

小児期被ばくの放射線感受性と DNA 修復に関する研究

研究代表者 小松 賢志 国立大学法人京都大学放射線生物研究センター
参画機関 国立大学法人京都大学、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

1.1 社会的背景： 東京電力福島原発事故では周辺住民の若年被ばく者への放射線影響が危惧されている。このため政府は、子どもたちの安全に配慮して乳幼児食品の放射性物質の新しい基準値を一般食品の半分の 50Bq/kg とし、また、子どもの生活環境での除染を優先的に行うことを決定した。一方、近年、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。特に小児は成人用設定の診断機器で必要以上に被ばくしていることが指摘されている。また、英国やドイツの原子力施設周辺で小児白血病が増加していることも、社会的な懸念材料である。

1.2 科学的背景： ICRP99 は「(DNA) 切断が誤った修復を受けた場合は、発がん性損傷として (修復を受けない場合) より大きな脅威となるかもしれない」と、放射線リスクにおける DNA 修復の潜在的な危険性を指摘している。ICRP99 は 2004 年までの科学的知見をまとめた報告であるが、それ以降の分子生物学的研究の進展により DNA 修復のゲノム不安定性への関与が明らかになってきた。特に、放射線が誘発する DNA 二重鎖切断再結合の二つの経路、相同組換え修復と非同相末端再結合、を比較した我々の解析では、表に示すようにほとんどの突然変異は非同相末端再結合に由来しており、相同組換え修復に起因する突然変異は 34 変異中わずか 1 例であった¹⁾。このことから、若年者および成人の放射線リスクはどちらの DNA 修復系が用いられるかによって大きく異なると予想される。

DNA二重鎖切断部位の突然変位 (34ヶ所)
における利用された修復系
末端再結合 : 33
非同相末端再結合 : 26
マイクロホモロジー経路末端再結合 : 7
相同組換え修復 : 1
Mashimo T, et al., Cell Rep. 2:685-94, 2012から解析。

1.3 研究のねらい： 本事業では定量性に優れた相同組換え修復と非同相末端再結合の DNA 修復用レポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを開発して、各年齢のマウスから分離した骨髄の放射線感受性と DNA 修復能を定量的に評価、さらに、DNA 修復制御の蛋白の発現動態の解析により、放射線生物影響の年齢依存性の機構を明らかにする。

2. 研究開発成果

2.1 トランスジェニックマウスの DNA 修復能に関する研究

トランスジェニックマウスの開発： 放射線照射による DNA 二重鎖切断は細胞ゲノム DNA 上にランダムに発生する。このため、ゲノム情報に基づいた遺伝子レベルの解析が困難である。本研究では、相同組み換え修復レポーター遺伝子として M. Jasin らによって開発された DR-GFP、非同相末端再結合レポーター遺伝子として J. Dahm-Daphi らによって開発された pEJ 遺伝子の単一コピーをマウスに導入する。DR-GFP は、Sce-GFP (GFP 遺伝子が制限酵素サイト I-SceI により中

図1. DR-GFPレポーター遺伝子



断されている) と iGFP (プロモーターを持たないので GFP を発現しない) の 2 部分から構成されている。制限酵素により①Sce-GFP に DNA 二重鎖切断が導入されて、② (姉妹染色体上の) iGFP を鋳型として相同組み換え修復が起こると GFP 蛋白が発現する仕組みである (図 1)。この培養細胞用に開発された相同組み換え修復レポーター遺伝子 DR-GFP のプロモーターをマウス造血幹細胞で発現する Sca1 プロモーターに変えるなどの改変後、マウス ES 細胞に導入した。この ES 細胞を偽妊娠のマウス胚盤胞にインジェクションしてキメラマウス、また、その交配により DR-GFP 遺伝子コンストラクトが子孫に伝わる (生殖系列伝達) トランスジェニックマウスが得られた。同様に、非相同末端再結合レポーター遺伝子 pEJ をマウス ES 細胞に導入した。キメラマウスは作製できたが、pEJ 遺伝子は残念ながら生殖系列に伝達しなかった。



図2. DR-GFP導入キメラマウス

トランスジェニックマウスの DNA 修復の測定： トランスジェニックマウスの骨髄から細胞を採取して PCR で解析した結果、DR-GFP レポーター遺伝子が骨髄幹細胞で発現していることが確認できた。DR-GFP/pEJ レポーター遺伝子が機能するためには、I-Sce1 制限酵素プラスミドを骨髄細胞に導入する必要がある。レトロウイルスベクター法、遺伝子導入試薬法および通常のエレクトロポレーション法を試みたが十分な導入量を確保できなかった。そこで磁気ビーズを用いて 8 週齢マウス骨髄の Sca1 陽性細胞の濃縮後に、初代培養細胞および骨髄細胞用として最近開発されたエレクトロポレーション法を試みた結果、十分な量の確保に成功した。続いて 1 週齢マウスのレポーター遺伝子による測定を行った結果、DR-GFP レポーター遺伝子では 8 週齢よりも高頻度に陽性細胞が観測された (図 3)。pEJ レポーター遺伝子でも 8 週齢マウス骨髄でも GFP 陽性細胞が検出され、非相同末端再結合が測定出来た。しかし、使用したマウスがキメラマウスの段階のためと思われるが、1 週齢マウスの陽性細胞が観測できなかった。続いて、1 週齢マウスと 8 週齢マウス骨髄中の Sca1 陽性細胞を定量したが、両マウスで細胞数に顕著な違いは見られなかった。このことは相同組み換え能の違いが造血幹細胞数の違いによるのではなく、1 週齢マウス造血幹細胞の相同組み換え能が 8 週齢マウスのそれよりも高いことを示している^{2,3)}。

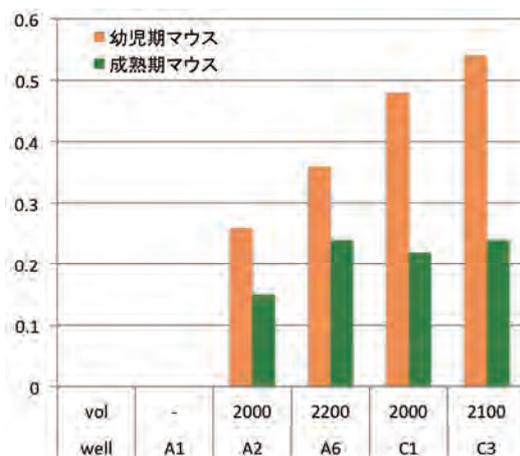


図3. 1週齢マウスと8週齢マウスの相同組み換え能

マウス骨髄免疫染色法による DNA 修復能の年齢依存性：レポーター遺伝子の解析結果を免疫染色法の結果と比較するために、初めにマウス骨髄の免疫染色法の改良を行った。その結果、ホルマリン固定した細胞懸濁液をスライドガラスにサイトスピン法で接着させることにより良好な免疫染色ができることが判明した。続いて、免疫染色に使えるいくつかの市販抗体を検討した結果、RAD51, RPA32, γ H2AX 抗体が使えることが分かった。そこで、1 週齢マウスと 8 週齢マウスを用いて放射線照射後に骨髄細胞に形成された γ H2AX フォーカスの経時変化を検討した結果、両マウスで顕著な違いが認められなかった。 γ H2AX フォーカスは放射線誘発 DNA 二重鎖切断の指標であるので、1 週齢マウスと 8 週齢マウスの骨髄細胞に放射線誘発 DNA 二重鎖切断の再結合能力に有

意な差がないことを示している。同様に、両マウスに放射線照射後の RAD51 および RPA32 フォーカス形成をそれぞれの抗体を用いて行った結果、8 週齢に比較して 1 週齢マウス骨髄細胞に多くのフォーカスが観測された。これは、1 週齢マウスで相同組み換え修復が活発であることを示したレポーター遺伝子の解析結果と一致する^{2,3)}。続いて、ヒトでの年齢依存性を比較するために、27 歳と 55 歳、および 26 歳と 41 歳の細胞の γ H2AX および RAD51 の免疫染色による DNA 修復能を検討したが、いずれでも差がなかった。これは入手できるヒト細胞の年齢がいずれも成人であることに原因すると思われるが、結果として 20 代以降の成人の年齢では骨髄細胞の DNA 修復能に差異がないことが明らかとなった。

2.2 トランスジェニックマウスの放射線影響に関する研究

マウス骨髄幹細胞の放射線感受性の年齢依存性：マウスの全身照射後の骨髄細胞数、脾コロニー形成能、培養系でのコロニー形成能のアッセイ法を測定した結果、これらが放射線線量依存的に減少することが確認できた。最終的には脾コロニー形成法を用いて、1 週齢マウスと 8 週齢マウス骨髄幹細胞の放射線感受性を比較した結果、両者に顕著な違いは見られなかった。これは γ H2AX の免疫染色法による DNA 修復能に 1 週齢マウスと 8 週齢マウスの造血幹細胞で差がないことと一致した。

マウス致死効果：1 週齢と 8 週齢の多数のマウスに 6Gy から 9Gy の種々の放射線線量を照射してその後の生存日数を測定して、放射線線量-生存率曲線を求めた。30 日間で半分のマウスが致死になる線量 LD50/30 は約 8Gy であり、これは 1 週齢マウスおよび 8 週齢マウスで違いはなかった (図 4)。しかし、8.5Gy 以上の照射では 8 週齢マウスの方が予想に反して高感受性であった。これは分担者が以前に報告したマウス腸クリプト細胞が成体 (7 週齢) マウスで感受性であることと一致する。LD50/30 線量およびそれ以下の線量でのマウス個体死の原因は骨髄死であるので、この結果も γ H2AX の免疫染色法による DNA 修復能に 1 週齢マウスと 8 週齢マウス造血幹細胞で差がなかったことと一致する^{2,3)}。

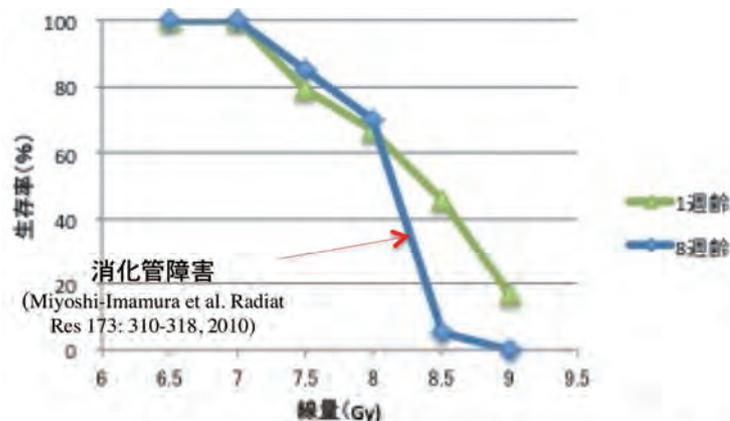


図4. 1週齢マウスと8週齢マウスの致死線量

2.3 DNA 修復能の制御機構に関する研究

DNA 修復を制御している機構を培養細胞を用いて測定した。その結果、ヒストン H2B のユビキチン化酵素 RNF20 やヒストンシャペロン FACT の失活により、DNA 修復が低下することが明らかになった (図 5)^{4,5)}。このことは、DNA 修復が DNA の高次構造であるクロマチンレベルで制御されていることを示す。同様の機構がマウス骨髄細胞でも機能しているかを確認するために、4 万個以上の転写産物を解析出来るマイクロアレイ法を用いた。その結果、RNF20 により修飾されるヒストン H2B やその下流の

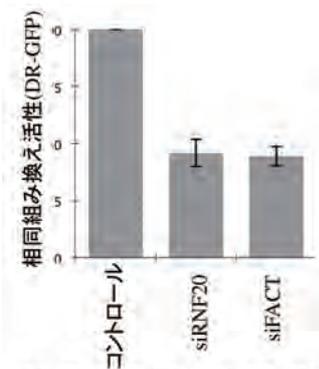


図5. RNF20およびFACT失活による相同組換え能低下

クロマチン・リモデリング因子が変化することが分かった。しかし、相同組み換えの蛋白 RAD51 や RPA32 には変化が見られなかった。そこで、クロマチン・リモデリング因子 SNF2h をノックダウンして同様の解析を行ったが、同様に RAD51 や RPA32 の転写量に変化がなかった。このことから RNF20 の下流で機能すると思われる RAD51 や RPA32 蛋白は転写レベルで制御されているのではなく、細胞内の DNA 二重鎖切断部位に集結する動態分布により制御されていることが示された。また、マウス骨髄細胞でも RNF20 依存にクロマチン・リモデリングを起こすヒストン H2B のユビキチン化が起こることが示されたので、RNF20 はクロマチン・リモデリングを介して骨髄組織で相同組み換えを制御していることが判明した。

2.4 まとめ

DNA 修復欠損のほぼ全てのヒト疾患およびノックアウトマウスが高発がん性を示すことから、DNA 修復能が放射線リスクの重要因子であることが既に示唆されていた。しかし、DNA 修復能を個体レベルで測定するアッセイ系は従来存在しなかった。本研究で、DR-GFP レポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを開発できた。また同マウスを用いて 1 週齢マウス骨髄では、突然変異誘発が少ない修復系である相同組み換えの寄与が 8 週齢マウスよりも大きいことが示された。その一方で、非相同末端再結合経路を主体とする DNA 二重鎖切断の修復能が 1 週齢と 8 週齢マウスで大きく変わらないことが示され、マウス骨髄死および骨髄幹細胞の放射線致死感受性の実験により確認された。

3. 今後の展望

pEJ 導入キメラマウスの生殖系列が得られなかったのは、同遺伝子が発生に重要なゲノム上の座位に導入された可能性がある。そこで、第二世代の DNA 修復レポーター遺伝子導入マウスとして、マウス組織間で均一に発現、しかも遺伝子を破壊しても致死にならない ROSA26 座位に pEJ および DR-GFP をノックインしたマウスを作製する。現在、前者については、ノックイン ES 細胞が得られている。これらのマウスを用いて、引き続き我々は 1 週齢と 8 週齢マウスの放射線発がん頻度と DNA 修復能について解析予定である。また、将来的にはベルゴニー・トリボンドの法則で説明されている組織間の放射線感受性の違いや DNA 修復が大きく関わるとされる低線量率放射線影響研究への利用を促進したい。

4. 参考文献

- (1) Mashimo T., et al., "Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats," *Cell Rep*, 2, p. 685-94 (2012)
- (2) 加藤晃弘, 他. "マウスを用いた小児期被ばくの放射線感受性と DNA 修復能の解析" 日本放射線影響学会第 56 回大会, 青森, 10 月 18-20 日, 2013.
- (3) 小松賢志, "若年期マウスの DNA 修復能力と放射線感受性" 環境科学技術研究所セミナー, 六ヶ所村, 8 月 30 日, 2013.
- (4) Nakamura K, et al., "Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination," *Mol. Cell*, 41, p. 515-528 (2011)
- (5) Oliveira D.V., et al., "Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20," *J. Cell Sci.*, in press (2013)