

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02821

研究課題名(和文)放射線による染色体構造異常の形成機構の解明

研究課題名(英文)Study of the mechanisms of radiation-induced chromosome abnormalities

研究代表者

田代 聡 (Tashiro, Satoshi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：20243610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘発核内ドメインRAD51フォーカスについては、核膜裏打ち構造タンパク質の一つであるLaminBがRAD51の分解を抑制することでRAD51フォーカス形成を促進することなどを見出し、論文発表した。新しい生物学的線量評価法についての研究としては、放射線治療症例についてのFISH法などを用いた放射線被ばく影響の20年にわたる追跡調査の結果や心臓CTによるリンパ球DNA損傷のgammaH2AX免疫染色を用いた放射線影響評価などを報告した。超解像顕微鏡を用いた放射線誘発核内ドメインの動的構造解析では、放射線照射によりRAD51フォーカスの形が変わることなどを明らかにし、現在論文投稿中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have published papers concerning the mechanism of RAD51 focus formation involving nuclear proteins such as LaminB, a nuclear lamina related protein, after induction of DNA damage. I have also reported the result of the long time follow-up of a patient receiving radio-iodine treatment using cytogenetical analysis and estimation of radiation effect by a cardiac CT scan using immunofluorescence analysis using anti-gH2AX antibodies. I have also performed a dynamic structural analysis of radiation-induced nuclear domains using super-resolution microscopy. We found that the shape of RAD51 foci is changed by ionizing irradiation. We are now preparing a manuscript concerning the effect of ionizing radiation on the fine structure of radiation-induced nuclear domains.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線被ばく 損傷ゲノム 細胞核構造 ゲノム修復 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

原爆被ばく者では、被ばく後数年を経て悪性腫瘍の発症が認められるとともに、被ばく線量に相関して染色体転座や二動原体染色体などの染色体構造異常が認められることが知られている。白血病をはじめとする多くの悪性腫瘍には、疾患特異的な染色体異常が存在する。被ばく者の白血病では、複雑な染色体構造異常が認められることが知られている。染色体構造異常は、細胞増殖や分化の制御に係っている遺伝子の変異をもたらすことで、発がんに関与すると考えられている。このような染色体構造異常の一部には、染色体脆弱部位や免疫グロブリン遺伝子座など特定の染色体領域が関与していることが知られている。しかし、どのようなしくみで放射線被ばくにより染色体構造異常が形成されるか、という本質的な疑問については、未だ不明な点が多い。我々は、白血病の疾患特異的な染色体転座の切断点の解析から、転座切断点が生理的に DNA 組換え反応が起りやすい部位に存在することなどを明らかにしてきた。さらに、高度な技術と経験を要する染色体構造異常の解析を効率的に行うために、我々は染色体セントロメアとテロメアを可視化する PNA-FISH 法を開発した。PNA-FISH 法を用いることにより、従来困難であった大量のサンプルでの染色体構造異常の解析が可能となった。

放射線によるゲノム損傷は、細胞に備わったゲノム修復機構により損傷前の状態に修復される。しかし、DSBs の修復過程で切断端の「つなぎ間違い」が発生した結果、染色体構造異常が形成される。染色体構造異常の出現率は、DSBs の相同組換え修復で重要な RAD51 タンパク質の過剰発現でも、逆に発現抑制によっても上昇することが知られている。さらに、我々は、二次性白血病の疾患特異的な染色体転座の転座切断点集中領域に RAD51 が過剰に結合していることを見いだしている。これらの知見から、染色体構造異常の形成には RAD51 などのゲノム修復機構が深く関わっていることが明らかである。

RAD51 などの修復関連蛋白質は、ゲノム損傷部位に集積し「放射線誘発核内ドメイン」を形成する。DSBs の切断端も放射線誘発核内ドメインに含まれるので、放射線誘発核内ドメインは修復の「場」であるとともに、染色体構造異常が形成される「場」と考えることができる。このため、染色体構造異常の形成機構を理解するには、放射線誘発核内ドメインの構造構築を解析することが重要であると考えられる。

我々は、RAD51 がゲノム損傷部位に集積し RAD51 フォーカスを形成することなどを、世界に先駆けて報告した。さらに、RAD51 フォーカス形成には、クロマチン構造変化や SUMO 化蛋白質修飾システムが重要であることを報告している。

従来の光学顕微鏡では、解像度の限界のため 300 nm 以下の放射線誘発核内ドメインの内部構造や染色体 DNA が形成するクロマチン領域など微細な構造体の解析は困難であった。2014 年のノーベル化学賞の受賞で知られる超解像顕微鏡は、従来の顕微鏡の数倍の解像度を持つので、放射線誘発核内ドメインの内部構造や損傷クロマチンとの局在関連の詳細な解析が可能となった。そして、平成 26 年度には、我々の研究室には共通機器として超解像顕微鏡 ELYRA が設置された。

特定の染色体異常形成には、つなぎ間違われる切断端が隣接した位置関係にある必要がある。このため、染色体異常の形成機構を解明するためには、特定の染色体 DNA の位置関係の解析が重要である。従来、染色体 DNA の位置の解析には、特定の DNA 領域を蛍光色素で可視化する FISH 法が用いられていた。最近、次世代シーケンサーを用いて特定の染色体 DNA 領域の位置関係を網羅的に解析する Chromatin Conformation Capture (3C) 技術などが開発された。この手法を用いることで、特定の染色体 DNA 領域の位置関係の放射線被ばくによる変化について網羅的解析を行うとともに、FISH 法により得られたデータの検証を行うことが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射などによりゲノム損傷を誘導したヒト細胞を用いて、

- 1) 超解像顕微鏡を用いた放射線誘発核内ドメイン内部構造の解析
- 2) 3C 技術などを用いた染色体 DNA 位置関係の解析を行う。

これらの解析からゲノム修復機構や染色体 DNA 位置関係と染色体構造異常の関連について検討することで、放射線被ばくによる染色体構造異常の形成機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) 超解像顕微鏡を用いた放射線誘発核内ドメインの微細構造解析
超解像顕微鏡を用いて、正常ヒト培養細胞での放射線誘発核内ドメイン内部の微細構造の解析を行い、染色体構造異常形成に関わる放射線誘発核内ドメインの微細構造を同定する。

放射線による染色体構造異常形成と放射線誘発核内ドメインの関連を検討するために、まず放射線照射あるいは紫外線レーザーマイクロ照射法を用いてヒト正常培養細胞にゲノム損傷を誘導する。これらの細胞での染色体構造異常の形成を、PNA-FISH 法と染色体ペインティング FISH 法を用いて解析する。さらに蛍光免疫染色を行い、超解像顕微鏡を用いて gH2AX、ATM、53BP1、MRE11、RAD51 などが形成する放射線誘発核内ドメインの微細構造画像を取得し、画像解析ソフト Imaris を用いて定量的に解析する。解析のパラメー

ターには、放射線誘発核内ドメインの数、大きさ、シグナル強度、クロマチン領域および他の放射線誘発核内ドメインとの局在関連を用いる。同様の実験をヒト末梢血リンパ球について行うことで、培養細胞を用いて得られたデータの検証を行う。

ゲノム修復因子の染色体異常形成への関与を検討するために、ATM、ATR、Ku70/80、DNA-PKsc、MRE11、RAD51 や SUMO 化修飾酵素などゲノム修復に関連する蛋白質について薬剤や siRNA を用いた発現抑制による機能抑制を行い、染色体異常形成への影響を PNA-FISH 法と染色体ペインティング FISH 法などを用いて検討する。次いで、これらの細胞における放射線誘発核内ドメイン内部構造の定量的解析を行い、放射線誘発核内ドメインの構造構築と染色体構造異常の形成についての関連を検討する。

超解像顕微鏡は、最新の光学顕微鏡システムであり未だ非常に調整が難しい顕微鏡なので、研究の進行が予想より遅れる可能性がある。平成 25 年度後半に、全学共通機器として ELYRA とは異なるタイプの超解像顕微鏡 (OMX version4, GE) が、国内で初めて原医研に隣接するビルに設置されている。OMX も併用して研究を遂行することで、研究の効率化をはかる。

さらに OMX では、現在我々が使用している ELYRA より高速な超解像画像が取得可能であるため、生細胞を用いた超解像画像解析が可能である。そこで、ゲノム損傷誘導後に放射線誘発核内ドメインが形成される過程や、放射線誘発核内ドメイン内外での関連タンパク質の動態について、生細胞を用いた定量的解析を行う。固定細胞を用いた実験のデータと生細胞実験から得られたデータを総合して解析することで、染色体異常形成に関与する放射線誘発核内ドメインの構造構築について、様々な角度から検討することが可能となる。

2) 染色体 DNA 核内位置情報の解析

3C 技術では、既知の 2 つの染色体 DNA 領域について位置関係の解析が可能であり、この手法をもとに多領域間や未知の染色体領域間の位置関係を解析することが可能な 4C、5C、6C 法など、いわゆる HiC 技術が開発されている。

放射線被ばくによる染色体 DNA 領域の位置関係の変化については、ほとんど知られていない。そこで、さまざまな疾患の染色体転座切断点集中領域、染色体脆弱部位や免疫グロブリン遺伝子座など特定の染色体 DNA 領域について、放射線による位置関係の変化を定量的に検討するため、従来から用いられている FISH 法による特定の染色体 DNA 領域の可視化とともに、次世代シーケンサーを用いた 3C をはじめとする HiC 技術による解析を行う。

3) 放射線被ばくの新しい線量評価法の確

立

緊急被ばく医療での生物学的線量評価法としては、二動原体染色体の解析がゴールドスタンダードとされている。しかし、従来のギムザ染色による二動原体染色体の解析は、分裂期細胞を用いるため最低 2 日間の細胞培養をする必要があり、また非常に高度な技術と経験を必要とするため、特定の研究室、検査室のみで実施可能である。そこで、被ばく線量と放射線誘発核内ドメインの内部構造や染色体 DNA 位置関係の相関について解析を行い、細胞培養を必要としない分裂間期細胞を用いた効率的な生物学的線量評価法の確立に取り組む。

4. 研究成果

超解像顕微鏡を用いた放射線誘発核内ドメインの動的構造解析を行ったところ、放射線照射細胞では代表的な放射線誘発核内ドメインとして知られている RAD51 フォーカスの形が変わること、損傷ゲノムの一部は RAD51 がもともと集積していた場所に移動すること、などを明らかにすることができた。これらの研究成果については、現在論文投稿中である。

放射線誘発核内ドメイン RAD51 フォーカスについては、核膜裏打ち構造タンパク質の一つである LaminB が RAD51 の分解を抑制することで RAD51 フォーカス形成を促進すること (文献 14)、細胞質核間輸送関連因子 hCAS/CSE1L が、RAD51 の細胞内分布を制御することにより、RAD51 フォーカス形成の抑制的制御からゲノム修復活性を制御すること (文献 13) を、損傷部位での RAD51 フォーカス形成を促進することで相同組換え修復を制御するヒストン H2A.Z-2 の損傷部位での交換反応が、タンパク質翻訳後修飾の一つである SUMO 化修飾により制御されていること (文献 3) などを見出し、論文発表した。さらに、損傷シグナル因子 ATM キナーゼによるクロマチン再構成因子複合体の活性制御により、損傷クロマチンへの適切な RAD51 の結合を調節していることを明らかにした。この研究成果については、現在論文のリバイス中である。さらに、RAD51 タンパク質複合体に含まれる細胞核構造構築に関連する因子が、RAD51 の機能制御を介して染色体異常形成の抑制に関与していることを見出し、現在論文投稿準備中である。

HiC 技術を用いた染色体 DNA 核内位置情報の解析については、現在ゲノム損傷誘導後の特定の染色体領域の位置関係について検討を進めているところである。

新しい生物学的線量評価法についての研究としては、放射線治療症例についての FISH 法などを用いた放射線被ばく影響の 20 年にわたる追跡調査の結果 (文献 9) や心臓 CT によるリンパ球 DNA 損傷の gammaH2AX 免疫染色を用いた放射線影響評価 (文献 6) などを報告した。

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 14件)

Exploration of genetic basis underlying individual differences in radiosensitivity within human populations using genome editing technology. Miyamoto T, Akutsu SN, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. *J Radiat Res.* 査読有. 2018 Mar 8. ii75-ii82.
DOI:10.1093/jrr/rry007.

Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. Shi L, Tashiro S. *J Radiat Res.* 査読有. 2018 Mar 6. ii121-ii129.
DOI:10.1093/jrr/rry006.

SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites. Fukuto A, Ikura M, Ikura T, Sun J, Horikoshi Y, Shima H, Igarashi K, Kusakabe M, Harata M, Horikoshi N, Kurumizaka H, Kiuchi Y, Tashiro S. *Nucleus.* 査読有. 2018 Jan 1;9(1):87-94.
DOI:10.1080/19491034.2017.1395543.

Relative Biological Effectiveness of Neutrons Derived from the Excess Relative Risk Model with the Atomic Bomb Survivors data Managed by Hiroshima University. Satoh K, Yasuda H, Kawakami H, Tashiro S. *Radiat Prot Dosimetry.* 査読有. 2017 Sep 23:1-5.
DOI:10.1093/rpd/ncx173.

Evaluation of ATM heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells. Royba E, Miyamoto T, Natsuko Akutsu S, Hosoba K, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. *Sci Rep.* 査読有. 2017 Jul 20;7(1):5996.
DOI:10.1038/s41598-017-06393-8.

DNA damage in lymphocytes induced by cardiac CT and comparison with physical exposure parameters. Fukumoto W, Ishida M, Sakai C, Tashiro S, Ishida T, Nakano Y, Tatsugami F, Awai K. *Eur Radiol.* 査読有. 2017 Apr;27(4):1660-1666.
DOI:10.1007/s00330-016-4519-8.

A New Application of the Phase-field Method for Understanding the

Reorganization Mechanisms of Nuclear Architecture. Seirin Lee A, Tashiro S, Awazu A, Kobayashi R. *Journal of Mathematical Biology.* 査読有. 2017 Jan;74(1-2):333-354.
DOI: 10.1007/s00285-016-1031-3

Antagonizing effect of CLPABP on the function of HuR as a regulator of ARE-containing leptin mRNA stability and the effect of its depletion on obesity in old male mouse. Nishino T, Matsunaga R, Jikihara H, Uchida M, Maeda A, Qi G, Abe T, Kiyonari H, Tashiro S, Inagaki-Ohara K, Shimamoto F, Konishi H. *Biochim Biophys Acta.* 査読有. 2016 Nov;1861(11):1816-1827.
DOI:10.1016/j.bbali.2016.09.006.

Cytogenetic effects of radioiodine therapy: a 20-year follow-up study. Livingston GK, Khvostunov IK, Gregoire E, Barquinero JF, Shi L, Tashiro S. *Radiat Environ Biophys.* 査読有. 2016 May;55(2):203-13.
DOI:10.1007/s00411-016-0647-4.

Enhanced gefitinib-induced repression of the epidermal growth factor receptor pathway by ataxia telangiectasia-mutated kinase inhibition in non-small-cell lung cancer cells. Misumi K, Sun J, Kinomura A, Miyata Y, Okada M, Tashiro S. *Cancer Sci.* 査読有. 2016 Apr;107(4):444-51.
DOI:10.1111/cas.12899.

Relaxed Chromatin Formation and Weak Suppression of Homologous Pairing by the Testis-Specific Linker Histone H1T. Machida S, Hayashida R, Takaku M, Fukuto A, Sun J, Kinomura A, Tashiro S, Kurumizaka H. *Biochemistry.* 査読有. 2016 Feb 2;55(4):637-46.
DOI:10.1021/acs.biochem.5b01126.

Common Variant Near HEY2 Has a Protective Effect on Ventricular Fibrillation Occurrence in Brugada Syndrome by Regulating the Repolarization Current. Nakano Y, Ochi H, Onohara Y, Toshishige M, Tokuyama T, Matsumura H, Kawazoe H, Tomomori S, Sairaku A, Watanabe Y, Ikenaga H, Motoda C, Suenari K, Hayashida Y, Miki D, Oda N, Kishimoto S, Oda N, Yoshida Y, Tashiro S, Chayama K, Kihara Y. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 査読有. 2016 Jan;9(1):e003436.
DOI:10.1161/CIRCEP.115.003436.

hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. Okimoto S, Sun J, Fukuto A, Horikoshi Y, Matsuda S, Matsuda T, Ikura M, Ikura T, Machida S, Kurumizaka H, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y, Kiuchi Y, Tashiro S. *Genes Cells*. 査読有. 2015 Sep;20(9):681-94. DOI:10.1111/gtc.12262.

Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. Liu NA, Sun J, Kono K, Horikoshi Y, Ikura T, Tong X, Haraguchi T, Tashiro S. *FASEB J*. 査読有. 2015 Jun;29(6):2514-25. DOI:10.1096/fj.14-265546.

[学会発表](計 20件)

田代 聡, Nuclear topography of homologous recombinational repair, The 3rd Hiroshima International Symposium on Future Science "Frontiers in Bioimaging Based Life Science"2018

田代 聡, 細胞核高次構造によるゲノム修復機構の制御, 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会), 2017

田代 聡, Nuclear Topography of homologous recombinational repair, Friedrich Miescher Institute (FMI) セミナー, 2017

田代 聡, Medical radiation exposure and DNA damage, 第45回日本放射線技術学会秋季学術大会 (ICRST), 2017

田代 聡, Enhanced gefitinib-induced repression of the EGFR pathway by ATM kinase inhibition in non-small-cell lung cancer cells, 第76回日本癌学会学術総会, 2017

田代 聡, 学協会連携による放射線防護の協働研究イニシアティブ, 日本保健物理学会第50回研究発表会・日本放射線安全管理学会第16回学術大会 合同大会, 2017

田代 聡, Nuclear topography of DNA repair, 4D Nuclome The Cell Nucleus in Space and Time, 2017

田代 聡, Radiation, chromosome and FISH, IAEA・HICARE協働センターによる先進的放射線治療に関する国際医療研修,

2017

田代 聡, Nuclome Analysis of DNA repair, 第39回日本分子生物学会年会, 2016

田代 聡, 細胞のロバストネスを規定するタンパク質複合体のダイナミクス, 第89回日本生化学会大会, 2016

田代 聡, Cytogenetic effects of radioiodine therapy and CT scan -Application of biodosimetry to medicine-, IAEA-Consultants Meeting on Clinical applications of biodosimetry and BIODOSE/RADBIOLab concept, 2016

田代 聡, Nuclear Topography of Homologous Recombinational Repair, Cancer Institute of New Jersey セミナー, 2016

田代 聡, Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage, Nuclear Organization & Function, 2016

田代 聡, CT scan-induced DNA damage in children measured using molecular markers and nanoscope technology, 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2016

田代 聡, 放射線誘発核内ドメインの構造構築, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB 2015), 2015

田代 聡, Regulation of homologous recombinational repair by nuclear structure-associated proteins, 第74回日本癌学会学術総会, 2015

田代 聡, Biological estimation of DNA damage induced by CT scan - Application of biodosimetry to medicine -, IAEA/NIRS 合同テクニカルミーティング, 2015

田代 聡, Regulation of DNA Repair and Nuclear Lamina, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 2015

田代 聡, Nuclear Topography of Homologous Recombinational Repair, 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015), 2015

田代 聡, Biological Estimation of the DNA Damage Induced by CT Scan, 15th

International Congress of Radiation
Research (ICRR 2015), 2015

研究者番号：00719429

〔図書〕(計 1件)

CTにおける被ばくの生物学的影響
福本 航、石田万理、田代 聡
最新 Body CT 診断 84-90
編集 粟井和夫、陣崎雅弘
2018年 メディカル・サイエンス・インター
ナショナル社

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()

〔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〕

和文雑誌(計 2件)

放射線災害と子ども. 田代 聡. 小児内
科 2018 50:411-413

ヌクレオームコンソーシアム. 田代 聡、
木村 宏. 生物物理 2018

講演(計 2件)

田代 聡, 平成 29 年度原子爆弾被爆者
指定医療機関当医師研究会 講演 「放射
線被ばくの健康影響とそのメカニズム」
2018

田代 聡, 医療放射線被ばくと染色体,
染色体学会年会の市民公開講座「広島
の地で考える、高・低線量放射線の被ばくと
染色体解析の意味」2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

田代 聡 (TASHIRO, Satoshi)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：20243610

(2)研究分担者

堀越 保則 (HORIKOSHI, Yasunori)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教