

## 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6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510060

研究課題名（和文） 放射線適応応答の分子機構に関する研究

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for radioadaptive responses

研究代表者

根井 充（NENOI MITSURU）

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・プログラムリーダー

研究者番号：10164659

研究成果の概要（和文）：予め低線量放射線に当たることにより、その後の中高線量放射線に対して抵抗性を獲得する生体応答を放射線適応応答と呼ぶ。本研究では、ヒト由来培養細胞における放射線誘発突然変異を指標とした放射線適応応答を解析し、効率のよいDNA2本鎖切断修復機構の活性化が放射線適応応答のメカニズムに関係していることを示す一方、細胞周期とアポトーシスは主要なメカニズムではないことを示した。また、マウス胎児の死亡と奇形発生を指標とした放射線適応応答については、*Tead3* 遺伝子、*Csf1* 遺伝子および *Cacna1a* 遺伝子の発現変動が機能的に関係することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The radioadaptive response is defined as a biological response by which cells or animals acquire resistance against subsequent high dose radiation. In this research, we showed that the radioadaptive response of human lymphoblastoid cells in terms of radiation-induced mutation was associated with activation of a DNA repair system with high fidelity, and that the response was not primarily related to regulation of the cell cycle or apoptosis. In addition, we showed that the radioadaptive response of fetal mice in terms of radiation-induced prenatal death and teratogenesis was functionally associated with *Tead3*, *Csf1* and *Cacnala* genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：応答、放射線適応応答

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに染色体異常を指標とした放射線適応応答が詳細に調べられており、予め低線量放射線照射（priming dose）の上限線量が約0.1 Gyであること、あるいは priming dose 照射後4～6時間後に高線量本照射（challenge dose）を行うことで最適に観察されることなどが報告されている。また PKC $\alpha$ 、p38MAPK および PLC を介する細胞内シ

グナル伝達のフィードバックループが、p53 を介して精度の高いDNA修復機構を活性化するというモデルも提案されている。一方、細胞死を指標とした放射線適応応答において、challenge dose による p53 の誘導を priming dose が抑制することによって NO ラジカルの生成を促進すること、そして生成された NO ラジカルが放射線抵抗性をもたらす機構が明らかにされている。

突然変異を指標とした放射線適応応答は、放射線発がんとの関連から非常に興味深い。*HPRT* 遺伝子座突然変異を指標とした放射線適応応答が正常ヒトリンパ芽球由来細胞株 AHH-1 において解析され、0.02 Gy の priming dose で誘導される放射線適応応答において、染色体の部分的な欠損が減少していること、細胞周期を制御する CDC16 遺伝子の発現が低下していること、MnSOD、glutathione-S-transferase、glutathione peroxidase および catalase 等の抗酸化酵素の活性が増強していることが明らかにされている。しかし、その詳細な発現条件や分子機構についてはまだ解明されていない。

## 2. 研究の目的

ヒトリンパ芽球由来細胞における *HPRT* 遺伝子座突然変異を指標とした放射線適応応答、およびマウス胎児の致死と奇形発生を指標とした放射線適応応答に機能する遺伝子を同定し、その分子機構の全体像を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒトリンパ芽球由来細胞 AHH1 を 0.02Gy 照射することによって発現変動する遺伝子、および妊娠マウスを 0.3Gy 照射することによってマウス胎児で発現変動する遺伝子を情報生物学的手法により解析し、放射線適応応答に機能すると予想される遺伝子を抽出する。次に RNA 干渉法を用いて、これら候補遺伝子の発現を安定かつ特異的に抑制する細胞を作製する。マウス胎児の放射線適応応答を調べる際には、マウス胎児の四肢細胞（指趾原基細胞）由来の培養細胞系を用いるが、我々はマウス個体で観察される奇形発生の原因となっている過剰な放射線誘発アポトーシスを指標とすることにより、本培養系で個体の放射線適応応答が再現できることを既に確認している。この細胞に siRNA 発現ベクターを導入することによって得られるノックダウン細胞において放射線適応応答が阻害されるかどうか調べる。阻害された場合は発現抑制した遺伝子が放射線適応応答に機能する遺伝子として同定する。同定した遺伝子の機能を情報生物学的に解析することにより、放射線適応応答の分子機序を解明する。

## 4. 研究成果

放射線適応応答のうち、特にヒトリンパ芽球由来細胞 AHH-1 における *HPRT* 遺伝子座突然変異を指標とした放射線適応応答、および胎児マウスの死亡および発生異常を指標とした放射線適応応答の分子機構を解明する目的で、我々は cDNA マイクロアレイの解析を行った。ヒトリンパ芽球由来細胞 AHH-1 における *HPRT* 遺伝子座突然変異を指標とした

放射線適応応答の条件下では、M 期のチェックポイント制御に機能すると考えられている death inducer-oblierator 1 (*DIDO1*) 遺伝子の発現が上昇することを示した。また、マウス胎児の死亡と奇形発生を指標とした放射線適応応答については、*Tead3* 遺伝子、*Csfl* 遺伝子および *Cacna1a* 遺伝子の発現が変動することを明らかにした。*Tead3* は分化に係る転写因子であり、適応応答条件下で発現が上昇、*Cacna1a* は Ca チャネルの制御、遺伝子発現、細胞運動、細胞分裂、細胞死等に機能する遺伝子で、適応応答条件下で発現が低下、*Csfl* は胎児期の器官形成に関わる増殖因子であり、高線量単回照射では発現が上昇するものの、放射線適応応答条件下では変動しない遺伝子である。これらの遺伝子の発現変動はリアルタイム PCR によって確認した。更に、我々は *Tead3* 遺伝子と *Cacna1a* 遺伝子について、胎児マウス指趾原基細胞初代培養系を用いて RNA 干渉法による遺伝子ノックダウンの実験を行った。そして、遺伝子をノックダウンした条件下で放射線適応応答が消失することを観察した。図 1 は、*Tead3* 遺伝子ノックダウン細胞を使った例を示している。この結果から、*Tead3* 遺伝子と *Cacna1a* 遺伝子が放射線適応応答に重要な機能を果たしていることを明らかにした。

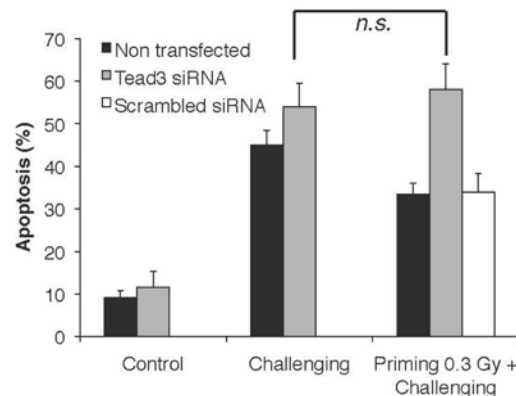


図 1. *Tead3* 遺伝子ノックダウン細胞における放射線適応応答の消失。siRNA を導入していないコントロール細胞（黒）では観察されている放射線適応応答が、ノックダウン細胞（グレー）では観察されない。

p53 遺伝子のステータスが異なる種々のヒト由来培養細胞を用い、放射線誘発突然変異を指標とした放射線適応応答を解析した。予め 0.02 Gy の X 線を照射してから 6 時間後に 2Gy の粒子線照射 (20 keV/ $\mu$ m 炭素イオン線、40 keV/ $\mu$ m 炭素イオン線および 150 keV/ $\mu$ m ネオンイオン線) を行った場合、2Gy の粒子線照射のみの場合に比べて *HPRT* 遺伝子座の突然変異頻度が有意に低下していることがわかった (図 2A)。このメカニズムを調べる

ため、粒子線照射後の細胞当たりの DNA2 本鎖切断量 ( $\gamma$ H2AX 発現量) の経時変化を調べた。その結果、予め 0.02 Gy の X 線照射した場合、DNA2 本鎖切断の消失速度が顕著に速くなることがわかった (図 2B)。このことから、正確性の高い DNA2 本鎖切断修復機構の活性化が放射線適応応答のメカニズムに関係していることが示唆された。一方、細胞周期とアポトーシスは、どちらも適応応答条件下で変化していないことから、主要なメカニズムではないことが示唆された。

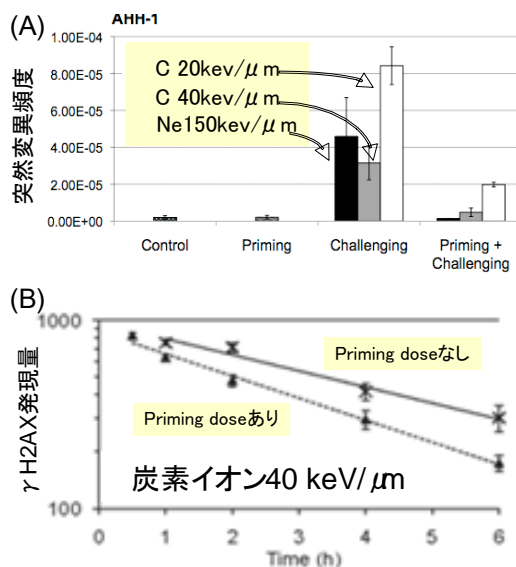


図 2. ヒトリンパ芽球細胞における突然変異を指標とした放射線適応応答。予め 0.02 Gy の X 線を照射 (priming dose) することにより、6 時間後の 2 Gy 粒子線照射による突然変異誘発頻度が低下している (A)。予め priming dose で照射することにより、粒子線照射後の DNA2 本鎖切断の消失 ( $\gamma$ H2AX 発現の低下) 速度が顕著に速くなっている (B)。

我々は、これまでにマウス胎児における放射線誘発奇形発生 (四肢形成異常) と致死を指標とした放射線適応応答が、マウスの系統に依存することを観察している。本研究の今後の展開として、これが母体内環境の違いを反映しているものかどうかを明らかにするため、マウス受精卵を異なる系統のマウスに移植し、仮腹で発生した胎児における放射線適応応答を検証する実験を開始した。そして、適応応答の見られない C3H 系マウスの受精卵を適応応答の見られる ICR 系受容体へ移植する実験系、およびその逆の移植を行う実験系を構築した。現在、移植受精卵から発生した胎児における放射線適応応答を調べている。一報、ヒトリンパ芽球由来細胞の突然変異を指標とした放射線適応応答については、本研究において効率のよい DNA 修復機構の関与を示唆したことから、今後はその内容を解明

するため、適応応答条件下でどのような DNA 修復機構が活性化されているかを調べていく必要がある。具体的には、相同組換え修復機能分子 (RAD50、NBS1、MRE11、RAD51 等) の量的変化および DNA 結合活性を解析すること等により、放射線適応応答における相同組換え修復機構の関与を明らかにすることが考えられる。

## 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 12 件)

- ① Vares G, Wang B(2番目), Nenoi M(7番目)、他4名. Gene silencing of Tead3 abrogates radiation-induced adaptive response in cultured mouse limb bud cells. *Journal of Radiation Research*. 52, 39-46 (2011)
- ② Vares G, Wang B(2番目), Nenoi M(6番目)、他3名. Mutagenic adaptive response to high-LET radiation in human lymphoblastoid cells exposed to X-rays. *Mutation Research*. 706, 46-52 (2011).
- ③ Vares G, Wang B(2番目), Nenoi M(7番目)、他4名. Trp53 activity is repressed in radio-adapted cultured murine limb bud cells. *Journal of Radiation Research*, 52, 727-734 (2011)
- ④ Vares G, Wang B(5番目), Nenoi M(13番目)、他10名. Transcription factor-recognition sequences potentially involved in modulation of gene expression after exposure to low dose-rate  $\gamma$ -rays in the mouse liver. *Journal of Radiation Research*. 52, 249-256 (2011)
- ⑤ Vares G, Wang B(2番目), Nenoi M(6番目)、他3名. Mutagenic adaptive response to high-LET radiation in human lymphoblastoid cells exposed to low doses of heavy-ion radiation. *Mutation Research*. 712, 49-54 (2011).
- ⑥ 王冰 (1番目)、根井充 (3番目): 低線量影響としての放射線適応応答—放射線防護へのインパクト—. *日本原子力学会誌*、査読なし、53(2)、96-101、2011
- ⑦ Wang, B(1番目), Nenoi, M(9番目)、他7名. X-rays-induced radioresistance against high LET irradiations from accelerated heavy ions in mice. *Radiation Research* 174:532-536 (2010).
- ⑧ Uehara, Y., Nenoi, M. (4番目)、他11名: Gene expression profiles in mouse liver after long-term low dose-rate irradiation with gamma-rays. *Radiat. Res.*, 174:611-617 (2010).

- ⑨ Vares, G., Wang, B. (2 番目), Neno, M. (7 番目)、他 5 名: Adaptive response in embryogenesis: VI. Comparative microarray analysis of gene expressions in mouse fetuses. International Journal of Radiation Biology. 85, 70-86 (2009).
- ⑩ Neno M(1 番目), Wang B(4 番目)、他 4 名: Involvement of Oct-1 in the regulation of CDKN1A in response to clinically relevant doses of ionizing radiation. BBA - Gene Regulatory Mechanisms 1789, 225-231 (2009)
- ⑪ Taki, K., Wang, B. (2 番目), Neno, M. (15 番目)、他 12 名: Microarray analysis of differentially expressed genes in the kidneys and testes of mice after long-term irradiation with low-dose-rate  $\gamma$ -rays. J. Radiat. Res. 50, 241-252 (2009).
- ⑫ 根井充 (1 番目)、王冰 (3 番目): 放射線適応応答に関与する多様な因子。放射線生物研究、査読なし、44(3), 294-311, 2009

[学会発表] (計 9 件)

- ① Guillaume Vares、他: High-LET Heavy-Ion Radiation and Adaptive Response. 日本放射線影響学会第 54 回大会。神戸、2011. 11.
- ② 田中薫、他: 胎児・成体マウスにおける放射線誘発適応応答は重粒子線にも当て嵌まるか? 日本放射線影響学会第 54 回大会。神戸、2011. 11.
- ③ Bing Wang、他: X-Ray-Induced Radioresistance against High-LET Radiations from Accelerated Neon-Ion Beams in Mice. ICRR, Warsaw, 2011, 8.
- ④ Guillaume Vares、他: Analysis of molecular mechanisms for radioadaptive responses. ICRR, Warsaw, 2011, 8.
- ⑤ 田中薫、他: 胎児・成体マウスにおける放射線誘発適応応答は重粒子線にも当て嵌まるか? III. 低線量粒子線前照射による高線量粒子線本照射の有害影響の修飾。日本放射線影響学会第 53 回大会。京都、2010. 10.
- ⑥ Bing Wang、他: Induction of adaptive response by high LET heavy ion irradiation in mice. Bremen, Germany, 18-25 July 2010
- ⑦ 田中薫、他: 胎児・成体マウスにおける放射線誘発適応応答は重粒子線にも当て嵌まるか? II. 低線量粒子線前照射による高線量 X 線本照射の有害影響の修飾。日本放射線影響学会第 52 回大会。広島、2009. 11.
- ⑧ 根井充、他: 放射線適応応答に相関する遺伝子発現変動。日本放射線影響学会第 52

回大会。広島、2009. 11.

- ⑨ 王冰、他: 発生段階での放射線適応応答におけるマウス系統差に関する予備的研究。日本放射線影響学会第 52 回大会。広島、2009. 11.

[図書] (計 3 件)

- ① Mitsuru Neno(1 番目), 他 1 名: Modulation of Gene Expression After Exposure to Ionizing Radiation. In "Current Topics in Ionizing Radiation Research" (ed. Mitsuru Neno) 査読あり、pp. 129-148, InTech (Rijeka, Croatia) 2012.
- ② Wang Bing(1 番目), Mitsuru Neno(7 番目): X-ray-induced radioresistance against high-LET radiations from accelerated neon-ion beams in mice. In "Current Topics in Ionizing Radiation Research" (ed. Mitsuru Neno) 査読あり、pp. 199-214, InTech (Rijeka, Croatia) 2012.
- ③ Mitsuru Neno (edit): Current Topics in Ionizing Radiation Research, InTech, total 839 pages, (Rijeka, Croatia) 2012.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

根井 充 (NENOI MITSURU)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・プログラムリーダー  
研究者番号: 10164659

### (2) 研究分担者

王 冰 (WANG BING)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー  
研究者番号: 10300914