまで resection 開始のメカニズムについて研究を行い、resection には MRE11 エンドヌクレアーゼ活性及び CtIP が必要であることを見出している (Shibata, Mol. Cell, 2013; Shibata, EMBO J, 2011)。さらに申請者らの研究から、放射線誘発転座にはクロマチン構造が関わっていることが明らかになりつつある (Yamauchi, Sci. Rep., 2017)。また、DSB 修復とクロマチン構造の関連については、ヘテロクロマチン領域で生じた DSB の連結には ATM やシグナル増幅因子である 53BP1 が必要であることが明らかになっている (Noon and Shibata, Nat. Cell Biol., 2010; Shibata, MCB, 2010)。一方、白血病患者のがん細胞内では転写活性領域間の転座が多く認められるが、放射線照射後に転写領域同士で転座が好発するかどうかは全く未明である。

遺伝子診断の進歩により放射線誘発転座頻度のある程度予測することは可能であるが、転座は上記のように複数のステップを経るため、患者由来の細胞を用いた直接的な転座頻度の測定が望ましい。しかしながら現在まで行われている放射線誘発転座検出法は染色体実験に関する熟練した技術が必要であり、その技術を臨床現場に広く普及させることは極めて困難である。また放射線誘発 DSB はゲノム中にランダムに生じるため FISH (fluorescence in situ hybridization) 解析が必要であり、検出のための更なる技術と時間が要求される。本案では申請者が DSB 修復研究で使用している放射線誘発 DSB を模倣する部位特異的制限酵素 I-PpoI を用い、DSB 誘導後、選定した転座連結部位上で PCR を行うことにより転座頻度を測定する方法を開発することを研究目的とした。本アッセイ系を発展させることで、同一個体の各臓器から細胞を採取し、臓器別の転座率測定が出来るなど、その他の実験系への応用の可能性が大きいと考えられたため、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

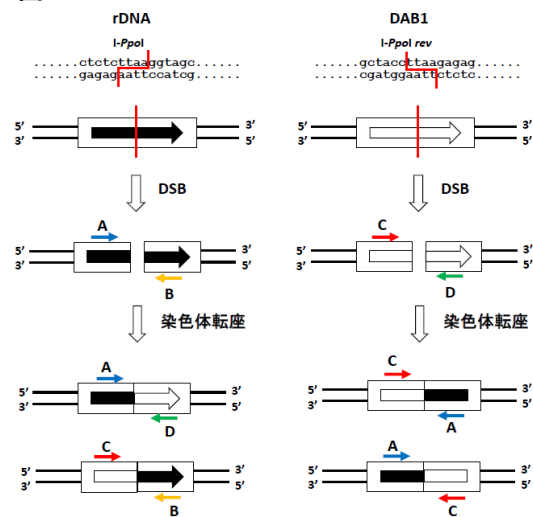
放射線晩発性影響は数か月 数年に及ぶ潜伏期間を経て出現する。近年、定位放射線や重粒子線等の近代的照射技術の導入により、放射線治療の治療成績は格段に上昇している。一方で完治したがん経験者、特に小児がん経験者は乳がん、甲状腺がん、肉腫、皮膚がん等の二次性固形がん発症のリスクが高いことが知られている。これら二次発がんを導く要因として DNA 修復ミスによる突然変異があり、その中でも二つの異なる染色体が連結される染色体転座は最も重篤な遺伝子変

異として知られている。従って、がん患者が転座を誘発しやすい遺伝的背景を有するかどうかを治療前に診断することが出来れば、治療方針の変更や二次性がん発症までの経過を注意深く観察することが出来る。また腫瘍内がん細胞における転座頻度を事前に知る事が出来れば、その腫瘍が放射線照射によりゲノム不安定化しやすいかどうかや致死感受性の判別にも繋がると思われる。一方で、速やかな治療の開始が望まれるがん患者に対して染色体転座診断法を普及させるためには、迅速かつ簡便な診断方法の開発が必要である。

### 3. 研究の方法

転座発生原因となる放射線照射誘発 DNA 二本鎖切断 (DSB) を模倣且つ制御するために、15bp と長い認識配列を有するゲノム内在性制限酵素 I-PpoI を用いた。制限酵素導入による DNA の切断は、認識部位のクロマチン構造に大きく左右される。そのため本アッセイでは既に切断が報告されている配列 Chr.1 (DAB1) 及び rDNA 配列部位を用いた。全細胞集団において I-PpoI を同時期に誘導するため、細胞はタモキシフェン誘導体 4-OHT (4-hydroxytamoxifen) で誘導可能な I-PpoI-HT1080 細胞を用いた (研究協力者・長崎大学 山内基弘博士から分与)。4-OHT を 4 時間添加し I-PpoI 配列に DSB を誘導後、各染色体上の DSB 切断効率を測定するために、I-PpoI 配列を跨ぐプライマーおよび転座後の連結部位を跨ぐプライマーを設計した (図 1: プライマー A 及び B は rDNA 近傍の I-PpoI 切断部位周辺に設置、プライマー C 及び D は DAB1 遺伝子近傍の I-PpoI 切断部位周辺に設置)。

図 1

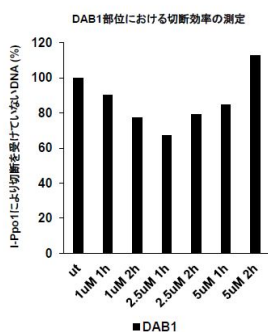
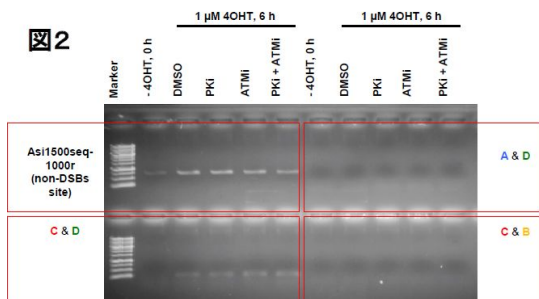


### 4. 研究成果

タモキシフェン類似化合物である 4OHT 誘導型 I-PpoI-細胞 (HT1080 細胞株) を用いて本実験を行った。まず、4OHT により DSB が誘導されるかどうかを H2AX foci の生成により確

認した。1  $\mu$ M 4OHT を添加し、2, 4, 6, 24 時間後の H2AX を検出した結果、2 時間後の時点から H2AX foci の形成が始まり、24 時間後にピークに達した (data not shown)。また I-PpoI タンパク質に付随しているタグである HA に対する抗体で免疫染色した結果、H2AX foci 形成のタイミングと一致して、2-24 時間で徐々に細胞核内での発言量が上昇した (data not shown)。

次に 1  $\mu$ M 4OHT を添加後 6 時間の時点での転座の有無を確認するため、転座が起こった場合に増幅されるプライマーの組み合わせにより PCR を行った。その結果、転座が発生していれば検出されるプライマーの組み合わせである A 及び D, また C 及び B の組み合わせでは増幅が認められなかった (図 2 上)。また C 及び A の組み合わせを用いて PCR を行ったが、こちらについても増幅は認められなかった (data not shown)。次に DAB1 遺伝子近傍における I-PpoI 切断効率を測定するため、切断部位を跨ぐプライマーを設置し、リアルタイム PCR を行った (図 2 下)。リアルタイム PCR の結果、最大でも 40% 程度の割合で DAB1 部位が切断されていることが明らかになった。以上の結果から、転座を誘導するためにはより効率の高い方法で I-PpoI を導入し、rDNA 及び DAB1 部位を切断する必要があると考えられた。



## 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 12 件)

Mayu Isono, Atsuko Niimi, Takahiro Oike, Yoshihiko Hagiwara, Hiro Sato, Ryota Sekine, Yukari Yoshida, Shin-Ya Isobe, Chikashi Obuse, Ryotaro Nishi, Elena

Petricci, Shinichiro Nakada, Takashi Nakano and Atsushi Shibata\*. BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation. Cell Reports, 査読有, 18(2):520-532.2017.\*Corresponding author DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.042

② Motohiro Yamauchi, Atsushi Shibata, Keiji Suzuki, Masatoshi Suzuki, Atsuko Niimi, Hisayoshi Kondo, Miwa Miura, Miyako Hirakawa, Keiko Tsujita, Shunichi Yamashita, Naoki Matsuda. Regulation of pairing between broken DNA-containing chromatin regions by Ku80, DNA-PKcs, ATM, and 53BP1. Scientific Reports, 査読有, 7:41812, 2017. DOI: 10.1038/srep41812

Atsuko Niimi, Motohiro Yamauchi, Siripan Limsirichaikul, Ryota Sekine, Takahiro Oike, Hiro Sato, Keiji Suzuki, Kathryn D. Held, Takashi Nakano, and Atsushi Shibata\*. Identification of DNA Double Strand Breaks at Chromosome Boundaries Along the Track of Particle Irradiation. Genes, Chromosomes and Cancer. 査読有, 55(8):650-60, 2016.\*Corresponding author DOI:10.1002/gcc.22367

Takahiro Oike, Atsuko Niimi, Noriyuki Okonogi, Kazutoshi Murata, Akihiko Matsumura, Shin-Ei Noda, Daijiro Kobayashi, Mototaro Iwanaga, Keisuke Tsuchida, Tatsuaki Kanai, Tatsuya Ohno, Atsushi Shibata\* & Takashi Nakano\*. Visualization of complex DNA double-strand breaks in a tumor treated with carbon ion radiotherapy. 査読有, Scientific Reports. 6:22275, 2016.\*Corresponding author. DOI: 10.1038/srep22275

Laura A. Tookman, Ashley K. Browne, Claire M. Connell, Gemma Bridge, Carin K. Ingemarsdotter, Suzanne Dowson, Atsushi Shibata, Michelle Lockley, Sarah A. Martin, and Iain A. McNeish. RAD51 and BRCA2 promote oncolytic adenovirus type 5 activity in ovarian cancer. 査読有 Mol Cancer Res. 14(1):44-55, 2016. DOI: 10.1158/1541-7786

Meryem Alagoz, Yoko Katsuki, Hideaki Ogiwara, Tomoo Ogi, Atsushi Shibata, Andreas Kakarougkas, and Penny Jeggo. SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells. 査読有, Nucleic Acids Res, 43(16):7931-44, 2015. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkv722

Naoyuki Okita and Atsushi Shibata\*. Other Determinants of Sensitivity (Chapter 15). 査読無, PARP Inhibitors for

Cancer Therapy, Cancer Drug Discovery and Development 83, 363-379, 2015  
\*Corresponding author  
DOI:10.1007/978-3-319-14151-0\_15

Napapat Amornwichee, Takahiro Oike, Atsushi Shibata, Chaitanya S. Nirodi, Hideaki Ogiwara, Haruhiko Makino, Yuka Kimura, Yuka Hirota, Mayu Isono, Yukari Yoshida, Tatsuya Ohno, Takashi Kohno & Takashi Nakano. The EGFR mutation status affects the relative biological effectiveness of carbon-ion beams in non-small cell lung carcinoma cells. 査読有, Sci Rep, srep11305, 2015. DOI: 10.1038/srep11305

Mayu Isono, Yukari Yoshida, Akihisa Takahashi, Takahiro Oike, Atsushi Shibata, Yoshiaki Kubota, Tatsuaki Kanai, Tatsuya Ohno, and Takashi Nakano. Carbon-ion beams effectively induce growth inhibition and apoptosis in human neural stem cells compared with glioblastoma A172 cells. 査読有, J. Rad. Res., 56(5):856-61, 2015. DOI: 10.1093/jrr/rrv033

Nakako Izumi Nakajima#, Yoshihiko Hagiwara#, Takahiro Oike, Ryuichi Okayasu, Takeshi Murakami, Takashi Nakano, and Atsushi Shibata\*. Pre-exposure to ionizing radiation stimulates DNA double strand break end resection, promoting the use of homologous recombination repair. 査読有, PLOS ONE, 10(3):e0122582, 2015.#Equal first author. \*Corresponding author DOI: 10.1371/journal.pone.0122582

Napapat Amornwichee, Takahiro Oike, Atsushi Shibata, Hideaki Ogiwara, Naoto Tsuchiya, Motohiro Yamauchi, Yuka Saitoh, Ryota Sekine, Mayu Isono, Yukari Yoshida, Tatsuya Ohno, Takashi Kohno, Takashi Nakano. Carbon-Ion Beam Irradiation Kills X-Ray-Resistant p53-Null Cancer Cells by Inducing Mitotic Catastrophe. 査読有, PLoS One. 9(12):e115121, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0115121

Atsushi Shibata, Penny Jeggo. DNA double-strand break repair in a cellular context. 査読有, Clin Oncol (R Coll Radiol).26(5):243-249, 2014. DOI: 10.1016/j.clon.2014.02.004

[学会発表](計 23 件)

柴田淳史, DNA repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells、International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017 (国際学会) 2017年1月26日~1月28日、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

② 柴田淳史, BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation、Abcam

Conference “Mechanisms of Recombination” (国際学会) 2016年5月19日~5月23日、アリカンテ(スペイン)

柴田淳史, DNA二本鎖切断修復経路の選択性を担う時空間的制御機構、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日~12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

柴田淳史, 重粒子線特異的なDNA損傷の可視化と修復経路への影響、放射線医学総合研究所の第2回放射線がん生物研究セミナー(招待講演)、2016年11月15日、放射線医学総合研究所(千葉県・千葉市)

柴田淳史, シンポジウム・多彩な細胞応答を制御するDNA修復研究の最先端(座長)、日本放射線影響学会第59回大会、2016年10月26日~10月28日、JMSアステールプラザ(広島県広島市)

柴田淳史, DNA二本鎖切断修復経路を制御するDNA end resectionの多段階調節機構、遺伝研究集会「生物ゲノム安定維持の分子機構」(招待講演)、2016年10月24日~10月25日、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)

柴田淳史, BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation, The 32th International Symposium “Growing Edge of Radiation Biology, from principles to applications” (招待講演・国際学会)、2016年9月1日~9月2日、ホテルコープイン京都(京都府・京都市)

柴田淳史, Analysis of cluster and DNA double strand break after heavy ion irradiation using high resolution microscopy, 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA(国際学会), 2016年3月21日~3月22日、メルボルン(オーストラリア)

柴田淳史, 研究からの放射線治療発展へのアプローチ、茨城大学理学部公開シンポジウム「第9回 Quantum Medicine 研究会」(招待講演)、2016年3月13日、茨城大学理学部(茨城県・水戸市)

柴田淳史, DNA二本鎖切断修復経路を決定する時空間的制御機構の解明、放射線医学総合研究所 第7回次世代放射線治療研究セミナー・放医研研究会共催「若手研究者によるDNA修復の最先端」(招待講演)、2015年12月18日、放射線医学総合研究所(千葉県・千葉市)

柴田淳史, 多様なDNA損傷応答の統合制御機構 2015~ゲノム不安定性の病態解明研究~、第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会 合同大会、2015年12月3日、神戸ポートピアホテル本館 B1階階楽1(兵庫県・神戸市)

柴田淳史, Understanding the molecular mechanism for developing a novel treatment strategy in radiotherapy、日本放射線腫瘍学会第28回大会(招待講演)、2015年11月19日、前橋商工会議所 サクラ(群馬県・前橋



市)

柴田淳史、BRCA1 による DNA end resection の調節機構の解明、国立遺伝学研究所「染色体 DNA の安定機構の分子メカニズム(招待講演)、2015 年 10 月 1 日、国立遺伝学研究所・講堂(静岡県・三島市)

柴田淳史、District regulation of DNA double strand break end-resection after heavy ion irradiation、The 2015 IMB conference, DNA Repair & Genome Stability in a Chromatin Environment(国際学会)、2015 年 6 月 4 日~6 月 7 日、マインツ(ドイツ)

柴田淳史、Initiation of homologous recombination repair by MRE11 nuclease activities、Keystone Symposia Genomic Instability and DNA Repair (X4)(国際学会)、2015 年 3 月 4 日、ウイスラー(カナダ)

柴田淳史、DNA 二本鎖切断修復経路を決定する分子メカニズム、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

柴田淳史、DNA 二本鎖切断発生後の相同組換え修復開始メカニズム、国立遺伝学研究所・研究集会「染色体 DNA の安定維持の分子メカニズム」(招待講演)、2014 年 11 月 6 日、国立遺伝学研究所・講堂(静岡県・三島市)

柴田淳史、DNA 二本鎖切断修復経路を決定する分子メカニズム、日本放射線影響学会第 57 回大会(招待講演)、2014 年 10 月 3 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)

柴田淳史、放射線誘発 DNA 二本鎖切断発生後の修復経路決定メカニズム、人材育成事業第 1 回集中講義「放射線の生体効果：発ガン誘導と抵抗性獲得メカニズム」(招待講演)、2014 年 8 月 10 日、京都大学原子炉実験所 会議室(大阪府・泉南郡)

柴田淳史、DNA 二本鎖切断修復経路決定に関わる分子機構の解明、Genome Damage Network Workshop in Tohoku University 2014 (招待講演)、2014 年 6 月 5 日~6 月 6 日、東北大学 加齢医学研究所(宮城県・仙台市)

②柴田淳史、Initiation of homologous recombination repair by MRE11 nuclease activities、Mechanisms of Recombination:50<sup>th</sup> Anniversary Meeting of the Holliday Model、2014 年 5 月 19 日~5 月 23 日、アリカンテ(スペイン)

②柴田淳史、放射線照射後の DNA 二本鎖切断修復とチェックポイントシグナル研究、第 18 回 NRGIC 重点セミナー/第 18 回原研研究集会がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン講演会(招待講演)、2014 年 4 月 25 日、長崎大学(長崎県・長崎市)

③柴田淳史、欠失及び転座を導く G1(G0)期細胞の DSB end resection 機構、浜名湖ワークショップ、2014 年 4 月 3 日~4 月 4 日、浜名湖弁天リゾート ジ・オーシャン(静岡県・浜松市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
DNA 修復研究 柴田研究室  
<http://shibatalab.com/>  
SHIBATA LAB  
<http://shibatalab.com/english/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 淳史 (SHIBATA Atsushi)  
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教  
研究者番号：30707633

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

山内 基弘 (Yamauchi Motohiro)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教