

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710069

研究課題名（和文）放射線照射条件と細胞に依存した細胞応答とゆらぎ機構によるp53機能の解析

研究課題名（英文）The analysis of cell-type specific cellular responses under different irradiation conditions and dynamic regulation of p53 functions

研究代表者

河合 秀彦（KAWAI HIDEHIKO）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30379846

研究成果の概要（和文）：

hiPS 細胞を含む様々なヒト由来培養細胞を低～中線量率（10-1000 mGy/day）の $\gamma$ 線照射下で培養し、細胞の種類や照射線量率に依存した細胞応答現象とその分子機構を解析した。持続的放射線照射環境と次世代シーケンサや全自動画像解析装置などの革新的な網羅的解析を組み合わせた研究によって、細胞の持つ多様なゲノム安定性維持機構と新しい p53 依存的な細胞応答の分子機構が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Various types of human cultured cells, including induced pluripotent stem cells (hiPSCs), were cultured under chronic gamma-irradiation at low and middle dose-rates (10-1000 mGy/day). The cell-type specific cellular responses of these cells to irradiation and the underlying molecular mechanisms were analyzed to examine their dose-rate-dependence. A combination of chronic irradiation culture conditions and advanced high-throughput techniques, such as the next generation sequencing system and an automated image analyzing system, could reveal a variety of cellular systems for the maintenance of the genomic integrity and the molecular mechanisms of p53-dependent cellular responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：応答、p53、照射線量率、iPS 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

2006年に発表されたiPS細胞は、幹細胞や発生分化の研究、疾患治療や創薬研究、そして再生医療の現場にと、将来的に人類に対して大きく貢献するものと期待されている（Cell, 2006,126(4):663-76）。現時点では、その臨床応用に関しては、リプログラミングの手法、分化誘導技術、安全性などの課題は抱えてはいるものの、多くの研究者によって

精力的に研究が行われており、今後の成果に期待されている。

そうした中で、iPS細胞のリプログラミングについて、がん抑制因子p53の活性化がその障壁となっている事が報告された（Nature, 2009, 460:1132-5, 1136-9, 1140-4, 1145-8, 1149-53., Genes Dev., 2009, 23:2134-9, Genes Dev., 2010, 24:561-73）。障壁としてのp53の意義やその活性化機構については不明

な点が多いが、リプログラミングの過程だけでなく、iPS 化された細胞や iPS 細胞からの分化誘導過程、そして分化させた細胞における p53 の機能と制御機構を解明する事は、臨床応用に用いられるそれぞれの細胞のゲノム安定性維持機構の解明、そして最終的には、細胞のゲノム安定性を人工的に維持すると言った技術の開発に貢献するものと考えられる。

申請者は、ゲノム安定性維持機構としての多様な細胞応答現象の分子機構を明らかにすることを目的として、放射線照射による p53 の機能変化とその分子機構の解析を中心に研究を行ってきた。生体を構成する様々な細胞は、細胞の生命活動に伴って生じる内因性の DNA 損傷、或いは放射線被ばくなどによる外因性の DNA 損傷に対して、生体のゲノム安定性を維持する為に、細胞周期進行調節、細胞老化、アポトーシスなどの細胞応答機構を備えている。p53 は、こうした細胞応答機構に共通して機能している事から“ゲノムの守護神”と称され、その機能解析はこれまでも詳細に行われてきた。申請者は、p53 と負の feedback loop を形成する Murine Double Minute 2 (MDM2) E3 ユビキチン化酵素と Murine Double Minute X (MDMX) に注目し、それらが構成する複合体の放射線で生じた DNA 損傷に対する応答性と機能の解析を行ってきた。これまでの研究から、放射線照射による細胞内での DNA 損傷応答 (DDR) が、“ゆらぎ”を持った MDM2/MDMX 複合体機能に変化を誘導する事で、p53 の安定性と機能を制御し、細胞応答現象の決定に関与している事を明らかにしてきた。また、様々な細胞に対する低 LET 放射線の線量率効果に関する研究の中で、持続的なγ線照射条件下で細胞を培養した場合には、線量率と細胞の種類に依存して異なる細胞応答が誘導され、その細胞応答に MDM2/MDMX-p53 経路が深く関与している事を明らかにしてきた (図 1)。

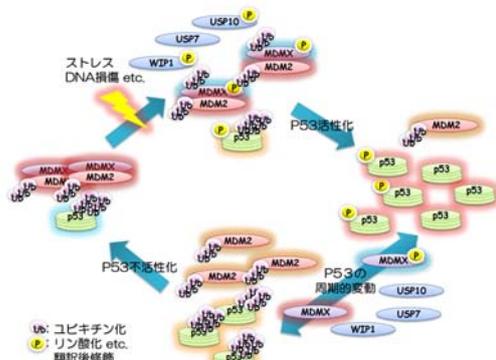


図1 MDM2/MDMXによるP53の周期的変動による活性化制御モデル

また、Knudson らは、細胞が増殖する正常な代謝活動状態においては、1日あたり 3 Gy の低 LET 放射線被ばく相当の酸化的 DNA

損傷と一本鎖 DNA 切断、また、細胞周期の進行に依存して 1.5 Gy 相当の二重鎖 DNA 切断と言った内因性の DNA 損傷が生じていると報告している (P. N. A. S., 2003, 100:12871-6, P. N. A. S., 2006, 103:17874-9)。細胞内で日常的に生じる内因性 DNA 損傷量に加えて、低 LET 放射線照射によって持続的に DNA 損傷量が増加した結果として、線量率依存的に MDM2/MDMX-p53 機能の“ゆらぎ”に変化が誘導され、細胞の運命決定が行われている可能性があると考えられる。

これらのことから、iPS 細胞が細胞増殖する上で、日常的にも生じている DNA 損傷と p53 の役割とその活性化機構の詳細を解析することは極めて重要なことであると考えられ、本研究課題を始める背景となった。

## 2. 研究の目的

本申請研究課題では、これまでの申請者の研究を基に、iPS 細胞の放射線応答機構と MDM2/MDMX-p53 経路の機能解析、及び持続的な放射線照射培養条件下での p53 の機能解析と網羅的な遺伝子発現解析を行う事により、iPS 細胞を含む様々な細胞の DDR-p53 経路の活性化機構とゲノム不安定性に対する細胞応答機構の分子機構を解明する事を目的の一つとした。また、ヒトの様々な組織由来の細胞を用いて、一過性の高線量率放射線照射と持続的な低-中線量率放射線照射培養条件下に対する細胞応答機構を、分子生物学的・生化学的に解析する事により、細胞の種類と放射線照射の線量・線量率に依存した細胞応答機構の存在を明らかにすると共に、それぞれの細胞応答機構における p53 の機能解析と Genome Analyzer を用いた網羅的解析を行う事で、DNA 損傷誘導量と細胞の種類に依存したゲノム安定性維持の分子メカニズムを統合的に明らかにすることを最終的な目的とした。

## 3. 研究の方法

iPS 細胞を含む異なる組織由来のヒト培養細胞を用いて、一過性の高線量率放射線照射及び持続性の低-中線量率放射線照射培養下での DDR と細胞応答を p53 機能解析及び Genome Analyzer を用いた網羅的解析を以下の (1) ~ (5) の課題に注目して、解析を行った。

(1) 細胞の種類に依存した p53 の安定性制御の分子機構解析

siRNA や人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子破壊により、p53 の安定性制御機構とその“ゆらぎ”について解析した。

(2) 放射線照射に対する p53 の修飾及び転写機能の解析

放射線照射による p53 のリン酸化などの修飾と“ゆらぎ”に依存した転写標的因子の動態を解析した。

(3) アポトーシスと細胞周期制御機構における p53 の機能解析

siRNA や人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子破壊手法を用いて、放射線照射後の p53 の“ゆらぎ” 依存的なアポトーシス機構を解析した。

(4)  $\gamma$  線照射と紫外線照射に対する細胞応答の比較解析

異なる細胞種間での、 $\gamma$  線照射と紫外線照射に対する細胞応答性の違いについて検討した。

(5) Genome Analyzer を用いたトランスクリプトーム解析

次世代シーケンサによる mRNA シークエンスによって、放射線照射に依存して生じる DNA 損傷量と細胞内のシグナル伝達経路に関する解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞の種類に依存した p53 の安定性制御の分子機構解析

細胞の由来組織や分化段階に依存して、p53 によって活性化されるシグナルが異なり、その役割が細胞周期制御、アポトーシス制御、細胞老化制御など明らかに異なることが、明らかとなった。

(2) 放射線照射に対する p53 の修飾及び転写機能の解析

放射線照射による p53 のリン酸化などの修飾と“ゆらぎ” は、細胞種と放射線照射によって異なることが明らかとなった。“ゆらぎ” の変化は、細胞種と DNA 損傷量とその誘発頻度に依存し、それらはそれぞれの細胞種に依存した MDM2/MDMX 複合体と HAUSP、ATM/WIP1 シグナルのバランスによって制御されることが明らかとなった。

(3) アポトーシスと細胞周期制御機構における p53 の機能解析

p53 の機能は、細胞種に特に依存することが明らかとなった。細胞種間でその発現パターンの変化が観察されなくとも、その下流因子の発現パターンが大きくことなり、細胞の由来組織や分化程度によるエピゲノムの違いが細胞の運命決定に必要であることが示唆された。

(4)  $\gamma$  線照射と紫外線照射に対する細胞応答の比較解析

細胞種で  $\gamma$  線照射と紫外線への応答性の違いが異なるものと、変わらないものが存在することが明らかとなった。特に iPS 細胞などの未分化細胞では、 $\gamma$  線照射と紫外線照射では細胞の応答性が全く異なることが明らかとなり、p53 の役割も異なることが明らかとなった。

(5) Genome Analyzer を用いたトランスクリプトーム解析

放射線照射に依存して生じる DNA 損傷量と細胞内のシグナル伝達経路は、DNA 損傷

量誘発の頻度に依存するし、それぞれの DNA 損傷量誘発頻度による遺伝子発現変化と細胞応答機構が存在することが明らかとなった。

様々な組織由来の培養細胞株や、ヒト正常線維芽細胞と同細胞から樹立した iPS 細胞を用いて、放射線照射によって誘発される細胞応答現象とその分子機構の解析を MDM2/MDMX-p53 経路の解析を中心に行った。その研究過程で、iPS 細胞を含む正常な p53 を有する様々な細胞に高線量率で  $\gamma$  線を照射し、それらの細胞応答を解析したところ、全ての細胞において照射線量依存的な DDR 因子の活性化や dynamics の変化が生じ、それに伴う MDM2/MDMX-p53 経路の“ゆらぎ” の変化による活性化が検出された。大変興味深い事に、iPS 細胞では照射線量に依存して、G1 期細胞の速やかな消失や DNA 複製の遅延など、特異的な細胞応答が誘導されるという新たな知見が明らかとなった。また、iPS 細胞は、紫外線照射に対して高いアポトーシス感受性を示した。こうした結果は、iPS 細胞が DNA 損傷に対し、独自の DDR と細胞応答機構を持つ事を示唆した。

また、iPS 細胞を含む様々な細胞を低-中線量率 (10-1000 mGy/day) の低 LET 放射線照射環境下で培養し、細胞の種類や照射線量率に依存した細胞応答現象とその分子機構の解析を行った。本研究により樹立された細胞と Genome Analyzer の解析データを用いて、異なる種類の細胞と様々な線量率に依存した細胞の応答機構の解析を行った。iPS 細胞の放射線応答機構の解析を進めると共に、トランスクリプトームのデータ解析を行い、RT-PCR などを用いて p53 の機能を検証した。発現パターンの変化の解析から、線量率依存的な放射線細胞応答機構とその経路を同定することができた。

本研究の解析によって、本研究課題の目的であった細胞種と DNA 損傷誘発頻度に依存した新しいゲノム安定性維持機構が明らかとなった。異なる細胞種による異なるゲノム安定性維持機構の存在が明らかとなったことで、今後、新しい研究領域の展開が期待される。

#### 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 5 件)

- ① Iizuka, D., Imaoka, T., Nishimura, M., Kawai, H., Suzuki, F., Shimada, Y. Aberrant microRNA expression in radiation-induced rat mammary cancer: the potential role of miR-194

overexpression in cancer cell proliferation. Radiat Res. 2013 Feb;179(2):151-159. (査読有)

- ② Masuda, Y., Suzuki, M., Kawai, H., Hishiki, A., Hashimoto, H., Masutani, C., Hishida, T., Suzuki, F., Kamiya, K. En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. Nucleic Acids Res. 2012 Nov 1;40(20):10394-10407. (査読有)
- ③ Katayama, H., Wang, J., Treekitkarnmongkol, W., Kawai, H., Sasai, K., Zhang, H., Wang, H., Adams, HP., Jiang, S., Chakraborty, SN., Suzuki, F., Arlinghaus, RB., Liu, J., Mobley, JA., Grizzle, WE., Wang, H., Sen, S. Aurora kinase-A inactivates DNA damage-induced apoptosis and spindle assembly checkpoint response functions of p73. Cancer Cell. 2012 Feb 14;21(2):196-211. (査読有)
- ④ Masuda, Y., Suzuki, M., Kawai, H., Suzuki, F., Kamiya, K. Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex. Nucleic Acids Res. 2012 Feb;40(3):1065-1076. (査読有)
- ⑤ Huang, L., Yan, Z., Liao, X., Li, Y., Yang, J., Wang, ZG., Zuo, Y., Kawai, H., Shadfan, M., Ganapathy, S., Yuan, ZM. The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108(29):12001-12006, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 河合秀彦、Comprehensive analysis of cellular responses to chronic  $\gamma$ -irradiation、3rd International Symposium of RIRBM、2013 年 02 月 13 日、広島市
- ② 河合秀彦、The role of p53 in human iPS cells in the cellular response to DNA-damage、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡市
- ③ 河合秀彦、異なる線量率の  $\gamma$  線照射下での細胞応答の多次元解析、日本放射線影

響学会第 55 回大会、2012 年 09 月 08 日、仙台市

- ④ 河合秀彦、慢性的な放射線照射に対する細胞応答機構の解析、第 37 回中国地区放射線影響研究会、2012 年 07 月 27 日、広島市
- ⑤ 河合秀彦、 $\gamma$  線の照射環境下での細胞応答の線量率依存性の解析、日本放射線影響学会第 54 回大会、2011 年 11 月 19 日、神戸市
- ⑥ 河合秀彦、恒常的な放射線照射に対する細胞応答の線量率依存性の解析、第 52 回原子爆弾後障害研究会、2011 年 06 月 05 日、広島市

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河合 秀彦 (KAWAI HIDEHIKO)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
研究者番号：30379846

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：