

研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18510052
 研究課題名（和文） 電離放射線により誘発されるエピジェネティックな細胞内変化に関する研究
 研究課題名（英文） Epigenetic effect induced by ionizing irradiation in mouse cells

研究代表者
 山内 正剛 (YAMAUCHI MASATAKE)
 独立行政法人 放射線医学総合研究所 放射線防護研究センター チームリーダー
 研究者番号：00260240

研究成果の概要：マウス培養細胞を用いて、さまざまな電離放射線照射条件下において、高頻度に復帰変異株を生じる 6-チオグアニン耐性変異株を分離し、その分子機構を解明することを試みた。5-アザシチジンの添加が復帰変異頻度に影響を及ぼさなかったことから、DNAメチル化の本現象における関与は否定された。すなわち、放射線発ガン初期過程に発生すると考えられているエピジェネティックな細胞内変化は DNAメチル化以外の機構によるものであることが強く示唆された。また、結果として、放射線照射により、6-チオグアニン耐性変異株の発生頻度は有意に上昇したが、復帰変異頻度の有意な上昇は観察されなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	480,000	4,080,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：電離放射線、マウス細胞、エピジェネティクス、6-チオグアニン、DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

放射線発ガンは、放射線の電離作用によって生じた DNA 上の傷や、その修復過程で発生したエラーによる突然変異が引き金となって誘発されると従来は考えられてきた。

しかしながら、放射線によって誘発されたがん細胞を分子レベルで詳細に解析しても、特徴的な DNA 上の傷を発見・同定することはできなかった。

電離放射線を細胞に照射することにより、

細胞内の遺伝子発現は変動するが、その発現が抑制されるものが多いことが DNA マイクロアレイ解析データにより示唆されていた。

研究代表者の未発表の観察データとして、マウス細胞から 6-チオグアニン耐性変異株を分離・解析すると、細胞株に特徴的なある一定の割合で、6-チオグアニン耐性変異の原因となるヒポキサンチンホスホリボシル転移酵素 (*Hprt*) 遺伝子に突然変異が発生していないのに、耐性変異を示すものがあるという知見を得ていた。

また、このような耐性変異株のうち、かなりの割合のものは100分の1以上の高頻度でHprt 活性を回復する。

すなわち、少なくともマウス細胞の *Hprt* 遺伝子領域においては、欠失変異や点突然変異のような古典的な突然変異とは異なる様式で遺伝子発現を停止するものが存在し、さらには、一度停止した遺伝子発現を環境の変化（この場合はHAT 培地）に応じて遺伝子発現を回復させること、すなわち、エピジェネティックな細胞内変化が存在することを認識していた。

また、6-チオグアニン耐性株の出現頻度は、3 グレイまでは放射線照射量に比例して増加することは広く知られている観察事実である。

2. 研究の目的

マウス細胞において、放射線がエピジェネティックな遺伝子発現変動に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)まず、0, 1, 3, 各グレイの放射線照射により、マウス FM3A 細胞集団から6-チオグアニン耐性変異株の出現を誘発し、変異株を分離する。

(2)分離された変異株のうち、*Hprt* 遺伝子領域における欠失変異を、PCR 法による LOH 解析により検出して、欠失変異が検出されないものを選別する。

(3)欠失が認められなかった変異株を、0, 1, 3, 各グレイの放射線を照射してから、HAT 培地で培養し、Hprt 活性を復活した復帰変異株を選択する。

(4)HAT 耐性を示した変異株を再度 6-チオグアニン存在下で培養し、同様の現象が発生する頻度を計測する。

(5)高頻度に6-チオグアニン耐性からHAT 耐性、または逆方向に表現形質を変化させる変異株について、5-アザシチジン処理が表現形質を変化させる頻度に及ぼす影響を解析する。

(6)5-アザシチジンが表現形質を変化させる頻度に有意の影響を及ぼすことが認められた場合は、*Hprt* 遺伝子上流領域のメチル化解析を実施する。

4. 研究成果

(1)マウス FM3A 細胞からの6-チオグアニン耐性変異株の出現頻度は、放射線の照射線量に応じて、 5×10^{-6} から 5×10^{-5} へと、ほぼ比例的に増加した。合計 648 株の6-チオグアニン耐性変異株を分離することに成功した。

(2)上記 648 株すべてについて、*Hprt* 遺伝子領域の LOH 解析を実施したところ、634 株については欠失変異が認められたが、114 株については欠失変異の存在は確認されなかった。欠失変異の割合は、放射線照射線量の増加に伴って増加し、3 グレイの放射線で照射した細胞集団から得られた変異株ではほとんどすべてから欠失変異が検出された。

(3)上記 114 株について、HAT 耐性を解析したところ、そのうち 23 株は死滅した。これからは点突然変異または微細な欠失変異等により6-チオグアニン耐性形質を獲得していた可能性が高い。残り 91 株は、培養初期には数多くの死細胞を生じたものの、数週間増殖は安定し、その後は HAT 培地中で正常に生育した。

(4)HAT 培地中で正常に生育した 91 株は、6-チオグアニン培地中でも、培養初期に死細胞を生じるものの、やがて正常に生育した。

(5)軟寒天平板を用いて、6-チオグアニン耐性から HAT 耐性へと移行する頻度を計測したところ、いずれも 1×10^{-2} から 5×10^{-2} 程度であった。

(6)6-チオグアニン耐性から HAT 耐性へと（または逆方向に）移行する頻度への 0, 1, 3, 各グレイの放射線照射による影響を解析したが、有意の頻度差は検出されなかった。

(7)6-チオグアニン耐性から HAT 耐性へと（または逆方向に）移行する頻度への 5-アザシチジンによる影響を解析したが、有意の頻度差は検出されなかった。

(8)5-アザシチジンによる出現頻度差に対する影響はあまり大きくはなかったが、少しは差があるように見えた 3 株について DNA メチル化解析を実施した。ある程度予想していたことではあったが、*Hprt* 遺伝子上流領域におけるメチル化パターンに有意差は検出されなかった。

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)

[図書] (計2件)

(1) 山内正剛, 27 放射線と生命の進化, p82-84, 身近な放射線の知識, 放射線医学総合研究所編, 佐々木康人著, 157 ページ, 丸善株式会社, 2006年

(2) 山内正剛, 先進医療技術を取り巻く生命倫理事情について, p.113-123, 遺伝診療をとりまく社会—その科学的・倫理的アプローチ 水谷修紀・吉田雅幸監修 吉田雅幸・小笹由香編集, 181 ページ, ブレーン出版, 2007年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 正剛 (YAMAUCHI MASATAKE)
独立行政法人 放射線医学総合研究所
放射線防護研究センター チームリーダー
研究者番号: 00260240

(2) 研究分担者 (2006, 2007年度)

福津 久美子 (FUKUTSU KUMIKO)
独立行政法人 放射線医学総合研究所
緊急被ばく医療研究センター 主任研究員
研究者番号: 10238496

(3) 連携研究者 (2008年度)

福津 久美子 (FUKUTSU KUMIKO)
独立行政法人 放射線医学総合研究所
緊急被ばく医療研究センター 主任研究員
研究者番号: 10238496