

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390170
 研究課題名 (和文) 原爆被爆者コホートにおけるヒト造血リンパ系の遺伝的不安定性と放射線感受性の評価
 研究課題名 (英文) Evaluation of genetic instability and radiation sensitivity in human hematolymphoid cells among the atomic-bomb survivor cohort
 研究代表者
 楠 洋一郎 (KUSUNOKI YOICHIRO)
 財団法人放射線影響研究所・放射線生物学／分子疫学部・部長代理
 研究者番号：60333548

研究成果の概要 (和文)：ヒト DNA の完全な遺伝情報一式であるヒトゲノムは個人間で多少異なっており、その違いが放射線による DNA の傷および疾患の罹りやすさの個人差と関係する可能性がある。放射線によって生じたと考えられる DNA の傷を原爆被爆者の血液細胞で検出し、その度合いと DNA の傷の修復に働くタンパクの遺伝子型の関係を調べた。その結果、*P53BP1* の遺伝子型の違いが、*GPA* 遺伝子に突然変異を起こした血液細胞の頻度の個人差に關係する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The human genome (the complete set of genetic information in people's DNA) somewhat differs among individuals, and such variation is in part responsible for how individuals differ in their susceptibility to radiation-related DNA damage and diseases. We detected radiation-related DNA damage in blood cells of A-bomb survivors and investigated associations between frequencies of DNA-damaged cells and genotypes of DNA repair genes. Our results suggest that the difference in the genotype of P53BP1 may be involved in the individual's difference in the frequency of *GPA* mutant blood cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 2008 年度 | 4,300,000 | 1,290,000 | 5,590,000 |
| 2009 年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 11,000,000 | 3,300,000 | 14,300,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ゲノム、放射線、突然変異、血液細胞

1. 研究開始当初の背景

放射線影響研究所における原爆被爆者の成人健康調査対象者集団において、遺伝子解析に必要な血液サンプルが入手可能な原爆被爆者約 7,000 名について、免疫系や DNA 修

復系に関連する遺伝子の多型と、がんなどの生活習慣病のリスクとの関連性を解析する研究を進めている。この研究コホートは、健康状態に関する情報が生物学的指標データを付帯して得られ、遺伝子解析も可能な極め

て貴重な集団であると考えられる。

放射線被曝などの環境変異原暴露による発がん危険性の評価には、ゲノム情報を用いるアプローチの他に、遺伝子修復能や体細胞遺伝子変異性の測定など、遺伝毒性に対する個人の細胞の応答を調べる方法がある。また、前者の遺伝型と後者の表現型との関連を調べる解析は、リスク評価の機序的基盤を保証するのにきわめて有効である。我々は原爆被曝者における赤血球グリコフォリン A (GPA) 遺伝子座の突然変異体頻度 (Mf) は被曝した放射線量とともに増加するが、大きな個人差のあることを報告してきた。また、同じ被曝者集団で GPAMf の線量効果は、がん発生群の方が非発生群よりも有意に高いことを前向き調査によって示した (Kyoizumi et al, Cancer Res, 2005)。これらの知見は放射線被曝後の体細胞遺伝子の変異性には個人差が存在し、より高い変異性を有する者には放射線に関連したがんが、より高い確率で発生することを示唆している。また、この放射線に対する個人差の背景には DNA 修復系に関連する遺伝子の多型が関係すると仮定される。

2. 研究の目的

本研究は、血液細胞を用いて、個体の放射線感受性および遺伝的不安定性を反映する細胞遺伝子損傷を正確に検出できる簡便な方法、ならびに放射線感受性の個人差に関係する可能性が考えられる DNA 修復遺伝子多型の解析方法を確立する。さらに、確立された方法を用いて、原爆被曝者コホートでの放射線感受性および放射線誘発遺伝的不安定性の評価を行い、放射線発がんとの関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) 試験管内放射線感受性の評価には、末梢血単核細胞を PHA 存在下、rIL-2 含有 GIT 培養液で 1 週間培養し、増殖した T リンパ球を用いて行った。培養 T リンパ球に 4Gy の X 線を照射した後、さらに培養して照射 6 時間後の γ H2AX の細胞内発現量を、FACScan を用いたフローサイトメトリーで測定した。

(2) 遺伝的不安定性指標として末梢血網状赤血球小核頻度を評価した。末梢血をマイナス 80 度メタノール固定後、CD71-FITC、CD61-PE 抗体および PI で染色して、CyAn を用いたフローサイトメトリーにて解析した。小核頻度は CD71 陽性、CD61 陰性の網状赤血球集団における PI 陽性細胞の比率にて求めた。

(3) GPA 突然変異体頻度のデータは 1988-1996 年の約 8 年間で放射線影響研究所 (放影研) 成人健康調査対象者約 1,900 名について測定したものをを用いた。

(4) 末梢血 T 細胞サブセットをフローサイト

メトリーにより解析し免疫指標として用いた。また、血漿中の TNF- α レベルを ELISA で測定し、炎症状態を評価した。

(5) DNA 修復遺伝子の多型は SNP を TaqMan-Allelic Discrimination 法を用いて解析し、ハプロタイプは linkage disequilibrium (LD) coefficients に基づいて EM アルゴリズムにより推定した。今回の解析では、がんを発生していない 1,300 名について、DNA 修復遺伝子の多型と GPA 突然変異頻度との関連を調べた。関連分析には、対数変換した GPA 突然変異頻度を、性、年齢、都市、および推定骨髄被ばく線量で補正して用いた。GPA 突然変異頻度の SNP およびハプロタイプ間における差異は ANCOVA にて検討した。

4. 研究成果

(1) 試験管内放射線感受性と GPA 突然変異頻度の関係を原爆被曝者集団で検討した。1 Gy 以上の放射線を被ばくした 22 名の被曝者の放射線誘発 γ H2AX レベルの頻度分布から、放射線感受性が高いグループと低いグループにほぼ二分される傾向が見られた (図 1)。そこで、この二群間で体細胞突然変異性に違いがあるか検討したが、 γ H2AX レベルが低いグループと高いグループ両群間で赤血球 GPA 突然変異頻度に有意な違いは認められなかった (図 2)。

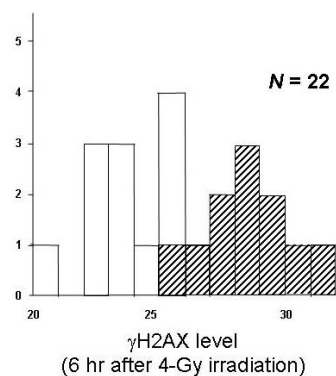


図 1. 原爆被曝者 (1 Gy 以上被ばく) の培養 T リンパ球における試験管内放射線誘発 γ H2AX レベルの頻度分布

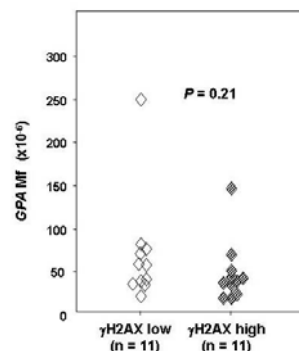


図 2. 原爆被曝者 (1 Gy 以上被ばく) の試験管内放射線感受性と GPA 突然変異頻度

(2) X線を2.5Gy全身照射したマウスを用いて、照射1年後の網状赤血球小核頻度を測定した。その結果、同じ週齢の非照射マウスに比べて有意な小核頻度の増加が認められ、放射線で誘発される遺伝的不安定性が照射後長期にわたって生体内で持続する可能性が示唆された(図3)。また、BALB/cとC57BL6マウスで放射線誘発小核頻度に有意な系統差が観察され、放射線誘発遺伝的不安定性の個体差に遺伝的背景が関与する可能性が示唆された。

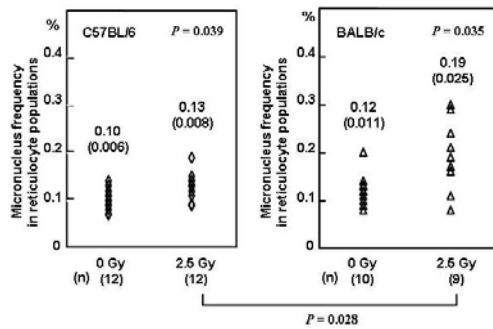


図3. 2.5Gy X線照射1年後のマウス網状赤血球小核頻度

(3) 原爆被爆者の造血系においても放射線誘発遺伝的不安定性が依然として持続しているか検討する目的で、ヒトにおける末梢血網状赤血球小核頻度の測定系を確立した。図4に1Gy以上の放射線を被ばくした原爆被爆者68名および性、年齢を一致させたコントロール83名について小核頻度の分布を示した。被ばく群と非被ばく群との間に統計学的に有意な差は認められず、原爆被爆者の造血系において今日まで長期間持続する放射線誘発遺伝的不安定性を示唆する証拠は見られなかった。また、図5に示すように、1Gy以上の被ばく群においてGPA突然変異頻度と小核頻度の間に有意な相関は認められず、原爆被爆者の被ばく線量に依存した赤血球GPA突然変異頻度の増加に遺伝的不安定性が寄与している証拠はえられなかった。

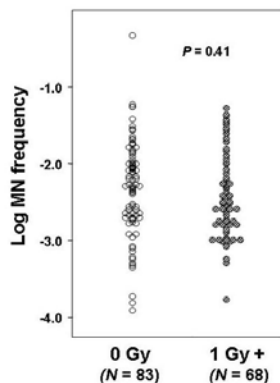


図4. 原爆被爆者の末梢血網状赤血球小核頻度

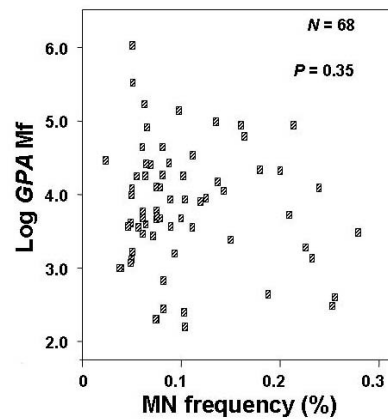


図5. 原爆被爆者(1Gy以上被ばく)のGPA突然変異頻度と末梢血網状赤血球小核頻度

(4) マウス炎症モデルでTNF- α レベルの上昇に伴う小核網状赤血球の頻度増加の知見(Mutat Res, in press)に基づき、原爆被爆者の造血系の遺伝的不安定性に放射線で誘発される持続性炎症が関係するか検討するため、被爆者末梢血中のTNF- α レベルと網状赤血球小核頻度との関係を調べたが、両者に有意な相関は認められなかった。しかしながら、TNF- α レベルは同じ被爆者の末梢血中ナイーブCD4T細胞の割合と逆相関を示し、放射線によるT細胞免疫の長期低下が持続性炎症に関係していることが示唆された(図6)。

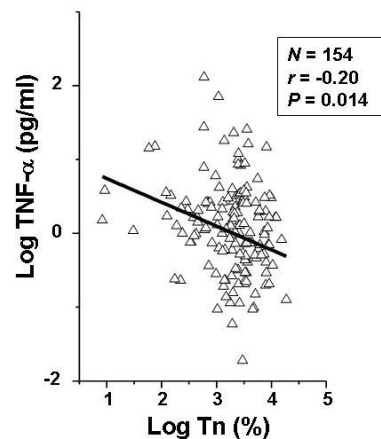


図6. 原爆被爆者(1Gy以上被ばく69名およびコントロール86名)のTNF- α 血漿中レベルはナイーブCD4T細胞(Tn)の割合と逆相関する。測定データは年齢、性別、被ばく線量で補正して解析

(5) ATM, NBS1, ATR, p53, ならびに P53BP1 遺伝子の多型を解析した。がんの既往のない1,300名のデータを用いた統計解析において、前4者の遺伝子型ではGPA突然変異頻度の

原爆放射線量効果関係に違いが見いだされなかったが、*P53BP1* の遺伝子型の違いが放射線誘発 *GPA* 突然変異頻度の個人差に関与する可能性が示唆された。すなわち、1 Gy 以上の高線量被ばく群では、*P53BP1* の 3 箇所 の SNP を含むハプロタイプブロックにおいて *TCA/TCA* ハプロタイプを有する被爆者に *GPA* 変異体頻度の有意な増加が認められた (図 7)。今後、*P53BP1* の遺伝子型と放射線による固形がん発生リスクの関係を含めた詳細な解析が必要である。

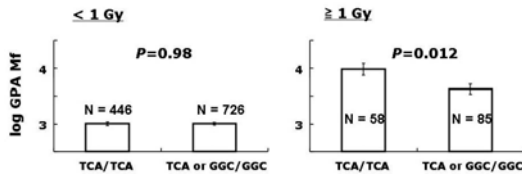


図 7. 1Gy 以上の被爆者における *P53BP1* ハプロタイプ別の *GPA* 変異体頻度

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Kusunoki Y, Yamaoka M, Kubo Y, Hayashi T, Kasagai F, Double EB, Nakachi K. T-cell immunosenescence and inflammatory response in atomic-bomb survivors. *Radiat Res*, 2010; in press. (査読有)
- ② Kusunoki Y, Hamasaki K, Koyama K, Imai K, Hayashi T, Martin PJ, Nakachi K. Increased DNA damage in hematopoietic cells of mice with graft-versus-host disease. *Mutat Res*. 2010; in press. (査読有)
- ③ Kyoizumi S, Yamaoka M, Kubo Y, Hamasaki K, Hayashi T, Nakachi K, Kasagi F, Kusunoki Y. Memory CD4 T-cell subsets discriminated by CD43 expression level in A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol*, 2010;86:56-62. (査読有)
- ④ Yoshida K, Nakachi K, Imai K, Cologne JB, Niwa Y, Kusunoki Y, Hayashi T. Lung cancer susceptibility among atomic-bomb survivors in relation to CA repeat number polymorphism of epidermal growth factor receptor gene and radiation dose. *Carcinogenesis*, 2009; 30:2037-41. (査読有)
- ⑤ Hamasaki K, Kusunoki Y, Nakashima E, Takahashi N, Nakachi K, Nakamura N, Kodama Y. Clonally expanded T lymphocytes from atomic bomb survivors in vitro show no evidence of cytogenetic instability. *Radiat Res*. 2009;172:234-43.

(査読有)

- ⑥ Yoshida K, Kubo Y, Kusunoki Y, Morishita Y, Nagamura H, Hayashi I, Kyoizumi S, Seyama T, Nakachi K, Hayashi T. Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells. *Cell Immunol*, 2009;255:61-8. (査読有)
- ⑦ Ohara M, Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, Fujiwara T, Komatsuzawa H, Sugai M. Cytotoxic distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 cells. *Infect Immun*. 2008;76:4783-91. (査読有)
- ⑧ Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y. Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: Current progress in molecular epidemiology studies. *Mutat Res*. 2008;659:109-17. (査読有)
- ⑨ Kusunoki Y, Hayashi T. Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 2008;84:1-14. (査読有)
- ⑩ Hamasaki K, Imai K, Hayashi T, Nakachi K, Kusunoki Y. Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: Frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body X-irradiated BALB/c and C57BL/6 mice. *Cancer Sci*. 2007;98:1840-4. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 濱崎幹也、マウス造血系における炎症とゲノム不安定性. 第 52 回日本放射線影響学会 2009/11/11-13 広島
- ② Yoshida K, Impact of ATM, ATR, NBS1 genetic polymorphisms on radiation-associated cancer risks in atomic-bomb survivors. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Telomere Biology and DNA Repair, 9-14 October 2009, Ashmore, Australia
- ③ 楠 洋一郎、網状赤血球小核頻度解析による原爆被爆者造血系の放射線誘発遺伝的不安定性の評価. 第 19 回日本サイトメトリー学会学術集会 2009/6/20-21 松江
- ④ Kusunoki Y, Increases in the percentages of CD43-low memory and CD25+/CD127-regulatory T cells in the CD4 T-cell populations among A-bomb survivors. The 5th Kyoto T Cell Conference (KTCC) 2009 International Workshop on T Lymphocytes, 1-4 June 2009, Kyoto
- ⑤ Kusunoki Y. Immunological alterations in aging A-bomb survivors. *Late Health*

Effects of Ionizing Radiation: Bridging the Experimental and Epidemiologic Divide, 4-6 May 2009, Georgetown University, Washington DC, USA

- ⑥ Kusunoki Y, Development of genetic instability and somatic mutation assays in radiation-exposed individuals. International Symposium on Genotoxicity Assessment, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 4-6 December 2008, Okinawa
- ⑦ Kusunoki Y, Genetic instability of the hematopoietic system in murine inflammation models. The 10th International Symposium on Dendritic Cells, 1-5 October 2008, Kobe
- ⑧ Hamasaki K, Genomic instability persisting in vivo for prolonged periods after irradiation: Elevated micronucleated reticulocyte frequencies in mice one year after whole-body irradiation. The 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 21-25 September 2008, Boston, Massachusetts, USA
- ⑨ Kusunoki Y, T-cell aging radiation-exposed individuals. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Immunology Board: Immunosenescence Workshop, 18-21 June 2008, San Francisco, California, USA
- ⑩ Kusunoki Y, Mouse strain difference in sensitivity to radiation-induced genomic instability persisting in vivo for prolonged periods after irradiation. The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008, 22-26 April 2008, Otsu
- ⑪ 濱崎幹也、X線を全身照射したBALB/cおよびC57BL/6マウスにおける小核網状赤血球のフローサイトメトリーによる解析：遺伝的不安定性が照射後長期にわたって生体内で持続する証拠。第50回日本放射線影響学会 2007/11/14-17 千葉
- ⑫ 楠 洋一郎、原爆被爆者集団における末梢血ナイーブCD4T細胞比率の加齢あるいは被ばく線量依存性の低下にCD45遺伝子多型との関連性は見られない。第17回日本サイトメトリー学会 2007/07/05-06 浦安

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠 洋一郎 (KUSUNOKI YOICHIRO)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・部長代理

研究者番号：60333548

(2) 研究分担者

濱崎 幹也 (HAMASAKI KANYA)

財団法人放射線影響研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号：80443597

今井 一枝 (IMAI KAZUE)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・研究員

研究者番号：80260230

吉田 健吾 (YOSHIDA KENGO)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・研究員

研究者番号：70443596

(3) 連携研究者

京泉 誠之 (KYOIZUMI SEISHI)

安田女子大学・家政学部・教授

研究者番号：50333547