

平成22年度成果報告会要旨集

原子力安全研究推進事業

低線量・低線量率放射線による 発がん機構に関する研究



紀の川春の雪



日時：平成23年2月23-24日
会場：休暇村紀州加太・会議室



原子力安全研究推進事業平成22年度研究成果報告会(加太 和歌山)

原子力安全研究推進事業
低線量・低線量率放射線による発がん機構に関する研究
平成22年度成果報告会プログラム

日時：平成23年2月23日-24日
会場：休暇村紀州加太・会議室
(各人：発表：20分、討論10分)

2月23日

13:00-13:10 成果報告会の狙い―渡邊正己（京都大）

13:10-15:10

第一部：低線量放射線による細胞/動物個体における発がんの研究（1） 司会：今岡達彦（放医研）

13:10-13:40 低線量放射線によるヒト体細胞の発がん機構の研究―内在性活性酸素種に対する細胞応答機構について
―田野恵三、渡邊正己（京都大）

13:40-14:10 培養幹細胞および幹細胞様細胞の DDREF―小林純也、小松賢志（京都大）

14:10-14:40 幹細胞における低線量・低線量率被ばくの影響に関する研究―児玉靖司、白石一乗（大阪府立大）

14:40-15:10 体性幹細胞における低線量放射線によるゲノム不安定性の研究―鈴木啓司（長崎大）

15:10-15:30 休憩

15:30-17:30

第一部：低線量放射線による細胞/動物個体における発がんの研究（2） 司会：鈴木啓司（長崎大）

15:30-16:00 放射線影響を組織レベルで解析する分子遺伝学的研究―藤堂剛（大阪大）

16:00-16:30 動物発がん実験による DDREF 推定およびその機序解明―低線量率照射開始と幹細胞培養条件検討
―今岡達彦（放医研）

16:30-17:00 発がんを指標とした線量・線量率効果―吉田和生、野村崇治（電中研）

17:00-17:30 DNA損傷を標的としない発がん機構の存在―渡邊正己（京都大）

18:00-19:30 夕食

19:30-21:00

第二部：低線量放射線に特徴的な細胞応答現象の発がんへの関与の研究（1） 司会：熊谷純（名古屋大）

19:30-20:00 ヒト個体レベルにおける発がんのリスク係数の不確かさ解析―杉浦紳之（近畿大）

20:00-20:30 低線量放射線による発がんへのバイスタンダー効果の影響メカニズム―菓子野元郎、渡邊正己（大分大）

20:30-21:00 中性子線による DNA 二重鎖切断の誘発と修復の線量率効果と線質効果に関する研究―高橋千太郎、木梨友子、奥村寛二（京都大）

21:00-21:30 放射線発がんの原因となるタンパク質標的に関する研究―異性体ペプチドの迅速分析の開発―藤井紀子、藤井智彦（京都大）

2月24日

9:00-10:30

第二部：低線量放射線に特徴的な細胞応答現象の発がんへの関与の研究（2） 司会：田内広（茨城大）

9:00-9:30 発がん防御におけるクロマチン制御因子の役割―高田穰（京都大）

9:30-10:00 低線量域における細胞運命に関する研究―低線量域における p53 の活性制御機構に関する研究―松本智裕、土生敏行、井倉毅（京都大）

10:00-10:30 活性酸素防御タンパク質および酸化DNA修復酵素の発現変動と細胞の放射線応答に関する研究―ミトコンドリア内在型 SOD2 による放射線障害抑制効果―秋山秋梅、橋口一成、細木彩夏（京都大）

10:30-10:50 休憩

10:50-10:30

第二部：低線量放射線に特徴的な細胞応答現象の発がんへの関与の研究（3） 司会：秋山秋梅（京都大）

10:50-11:20 放射線発がんに影響するバイスタンダー効果の発現機構の研究―培地経由バイスタンダー効果による長寿命ラジカル発現―熊谷純（名古屋大）

11:20-11:50 低線量放射線による DNA 損傷に対する修復の分子機構(1)―田内広（茨城大）

11:50-12:20 低線量放射線による DNA 損傷に対する修復の分子機構(2)―立花章（茨城大）

12:20-12:50

第三部：総合討論と平成23年度の研究方針策定 司会：渡邊正己（京都大）

13:00 解散

第一部

原子力安全研究推進事業

「低線量放射線による細胞/動物個体における発がんの研究」

低線量放射線によるヒト体細胞の発がん機構の研究 -内在性活性酸素種に対する細胞応答機構について-

田野恵三、渡邊正己

京都大学 原子炉実験所 放射線生命科学研究所 粒子線生物学研究室
(tano@rri.kyoto-u.ac.jp)

研究目的

細胞内在性ROSの変動は、放射線の直接作用である遺伝子切断や異数化といったマクロな現象と違ったマイクロモルオーダーの現象であり、特に低線量放射線の生物への影響を追跡する上で有効なランドマークとなり得ることから、上述の解析を通じて、これまで把握が困難であった低線量放射線等の微量環境因子による細胞がん化への影響を正確に評価するための基礎を築くことを目的とする。

これまでの成果

ヒト細胞における細胞内在性 ROS の適正化機構がゲノムの安定性維持に関わることを示す基礎データを得る前段階として、ニワトリ DT40 細胞を用いた内在性 ROS 制御遺伝子条件欠損細胞の作成を進めてきた。Tet off 発現システムを用いて、条件欠損型の内在性 ROS 制御遺伝子の破壊細胞を作成している。この方法では、外的要因に関係なく目的とする遺伝子を枯渇させて、細胞内の活性酸素種濃度を調節することが出来る。

既に、主要な活性酸素種である Super Oxide (SOX) を過酸化水素と酸素とに変換する酵素 Super Oxide Dismutase (SOD) のうち、細胞質に存在する SOD1 と、ミトコンドリアに存在する SOD2 の条件欠損細胞を作成し、それら内在性 ROS の適正化破壊は、染色体分配不全といったゲノム安定性維持機能に異常をきたすことを報告した。

一方、SOX から変換された過酸化水素は、蛋白質脱リン酸化酵素を不活性化し、細胞内シグナルトランスダクション (情報伝達) のメデエイターとして有用に機能する。また、細胞内の過酸化水素濃度は、チオレドキシン依存的に過酸化水素を水と酸素に変換する Peroxiredoxin (PRDX1) により適正化されることから、PRDX1 の条件欠損細胞を作成して解析を進めた結果、PRDX1 が培養細胞増殖に必須であることを明らかにした。

研究方針

5年間の研究方針

(1) 内在性活性酸素種に対する細胞応答メカニズムを解析する。そのために、活性酸素種除去に関わる遺伝子群を網羅的に破壊した細胞パネルを作製し、それら細胞群の表現型を解析するという逆遺伝的手法を採る。さらに、個々の遺伝子のみならず多重破壊細胞をも作製し、活性酸素除去関連遺伝子間の相互作用を解析する。

(2) これまでの解析で得た SOD1 条件欠損細胞の結果から、細胞内 ROS が損傷因子として作用する場合のターゲットは、染色体自体よりむしろ細胞質蛋白であると考えられる。染色体異数化の生ずるメカニズムが、中心体といった機能蛋白の機能不調が関与する可能性を考えると、内在性

ROS 適正化機構の破綻は、中心体等の機能蛋白の異常から誘導された自然発がんや放射線発がんへと関与しているとも予想される。この可能性を細胞生物学的に検証する。

(3) 細胞内機能蛋白のリン酸化レベルの維持に、細胞内 ROS が関与することが明らかになっている。染色体分配や維持に関わる機能蛋白の多くがリン酸化修飾で制御されていることから、ミクロな内在性 ROS の機構破綻が、関連蛋白の機能不全と言ったマクロな破綻をも導く可能性が考えられる。この点についても検証する。

(4) 上記(1)～(3)の視点について DT40 で得られた結果と、ヒト細胞及びハムスター細胞で得られた結果とをクロストークさせることにより、内在性 ROS 機構がゲノム安定性機構へどう関与するのかを解析し、さらに、情報伝達因子としても機能する内在性 ROS 適正化機構の破綻が染色体異数化にどのように影響し、どのような仕組みで細胞がん化の発現に関与するかを調べる。

これらの研究を足がかりに、ヒト細胞の発がんについて、特に低線量放射線影響という限りなく生理環境に近い状態でのメカニズムを明らかにする。

平成 22 年度の実施内容

(1) 内在的な活性酸素種に対する細胞応答機構の研究

内在的な活性酸素種に対する細胞応答メカニズムの解析を開始した。そのために逆遺伝的に活性酸素種除去に関わる遺伝子群、SOD1、SOD2 及び PRDX1 を破壊した細胞を作製した。特に SOD1 及び PRDX1 は細胞増殖に必須であり、SOD2 は細胞増殖に重要な役割を持っていた。これら遺伝子産物の枯渇は、細胞内の酸化レベルの上昇をもたらすことを明らかにした。

(2) 中心体機能不調の研究

染色体の異数化が生ずるメカニズムが、中心体の機能不調に関与する可能性があるので、自然および放射線被ばくによって生ずる発がんと中心体異常誘導に関与しているかどうかを明らかにするために、中心体異常を可視化する方法を確立した。

(3) 染色体異数化によるがん化形質発現機構の研究

自然および放射線被ばくによって生ずる発がんと中心体異常誘導に関与しているかどうかを明らかにするために、人工的に染色体を移入し細胞を作成し解析を進めている。

培養幹細胞および幹細胞様細胞の DDREF

小松賢志、小林純也

京都大学放射線生物研究センター・ゲノム動態部門

(komatsu@house.rbc.kyoto-u.ac.jp)

研究目的

幹細胞の性質を持ったごく少数の細胞を起源としてがんが発生する“がん幹細胞仮説”が多くのヒト組織で確認されているが、この仮説は放射線発がんにも該当すると思われる。本研究は、培養幹細胞および幹細胞様細胞を用いて、放射線致死感受性、中心体不安定性や修復蛋白の細胞内動態を指標とした放射線線量率効果を解析する。

これまでの成果

放射線の緩照射により、放射線生物効果が軽減する事が多くの実験系で知られている。我々は、細胞致死、突然変異および細胞がん化を同時に測定できる細胞 m5S 細胞を用いて γ 線の緩照射 1.8cGy/min 実験を行った。その結果、いずれの生物学的影響を指標としても緩照射により放射線影響が顕著に減少する事、またその程度は用いた生物学的指標において大きく変わらないことが判明した。このことは、放射線致死における DNA 修復が突然変異などの生物影響にとっても重要であることを示唆している。

研究方針

5 年間の研究方針

(1) 胚性幹細胞の線量率効果

胚性幹細胞の放射線影響は遺伝的影響の放射線リスクの的確な評価に重要である。Kanaar等のグループは相同組換え欠損の細胞の放射線感受性がES細胞とそこから分化したMEF細胞で変わることを報告している (Essers J, et al., EMBO J. 2002)。同様に、バイパスDNA合成欠損細胞の紫外線感受性も発生初期細胞と分化した細胞で異なることが知られている (Ohkumo T, et al., Cell Struct Funct. 2006)。ここでは、マウスES細胞とMEF細胞の線量率効果を指標に細胞致死、およびゲノム不安定性を引き起こす中心体異常の測定により評価する。

(2) 体性幹細胞の線量率効果

ES細胞のような胚性幹細胞と同じく、多くの細胞に分化する能力と自己複製能を有する細胞が成体組織にも存在する事が知られている。特に放射線抵抗性の脳腫瘍として知られるグリオブラストーマでは、体性幹細胞（癌幹細胞）の存在が放射線感受性を左右していることが知られている (Bao S, et al., Nature. 2006)。ここでは、ヒトおよびマウスのグリオブラストーマ細胞ならびにグリオブラストーマ幹細胞の線量率効果を定量的に測定して体性幹細胞のDDREFにおける役割を評価する。

(3) 幹細胞のDNA修復能

DNA修復能が細胞の感受性や線量率効果の大きな要因であることが知られている。また、細胞致死、突然変異および細胞がん化を同時にアッセイできるマウスm5S細胞ではいずれのエンドポイントを指標にしても同様の線量率効果を示したことからDNAS修復がこれらのDDREFに大きな役割

を果たしていると思われる (Komatsu K. et al., Int J Rad Biol., 1993)。そこで、上記 (1) および (2) の線量率効果の根底機構として、免疫染色を主体とした測定により幹細胞のDNA修復能を定量的に評価する。

平成 22 年度の実施内容

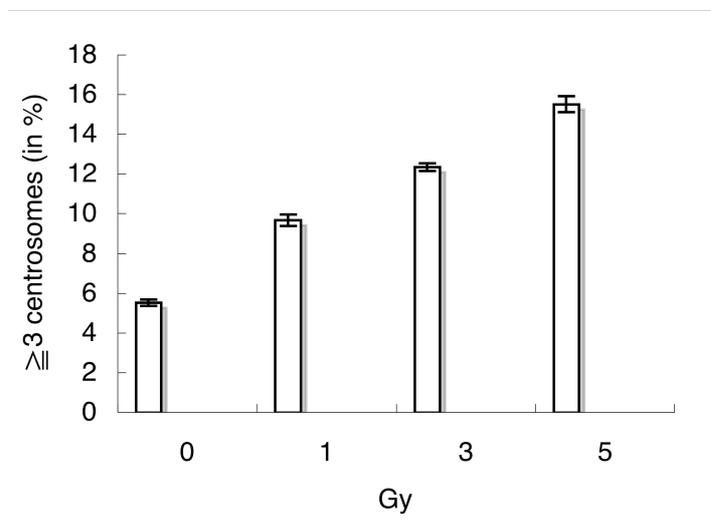
(1) 胚性幹細胞の線量率効果

(1)-1 幹細胞のコロニー法および中心体異常検出法の開発

細胞培養による ES 細胞のコロニー形成法を確立した。また、 γ -チューブリンの免疫染色による ES 細胞の中心体の可視化とその異常の検出方法を確立した。

(1)-2 放射線感受性、中心体異常誘発頻度の解析

上記で確立した方法を用いた、各種放射線線量の γ 線照射による放射線感受性および中心体異常頻度の解析を行った。



(2) 体性幹細胞の線量率効果

(2)-1 培養条件の検討

グリオーマ幹細胞の培養方法を確立した。

(2)-2 幹細胞の分化法ならびに脱分化法の開発

上記の培養細胞を用いた、遺伝子導入による分化法ならびに脱分化法を確立した。

幹細胞における低線量・低線量率被ばくの影響に関する研究

児玉靖司、白石一乗
大阪府立大学産学官連携機構先端科学イノベーションセンター
放射線生命科学研究室
(kodama@riast.osakafu-u.ac.jp)

研究目的

低線量・低線量率被ばくで評価すべき重要な影響は発がんである。最近、幹細胞は発がんの起源細胞になることが明らかになってきた。したがって、低線量・低線量率放射線による発がんリスクを評価するには、体細胞ではなく、幹細胞を用いて評価することが望ましい。しかしながら、これまで幹細胞に着目して放射線の被ばく影響を評価する実験系が存在しなかった。そこで、本研究では、マウス組織幹細胞を材料として、低線量・低線量率放射線被ばくによるDNA損傷の蓄積、DNA修復能への影響、染色体異常、多分化能への影響等を調べ、これを高線量被ばくの場合と比較して影響の違いを明らかにする。同時に、対照細胞として体細胞を用い、幹細胞と体細胞の低線量・低線量率放射線に対する応答の違いも明らかにする。

これまでの成果

幹細胞を用いた放射線影響評価系を構築するために、ICRマウス成体、及び14.5日齢胎児から脳組織の一部を用いて、神経幹細胞を含む細胞塊（ニューロスフェア）を増殖させる培養系を確立した。ニューロスフェアは、構成するほぼ100%の細胞が未分化マーカーであるnestin陽性を示し、適切な培養条件下に移すとニューロンとグリア系細胞に分化する。したがって、マウスニューロスフェア形成細胞は、放射線影響を評価する幹細胞実験系として優れた特性を備えている。そこで、本研究ではマウスニューロスフェア形成細胞を材料として用いた。

これまでに、胎内被ばくしたマウス個体では、出生後6週齢時においてリンパ球に染色体異常が残存しないことが知られている。同時に被ばくした母親マウスのリンパ球には染色体異常が残存する。このことは、胎児細胞における放射線応答の特殊性を示唆しているが、一方で、胎児期の造血組織における特殊性を示している可能性も否定できない。そこで、本研究では、胎内被ばくの影響を神経幹細胞に着目して評価することを目指す。この成果は、胎内被ばくで染色体異常が見られないことが、造血組織の特殊性なのか、あるいは、胎児細胞の特殊性なのかを明らかにするだけでなく、胎内被ばくにおける発がんリスクに対しても重要な知見を提供すると期待される。

研究方針

5年間の研究方針

本研究の方針は、以下の2つである。

- 1) 胎内被ばくでは出生後にリンパ球における染色体異常が観察されないという現象が、胎児期細胞の特殊性なのか、あるいは胎児期造血組織の特殊性なのかを明らかにする。
- 2) 幹細胞と体細胞における低線量・低線量率放射線に対する応答を比較検討する。

平成22年度の実施内容

平成22年度は、以下の3項目について研究を実施した。

1. 神経幹細胞、リンパ球、及び線維芽細胞におけるDNA損傷・染色体異常・分化能に関する解析

1-1.神経幹細胞における染色体転座検出系の確立

1 番染色体をFITC、3 番染色体をCy3 でラベルすることによる染色体転座の検出系を確立した。In vitro 放射線照射により、線量依存的に転座頻度が増加することを確認した。この転座検出系により、2 Gy照射により100細胞当たり7個の転座が検出可能であった。現在、胎内被ばくによる染色体転座について、ニューロスフェア形成細胞とリンパ球を用いて検討中である。

1-2.神経幹細胞と線維芽細胞を用いたX 線によるDNA 損傷検出系の確立

In vitro放射線照射によるDNA 損傷を核当たりの γ -H2AX フォーカス数で定量化する実験系を確立した。この系を用いて、ニューロスフェア形成細胞と線維芽細胞のDNA 損傷修復動態を継時的に解析したところ、前者では、被ばく後3時間までの損傷修復が有意に速いことが明らかになり、幹細胞ではDNA 修復効率が高い可能性が示唆された。現在、他の指標として未成熟染色体凝縮(PCC)法を用いて、両細胞における損傷修復動態を比較検討中である。

1-3.分化マーカー検出系の開発

1-3-1.ニューロスフェア形成細胞と線維芽細胞における放射線感受性のコロニー形成法による比較

上述のDNA 損傷修復の解析において、ニューロスフェア形成細胞は線維芽細胞に比べて高い修復効率を持つ可能性が示唆され、これが細胞分化度の相違を反映する可能性があるため、両細胞集団の放射線感受性についてコロニー形成法を用いて調べた。その結果、ニューロスフェア形成細胞の D_0 値は、1.1Gyであり、線維芽細胞の D_0 値は0.84Gyを示した。神経幹細胞を含む集団の方が、わずかであるが抵抗性であり、DNA 損傷修復効率の差が幹細胞と体細胞の放射線感受性に関与している可能性が示唆された。他の分化能定量系については、現在検討中である。

体性幹細胞における低線量放射線によるゲノム不安定性の研究

鈴木啓司

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻

(kzsuzuki@nagasaki-u.ac.jp)

研究目的

低線量放射線による放射線発がんのメカニズムを明らかにするためには、低線量放射線に対する分子・細胞応答の特殊性に配慮できる実験モデルの構築が必要不可欠である。一方、これまでの低線量放射線の影響は、マウスなど動物個体か、あるいは培養された体細胞において解析されてきたが、昨今の癌幹細胞などの研究を通じて、放射線発がんにおける体性幹細胞被ばくの重要性が再度議論されるようになってきた。そこで本研究では、これまで類を見ない、培養ヒト体性幹細胞を対象にした低線量放射線影響研究を展開することを目的に、ヒト甲状腺、乳腺、前立腺および肺胞上皮より体性幹細胞を単離し、生体内での機能を保持しながら放射線に対する影響が検討できる実験モデルを確立することを目指した。その上で、100 mGy以下の低線量域の電磁放射線を照射し、ヒト体性幹細胞に生じるゲノム不安定性を定量的に解析する。発がん過程の駆動力となるゲノム不安定性の誘導は、放射線照射後に生存細胞により形成されるコロニーの形成率の低下や、あるいはコロニー中に生じる遅延的死細胞（巨大細胞）の出現頻度を指標にして検討する。また、ゲノム不安定性の原因となる遅延的DNA損傷の誘導を、マイクロコロニー中のリン酸化ATMフォーカスの出現により評価する。以上の検討から、低線量放射線が、ヒト体性幹細胞にゲノム不安定性を誘導する確率を提示する。

研究方法

研究期間内に、ヒト甲状腺、乳腺、前立腺および肺胞上皮に由来するヒト体性幹細胞を用いた培養実験モデルを構築する。その上で、樹立したヒト体性幹細胞に100 mGy以下の電磁放射線を照射し、細胞に生じるゲノム不安定性を様々な指標を用いて定量的に解析する。このため、ヒト個体から得られる甲状腺、あるいは、乳腺、前立腺および肺胞由来細胞から、幹細胞を選別する方法を確立する必要がある。これには、従来最も一般的に用いられてきた、培養基への接着依存的な二次元培養法ではなく、非依存的な培養法を導入し改良しなければならない。そこで、以下に示す方法により、幹細胞の単離と同定を行う。また、放射線誘発ゲノム不安定性の評価は、これまでの成果で確立されてきた方法を応用するが、従来の体細胞と同様の解析が幹細胞でも可能であることをまず確認する。

(1) ヒト体性幹細胞培養系の確立

これまでに発見した無血清培養条件に、従来幹細胞の単離に用いられてきた非付着性培養器具を用いたスフェロイド形成技術を応用し、浮遊環境下で増殖する細胞集団を幹細胞集団の候補として採取する方法を検証する。このため、組織あるいは培養細胞から採取した細胞を単個細胞に分離し、撥水性表面処理をした特殊培養シャーレに細胞を播種し、3日ごとに細胞を回収して培地交換を行う。細胞からなる集塊（スフェロイド）を確認した後は、培養ピペットで1つ1つを回収し、独立したクローンとしてさらに培養を続ける。

その後、採取したクローン由来の細胞集団を、幹細胞マーカーとして広く用いられているOct-4、ABCG2等に対する抗体を用いた免疫染色法により解析し、幹細胞の同定を完了する。

(2) 放射線誘発ゲノム不安定性誘導の評価

樹立したヒト体性幹細胞に100 mGy以下の γ 線を照射し、細胞に生じるゲノム不安定性を定量的に解析するための手法を確立する。具体的には、ゲノム不安定性の評価を、遅延性細胞死および遅延性DNA損傷誘発の両指標により行う。遅延性細胞死は、放射線照射後に、生存細胞により形成されるコロニーの形成率を計測し、非照射細胞によるコロニー形成率との比較によりその低下を評価する。コロニー形成は約2週間行い、形成したコロニーは3%ギムザ液により染色して、50個以上の細胞からなる集団をコロニーとして計測する。また、形成されたコロニー中に認められる遅延的死細胞の結果生じた巨大細胞の出現頻度を検討する。巨大細胞は、実体顕微鏡下でギムザ染色したコロニーを観察し、コロニーを形成する大半の細胞と比較して、細胞質の大きさが5倍以上であるものを計測する。一方、遅延的DNA損傷の誘導は、生存細胞により形成されるマイクロコロニー中のリン酸化ATMフォーカスの出現により評価する。このため、 10^2 個の細胞を22 mm x 22 mmの滅菌カバーグラス上に培養し、3日目に4%ホルマリンで細胞を固定し、抗リン酸化ATM抗体、抗リン酸化H2AX抗体、53BP1抗体を用いた蛍光染色を施す。1次抗体は、Alexa488標識抗マウスIgGにより検出し、蛍光顕微鏡下でフォーカスの誘導を確認する。

平成 22 年度の実施内容

(1) ヒト体性幹細胞培養系の確立

ヒト甲状腺および乳腺上皮細胞から幹細胞を特定し選別する方法を確立している。具体的には、分離した単個細胞を疎水性表面コーティングした非付着性培養ディッシュ上で培養し、増殖細胞からなるスフェロイドを形成させた。大半の細胞は、培養開始5日後までにはアノキスによる細胞死を誘導し、細胞が断片化する。一方、図1に示すように、ごく少数の細胞は、浮遊状態で増殖でき、細胞の集団（スフェロイド）を形成することを確認した。この結果、細胞増殖に培養器壁への接着が必要な幹細胞以外の細胞との区別が可能になった。この後、独立した複数個のスフェロイドを回収し、免疫染色法により、これら細胞での幹細胞マーカーの発現を解析している。

(2) 放射線誘発ゲノム不安定性誘導の評価

単離した幹細胞では、100 mGy以下の γ 線を照射してゲノム不安定性の誘導を評価するが、そのための基盤技術として、幹細胞の候補細胞によるコロニー形成法を確立した。また、遅延性DNA損傷誘導の評価のため、DNA二重鎖切断の分子マーカーであるリン酸化ATM、リン酸化H2AXや53BP1フォーカスの免疫蛍光染色法を確立している。モデル実験として、細胞に0.5 Gyの γ 線を照射して1時間後に細胞を固定して染色したところ、体細胞で確認されたものと同様のフォーカスの形成が確認できた。また、これらフォーカスはいずれもが局在するフォーカスを形成していたことから、DNA二重鎖切断を検出していることが確認できた。

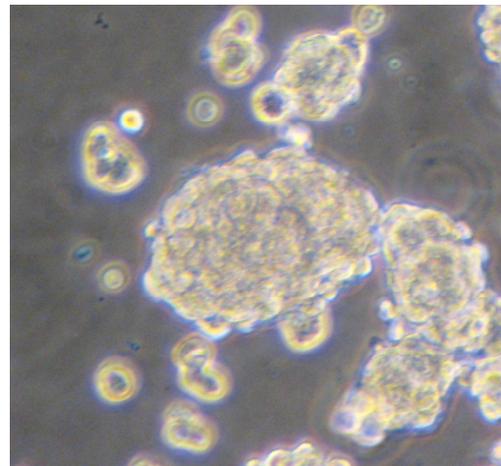


図1 形成された甲状腺スフェロイド

放射線影響を組織レベルで解析する分子遺伝学的研究

藤堂 剛

大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座放射線基礎医学教室

(todo@radbio.med.osaka-u.ac.jp)

研究目的

メダカは、胚操作が極めて容易である、多数個体を取り扱う事が可能である等、実験モデル動物としての利点を多く持つ。更に、ゲノム情報等のバイオリソース基盤整備が進み、古典的遺伝学から分子遺伝学まで、幅広い手法を適用できるユニークなモデル実験動物系として注目を集めている。本研究では、これらの特徴を活かし、メダカにおいて組織・個体レベルでの解析系を確立し、低線量放射線の生体影響解析に新たな切り口からの知見をもたらす事を目指している。

これまでの成果

遺伝子の機能解析において、遺伝子変異体が極めて貴重な情報源である事は、これまでの生物学の歴史からも明白である。更に、ゲノム生物学時代の到来は、遺伝子の取得を容易にし、得られた遺伝子の生体における機能を解析するといった逆遺伝学的手法の必要性を増大させてきた。逆遺伝学には、標的とする遺伝子の変異体を自由に作成する、いわゆる遺伝子ノックアウトの手法が必須である。しかしながら、遺伝子ノックアウトは酵母やマウス等のごく限られたモデル生物でのみ可能であり、メダカを含む小型魚においてもこの手法確立の必要性が叫ばれてきた。TILLING 法とは、Targeted Induced Local Lesions IN Genome の略であり、化学変異原処理により変異を導入した後、次世代個体を作製し、その次世代個体ゲノム DNA 中に誘発変異を検出する事により変異体を得る方法である。簡単な遺伝学が可能な実験モデル生物を対象に、目的とする遺伝子の変異体を自由に作成する方法として近年開発された。我々は、メダカにおいて TILLING を用いた逆遺伝学手法を確立し、放射線応答に重要な役割を果たす遺伝子群の変異体作製を行ってきた。既に、ATM, ATR, p53, Msh2, Exo1, Rev1, Rb のナンセンス変異体を樹立している。これら変異体、あるいは更に今後新たに作製する変異体が、今後の研究の基盤になる。

研究方針

5年間の研究方針

(1) 放射線応答が起動された細胞の標識

放射線応答において p53 は中心的な役割を果たすが、その重要な応答の一つは p21 遺伝子の転写活性化である。p21 遺伝子発現を指標に、放射線応答を起こした細胞をマーキングできる系を樹立したい。基本的戦略は、i) p21 遺伝子の発現制御領域の下流に iCre 遺伝子を組み込んだコンストラクトを作製し、ii) p21-iCre コンストラクトを導入したメダカ Transgenic (TG) 個体を作製する、iii) この個体に、別途作製する「転写阻害配列を loxP で挟んだ蛍光色素レポーター」を共存させる事により、放射線応答を起こした細胞のみを蛍光ラベルする事が可能になる、というものである。本法は、丹羽（電中研）等により考案され、既にマウスで作製が開始されている。メダカは全身がある程度透明であり、このような可視化技術の個体レベルでの適用に極めて適している。メダカにおいても同様な系を確立し、上記変異体をバックグラウンドに体組織レベルでの解析を可能にする基本技術としたい。

(2) 組織幹細胞のマーキング

組織レベルで解析を行うには、分化状態の異なる細胞群を他と区別する必要がある。マウスにおいては腸幹細胞の解析が極めて詳細に行われており、メダカにおいても同様な解析を行いたい。残念ながら、メダカを含め小型魚の腸幹細胞については組織学的にも不明な点が多い。そこで、まず腸幹細胞をマーキングする事から始めたい。基本的戦略は1) 同様、組織特異的発現制御領域の下流に蛍光色素遺伝子を組み込み、このTGラインを樹立するというものである。組織特異的発現遺伝子としてはMusashiを用いる。

(3) 新たな遺伝子解析系

組織レベルでの解析系においては、少数細胞集団、できれば1細胞レベルでの解析が必須になる。従来の組織レベルでの解析は、検鏡による形態観察が主な手法であったが、技術的発展はこれら検鏡下レベル細胞の分子生物学的解析を可能にしてきた。つまり、実際に1細胞レベルでの解析が可能になってきたわけである。我々は、放射線影響を突然変異(遺伝子変異)生成に注目して解析していきたいと考えており、1細胞レベルでの遺伝子変異解析系の樹立を目指したい。現在は、放射線で変異が高頻度に誘発されるマイクロサテライト(Ms)に注目し、HRM(High Resolution Melting)法による解析を行っているが、今後の低頻度変異の解析を視野に入れ次世代シーケンサーを用いた解析系の開発も行いたい。

放射線照射次世代に現われる遺伝的変異は、1個の生殖細胞に起こった変異である。そこで、照射次世代でみられるMs変異と1個の体細胞に起こるMs変異との比較を行い、生殖細胞と体細胞の変異誘発における違いを1細胞レベルで比較する。一方、次世代シーケンサーはMs配列のような繰り返し配列の解析には不向きであるが、単なる塩基配列変異の大量解析は効率よく行える。次世代シーケンサーを用い塩基置換解析系の可能性を模索する。

(4) 低線量放射線発がん実験

最終的には、以上(1)-(3)の分子・細胞レベルでの解析結果を個体での発がん影響とリンクさせたい。しかしながら、メダカの放射線発がんの報告は少ない。一方、化学変異原誘発発がんに関しては多くの報告がある。我々は既にATM, p53等放射線感受性に大きな作用を持つ遺伝子変異体を樹立している。これら変異体を用い、メダカにおいて新たな放射線発がん解析系を確立したい。できれば、化学発がんとの感受性の違いから、放射線に特異的な変異を同定できればと考えている。

平成22年度の実施内容

Musashi, p21 遺伝子のレポーターTransgenic (TG)ラインを樹立するため、両遺伝子についてBACクローンの検索、Recombineeringによるレポーター遺伝子挿入を行っている。Musashiに関しては、TGライン作成の為にメダカ卵へのインジェクションまで完了している。また、放射線誘発遺伝子不安定性の一つとしてマイクロサテライトの変異が有用である事を見いだした。

動物発がん実験による DDREF 推定およびその機序解明 ～低線量率照射開始と幹細胞培養条件検討～

今岡 達彦

放射線医学総合研究所放射線防護研究センター発達期被ばく影響研究グループ
(t_imaoka@nirs.go.jp)

研究目的

放射線による乳がん誘発の実験モデルであるラット個体を用いて、低線量率照射による発がんの特徴を明らかにし、DDREF推定の根拠となるデータを蓄積するとともに、乳腺の放射線発がんにおいて組織幹細胞が標的となっているかどうかについて科学的証拠を得る。

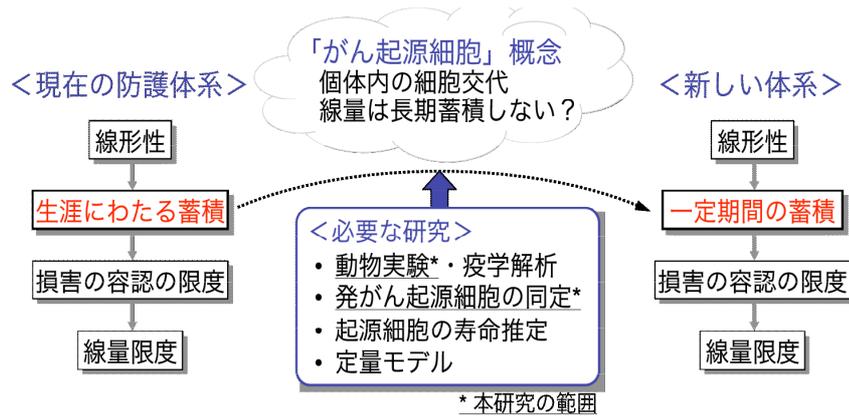
これまでの成果

放射線治療患者に二次的に発生した乳がんには、特定の遺伝子発現を有するサブタイプ (basal-like あるいはERBB2サブタイプ) が多いという証拠がある (Castiglioni et al. 2007, Broeks et al. 2010)。これらの乳がんは、乳腺の内腔前駆細胞または成熟内腔細胞を起源とする可能性が高いが (Visvader 2009)、これらの細胞はターンオーバーによる寿命を有すると推定される。γ線単回急照射によってラットに誘発される乳がんも、独特の遺伝子発現を有し、永続しない未分化細胞集団 (終蕾) から発生するという証拠がある (Imaoka et al. 2006, 2008)。これらの知見から、短期間の照射によって誘発される乳がんの起源細胞は必ずしも長寿命でないと推測される。一方、複数の疫学および動物実験結果は、長期間の照射による乳がんの誘発効果が、短期間の照射による効果よりも低いことを示している (Howe et al. 1996, Little et al. 1999, Johnson et al. 1989)。

研究方針

5年間の研究方針

現行の放射線防護では、中高線量影響から直線的に外挿した影響評価値を、低線量・低線量率影響の補正係数 (DDREF) で調整する。さらにこの影響が生涯にわたり蓄積することを仮定して、生涯の損害を容認可能レベルに抑えるよう、線量限度を設定している (ICRP Publication 60)。しかし、放射線被ばくによる発がん効果が生涯にわたり蓄積するかどうかは、よくわかっていない。近年、がん研究及び幹細胞研究の進展によって、がんの起源となる細胞の種類が明らかになりつつある。そこで、組織加重係数の高く設定されている組織のひとつである乳腺に着目し、動物モデルにおける低線量率照射による発がんの特徴を明らかにするとともに、乳腺の放射線発がんにおいて組織幹細胞が標的となっているかどうかについて科学的証拠を得る。



具体的には、ラット個体を用いた実験により以下に関する情報を得る。

- ・ 低線量率 γ 線 (0.1mGy/分; UNSCEAR (1993)の定義による) の発がん効果。
- ・ 照射期間と発がん効果の関係。
- ・ 上記動物実験で誘発された腫瘍のサブタイプ。
- ・ 照射個体より幹細胞を含む未分化細胞集団を分離し他個体内に生着させた時、その後の発がん頻度。

平成 22 年度の実施内容

- ・ 低線量率 γ 線のラットへの全身照射（今年度は1～8Gy群計78匹及び非照射群12匹）及び特定病原体不在条件における長期飼育観察を開始した。
- ・ ラット個体より取り出した乳腺組織を用いて乳腺幹細胞を含む細胞塊（マンモスフィア）を形成させる濃縮培養条件について、2種類の培地（MammoCult及びMEBM）を用いて検討した。細胞塊の形成率はMammoCult培地の方が若干高く、PKH26標識保持能は同程度で、形成される細胞塊の大きさはMammoCult培地の方が大きい傾向があった。細胞塊では、分化した細胞（筋上皮細胞及び内腔上皮細胞）に特徴的な遺伝子発現が低く、幹細胞マーカーの遺伝子発現が高いことが確認され、これらの培地による違いは殆どなかった。

文献

- Broeks et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 76: 540-547 (2010)
- Castiglioni et al. Clin Cancer Res 13: 46-51 (2007)
- Howe et al. Radiat Res 145 694-707 (1996)
- Imaoka et al. J Radiat Res 49: 349-360 (2008)
- Imaoka et al. In Vivo 20: 353-358 (2006)
- Johnson et al. Radiat Res 118 545-558 (1989)
- Little et al. Radiat Res 151 218-224 (1999)
- Visvader. Genes Dev 23: 2563-2577 (2009)

発がんを指標とした線量・線量率効果

吉田和生、野村崇治

電力中央研究所 原子力技術研究所 放射線安全研究センター

(kazu@criepi.denken.or.jp)

研究目的

放射線リスクの主要な要因である発がんを指標として、線量・線量率効果を解明するために、放射線誘発がんのモデルマウスを用いて、がん発症の線量・線量率依存性の有無を明らかにする。

背景

低線量・低線量率放射線の生物に対する影響は、様々な角度から研究されているが、個々の生物応答が低線量放射線のリスクにどのように影響するかは明らかになっていない。この原因の一つとして、培養細胞を用いた結果が単独の細胞の現象であり細胞の相互作用は反映されていないことが挙げられる。低線量・低線量率域では、細胞個々の応答に加えて、組織・個体レベルでの応答が発がんに対して重要な役割を果たしていると考えられるため、動物個体レベルで現象を明らかにし、その機構を解明していくことが重要である。

研究内容

放射線リスクの主要な要因である発がんに着目し、その線量・線量率依存性を定量的に取得するとともに、線量・線量率効果をもたらす低線量・低線量率域固有の生体応答の特徴を明らかにする。実験には、放射線で腸管等のがんを誘発することが知られているモデルマウス(Minマウス)を用いる。照射は、電力中央研究所と京都大学・放射線生物研究センターの施設で行う。

(1) 発がんの線量依存性

線量0～1Gyの範囲で1回照射を行い、照射により生じたがんの数、照射後からの発症時期を調べ、発がんの線量依存性を定量的に示す。

(2) 発がんの線量率依存性

線量率20～60mGy/hの範囲で長期照射を行い、照射により生じたがんの数、照射後からの発症時期を調べ、発がんの線量率依存性を定量的に示す。

今回の報告会では、平成22年度に実施した予備実験の結果について紹介する。

DNA 損傷を標的としない発がん機構の存在

渡邊正己

京都大学原子炉実験所放射線生命科学研究部門
(msm@rri.kyoto-u.ac.jp)

放射線による細胞がん化の第一標的が DNA であることを示す証拠は多い。例えば、網膜芽細胞腫 (RB) や家族性大腸ポリポーシス (FAP) などは、原因遺伝子が特定されており、その遺伝子の突然変異が発がんの直接原因であることが明確である。しかし、それらの患者のがん発症は 10 万人に数名程度と極めて稀な事象である。ところが、実際には、ヒトの半数ががんになるのでとも単独の遺伝子変異でがんが生ずるとは考えられない。一度にたくさんのがん関連遺伝子が同時に変化するのだろうか。ヒトゲノム解析プロジェクトの結果、ヒトの全遺伝子数は、意外に少なくおよそ 25,000 遺伝子であることがわかった。そのうち、約 10% の 2,500 遺伝子が細胞増殖や血管新生など何らかの意味でがん形質に関係する遺伝子であると予想されている。一般的な遺伝子の放射線突然変異率は、およそ $10^{-5}/\text{Gy}$ 程度であることを考えると、細胞がん化 ($3 \times 10^{-2}/\text{Gy}$) が起きるためには、2,500 の関連遺伝子のすべてが同時に突然変異を起こさねばならないことになる。しかし、これまで、そうしたことが起きていることを示唆する結果はない。これらのことから放射線発がんは、突然変異を経る経路以外に発現頻度が極めて高い経路が存在すると考えるのが極めて自然である。

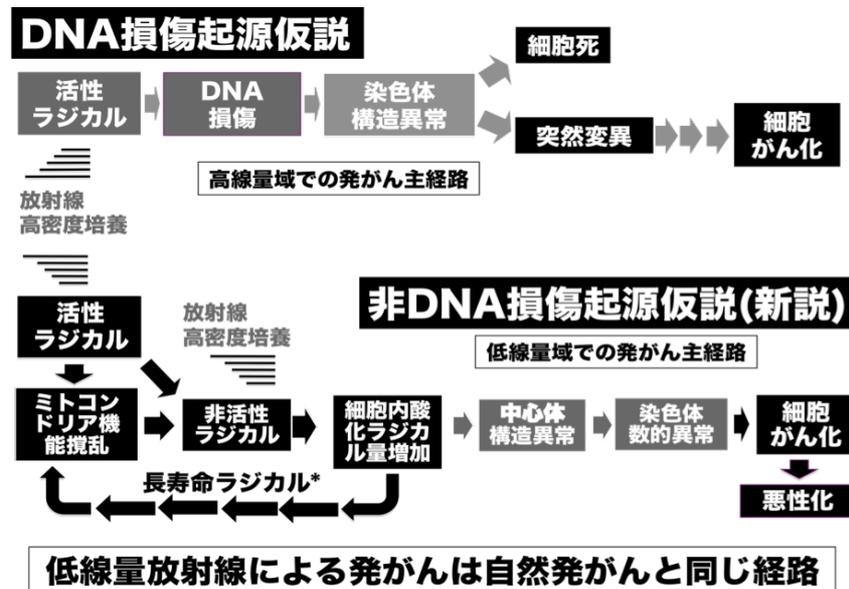


図 1 染色体異数化誘導予想図

それでは、DNA 損傷を起源としない発がん経路とはどういったものであろうか？我々は、これまで得た研究成果を基に、放射線照射によって生じた中心体構造異常が引き金となりメロトリック接合を介した染色体取り残し現象によって生ずる異数化が細胞がん化の主因であると結論して

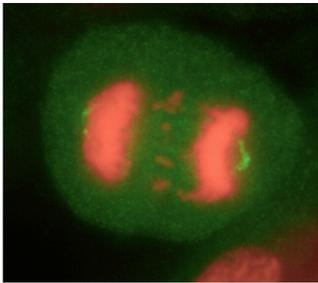


図2 メロトリック接合を介して生ずる染色体の取り残し現象

いる。この経路は、通常の生理活動でも頻繁に起こる現象で放射線発がんは自然発がんを押し上げているに過ぎないと推測される。

本報告会では、非 DNA 損傷を起源とする放射線発がん経路が放射線発がんの主経路であることを解説する。

ヒト個体レベルにおける発がんのリスク係数の不確実さ解析

杉浦紳之

近畿大学原子力研究所第3研究室

(nsugiura@kindai.ac.jp)

研究目的

放射線防護体系では、①医学・生物学の知見と②線量概念・線量評価の知見を基礎とし、様々な状況・対象についての防護方策が構築されている。本研究では、インプット情報である生物影響・疫学調査・線量評価についての「不確実さ」を定量的に評価し、それぞれが防護体系に与える影響の大きさ（感度解析）を検討する。

これまでの成果

本研究に直接関係したこれまでの研究実績はない。

研究担当者がこれまでかかわってきた放射線生物学の基礎研究から線量評価や防護理念の現場適用にいたるまでの幅広い知見をベースに検討を進める。

研究方針

2年間の研究方針

評価された線量が持つ不確実性の要因分析、及びがん、遺伝的影響の「損害」に対する重要度評価を膨大な文献調査をもとにした、ヒト疫学レベルの影響解析を行うことにより、放射線影響全体の中で放射線発がんが持つ重要性を明らかにし、さらにその影響評価結果がもつ確からしさを定量的に示す。

1) 評価された線量が持つ不確実性の要因分析

- 放射線防護体系が持つ不確実性の評価を行うことを目的とする。評価された線量がどの要因によりどの程度の不確実さを含むかの形で評価結果を整理する。
- 不確実性の主な検討対象は、以下のとおり。
 - 疫学調査：発がんのリスク係数、線量・線量率効果係数(DDREF)、発がんの発現分布モデル
 - 生物影響：発がん：上記の項目を補完する動物実験結果
 - 遺伝的影響：倍加線量、潜在的回収能補正係数(PRCF)
 - 線量評価：放射線加重係数、組織加重係数

2) がん、遺伝的影響、非がん疾患の「損害」に対する重要度評価

- ICRP2007年勧告においては、「がん」が防護対象の中心であり、「遺伝的影響」のリスク係数は引き下げられた。一方、心臓血管系疾患などの「非がん疾患」については、現状では防護体系に含める必要性はないとするものの、継続した検討が必要とされている。
- 非がん疾患（特に心臓血管系疾患）について、低線量の影響を中心とした最新の疫学調査結果のレビューを行う。この情報をもとに、ICRP2007年勧告で行われているがんと遺伝的影響の「損害」評価に、非がん疾患を加えた場合の影響を検討する。相対的な重みのみではなく、

「不確実さ」への影響に重点を置くものとする。

平成 22 年度の実施内容

放射線リスクに関する広範な文献調査を行い、発がんのリスク係数、線量・線量率効果係数 (DDREF)などを中心に知見をまとめた。ここでは、DDREFについて示す。

(1)UNSCEAR2000

- ・ $DDREF = (\alpha D + \beta D^2) / \alpha D = 1 + (\beta / \alpha)D$ で見積もられる。
- ・ 疫学・実験データを総合して考えると、安全側の評価で、DDREFは3よりは大きくないであろうと結論している。

(2)BEIRVII (2005)

- ・ LNT 仮説に DDREF を組み入れたリスクモデルを提唱している。
- ・ 原爆被爆者データから DDREF を算定し、1.5 としている。

(3)NUREG/CR 4214 (1993)

- ・ ①総線量にかかわらず線量率が 0.1Gy/h 以下の場合、②線量率にかかわらず総線量が 0.2Gy 以下の場合に DDREF を考慮する。
- ・ DDREF の値は、不確定性があることを考慮に入れて、リスクの上限値を評価する場合と下限値を評価する場合で異なる値を採用することとしている。多くのがんに対して DDREF=2 としているが、上限値評価では 1、下限値評価では 4 としている。
- ・ また、甲状腺がんでは DDREF=1、乳がんの下限値評価に対して DDREF=4 とし、中央値評価、上限値評価に対しては DDREF=1 としている。

(4)ICRP1990 年勧告及び 2007 年勧告

- ・ 理論的考察、生物における実験結果、いくつかの限られたヒトの経験から、低線量・低線量率におけるがん誘発は、高線量・高線量率で観察されるよりも低いことが明白に示されている。
- ・ DDREF は 0.2Gy 以下の吸収線量、0.1Gy/h 以下の場合に適用される。
- ・ DDREF の値として 2 を勧告する。

(5)フランス科学アカデミー

- ・ 100mSv 以下の低線量における発がんリスク評価に LNT 理論を使用することに疑問を呈している。

第二部

原子力安全研究推進事業

「低線量放射線に特徴的な細胞応答現象の発がんへの関与の研究」

低線量放射線による発がんへのバイスタンダー効果の影響メカニズム

菓子野元郎¹、渡邊正己²

1.大分大学医学部附属先端分子イメージングセンター

2.京都大学原子炉実験所放射線生命科学研究所部門粒子線生物学研究室

(kashino@oita-u.ac.jp)

研究の背景

低線量放射線において特殊な細胞応答反応を解明し、放射線に特殊な標的反応を解明するとともに、その周辺部位にまで及ぼされる“バイスタンダー効果”の生成の機構を解明する。

照射細胞と非照射細胞が混在する細胞集団の中では、細胞間情報伝達が活性化していることが示唆されている。例えば、細胞集団中の一部の細胞のみを標的にした局所的なマイクロビーム照射により、周りの非照射細胞で微小核形成などの遺伝的毒性が及ぼされることが示されている(Kashino et al. 2004. Mutat. Res)。また、照射細胞の培養上清にはバイスタンダー効果を引き起こす因子が含まれることも明らかである。

22年度の研究成果

(1) バイスタンダー効果の引き金機構の解明

放射線照射により及ぼされるミトコンドリア機能の変化と、その変化がバイスタンダー効果へ関与するの可否かを調査している。細胞は、ヒト正常細胞とヒト癌細胞を用いた。ミトコンドリアへの影響として、膜電位およびスーパーオキシドの生成量の評価を開始した。照射細胞ではミトコンドリア膜電位の低下が観察されたことから、検出系としてこの方法は適切であったことが分かった。さらなる解析を続けている。

(2) バイスタンダー効果の伝搬因子の解明

放射線を照射された細胞から分泌される因子の同定を目指している。方法としては、照射細胞の培養上清を回収し、放射線により分泌されるサイトカイン類をサスペンションアレイにより解明する。液性因子がある程度解明できたら、それらに対応する中和抗体を用いてバイスタンダー効果が阻害されるか否かを開始する。現在までに、TGF-betaの関与が示唆されたことから、さらに詳細を調べている。

(3) 遺伝的不安定性や適応応答機構との関連性

バイスタンダー効果が遺伝的不安定性の発現に影響する可能性は高いので、照射後、被ばくした細胞の子孫細胞で見られる微小核生成と突然変異誘導の発現がバイスタンダー効果の発現でどのように変動するかについての研究を始めた。微小核を指標にした解析において、バイスタンダー効果により遺伝的不安定性が誘発する可能性が示唆された。特にDNA損傷修復欠損細胞ではその影響が顕著にみられた。

中性子線による DNA 二重鎖切断の誘発と修復の線量率効果と線質効果に関する研究

高橋 千太郎、木梨友子、奥村覚二

京都大学原子炉実験所原子力基礎科学研究本部放射線安全管理学研究分野
(sentaro@rri.kyoto-u.ac.jp)

研究目的

京都大学原子炉実験所の研究炉 (KUR) の熱中性子および加速器により発生させた速中性子をチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO細胞) などの細胞に照射し、がんの誘発や細胞致死の重要な要因とされているDNA 二重鎖切断を指標として、中性子線の線質係数や線量率の効果を明らかにし、中性子線の生物影響評価と安全指針の策定に資するデータを提供すること。

これまでの成果

これまで各種の放射線や環境有害物質による DNA の損傷 (特に DNA 二重鎖切断、以降 DNA-dsb と記述) とその修復に関して研究を行ってきた。チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) とその DNA-dsb 修復欠損細胞 (xrs 細胞)、人の繊維芽細胞などを用い、放射線や環境有害物質であるヒ素、アンチモン、アスベストなどにおいて DNA-dsb が誘起されていることを明らかにし、また、放射線の種類によって誘起された損傷の修復の様態が異なり、重粒子線では損傷の修復が遅れ、長時間を経ても修復されにくい損傷形態であることなどを示した。

研究方針

5年間の研究方針

1) 熱中性子および熱外中性子線によるDNA二重鎖切断の誘発とその修復

研究用原子炉 (KUR) 重水設備において利用できる熱中性子及び熱外中性子による培養細胞での DNA 損傷 (二重鎖切断) の誘発と修復を明らかにする。この程度のエネルギーの中性子線は医療などにおいて今後多用されること、原子力施設などからの漏洩により一般公衆での被ばくが懸念されることから、特に、低線量での影響を中心に研究を進める。

平成22年度は照射条件を確定するとともに、2Gy/40min程度の吸収線量で、主にγ線との比較により、線質効果を明らかにする。平成23-24年度は照射条件を変化させ、DNA損傷の誘発や修復に線質や線量率がどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

2) 中速中性子によるDNA二重鎖切断の誘発とその修復

加速器中性子源を用いて中速中性子による培養細胞でのDNA損傷 (二重鎖切断) の誘発と修復を明らかにする。中性子のエネルギーとしては、1.5-10.0MeV程度の一般的な原子力施設の事故時に作業者が被ばくする可能性の高い領域を設定する。

平成24年度中に使用する加速器と装置の選定、照射条件の設定、照射方法の開発等を完了する。平成25年には、上記の熱中性子と同程度 (2GyEq) の線量で照射を行い、エネルギーの違いによるDNA損傷の誘発や修復の違いを明らかにする。さらに平成26年度には、線量率を変化させ、線量率効果を明らかにする。

従来の中性子線の放射線荷重係数 (線質係数) を決定する根拠となった実験の多くは、細胞突然変異や細胞増殖阻害を指標 (生物効果) としているため、比較的高い線量が用いられている。今回

の研究では、細胞増殖試験（コロニーアッセイ）などに加えて、最近利用が進んでいる γ H2AXなどの修復酵素のフォーカス形成や単細胞電気泳動法を用いることとしている。これらの方法は、比較的低い線量でもDNA損傷を検知することが可能であり、低線量・低線量率領域での知見を得ることが期待できる。

平成 22 年度の実施内容

京都大学研究炉(KUR)の重水設備について、熱中性子および熱外中性子の線量率、 γ 線の混入率、照射容器などについて検討するとともに、対照として用いる γ 線の照射装置のセットアップなど、実験に必要な照射場の設定を完了した。次にCHO細胞およびDNA二重鎖切断修復酵素であるKu80が欠損した突然変異株のxrs5細胞の照射実験を行った。細胞は常法に従ってConfluentな状態まで培養し、浮遊細胞状態でテフロン照射管に入れて照射した。照射線量を100mGyEqから2GyEqとして検討したところ、1Gy以上で γ H2AXのフォーカス形成などが有意に上昇したので、今後の実験ではこの程度の線量を用いることとした。また、中性子線と同等の線量率で γ 線を照射するための照射条件の設定も完了した。

業務実施計画に従い、本年度は細胞増殖試験に加え、DNA二重鎖切断部位に特異的に集積する γ H2AXなどの修復タンパクのフォーカス形成を指標として切断数とその修復の動態を明らかにする系について当初の予定通り染色法や画像処理手法等についての検討を進め、可視化し定量する系を確立することができた。さらに、DNAの切断を直接的に定量する方法である単細胞電気泳動法についてもその適応の可能性を検討した。その結果、細胞増殖試験では明らかに熱中性子線照射が γ 線より細胞増殖阻害能が高いことが示された。一方、フォーカス数を指標とした場合は、明確な線質効果（熱中性子と γ 線の照射による差）は認められなかったが、フォーカスの面積を比較すると中性子線照射で大きい傾向が認められ（図を参照）、DNA損傷の様態が異なっていることが示唆された。

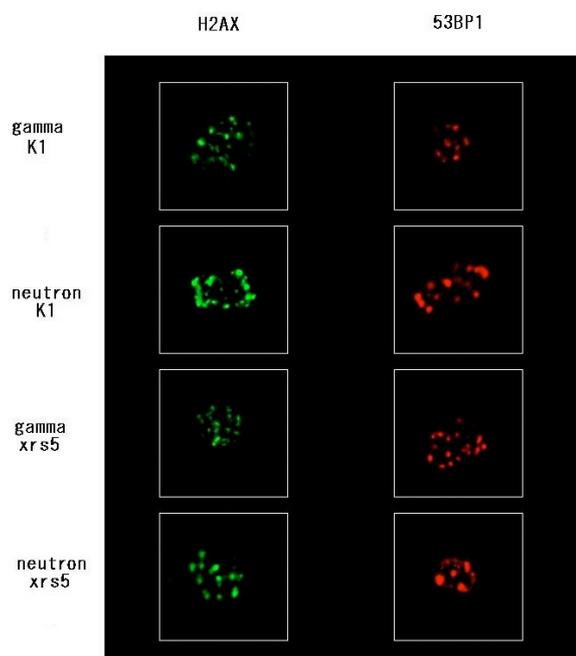


図 γ 線及び熱中性子線を照射したときの γ H2AXと53BP1のフォーカス。フォーカス数に顕著な違いはないが、形態（大きさ）に差がみられた。

放射線発がんの原因となるタンパク質標的に関する研究 -異性体ペプチドの迅速分析の開発-

藤井 紀子、藤井智彦

京都大学原子炉実験所放射線生命科学研究所機能生化学研究室

(nfujii@rri.kyoto-u.ac.jp)

研究目的

放射線照射によって生成するラジカルがタンパク質中のどのアミノ酸のどの部位にどのような化学変化をもたらすのかをアミノ酸1残基ごとに解明する。又、これらの変化が発がんに関わるタンパク質の構造や機能にどのような変化をもたらすのかを解明する。

これまでの成果

放射線の生体高分子への影響研究は大半が DNA 分子をターゲットとしておりタンパク質への放射線影響に関する詳細な研究例はほとんどない。それは放射線照射によりタンパク質中のアミノ酸残基に生じる修飾をアミノ酸一残基ごとに検出することが不可能と考えられていたことに起因している。しかし、最近の質量分析の進歩により、トリプトファン(Trp)、メチオニン(Met)、システイン(Cys)残基の酸化、リジン(Lys)残基の非酵素的糖化などを明らかにすることができるようになった。我々はこれらのアミノ酸の酸化物の検出に加えてタンパク質中のアスパラギン酸(Asp)残基の異性体(D-b-Asp)がこれらのストレスに対して有用な分子マーカーであることを提唱してきた。なぜならタンパク質構成アミノ酸はすべてL-体であるが、加齢、放射線照射、酸化的ストレスを受けると、タンパク質中のAsp残基がラセミ化および異性化してD-b-Aspへと変化し、タンパク質の構造や機能に多大な影響を及ぼすことを見いだしたからである。

研究方針

5年間の研究方針と平成22年度の実施内容

5年間の研究方針

- 1) 構造、機能の判明しているタンパク質を各種酸化ラジカルに曝露し、曝露後に生じるタンパク質構成アミノ酸のAsp残基の異性化、Trp, Met, Cys残基の酸化、糖、脂質酸化を主因とするLys残基の非酵素的糖化など、構成アミノ酸の修飾がそのタンパク質のどの部位に生じているのかを質量分析装置で一残基ごとに詳細に分析する。
- 2) また、上記で種々の修飾をうけたタンパク質の二次、三次構造変化をCDスペクトルで、四次構造変化を蛍光分析装置で詳細に解析する。
- 3) さらに修飾タンパク質の凝集変化なども動的光散乱装置などで測定する。
- 4) タンパク質の機能変化は種々の活性測定を行い、相互作用と機能解析を行う。
- 5) 上記の知見を得た後、発がんに関わるタンパク質に対して同様の分析を行う。

平成22年度実施内容

[目的]

主に上記1)について研究を進めた。タンパク質の放射線損傷ではAsp残基の異性化が構造変化に直接関わるので、Asp残基の異性体が損傷マーカーとして有用である。しかし、現在の分析法は

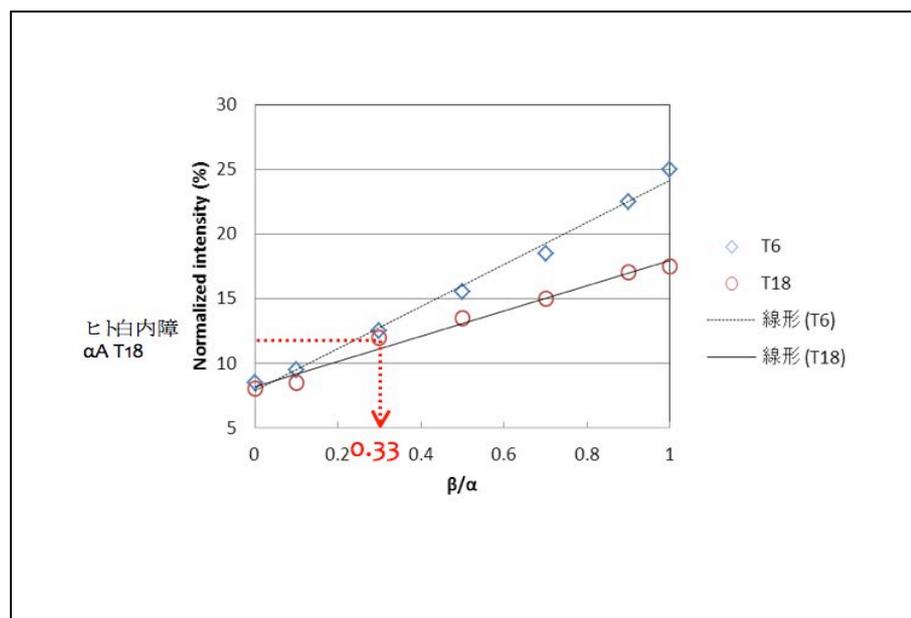
複数のクロマトグラフィー操作、サンプルの誘導化などを必要とし、非常に煩雑で時間がかかる。そこで本年度はこれらの問題を解決するために質量分析を用いた迅速、簡便な分析法の技術開発を行った。

[方法]

ヒト α -crystallin の部分ペプチドに相当する (T6 ; TVLDSGISEVR、T18 ; IQTGLDATHAER) ならびに、これらペプチド中の Asp 残基を 4 種類の異性体 ($L\alpha, L\beta, D\alpha, D\beta$ 体) に置換した異性体含有ペプチドを Fmoc 固相合成法により合成した。これらを MALDI TOF MS (Shimadzu AXIMA-TOF²) で MS/MS 分析した。

[結果]

T6 のフラグメントイオン y_8 および T18 のフラグメントイオン y_7 において α 体と β 体で強度が異なっており、 β 体の方がフラグメント強度は高かった。この強度比から下図のように T6 および T18 の β/α 比の検量線を作成し、ヒト白内障サンプルの β/α 比の算出を行った。その結果、従来の分析方法で算出した結果とほぼ一致した。本分析によりペプチド中の Asp 残基の異性体分析に要する時間は飛躍的に短縮できた。これにより、多数のタンパク質中の Asp 残基の一斉異性化分析が容易になった。



発がん防御におけるクロマチン制御因子の役割

高田 穰

京都大学放射線生物研究センター
(mtakata@house.rbc.kyoto-u.ac.jp)

研究目的

SWI/SNF複合体 (Brg1,SNF5等) などのクロマチンリモデリング因子の発がん防御における役割を明らかにする。

これまでの成果

様々ながん患者の検体の解析によって、SWI/SNF 複合体 (Brg1,SNF5 等) などのクロマチンリモデリング因子の機能消失型変異が多数発見され、本複合体が発がん、がん進展過程において重要な役割を果たすことが推定されている。SWI/SNF 複合体は、ATP 分解のエネルギーを使って、ヌクレオソームの移動 (sliding)、置き換え等、クロマチン構造変換 (クロマチンリモデリング) を行い、転写、複製等のゲノム機能に必須の役割が想定されている。しかし、その発がん防御に関連した具体的な分子機構についてはいまだ不明な点が多い。興味深いことに、Brg1 や SNF5 は放射線応答においてリン酸化されることが示されており (Matsuoka et al. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1160-6.)、DNA 損傷修復への関与も示唆されている (Lee et al. *EMBO J*. 2010 Apr 21;29(8):1434-45; Peng et al. *Nat Cell Biol*. 2009 Jul;11(7):865-72.)。本研究は、低線量放射線をミミックする単一二重鎖切断誘導への細胞応答を解析し、DNA 損傷応答におけるクロマチンリモデリング因子の役割の解明をめざす。

研究方針

5年間の研究方針

発がん防御における SWI/SNF 複合体クロマチンリモデリング因子の役割を明らかにするため、まず、低線量放射線に対する分子細胞応答を、細胞あたり一個の DNA 二重鎖切断 (DSB) を酵素的に誘導することで部分的にミミックする系を樹立する。この系を用いて、細胞の生死、細胞周期チェックポイントなどの細胞応答と、DSB 部位での分子応答を中心に、クロマチンリモデリング因子 Brg1 と SNF5 の役割に焦点をあて、その分子機構を解析する。

(1) 単一 DSB 誘導システムの確立(平成 22-23 年度):

制限酵素 I-SceI をトランジェントかつタイトに発現制御可能な細胞株を構築し、染色体上の単一部位に DSB を誘導する系を作成することを試みる。モデル細胞系として、まず、汎用性の高い 293T 細胞を用いる。最初の二年間をこれにあてる。系の構築後、DSB の修復効率や細胞の生死、細胞周期に及ぼす影響を検討する。

(2) 各種クロマチンリモデリング因子の強制発現、ノックダウンによるDNA損傷応答における役割の解析 (平成22-24年度) :

H1299 細胞、293T細胞にBrg1、SNF5などの強制発現、ノックダウンを行い、ウェスタンブロットで検証する。その上で、染色体単一部位にDSBを誘導する系を応用し、細胞応答への影響を検討する。

(3) 単一 DSB 部位におけるクロマチン構造と DNA 損傷応答の解析 (平成 24-26 年度) :

クロマチン免疫沈降法の最適化、各種因子の DSB への集積の解析、クロマチン応答と細胞応答との関係の解析等を予定している。

平成 22 年度の実施内容

(1) 単一 DSB 誘導システムの確立:

オーキシングロンとの融合蛋白質として、ドキシサイクリン誘導性プロモータによって I-SceI を発現することにした。293 細胞から樹立された関連細胞株 FlpIn T-rex 293 細胞における発現系、オーキシングロン系が我々の研究室で良好に機能することは確認した。現在、プラスミドの構築と細胞株へのトランスフェクション準備を行っている。

(2) 各種クロマチンリモデリング因子の強制発現、ノックダウンによる DNA 損傷応答における役割の解析:

まず、Brg1 を欠損する細胞における DNA 損傷応答を解析することにした。その目的で肺がん細胞株である H1299 細胞、A549 細胞が Brg1 遺伝子を欠損すると報告されているので、複数のソースから同細胞株を収集し、ゲノムを解析したところ、いずれにも報告通りの両アレル欠損を認めた。したがって、これらの細胞株は Brg1 に関してヌル変異を有すると判断される。

これらの細胞株にヒト Brg1 を発現させるべく、発現ベクターを構築し、導入した。野生型の Brg1 (WT) と、RB 結合領域を欠損させた Brg1(DRB)の両方を用意した。A549 においては発現クローンを得ることができなかったが、H1299 細胞においては WT、DRB の両方の発現したクローンを得ることができた。これらの細胞は、いずれも増殖が緩徐化しており、それは WT 発現細胞でより顕著であった。これらの細胞にシスプラチンや CPT で DNA 損傷を与えたところ、コロニー生存率がコントロール細胞に比して低下しており、Brg1 が果たして DNA 修復を促進していると考えて良いかどうか、さらに検討を要する。また、GFP-Brg1 発現細胞で、レーザー局所照射による集積がおこるかどうかを解析したが、集積を認めることができなかった。

さらに今後、Brg1、SNF5 などのノックダウンを行い、ウェスタンブロットで検証する。その上で、染色体単一部位に DSB を誘導する系を応用し、細胞応答への影響を検討したい。

低線量域における p53 の活性制御機構に関する研究

松本 智裕、土生 敏行、井倉 毅
京都大学 放射線生物研究センター
(tmatsumo@house.rbc.kyoto-u.ac.jp)

研究目的

低線量放射線によるストレス存在化で、p53-p31comet 複合体形成を制御する分子機構を解明すること、さらに、この複合体の分子機能を解明し、放射線被曝をした細胞の運命決定機序の解明を目的とする。

これまでの成果

p53 癌抑制遺伝子は様々なストレスに応答し細胞の生死運命を決定する因子であることが知られている。低線量放射線照射においても同様に p53 の活性化が起こり、細胞周期停止や細胞死の調節に深く関わっていることも知られている。我々は DNA 損傷を引き起こす抗癌剤等による低レベルの DNA 損傷誘導時に特異的に p53 に結合する因子、p31comet を同定し、p53-p31comet 複合体が、細胞周期制御因子である p21 の発現に必須であることが見いだした。放射線照射においてもその複合体が形成されることを確認でき、p21 遺伝子発現誘導に関わっていることが分かった。

研究方針

5 年間の研究方針

低線量放射線が及ぼす細胞周期への影響の分子機序を解明するため、低線量域に特異的な p53 の活性制御機構を解析する。

p53-p31comet 複合体形成の線量依存性に関する試験を実施する。細胞の放射線感受性は、線量と組織、そして遺伝的背景により大きく左右される。各種細胞の放射線応答を、細胞死・細胞周期停止などの表現形、また p53 標的遺伝子の発現誘導、さらにそれを制御すると考えられる p53-p31comet 複合体形成能の 3 つを指標として精査し、低線量域での細胞の放射線応答をカタログ化する。

DNA 損傷ストレスと p53 活性化の相関関係の解析：

放射線照射を疑似した抗癌剤による DNA 損傷ストレス応答の解析では、その刺激に呼応してレベルに依存せず p53 タンパク質の蓄積・活性化が起きる。一方 p53 標的遺伝子 p21 の発現誘導は低損傷レベル時にのみ観察され高レベル時には見られない。反対に細胞死関連遺伝子発現誘導はストレス依存的に発現誘導が観察される。このように損傷レベルの違いにより標的遺伝子の発現誘導能がことなることと、我々が発見した p53-p31comet の複合体形成能は非常に相関関係があることを見出している。この相関関係の線量依存性について詳細に調べる。

放射線応答と遺伝的背景の解析：

p53-p31comet 複合体形成能が p53 標的遺伝子発現誘導能と深く関わっていることから、p31comet が DNA 損傷応答にどのような影響を与えるか siRNA によるノックダウン法により解析を行った。野生型 p53 を持つ細胞株 HC116, BJ 等により p31comet 発現を抑制すると興味深いことに BJ 細胞株は、p31 遺伝子をノックダウンするだけで細胞死を誘発した。また HCT116 細胞株は p31 遺伝子を

ノックダウンすると DNA 損傷による細胞死の頻度が上昇した。細胞株ごとにノックダウンによる表現形が異なることは、p31 遺伝子が組織や遺伝学的背景により特異的な機能を果たすことを示唆するものと考えられる。特に HCT116 細胞株では低ストレスに対する応答が大きく変化し感受性が増すことを明らかにした。低線量域における p53-p31comet を介した放射線応答の解析をさらに進めていく。

低線量放射線による細胞の表現形、p53 標的遺伝子発現、p53-p31comet 複合体形成の 3 つの指標のカタログ化を行い、p53-p31comet 複合体形成の制御機構の解析を行っていく。

活性酸素防御タンパク質および酸化 DNA 修復酵素の発現変動 と細胞の放射線応答に関する研究 -ミトコンドリア局在型 SOD2 による放射線障害抑制効果-

秋山秋梅、橋口一成、細木彩夏
京都大学大学院理学研究科生物科学専攻環境応答遺伝子科学研究室
(qmzhang@kingyo.zool.kyoto-u.ac.jp)

研究目的

放射線照射によって細胞中に多くの活性酸素が生じる。代謝の過程でミトコンドリアから漏れ出す活性酸素もある。これらの活性酸素は細胞中の DNA やタンパク質、脂質などの生体分子に損傷を与えて、突然変異などの障害を起こす要因になっている。突然変異の蓄積は細胞をがん化する重要な原因の一つである。低線量放射線照射および細胞代謝で生じる活性酸素が複合作用として細胞にどのような影響を与えているのか、それに対して、細胞の酸化ストレスに対する防御機構がどう応答するのかに関する研究はまだ不十分である。本研究は、(1) 活性酸素防御酵素 SOD や細胞内の酸化還元状態（レドックス）を維持する酵素グルタレドキシシン（Grx）、DNA の酸化的損傷塩基を修復する酵素 OGG1 および酸化ストレスの防御に働く新規タンパク質 OXR1 に焦点をあてて、まず、ヒト細胞でのそれぞれの高発現株あるいは RNAi によって発現を抑制した細胞株を樹立し、それらの細胞の放射線に対する細胞応答の変動を調べる。さらに、(2) 核 DNA 損傷、ミトコンドリアの障害、細胞質でのタンパク質の酸化を指標にした低線量放射線の細胞への作用、(3) 細胞内での酸化ストレスおよびその防御の間のバランス破綻や DNA 修復機構の変動に伴う発がんとその分子機構の解明に貢献する。

これまでの成果

ヒト培養細胞 HeLa S3 から、細胞質に局在する CuZnSOD (SOD1) とミトコンドリアに局在する MnSOD (SOD2) をそれぞれ高発現する細胞株を樹立し、それらの γ 線感受性を比較した。SOD1 高発現細胞株は HeLa S3 細胞と同じ程度の感受性を示したが、SOD2 を高発現した細胞株は HeLa S3 細胞に比べて放射線抵抗性を獲得した。放射線照射後での細胞内の活性酸素レベルの増大が SOD2 高発現した細胞では抑制された。細胞内での酸化タンパク質の増大も観察され、これらの事実は、ミトコンドリアで発生した活性酸素が細胞全体に拡大することを示している。さらに、この活性酸素が細胞核の DNA に損傷を与えることが分かった。これらの結果は、ミトコンドリアでの酸化ストレスが細胞核に波及したことを示している。

研究方針

5年間の研究方針

電離放射線の生体分子に対する作用は、対象となる分子が照射によって直接励起あるいは電離することによって損傷を受ける直接作用と、周辺のおもに水分子の放射線分解によって生成する酸素ラジカル (ROS) を介して起こる反応による間接作用がある。後者の場合、これらの酸素ラジカルが DNA、タンパク質、脂質などと反応し、それらを非特異的に酸化する。DNA が酸化されると、鎖切断、塩基酸化体（塩基損傷）や脱塩基部位を生じさせ、細胞致死や突然変異のおもな原因になる。

放射線照射によって生成する酸素ラジカル消去に関わる SOD、レドックス維持酵素 Grx など抗

酸化酵素高発現させ、細胞の放射線への応答変動を観察する。酸化損傷 DNA を修復する酵素 OGG1 および酸化ストレス防御にはたらく新規タンパク質 OXR1 をそれぞれ高発現するヒト細胞株あるいは RNAi で発現抑制した細胞株を樹立し、放射線やゲノム損傷性薬剤に対する感受性や応答を解析する。さらに、低線量放射線の細胞への作用における核 DNA 損傷、ミトコンドリアの障害とそれらの酸化防御の役割を解明する。

平成 22 年度の実施内容

SOD 高発現細胞の樹立と細胞の放射線応答を検出するためのいくつかの指標を開発する。

(1) SOD を高発現する細胞株の樹立と放射線照射条件の検討：

T-REx HeLa 細胞株において SOD 2 を高発現した細胞株を樹立しました。

SOD 2 高発現細胞株における、下記のいくつか指標について検討した。

(2) 活性酸素測定系検討：

照射後の時間とともに、細胞内の活性酸素拡散が起こると予想されるので、その拡散が SOD 2 高発現により抑制されるかどうかを検討する。そのため、本年度放射線照射によってミトコンドリアでのスーパーオキシド増大の検出系を確立している。SOD2 高発現株では、放射線照射によってスーパーオキシドの生成を抑制した結果を見いだした。

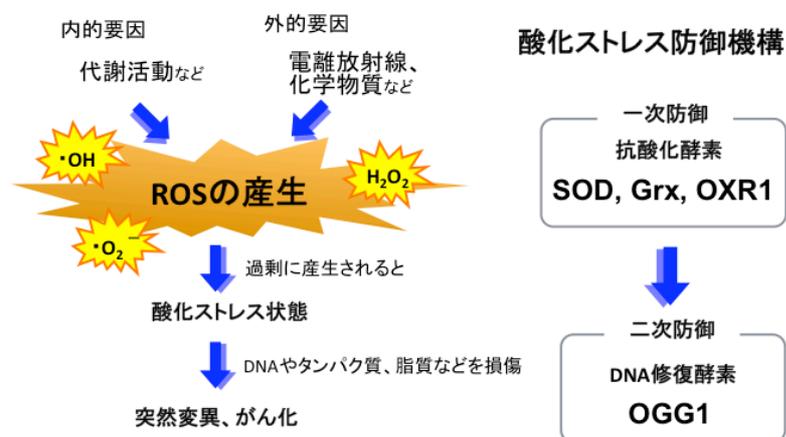
(3) 酸化タンパク質検出系開発：

放射線照射による酸化タンパク質の増加と、SOD 2 高発現により抑制効果を検討する。そのために、細胞のタンパク質を抽出して、電気泳動後、酸化タンパク質のカルボニル化検出系を確立した。

(4) ミトコンドリア形状変化の検出系の確立：

放射線発がんに関する細胞内標的がミトコンドリアである可能性が予想されるので、ミトコンドリアの形状変化が起きると思われる。そこで、ミトコンドリアの形状変化可視化する方法を本年度で確立した。

活性酸素種 (ROS)



放射線発がんに影響するバイスタンダー効果の発現機構の研究 培地経由バイスタンダー効果による長寿命ラジカル発現

熊谷 純

名古屋大学大学院工学研究科 化学・生物工学専攻
理論計算化学・放射線化学研究室
(kumagai@apchem.nagoya-u.ac.jp)

研究目的

低線量放射線発がんにおけるバイスタンダー効果の寄与が注目されている。放射線バイスタンダー効果とは、集団系の細胞の一部を放射線照射すると、物理的に放射線のエネルギーを吸収した履歴のない細胞にも放射線のエネルギーを吸収したのと同等の生物影響が現れる現象である。低線量・低線量率被ばくで評価すべき重要な影響は発がんであり、発がんにおけるバイスタンダー効果の発現機構の解明は大変重要な課題である。バイスタンダー効果の評価は一般に生物影響の頻度を指標としているが、本研究課題項目代表者等はバイスタンダー効果の発現する細胞中の長寿命ラジカルを電子スピン共鳴法で観測する手法をほぼ確立している。これは、生物学的ではなく物理化学的な分析方法でバイスタンダー効果の評価を行える唯一の系である。本研究では、バイスタンダー効果の発現機構とそれと深く関連していると思われる遺伝的不安定性に依存する染色体の異数化過程、さらにがん化した細胞におけるラジカルの消去方法を探り、放射線発がん機構およびその防御方法の確立を目的とする。

平成 22 年度の実施内容

<実験>

ヒト hiMSC 細胞を用い、培地移動によるバイスタンダー効果発現実験を行った。バイスタンダー因子のドナー用の細胞として、 7.0×10^6 個の hiMSC 細胞を 35 mL の D-MEM (Invitrogen prime) 培地と共に T175 フラスコに撒き、24 h 後にフラスコ内の培地を 100 mL の新しい培地と交換し、 γ 線照射した(4 Gy, 0.25 Gy/min)。ドナー細胞と同時間に 4 つの T175 フラスコにバイスタンダー因子のレシピエント用細胞を 3.5×10^6 個ずつ蒔いた。ドナー細胞のフラスコの γ 線照射後 24 h 後に、レシピエント細胞の入っているフラスコの培地を抜き取り、ドナー細胞の培地を $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過して各フラスコに 18 mL ずつ加え、その 24 h 後に細胞を回収して ESR 測定用石英チューブ (JEOL 製) に移し、チューブ内の細胞を液体窒素で凍結後、チューブを封緘した。

バイスタンダー因子の 1 つとして注目されている Transforming Growth Factor- β 1: TGF- β 1 (Sigma) の入った 4 mM HCl-BSA 水溶液は、放射線照射されていないドナー細胞の培地をレシピエントに移す際に、5 ng/mL の TGF- β 1 の濃度となるよう添加し、添加後 24 h 後に細胞を回収し、同様に ESR チューブに詰めた。

ESR 測定は、JEOL JES-RE1X 装置を用い、77 K で行った。

<結果>

図 1 に hi-msc 細胞の ESR スペクトルを示した。Control と比較して、照射後培地移動 (Medium Transfer: MT) した場合と比較して特に違いは見られなかった。TGF- β 1 を添加した場合は、若干シグナルが

大きくなった。図2に ESR シグナルを二重積分して求めた細胞中のラジカル量を示した。ドナー細胞の培地を照射して(4 Gy)24 h 後にレシピエント細胞に移動してみても、現時点で対照群と有意差は見られなかった。一方、TGF β 1 を加えた場合は、ラジカル量が増える傾向が見られた。

CHO細胞の場合は、照射後の培地移動で有意なラジカル量の上昇が見られたが、hiMSC 細胞においては特に変化が見られなかった。現時点でその詳しい理由は不明であるが、ヒト細胞の方がハムスターの細胞と比較してバイスタンダー効果が起こりにくいように見える。その場合、ドナー側の細胞の問題（バイスタンダー因子の濃度が低い）か、レシピエント側の影響なのかを将来調べていきたい。また、TGF- β 1 を添加した結果に関しては、統計的に有意差が出るまでサンプル数を増やしていきたいが、 γ 線照射培地の結果と比較すると、ドナーの培地には 5 ng/mL より低い濃度の TGF- β 1 しか入っていなかったと推察される。今後はどれくらいの濃度で長寿命ラジカル濃度の上昇が見られるのか確かめていきたい。また、放射線を直接照射された hiMSC 細胞のラジカルについてもまだ観測を行っていきたい。

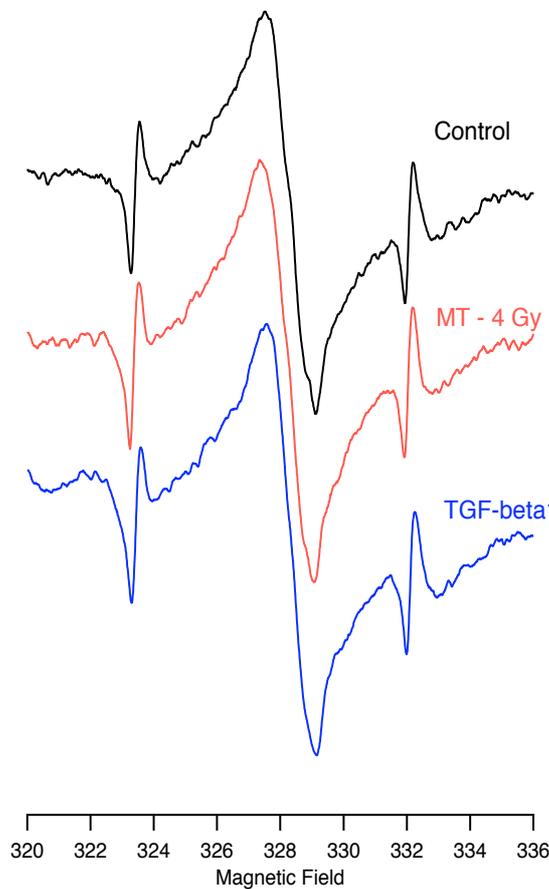


図1 レシピエント hiMSC 細胞の ESR スペクトル。

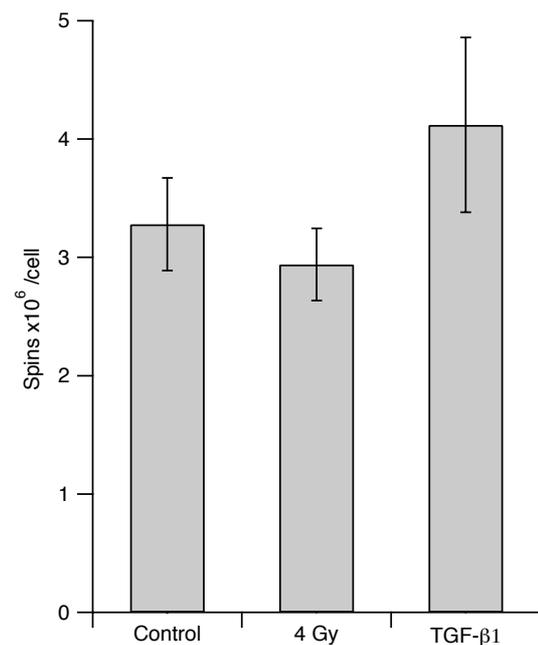


図2 レシピエント hiMSC 細胞のラジカル量 (サンプル数は TGF β 1 が 3, 他は 4)

低線量放射線による DNA 損傷に対する修復の分子機構と
細胞応答の解析(1)
田内 広
茨城大学理学部 生物科学領域
(htauchi@mx.ibaraki.ac.jp)

研究目的

本課題担当者の1人である田内は、これら多様な放射線応答の側面のうち、発がんへの関与が大きいと考えられる2つの事項に注目して解析を進めてゆく。具体的には、(1)動物培養細胞でのDNA損傷の検出法を用いて、放射線照射直後からのDNA再結合過程における損傷修復タンパク質の貢献度を明らかにする、(2)低線量放射線によるDNA損傷の修復効率と突然変異生成との関係を、極めて高感度に突然変異を検出できる独自の細胞系を用いて解析することの2点である。また、再委託機関の代表である立花が中心となって低線量放射線により誘導される適応応答について、特に低線量率放射線による適応応答の誘発や、そのシグナル伝達機構の解析をすすめる。

これまでの成果

低線量放射線被ばくの影響を実際のデータで明らかにするためには従来にない高感度、すなわち可能な限り低線量でも生物影響を検出できるような新規の実験系開発が必要となる。DNA損傷そのものについては、比較的高感度な検出系としてコメット法やリン酸化ヒストンH2AXを検出する方法などがあるが、最終的な結果として生じる遺伝子突然変異などに関しては、高感度系はほとんどなかった。我々は、低線量あるいは低線量率での体細胞突然変異誘発を従来の50-100倍の高感度で検出できる細胞系を開発し (Tauchi *et al.* 2002)、通常の実験系では難しかった重粒子線の低線量率照射実験をおこなって、逆線量率効果(線量率があるレベルよりも低くなると同じ線量での生物影響が大きくなるという特殊な現象)が放射線の粒子種ではなく、放射線の線エネルギー付与(電離の密度)に依存する現象であることを明らかにした (Tauchi *et al.* 2009)。

研究方針

5年間の研究方針

(1) DNA 損傷の再結合過程の解析について:

DNA二重鎖切断は、放射線で効率よく引き起こされる損傷のうちで最も重篤なものである。本課題では、数Gyレベルの被ばくで生じたDNA二重鎖切断が細胞の中で修復される過程を、コメット法(単一細胞ゲル電気泳動法)を用いて個々の細胞レベルで解析する。特に、DNA二重鎖切断の修復に関わる酵素を欠損させた細胞を用いて、2Gy程度の放射線で生じたDNA二重鎖切断が再結合されるまでの時間的な経過を調べ、未知の修復経路を含むそれぞれの修復経路が、どの程度の割合で関与しているのかを明らかにすることを目指す。

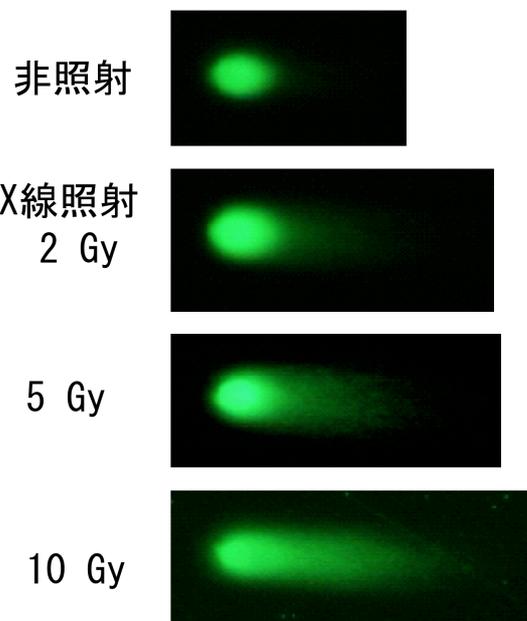
(2) 突然変異実験について:

本課題で用いる突然変異の高感度検出系は、ハムスター培養細胞にヒトX染色体を導入した培養細胞で、導入されたヒトX染色体上のHPRTという酵素の遺伝子に生じる変異を検出する系である。この系は、0.2Gy程度のX線でも明らかに突然変異頻度が上昇し、変異のほとんどが放射線被ばくによく見られる欠失型変異となる。しかも、その欠失範囲が大きくなる傾向があることから、異種生物細胞への移入によるヒト染色体の不安定性に加えて、放射線DNA損傷によく応答する特定の

修復反応（おそらくは DNA の組換えを介する機構）が大きな欠失を生じさせているものと考えられる。そこで本課題では、相同組換え（DNA 組換えを介した修復経路）の制御に関わることがわかっているタンパク質の異常型を、この培養細胞に導入・発現させて、相同組換え機能を抑制した細胞系を樹立する。この細胞を用いて低線量・低線量率の放射線被ばくによる遺伝子突然変異を調べ、実際に組換え反応が突然変異にどの程度関与しているのかを明らかにしたい。最終的に、前述のコメット法による DNA 再結合と損傷修復タンパク質の寄与とを総合して、DNA 切断の再結合から突然変異の生成に至る過程を明らかにするための糸口をつかみたいと考えている。

平成 22 年度の実施内容

- (1) 動物培養細胞の野生株および DNA 二重鎖切断修復タンパク質を欠損する細胞を用い、中性コメット法による DNA 損傷の検出の実験条件と手順を確定させることができた。当初予定よりも早く DNA 二重鎖切断の再結合過程を解析する実験に着手した。
- (2) 体細胞突然変異を高感度に検出できる細胞系を用いて、相同組換え修復に関わるタンパク質機能を抑制した細胞系の構築に着手し、細胞系が完成見込みとなっている。



中性コメット法を用いた DNA 二重鎖切断の検出例
(X 線照射直後、ニワトリ DT40 細胞)

低線量放射線による DNA 損傷に対する修復の分子機構と細胞応答の解析(2)

立花 章

茨城大学理学部

(akiratac@mx.ibaraki.ac.jp)

研究目的

低線量・低線量率の放射線による発がん機構には不明な点が多いが、細胞におけるDNA損傷の生成とその修復、それに伴う突然変異生成、あるいは放射線を刺激とする細胞の応答などが相互に関連して発がんに関与しているものと考えられている。

こうした点を明らかにするために、動物培養細胞を用いて低線量放射線により誘導される適応応答について検討する。細胞に微小線量の放射線を照射すると、その後の高線量放射線に対して防御的な作用を示すことがあり、放射線適応応答と呼ばれている。このような適応応答反応は、大腸菌から植物や動物まで生物界に広く見られており、また細胞だけでなく個体でも観察されることから、生物の持つ基本的な防御機構であると考えられる。本研究では、低線量放射線、特に低線量率放射線による適応応答の誘発や、そのシグナル伝達機構について解析する。

こうした検討により、放射線適応応答による低線量放射線に対する細胞応答とその誘導機構を解明し、低線量放射線の発がん頻度への影響についての基礎的知見を得て、放射線発がんとの関連を明らかにすることを旨とする。

これまでの成果

これまでに我々は、マウス線維芽細胞を用いて放射線適応応答の解析を行ってきた。その結果、細胞内情報伝達に関与する重要なタンパク質であるプロテインキナーゼ C (PKC) が重要な役割を果たしており、殊にそのうちの1種である PKC α の発現が低下した細胞では放射線適応応答が見られないことから、少なくとも PKC α は適応応答誘導に必要であることを明らかにした。一方、がん抑制遺伝子としてよく知られている p53 タンパク質は、多数の遺伝子の転写調節に関与し、また細胞周期や細胞死、あるいは DNA 修復など多様な細胞機能の調整を行っている。この p53 を欠損した細胞でも放射線適応応答が起こらないことが見いだされた。しかし、p53 が関与する機構を含めた詳細な解析は未だ行われていない。

我々はこれまで低線量放射線照射を行ってきたが、線量率は高く、低線量照射をするために極めて短時間の照射を行ってきた。また、この場合には放射線適応応答が誘導される線量は非常に低い線量の範囲に限定されていた。しかし、低線量率で照射すると長時間照射して総線量が比較的高い時にも適応応答が観察されることが、他の研究室から報告されている。このことは、低線量率放射線を細胞が感知し、その情報に対して応答していることを示している。この点について確認するとともに、その機構を解明することは、低線量率放射線の効果を明らかにする上で重要である。

研究方針

(1) 5年間の研究方針

我々はこれまでにマウス胎児から由来した線維芽細胞の m5S 細胞を用いて様々な検討を行って

きた。異なる種類の細胞を用いると、適応応答に違いが見られた場合、遺伝子発現の違いによるものであるのか、あるいは細胞の性質の違いによるものであるのかを判別することが困難である。しかし、同一の細胞を用いて、遺伝子発現を変化させたときに適応応答に違いが見られれば、遺伝子発現の相違によるものであると判断することができる。従って、できるだけ同一細胞を研究に用いることによって、実験間の比較を容易にすることを計画している。

がん抑制遺伝子である p53 は、多様な細胞機能の調節に関与しているが、我々の研究から放射線適応応答にも関与していることが示唆された。このことを確認するとともに、p53 が放射線適応応答の誘導にどのように関与しているのかについて検討する。放射線適応応答では DNA 損傷を正しく修復する機能が上昇しているとする報告があるが、p53 は DNA 修復に関与するという報告もあるため、p53 により DNA 修復能が上昇している可能性がある。一方、p53 は細胞死も制御しており、このことが放射線適応応答に関わっている可能性もある。このような可能性について検討を行い、放射線適応応答での p53 の役割を明らかにする。腫瘍形成において p53 は重要な役割を占めているので、こうした検討は低線量放射線による発がん過程の解明に寄与することが期待できる。

また、低線量率放射線によって適応応答が誘導されるかを検討する。誘導されるのであれば、細胞は低線量率放射線を感知していることになるが、それはどのようなシグナルであるのか、またそのシグナルは細胞内でどのように情報伝達されるのかについて、PKC α や p53 の関与に焦点を絞って解析する。

(2) 平成 22 年度の実施内容

がん抑制遺伝子 p53 のタンパク質が低下した細胞を得るために、RNA 干渉法 (RNAi) を行って遺伝子発現を抑制することを試みた。3 種類の siRNA を用いて、ウェスタンブロット法によりタンパク質量を検討したところ、遺伝子発現が低下していることを確認した (図)。従って、m5S 細胞で p53 タンパク質を減少させるのに RNAi が有効であり、今後この方法を用いて p53 タンパク質量を減少させた細胞を用いて適応応答の検討が可能であると考えられる。

さらに、低線量率放射線により適応応答が誘導されるか、また総線量がどの程度まで有効であるかを検討するため、0.8 mGy/min の線量率で 24 時間の照射を行って適応応答の誘導についても実験を実施した。

