

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792003

研究課題名(和文) 低線量放射線による細胞の放射線適応応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of Cell response by low dose irradiation

研究代表者

富田 和男 (Tomita, Kazuo)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60347094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死などに有意な変化を検出できない0.1mGy-100mGyといったごく低線量の放射線照射による細胞応答について、定量PCR法を用いて遺伝子発現変化を調べた。その結果、神経細胞芽腫NB-1細胞において、p53やMnSODなどの遺伝子発現が有意に変化することが明らかとなった。また、ミトコンドリアDNA突然変異を従来のRFLP法とSSCP法、および新しい方法であるTaqMan probeを用いた方法で比較検討した。その結果、TaqMan probeを用いた方法が、最も簡便に、かつ従来法より再現性良く突然変異を検出できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The cell response of low dose (0.1-100mGy) irradiation was investigated. Quantitative PCR was carried out whether specific gene expression change or not. As a result, 0.1 to 100mGy irradiation, that dose do not affect apoptosis ratio significantly, cause specific gene expression change such as p53, MnSOD in neuroblastoma cell line NB-1. Furthermore, to detect mitochondria DNA mutation, RFLP, SSCP and TaqMan based QPCR was performed. As a result, The TaqMan probe method was the easiest and most reproducible among them.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：放射線 遺伝子発現変化 酸化ストレス ミトコンドリア 低線量放射線影響

1. 研究開始当初の背景

細胞に対する放射線影響は、染色体異常、器官形成異常、細胞死等様々な指標を用いて解析がなされてきたが(1,2)、それらのほとんどは1 Gy以上の照射が必要であり、微小線量放射線の影響を解析するのは困難であった。近年、この解析の第一スクリーニングとしてDNA マイクロアレイ解析が用いられるようになってきた。この手法を用いれば、放射線に対する細胞影響を遺伝子発現の面から網羅的に解析することが可能である。しかしながら、現在までに行われているDNA アレイを用いた放射線による影響の研究は、比較的高線量で行われていることが多く(3-5)、低線量での放射線影響、特に遺伝子発現変化についての報告はきわめて少なかった。さらに、DNA アレイ法では遺伝子発現を網羅的に解析することは可能であるが、個々の遺伝子発現変化の解析では、定量PCRによる解析の方が再現性、感度ともに高い。

申請者らはまず、ヒト神経前駆細胞 NHNP を用いてミトコンドリアDNA (mtDNA) deletion、脂質過酸化、核DNA断片化のエンドポイントを探ったところ、0.5Gy以上であった。次に、上記実験の結果より最小線量の0.5 Gyおよびそれ以下である0.1 GyのX線を照射しDNA マイクロアレイ法を用いて2400個の遺伝子発現変化を調べた結果、非照射群に比べ0.5 Gy照射では398個、0.1 Gy照射では566個が5倍以上または1/5以下に変化している事が明らかとなった。さらに、予備的に2万個の遺伝子が載ったDNA マイクロアレイを用いてヒト神経芽細胞腫 NB-1細胞における0.1, 1, 10, 100 mGy照射後の遺伝子発現変化を調べたところ、非照射に比べて有意に発現の変化する遺伝子があることを見いだした。

近年になって、正常繊維芽細胞において20 mGyの照射に対する遺伝子発現を調べ、細胞骨格構成因子や、細胞間シグナル因子の発現変化がみられたという報告がなされたが(6)、今回行おうとするようなごく低線量の照射による遺伝子発現変化の報告はなされていない。

(参考文献)

(1) Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest.* 1999;17(1):56-72.

(2) Majima HJ, Indo HP, Tomita K, Suenaga S, Motoori S, Kato H, Yen H-C and Ozawa T. Intracellular oxidative stress caused by ionizing radiation, In *Oxidative Stress, Disease and Cancer*, ed. Singh K., Imperial College Press, London, UK, pp 61-83, 2006.

(3) Khodarev, N., N., Park, J., O., Yu, J., Gupta, N., Nodzenski, E., Roizman, B., Weichselbaum, R., R. Dose-dependent and independent temporal patterns of gene responses to ionizing radiation in normal and tumor cells and tumor xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(22):12665-12670.

(4) Amundson SA, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ Jr. Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2001;156(5 Pt 2):657-661.

(5) Yasumoto J, Imai Y, Takahashi A, Ohnishi K, Yuki K, Kirita T, Ohnishi T. Analysis of apoptosis-related gene expression after X-ray irradiation in human tongue squamous cell carcinoma cells harboring wild-type or mutated p53 gene. *J Radiat Res (Tokyo).* 2003; 44(1):41-45.

(6) Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, Cheng J F, Chen DJ. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res.* 2005; 164(1):17-26.

2. 研究の目的

本研究は、0.1mGyから100mGyといった低線量放射線(X線)照射による細胞応答メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

・定量PCRを用いた低線量照射による遺伝子発現変化の検討

低線量放射線の影響を明らかにするために、ヒト神経芽細胞腫を培養し、細胞に0.1-100mGyの放射線を照射した後細胞を回収し、RNAを抽出した。抽出したRNAを逆転写後、予備的なDNAアレイ法による実験で変化した遺伝子について、定量PCR用のPrimerを設計し、SYBR Greenを用いた定量PCRを行った。

・RFLP, SSCP, TaqMan Probe を用いた DNA 突然変異の検出

RFLP, SSCP, TaqMan Probe を用いた方法により、突然変異が起きると重篤な症状を示すミトコンドリア DNA (mtDNA) 突然変異である A3243G の変異の検出を試みた。

1) RFLP 法による突然変異の検出

野生型 mtDNA および突然変異型 mtDNA をもつ DNA と、以下の primer を用い 0-100% の突然変異を持つ PCR 断片を増幅した。

Forward primer

5' - AGGACAAGAGAAATAAGGCCT-3'

Reverse primer

5' - CACGTTGGGGCCTTTGCGT-3'

増幅した PCR 断片を精製後、制限酵素 *Apa*I で処理し、突然変異率ごとに電気泳動した。電気泳動後、バンドの強さを測定し、標準曲線を作成した。

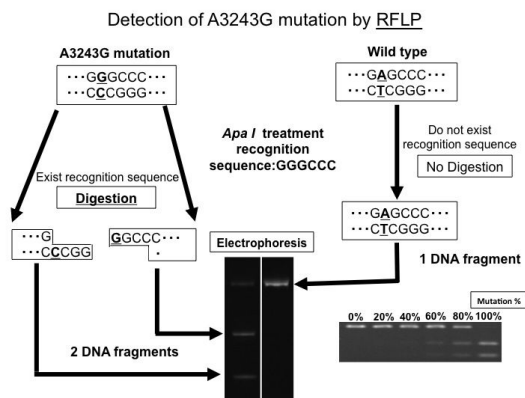


図 1 RFLP による突然変異の検出

2) SSCP による突然変異の検出

RFLP と同様に、野生型 mtDNA および突然変異型 mtDNA をもつ DNA と、以下の primer を用い 0-100% の突然変異を持つ PCR 断片を増幅した。

Forward primer

5' - AGGACAAGAGAAATAAGGCCT-3'

Reverse primer

5' - CACGTTGGGGCCTTTGCGT-3'

増幅した PCR 断片にホルムアミドと NaOH を加え、熱変性後、Elchrome 社の GMA ゲルで電気泳動し、SYBR Gold で染色後、バンドの強さを測定し、RFLP と同様に標準曲線作成した。

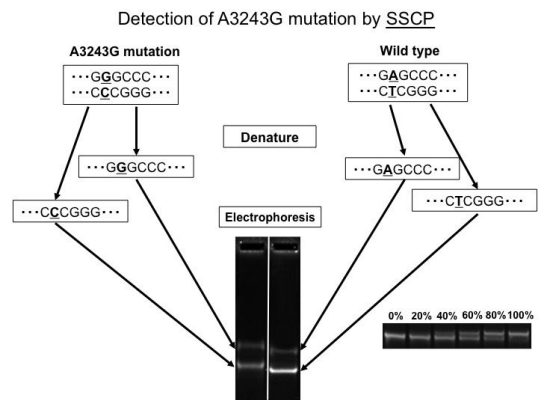


図 2 SSCP による突然変異の検出

3) TaqMan probe を用いた突然変異の検出

野生型 mtDNA および突然変異型 mtDNA をもつ DNA と、以下の primer、TaqMan probe を用い 0-100% の突然変異を持つ PCR 断片を増幅した。

Forward primer

5' - CACCCAAGAACAGGGTTTGTAA-3'

Reverse primer

5' - GTTGCCATGGGTATGTTGTTA-3'

TaqMan probe to detect wt mtDNA

5' - VIC- ATGGCAGAGCCCGG-MGB-3'

TaqMan probe to detect mut mtDNA

5' - FAM- TGGCAGGGCCCGG-MGB-3'

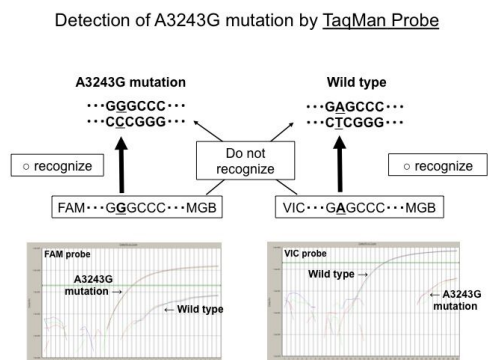


図 3 TaqMan probe を用いた突然変異の検出

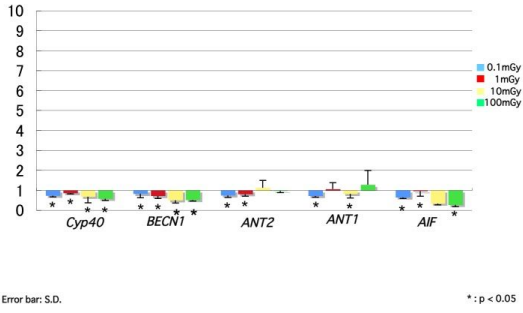
PCR 後、得られた Delta Rn の値から直線部を取り出し、その角度より突然変異率の標準曲線を作成した。

4. 研究成果

定量 PCR の結果、神経細胞芽腫 NB-1 細胞において、低線量の放射線照射によって Cyp40, MnSOD, p53 をはじめとする遺伝子発現が有意に変化することが明らかとなった。

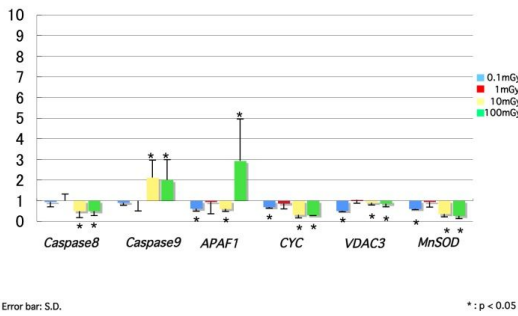
a)

NB-1 定量PCR X-irradiation 30 min 後



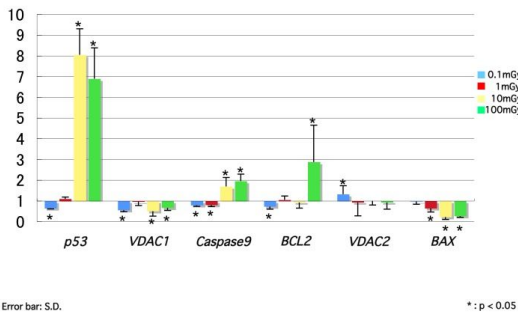
b)

NB-1 定量PCR X-irradiation 30 min 後



c)

NB-1 定量PCR X-irradiation 30 min 後



d)

NB-1 定量PCR X-irradiation 30 min 後

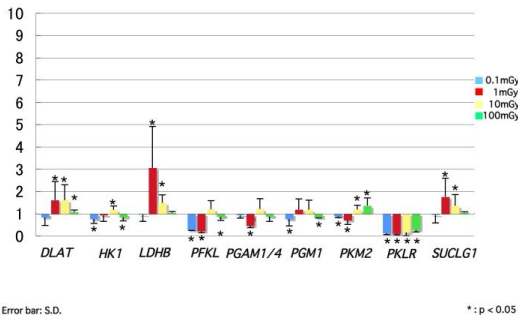
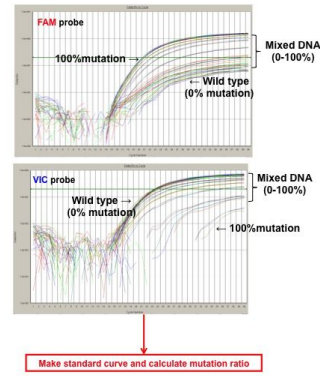


図4 低線量放射線照射による遺伝子発現変化 (一部抜粋)

また、ミトコンドリア DNA 突然変異を RFLP 法、SSCP 法、TaqMan probe を用いた方法の 3 つで検出を試みた。その結果、TaqMan probe を用いた方法が、最も簡便で、再現性良く突然変異が検出できることがわかった。

a)



b)

Determine the standard curve (TaqMan)

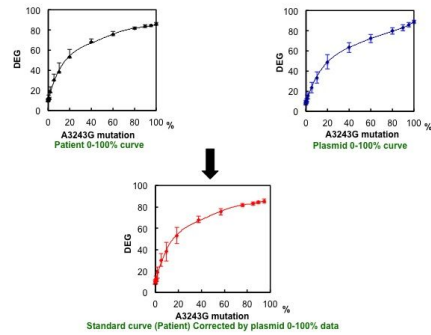


図5 TaqMan probe による突然変異率標準曲線

以上より、低線量放射線照射にตอบสนองして発現が変化する遺伝子の存在が明らかとなり、また DNA 突然変異を簡便かつ高感度で検出する系を確立できた。

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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ なし

6．研究組織

研究代表者 富田 和男 Kazuo Tomita
顎顔面放射線学 助教

研究者番号：60347094