

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281024

研究課題名(和文)放射線による小核形成を起源とする染色体不安定化メカニズムの解明

研究課題名(英文)A mechanism for chromosome instability mediated by micronuclei induced with radiation

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は放射線誘発染色体不安定化に染色体分配異常に起因する小核が関与するというモデルを検証した。そのために、ライブセルイメージングを用いてX線誘発小核形成とその後の運命を細胞系譜解析により調べた。その結果、放射線により染色体分配異常に起因する染色体由来小核の生成が促進されることがわかった。また、染色体由来小核には、主核のDNA合成期にDNA2本鎖切断が蓄積し、一部の小核は次の分裂期に主核に再取り込みされることがわかった。さらに、放射線被ばくした染色体由来小核にはDNA2本鎖切断が誘発され、その小核が主核に取り込まれることにより、複雑な染色体再構成が生じる可能性があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We examined the induction of micronuclei by X-irradiation and their fate during several cell divisions post-irradiation using live cell imaging, which traced living cell lineages. Radiation promoted the induction of a whole chromosome-derived micronucleus(MN) that was mediated by chromosome segregation errors. Further, a whole chromosome-derived MN accumulated DNA double strand breaks (DSBs) during the S phase of main nuclei, and some of them were reincorporated into the main nuclei. The present study indicates the possibility that the chromosome-derived MN, which accumulates DSBs induced by radiation, is incidentally reincorporated into the main nuclei and this process causes the complicated chromosome rearrangements.

研究分野：放射線生物学

キーワード：染色体不安定化 放射線 小核形成 ライブセルイメージング DNA2本鎖切断

1. 研究開始当初の背景

放射線による小核形成と染色体不安定化との関係は明らかではない。本研究では次の(1)~(3)に示す理由により、放射線誘発染色体不安定化の起源として染色体分配異常による小核形成に着目する。

(1)がん細胞によく見られる小核にはDNA2本鎖切断(DSB)が蓄積していることが示されている。

(2)小核におけるDNA複製のタイミングは主核に比べて遅延しており、このことが小核にDNA2本鎖切断(DSB)を誘発する。

(3)発がん過程で特定染色体領域に複雑なDNA再配列が一度に起きる現象(chromothripsis)が生じていることが示され、その発生機構の有力モデルとしてDNA損傷を蓄積した小核が主核に再取り込みされる経路が想定される。

以上の学術的背景から我々は、放射線誘発染色体不安定化に、放射線による染色体分配異常により生じる小核が関与している可能性について探ることを着想した。

2. 研究の目的

前述の学術的背景(1)~(3)を踏まえて、本研究は、放射線によって誘発される染色体不安定化の新しいモデルの提唱とその実験的検証を目指した。蓄積したDSBに起因する染色体断片化が生じた小核が、主核に再取り込みされ、さらに断片化された染色体が局限された領域でランダムに再結合することによって、主核の染色体不安定化が促進されるというモデルを以下の2つの手法で検証することが本研究の目的である。すなわち、(1)生きた細胞を対象とするライブセルイメージングを用いて小核の形成と消失(再取り込み)動態を追跡する手法、及び(2)単離した小核にX線照射してDNA損傷を誘発し、その小核を特定の細胞周期を狙って主核に取り込ませる手法である。以上は、放射線によるchromothripsis形成モデルの検証として期待される。

3. 研究の方法

本研究では、放射線による小核形成を起源とする染色体不安定化モデルを以下の方法により調べた。

(1)核と動原体を可視化した細胞を用いてライブセルイメージングにより、X線誘発小核形成とその後の運命について、細胞系譜を作成して調べた。

(2)紡錘系形成阻害剤ノコダゾール処理によって分裂期同調し、細胞周期の進行とともに生じた染色体由来小核について、DNA2本鎖切断(DSB)の蓄積をリン酸化ヒストンH2AX(-H2AX)フォーカスの形成により定量化した。

(3)紡錘系形成阻害剤コルセミドを用いて形成させたヒト染色体由来小核を単離してX線照射によりDSBを誘発し、G1期、またはS/G2期に同調培養したマウスm5S細胞に取り込

せて小核由来ヒト染色体の不安定化について解析した。

4. 研究成果

(1)ライブセルイメージングを用いたX線誘発小核の運命の解析

マウス胎児線維芽細胞由来不死化m5S細胞のヒストンH3を蛍光色素mcherryで標識した細胞を作製し、X線による小核出現頻度をライブセルイメージングで解析した。小核出現頻度は、0Gy、1Gy、2GyのX線照射により、それぞれ、9%、22%、32%と線量依存的に増加した。さらに、照射後1回目の分裂では出現せずに2回目、3回目の細胞分裂時に小核が出現する頻度は、1Gy照射で、それぞれ9%、4%、また、2Gy照射でそれぞれ20%、6%であった。この結果から、X線照射により、染色体断片、あるいは染色体分配エラーが照射直後だけでなく遅延性に生じることが明らかになった。さらに、断片由来と染色体由来小核を区別するために、動原体由来タンパク質CENP-Aを蛍光色素mKOで、ヒストンH3を蛍光色素Plumで標識したヒト線維肉腫細胞HT1080を作製し、ライブセルイメージングで1Gy、または2Gy照射後に出現する小核について調べた。この細胞由来小核は、CENP-Aシグナルの有無によって、断片由来か染色体由来かを区別できる特徴を有する。X線による断片由来小核出現頻度は、0Gy、1Gy、2Gy照射でそれぞれ、0%、30%、42%であり、染色体由来小核出現頻度は、0Gy、1Gy、2Gy照射でそれぞれ、5%、14%、26%を示し、どちらのタイプも線量依存的に増加することが分かった。特に、染色体由来小核出現頻度に線量依存性がみられた事実は、X線がDNA2本鎖切断に起因する構造異常だけでなく、染色体分配異常も促進していることを示している。一方、生じた小核が次の細胞分裂で消失する頻度を調べたところ、1Gy及び2Gy照射による消失の割合は、断片由来で31%、及び28%であり、染色体由来では、それぞれ42%、及び19%であった。このことは、小核の由来にかかわらず、形成した20~40%程度の小核が次の分裂時に主核に取り込まれるか、あるいはアポトーシスを起こして消失することを示唆している。

(2)ライブセルイメージングを用いたX線誘発染色体分配異常の解析

ライブセルイメージングを用いた小核形成の解析により、X線がDNA2本鎖切断に起因する構造異常だけでなく、染色体分配異常も促進していることが明らかになったことを踏まえて、染色体分配異常と染色体不安定化の関係をライブセルイメージングで調べた。特に、染色体分配異常の指標として細胞分裂時に出現するクロマチン架橋に着目し、マウスm5S細胞のヒストンH3を蛍光色素mcherryで標識した細胞を用いて、架橋形成した細胞の系譜を解析した。X線を2Gy照射

した細胞 271 系統について調べた結果、分裂異常が起きた系統は 53%であり、そのうちの 69% (99 系統) がクロマチン架橋であった。クロマチン架橋が断裂した後、解析不能例を除くと、45%の細胞が持続的な増殖、22%が G1 期停止、及び 4%がアポトーシスを示した。このうち、G1 期停止は、分裂終期における架橋の断裂により、DSB が新たに誘発されたことが原因で p53 依存的に生じたものと推定される。以上の結果より、DSB の誤った再結合により生じた二動原体染色体を持った細胞の運命として、分裂期でクロマチン架橋を形成するが、およそ半数は増殖を継続し、20%程度が p53 依存的期 G1 停止に至り、アポトーシスが誘導される例は稀であることがわかった。

(3)小核の主核への再取り込み頻度に関する解析

ライブセルイメージングを用いた X 線誘発小核の運命追跡により、一旦形成された小核が 2 回目、あるいは 3 回目の分裂期で消失することが明らかになった。しかし、この現象が、アポトーシスによる消失なのか、主核への再取り込みなのかに関しては、ライブセルイメージング装置の制約上判別がむずかしかった。そこで、広領域顕微鏡観察を可能にする最新の CMOS カメラを導入して解像度を上げ、2.6 倍の広領域で高感度に観察できるようライブセルイメージング装置を改良した。この装置とマウス m5S 細胞のヒストン H3 を蛍光色素 mcherry で標識した細胞を用いて、X 線(2Gy)照射により誘発した小核、並びに、染色体由来小核を得るために紡錘系形成阻害剤ノコダゾールにより誘発した小核について、主核への再取り込みをライブセルイメージングにより解析した。その結果、ノコダゾール誘発小核では、10 個のうち 2 個(20%)が次の分裂期で主核に再取り込みされたのに対し、X 線誘発小核では、35 個のうち主核に再取り込みされたものはなかった。この相違は、ノコダゾール誘発小核が主に 1 本のラギング染色体全体から構成されるのに対して、X 線誘発小核は主に染色体断片から構成されることに原因があると推定される。そこで次に、染色体由来小核における DNA2 本鎖切断(DSB)の蓄積について調べた。ノコダゾール(100ng/mL, 6h)処理により分裂期で同調した m5S 細胞に、細胞周期の進行とともに生じる DSB 陽性小核の数を解析した。DSB は、-H2AX フォーカスを指標にして定量化した。その結果、主核の DNA 合成が進行するのに伴い、DSB 陽性小核数が増加することが明らかとなった。以上の結果は、主核の DNA 合成期に染色体由来小核には DSB が蓄積し、それらの小核の一部は、次の分裂期に主核に再取り込みされることを示している。

(4)DNA2 本鎖切断(DSB)を蓄積した小核由来ヒト染色体の不安定化に関する解析

DSB を蓄積した小核が主核に取り込まれることによる染色体不安定化について調べるために、X 線(4Gy)照射した小核を G1 期、または S/G2 期に同調したマウス m5S 細胞に移入して染色体不安定化を解析した。まず、紡錘系形成阻害剤コルセミドによって形成させたヒト染色体 1 本からなる小核を単離した。この単離した小核に X 線(4Gy)を照射し、すぐに DSB マーカーである -H2AX フォーカスを調べたところ、小核に DSB が残っていることが確認された。この DSB が残存する小核を G1 期、または S/G2 期のマウス m5S 細胞に移入し、小核由来ヒト染色体の不安定化について、ヒト染色体特異的プローブを用いた FISH により解析した。その結果、X 線被ばくヒト染色体の不安定化について、移入細胞周期の違いによる影響はみられなかった。一方、染色体の短腕・長腕特異的プローブを用いた FISH 解析により、被ばく染色体には、短腕と長腕の間で複雑な組換えを起こしているものがあり、chromothripsis にみられる特徴的な染色体内再構成を示す例があることが明らかになった。以上の結果は、DSB が蓄積した染色体由来小核が主核に取り込まれることにより、chromothripsis のような複雑な染色体再構成が、X 線被ばくによって生じる可能性を示唆している。

(5)まとめ

本研究により、以下の ~ が示された。X 線により、DNA2 本鎖切断(DSB)に起因する染色体断片由来小核だけではなく、染色体分配異常に起因する染色体由来小核の生成も促進される。X 線により、染色体断片由来、あるいは染色体由来小核が、照射後 2 回目あるいは 3 回目の分裂時に遅延性に生じる。マウス m5S 細胞では、X 線で生じた DSB の誤った再結合により形成された二動原体染色体を持った細胞の運命として分裂期でクロマチン架橋を形成するが、およそ半数は増殖を継続し、20%程度が p53 依存的期 G1 停止に至り、アポトーシスが誘導される例は稀である。主核の DNA 合成期に染色体由来小核には DSB が蓄積し、それらの小核の一部は、次の分裂期に主核に再取り込みされる。X 線被ばくしたヒト染色体由来小核をマウス m5S 細胞に移入する際の被ばくヒト染色体の不安定化について、移入細胞周期の違いによる影響はみられない。DSB が蓄積した染色体由来小核が主核に取り込まれることにより、chromothripsis のような複雑な染色体再構成が、X 線被ばくによって生じる可能性がある。

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 4 件)

Fujiwara, D., Kitada, H., Oguri, M., Nishihara, T., Michigami, M., Shiraishi, K., Yuba, E., Nakase, I., Im, H., Cho, S., Joung, J. Y., Kodama, S., Kono, K., Ham, S. and Fujii, I.: A cyclized helix-loop-helix peptide as a molecular scaffold for the design of inhibitors of intracellular protein-protein interactions by epitope and arginine grafting. *Angew. Chem, Int. Ed.*, 55, 1-5, 2016 (査読有).
DOI: 10.1002/ange.201603230

Ariyoshi, K., Suzuki, K., Watanabe, M., and Kodama, S.: Promoted instability in an X-ray irradiated chromosome transferred into Werner syndrome cells. *Radiat. Emer. Med.*, 4, 40-46, 2015 (査読有).
URL: https://www.researchgate.net/publication/275038114_Promoted_Instability_in_an_X-ray_Irradiated_Chromosome_Transferred_into_Werner_Syndrome_Cells

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

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.

[学会発表](計 19 件)

西田拓馬、白石一乗、児玉靖司、小核由来被ばく染色体の細胞周期における移入時期と不安定化の関係、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

白阪耀介、坂口健太、白石一乗、児玉靖司、胎内被ばくによってマウス神経幹/前駆細胞に誘発される DNA 二本鎖切断の解析、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

富野菜央、白石一乗、杉本憲治、児玉靖司、川喜多愛、小核における DNA 二本鎖切断蓄積と主核への取り込み頻度の解析、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

坂本佳美、児玉靖司、白石一乗、放射線によるテロメアシグナル異常に対する

アスコルビン酸の影響、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

柏木裕呂樹、白石一乗、坂口健太、白阪耀介、児玉靖司、マウスニューロンにおける X 線誘発 DNA 二本鎖切断の修復能解析、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

今岡航、柏木裕呂樹、坂口健太、白石一乗、児玉靖司、マウスニューロンにおける非相同末端結合の阻害効果の解析、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

泉谷彬元、児玉靖司、白石一乗、アストロサイトの放射線損傷応答に関する解析、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

児玉靖司、放射線による染色体異常生成とその後の運命について、日本環境変異原学会第 45 回大会 (2016 年 11 月 17 日～18 日、つくば国際会議場、つくば市)

Seiji Kodama, Tomoya Nakahama, Hiroki Kashiwagi, Kae Imanishi, Takayo Awatani, Kazunori Shiraishi, Establishment and Radio-biological Characterization of Immortal Mouse Neural Stem Cell Lines, 15th International Congress of Radiation Research. (2015 年 5 月 25 日～29 日、Kyoto International Conference Center, Kyoto)

Kazunori Shiraishi, Mouse Adaptive Response by Low Dose Irradiation Consists of Two Pathways. (2015 年 5 月 25 日～29 日、Kyoto International Conference Center, Kyoto)

Kenta Sakaguchi, Hiroki Kashiwagi, Yosuke Shirasaka, Maki Fukui, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, Development of an Image-J Based Program for Counting -H2AX foci in Mouse Neurosphere Cells. (2015 年 5 月 25 日～29 日、Kyoto International Conference Center, Kyoto)

Hiroki Kashiwagi, Tomoya Nakahama, Yosuke Shirasaka, Kenta Sakaguchi, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, Repair of DNA Double Strand Breaks Induced By X-irradiation in Mouse Neurons. (2015 年 5 月 25 日～29 日、Kyoto International Conference Center, Kyoto)

Shohei Okamoto, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama, X-ray-induced Chromosome Segregation Errors Analyzed by Live Cell Imaging. (2015

年5月25日～29日、Kyoto International Conference Center, Kyoto)
Yuki Hirakawa, Masateru Tanabe, Takuma Nishida, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, Chromosomal Instability Transmitted by a Microcell Exposed to X-rays. (2015年5月25日～29日、Kyoto International Conference Center, Kyoto)
Seiji Kodama, Kohei Hagihara, Kazunori Shiraishi, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kenji Sugimoto, p53 dependent timing of DNA synthesis in main nuclei and micronuclei, 日本放射線影響学会第57回大会 (2014年10月1日～3日, かごしま県民交流センター, 鹿児島市)
Yuki Hirakawa, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, Chromosome instability transmitted by a microcell exposed to ionizing radiation, 日本放射線影響学会第57回大会 (2014年10月1日～3日, かごしま県民交流センター, 鹿児島市)
Shohei Okamoto, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama, X-ray-induced chromosome bridges analyzed by live cell imaging, 日本放射線影響学会第57回大会 (2014年10月1日～3日, かごしま県民交流センター, 鹿児島市)
Hiroki Kashiwagi, Tomoya Nakahama, Kenta Sakaguchi, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, DNA double-strand break repair in mouse neurons, 日本放射線影響学会第57回大会 (2014年10月1日～3日, かごしま県民交流センター, 鹿児島市)
Tomoya Nakahama, Hiroki Kashiwagi, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, Establishment and radio-biological characterization of immortal mouse neural stem cell lines, 日本放射線影響学会第57回大会 (2014年10月1日～3日, かごしま県民交流センター, 鹿児島市)

〔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://www.riast.osakafu-u.ac.jp/~housya6/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
- (2)研究分担者
杉本 憲治 (SUGIMOTO, Kenji)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：40196746
- (3)連携研究者
白石 一乗 (SHIRAISHI, Kazunori)
大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：40347513