

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

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), 医療被ばくは成人と小児に共通した問題であるが、特に小児は、1) 放射線感受性が高いと見なされ、また成人より平均余命が長く、成人用設定の診断機器で必要以上に被ばくする問題があり、その結果として放射線障害が成人より数倍高くなる可能性が指摘されている。また、2) 英国およびドイツの原子力サイト周辺で小児白血病の増加が報告されている。3) 東京電力福島第一原子力発電所事故 (平成 23 年 3 月 11 日) での周辺住民の小児への放射線影響が危惧されている。実際、チェルノブイリ事故の甲状腺腫瘍や広島・長崎の原爆被爆者の白血病・固形がんでは小児ほど感受性が高い。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。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、そして非同末端再結合には pEJ レポーター遺

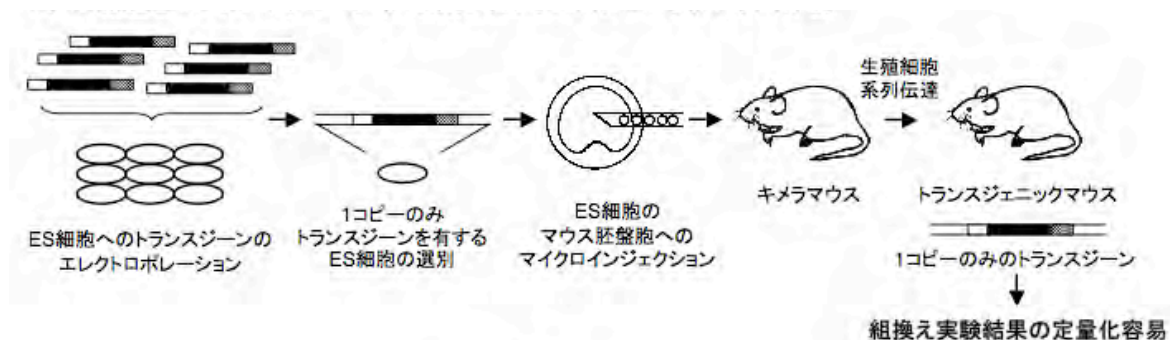
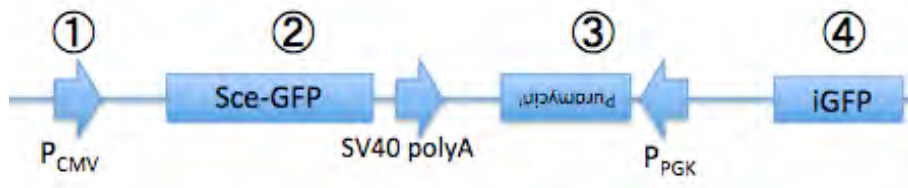


図 1. ES 細胞とエレクトロポレーションを用いた遺伝子改変マウスの作製

伝子が細胞レベルの研究に用いられてきた。本研究では、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 1)。

① DR-GFP マウス: 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 2 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 パーツから成り立っている。本研究では①のプロモーターを

図2 オリジナルのDR-GFP コンストラクト

マウス個体で発現する ScaI 遺伝子のプロモーターと交換した。エレクトロポレーションした ES 細胞に G418 を添加、G418 耐性細クローンを約 50 個ピックアップした。各々のクローンを培養した後、半数の細胞を将来のインジェクション用に凍結し、残りの半数の細胞を京都大学で解析した。その結果、トランスジーン的全長が入り、また 1 コピーのみ挿入されたクローンが同定された。2 つのクローンについて、ES 細胞の形態および増殖率ともに良好であったため、これらの細胞についてキメラマウスを作製することとし、インジェクションを行った。DR-GFP の 2 ラインの ES 細胞をインジェクションした結果、毛色のほとんどが茶色である ES 細胞の寄与が高いキメラマウスが複数得られた (図3)。



図3：作製したキメラマウス

②pEJ マウス：J Dahm-Daphi らによって開発された既存の pEJ コンストラクトは図4のような構造をしている。制限酵素サイト I-SceI で挟まれた ATG のため、通常は下流の GFP は発現しないが、I-SceI による切断

で上流の ATG が切り飛ばされ、さらにその切断が再結合 (NHEJ による修復)



した場合、下流の ATG から GFP が翻訳される。

図4：用いた pEJ コンストラクト

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、pEJ と loxP-Neo^r 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った。DR-GFP と同じ手法により ES 細胞にエレクトロポレーションを行なった。エレクトロポレーションは通常のノックアウトマウス作製と同じ条件で行い、negative selector が無く多数のクローン出現が予想されたため、1/10 量を plating した。G418 による選別の結果、DR-GFP と同じく約 50 個の G418 耐性クローンを得ることが出来た。各々のコロニーをピックアップし、培養後約半数を凍結保存し、残り半数は京都大学にて解析した。その結果、サザンブロットにより全長が挿入されており、さらに挿入コピー数が 1 コピーである ES

クローンを選別して貰った結果、#EJ5 と #EJ6 の 2 クローンが得られた (図 5)。

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別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 上の蛋白質を免疫染色する方法は、定量性には欠けるが培養細胞の DNA 修復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から骨髄細胞を採取し、サイトスピン法でスライドグラスに接着後ホルマリン固定する方法により免疫染色ができることが判明した。ガンマ線 1 Gy 照射した場合には γ H2AX フォーカスが 1 週齢、8 週齢マウスともに 4 時間後には約 60%、24 時間後には約 20%において観察され、照射により生じた DNA 二重鎖切断損傷は 1Gy 照射の条件では年齢にかかわらず同程度の速度で修復されることが示唆された (図 6)。同様に、相同組み換えの蛋白 RAD51 について解析した。1 週齢マウスでは照射後 4 時間では約 40%の細胞で RAD51 フォーカスが観察されたが、8 週齢マウスでは陽性率は約半分であり、照射 24 時間でも RAD51 陽性細胞の割合は 1 週齢マウスの方が明らかに高かった。両年齢マウスの骨髄細胞のあいだに DNA 二重鎖切断修復能に有意な差があるかはさらに検討が必要であることを示す。

続いて、ヒト幹細胞を用いてリン酸化 H2AX のフォーカスの形成を検討した。ガンマ線 2 Gy 照射 15 分後では、27 歳由来、55 歳由来幹細胞でともにほぼ 100%の細胞でリン酸化 H2AX フォーカスが観察された。リン酸化 H2AX フォーカスは放射線 DNA 損傷部位に形成されることから、放射線による DNA 損傷の発生は幹細胞の供与者の年齢 27 歳と 55 歳に影響されないことが示唆された。照射 2 時間後でもともに 90%以上の細胞でフォーカスが観察されたが、照射 4 時間、8 時間後では 27 歳由来幹細胞でリン酸化 H2AX フォーカスの減少が早い。24 時間後には 55 歳由来細胞とほぼ同程度に減少しており、ともに高い DNA 修復活性が観察された。その出現頻度には 27 歳と 55 歳由来幹細胞の間で明確な差は検出できなかった。

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

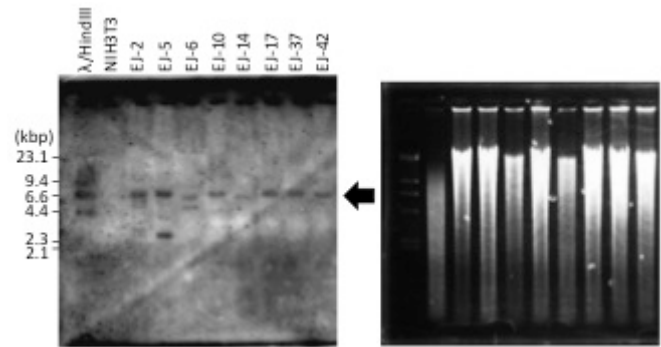


図 5 : #5 と #6 の ES 細胞のサザンブロッティング

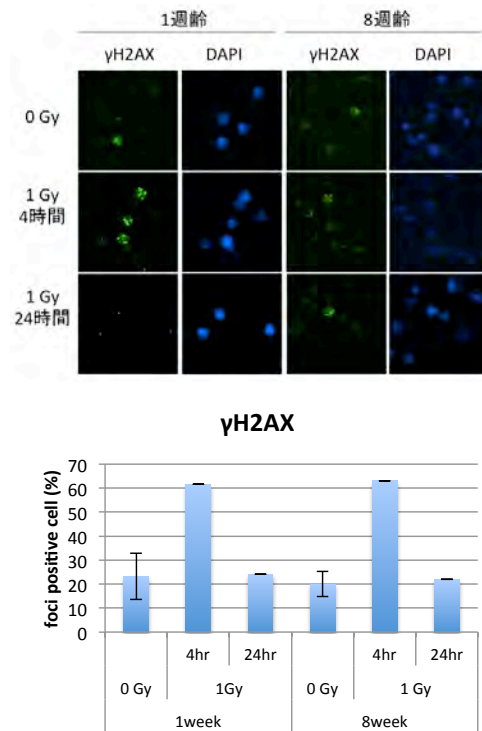


図 6 : マウス骨髄細胞の γ H2AX フォーカス

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

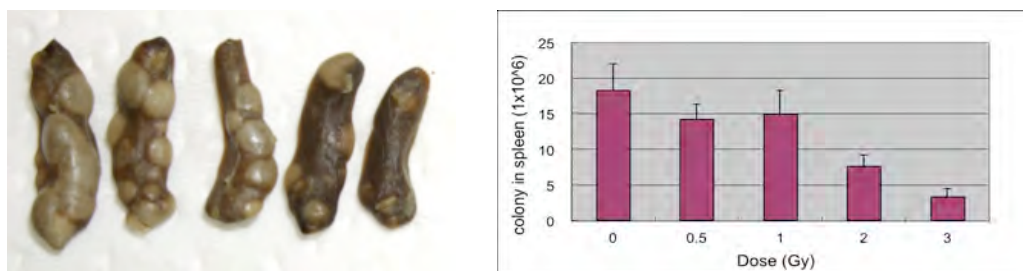


図 7 : 8 週齢マウス骨髄細胞の脾コロニー (左) と感受性 (右)

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、脾コロニーアッセイを行った結果、放射線線量依存的に脾コロニー形成能が低下した。同様に、骨髄のコロニー形成細胞 (CFU-C) も、線量とともにコロニー形成率が減少し、放射線感受性の検出が可能となった。

2.4 DNA 修復の制御機構に関する研究

マウスの年齢により 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 (参考文献)。今回、RNF20 の下流で働くタンパクについて解析するため、クロマチン画分における RPA34 のタンパク質量を調べた結果、RPA34 は 1 週齢マウスでは照射後クロマチン画分に増えていた。一方 8 週齢マウスでは照射によりクロマチン中の RPA34 の減少がみられた。これは 8 週齢マウスでは RNF20 依存的な HR による DSB 修復があまり活発に行われないう可能性を示唆しているが、さらに詳細な解析が必要である。

3. 今後の展望

ヒト細胞では容易にできる免疫染色やウエスタンブロットが、マウス細胞では技術的な問題が発生した。しかし、慎重にマウス抗体を選ぶことにより、多くの問題は解決できたが、今後はより精度を高めるための技術的工夫が必要である。また、DR-GFP と pEJ トランスジェニックマウス作製の目処が立ったので、レポーター遺伝子を用いた DNA 修復能のアッセイ、そしてこの結果を検証する免疫染色やウエスタンブロット実験、と放射線影響の結果との照合により、平成 24 年度に DNA 修復の年齢依存性の結果を得る予定である。

4. 参考文献

Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira D. V.N.P, Shimada M, Tauchi H, Suzuki H, Tashiro S, Zou L, Komatsu K. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Molecular Cell*, 41:515-628, 2011

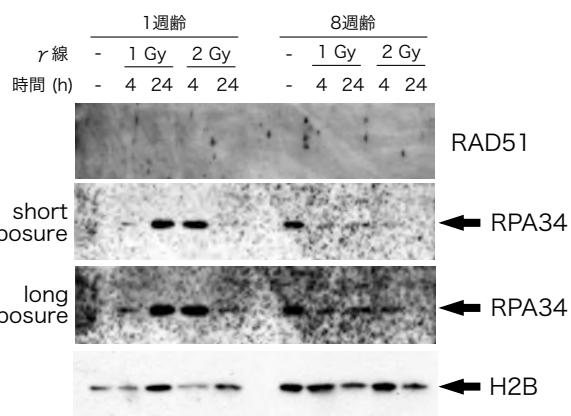


図 8. 骨髄細胞のウエスタンブロット