

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700955

研究課題名(和文) 低線量放射線による発がんリスクの高感度DNA損傷マーカーを用いた解析

研究課題名(英文) Assessment of biological effect of low-dose radiation by phosphorylated H2AX in vivo

研究代表者

中村 麻子 (Nakamura, Asako)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：70609601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円、(間接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は低線量放射線被ばくによるDNA損傷レベルと発がんリスクの相関性を明確にすることを最終目的とし、「被ばく家畜のDNA損傷レベルのモニタリング」を中心に研究を行った。福島第一原発事故による被ばく家畜のDNA二本鎖切断レベルを、近年その高感度性からも注目されているリン酸化型ヒストンH2AX(γ-H2AX)を用いてモニタリングした結果、被ばく家畜にDNA損傷の増加が認められることをγ-H2AXレベルの増加によって明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Radiation induced-DNA double strand break (DSB) is one major initial cause of genomic instability leading to cancer. The creation of a DNA DSB in eukaryotic cells is generally accompanied by the formation of hundreds of phosphorylated H2AX (gamma-H2AX) molecules in the chromatin flanking the DSB site. Antibodies to gamma-H2AX allow the visualization of a "focus" at the DSB site. Since it has been demonstrated that the numbers of gamma-H2AX foci correlate directly to the numbers of DNA DSB, the detection of gamma-H2AX is an attractive candidate for monitoring DNA DSB levels. Here, to assess biological effect by radiation exposure after the accident, we performed quantitation of gamma-H2AX foci as a marker of DNA DSB in bovine lymphocytes from Fukushima evacuated area. Although majority of lymphocytes are negative of gamma-H2AX foci, immunostaining data clearly showed an increase of population of gamma-H2AX foci positive cells from Fukushima evacuated area.

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：低線量放射線 DNA損傷 発がん

1. 研究開始当初の背景

- (1) 2011年に発生した福島第一原発事故以降、放射線（特に低線量放射線）による生体影響が懸念されているが、その発がんリスクは確率論的現象として考えられているのが現状であり、実際の生物学的影響を評価するためには、どれだけの放射線を被ばくしたのかを知るバイオドーズメーター（定量的バイオマーカー）が必要不可欠である。

低線量放射線誘発 DNA 損傷をモニタリングするシステムとして、リン酸化型 H2AX (γ -H2AX) の検出が有効ではないかと考えられる。

H2AX はヒストン H2A のバリエーションであり、DNA 損傷発生後、数秒以内に損傷部付近の H2AX がリン酸化されることで、損傷部位をリン酸化特異的抗体による免疫染色法により可視化することが可能である。

申請者の過去の研究により、生体内の DNA 損傷レベルについて血液サンプルをはじめとした生体サンプルをもちいた γ -H2AX アッセイによって検出することが可能であることが示されている。

- (2) 放射線照射によって生じた DNA 損傷が最終的にどのような生物学的影響をもたらすのかについては、低線量から高線量までの放射線が線量依存的にどのような傷を発生させ、どのように修復されるのかといった分子学レベルの解析が必要である。

γ -H2AX のフォーカスによって検出される放射線誘発 DNA 損傷は、放射線照射後 30 分で最大となり、その後 4 時間までに 70% が修復されることが知られているが、低線量放射線での解析は行われていない。

放射線誘発 DNA 損傷部位には、DNA 損傷修復タンパク質が、空間的、時間的に綿密に制御されて局在することが分かっているが、低線量放射線によって誘発された DNA 損傷における修復タンパク質の挙動は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、放射線によって生じた DNA 損傷と発がんリスクの相関性をより明確にし、現在懸念されている低線量放射線被ばくの生物学的影響についての知識を深め、低線量被ばくに対する適切な防護法、発がん予防など、臨床応用につながるための研究基盤を確立することを目的とする。

- (1) 低線量放射線被ばくした動物生体内における DNA 損傷レベルのモニタリング

を行う。実際に福島第一原発事故により放射線被ばくした家畜の生体サンプルを用いて、その DNA 損傷レベルを γ -H2AX によって検討し、被ばく量の評価および生物学的影響を調査する。

- (2) 放射線被ばく影響を軽減するため、発がん予防効果が示唆される薬剤の放射線防護作用の検討を行う。
- (3) 低線量放射線によって発生する DNA 損傷部位を特定し、中線量、高線量放射線による DNA 損傷との比較検討を行う。放射線による DNA 損傷はランダムに発生すると考えられているが、線量の違いが損傷発生部位に影響を与えるのかについて、DNA 損傷部位の詳細な同定を行う。
- (4) 低線量放射線によって発生する DNA 損傷の修復過程を γ -H2AX のフォーカス形成によりモニタリングする。

3. 研究の方法

本研究は放射線照射によって誘発された DNA 損傷を高感度分子マーカー γ -H2AX を用いて検出することで、放射線被ばく（特に低線量被ばく）によって生じる DNA 損傷の特徴を明らかにし、その発がんリスクを確率論的現象ではなく物理学的現象をもとにした生物学的現象として理解するものである。

- (1) 被ばく家畜の DNA 損傷レベルのモニタリング

福島第一原発事故によって放射線被ばくしたと考えられる被ばく家畜について、その血液サンプルを採取、生体内の DNA 損傷レベルを γ -H2AX の免疫染色法、あるいはウェスタンブロット法といった手法でモニタリングする。

血液サンプルから分離したリンパ球における DNA 損傷レベルをモニタリングし、家畜の生息地などの情報と照らし合わせることで、事故によって実際にどれぐらいの DNA 損傷が誘発されているのか明らかにする。

- (2) 発がん予防効果が示唆される薬剤の低線量放射線誘発 DNA 損傷への影響の検討

アスピリンを代表とする発がん予防効果が示唆される薬剤の遺伝子毒性や、高線量放射線における効果はいくつか報

告されているが、その低線量放射線照射における生物学的影響は不明である。こうした薬剤が低線量放射線誘発の発がんリスクに影響を与えるのかどうかを検討する。これによって、低線量放射線発がんの有効な防護法、あるいは予防法確立のための予備的情報が得られると考えられる。

細胞レベルで薬剤存在下における低線量放射線誘発 DNA 損傷レベルを γ -H2AX の免疫染色法で確認する。損傷レベルに変化が見られるか、また見られなかった場合、その後の損傷修復過程に影響を与えるかを γ -H2AX のフォーカス形成をモニタリングすることで明らかとする。マウスに薬剤含有餌を摂取させ、個体レベルでの放射線誘発 DNA 損傷レベルへの影響を検討する。放射線照射後のコントロール群と薬剤摂取群から臓器を摘出し、放射線誘発 DNA 損傷レベルを γ -H2AX の免疫染色法で確認する。

(3) 放射線照射後の DNA 損傷修復過程のモニタリング

予備的な研究から、細胞レベルでは 0.2Gy 以上の放射線照射で γ -H2AX のフォーカス形成として検出される DNA 損傷のレベルは、30 分で最大値となり、その後 4 時間までに約 70% が修復、残り 30% がその後、緩やかに修復されることが分かっている。しかし、同じような DNA 損傷修復過程が低線量による放射線照射でも起こるのかは不明である。そこで、10mGy 以下の低線量放射線をヒトリンパ球や細胞株に照射後、 γ -H2AX のフォーカス形成を免疫染色法によって経時的にモニタリングする。これにより、低線量から高線量にいたるまでの放射線照射により、どれほどの損傷が発生し、どのタイミングで修復されるかという、物理化学的变化を明確にすることが可能である。

(4) 放射線照射によって誘導された DNA 損傷部位の同定

低線量放射線によって生じる DNA 損傷は高線量照射によって生じる DNA 損傷と同じなのか？それを明確にするために、スライド上に展開した分裂期染色体上で γ -H2AX と特異的プローブによる FISH を同時に行い、放射線照射によ

って誘導された DNA 損傷部位が、染色体上のどこに存在するのか特定する。それによって、低線量放射線によって生じる傷が、中線量、高線量によって生じる傷と同じメカニズムで修復されるか予測することが可能であると考えられる。

(5) DNA 損傷修復部位における損傷修復たんぱく質の局在解析

生物は DNA 損傷を修復するための機構を複数有しており、発生した傷の種類や、タイミングによって修復機構を使い分けていると考えられる。それぞれの修復機構は、誤りを全く生じない安全な修復機構や、誤りがちで突然変異の可能性を有する修復機構など、異なった特徴をもつと同時に、異なった修復たんぱく質によって制御されている。低線量放射線照射による修復経路は現在のところ不明であるが、発がんリスクの「しきい値」の存在の有無を明確にするためには解明されなければいけない問題である。そこで、低線量放射線照射後のヒトリンパ球や細胞株における DNA 損傷修復経路について、損傷部位に局在する修復たんぱく質を γ -H2AX との免疫染色法によって検討する。具体的には、相同組み換えに関与するたんぱく質 (NBS1, RAD51 などに代表される) や、非同相組み換えに関与するたんぱく質 (Ku, DNA-PK などに代表される) との共局在を調べる。

4. 研究成果

(1) 低線量放射線被ばくの生物学影響を検討するにあたり、低線量放射線によって誘導される DNA 損傷の詳細なモニタリングが必要になる。そこで、低線量放射線照射後の DNA 損傷発生を γ -H2AX によってモニタリング可能であるかを放射線照射したヒト血液細胞を用いて検討した。具体的には、ヒト血液サンプルに対し、0mGy, 5mGy, 10mGy, 20mGy を照射、30 分間のインキュベーションの後、白血球を Ficoll 液により分離した。分離した白血球細胞は、パラホルムアルデヒドにより固定し、 γ -H2AX による免疫染色を行った。その結果、低線量領域であっても、DNA 損傷の発生は線量依存的に起こり、 γ -H2AX フォーカス数が線量に比例して増加していることが分かった (図 1)。

(2) 被災家畜の血液サンプルで γ -H2AX の検

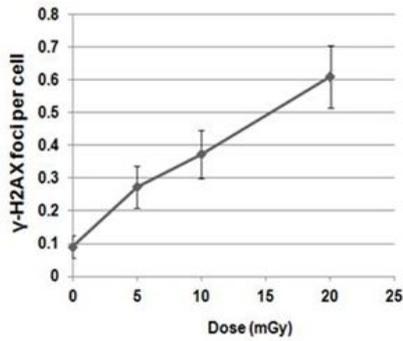


図1 低線量放射線照射後の γ -H2AXレベル

出を行うにあたり、牛の生体サンプルであっても問題なく γ -H2AXの検出が可能であるかを検討した。牛血液サンプルに放射線照射後、リンパ球を分離、 γ -H2AXによる免疫染色を行った。その結果、放射線量に依存して γ -H2AXフォーカスレベルが上昇していることが確認された(図2)。この結果は、牛の血液サンプルを用いても γ -H2AXの検出が可能であることを示していると同時に、他の動物種同様に γ -H2AXをモニタリングすることで放射線量の推測が可能であることを示唆している。

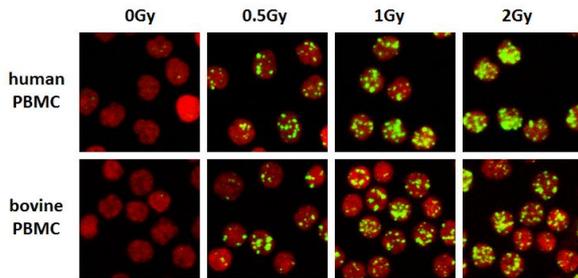


図2 ヒトリンパ球と牛リンパ球における放射線依存的DNA損傷レベルの増加

- (3) 避難地域から被ばく家畜の血液を採取し、リンパ球における γ -H2AXレベルを検討した結果、家畜が捕獲された4か所の地域すべてにおいてコントロール家畜(東京と北海道に生息する牛、合計6頭)と比較して有意に高いことが明らかとなった(図3)。コントロールおよび被ばく家畜、いずれにおいても大多数(90%近く)のリンパ球は γ -H2AXフォーカスを有していないが、被ばく家畜では明らかに、フォーカスを有する細胞数の増加、さらには細胞当たり10個以上という多数の γ -H2AXフォーカスを有する細胞数の増加が認められた。そのため、4か所すべ

ての被ばく家畜のDNA損傷レベルの平均はコントロールと比較して有意に高く、避難地域におけるDNA損傷誘発が示唆された。

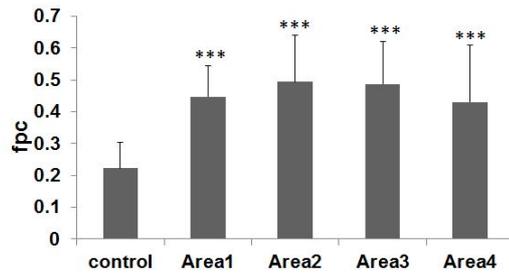
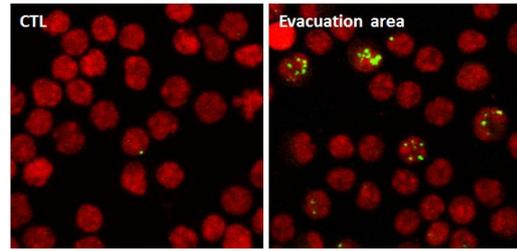


図3 被ばく牛リンパ球におけるDNA損傷レベル

- (4) 低線量放射線に対する新規放射線防護剤の発見を目的として、すでにマウスモデルにおいて高線量放射線に対する防護効果が報告されている4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (Tempol)の低線量放射線照射に対する防護効果について、 γ -H2AXを用いたDNA損傷レベルのモニタリングによって検討した。具体的には、HeLa細胞あるいはヒト末梢血由来のリンパ球に放射線照射後、免疫染色法による γ -H2AXフォーカスの測定およびウェスタンブロット法による γ -H2AXレベルの測定を行った。その結果、Tempolを添加した細胞では1Gy放射線照射後の γ -H2AXレベルがコントロールと比較して低下しており、DNA損傷誘発を抑制していることが示された(図4)。

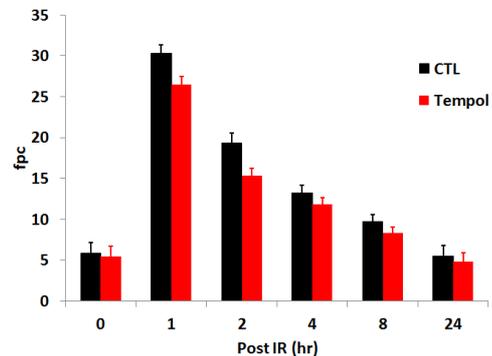


図4 薬剤存在下における放射線照射後のDNA損傷レベル

- (5) Tempol の低線量放射線照射に対するマウスレベルでの防護効果について、 γ -H2AXを用いたDNA損傷レベルのモニタリングによって検討した。Tempolを長期投与したマウスに、1Gy急性放射線照射あるいは1Gy/dayの慢性放射線照射を行い、経時的に臓器を摘出した。胸腺および十二指腸組織において、DNA損傷レベルを γ -H2AXによってモニタリングした。胸腺由来細胞についてはFACS解析を、小十二指腸組織については凍結薄利切片を作成したのちに蛍光免疫染色法による解析を行った。その結果、急性照射、慢性照射いずれにおいても、Tempol投与群において放射線照射後のDNA DSBレベルが減少していることが明らかとなった(図5)。

現代社会において、放射線(特に低線量放射

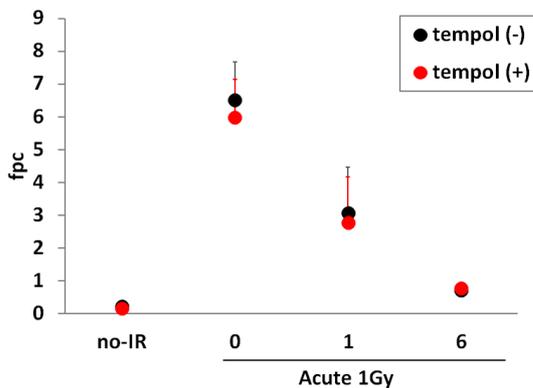


図5 放射線照射後マウス小腸臓器におけるDNA損傷レベル

線)に被ばくした際の発がん影響については研究者や医療従事者だけではなく社会全体が検討しなければいけない問題である。本研究により被ばく家畜のリンパ球におけるDNA損傷レベルが、コントロールよりも優位に高いことが示唆された。この結果は、低線量放射線被ばくが、どの程度のDNA損傷を誘発しているのか、さらにはどのような生体影響をもたらすのかを知るための重要な知見であると考えられる。また、放射線被ばくによる実際の生物学的影響を評価するために重要なバイオドーズメーターとして γ -H2AXアッセイが有効であることを示している。さらに、放射線被ばくの影響を軽減する可能性を検討するために、抗がん作用等が報告されているTempolについて検討を行った結果、細胞レベルおよびマウスレベルで、放射線照射後のDNA損傷レベルを軽減することが明

らかとなった。

以上、本研究で得られた結果は、低線量放射線被ばくの生体影響を γ -H2AXアッセイによるDNA損傷のモニタリングで評価することが可能であることを示すものであり、今後、放射線被ばくによる発がんリスクを評価するうえで重要な知見をもたらすものだと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

Dickey JS, Gonzalez Y, Aryal B, Mog S, Nakamura AJ, Redon CE, Baxa U, Rosen E, Cheng G, Zielonka J, Parekh P, Mason KP, Joseph J, Kalyanaraman B, Bonner W, Herman E, Shacter E, Rao VA. Mito-tempol and dexrazoxane exhibit cardioprotective and chemotherapeutic effects through specific protein oxidation and autophagy in a syngeneic breast tumor preclinical model. PLoS One. 2013; 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0070575

[学会発表](計 7件)

中村麻子、『ヒストン H2AX による被ばく検出 リン酸化ヒストンによる生体内 DNA 損傷レベルの高感度検出』、第 7 回「Quantum Medicine 研究会」茨城大学重点研究「がん放射線治療のための基礎生命科学研究」講演会、2014-3-9、茨城大学(茨城)

中村麻子、『高感度 DNA 損傷マーカーを用いた生体応答の評価』、平成 26 年東京 Radiation Biology Conference、2014-2-22、放射線医学総合研究所(千葉)

Asako J. Nakamura, Megumi Sasatani and Kenji Kamiya, 『The use of γ -H2AX assay for validation of novel radioprotector against both acute and chronic low-dose radiation exposure』、The 4th International Symposium of RIRBM, Hiroshima University、2014-2-13-14、広島大学(広島)

中村麻子、『Monitoring low-dose radiation induced-DNA damage levels *in vivo*』、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013-10-18-20、パレス青森(青森)

中村麻子、鈴木正敏、福本学、『Assessment of DNA damage level in animals from Fukushima area using phosphorylated H2AX assay』、第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3-5、パシフィコ横浜(神奈川)

中村麻子、『 Monitoring of low dose radiation induced-DNA damage level in vivo. 』、日本放射線影響学会第 55 回大会、2012-9-6-8、東北大学（宮城）

〔図書〕（計 2 件）

Nakamura AJ、Methods for the assessment of telomere status. *Cell Senescence. Methods Mol. Biol.*、2013、965、233-242

Nakamura AJ, Parekh P, martin OA, Bonner WM and Redon CE. γ -H2AX formation and chromatin structure. *Advances in Genet. Res.*、2012、127-152

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 麻子 (NAKAMURA, Asako)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：70609601

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

無し