

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651051

研究課題名(和文)放射線によるテロメア脆弱化を介した遅延性染色体組換えメカニズム

研究課題名(英文)The mechanism for delayed chromosome rearrangements mediated by radiation-induced telomere instability

研究代表者

児玉 靖司(KODAMA, Seiji)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00195744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、放射線によるテロメア脆弱化と遅延性染色体組換えとの関係を探るために行った。その結果、0.5Gy以上のX線被ばくにより、テロメアFISHで検出されるテロメアシグナル数増加異常が線量依存的に誘発されることが明らかになった。これに対し、シグナル数減少異常は、X線被ばくによる影響はみられなかった。一方、被ばくヒト染色体の移入実験から、2Gy以上のX線を被ばくしたヒト染色体は、被ばくしていないマウス細胞内で遅延性に組換えを起こす頻度が有意に高くなることが明らかになった。これらの結果は、放射線被ばくによるテロメア脆弱化と遅延性染色体組換え誘発との関係を探るための有力な糸口を提供している。

研究成果の概要(英文)：We studied the relationship between telomere instability and delayed chromosome rearrangements, both of which are induced by ionizing radiation. The result revealed that the gain of telomere signals detected by telomere FISH was induced dose-dependently in cells exposed to more than 0.5 Gy of X-rays. In contrast to this, the loss of telomere signals was not significantly induced by X-irradiation. The chromosome transfer experiments demonstrated that a human chromosome exposed to more than 2 Gy of X-rays showed a significantly increased frequency of delayed chromosome rearrangements in unirradiated mouse cells. These results provide an important cue to understand the mechanism for radiation-induced delayed chromosome rearrangements possibly related to telomere instability.

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：生物影響 テロメア

1. 研究開始当初の背景

がんの進展に必要な突然変異的進化を促進するのに、ゲノム不安定化が重要な役割を果たす証拠はこれまでに数多く蓄積されてきた。しかしながら、このゲノム不安定化を放射線によるヒトでの発がんリスク推定に適用するまでには、その誘発機序に関するさらなる情報が必要である。応募者はこれまでに、放射線被ばくにより、遅延的な染色体組換え頻度が上がることを確認しているが、そのメカニズムは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、被ばく染色体を被ばくしていない細胞内に移入して、被ばく後、遅延性に見られる染色体組換えに關与する因子を明らかにし、そのメカニズムを探ることである。特に、被ばく染色体のテロメア脆弱化と染色体組換えとの関係について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞

染色体移入実験には、染色体ドナー細胞として、ヒト 8 番染色体を 1 本含有したマウス A9 細胞、また、レシピエント細胞として核型が安定で近 2 倍体であるマウス m5S 細胞を用いた。一方、放射線によるテロメア脆弱化を調べる実験では、マウス胎児線維芽細胞を用いた。

(2) 染色体移入

染色体移入は、微小核融合法を用いて行った。マウス A9 細胞にコルセミドを 48 時間処理して染色体 1~2 本含む微小核を形成し、これをポリエチレングリコールを用いてレシピエント細胞に融合し、細胞内に移入した。ヒト 8 番染色体には、プラスチジン S (BS) に対する耐性遺伝子が挿入されているため、BS (3 µg/ml) を培地に添加して、ヒト 8 番染色体が移入されたレシピエント細胞を選択し単離した。単離細胞を増殖させて染色体不安定化をヒト染色体を標的とした全染色体蛍光プローブを用いた FISH (WCP-FISH) 法で解析した。

(3) テロメア脆弱化の指標

テロメア脆弱化の指標として、テロメアシグナル数の異常に着目し、これを定量化した。テロメアシグナルは、蛍光色素でラベルしたテロメアプローブを用いたテロメア FISH 法を用いて検出した。

(4) X 線照射の条件

X 線照射は、軟 X 線照射装置 (OM-B205; Ohmic) を用い、70kvp, 5mA, 0.5mm Al フィルターの条件下、線量率 0.66 Gy/min で照射した。染色体移入では、単離した微小核に照射し、直後にレシピエント細胞に移入した。テロメア脆弱化試験では、X 線照射 2 時間後に染色体標本を作製し、テロメアシグナルを定量化した。

4. 研究成果

(1) 放射線によるテロメア脆弱化

X 線被ばくによるテロメア脆弱化を検出し、定量化する実験系の確立を目指した。テロメア反復配列を標的としたテロメア FISH を用いると、通常 1 本の染色体上に 4 個のドット状のテロメアシグナルが検出される。テロメア構造に何らかの異常が生じた場合、シグナル数の異常が見られると予想される (図 1)。

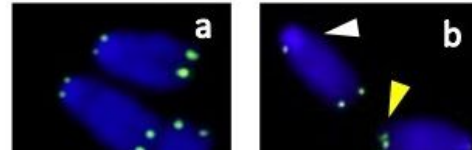


図 1 テロメアシグナルの検出 a, 正常なテロメアシグナルは、染色体当たり 4 個検出される。b, シグナル異常として、シグナル増加 (黄矢印) とシグナル消失 (白矢印) を数えた。

そこで、ICR マウス胎児線維芽細胞を用いて、X 線被ばくによるテロメアシグナル異常について調べた。細胞周期 G2 期の細胞に、0.5Gy, 1Gy の X 線を照射し、直後の分裂期でテロメア FISH によりテロメアシグナル異常を解析した。その結果、染色体当たりのシグナル数増加頻度は、0Gy, 0.5Gy, 1Gy の X 線線量に依存して、それぞれ 0.051 ± 0.005 , 0.21 ± 0.021 , 0.34 ± 0.016 と有意に増加した ($p < 0.001$, カイ二乗検定)。一方、染色体当たりのシグナル消失頻度は、0Gy, 0.5Gy, 1Gy の X 線線量について、それぞれ 0.032 ± 0.003 , 0.038 ± 0.003 , 0.036 ± 0.004 であり、有意差は見られなかった。以上の結果は、テロメアシグナル増加は、X 線被ばくによって増加するが、シグナル消失は X 線被ばくの影響を受けないことを示している。それぞれのシグナル異常の分子的基盤は未だ不明であるが、本研究により、0.5Gy 程度の X 線被ばくにより、何らかのテロメア構造異常が生じていることが明らかとなった。この異常がテロメア脆弱化を引き起こす可能性が示唆される。

(2) 被ばく染色体の不安定化

染色体移入実験により、X 線による遅延性染色体組換えについて解析した。ヒト 8 番染色体を含有したマウス A9 細胞にコルセミドを 48 時間処理して微小核を形成させ、単離して X 線を照射後直ちにレシピエントのマウス m5S 細胞に移入した。ヒト 8 番染色体が移入された細胞をプラスチジン S 耐性で選択し、X 線非照射染色体移入細胞を 10 種、2Gy、及び 4Gy 照射染色体移入細胞をそれぞれ 10 種、及び 5 種分離した。X 線被ばくにより生じた染色体損傷は、微小核内では修復されず、レシピエント細胞に移入された後に修復されると想定される。その際に、遅延性に染色体不安定化が惹起されるか否かを調べた。そ

の結果、X線非照射、2Gy照射、及び4Gy照射染色体移入100細胞当たりの平均遅延性染色体異常数は、 1.2 ± 1.2 、 2.6 ± 1.5 、及び 6.8 ± 3.8 であった。X線非照射細胞群に比べて、2Gy照射群 ($p=0.0242$)、及び4Gy照射群 ($p=0.0083$, Mann-Whitney U-test) とともに有意に異常頻度が上がることが明らかとなった。検出された染色体異常には、被ばくヒト染色体自身の異常に加えて、無傷のマウス染色体との複雑な転座も含まれていた(図2)。

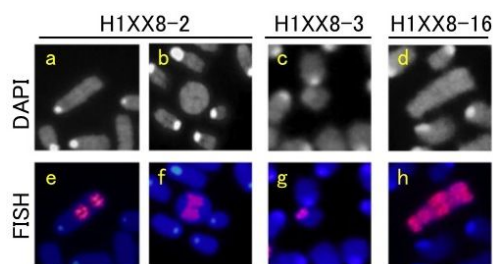


図2 レシピエント細胞内でみられた4Gy被ばくヒト染色体の遅延性組換え a-d, DAPI染色、e-h, ヒト8番染色体(赤)の遅延性組換え。マウス染色体との複雑な転座や環状染色体形成がみられた。

本研究の結果は、放射線による染色体損傷の修復過程において、無傷の染色体との組換え現象が惹起されることを示している。応募者は、これまで染色体移入による遅延性染色体組換えについて、4Gy以上の線量を用いていたが、本研究では、2GyのX線でも有意に染色体組換えが誘発されることが明らかになった。これまでの染色体移入実験では、X線照射した細胞から48時間かけて微小核を形成させていたが、本研究では、単離した微小核にX線を照射し、すぐに染色体移入を行った。その点が、2Gy被ばくによる有意な染色体組換え頻度の上昇に影響していると考えられる。

(3) まとめ

テロメアFISHによるテロメアシグナルは、テロメア状態を知る手がかりとなる。テロメアシグナル異常として、シグナル数の増減が検出されることが分かった。さらに、0.5Gy以上のX線被ばくによって、シグナル数増加異常が線量依存的に誘発されることが明らかになった。一方、シグナル数減少異常は、X線被ばくによる影響はみられなかった。

2Gy以上のX線を被ばくしたヒト染色体は、被ばくしていない細胞内で遅延性に組換えを起こす頻度が有意に高くなることが明らかになった。

本研究により、X線被ばくによるテロメア脆弱化と遅延性染色体組換えの誘発との関係を探るための有力な糸口が得られた。今後、両者の関係を解明していく予定である。

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6件)

Urushibara, A., Kodama, S., and Yokoya, A.: Induction of genetic instability by transfer of a UV-A-irradiated chromosome. *Mutat. Res.*, 766, 29-34, 2014 (査読有)。

DOI:10.1016/j.mrgentox.2014.02.005

Yamamoto, M., Wakata, A., Aoki, Y., Miyamae, Y., and Kodama, S.: Chromosome loss caused by DNA fragmentation induced in main nuclei and micronuclei of human lymphoblastoid cells treated with colcemid. *Mutat. Res.*, 762, 10-16, 2014 (査読有)。

DOI:10.1016/j.mrfmmm.2014.02.002

Takeshita, S., Matsuda, N., Kodama, S., Suzuki, K., and Watanabe, M.: In vitro thermal effect on embryonic cells of endangered hawksbill turtle *Eretmochelys imbricate*. *Zool. Sci.*, 30, 1038-1043, 2013 (査読有)。

DOI:10.2108/zsj.30.1038

Yamamoto, M., Wakata, A., Aoki, Y., Miyamae, Y., and Kodama, S.: Induction of a whole chromosome loss by colcemid in human cells elucidated by discrimination between FISH signal overlap and chromosome loss. *Mutat. Res.*, 749, 39-48, 2013 (査読有)。

DOI:10.1016/j.mrfmmm.2013.06.001

Kashino, G., Suzuki, K., Kodama, S., Watanabe, M., and Prise, K. M.: Increased susceptibility to delayed genetic effects of low dose X-irradiation in DNA repair deficient cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 89,

295-300, 2013 (査読有) .

DOI:10.3109/09553002.2013.752596

Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S., Yamashita, S., and Watanabe, M.: Persistent amplification of DNA damage signal involved in replicative senescence of normal human diploid fibroblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 20121, 1-8, 2012 (査読有) .

DOI:10.1155/2012/310534

[学会発表](計12件)

Ccdc85c欠損hhy突然変異マウス由来ニューロスフェア細胞の遺伝子発現特性,古川淳士,阿波谷貴代,白石一乗, 児玉靖司, 田中夏樹,桑村充,岡田圭輝,森 展子,第36回日本分子生物学会年会(2013年12月3日~6日,神戸市)

Efficient disappearance of DNA lesions in neurosphere cells of mice irradiated with X-rays in utero, Seiji Kodama, Naoki Yamamura, Hiroki Kashiwagi, Maki Fukui, Kenta Sakaguchi, Kazunori Shiraishi, 日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

Induction and transmission of micronuclei with X-rays analyzed by live cell imaging, Kohei Hagiwara, Ai Kawakita, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama, 日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

Radiation sensitivity of immortal mouse neurosphere cell lines that retain diploid karyotype, Tomoya Nakahama, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, 日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

神経幹細胞に蓄積する放射線損傷の影響,白石一乗,山村直己,柏木裕呂樹,福井真希,坂口健太, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

医療関係者に求められる放射線の人体影響に関する説明, 児玉靖司, 第49回日本医学放射線学会秋季臨床大会(2013年10月12日~14日,名古屋市)

UV-A照射染色体移入による非照射細胞の不安定化,漆原あゆみ, 児玉靖司, 第71回日本癌学会学術総会(2012年9月19日~21日,札幌市)

長期継代培養により不死化したニューロスフェア細胞の性質解析,白石一乗,今西香絵,阿波谷貴代,原 正之, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第55回大会(2012年

9月6日~8日,仙台市)

Chromosome translocations in neural stem cells of mice irradiated in utero, Naoki Yamamura, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, 日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

マウス神経幹細胞における選択的染色体分配へのp53タンパク質の関与,近藤蓉子,白石一乗,原 正之, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

X線照射による小核誘発のライブセルイメージングを利用した解析,萩原浩平,川喜多愛,白石一乗,杉本憲治, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

UV-A照射染色体の移入による遺伝的不安定性の誘発,漆原あゆみ, 児玉靖司, 横谷明德, 日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻・放射線生物学研究室のホームページ:
<http://chokai.riast.osakafu-u.ac.jp/%7Ehousya6/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 靖司(KODAMA Seiji)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号:00195744