

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310043

研究課題名(和文)放射線感受性の個人差を規定する遺伝子の探索と同定

研究課題名(英文)Identification of genetic determinant for individual radiosensitivity

研究代表者

松浦 伸也(MATSUURA, SHINYA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：90274133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：放射線防護基準は公衆に一律に定められているが、放射線感受性には個人差があることが知られており、将来的には個々人の感受性に応じて放射線防護基準を設定することも可能になると思われる。

微小核法を用いて健常者集団の末梢血リンパ球を検討したところ、一部のヒトは微小核頻度が再現性をもって高値を示し、放射線感受性に個人差があることが明らかとなった。さらに、DNA修復欠損症家系の血液サンプルなどを用いて放射線感受性の分布を調べたところ、遺伝子変異の保因者に中等度の放射線感受性を見出した。すなわち、DNA修復遺伝子の変異または一塩基多型が放射線感受性の個人差を規定する遺伝的素因の有力な候補と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The current system of radiological protection is uniformly established to the public, and it is important for the radiation risk communication to evaluate the individual radiosensitivity. We studied radiation-induced micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes from normal individuals, and found that individual differences of radiosensitivity exist in human populations. We also found that cells from the heterozygous carriers for radiation hypersensitive disorders exhibited an increase of micronucleus formation, suggesting that the DNA repair gene variants are indeed involved in individual radiosensitivity.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線感受性 個人差

1. 研究開始当初の背景

平成23年3月11日の未曾有の東日本大震災により福島第1原発事故が発生した。これにより国民の放射線障害や環境放射線汚染に対する不安が増大している。現在、放射線防護基準は公衆に一律に定められているが、放射線感受性には個人差があることが知られており、将来的には個人々の感受性に応じて放射線防護基準を設定することも可能になると思われる。

電離放射線は生命活動の基本物質である二重鎖DNAを切断する。DNA二重鎖切断が細胞の一つでも残っていると、大量のゲノム情報が消失して細胞死やがん化などの重大な事態に陥る。これに対して生物は、DNA二重鎖切断修復機構を進化させて放射線からゲノムDNAを防護してきた。近年、細胞のDNA二重鎖切断(DSB)修復能を測定する方法として、微小核法(cytokinesis-block micronucleus assay)が注目されている。この検査法は、放射線によって生じたDSBが修復されないまま分裂期に入ると、分裂終期に微小核を形成することを利用したものである。この方法を用いて多人数の末梢血リンパ球を検討したところ、一部のヒトは微小核頻度が再現性をもって高値を示し、放射線感受性に個人差があることが明らかになった。さらに興味深いことに、一般健常者集団とがん患者集団との比較では、がん患者集団に微小核頻度の高いヒトが多く含まれていた

(Scott *Br J Cancer* 1999; Ban *J Radiat Res* 2004)。これらの結果から、ヒト集団にはDNA修復能がわずかに低下して放射線感受性を示す一群が存在し、そのようなヒトは放射線被ばくによりがんを発症するリスクが高いことが考えられた。また、DNA修復能低下の原因として一塩基多型(SNP)が考えられた。しかしながら、こうしたDNA修復遺伝子の一塩基多型(SNP)が実際に放射線感受性を規定しているか否かについては、十分には実証

されていない。

2. 研究の目的

本研究では、日本人健常者の細胞サンプルを入手して微小核法を実施する。これにより日本人の放射線感受性の個人差を規定するSNPを同定することを目的としている。

3. 研究の方法

候補遺伝子変異(または一塩基多型SNP)を持つ健常者の末梢血リンパ球または線維芽細胞、B細胞株を用いて微小核法を実施する。これにより、放射線感受性の個人差を規定する主要な遺伝的素因を特定する。

末梢血リンパ球の微小核法のプロトコールを以下に示す。すなわち、末梢血2mlを採血して、フィコールを用いてリンパ球を分離する。リンパ球に種々の放射線を照射後、PHAを添加して10%FBS添加RPMI1640培地で44時間培養する。PHA添加44時間後にサイトカラシンBを添加してさらに28時間培養する。細胞を回収して低張液に再懸濁し、カルノアを用いて細胞をスライドグラスに固定する。Hoechst33342で核を、FITCで細胞全体を染色する。2核細胞中の微小核数を計測する。これにより個々の細胞株の放射線感受性を定量化する。

4. 研究成果

微小核法を用いて健常者集団の細胞サンプルを検討したところ、一部のヒトは微小核頻度が再現性をもって高値を示し、放射線感受性に個人差があることが明らかとなった。

DNA修復欠損症家系の血液サンプルなどを用いて放射線感受性の分布を調べたところ、遺伝子変異の保因者に中等度の放射線感受性を見出した。すなわち、DNA修復遺伝子の変異または一塩基多型(SNP)が放射線感受性の個人差を規定する遺伝的素因の有力な候補と考えられた。

本研究ではさらに、DNA修復欠損症だけではなく、CINを特徴とする染色体不安定症候群の患者やその両親も放射線感受性であることが判明した。すなわち、染色体不安定症候群の原因遺伝子が放射線感受性の遺伝的素因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

- ① Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, Matsuura S. The microtubule depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. *Cell Reports* (2015) 10, 664-673. (査読有り) doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.003
- ② Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrndt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens SF, Osada Y, Asaka S, Momoi A, Linton S, Miesfeld JB, Link BA, Senga T, Castillo-Morales A, Urrutia AO, Shimizu N, Nagase H, Matsuura S, Bagby S, Kondoh H, Nishina H, Heisenberg CP, Furutani-Seiki M. YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* (2015) 521, 217-221. (査読有り) doi: 10.1038/nature14215
- ③ 落合 博、松浦伸也. 新規一塩基置換導入法による高発癌性遺伝病の原因変異の同定. *医学のあゆみ* (2015) 252, 153-158. (査読無し)
- ④ 宮本達雄、松浦伸也. PCS (MVA) 症候群. *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ* (2014) 29, 411-414. (査読無し)
- ⑤ 松浦伸也. Nijmegen (ナイミーヘン) 染色体不安定症候群. *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ* (2014) 29, 617-620. (査読無し)
- ⑥ 宮本達雄、松浦伸也. DNA修復障害概論. *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ* (2014) 28, 642-645. (査読無し)
- ⑦ Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T, Matsuura S. TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111, 1461-1466. (査読有り) doi: 10.1073/pnas.1317008111.
- ⑧ Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Miyazaki Y, Maruyama H, Murakami N, Fukada K, Izumi Y, Matsuura S, Kaji R, Kawakami H Exome sequencing reveals a novel MRE11 mutation in a patient with progressive myoclonic ataxia. *J Neurol Sci* (2014) 337, 219-223. (査読有り) doi: 10.1016/j.jns.2013.11.032.
- ⑨ Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S, Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep* (2013) 3: 3379. (査読有り) doi: 10.1038/srep03379.
- ⑩ 落合 博、佐久間哲史、松浦伸也、山本卓 TALE nuclease (TALEN) を用いた培養細胞におけるゲノム編集 *実験医学* (2013) 31, 95-100. (査読無し)
- ⑪ Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki K, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S, Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells* (2013) 18, 315-26. (査読有り) doi: 10.1111/gtc.12037.
- ⑫ Kobayashi J, Fujimoto H, Sato J, Hayashi I, Burma S, Matsuura S, Chen DJ, Komatsu K. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. *PLoS ONE* (2012) 7, e49245. (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0049245.
- ⑬ Ochiai H, Sakamoto N, Fujita K, Nishikawa M, Suzuki K, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Shibata T, Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative

imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109, 10915-10920. (査読有り)
doi: 10.1073/pnas.1202768109.

[学会発表] (計 37 件)

- ① Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro S, Miyamoto T, Matsuura M: Individual difference of radiosensitivity evaluated by semi-automatic cytokinesis-block micronucleus assay. The 4th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館 (広島) 2015 年 2 月 14-15 日
- ② Akutsu SN, Royba E, Miyamoto T, Matsuura M: Chromosomal analysis in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia cell lines through the cytokinesis block micronucleus assay (CBMA) and cytogenetic study. The 4th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館 (広島) 2015 年 2 月 14-15 日
- ③ Yanagihara H, Kato A, Matsuura S, Kobayashi J, Komatsu K: NBS1 initiates UV damage tolerance. The 30th RBC-NIRS International symposium. コーポイン京都 (京都) 2015 年 2 月 20-21
- ④ Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Matsuura S: Constitutive activation of cell proliferation coupled-ciliary disassembly in a spindle assembly checkpoint-deficiency syndrome. The 5th International symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2015 年 3 月 2-3 日
- ⑤ Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro S, Miyamoto T, Matsuura M: Individual difference of radiosensitivity evaluated by semi-automatic cytokinesis-block micronucleus assay. The 5th International symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2015 年 3 月 2-3 日
- ⑥ 宮本達雄、落合 博、Ekaterina Royba、Silvia Natsuko Akutsu、松浦伸也: 放射線感受性 SNP の定量的評価系構築のためのヒト培養細胞における一塩基編集法の開発 第 55 回原子爆弾後障害研究会 長崎原爆資料館 (長崎) 2014 年 6 月 1 日
- ⑦ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、松浦伸也: ヒト分裂期チェックポイント欠損症における PLK1-KIF2A 経路の亢進による絨毛病発症機構 第 57 回日本放射線影響学会 かがしま県民交流センター (鹿児島) 2014 年 10 月 1-3 日
- ⑧ 柳原啓見、加藤晃弘、斎藤裕一朗、小林純也、松浦伸也、小松賢志: 紫外線損傷応答における放射線修復因子 NBS1 の機能とマウスモデルの作製 第 57 回日本放射線影響学会 かがしま県民交流センター (鹿児島) 2014 年 10 月 1-3 日
- ⑨ 角田治美、沖本由理、種山雄一、古館和季、岩井潤、東本恭幸、四本克己、菱木知郎、小松秀吾、堀江弘、宮本達雄、松浦伸也: 横紋筋肉腫治療終了後、長期寛解を維持している染色分体早期解離 (PCS) 症候群の姉弟例 第 56 回日本小児血液・がん学会 岡山コンベンションセンター (岡山) 2014 年 11 月 28-30 日
- ⑩ 松浦伸也、宮本達雄、落合 博、浅見恵子、小川 淳、渡辺輝浩、梶井 正、山本 卓: 次世代シーケンサーとゲノム編集法を用いた非コード領域の原因変異の解析 第 59 回日本人類遺伝学会 タワーホール船堀 (東京) 2014 年 11 月 19-22 日
- ⑪ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、Ekaterina Royba、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也: ヒト紡錘体チェックポイント欠損症における細胞増殖に共役した一次絨毛退縮制御の破綻による絨毛病発症機構 第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (横浜) 2014 年 11 月 25-27 日
- ⑫ Miyamoto T, Ochiai H, Royba R, Matsuura S: Functional evaluation system of single nucleotide polymorphisms linked to radiosensitivity using genomic editing technology. The 4th International symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2014 年 2 月 13-14
- ⑬ Royba E, Akutsu SN, Miyamoto T, Matsuura M: Individual difference of

- radiosensitivity detected by cytokinesis-block micronucleus assay. The 3rd International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館 (広島) 2014年2月15-16日
- ⑭ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、松浦伸也 : 細胞増殖に連動した分裂期キネシン分子 KIF2A による繊毛退縮機構 第54回原子爆弾後障害研究会 広島国際会議場 (広島) 2013年6月2日
- ⑮ 宮本達雄、落合 博、久米悟士、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也 : ヒト培養細胞における一塩基編集技術:放射線感受性 SNP の定量的評価系確立への試み 第38回中国地区放射線影響研究会 広島大学広仁会館 (広島) 2013年7月26日
- ⑯ 宮本達雄、落合 博、金井昭教、久米悟士、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也 : 人工ヌクレアーゼを用いたヒト培養細胞での一塩基編集:放射線感受性 SNP の評価系構築への試み 第56回日本放射線影響学会 ホテルクラウンパレス青森 (青森) 2013年10月18-20日
- ⑰ 小林純也、藤本浩子、奥井理予、加藤竹雄、Lavin Martin、松浦伸也、小松賢志 : 酸化ストレスによる ATM キナーゼの活性制御 第56回日本放射線影響学会 ホテルクラウンパレス青森 (青森) 2013年10月18-20日
- ⑱ 松浦伸也、落合 博、宮本達雄、金井昭教、細羽康介、佐久間哲史、浅見恵子、小川 淳、渡辺輝浩、梶井 正、山本 卓 : 人工ヌクレアーゼによる一塩基編集法を利用した PCS (MVA) 症候群の遺伝子間領域変異の同定 第58回日本人類遺伝学会 江陽グラントホテル (仙台) 2013年11月20-23日
- ⑲ Miyamoto T、Ochiai H、Kanai A、Hosoba K、Kume S、Sakuma T、Kajii T、Yamamoto T、Matsuura S : Identification of an extragenic mutation of BUB1B gene for PCS (MVA) syndrome and functional analysis using TAL effector nucleases. The 63rd annual meeting of American Society of Human Genetics ボストン、USA 2013年10月22-24日
- ⑳ 松浦伸也、落合博、宮本達雄、金井昭教、細羽康介、佐久間哲史、野路澄晴、山本卓 : PCS (MVA) 症候群の遺伝子外変異の同定と人工ヌクレアーゼを用いた機能解析 第72回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 (横浜) 2013年10月3-5日
- ㉑ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也 : 細胞増殖シグナル依存的な一次繊毛抑制過程における PLK1-KIF2A 経路の役割 第72回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 (横浜) 2013年10月3-5日
- ㉒ 宮本達雄、細羽康介、落合 博、佐久間哲史、山本 卓、松浦伸也 : 分裂期キネシン KIF2A を介した細胞増殖に共役した繊毛退縮機構 第36回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド (神戸) 2013年12月3-6日
- ㉓ 宮本 達雄、細羽 康介、落合 博、松浦 伸也 : ヒト分裂期チェックポイント欠損症における繊毛形成異常 2013年生体運動研究合同班会議 広島大学 (東広島) 2013年1月12-14日
- ㉔ Hosoba K、Miyamoto T、Ochiai H、Matsuura S : KIF2A phosphorylation by PLK1 regulates primary cilia disassembly. The 2nd international symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster. 広島大学広仁会館 (広島) 2013年2月10-11日
- ㉕ Ohara M、Sakamoto Y、Fukasaku J、Komatsu K、Matsuura S、Tauchi H : Kinetics of radiation -induced DNA double strand break rejoining in DNA repair deficient cells. The 3rd international symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2013年2月12-13日
- ㉖ Ochiai H、Miyamoto T、Kanai A、Hosoba K、Sakuma T、Yamamoto T、Matsuura S : Artificial nuclease-based targeted DSB introduction and its application. The 3rd international symposium of RIRBM, Hiroshima University. 広島大学広仁会館 (広島) 2013年2月12-13日
- ㉗ 宮本 達雄、細羽 康介、落合 博、松浦 伸也 : ゲノム安定性を司る紡錘体チェックポイント因子 BUBR1 の間期中心体における機能 第53回原子爆弾後障害研究会 長崎原爆資料館 (長崎) 2012年6月3日

- ⑳ 細羽 康介、宮本 達雄、落合 博、松浦 伸也：分裂期キナーゼ PLK1 による繊毛形成機構 第37回 中国地区放射線影響研究会放射線影響研究所講堂（広島）2012年7月27日
- ㉑ 落合 博、宮本 達雄、細羽 康介、佐久間 哲史、野地 澄晴、山本 卓、松浦 伸也：人工ヌクレアーゼを利用した一塩基置換の導入 岡崎コンファレンスセンター（岡崎）第2回ゲノム編集研究会 2012年9月20日
- ㉒ 小林 純也、藤本 浩子、松浦 伸也、小松 賢志：低線量率放射線細胞応答におけるヒストン修飾の役割 第55回日本放射線影響学会 東北大学（仙台）2012年9月6-8日
- ㉓ 落合 博、宮本 達雄、細羽 康介、佐久間 哲史、野地 澄晴、山本 卓、松浦 伸也：人工ヌクレアーゼ TALEN を利用した DSB 導入とその応用 第55回日本放射線影響学会 東北大学（仙台）2012年9月6-8日
- ㉔ 宮本 達雄、細羽 康介、落合 博、松浦 伸也：分裂期キネシンを標的とした単極性紡錘体形成の誘導法の探索 第55回日本放射線影響学会 東北大学（仙台）2012年9月6-8日
- ㉕ Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Noji S, Yamamoto T, Matsuura S: Establishment of human disease model cell lines by introduction of intergenic single nucleotide mutation using artificial nucleases. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 2012年12月11-14
- ㉖ Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Matsuura S: Ciliary disassembly by the mitotic kinase PLK1 in a spindle assembly checkpoint-deficiency syndrome. 第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場（福岡）2012年12月11-14日
- ㉗ Kobayashi J, Fujimoto H, Okui M, Kato T, Matsuura S, Komatsu K: Role of MRE11/RAD50/NBS1 complex in regulation of ATM activation 第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場（福岡）2012年12月11-14
- ㉘ 松浦 伸也：教育講演「放射線の健康影響」放射線の医学生物学的影響 第20回 IPPNW 世界大会 広島国際会議場（広島）2012年8月24-26日
- ㉙ 宮本 達雄：ゲノム安定性を司る遺伝子 BUBR1 がつくる繊毛構造 第49回広島大学・生命科学フォーラム 広島大学（東広島）2012年5月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 伸也 (MATSUURA SHINYA)
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
 研究者番号：90274133

(2) 研究分担者

宮本 達雄 (MIYAMOTO TATSUO)
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師
 研究者番号：40452627