

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22310037
 研究課題名（和文）低線量放射線被ばくのゲノム損傷を測る分子的生物線量計の開発と発がんリスク評価
 研究課題名（英文）Development of a biological dosimeter to detect the DNA damage induced by low dose radiation and carcinogenic risk evaluation
 研究代表者 神谷 研二（KAMIYA KENJI）
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
 研究者番号：60116564

研究成果の概要（和文）：

最新の突然変異誘発機構の研究成果を応用して、低線量放射線被ばくに対する分子レベルの生物線量計の開発を試みた。生物線量計として、突然変異を誘発する *Rev1* トランスジェニックマウスとヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスを交配した F1 マウスを使用した。その結果、F1 マウスは、自然誘発がんのみならず、放射線誘発がんを高頻度に発症した。このマウスを使うことで放射線発がんリスクを評価できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

It was explored the development of a biological dosimeter for low dose irradiation using our latest research data about mutagenesis. *Rev1 Tg* mice and *Apc^{Min/+}* mice, which are the model mice for human familial adenomatous polyposis coli, are used to generate *Apc^{Min/+}; Rev1 Tg* mice. The incidence of spontaneous and radiation-induced intestinal adenoma in *Apc^{Min/+}; Rev1 Tg* mice was significantly higher than that in *Apc^{Min/+}* mice. *Apc^{Min/+}; Rev1 Tg* mouse is thought to be useful for the study of risk estimation of radiation-induced cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：放射線生物学

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：低線量放射線

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化対策としての原子力エネルギーの利用増加や、医療や産業の高度化に伴う放射線利用の激増など、放射線を利用した技術は21世紀の社会では不可欠のものである。放射線を安全に利用するためには、放射線の健康影響を科学的に把握する必要がある。しかし、世界で最も精度の高い原爆被ばく者の疫学資料を用いても100mSV以下の発がんリスクは測定できない。100mSV以下の発がんリスクを測定するためには放射線による発がん機構を解明しそれを応用した分子レベルのリスク評価を行う必要がある。

放射線誘発白血病では、二重鎖切断に伴う染色体転座や染色体不安定が発症に深く関与する。しかし、これまでに報告された放射線関連固形がんの遺伝子変異は、自然突然変異に類似した点突然変異が圧倒的に多いことが報告されている。このことより、放射線による発がんでは、点突然変異の関与が非常に重要であると考えられる。

我々は、点突然変異誘発に関与する *Rev1* 遺伝子に着目し、*Rev1* トランスジェニックマウスを作成し、*Rev1* の機能亢進が発がんに関与することを示唆する知見を得ている。

一方、ヒト家族性大腸腺腫症のモデルである *Apc^{Min/+}* マウスは、片側アレルの変異を遺伝的に有し、小腸腫瘍を多発する。この *Rev1* トランスジェニックマウスと *Apc^{Min/+}* マウスを交配した F1 マウスは、より多数の小腸腫瘍が短期間に誘発され、極めて高感度な発がん感受性マウスとして利用できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、突然変異を誘発する *Rev1* トランスジェニックマウスと *Apc^{Min/+}* マウスを交配した F1 マウスを使用し、低線量放射線被ばくに対する分子レベルの生物線量計の

開発を試みる。誘発された小腸腫瘍を用いて、新たに出来た対側アレルの *Apc* 変異を同定することで低線量放射線の爪痕とその発がんリスク評価を試みる。同時に、損傷乗り越え DNA 合成による点突然変異の誘発機構の解析を進め、低線量放射線による点突然変異を介する発がん機構を解明し、併せてリスク評価に応用する。

3. 研究の方法

(1) マウス

Rev1 トランスジェニックマウス (C57BL/6N 系統) は広島大学原爆放射線医科学研究所疾患モデル研究分野の本田浩章先生に作成していただいた。*Apc^{Min/+}* マウス (C57BL/6N 系統) は日本チャールズリバーから購入した。*Rev1* トランスジェニックメスマウスと *Apc^{Min/+}* オスマウスを交配させ、得られた仔を実験に使用した。

(2) 照射

生後2週齢の *Apc^{Min/+}*、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスに2Gyの照射を行った。線源として¹³⁷Cs γ 線を用い照射の線量率は1.03Gy/minである。

(3) 発がん実験

Apc^{Min/+}、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスを、19週齢まで飼育し、エーテル麻酔後、頸椎脱臼により屠殺し、体重、脾臓の重量を測定した。また、末梢血を採取し、リンパ球数、ヘモグロビン値、血小板数を測定した。屠殺後、小腸、大腸を採取し、ホルマリンで固定した。また、直径2mm以上の腫瘍は、パラフィン切片を作成し、組織学的観察により、浸潤の有無を診断した。

(4) 小腸腫瘍を用いた放射線の爪痕解析

Apc^{Min/+}、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスに誘発した小腸腫瘍の遺伝子変異の解析を行った。特に、遺伝的 *Apc^{Min/+}* 変異を持たな

い対側のアレルに新たに出来た変異スペクトラムを解析した。

(5) REV1 の損傷乗り越え DNA 合成による突然変異誘発機構の解析

放射線発がんにおける突然変異誘発機構を解析するためには、突然変異誘発の中心的役割を担う REV1 の生化学的な機能解析は不可欠である。

そこで、既知の組み換えタンパク質因子 (DNA ポリメラーゼ δ 複合体、RFC、PCNA、RPA) を大腸菌で過剰発現し、組み換えタンパク質を大量精製し、DNA 合成の試験管内複製系の確立を試みた。さらに、REV1 の個々のドメインを欠失した変異タンパクを精製し、突然変異誘発における REV1 の役割や制御機構を解析した。

4. 研究成果

自然発症の小腸腫瘍形成を調べるため、*Apc^{Min/+}*、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスを 19 週齢まで飼育し、その後、屠殺した。*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスは、*Apc^{Min/+}* マウスと比較して、有意に末梢ヘモグロビン値の低下、脾臓重量の増加が観察された。また、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスは、*Apc^{Min/+}* マウスと比較して、小腸腫瘍の数が有意に増加していた。

放射線照射による腫瘍形成への寄与を調べるために、2 週齢の *Apc^{Min/+}*、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスに 2Gy 照射を行い、19 週齢で屠殺した。その結果、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスは、*Apc^{Min/+}* マウスと比較して、放射線照射に高発がん性を示した。

小腸腫瘍を用いた放射線の爪痕解析を行った結果、自然発症した *Apc^{Min/+}*、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウス由来小腸腫瘍では、染色体の交差による LOH が高頻度で検出され、その頻度は同程度であった。放射線照射により誘発した *Apc^{Min/+}*、*Apc^{Min/+}; Rev1*

1 トランスジェニックマウス由来小腸腫瘍を用いた解析から、両者とも照射により、DNA 切断による LOH の頻度が増加した。*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスにおける DNA 切断による LOH の頻度は、*Apc^{Min/+}* マウスにおける頻度よりも低い値を示した。

また、突然変異誘発における Rev1 の機能を明らかにするために、Rev1 タンパクの各ドメインの機能解析を行った。Rev1 の個々のドメインを欠失した変異体タンパクを精製し、生化学的解析を行った結果、REV1 の DNA との結合能および、そのドメインを明らかにした。

これらの結果から、*Apc^{Min/+}; Rev1* トランスジェニックマウスは、放射線発がんに対して高感受性マウスとして利用できる可能性があるといえる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Suzuki F and Kamiya K: Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex. *Nucleic Acids Research*; 40(3): 1065-1076, 2012. 査読有
2. Masuda Y, Kamiya K: Molecular nature of radiation injury and DNA repair disorders associated with radiosensitivity. *Int J Hematol*; 95(2): 239-245, 2012. 査読有
3. Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Hishiki A, Hashimoto H, Masutani C, Hishida T, Suzuki F, Kamiya K., En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. *Nucleic Acids Res*; 40(20): 10394-407, 2012. 査読有
4. 笹谷めぐみ, 増田雄司, 神谷研二: APC *Min/+* マウスにおける放射線誘発消化管腫瘍の解析. *広島医学*; 65(4): 316-318,

2012. 査読有
5. 増田雄司, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 放射線によって誘発される DNA 損傷に対する複製後修復経路の機能解析. 広島医学; 65(4): 292-294, 2012. 査読有
 6. 河合秀彦, 曹麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 増田雄司, 笹谷豊島めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男: 恒常的な放射線照射に対する細胞応答の線量率依存性の解析. 広島医; 65(4): 302-304, 2012. 査読有
 7. Toyoshima M., Honda H., Watanabe H., Masuda Y., Kamiya K.: Development of a sensitive assay system for tritium risk assessment using Rev1 transgenic mouse. Fusion Science and Technology; 60: 1204-1208, 2011. 査読有
 8. de Groote FH, Jansen JG, Masuda Y, Shah DM, Kamiya K, de Wind N and Siegal G: The Rev1 translesion synthesis polymerase has multiple distinct DNA binding modes. DNA Repair ; 10: 915-925, 2011. 査読有
 9. Toyoshima M, Honda H, Watanabe H, Masuda Y, Kamiya K: Development of a sensitive assay system for tritium risk assessment using Rev1 transgenic mouse. Fusion Science and Technology ; 60: 1204-1208, 2011. 査読有
 10. 豊島めぐみ, 習陽, 三家本隆宏, 渡邊敦光, 増田雄司, 本田浩章, 濱崎幹也, 楠洋一郎, 神谷研二: 損傷乗り越えポリマーゼ Rev1 の放射線発がんに与える影響. 広島医学 ; 63(4): 348-350, 2010. 査読有
 11. 三家本隆宏, 豊島めぐみ, 習陽, 本田浩章, 濱崎幹也, 楠洋一郎, 神谷研二: 損傷乗り越えポリマーゼ Rev1 の過剰発現が放射線による突然変異誘発に与える影響. 広島医学 ; 63(4): 345-347, 2010. 査読有
 12. Tachibana N., Iwamoto T., Kawamura T., Masuda Y., Mori T., Kamiya K.: Generation and Evaluation of an Anti-REV1 Monoclonal Antibody. HIJM ; 59(3): 51-56, 2010. 査読有
 13. Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kasahara T, Osada H, Yatabe Y, Akashi T, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M: Regulation of DNA Polymerase POLD4 Influences Genomic Instability in Lung Cancer. Cancer Research ; 70(21): 8407-8411, 2010. 査読有
 14. 増田雄司, 笹谷豊島めぐみ, 神谷研二: 放射線による PCNA のモノユビキチン化の解析. 長崎医学会雑誌 ; 85(特集号): 249-251, 2010. 査読有
 15. 笹谷豊島めぐみ, 増田雄司, 神谷研二: 放射線応答における損傷乗り越え DNA 合成の役割. 長崎医学会雑誌 ; 85(特集号): 239-241, 2010. 査読有
 16. Watanabe, H., Toyoshima, M., Ishikawa, M., Kamiya, K.: Paternal monoenergetic neutron exposure results in abnormal sperm, and embryonal lethality and transgenerational tumorigenesis in mouse F1 offspring. Oncol. Rep. ; 23(5): 1351-1360, 2010. 査読有
- [学会発表] (計 25 件)
1. Y. Xu, M. Sasatani, H. Kawai, K. Kamiya: Function of RAD18 on radioresponse. The 2nd International Symposium Phoenix Leader Education Program(Hiroshima Initiative) for Renaissance from Radiation Disaster -Suggestion for the Renaissance from Radiation Disaster-, Hiroshima, 2013/2/10. (Abstracts, p74, 2013)
 2. H. Kawai, L. Cao, D. Iizuka, H Matsui, A. Kanai, T. Inaba, M. Sasatani, K. Kamiya, F. Suzuki: Comprehensive analysis of cellular responses to chronic γ - irradiation. 3rd International Symposium of RIRBM -Biological Effects of Low Dose Radiation-, Hiroshima, 2013/2/12. (Abstracts, pp7-6, 2013)
 3. 笹谷めぐみ, XU Yanbin, 本田浩章*1,

- 渡邊敦光, 神谷研二:白血病モデルマウスを用いた放射線誘発胸腺リンパ腫発症機構解明. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012/9/7. (講演要旨集, p.157, 2012)
4. XU Yanbin, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 増田雄司, 神谷研二:Role of post-replication repair system on radioresponse. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012/9/6. (講演要旨集, p.139, 2012)
 5. 増田雄司, 鈴木美紀, 益谷央豪, 神谷研二:ヒト PCNA のユビキチン化酵素 RAD6-RAD18 複合体の構造と機能. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012/9/7. (講演要旨集, p.115, 2012)
 6. 河合秀彦, 曹 麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男:異なる線量率の γ 線照射下での細胞応答の多次元解析. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012/9/6. (講演要旨集, p.86, 2012)
 7. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二:放射線による DNA 損傷と複製後修復経路の機能. 日本放射線影響学会第 54 回大会, 神戸市, 11/17/2011. (講演要旨集, p.75, 2011)
 8. 神谷研二:低線量放射線の人体影響と生体応答. 日本放射線影響学会第 54 回大会, 神戸市, 11/19/2011. (講演要旨集, p.53, 2011)
 9. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 渡邊敦光, 増田雄司, 神谷研二:放射線発がんゲノム不安定性. 日本放射線影響学会第 54 回大会, 神戸市, 11/19/2011. (講演要旨集, p.104, 2011)
 10. 河合秀彦, 曹 麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 増田雄司, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男: γ 線の照射環境下での細胞応答の線量率依存性の解析. 日本放射線影響学会第 54 回大会, 神戸市, 11/19/2011. (講演要旨集, p.104, 2011)
 11. 神谷研二:被ばく医療とがん. 第 49 回日本癌治療学会学術集会, 名古屋, 10/27/2011.
 12. 笹谷めぐみ, 本田浩章, 増田雄司, 渡邊敦光, 神谷研二:Rev1 の過剰発現が発がんに及ぼす役割. 第 70 回 日本癌学会学術総会, 名古屋, 10/5/2011. (講演要旨集, p.267, 2011)
 13. 鈴木元, 富田秀太, 有馬千夏, 増田雄司, 神谷研二, 長田啓隆, 谷田部恭, 高橋 隆:肺癌における POLD4 の関与. 第 70 回 日本癌学会学術総会, 名古屋, 10/3/2011. (講演要旨集, p.90, 2011)
 14. 増田雄司, 神谷研二:損傷 DNA の複製と PCNA のポリユビキチン化の分子機構. 第 70 回 日本癌学会学術総会, 名古屋, 10/5/2011. (講演要旨集, p.266, 2011)
 15. M Sasatani, H Honda, K Hamasaki, Y Kusunoki, Y Masuda, K Kamiya:The role of Rev1 in radiation and chemical-induced tumor development using Rev1 Tg mice. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, 9/1/2011. (Abstracts, p.312, 2011)
 16. Y Masuda, M Suzuki, K Kamiya:DNA damage tolerance and molecular mechanism of PCNA ubiquitination. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, 8/30/2011. (Abstracts, p.144, 2011)
 17. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二:ヒト PCNA のユビキチン化酵素 RAD6-RAD18 複合体の解析. 日本遺伝学会第 83 回大会, 京都, 9/21/2011. (講演要旨集, p.104, 2011)
 18. 笹谷めぐみ, 増田雄司, 神谷研二:APCMin/+マウスにおける放射線誘発消化管腫瘍の解析. 第 52 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 6/5/2011. (講演要旨集, p.40, 2011)
 19. 増田雄司, 笹谷めぐみ, 神谷研二:放射線によって誘発される DNA 損傷に対する複製後修復経路の機能解析. 第 52 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 6/5/2011. (講演要旨集, p.36, 2011)
 20. 増田雄司:突然変異誘発経路の制御機構

～PCNAのエピケン修飾の生化学的解析から。
平成 23 年度 日本環境変異原学会 公開シ
ンポジウム, 東京都, 5/28/2011. (講演要旨
集, p. 10, 2011)

21. 笹谷めぐみ、本田浩章、濱崎幹也、楠 洋
一郎、渡邊敦光、増田雄司、神谷研二：放
射線発がんにおける損傷乗り越え DNA 合
成酵素 Rev1 の及ぼす寄与。日本放射線影
響学会第 5 3 回大会, 京都市, 10/20/2010.
(講演要旨集, p. 146, 2010)
22. 浅川順一、上口勇次郎、金岡里充、中本
芳子、辻 隆弘、三嶋秀治、三浦昭子、金
子順子、羽場 博、今中正明、片山博昭、
CULLINGS Harry, 神谷研二、中村 典：
DNA2 次元電気泳動法を用いた放射線のラット
未熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響評価：ヒ
ト女性被曝の動物モデル実験。日本放射
線影響学会第 5 3 回大会, 京都
市, 10/20/2010. (講演要旨集, p. 116,
2010)
23. 鈴木 元、富田秀太、有馬千夏、増田雄
司、神谷研二、長田啓隆、谷田部 恭、黄
勤びょう、高橋 隆：肺小細胞癌に見られ
た POLD4 低発現。第 69 回日本癌学会学術
総会, 大阪, 9/24/2010. (講演要旨集,
p. 525, 2010)
24. 笹谷めぐみ、本田浩章、増田雄司、渡邊
敦光、神谷研二：Rev1 の過剰発現は化学
物質による発がんを促進する。第 69 回日
本癌学会学術総会, 大阪, 9/24/2010. (講
演要旨集, p. 524, 2010)
25. 笹谷-豊島めぐみ、増田雄司、神谷研二：
放射線応答における損傷乗り越え DNA 合
成の役割。第 51 回原子爆弾後障害研究会,
長崎, 6/6/2010. (講演要旨集, p. 26,
2010)

[その他]

ホームページ

[http://home.hiroshima-u.ac.jp/exponc/in
dex.html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/exponc/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 研二 (KAMIYA KENJI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：60116564

(2) 研究分担者

笹谷 めぐみ (SASATANI MEGUMI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：80423052

飯塚 大輔 (IIDUKA DAISUKE)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：00455388

(H24～H24)

増田 雄二 (MASUDA YUJI)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号：30273866

(H22～H23)