

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82641

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24310045

研究課題名(和文) 低線量率放射線照射下の生体応答における非相同末端結合の役割の解明

研究課題名(英文) Role of non-homologous end joining in biological response under low dose-rate irradiation condition

研究代表者

富田 雅典 (Tomita, Masanori)

一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・上席研究員

研究者番号：00360595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断(DSB)は、放射線被ばくによって生じる生物影響の主な原因であり、DNA Ligase IV(Lig4)は、その主な修復機構である非相同末端結合(NHEJ)における重要なタンパク質の一つである。Lig4に点突然変異を持つマウスを用い、低線量率照射下で生じる影響を解析した結果、Lig4変異マウスは、1 Gyを高線量率照射した場合と比べ、1 mGy/hの低線量率で照射した場合のほうが早期に死亡することを見出した。その原因として、幹細胞にDNA損傷の蓄積やターンオーバーの加速による早期枯渇が生じることを解明し、低線量率照射下での生体防御機構としてのNHEJの重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Radiation-induced biological effects are mainly caused by an accumulation of unrepaired DNA double-strand breaks (DSBs). DNA Ligase IV (Lig4) is one of the key protein of non-homologous end-joining (NHEJ), which is a major DSB repair pathway in mammalian cells. In this study, we found that the Lig4 mutated mice irradiated with low dose-rate γ -rays at 1 mGy/h died earlier than those irradiated with 1 Gy of X-rays at high dose-rate (0.5 Gy/min). We clarified that early exhaustion of hematopoietic stem cells due to accumulation of DNA damage and then acceleration of stem cell turnover was occurred in the Lig4 mutated mice under low dose-rate irradiation conditions as a cause of this. Our obtained results suggest that NHEJ is a chief DSB repair mechanism in maintaining the integrity of the genome under low dose-rate irradiation conditions.

研究分野：放射線生物物理学

キーワード：放射線 細胞・組織 シグナル伝達 幹細胞 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所の事故により、低線量率放射線を連続して被ばくすることによる健康影響とその根拠となる機構の解明が、最重要課題の一つとなっている。国際放射線防護委員会 (ICRP) の 2007 年勧告では、原爆被爆者の疫学データに基づいた中・高線量域でのリスクを、低線量・低線量率域に当てはめるために、線量・線量率効果係数 (DDREF) として 2 という値を採用している。一方、国際的には DDREF をより厳しくする方向で検討が進んでおり、米国科学アカデミーの BEIR VII では 1.5、ドイツでは 1 という値が示されている。しかしながら、通常の自然放射線のレベルよりも 3 倍以上高い、中国やインドの高自然放射線地域住民の疫学調査では、有意な発がんリスクの増加は認められていない。これらの疫学調査結果から、低線量率放射線によるリスクを正しく理解し、防護に反映させるためには、その根拠となる生体応答機構の解明が求められる。しかしながら、施設の問題や微弱な影響を検出できないなどの理由から、研究が進んでおらず、欧州の主要な放射線研究機関で構成される MELODI (Multidisciplinary European Low Dose Initiative) と DoReMi (Low Dose Research towards Multidisciplinary Integration) においても、取り組むべき最重要課題の一つに位置付けられている。

線量率効果は、線量率が低くなると総線量は同じでも生物影響が低くなる現象であり、分割照射の延長線上に考えられていた。分割照射によって影響が低減される要因は、古くから亜致死損傷修復 (SLDR) が起こるためであると考えられており、その機構として内海らは、DNA2 重鎖切断 (DSB) 修復機構の一つである相同組換え (HR) が、相同染色体上に生じた DSB を修復した結果であることを明らかにした (Utsumi *et al.*, *Radiat. Res.* 2001)。我々は、ニワトリ DT40 細胞を用いて樹立された様々な DSB 修復遺伝子破壊株を用い、低線量率連続照射下では、DSB 修復機構の一つである非同末端結合 (NHEJ) がより重要になることを見出した (Tomita *et al.*, *J. Radiat. Res.* 2008)。さらに、高線量率照射の場合に高い感受性を示す、NHEJ に関与する KU70 と HR に関与する RAD54 を 2 重に破壊した細胞は、低線量率照射下では、むしろ KU70 単独の欠損細胞よりも感受性が低いことも明らかにした。この結果は、高線量率照射の場合とは異なる修復メカニズムも、低線量率照射下では働いている可能性を示している。また、NHEJ に関与する DNA-PKcs を欠損したヒト培養細胞の細胞生存率変化を測定した結果、照射開始 3 週間後までは、照射期間に応じて生存率が減少するが、照射期間を長くしてもそれ以上生存率は低下しなかった。この結果は、低線量率照射下では、細胞のターンオーバーも放射線影響に大きく関与することを示唆する。

低線量率照射下での組織・個体の放射線影響における NHEJ の役割を考えるにあたり、放射線発がんの標的とされる幹細胞への影響の解明が重要となる。幹細胞における NHEJ の重要性について、NHEJ に関与する DNA ligase IV (以下、Lig4) を欠損したマウスや、DNA-PKcs のリン酸化部位をアラニンに置換したマウスなどでは、代謝による酸化的 DNA 損傷が蓄積し、幹細胞が枯渇することが報告された (Rossi *et al.*, *Nature* 2007, Nijnik *et al.*, *Nature* 2007, Zhang *et al.*, *J. Cell. Biol.* 2011)。低線量率照射下における幹細胞への損傷の蓄積とターンオーバーのバランスを、NHEJ を欠損したマウスを用いて明らかにできれば、低線量率照射下でのリスクモデル構築に大きく貢献し、合理的な説明が可能になると期待される。

2. 研究の目的

低線量率放射線照射下の生体応答における NHEJ の重要性を、特に個体レベルでの幹細胞・組織への DNA 損傷の蓄積とターンオーバーへの NHEJ の寄与を中心に明らかにし、NHEJ を中心とした生体応答モデルを示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料

Lig4 遺伝子に点突然変異が生じた *Lig4*^{V288C} マウス (Australian Phenomics Facility より提供、Nijnik *et al.*, *Nature* 2007)、*p53* ノックアウトマウス (理研バイオリソースより入手 (CDB 0001)、Tsukada *et al.*, *Oncogene* 1993) を用いた。これらのマウス、および交配させたマウスの 13.5d の胎児からマウス胎児線維芽細胞 (以下、MEF) を作成した。*Lig4*^{V288C} マウス由来 MEF については、SV40 を用いて不死化した細胞株も樹立した。*Lig4*^{V288C} MEF へのヒト *Lig4* 遺伝子 (Liu *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2013) の導入には、4D-Nucleofector (ロンザ) を用いた。

(2) 照射

マウスへの低線量率 γ 線連続照射 (1, 0.3 mGy/時) は、当所の低線量率放射線長期照射設備を用いて行った。また、高線量率 X 線照射 (0.5 Gy/分) は、当所の MultiRad350 (Faxitron)、もしくは MBR-320R (日立メディコ) を用いて行った。

MEF への低線量率 γ 線連続照射は、低線量率放射線長期照射設備 (1 mGy/時)、及び京都大学・放射線生物研究センターの低線量長期放射線照射装置 (100 mGy/時) を用いて行った。高線量率 X 線照射 (0.7 Gy/分) には、MultiRad350 を用いた。線量測定は、ガラス線量計素子 (千代田テクノル) を用いて行った。

(3) 造血幹細胞等の解析

心臓採血等により安楽死させた後、脾臓、

大腿骨、脛骨を採取した。大腿骨、脛骨から、骨髓を採取し懸濁液を調整した。精製して蛍光抗体染色を行った後、細胞を1%パラホルムアルデヒド・PBS溶液を用いて固定し、セルソーター (FACSAriaIII、日本BD) を用いて解析とソーティングを行った。

(4) 細胞生存率解析

照射後のMEFをトリプシン処理により回収し、計数、希釈した後、ディッシュに播種した。7-9日後に細胞を固定・染色した後、50細胞以上から成るコロニーをカウントして細胞生存率を求めた。

(5) 細胞周期解析

照射後のMEFをトリプシン処理により回収して洗浄した後、 -20°C の70%エタノールを用いて細胞を固定した。RNase処理後、ヨウ化プロピジウム溶液で染色し、フローサイトメーター (EPICS XL、ベックマン・コールター) を用いて細胞周期分布を解析した。

(6) 免疫蛍光抗体染色

凍結切片は、クリオスター NX70 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて作成した。乾燥後に固定し、抗 γ -H2AX抗体 (Cell Signaling Technology)、DAPI溶液により染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (C1si、ニコン) を用いて観察した。

(7) 遺伝子発現解析

MEFからRNAを抽出し、RT² Profiler PCR Array System (キアゲン) を用いて、DNA損傷シグナル伝達に関与する遺伝子群の発現変化を解析した。リアルタイム定量PCRシステムには、Mx3000P (アジレント・テクノロジー) を用いた。

4. 研究成果

(1) MEFを用いた放射線感受性の解析

DNA Ligase IVの触媒ドメインに生じたY288C変異が、細胞の放射線感受性に及ぼす影響について、これまでに十分な報告がなかったため、初めに不死化MEFを樹立し、コロニー形成法により高線量率X線照射後の細胞生

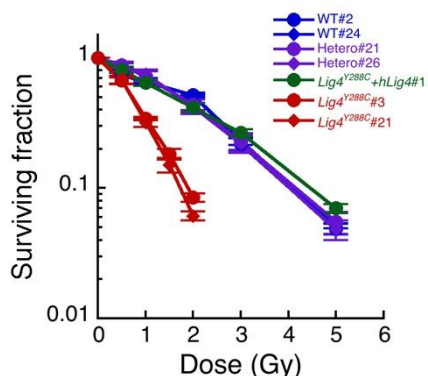


図1 高線量率X線 (0.7 Gy/分) を照射した細胞の生存率

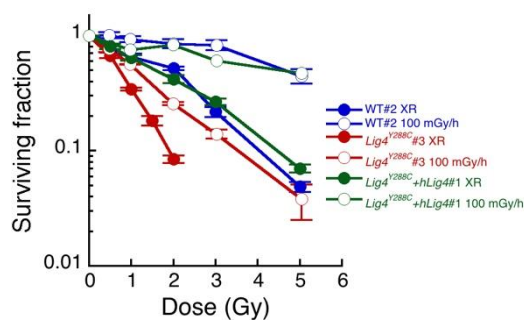
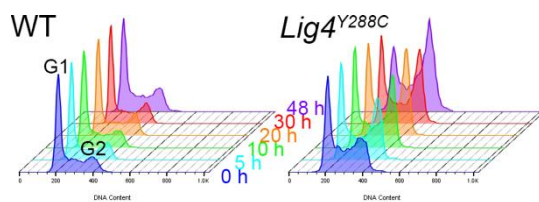


図2 高線量率X線照射 (0.7 Gy/分)、および低線量率 γ 線連続照射 (100 mGy/時) 後の細胞生存率の比較

(A)



(B)

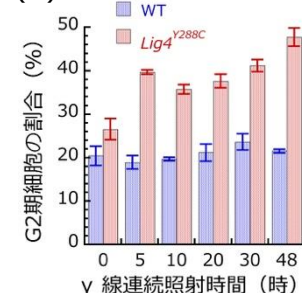


図3 低線量率 γ 線連続照射 (100 mGy/時) による細胞周期分布の変化 (A) と G2 期細胞の割合の変化 (B)

存率を解析した (図1)。野生型 (WT)、ヘテロ型 (Hetero) MEF の細胞生存率曲線はほぼ一致した。一方、 $Lig4^{Y288C}$ MEF は WT、Hetero MEF と比較して著しく高い細胞致死効率を示したが、ヒト $Lig4$ 遺伝子 ($hLig4$) を導入することにより ($Lig4^{Y288C}+hLig4$ MEF)、WT、Hetero MEF と同程度まで回復した。よって、 $Lig4^{Y288C}$ 変異により、MEF は高線量率放射線に対して高感受性を示すことを確認した。

図2に、100 mGy/時で低線量率 γ 線を連続照射した場合の細胞生存率を示した。WT、 $Lig4^{Y288C}+hLig4$ MEF は、 γ 線連続照射に対してもほぼ同レベルの細胞致死効果を示し、同じ線量の高線量率X線を照射した場合と比較して、細胞生存率が回復する線量率効果を示した。 $Lig4^{Y288C}$ MEF は、低線量率連続照射に対しても、WT MEF と比較して高感受性を示したが、線量率効果による回復は認められた。

報告者らは、ニワトリ DT40 細胞を用いて作成された NHEJ 関連遺伝子の欠損細胞が、低線量率 γ 線連続照射中に、細胞周期進行が G2 期で停止し、さらに損傷を蓄積することを明らかにしている (Tomita *et al.* 投稿準備中)。次に、100 mGy/時で連続照射した WT と

Lig4^{Y288C} MEF の細胞周期分布を解析した (図3)。WT MEF の細胞周期分布に大きな変化は認められなかったが、*Lig4*^{Y288C} MEF では、G2 期に細胞が蓄積することを確認した。これらの結果から、*Lig4*^{Y288C} MEF は、低線量率 γ 線連続照射中に生じた DSB が修復できないため、G2 期チェックポイントを通過できずに留まり、その間にさらに損傷を蓄積することが示唆された。

さらに線量率が 100 倍低い、1 mGy/時での γ 線長期連続照射 (42 日間) も行った。本実験では、*p53* ノックアウトマウスと交配させたマウスから作成した *WTp53*^{-/-} MEF と *Lig4*^{Y288C} *p53*^{-/-} MEF を用いた。図4に細胞生存率の変化を示した。*WTp53*^{-/-} MEF と比較して、*Lig4*^{Y288C} *p53*^{-/-} MEF の細胞生存率は約 10-15% ほど低下したが、100 mGy/時の場合とは異なり、照射期間を長くしても、積算線量の増加に伴った細胞生存率の低下は認められなかった。同様の結果は、NHEJ に関与する DNA-PKcs を欠損したヒト脳腫瘍細胞 M059J でも得られている (Tomita *et al.* 投稿準備中)。よって、線量率が 1 mGy/時まで低くなると、NHEJ が機能しなくても、長い照射期間中に細胞のターンオーバーが生じるため、積算線量が増加しても、それに応じて生存率は低下しないことが明らかとなった。

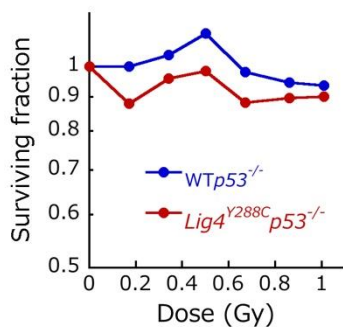


図4 低線量率 γ 線 (1 mGy/時) を長期連続照射した細胞の生存率

(2) *Lig4*^{Y288C} マウスの放射線感受性解析

5-7 週齢の WT、*Lig4*^{Y288C} マウスに、低線量率 γ 線 (1, 0.3 mGy/時) を連続照射、もしくは高線量率 X 線 (0.5 Gy/分) 1, 2 Gy を 1 回照射した場合の生存率を比較した。WT マウスでは、高線量率 X 線を 2 Gy を照射した群で 1 匹のみ死亡 (腫瘍形成) したが、他のマウスに照射による生存率の低下は認められなかった。一方、*Lig4*^{Y288C} マウスは、生まれながらに体が小さく (図5)、非照射のコントロール群でも、27 週齢までに 1/3 のマウスが体重減少・血球数の減少などにより死亡した (図6)。 γ 線 0.3 mGy/時連続照射群の生存率の低下は、コントロール群と比較して有意差はなかった。一方、 γ 線 1 mGy/時連続照射群の生存率は、積算線量が 1 Gy を超える 12 週齢 (照射開始後 6 週) 以降から低下した。この生存率の低下は、X 線 1 Gy 照射群と比較して有意であった。X 線 2

Gy 照射群では、11 週齢までにすべてのマウスが死亡した。



図5 16 週齢オスの WT (左) と *Lig4*^{Y288C} マウス (右)

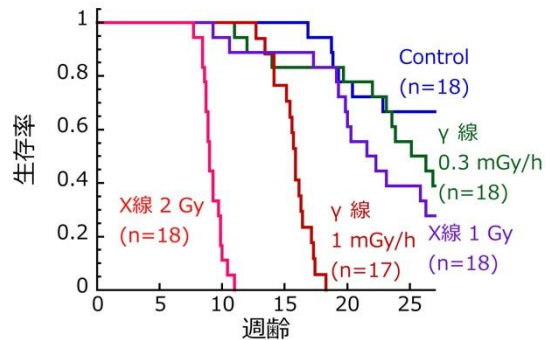


図6 低線量率 γ 線 (0.3, 1 mGy/時) 連続照射、高線量率 X 線 (0.5 Gy/分) 1 回照射後の WT、*Lig4*^{Y288C} マウスの生存率

(3) 造血幹細胞に低線量率 γ 線連続照射が及ぼす影響の解析

5-7 週齢から低線量率 γ 線 (1, 0.3 mGy/時) を連続照射した 24-27 週齢の WT、*Lig4*^{Y288C} マウスにおける造血幹細胞の変化を解析した。大腿骨、脛骨から骨髓懸濁液を精製し、蛍光抗体染色により lineage⁻Scal⁺c-Kit⁺ (KLS) 細胞の割合を求めた (図7)。その結果、WT マウスと比較して *Lig4*^{Y288C} マウスでは、非照射でも KLS 細胞の割合が低く、Nijnik ら (Nature

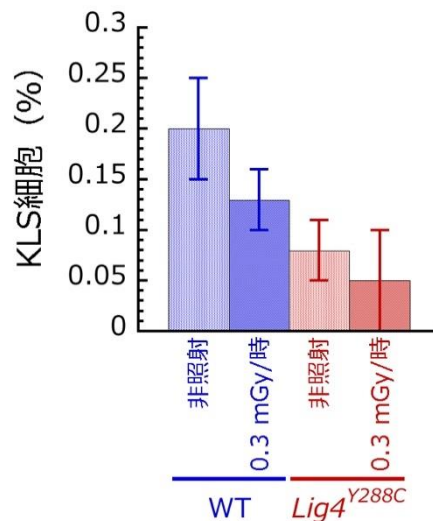


図7 KLS 細胞の割合の変化

24-27 週齢のマウス骨髓細胞中の lineage⁻Scal⁺c-Kit⁺ (KLS) 細胞の割合を示した。

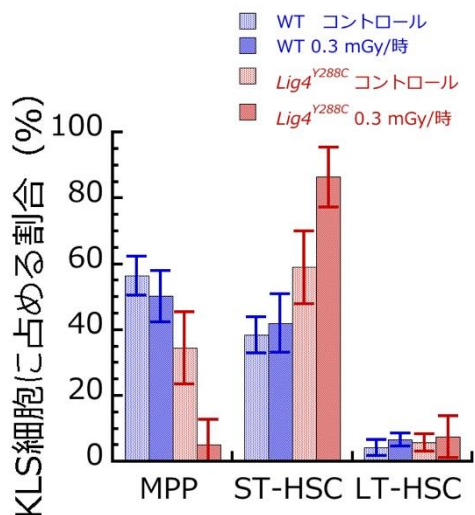


図8 造血幹細胞の割合の変化
24-27週齢のマウスKLS細胞中の各造血幹細胞の割合を示した。

2007)の結果を再現性した。

次にKLS細胞中のCD34⁺Flt3⁻造血幹細胞(LT-HSC)、CD34⁺Flt3⁺造血幹細胞(ST-HSC)、CD34⁺Flt3⁺多能性前駆細胞(MPP)の割合の変化を求めた。LT-HSCが最も上流に位置する自己複製能を有する造血幹細胞であり、ST-HSC、MPPの順に分化が進む。WTマウスでは、照射による変化は認められなかった。一方、Lig4^{Y288C}マウスではWTと比較して非照射でもMPPの割合が低く、ST-HSCの割合が高かったが、0.3 mGy/時の連続照射により、その傾向が著しく加速した。同様の結果は、1 mGy/時で照射したLig4^{Y288C}マウスでも認められた。

これらの結果から、Lig4^{Y288C}マウスでは、非照射でも加齢によりDNA損傷(DSB)が蓄積し、造血幹細胞のターンオーバーが加速されるが、低線量率γ線連続照射下ではさらに多くのDNA損傷が蓄積されるため、ターンオーバーの加速が促進され、早期枯渇に至ることを明らかにした。

(4) 低線量率γ線連続照射が腸管幹細胞に生じる影響の解析

造血幹細胞に加え、低線量率γ線を連続照射したマウスの腸管幹細胞への影響について解析した。低線量率γ線(1 mGy/時)を積算線量が1 Gyに到達するまで連続照射したWT、Lig4^{Y288C}マウスから、小腸(十二指腸)の凍結切片を作成し、DSBのマーカーであるリン酸化ヒストンH2AX(γ-H2AX)の蓄積を蛍光抗体染色により観察した(図9)。その結果、Lig4^{Y288C}マウスでは、腸管幹細胞が存在するクリプト底部において、γ-H2AXがより多く蓄積することを明らかにした。また、照射の有無によらず、クリプト細胞の数も著しく減少していた。

(5) 遺伝子発現解析

不死化していない継代数2回のWT、Lig4^{Y288C}MEFを用いて、1 mGy/時の低線量率γ線連続照射を行い、遺伝子発現変化を解析した。照

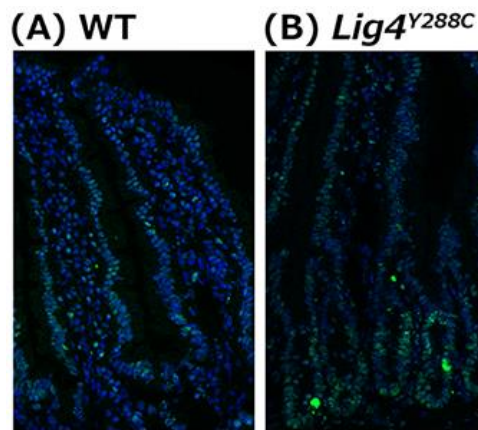


図9 小腸におけるDNA損傷の蓄積
低線量率γ線(1 mGy/時)を積算線量1 Gyまで連続照射した12週齢のマウス小腸におけるγ-H2AXの蓄積。バーは20 μm。

射は細胞を週1回程度適宜継代しながら31日間(積算線量0.74 Gy)行った。非照射コントロールのWTとLig4^{Y288C}のMEFを比較した場合、Lig4^{Y288C}MEFでは、Lig4の上流で働くNHEJ関連遺伝子やHRに関与するRad52などの一部の遺伝子の発現量が2倍以上増加していた。Lig4^{Y288C}MEFでは、代謝の過程で恒常的にDNA損傷が蓄積しているため、それを修復するためにこれらのDSB修復遺伝子の発現量が増加したものと推測された。WTMEFにおいて、低線量率連続照射の有無による遺伝子発現変化を解析した結果、損傷乗り越えDNA合成に関わる遺伝子群の一部に発現量の増加が認められた。類似の結果は、Lig4^{Y288C}MEFにおいても低線量率連続照射の有無により認められたが、さらにBRCA2やBRCA2と相互作用する遺伝子の一部にも2倍以上の発現量の増加が認められた。これらの発現量の変化が認められた遺伝子群については、DSB以外のDNA損傷の蓄積に関連している可能性もあり、今後別の実験においてさらに検討を進める予定である。

(6) まとめ

以上の結果から、Lig4^{Y288C}マウスでは、HR関連遺伝子の発現量が増加するものの、細胞周期に依存するHRでは低線量率連続照射下で離散的に生じるDSBを効率的に修復できないため、結局NHEJの不活化によりDSBが蓄積されることが高感受性を示す原因となることが明らかとなった。特に休止状態にある幹細胞では、NHEJによりDSBが修復されるため、NHEJの役割はより重要となる。

報告者らによる細胞レベルから組織・個体レベルに至るまでの一連の研究を通じて、低線量率放射線連続照射下では、DSB修復におけるNHEJの役割がより重要となることが明らかとなった。現在、放射線リスク研究において、ICRPがPub. 131で報告した幹細胞競合が、新たな組織レベルでの健全性維持機構として注目されている。予備的な結果ではあるが、Lig4^{Y288C}マウスにおいても腸管幹細胞において幹細胞競合が重要な役割を担っているこ

とが示唆されている。今後は、本研究結果を活用して、NHEJに加えて幹細胞競合を含めた低線量率放射線照射下における生体防御機構の全貌解明を進め、放射線リスク評価に反映させていく。

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1件)

- ① 富田 雅典、小林 純也、DNA Ligase IV 変異マウス由来細胞を用いた低線量率放射線照射下におけるDNA損傷蓄積性の解析、京都大学放射線生物研究センター年報 2015、査読無、2016、20

[学会発表] (計9件)

- ① 富田 雅典、低線量率放射線による生物影響の解明に向けて-DNA修復から細胞競合まで-、第36回生命医科学セミナー、2017年02月09日、九州大学病院地区総合研究棟(福岡県福岡市)
- ② 富田 雅典、小林 純也、大塚 健介、松本 義久、内海 博司、非相同末端結合欠損細胞が低線量率 γ 線に対して高感受性を示す機構の解析、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月01日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ③ 富田 雅典、松本 義久、小林 純也、大塚 健介、藤通 有希、岩崎 利泰、低線量(率)放射線の生物影響研究における課題、日本放射線影響学会第59回大会、2016年10月26日、JMSアステールプラザ(広島県広島市)
- ④ Masanori Tomita、Junya Kobayashi、Hiroshi Utsumi、Importance of Non-homologous End-joining under low dose-rate γ -ray irradiation condition, The 42nd Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 2016年09月05日、オランダ(アムステルダム)
- ⑤ 富田 雅典、小林 純也、大塚 健介、松本 義久、内海 博司、低線量率 γ 線連続照射下における非相同末端結合の重要性、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月03日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- ⑥ 富田 雅典、小林 純也、松本 義久、内海 博司、低線量率 γ 線連続照射下における非相同末端結合の重要性とその意義、日本放射線影響学会第57回大会、2014年10月03日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
- ⑦ 富田 雅典、低線量率放射線によるDNA損傷の修復機構、第3回低線量放射線影響研究交流会、2013年09月06日、放射線医学総合研究所(千葉県千葉市)
- ⑧ Masanori Tomita、Molecular mechanisms involved in the repair of DNA double-

strand breaks in cells exposed to low-dose-rate γ -radiation, 広島大学原爆放射線医科学研究所第3回国際シンポジウム、2013年03月13日、広島大学霞キャンパス広仁会館(広島県広島市)

- ⑨ 富田 雅典、低線量率放射線照射下におけるDNA2重鎖切断修復因子の役割、日本放射線影響学会第55回大会、2012年09月06日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

[その他]

ホームページ等

<http://criepi.denken.or.jp/jp/rsc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 雅典 (TOMITA, Masanori)

一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・上席研究員

研究者番号：00360595

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大塚 健介 (OTSUKA, Kensuke)

一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・主任研究員

研究者番号：50371703

小林 純也 (KOBAYASHI, Junya)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：30301302