

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340033

研究課題名(和文)異なる放射線照射条件と多能性幹細胞を用いた次世代DNA損傷ストレス影響研究

研究課題名(英文)Advanced research on the biological effects of genotoxic stress using different irradiation conditions and induced pluripotent cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：さまざまな組織由来のヒト培養細胞株と正常あるいはがん抑制遺伝子p53に変異導入を行ったiPS細胞について、異なる放射線照射方法によって誘導される細胞応答、分子応答を解析することにより、DNA損傷ストレスによる生物影響の発現メカニズムの解明を試みた。解析の結果、iPS細胞には他の細胞株とは異なる特有のDNA損傷応答機構が存在することが明らかとなった。また、iPS細胞のゲノム安定性の維持には、p53依存性、非依存性アポトーシス機構の両方が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これらの結果は、多能性幹細胞を含む幹細胞のゲノム安定性維持機構の解明やその品質管理につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to uncover the underlying mechanisms of genotoxic stress-induced biological effects, we have analyzed the cellular and molecular responses to various types of genotoxic stress in various types of cultured cell lines, including human induced pluripotent stem (hiPS) cells and p53-mutated iPS cells. As a result, we have found that iPS cells maintain their genomic stability through both p53-dependent and -independent apoptotic pathways. These results provide important clues to the understanding of the mechanisms of maintaining genomic stability in multi-potent or tissue stem cells, and the improvement of the quality control of those cells.

研究分野：放射線生物影響

キーワード：放射線照射条件 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

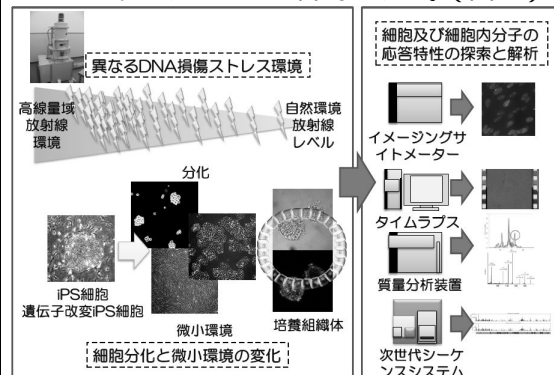
放射線を被曝したヒトでは、被曝線量に依存してさまざまな生物学的影響が現れる。そうした影響の中でも、がんを初めとする放射線による確率的影響の発現メカニズムについては、未だ不明な点が多く、現在、生命科学領域において明らかにすべき研究課題の一つとなっている。放射線被曝の人体影響に関する知見の多くは、原爆被ばく者のデータとその疫学データの統計学的解析によって蓄積されてきた (Rad. Res., 2007, 168:1-64)。また、それぞれの人体影響の発現メカニズムに関しては、動物実験やさまざまなヒト組織由来の培養細胞を用いた研究によって、その詳細が明らかにされてきた。しかし、これまでの研究では、限られた研究材料のみが用いられてきたことから、得られるデータと実際の人体影響との間には、いくつものブラックボックスが存在したままであるというのが現状である。このことは、放射線影響の研究領域に限らず、生命科学の領域全体に共通に存在する問題であると言える。そのブラックボックスの一つが、人体を構成する各組織の幹細胞と分化過程の細胞の性質の違いと、それらにおける生物学的影響の違いである。これまでも、胚性幹細胞を含むヒト由来幹細胞を用いた研究が行われてきたが、研究技術やコストあるいは倫理上の問題から、そうした研究を効率的に進めることは非常に困難であった。そのような中で、2006年に人工多能性幹 (iPS) 細胞が開発された (Cell, 2006, 126(4):663-76)。iPS細胞の出現は、疾病の原因解明や創薬開発、あるいは再生医療などへの応用展開を期待させるのと同時に、多くの生命科学領域においても、これまで不可能であった解析技術の開発による新しい研究展開を期待させることとなっている。

これまで申請者らは、放射線被曝の人体影響の発現メカニズムを明らかにすることを目的として、細胞のストレス応答機構で重要な役割を果たしているがん抑制遺伝子産物 P53 に注目して研究を行ってきた (Cancer Res., 2007, 67(13):6026-6030., P. N. A. S., 2011, 108(29):12001-12006)。その研究過程で、放射線照射によって変化する P53 制御因子群の発現量変化のダイナミクスが P53 のがん抑制機能をコントロールし、放射線被曝後の細胞運命を決定していることが明らかとなってきている。また、申請者らは、異なるレベルの DNA 損傷ストレスが存在する環境での細胞の応答機構と P53 の機能解析を行うことを目的として、Cs-137 を線源とした低・中線量率線照射環境細胞培養システムの整備を行ってきた。現在、このシステムを用いることで、異なる線量率 (1~1000 mGy/day) で持続的に線が照射された環境にある培養細胞の生物学的応答と放射線影響の解析を効率的に行うことが可能となっている。

そこで本研究課題では、持続線照射環境を含む異なる DNA 損傷ストレス処理と iPS 細胞を用いて、損傷ストレスと細胞の種類や性質に依存して誘導される細胞の運命変化とその制御機構に注目し、研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究課題では、放射線被曝によって現れる確率的影響の発現メカニズムを明らかにすることを最終的な目的として、DNA 損傷ストレスによって誘導される細胞運命変化とその分子機構の細胞種依存性を解析する。ヒト iPS 細胞及び遺伝子改変 iPS 細胞、ヒト組織由来の正常細胞株、がん細胞株について、それぞれの細胞が有する異なる DNA 損傷ストレス条件に対する細胞応答特性を同定する。同定された細胞応答特性について、その分子制御機構と生物学的影響への関与を網羅的解析手法を用いて解析する。多能性幹細胞の DNA 損傷ストレスに対する細胞応答特性の解析から細胞の性質に依存したゲノム安定性維持機構を明らかにし、将来的に、幹細胞から分化過程、また、遺伝的背景などを考慮して解析することが可能な次世代につながる新規の DNA 損傷ストレス影響研究の基盤を確立することを目的とする。(図1)



(図1) 異なる線量率 $\gamma$ 線照射環境下での細胞培養と解析システム

3. 研究の方法

(1) iPS細胞のDNA損傷ストレスに対する感受性、応答性、応答機構の解析

実験には、ヒト由来正常線維芽細胞 MRC5 から遺伝子導入によって樹立された iPS 細胞とフィーダーレスの培養環境に順化させたヒト iPS 細胞の他、異なる種類のヒト由来がん細胞株、初代培養細胞株及び不死化細胞株を用いた。iPS 細胞には Vitronectin と Essential 8 Medium (Thermo Scientific 社) を、iPS 細胞以外の細胞株には -MEM (SAJ 社) に 10% 牛胎児血清を加えたものを用い、5% CO<sub>2</sub>、37℃ インキュベーター内で培養を行った。線の急照射 (線量率: 1 Gy/min) にはガンマセル (Cs-137)、持続照射 (線量率: 0.007-0.694 mGy/min) には低線量率ガンマ線照射装置 (Cs-137)、紫外線照射には紫外線照射装置 (UV-C) を用いた。

(2) 遺伝子改変 iPS 細胞の樹立及び解析

目的遺伝子のゲノム DNA 配列に対する人工ヌクレアーゼを発現するプラスミドを複製した。NEPA21 (ネッパジーン社) によって作製したプラスミドを iPS 細胞に導入し、変異導入された細胞株をゲノム PCR によってスクリーニングし、クローニングを行った。DNA シークエンスによってゲノム DNA への変異導入を確認した。

(3) 次世代シークエンスシステムを用いたトランスクリプトーム

異なる線量率で線照射された細胞について次世代シークエンサー (illumina 社) を用いた RNA シークエンスを行い、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(4) siRNA ライブラリを用いた感受性関連因子及び応答性関連因子の網羅的探索

siRNA ライブラリ (Thermo Scientific 社) を RNAiMAX (Thermo Scientific 社) によって導入した細胞に放射線照射を行い、免疫蛍光染色法で DNA 損傷認識因子や増殖マーカーなどを染色した。染色した細胞は自動画像撮影解析装置 (Perkin Elmer 社または GE Healthcare 社) を用いてデータを取得、解析した。

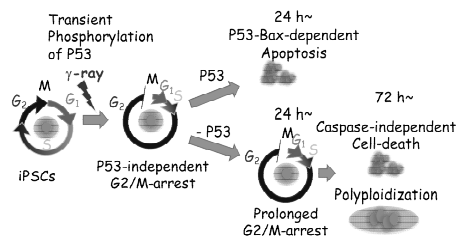
#### 4. 研究成果

iPS 細胞とヒト由来のさまざまな培養細胞株を用いて、DNA 損傷ストレス処理でそれぞれの細胞に誘導される細胞応答特性について比較解析を行うことで、多能性幹細胞の DNA 損傷ストレスに対するゲノム安定性維持機構と生物学的影響の発現メカニズムの解明を試みた。

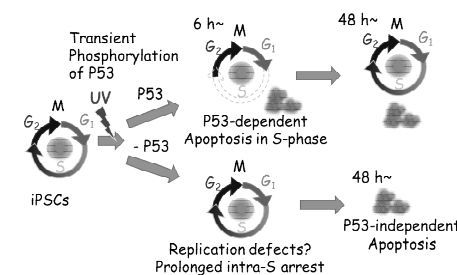
まず、それぞれの細胞株の線急照射に対する生存率曲線を求め、放射線感受性を比較した。その結果、iPS 細胞は線の急照射に対し、極めて高い感受性を示すことが明らかとなった。また、線持続照射や紫外線照射などに対しても、その他の細胞株と比較してより高い感受性を示した。こうした結果は、iPS 細胞が DNA 損傷ストレスに対するゲノム安定性維持機構として、細胞機能の回復、DNA 損傷の修復よりもむしろ増殖停止あるいは細胞死を選択している可能性を示唆する。次に、DNA 損傷誘導後、あるいは DNA 損傷誘導環境下での各細胞の細胞応答性を解析することを目的として、タイムラプス画像撮影装置を用いて経時的な細胞動態観察を行った。その結果、iPS 細胞以外の培養細胞株では、低レベルの DNA 損傷ストレスに対して、増殖の維持、増殖抑制、停止、あるいは分裂死を伴った増殖などが観察されたが、iPS 細胞では死滅する細胞が高頻度に観察された。iPS 細胞に誘導される細胞死では、断片化 Caspase-3 の増加が顕著に検出されたことからアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。また、その他の細胞では RNA シークエンスの解析結果から、線の照射線量あるいは照射線量率に依存して増殖抑制機構と細胞死抑制機構が活性化

されていることが明らかとなった。また、siRNA ライブラリを用いたスクリーニングから、DNA 損傷ストレスに対する細胞応答特性に関わると考えられる複数の遺伝子が同定された。次に、細胞間での細胞応答性の違いが DNA 損傷の修復能の違いに起因するかについて検討を行った。蛍光免疫染色と自動画像撮影解析装置を用いて、それぞれの細胞の DNA 損傷認識フォーカス数の増減を比較解析した結果、iPS 細胞を含む用いた全ての細胞で、DNA 損傷認識フォーカスはほぼ同様に生成、減少したことから、iPS 細胞においても DNA 損傷は効率的に修復されているものと考えられた。

がん抑制遺伝子産物 P53 は、多くの種類の細胞において DNA 損傷に対する細胞応答を制御する重要な因子である。また、これまでの研究から、iPS 細胞の誘導時に脱分化の障壁として機能していることも明らかとなっている。そこで、iPS 細胞における P53 の機能を明らかにするため、人工ヌクレアーゼを用いて p53 遺伝子欠損 iPS 細胞株を樹立し、樹立した細胞株の DNA 損傷ストレスに対する細胞応答性の解析を行った。まず、持続線照射環境での細胞動態を解析したところ、P53 が機能していない iPS 細胞では異常な核形態を示す細胞の蓄積が観察された。また、線の急照射後に誘導されるアポトーシスにおいては P53 が必要であることが明らかとなった。ただし、P53 の機能欠損 iPS 細胞においても最終的にはアポトーシスとは異なる細胞死が線照射線量に依存して誘導されており、生存率においての違いは検出されなかった。しかし、持続照射の場合と同様に核形態異常細胞の蓄積が観察された。こうした結果は、iPS 細胞においても DNA 損傷ストレスに対して P53 がその恒常性維持に重要な役割を果たしていること示唆するものである (図 2)。また、紫外線照射によ



(図 2) iPS細胞の電離放射線DNA損傷ストレスに対する応答



(図 3) iPS細胞の紫外線DNA損傷ストレスに対する応答

て誘導されるアポトーシスには P53 依存的に Caspase 経路が活性化されるものと、P53 非依存的に Caspase 経路が活性化されるものが存在することも明らかとなった (図 3)。

本研究課題の結果から、細胞においては、DNA 損傷ストレスに対してそれぞれが持つ性質に依存した細胞応答特性が誘導され、影響も異なって発現することが明らかとなった。iPS 細胞は、実験に用いた全ての DNA 損傷ストレスに対して高い感受性を示し、その他の種類の細胞とは異なる細胞応答特性を有していた。iPS 細胞の細胞応答特性の解析によって、iPS 細胞においては特に細胞死誘導機構が幹細胞性とゲノム安定性の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。興味深いことに、iPS 細胞では、線照射による損傷ストレスに対しては P53 依存的なアポトーシス機構と分裂期でのチェックポイント機構が機能して細胞死の誘導を行い、紫外線照射による損傷ストレスでは P53 依存的、非依存的な 2 種類のアポトーシス機構および DNA 複製に対するチェックポイント機構が機能しているという可能性を示す結果が得られた。iPS 細胞は、異なる DNA 損傷ストレスに対して複数の応答機構を備え、その幹細胞性の維持を行っているものと考えられる。こうした幹細胞の特徴的な細胞応答性は分化過程で失われ、分化によって新たな細胞応答性が獲得されていく。今後の iPS 細胞を用いた研究が進められることによって、こうした細胞応答性の変化が放射線影響に与える影響が明らかにされることが期待される。本研究によって得られた結果は、多能性幹細胞や組織幹細胞のゲノム安定性維持機構の解明や放射線被曝などによって誘発されるがん化機構の解明、あるいは幹細胞の品質管理につながるものと考えられる。

#### 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, Yoshioka S, Kawai H, Okazaki E, Kiriyama K, Izumi S, Nishimura M, Shimada Y, Kamiya K, Suzuki F. Hepcidin-2 in mouse urine as a candidate radiation-responsive molecule. *J Radiat Res*, 57(2), 査読有, 2016, 142-149. doi: 10.1093/jrr/rrv098.
2. Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget*, 7(3), 査読有, 2016, 3559-3570. doi: 10.18632/oncotarget.6518.
3. Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L,

Tateishi S, Shimura T, Li J, Iizuka D, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Kamiya K. RAD18 activates the G2/M checkpoint through DNA damage signaling to maintain genome integrity after ionizing radiation exposure. *PLoS One*, 12;10(2), 査読有, 2015, e0117845. doi: 10.1371/journal.pone.0117845.

4. Cao L, Kawai H, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F., A novel ATM/TP53/p21-mediated checkpoint only activated by chronic  $\gamma$ -irradiation. *PLoS One*, 5;9(8), 査読有, 2014, e104279, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0104279.

5. Shimizu N, Nakajima NI, Tsunematsu T, Ogawa I, Kawai H, Hirayama R, Fujimori A, Yamada A, Okayasu R, Ishimaru N, Takata T, Kudo Y. Selective enhancing effect of early mitotic inhibitor 1 (Emi1) depletion on the sensitivity of doxorubicin or X-ray treatment in human cancer cells. *J Biol Chem*, 288(24), 査読有, 2013, 17238-17252. doi: 10.1074/jbc.M112.446351.

[学会発表](計 43 件)

1. 河合秀彦, 曹麗麗, 金井昭教, 稲葉俊哉, 神谷研二, 鈴木文男, ハイスループット解析技術による放射線照射環境下での細胞応答の研究, 第 1 回放射線ワークショップ, 2015 年 10 月 16-17 日, 富山市
2. 河合秀彦, 放射線照射環境での細胞応答の解析, 変異機構研究会第 2 8 回夏の学校, 2015 年 7 月 25-26 日, 小牧市
3. Kawai H, Cao L, Shimizu N, Matsui H, Kanai A, Hirouchi T, Inaba T, Kamiya K, Suzuki F. An Integrated Approach Using High-throughput Sequencing and Imaging Technologies to the Study of Cellular Responses to Low Dose Radiation. 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 5 月 25-29 日, 京都市
4. Shimamoto A, Kagawa H, Kawai H, Sakuma T, Yamamoto T, Shiotani B, Tahara H. DNA Damage Response in Human Induced Pluripotent Stem Cells. 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 5 月 25-29 日, 京都市
5. Kawai H, Cao L, Shimizu N, Sasatani M, Iizuka D, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Kamiya K, Suzuki F. Comprehensive analyses of cellular responses to chronic  $\gamma$ -irradiation (II). The 5th International Symposium of RIRBM, 2015 年 3 月 3 日, 広島市
6. Shimamoto A, Kagawa H, Kawai H, Sakuma T, Yamamoto T, Shiotani B, Tahara H. DNA Damage Response in Human Induced Pluripotent Stem Cells.

The 5th International Symposium of RIRBM, 2015年3月3日, 広島市

7. 河合秀彦, 曹麗麗, 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 神谷研二, 鈴木文男, 異なる線量率での放射線被曝環境と細胞運命決定機構. 日本放射線影響学会第57回大会, 2014年10月2日, 鹿児島市

8. 嶋本顕, 香川晴信, 河合秀彦, 佐久間哲史, 山本卓, 塩谷文章, 田原栄俊, 人工多能性幹細胞(iPS細胞)のX線高感受性の分子機構. 日本放射線影響学会第57回大会, 2014年10月1日, 鹿児島市

9. Kawai H, Cao L, Iizuka D, Matsui, H, Kanai A, Inaba T, Sasatani M, Kamiya, K, Suzuki F. A combination of experimental and bioinformatics approaches for assessing the biological effects of ionizing radiation. The 4th International Symposium of RIRBM, Hiroshima, 2014年2月13-14日, 広島市

10. Kagawa H, Kawai H, Sakuma T, Yamamoto T, Shimamoto A, Tahara H. iPS cells show hypersensitivity to X-irradiation than isogenic somatic cells, leading to p53-dependent apoptosis. 4th International Symposium of RIRBM, 2014年2月13-14日, 広島市

11. Kanai A, Nagamachi A, Kawai H, Matsui H, Inaba T. Analysis of radiation-induced mutations using the next-gen sequencer. The 4th International Symposium of RIRBM, 2014年2月13-14日, 広島市

12. 河合秀彦, 曹麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男, 線照射環境下における細胞応答の線量率依存性の解析, 日本放射線影響学会第56回大会, 2013年10月18-20日, 青森市

13. 金井昭教, 長町安希子, 河合秀彦, 松井啓隆, 稲葉俊哉(\*がん分子病態): 次世代シーケンサーを用いた放射線誘発変異解析. 日本放射線影響学会第56回大会, 2013年10月18-20日, 青森市

他 30 件

## 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

嶋本 顕 (SHIMAMOTO AKIRA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院  
(薬)・准教授

研究者番号: 70432713