

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19851

研究課題名（和文）被ばくに起因するがん識別のためのFlow-Fish法の開発

研究課題名（英文）Development of Flow-Fish method for identifying cancer caused by radiation exposure

研究代表者

柿沼 志津子（Kakinuma, Shizuko）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線影響研究部・研究員

研究者番号：20392219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、1細胞レベルの情報を測定できるFlow Cytometry（FACS）法と、染色体の欠失が検出可能な蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）法を組み合わせたFlow-FISH法の開発に挑戦した。放射線照射で4番染色体のPax5領域に欠失が生じたB細胞性リンパ腫に、Pax5-BACプローブと4番染色体ペインティングプローブでFISHを行い、Pax5を含む領域の転座や欠失を染色体観察で確認した。液中の細胞標識は、細胞・核の形態維持が困難でFACS分析に適さなかった。さらに生細胞へPax5を標的とするdCas9-FISH法を試み、一部のリンパ球で細胞核の蛍光標識に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原爆被爆者や医療放射線に被ばくした集団の疫学調査から、被ばくした量に比例してがんのリスクが上昇することが示されている。低レベルの放射線被ばくによる発がんリスクは、自然発症と放射線被ばくによるがんを区別できないため、正確に評価することは困難である。1細胞レベルの情報を測定できるFlow-FISH法が開発できれば、低レベルの放射線被ばくによるがんリスクを直接的に評価する手法や発がんメカニズム解明のブレークスルーに繋がるだけでなく、がんを始めとする染色体異常を伴う疾病の早期発見や診断、治療効果の予測法の開発が実現する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop a Flow-FISH method that combines Flow Cytometry (FACS), which can measure information at the single cell level, and Fluorescence in situ Hybridization (FISH), which can detect chromosomal deletions. We performed FISH using a Pax5-BAC probe and a chromosome 4 painting probe on B-cell lymphoma in which the Pax5 region of chromosome 4 had been deleted due to radiation exposure and confirmed the translocation and deletion of the region containing Pax5 by chromosome observation. Cell labeling in liquid was not suitable for FACS analysis because it was difficult to maintain the morphology of the cell and nucleus. We also attempted the dCas9-FISH method, which targets Pax5 in live cells, and succeeded in fluorescently labeling the cell nuclei in some lymphocytes.

研究分野：放射線生物学

キーワード：Flow-Fish法 染色体 欠失

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原爆被爆者や医療放射線に被ばくした集団の疫学調査から、放射線を被ばくした量に比例してがんのリスクが上昇することが示されている。しかしながら、東京電力福島第一原子力発電所事故等で懸念されるような低レベル (100 mGy 以下) の放射線被ばくによる発がんリスクは、生活習慣要因によるリスクと比べて圧倒的に小さい上に、自然発症と放射線被ばくによるがんを区別することができないため、疫学的手法によって正確に評価することは困難である。したがって、低レベルの放射線被ばくによるがんリスクを直接的に評価する手法が求められている。直接的な評価が可能となれば、低線量被ばくのリスク評価や発がんメカニズム解明のブレークスルーに繋がるだけでなく、がんを始めとする染色体異常を伴う疾病の早期発見や診断、治療効果の予測法の開発が実現する。

2. 研究の目的

本研究では、放射線誘発白血病マウスモデルの解析で明らかになった特徴的な異常を分子指標に、1細胞レベルの情報を測定できる Flow Cytometry 法と、染色体の欠失が検出可能な蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を組み合わせた Flow-FISH 法の開発を目的とした (図 1)。

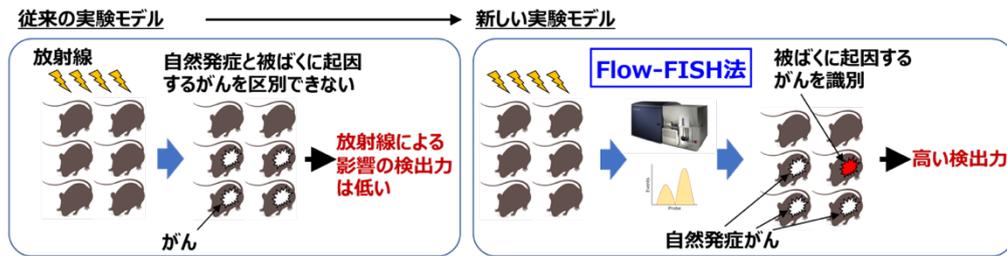


図 1 研究の概要

3. 研究の方法

これまでに、白血病マウスモデル (T 細胞リンパ腫や急性骨髄性白血病) の研究から、放射線被ばく 3 ヶ月後 (早いものでは 2~3 週間後) から、増殖した前がん細胞における染色体欠失が観察されることが報告されている (Go *et al Cancer Sci.*, 101:1347, 2010, Verbiest *et al Leukemia*, 32:1435, 2018)。そこで本研究では、我々が被ばくに特徴的な異常として染色体欠失を明らかにした放射線誘発 B リンパ腫の系を用いた (Tachibana *et al Carcinogenesis.*, 43:693, 2022)。マウスに照射後経時的に血漿と骨髄・リンパ組織を採取しリンパ球細胞を単離、および非照射マウスのリンパ球も同様に単離した。さらに、これまでの放射線誘発白血病マウスモデルのゲノム解析で明らかになった特徴的な異常 (4 番染色体の欠失) が見られる領域に結合する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) プローブ (Pax5-BAC プローブ) を作製し、単離したリンパ球細胞の染色体の FISH を行い得られた染色体を解析し、さらに FACS を検討した (図 2)。

- 1) リンパ球サンプル: 若齢期 (7 週齢) の野生型 B6C3F1 マウスに放射線 (γ 線, 4 Gy, 0.5 Gy/min) を照射し、30 から 60 週齢 (照射後 23 から 53 週目) に解剖を行い、経時的に血漿と骨髄・リンパ組織を採取し、血球分離試薬 (Lympholyte-M, Cedarlane labs, カナダ) によりリンパ球細胞を単離し CELLBANKER1 (日本全薬工業, 福島) に懸濁して -80°C で保存した。同時に、非照射のマウスからもコントロール用の細胞を同様に単離保存した。

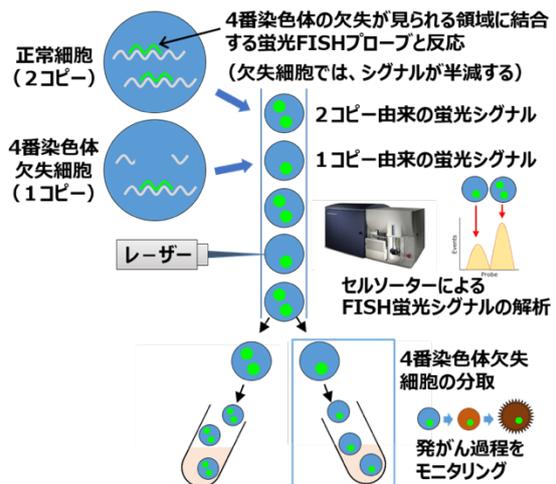


図 2 Flow-FISH法による染色体欠失細胞の検出と分取

- 2) FISH プローブの準備: 放射線誘発白血病マウスモデルのゲノム解析で明らかになった 4 番染色体の欠失領域に含まれる Pax5 遺伝子座内 200~700 Mb の配列に対応する 1~3 種類の BAC クローンを選択し、FISH 用カスタムプローブ (FITC-Pax5-BAC プローブ、クロモソームサイエンスラボ、北海道) を調達した。また、弘前大学・藤嶋洋平助教の協力の下、より蛍光の強い Alexa シリーズの蛍光タンパク質を修飾した Alexa546-Pax5-BAC プローブを作製した。また、Flow-FISH のポジティブコントロールとして、既製品の X 性染色体を標的とした、FITC 修飾の FISH プローブ (MXY-10、クロモソームサイエンスラボ) についても調達した。

- 3) Karyotype 解析：1) の解剖により採取した骨髓細胞、脾臓細胞及びリンパ腫の一部は、2 時間（骨髓・リンパ腫）、46 時間（脾臓）37 °C で培養した。尚、脾臓細胞の培養にはリンパ球の分裂を促進する Concanavalin A、Lipopolysaccharide、Phytohemagglutinin を含む培地を用いた。培養後に Colcemid 処理及び 0.075M KCl（低張液）処理を行い、カルノア固定したリンパ球を、スライドガラス上に展開し、染色体標本作製した。
- 4) 染色体標本について Quinacrine/Hoechst 蛍光二重染色を行い、Metafer システムを用いて高解像度で撮影し、染色体の本数や欠失および転座等の構造異常を解析した。
- 5) 染色体標本について、Alexa546-Pax5-BAC プローブと FITC 修飾 4 番染色体ペインティングプローブ (MXP4-Green, MetaSystems, ドイツ) を用いたハイブリダイゼーション (BAC-FISH) を行い、Metafer システムで撮影し、4 番染色体の *Pax5* を含む領域の転座や欠失を染色体観察により解析した。
- 6) BAC-FISH 法を応用した Flow-FISH の検討：実験系を確立するため、ハイブリダイゼーション溶液中のリンパ球へ X 性染色体用 FISH プローブを用いて、雌 (2 コピー) と雄 (1 コピー) マウス由来細胞の検出を行うことで条件の設定を試みた。
- 7) CRISPR-dCas9 を用いた Flow-FISH の検討：ヒト胎児腎細胞 HEK293 又はマウス脾臓細胞について実施した。テロメアの反復配列及び *Pax5* 遺伝子座内の配列を標的とする sgRNA を設計し、SNAP タグ及び核移行シグナル配列が修飾された dCas9 (New England Biolabs, Massachusetts) と複合体を形成し、導入試薬として Lipofectamine (ThermoFisher Scientific Japan, 東京) または Hilymax (同人科学研究所, 熊本) を用い、発色基質 SNAP-Cell-Star (New England Biolabs) により、蛍光発色した。一部実験条件では、Nuclear/Cytosolic Fractionation Kit (Cell Biolabs, California) を用いて核のみを単離してから、上記と同様に手法で発色を行った。

4. 研究成果

- 1) 解析用サンプルの単離保存：7 週齢の雌 B6C3F1 マウスに γ 線 4 Gy を照射し、30, 60 週齢（照射から 23, 53 週後）の骨髓・脾臓由来リンパ球（単核球）細胞を単離保存した。同時に、非照射マウスからもコントロール用の細胞を同様に単離保存した。60 週齢の照射マウス (n=2) は放射線誘発 B リンパ腫 (CD45R+) を発症したため、腫瘍細胞も得ることができた。また、一部細胞を用いて染色体標本作製した。
- 2) 照射後の染色体解析：照射・非照射マウス由来リンパ球の染色体標本について、Quinacrine/Hoechst 蛍光二重染色による Karyotype 解析を行った。30 週齢マウス由来の脾臓リンパ球において、4 番染色体の転座や欠失が照射により有意に増加することを確認し、放射線被ばくにより *Pax5* 欠失が発生することが示唆された。
- 3) 染色体標本について、Alexa546-Pax5-BAC プローブと FITC 修飾 4 番染色体ペインティングプローブを用いて BAC-FISH を行った結果、60 週齢の照射群で *Pax5* 領域の片アレルの中間欠失が 15% 程度観察されたが、非照射群では観察されなかった (図 3)。また、放射線誘発 B リンパ腫の細胞では、*Pax5* の欠失と 4 番染色体の転座がともに観察された。一方、BAC-FISH は細胞の分裂頻度や標本クオリティの影響を受けやすいことが分かり、本手法を用いた 1 遺伝子レベルでの欠失頻度の評価は難しいと判断した。
- 4) BAC-FISH 法を応用した Flow-FISH の検討として、スライドガラスへの細胞展開を行わず、液中の細胞への X 性染色体 BAC プローブを用いた FISH を試みたが、ハイブリダイゼーションの過程における約 80 °C の加熱および長時間の 37 °C インキュベーションにより細胞・核の形態維持が困難となるため、当初の目的の Flow cytometry による分析には適さないことが明らかになった。
- 5) CRISPR-dCas9 を用いた Flow-FISH の検討として、まず、テロメア及び *Pax5* を標的とするプローブ/sgRNA を作製し、Lipofectamine を用いて HEK293 へ導入した。導入には成功したが、非結合のプローブの洗浄が不十分であり、Foci の観察は難しかった。一方、同手法でマウス脾臓細胞へプローブの導入を試みたが、導入できなかった。
- 6) 次に、HilyMax を用いて、*Pax5* プローブを方法 3 の培地で分裂を行う脾臓リンパ球に導入し、核を単離後に発色したところ、脾臓細胞においてプローブシグナルと思われる foci を観察した (図 4)
- 7) 液体中の細胞への放射線誘発 B リンパ腫原因遺伝子の FISH を実施したが、本課題の期間ではスライドガラス上での *Pax5* プローブシグナルの観察にとどまった。今後、蛍光標識後の細胞が、Flow cytometry で解析可能か検証し、細胞処理条件のさらなる改善を継続する。

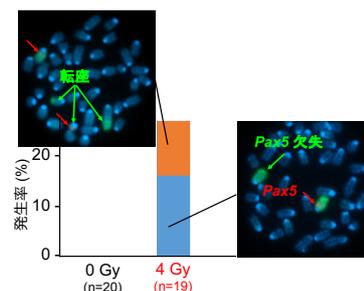


図 3. BAC-FISH を用いた照射マウスの 4 番染色体 (緑)、*Pax5* (赤) 解析

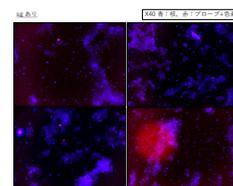


図 4. dCas9-FISH によるリンパ球の *Pax5* 標識 (赤) と DAPI による核染色 (青)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Tachibana Hirotaka, Daino Kazuhiro, Ishikawa Atsuko, Morioka Takamitsu, Shang Yi, Ogawa Mari, Matsuura Akira, Shimada Yoshiya, Kakinuma Shizuko	4. 巻 43
2. 論文標題 Genomic profile of radiation-induced early-onset mouse B-cell lymphoma recapitulates features of Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in humans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 693 - 703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgac034	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 橘 拓孝, 尚 奕, 鶴岡 千鶴, 砂押 正章, 吉田 光明, 飯塚 大輔, 臺野 和広, 森岡 孝満, 藤嶋 洋平, 今岡 達彦, 富田 雅典, 柿沼 志津子
2. 発表標題 マウスを用いた放射線被ばくによるPax5欠失リンパ球のがん化過程の解析
3. 学会等名 第3回若手放射線影響研究会, 日本放射線影響学会若手部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tachibana Hirotaka, Daino Kazuhiro, Morioka Takamitsu, Shang Yi, Tsuruoka Chizuru, Ishikawa Atsuko, Shimada Yoshiya, Kakinuma Shizuko
2. 発表標題 Dynamics of Pax5 deficient cells in B-cell lymphomagenesis in gamma-irradiated B6C3F1 mice
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kakinuma Shizuko, Yanagihara Hiromi, Nakayama Takafumi, Tachibana Hirotaka, Sunaoshi Masaaki, Daino Kazuhiro, Morioka Takamitsu, Tsuruoka Chizuru, Shang Yi, Imaoka Tatsuhiko, Shimada Yoshiya
2. 発表標題 Interstitial deletion is a radiation signature in tumors of various animal models
3. 学会等名 The 17th International Congress of Radiation Research (ICRR2023), International Association for Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋 拓孝, 臺野 和広, 尚 奕, 鶴岡 千鶴, 砂押 正章, 飯塚 大輔, 森岡 孝満, 松浦 彰, 今岡 達彦, 柿沼 志津子
2. 発表標題 遺伝子改変マウス用いた放射線誘発B-ALLの原因遺伝子の検証
3. 学会等名 第2回若手放射線影響研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋 拓孝, 臺野 和広, 吉田 光明, 尚 奕, 鶴岡 千鶴, 砂押 正章, 藤嶋 洋平, 飯塚 大輔, 森岡 孝満, 松浦 彰, 島田 義也, 柿沼 志津子
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying the development of preleukemic cells and subsequent rapid B-cell leukemogenesis by radiation exposure in mice
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 臺野 和広, 橋 拓孝, 石川 敦子, 鈴木 健之, 森岡 孝満, 今岡 達彦, 柿沼 志津子
2. 発表標題 Characteristic genetic abnormalities revealed by genomic analysis of radiation-induced cancer
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会 (JEMS) 第51回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋 拓孝
2. 発表標題 放射線によるマウスB細胞性リンパ腫・白血病の 発症メカニズム研究
3. 学会等名 令和4年東京RBC特別放談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橘 拓孝, 臺野 和広, 石川 敦子, 森岡 孝満, 鶴岡 千鶴, 尚 奕, 砂押 正章, 松浦 彰, 島田 義也, 柿沼 志津子
2. 発表標題 放射線誘発B細胞リンパ腫の分子発がんメカニズム解析
3. 学会等名 第58回日本アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橘 拓孝, 臺野 和広, 飯塚 大輔, 尚 奕, 鶴岡 千鶴, 砂押 正章, 森岡 孝満, 吉田 光明, 松浦 彰, 島田 義也, 柿沼 志津子
2. 発表標題 Analysis of the carcinogenic process of early-onset B-cell lymphoma in mice by radiation
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 橘 拓孝, 臺野 和広, 石川 敦子, 森岡 孝満, 尚 奕, 松浦 彰, 島田 義也, 柿沼 志津子
2. 発表標題 放射線誘発B細胞リンパ腫の分子発がんメカニズム解析
3. 学会等名 第1回放射線影響研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橘 拓孝, 臺野 和広, 石川 敦子, 森岡 孝満, 鶴岡 千鶴, 尚 奕, 砂押 正章, 松浦 彰, 島田 義也, 柿沼 志津子
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanisms of radiation-induced B-cell lymphomas by animal experiment
3. 学会等名 第58回日本アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tachibana Hirotaka, Daino Kazuhiro, Ishikawa Atsuko, Morioka Takamitsu, Shang Yi, Matsuura Akira, Shimada Yoshiya, Kakinuma Shizuko
2. 発表標題 Molecular signatures of radiation-induced mouse precursor B-cell lymphoma
3. 学会等名 International Symposium on the Environmental Dynamics of Radionuclides and Biological Effects of Low Dose-Rate Radiation (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究協力者	橋 拓孝 (Tachibana Hirotaka) (30985065)	一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・主任研究員 (82641)	
研究協力者	臺野 和広 (Daino Kazuhiro) (90543299)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線影響研究部,・上席研究員 (82502)	

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