

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K12202

研究課題名(和文) BRAF遺伝子点突然変異頻度に基づく放射線影響評価

研究課題名(英文) Evaluation of radiation effect based on point mutation of BRAF gene

研究代表者

和田 洋一郎 (Wada, Youichiro)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：10322033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、甲状腺がんなどに見られるBRAF V600E点変異を効率的に検出する方法を開発し、放射線被ばくによる変異メカニズムを研究しようとした。デジタルPCRシステムを駆使することで、10万個に1個の変異を検出することができた。放射線照射またはアリストロキア酸添加をおこなったHCT116細胞で変異が少数検出されたが、刺激を与えない場合にも検出されるケースがあり、これらの放射線照射やアリストロキア酸がBRAF V600E変異の誘因であるとは断定できなかった。今後放射線等の影響による遺伝子変異の検出にあたっては、特定の部位をさらに高効率で検出する手法の開発を優先すべきであると考えた。

研究成果の概要(英文)：BRAF V600E is likely a significant driving mutation in thyroid cancers, colorectal cancers and malignant melanomas. In this study, we have tried to develop a procedure to detect a single copy of point mutation, BRAF V600E among one hundred thousand copies to investigate the mechanisms of tumorigenesis. Using digital PCR system, we could determine the mutation in colon cancer cell line HCT116 treated with repeated high dose X-ray radiation, chronic low dose X-ray radiation and Aristolochic acid. However, the frequencies of BRAF V600E were too small to determine whether they were caused by these treatments. Together, to investigate the formation of specific point mutation, we should further develop the procedure to analyze larger copy numbers than one hundred thousand and seek suitable biological conditions.

研究分野：放射線生物学

キーワード：がん遺伝子

1. 研究開始当初の背景

放射線被ばくが発がんリスクを増大させ、遺伝子変異はその中の最も重要なステップのひとつであると考えられている。1986年のチェルノブイリ原子力発電所事故のち、小児甲状腺がんの増加が観察され、その後減少したことから放射線発がんであることが確認された。2011年福島第一原子力発電所事故以来、甲状腺がんの検診が行われ、現在までに100名以上の小児甲状腺がんが発見されている。一般の甲状腺がんにおいては、v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B(BRAF)の変異が約62%と高率にあり、特に点突然変異V600Eがその多くを占める。福島で発見された甲状腺がんにおいても同様の割合でこの変異が確認された。また、甲状腺以外でも、大腸癌、悪性黒色腫、ヒアリー白血病などで、BRAFV600E変異は高頻度で確認されている。これらの状況から、BRAFV600E変異の発生機序を明らかにすることで、発がんのメカニズム研究が進むことが期待される。

2. 研究の目的

放射線による遺伝子変異がどのような頻度で起きるのか、どのような状況で起こるのかを1分子レベルで解析することは、これまで困難であった。30億塩基あるヒトゲノムの中で、第7染色体上にあるBRAFのV600E点変異が起きるのは、ランダムに1か所に点変異が起こる場合を想定すると、30億分の1の確率である。本研究では、様々な条件の放射線照射によりBRAFのV600E変異が実際に生じるのか否かを調べる。そのために、まず大量のゲノム検体からごく少数の変異を検出する方法を確立する。次に、照射線量、照射線量率を変え、変異頻度を調べることで、変異の発生メカニズムを探求する。

3. 研究の方法

(1) コントロール細胞の設定

材料として、まず初めにすでにBRAFについて野生型およびV600E変異があることが報告されている大腸がん細胞株を用いて解析を行った。ヒト大腸がん細胞株HCT116は野生型BRAFを有し、同HT29はV600E変異を有することが報告されている。そこで、両細胞からクロマチンDNAを抽出し、解析の際のネガティブコントロール、ならびにポジティブコントロールとして使用することにした。また、同様にマウスのネガティブコントロール、ならびにポジティブコントロールとなる細胞を株化マウスメラノーマ細胞のなかから発見する。

(2) デジタルPCRによるV600E変異の検出

初めに研究者らはリアルタイムPCRシステムを利用したV600E変異検出系の創出を試みたが、デジタルPCR装置が有用な装置で

あることに気づき、このシステムを利用することにした。デジタルPCRはDNA抽出液を多数の微小水滴内に封じ込め、水滴ごとに蛍光物質でラベルしたプライマーを用いてPCR反応を行うシステムである。バイオラッド社製のデジタルPCR装置を用いて解析を行った。

(3) ジメチルスルフォキシド(DMSO)によるV600E変異の検出感度の調整

検体に少量のDMSOを加えることにより、PCR増幅効果が確認できるか否かを検討した。

(4) 放射線照射方法

放射線量は0.1 Gy, 1 Gy, 10 Gyの3種類の線量の急性照射(線量率 約2 Gy/分)を1週間ごとに行い、そのたびにDNAを抽出した。総線量は最大50 Gyであった。もう一方で、低線量率照射を断続的に合計720時間1000 mGy(線量率 0.02 mGy/分)照射した場合のクロマチンDNAも解析した。

(5) 紫外線(UV-A および UV-C)によるV600E変異の誘導

波長365 nmのUV-Aは紫外線の中では長波長で、組織深層にまで影響を及ぼす。波長256 nmのUV-Cは紫外線の中では短波長で、組織表層に強い影響を及ぼす。これら2種類の紫外線照射を培養細胞に行い、そのクロマチンDNAを解析した。

(6) アリストロキア酸によるV600E変異の誘導

アリストロキア酸は変異原として報告されている。特に、BRAF V600E変異で見られるバリンからグルタミン酸への置換は、核酸塩基配列のTがAに置き換わったものであり、このタイプの変異をアリストロキア酸は誘導するという報告がある。細胞培養液に種々の濃度のアリストロキア酸を添加し、BRAF V600E変異の発生状況を確認した。

(7) DNA修復欠損細胞におけるV600E変異の誘導

ヒト大腸癌株化細胞HCT116にジーンターゲットングによってDNA修復関連遺伝子XRCC3をノックアウトした細胞を用いて、放射線照射によってV600E変異が生じる確率を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸がん細胞株HCT116の解析

野生型BRAFを有し、ミスマッチ修復遺伝子MLH1が欠損したヒト大腸がん細胞株HCT116を使用した解析系を作製した。未処理のHCT116細胞では、デジタルPCR解析によってBRAF V600E変異は確認されなかった。一方、HT29は%でV600E変異が確認された。(表1)

マウスメラノーマ細胞では、ヒトの V600E に相当する Braf V637E に変異を持つものは見つからなかった。

表 1 2 種類のヒト大腸癌株化細胞の BRAF V600E 変異コピー数

| | HCT116 | HT29 |
|-------|--------------|---------------|
| 野生型 | 5120 (100 %) | 4204 (79.2 %) |
| V600E | 0 (0 %) | 1104 (20.8 %) |

(2) 放射線照射の影響

放射線量は 0.1 Gy, 1 Gy, 10 Gy の 3 種類の線量の急性照射 (線量率 約 2 Gy/分) を 1 週間ごとに行い、そのたびに DNA を抽出した。総線量は最大 50 Gy であった。

表 2 高線量急性放射線照射と HCT116 細胞の BRAF V600E 変異コピー数

| | HCT116 (XRCC3 +/+) | |
|-------|--------------------|----------------|
| | 非照射 | 50 Gy 照射 |
| 野生型 | 476020 (100 %) | 129237 (100 %) |
| V600E | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| | HCT116 (XRCC3 -/-) | |
| | 非照射 | 50 Gy 照射 |
| 野生型 | 523220 (100 %) | 124680 (100 %) |
| V600E | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

一方で、低線量率照射 (線量率 0.02 mGy/分) を合計 720 時間で 1000 mGy 照射した場合のクロマチン DNA も解析した。

表 3 低線量慢性放射線照射と HCT116 細胞の BRAF V600E 変異コピー数

| | HCT116 (XRCC3 +/+) | |
|-------|--------------------|--------------------|
| | 非照射 | 1000 mGy 照射 |
| 野生型 | 468520 (100 %) | 116613 (100 %) |
| V600E | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| | HCT116 (XRCC3 -/-) | |
| | 非照射 | 1000 mGy 照射 |
| 野生型 | 497060 (100 %) | 128512 (99.9992 %) |
| V600E | 0 (0 %) | 1 (0.0008 %) |

XRCC3 ノックアウト細胞で、12 万コピーに 1 コピーだけ V600E 変異が確認できた。

(3) 紫外線(UV-A および UV-C)の影響

波長 365 nm の UV-A と波長 256 nm の UV-C の 2 種類の紫外線照射を培養細胞 HCT116 に行い、そのゲノム DNA を解析した。

表 4 紫外線照射と HCT116 細胞の BRAF V600E 変異コピー数

| | 非照射 | UV-A 照射 | UV-C 照射 |
|-------|----------------|--------------|---------------|
| 野生型 | 533220 (100 %) | 2356 (100 %) | 16180 (100 %) |
| V600E | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

V600E 変異は確認できなかった。

(4) アリストロキア酸 B の影響

細胞培養液に種々の濃度のアリストロキア酸 B を添加し、BRAF V600E 変異の頻度を確認した。

表 5 アリストロキア酸 B 添加と野生型 HCT116 細胞の BRAF V600E 変異コピー数

| | DMSO | アリストロキア酸 B | |
|-------|------------------|-----------------|---------------|
| | | 100µM | 400µM |
| 野生型 | 19624 (99.985 %) | 29840 (99.99 %) | 30480 (100 %) |
| V600E | 3 (0.015 %) | 3 (0.01%) | 0 (0 %) |

表 6 アリストロキア酸 B 添加と XRCC3 変異 HCT116 細胞の BRAF V600E 変異コピー数

| | DMSO | アリストロキア酸 B | |
|-------|---------------|---------------|-------------------|
| | | 100µM | 400µM |
| 野生型 | 15078 (100 %) | 21270 (100 %) | 21270 (99.9953 %) |
| V600E | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 1 (0.0047 %) |

野生型 HCT116 では、DMSO を添加したもので BRAF V600E 変異が 3 コピー見られた。この結果から、BRAF V600E 変異はアリストロキア酸 B による影響とは考え難い。

総括

本研究は、BRAF V600E 点変異を効率的に検出する方法を開発し、放射線被ばくによる同変異の検出の有無を確認しようとした。デジタル PCR システムを駆使することで、12 万個に 1 個の変異を検出することができた。放射線照射またはアリストロキア酸添加をおこなった HCT116 細胞で BRAF V600E 変異が検出されたが、その数は少なく、刺激を与えない場合にも検出されるケースがあった。これらの放射線照射やアリストロキア酸が BRAF V600E 変異の誘因であるとは断定できなかった。今後放射線等の影響による遺伝子変異の検出にあたっては、特定の部位をさらに高効率で検出する手法の開発を優先すべきであると考えた。

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)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Effects of Chronic Low-Dose Radiation on Human Neural Progenitor Cells.

Katsura M, Cyou-Nakamine H, Zen Q, Zen Y, Nansai H, Amagasa S, Kanki Y, Inoue T, Kaneki K, Taguchi A, Kobayashi M, Kaji T, Kodama T, Miyagawa K, Wada Y, Akimitsu N, Sone H. Sci Rep. 2016 Jan 22;6:20027. doi: 10.1038/srep20027. (査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

Effects of Low- dose Internal Radiation From Cs-137 on Normal Human Cell

Nobuyoshi Akimitsu, Mari Katsura, Azusa Ishibashi, Hiromasa Cyou Nakamine, Kazuyuki Tao, Toshiyuki Kaji, Hideko Sone, Tatsuhiko Kodama, Kiyoshi Miyagawa, Youichiro Wada, ICRR 2015 (Kyoto) 2015年5月26日、国立京都国際会館(京都府京都市)

Effects of Low- and Middle- Dose Rate Radiation on Human Neural Precursor Cells

Mari Katsura, Hiromasa Nakamine, Hideko Sone, Shota Amagasa, Toshiyuki Kaji, Kiyoshi Miyagawa, Youichiro Wada, Nobuyoshi Akimitsu, 2015 ICRR (Kyoto) 2015年5月26日、国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ric.u-tokyo.ac.jp/>

http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田洋一郎 (WADA, Youichirou)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号: 10322033

(2) 研究分担者

桂 真理 (KATSURA, Mari)

東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教

研究者番号: 30436571

(3) 連携研究者

石崎 梓 (ISHIZAKI, Azusa)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・研究員

研究者番号: 10558894

秋光信佳 (AKIMITSU, Nobuyoshi)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号: 40294962

ウィロックス ラルフ (WILLOX Ralph)

東京大学・数理科学・准教授

研究者番号: 20361610