

# 小児期被ばくの放射線感受性と DNA 修復に関する研究

(受託者) 国立大学法人京都大学

(研究代表者) 小松賢志 放射線生物研究センター

(再委託先) 国立大学法人広島大学、独立行政法人放射線医学総合研究所

(研究開発期間) 平成 22 年度～ 24 年度

## 1. 研究開発の背景とねらい

本事業では、放射線影響の年齢依存性とその原因となる分子機構の解析を行う。PET や CT などの診断による医療被ばくが年々増加して、我が国では国民のがん発生の 3% に相当する被ばく線量に達している (Lancet 363, 345-51, 2004)。小児は、放射線感受性が特に高いと見なされ、また成人より平均余命が長いために、医療被ばくによる障害が成人より数倍高くなる可能性が指摘されている。実際、チェルノブイル事故の甲状腺腫瘍や広島・長崎の原爆被爆者の固形がんでは小児ほど高い感受性が顕著に見られる。しかし、疫学資料からは年齢による違いがほとんど見られない健康影響もあり、小児期における放射線被ばくの影響の評価とその根底機構の解析研究が求められている。

DNA 修復が放射線生物影響の重要因子であることは、DNA 修復欠損患者やノックアウトマウスが放射線感受性と高発がんを示すことから明らかである。しかし、ノックアウト細胞では自然加齢が促進しており年齢依存性の研究に利用出来ない。このため、放射線感受性の年齢依存性の解析には、正常なマウスに相同組換え修復および非相同末端再結合などの DNA 修復のレポーター遺伝子を発現させた遺伝子改変動物が必要である。しかし、現在までに諸外国を含めてこのようなマウスは作製されていない。本研究では、DNA 修復レポーター遺伝子を組み込んだマウスの開発と、それを利用した放射線影響の年齢依存性の解析を、京都大学放射線生物研究センターの DNA 修復の専門家グループ、トランスジェニックマウス作製の広島大学の専門家とマウスの年齢依存性の研究で実績のある放射線医学総合研究所の専門家との共同研究により行う。

## 2. 研究開発成果

### 2.1 トランスジェニックマウスの開発

放射線による DNA 損傷の修復には相同組換え修復と非相同末端再結合の二種類の経路がある。相同組換え修復には DR-GFP レポーター遺伝子 (図 1)、そして非相同末端再結合には pEJ レポーター遺伝子が細胞レベルの研究に用いられている。実験では、これらのレポーター遺伝子のプロモーターをマウス個体で発現するプロモーターに変換したコンストラクトをマウス ES 細胞に単一コピーを導入する。その後、ES 細胞をマウス胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスを作製し、生殖細胞系列伝達 (germline transmission) を介して遺伝子改変マウスを作製する (図 2)。

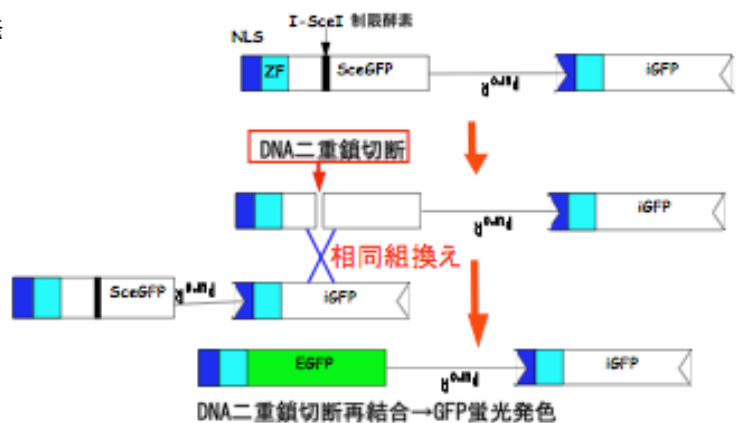


図 1. DR-GFP による相同組換え能アッセイ系

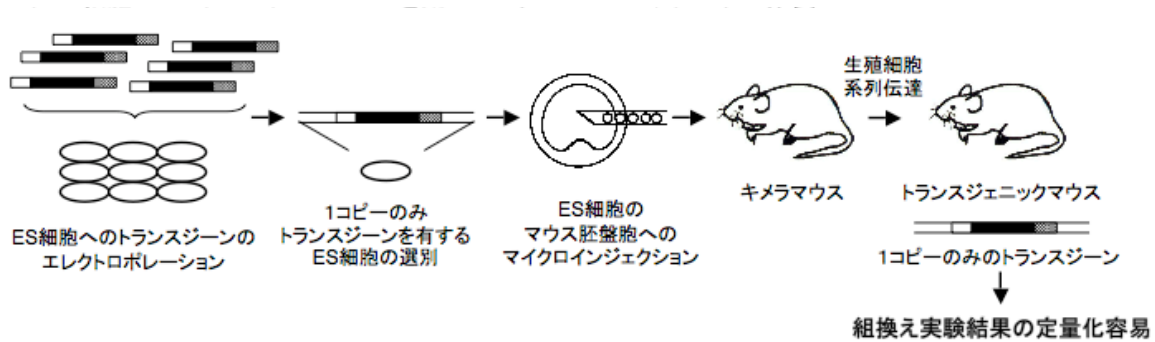


図2. ES細胞とエレクトロポレーションを用いた遺伝子改変マウスの作製

M. Jasin 博士らによって開発された既存の DR-GFP コンストラクトは図3のような構造をしており、①GFP 発現のためのプロモーター、②Sce-GFP、③薬剤耐性遺伝子 (図では Puromycin 耐性遺伝子)、④iGFP、の4つの部品から成り立っており、これら4つの部品が最低限必要な部品となる。本研究でもこれら4つの部品を組み込んだコンストラクトを作製する。基本構造は既存の DR-GFP コンストラクトと同じであるが、本研究では①のプロモーターとしてマウス個体で発現する ScaI 遺伝子のプロモーターを使用する。また、③の薬剤耐性遺伝子としては loxP 配列で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子 (loxP-Neor) を使用する。ネオマイシン耐性遺伝子は遺伝子改変マウス作製後に不要になるため、マウス作製後に Cre-loxP のシステムによりゲノム上から除去する。

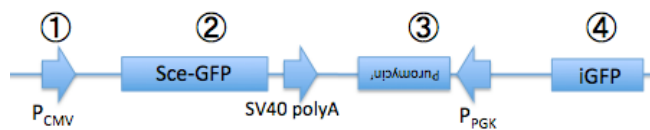


図3 オリジナルの DR-GFP コンストラクト

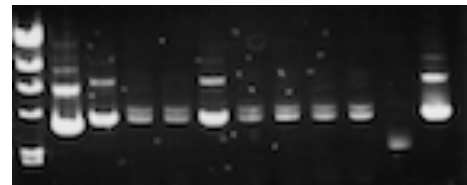


図4. SK+SceGFP+loxP-Neor<sup>r</sup> 電気泳動  
左から、λ/HindIII マーカー、#1、  
#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10

ScaI プロモーターが組み込まれたプラスミド APLy6A は、17.3Kbp と非常に大きく、またそのうち 14.3Kbp がプロモーターの機能として必要のため、このプラスミドからプロモーター部分を切り出して使用することは難しい。そこで今回は、Sce-GFP、loxP-Neor、および iGFP を APLy6A に組み込むという方法で DNA コンストラクトの作製を行う。具体的には、Sce-GFP、LoxP-Neor、iGFP をそれぞれ PCR で増幅させ、これら3つを結合した物をまず作製し、最後にこれを APLy6A に挿入する。それぞれの PCR プライマーにはサブクローニング時に使用出来るように異なる制限酵素認識配列を付加させておく。PCR で増幅させた断片については PCR による変異導入の可能性があるため、全長にわたってシークエンスの解析を行い、変異が導入されていないことを確認する必要がある。作製した Sce-GFP、LoxP-Neor、iGFP の連結コンストラクトは図4の通り一つ (#9) を除いて全てが予想された大きさのプラスミドであることが分かった。しかし、DNA シークエンス解析によりインサートの確認を行った結果、#1、#4、#10 は iGFP 断片が逆向きに繋がっていることが判明した。

次に、作製した DNA コンストラクトをマウスに導入した。通常行われる方法は、直接マウス受精卵前核にマイクロインジェクションすることにより行なう。しかし、この方法では数十コピーか

ら数百コピーが挿入されてしまう欠点があるので、ES細胞とエレクトロポレーション法を用いてトランスジェニックマウスを作製することを試みた。エレクトロポレーション法は、通常数コピーの遺伝子しか挿入されないため、ESクローンを単離した後でDNAを抽出し、サザンブロット法を用いることにより、1コピーのみの目的遺伝子を有するクローンが選択可能である。今回、 $10^7$ 個のES細胞を用いて240Vの電圧と500 $\mu$ Fの電気抵抗でエレクトロポレーションを行った結果、最終的には約50個のネオマイシン耐性クローンを得ることが出来た。

## 2.2 トランスジェニックマウスのDNA修復に関する解析

本研究で開発する遺伝子改変マウスは他に報告例がないので、導入された修復レポーター遺伝子がマウス臓器内で機能しているかどうかを他の方法で検証する必要がある。放射線により損傷を受けたDNA上の蛋白を免疫染色する方法は、定量性には欠けるが培養細胞の研究では広く普及している。そこで、マウスから採取した骨髄細胞を用いて、免疫染色方法とマウスに使用可能な市販の抗体について検討した。生体試料の染色方法を検討した結果、放射線照射したマウスの骨髄細胞をホルマリン固定した後に、スライドグラスにサイトスピン法で接着する方法により免疫染色が出来ることが判明した。また、十数種類の市販抗体について検討した結果、 $\gamma$ H2AX, RAD51 および RPA32 が放射線照射した骨髄細胞の免疫染色に使用可能であることが確認された (図6)。 $\gamma$ H2AX は主として、非相同末端再結合によるDNA修復、そしてRAD51とRPA32は相同組換えの修復能のアッセイに用いられる。

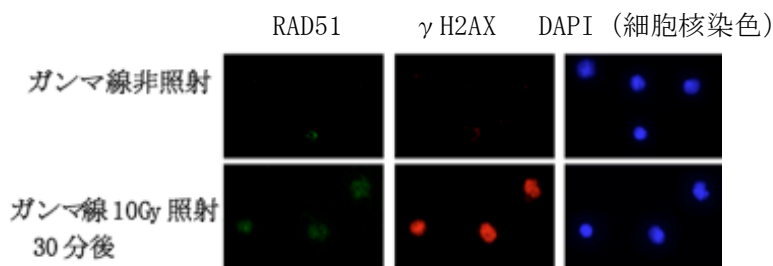


図5. マウス骨髄細胞の免疫染色

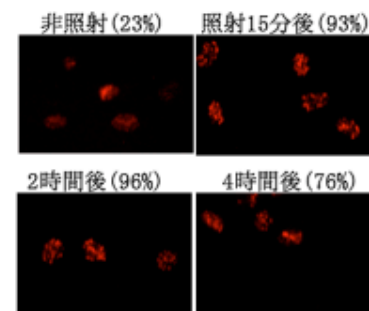


図6 ヒト皮下脂肪組織由来の成体幹細胞の $\gamma$ H2AXフォーカス数と減少

DNA修復能に関するマウスの結果がヒトにも言えるかどうかを確認しておく必要がある。このため、ヒト皮下脂肪組織由来の成体幹細胞とそこから分化した脂肪細胞を用いて、免疫染色した結果、いずれの蛋白の染色も可能であることが確認された。特に、 $\gamma$ H2AXフォーカス数が照射後4時間で顕著に減少したことからDNA修復が行われていることが分かる。

## 2.3 トランスジェニックマウスの放射線影響に関する研究

放射線感受性がマウスの年齢により変化することを示した報告が既にあるが、本研究で用いるマウス実験系でも確認しておく必要がある。このため、トランスジェニックマウスと同系統のC57BL/6マウスを用いて1)脾コロニー法および2)培養系でのコロニー法での放射線感受性を検討した。各線量のガンマ線を照射し、骨髄細胞を採取後、脾コロニーおよび培養法によるコロニーアッセイを行い、非照射マウスでは $1 \times 10^6$ 骨髄細胞中に3~9個の脾コロニーを確認できた。同様に培養系では、BFU-E (赤芽球系幹細胞)、CFU-GM (顆粒球・マクロファージ系幹細胞) および、CFU-GEMM (多分化能前駆細胞) のそれぞれのコロニー形成が確認できた。また、

放射線照射によって、増殖可能な細胞が減少したことから、放射線によって骨髄中の造血幹細胞が減少したことが示唆された（図7）。以上の結果より、C57BL マウスでの脾コロニー法および培養系でのコロニー法を用いて骨髄中の造血幹細胞の放射線感受性の評価法を確立することができた。

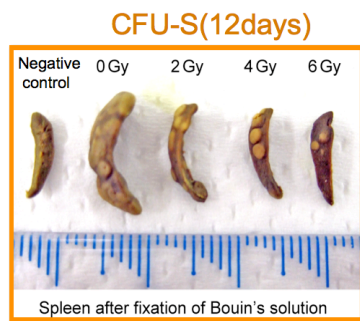


図7. 脾コロニーアッセイ

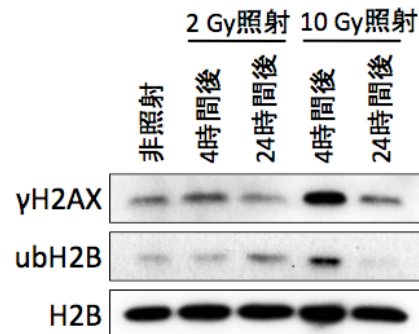


図8. マウス骨髄細胞のヒストン H2B ユビキチン化

#### 2.4 DNA 修復の制御機構に関する研究

マウス年齢により DNA 修復能が変わるとすれば、その制御機構を明らかにすることは実験結果の信頼性向上とヒトでの年齢依存性に関する普遍性を確認することになる。我々は培養細胞を用いて、放射線照射後の相同組換えは RNF20 によるヒストン H2B ユビキチン化とそれに続くクロマチン修飾により制御されていることを報告した (Nakamura et al., Mol Cell, 2011)。そこで、放射線照射したマウスから採取した骨髄細胞における H2B ユビキチン化をウエスタンブロットで測定した。その結果、10 Gy 照射で顕著な変化が見られ、図8のように照射4時間後で H2B のユビキチン化レベルが著しく上昇しており、24 時間経過後ではバックグラウンドレベルまで低下していた。放射線照射による H2B のユビキチン化の上昇はヒト培養細胞を用いた場合と同様の結果であり、RNF20 依存的な DNA 修復経路がマウス骨髄細胞でも活発に働いていることが示された。

### 3. 今後の展望

DR-GFP コンストラクトの作製は計画に沿って行われたが、途中で何度となく問題に直面した。その原因は、扱う DNA のサイズがこれまで扱ってきたものに比べてはるかに大きいものであり、今までのノウハウでは通用しないことが多かったためであると考えられる。しかし、結果的には全ての問題を解決でき、目的の DNA コンストラクトの作製および DR-GFP コンストラクトを導入した ES クローンを複数単離できた。また、次年度には pEJ コンストラクトの作製が計画されているが、本年度の実験を通して蓄積された技術、方法はそのまま次年度の計画にも応用出来るので、pEJ コンストラクトの作製は問題なく遂行出来ると予想される。

マウス骨髄細胞やヒト皮下脂肪組織由来成体幹細胞の免疫染色法、および脾コロニーや培養細胞コロニー法での同細胞の放射線感受性アッセイ、そしてマウス骨髄細胞での初めてのヒストン H2B のユビキチン化のいずれのアッセイ方法の基礎的実験が終了した。今後は、週齢の異なるマウスを用いての年齢依存性を予定している。