

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24年4月2日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510053

研究課題名（和文）

放射線誘発突然変異のエイジ依存性とそのメカニズムの解析

研究課題名（英文）

Studies on age-dependency of radiation-induced mutation and its mechanism

研究代表者

上原 芳彦（UEHARA YOSHIHIKO）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30223499

研究成果の概要（和文）：

放射線の発癌効果には被曝時のエイジ依存性のあることが分かっているが、そのメカニズムは未だ分かっていない。本研究では癌の大きな要因であることが分かっている遺伝子変異の生成効率がエイジによって異なることがその原因ではないかという仮説にたって lacZ 遺伝子導入マウスを用い肝臓での変異生成を調べた。その結果、放射線による変異誘発効果は確かにエイジ依存性がみられるが、その様子は発癌効果でみられるエイジ依存性とは異なることから仮説は正しくないことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Although it is well established that radiation-induced cancer shows age-dependency at which the individuals are exposed, the mechanism responsible for it is not understood. We hypothesized that the age-dependency could be explained by a difference in the efficiency of mutation induction with radiation. Using lacZ-transgenic mice, we studied dose responses of mutation induction in liver at different ages. The efficiency changed with age but the mode of the change was different from that of cancer induction. Thus, mutation induction could not explain the age-dependency of cancer induction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：放射線、マウス、被曝時年齢依存性、突然変異、DNA修復

1. 研究開始当初の背景

放射線による発癌リスクは被曝時の年齢によって大きく変化することが被曝者の調査とマウスを使った実験から明らかにされている。しかしながらこの被曝時年齢依存性

がどのようなメカニズムに支配されているかについては全く分かっていない。従ってこれを制御することができない状況が続いている。

2. 研究の目的

そこで我々は放射線による突然変異の量が被曝時の年齢（エイジ）によって異なり、それが発癌の被曝時年齢依存性を決めているのではないかという仮説を立てた。その根拠は、放射線による突然変異誘発は細胞のもつ非相同末端結合修復能力に大きく依存することを見出した我々自身の成果に由来する (Radiat. Res. 170:216-223 (2008))。即ち、放射線による突然変異の殆どは放射線によって生じた DNA 二重鎖切斷を非相同末端結合によって再結合する時の誤りに由来することが分かったことによる。従ってもしこの非相同末端結合修復の能力が個体の発達、成長の過程で増減すると仮定するとそれに応じて放射線による突然変異は変化することになり、それが発癌効率の違いを説明し得るものになる。このような考えから放射線による突然変異誘発効率がエイジによって異なるかどうか、異なるとすればその原因は何かについて明らかにしようと考えた。因みにマウス肝臓における放射線の癌誘発効果は胎仔期で低く、出生直後～1週令で高くなり、生後 35 日以後はまた低くなることが S. Sasaki によって明らかにされている (J. Radiat. Res., Suppl 2: 73-85 (1991))。

3. 研究の方法

用いたマウスは大腸菌の lacZ 遺伝子を導入された Muta マウス、red・gam 遺伝子を導入された gpt-delta マウス、相同組換え修復に関与している Rad54 遺伝子のノックアウトマウスの 3 種を用いた。Ku70 欠損マウスも用意したが、繁殖力が極端に低く、実際には使えなかった。上記マウスを交配し、2 種類の人工遺伝子をもったマウスを作成した。放射線は 10Gy、20Gy (線量率は 0.72Gy/min) の X 線を用い、それを全身照射後 3 日目で肝臓をサンプリングし、DNA 抽出後定法に従って突然変異頻度を求めた。15.5 日齢胎仔に 20Gy 照射した後 3 日目でみると体重は約 1/2 になっていたが、外見的影响はみられなかった。一部の変異体については DNA シーケンス法により塩基配列の変化を同定した。

gpt-delta マウスについてはマウスゲノムからのラムダ DNA 回収効率が低く信頼できるだけの変異体数を確保するのが難しいと判断し、途中で使用を断念した。

4. 研究成果

(1) 放射線による突然変異誘発効率のエイジ依存性

lacZ をもった Muta マウスの 15.5 日胎仔齢、生後 2 日齢、生後 7 日齢、生後 2 ヶ月齢で 10～20Gy の X 線を照射した時の肝臓での突然変異頻度は図 1 のようであり、若年齢の時の変異誘発率は低かった。

これらのデータから直線回帰を行い、1Gy 当たりの変異増加率を求め、エイジに対しプロットすると図 2 のようになった。これらの結果から放射線による突然変異誘発効率は胎児期で低く、生後は成体になるまで徐々に増加することが分かった。

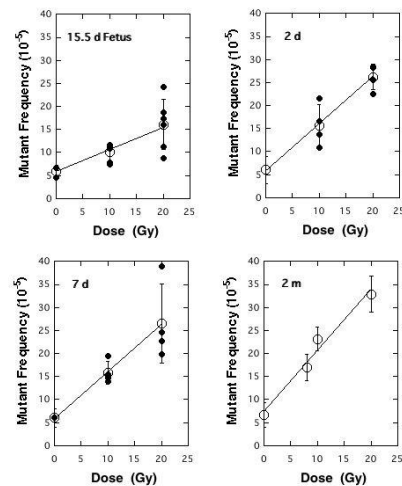


図 1 胎齢 15.5 日から生後 2 ヶ月齢の 4 つのエイジで放射線誘発突然変異の線量効果関係を調べた。マウスは lacZ をもった Muta マウス、臓器は肝臓。●は個々のマウスを、○は平均値を、縦の線は標準偏差を示している。2 m については個体数が多いので平均値だけを示した。

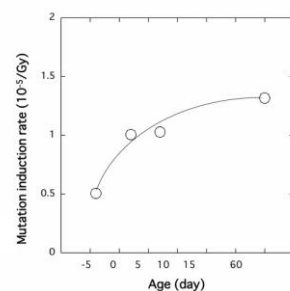


図 2 放射線による突然変異誘発効率のエイジに伴う変化。図 1 の結果を直線回帰し、1Gy 当たりの変異増加率を求めた。胎仔期のエイジは出生時を胎齢 18.5 日と考え、そこをゼロとしてマイナス値で表した。

次に 15.5 日齢でみられる突然変異と 2 ヶ月齢でみられる突然変異に質的な違いがないかどうかについて調べるため、見出された変異体の DNA 塩基配列を調べ、異なるタイプの変異がどれ程出現しているかを比較してみた。その結果、放射線照射は欠失型変異をより多く誘発すること、しかもその特徴は 15.5 日齢胎仔と生後 2 ヶ月齢の成体の肝臓で違いは見られなかった (図 3)。従って変異生成プロセスに大きな違いはないのではないかと推測される。

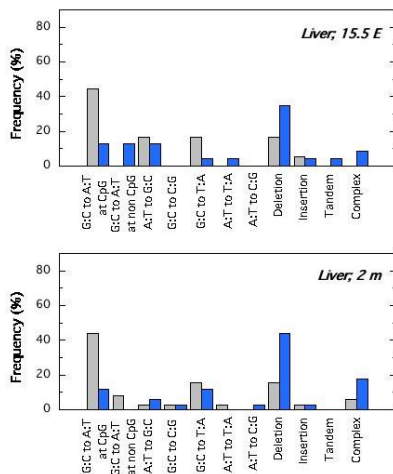


図 3 15.5 日齢胎仔と生後 2 ヶ月齢のマウスの肝臓でみられる放射線誘発突然変異の分子特性。非照射マウスは灰色のカラムで、20Gy 照射マウスの値は黒のカラムで示されている。縦軸はそれぞれの変異の割合を示している。非照射では GpG での G:C→A:T 変異が最も多いのに対し照射にマウスでは欠失型変異の頻度が最も高くなっている。胎仔と 2 ヶ月齢の成体マウスでの比較では差はみられない。

(2) Rad54 欠損マウスでの放射線誘発突然変異

胎仔期で放射線による突然変異誘発効率が低い理由を考えると、放射線による DNA 二重鎖切断が error-prone な非同末端結合により修復されるのではなく、error-free な相同組換え修復によって行われるせいではないかと推測される。そこで相同組換え修復に関与していることが知られている Rad54 遺伝子のノックアウトマウスを入手し、それに Muta マウスを交配し、Rad54(-/-)・lacZ(+)

マウスを作成した。このマウスを用いて 15.5 日齢胎仔と 2 ヶ月齢成体の肝臓での放射線による突然変異誘発を調べたところ、胎仔では、Rad54(+/+)マウス (図 1) と同じような線量-応答反応がみられたが、2 ヶ月齢では Rad54(+/+)マウス (図 1) より低い誘発率が見出された (図 4)。胎仔期で影響がみられないのは Rad54 がこの時期には発現していないか、あるいは別の分子で代行されていると考えればよいが、成体になった時誘発効率が低下するのは予想外であった。以前に非同末端結合に関与する Ku70 遺伝子を欠損したマウスで同様のことが見出されているが (Radiat. Res., 170: 216-223 (2008))、Rad54 欠損でも同じような結果になった。Rad54 の生体内での機能はまだ全てが明らかにされていない訳ではないので、今回の結果は Rad54 の新しい機能を示唆しているのかも知れない。今後さらなる解析が必要である。

なお、放射線が当たっていない時の自然突然変異頻度は胎仔齢でも生後 2 ヶ月齢でも野生型マウスとほぼ同じであり、Rad54 欠損による影響はみられなかった (図 1 と図 4)。

今回の研究によって放射線による突然変異誘発効率がエイジによって異なることは明らかになったが、その特性は放射線発癌効果のエイジ依存性とは明らかに異なり、有効な説明とはなり得ないことが分かった。何か別な要因があると思われる、今後の研究課題である。

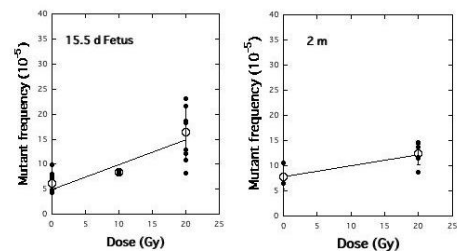


図 4 Rad54(-/-)・lacZ(+)マウスの 15.5 日齢胎仔及び生後 2 ヶ月齢での肝臓における突然変異誘発効果。胎児での結果は Rad54(+/+)マウス (図 1) 同様であるが 2 ヶ月齢では Rad54(+/+)マウス (図 1) より低い値になっている。●は個々のマウスを、○はそれらの平均値を、縦線は標準偏差を示す。

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0件)

[学会発表] (計1件)

1. 小野哲也、上原芳彦、池畑広伸、小村潤一郎、放射線誘発突然変異のエイジ依存性。日本放射線影響学会第54回大会、2011年11月18日、神戸市

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 芳彦 (UEHARA YOSHIHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30223499

(2) 研究分担者

小野 哲也 (ONO TETSUYA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00107509

(3) 連携研究者

()

研究者番号：