

氏 名 森 本 茂 子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大乙第103号

学位授与の日付 平成14年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 低線量放射線照射によるヒト細胞における遺伝的変化誘発の研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 若槻 壮市
教授 飯田 厚夫
助教授 小林 克己
教授 檜枝 光太郎（立教大学）
副主任研究員 谷田貝 文夫（理化学研究所）
研究員

論文内容の要旨

現在放射線防護の分野では放射線による発癌や遺伝的影響のリスクは線量とともに直線的に増加し、閾値はないと仮定されている。これまでの長年の細胞レベルでの放射線生物影響に関する実験的研究は比較的高線量を用いて行われてきた。その理由は、低線量になると突然変異などの誘発頻度がたいへん低くなるので、定量的な議論に耐える結果を得ることが出来ないからである。その結果、線量効果関係が直線的であるか否かという問題の結論を出すには至っていない。低線量での生物影響を推測する手法として、効果の見やすい積算線量が数 Gy となる低線量率照射や、数〜数 10 cGy の低線量放射線照射後に適当な時間をおいて数 Gy の放射線照射を行う実験が主にされてきた。その結果、10 cGy 以下の低線量放射線による生物効果が高線量実験からの予測とは異なることが示唆されてきたが、低線量のみでの照射実験による研究結果はまだ報告されていない。低線量のリスク推定では癌へ繋がる可能性がある遺伝的变化を生存細胞で研究することが重要と思われる。特に遺伝的变化の詳細な解析を行えば変化の原因と細胞応答経路を特定できる可能性がある。そこで、遺伝的变化を敏感に検出できる実験系を探し出し、低線量放射線による生物効果を直接捉えることが低線量放射線に対する応答の理解に必要であると考え、本研究を開始した。

本研究では低線量での遺伝的効果をこれまで報告されている高線量での効果と比べたかったので、ヒトリンパ球由来の TK6 細胞における以下の二つの遺伝子に着目し、それぞれについて以下の様な実験を行なった。

a) Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) 遺伝子：HPRT はヒトでは X 染色体長腕にある。低線量放射線の生物効果が検出できるかどうか確かめるために適応応答と呼ばれる現象に着目し、HPRT⁻ 誘発率と生存率、および放射線によって誘導されることが知られている癌抑制遺伝子 p53 および関連蛋白の誘導を調べた。適応応答とは低線量放射線照射後に適当な時間をおいて数 Gy の放射線照射を行ったときに、低線量照射のない場合と比べて致死効果の緩和や遺伝的変異誘発の抑制を示す現象で、低線量照射による細胞応答は微量で検出しにくいのに対して、適応応答の実験では低線量照射によって生じた変化を比較的高線量の照射による生物応答で増幅して検出するので、低線量だけの場合よりも検出され易い。そこで本研究の目的である低線量放射線の効果の検出に用いることができる実験系であるかどうかの判断を適応応答の有無で判定した。

b) Thymidinekinase (TK) 遺伝子：TK 遺伝子はヒトでは 17 番染色体長腕にある。正常の TK 遺伝子が 17 番染色体の片方にしかないヘテロの細胞に見られる TK⁻ への変異は、a) 不活性な TK 遺伝子座が組み換えにより両方の染色体に存在する様になる (ホモ型)、b) 活性を持つ TK 遺伝子座が欠失して、不活性な TK 遺伝子座だけ残る (ヘミ型)、c) 活性を持つ TK 遺伝子座に突然変異が入る、の過程で生成し、a) あるいは b) となった場合にはヘテロ接合性の消失 (LOH; loss of heterozygosity) と呼ばれている。癌抑制遺伝子の不活化の多くは LOH によることが知られているので、LOH は放射線影響の重要な指標となる。また、ホモ型、ヘミ型の LOH はそれぞれ電離放射線による DNA 損傷である DNA 二本鎖切断 (DSB) の二つの修復経路 homologous recombination (相同的組換え、HR) と non-homologous endjoining (非相同的末端結合、NHEJ) の結果と考えられるので、この二つを区別できれば

低線量電離放射線による遺伝的変化がどのような機構で生成したか推測できる。本研究で用いた株は、TK 遺伝子の活性アレルのエクソン7 および不活性アレルのエクソン4 に各々1塩基の挿入変異があるために各々のエクソン領域をマルチプルPCRで増幅し、定量する事により、ホモであるかヘミであるかを判定できる。さらに、17番染色体上の12個のマイクロサテライトマーカーを用いてLOHが染色体上のどの範囲まで及んでいるかを調べることが可能である。大きな欠失は放射線照射に特異的なものと考えられるので、低線量照射によってもこのような遺伝的変化がみられるのか確認できる。

はじめにTK6細胞に5、10、20 cGy X線または重イオン線の低線量照射の有無で、後に照射する1ないし3 GyのX線によるHPRT⁻誘発率と生存率を調べたところ、大きな差は見られなかったが、10 cGyのX線で前照射された場合には後の大線量照射によるHPRT⁻誘発の抑制が少し見られた。同時に調べたタンパクの発現では、p53蛋白、セリン15がリン酸化されたp53蛋白(p53-ser15)、p21蛋白は5 cGyのX線照射で誘導発現していたのでなんらかの応答は起きていると推測できた。この結果からこの細胞は低線量放射線の生物効果の研究に用いることが可能であると判断した。

続いて10 cGyのX線照射後に得られたTK⁻突然変異株について、DNAレベルでの遺伝的変化を調べた。その結果、TK⁻変異の誘発率は非照射群と比べ有意な差は見られなかった。しかし、変異株の染色体DNAの分析を行って中身をnon LOH、ヘミLOH、ホモLOHにクラス分けした結果、非照射群では10%だったヘミ型のLOHが10 cGy X線照射によって42%となり、さらに、ヘミ型の中で、非照射群では現れなかったTK遺伝子座より大きく欠失しているがテロメア付近のマーカーは残っている比較的大きな欠失変異が10 cGyのX線照射によって顕著に現れていた(15%)。この変化の内容は高線量照射時に現れるものと同じであったので放射線によって誘発された変化であると結論できる。この結果は10 cGyという低線量照射による遺伝的変化を敏感に検出できたことを示している。次に、X線よりも効率よくDNAに二本鎖切断(DSB)を引き起こすと考えられている炭素イオン線を10 cGy照射して得られた変異株について同様の解析を行なった所、ヘミ型LOHは58%となり、その中のTK遺伝子座より大きく欠失しているがテロメアマーカーは残っている変異は32%に増加していた。このことから放射線特異的な変異の原因となる損傷はDNA二本鎖切断と判断できた。このようなタイプのヘミ型LOHの炭素イオン線による誘発頻度はX線の6倍にもなった。炭素イオン線ではDNA上の近接した領域に多数あるいは多種類の損傷ができるので、DNA損傷の種類・量の変化あるいはそれに対する細胞の応答の違いによってこのようなタイプのヘミ型LOHが誘発されやすくなっていると結論された。

本研究では遺伝的変化を敏感に検出できる細胞系を探し出し、低線量放射線に対する細胞の応答に関する研究を進めることが目的であった。本研究の結果、以下の結論が得られた。

- 1) X線10 cGyという低線量照射でもLOHを指標として放射線特異的な遺伝的変化の誘発が観察できた。
- 2) 10 cGyの炭素イオン線照射実験との比較から、ヘミ型LOHの原因となる損傷はDNA二本鎖切断であると推測できた。
- 3) X線と炭素イオン線の作用の差を検出できたことから、LOH解析は放射線効果の高感度検出のみならずその作用機構の解明にも利用できる。

論文の審査結果の要旨

森本茂子氏の学位申請論文の内容は、低線量放射線の生物影響の研究に関するものである。放射線利用が不可欠になった現代社会にとって低線量放射線の生物効果、特にヒトに対する効果を正確に評価することは非常に重要である。生物効果を高い精度で検出することが難しくなる10 cGy以下の低線量域での線量？生物効果関係は、生物効果を引き起こすと考えられる傷が放射線量に対して直線的に増加するという実験事実を根拠にして、どんな低線量でも線量に比例すると仮定されている。しかしながら最近の疫学的あるいは実験的研究からはこれに反する結果が報告されている。この問題点を解決するには、低線量でも検出できる生物影響を見つけて、そのメカニズムを明らかにする必要がある。

森本氏は、初めに、あらかじめ生物効果が見られないような低線量の放射線をあらかじめ照射しておくとその後に照射された放射線の効果が抑えられる適応応答という現象に着目して、低線量域でも感度よく遺伝的な効果が見られること、誘発された遺伝的変化が染色体レベルでのマクロな分析だけでなく、ミクロな塩基レベルまで分析できる検出系を探した。その結果、1)TK (Thymidine kinase) 遺伝子座がヘテロになっているのでTK(-)への変異が容易に検出できる、2)10cGy程度の低線量でも放射線によるタンパク誘導が検出できる、3)TK(-)に変異した株での詳細な遺伝解析を可能とする多くの染色体マーカーが確立されている、という特徴を持ったヒト脾臓由来の細胞株(TK6株)を実験系として選定した。

この株に10 cGyのX線を照射してTK(-)への突然変異頻度を測定したところ、未照射試料での頻度とあまり変わらなかった。次にこの二つの集団からの突然変異株をそれぞれ100株程度採取して、TK遺伝子座内の特定エクソン領域をPCR (Polymerase chain reaction)法を用いて増幅・分析することによって、(a)不活性なTK遺伝子座が組み換えにより両方の染色体に存在する様になる(ホモ型)、(b)活性を持つTK遺伝子座が欠失して、不活性なTK遺伝子座だけ残る(ヘミ型)、(c)活性を持つTK遺伝子座に突然変異が入る、という三種に分類した。(a)あるいは(b)となった場合にはヘテロ接合性の消失(LOH; loss of heterozygosity)と呼ばれる。分析の結果、全体の頻度はあまり変化していなかったにもかかわらず、未照射集団で10%程度であった(b)のタイプの変異が10 cGy照射された集団では42%に上昇していた。さらにDNAの二本鎖切断をより効率良く生成する炭素イオンビームを10 cGy照射した場合にはこの割合が58%にまで増えていた。ホモ型、ヘミ型のLOHはそれぞれ電離放射線によるDNA損傷であるDNA二本鎖切断(DSB)の二つの修復経路、homologous recombination(相同的組換え、HR)とnon-homologous endjoining(非相同的末端結合、NHEJ)による修復の結果と考えられるので、今回の行われた分析によって10 cGyという低線量でも、放射線による突然変異を検出でき、さらにその原因となる損傷が二本鎖切断であると推測できた。また、TK遺伝子座の外部にある複数の染色体マーカーを用いて、(a)、(b)の原因となった遺伝的変化が染色体上でどのくらいの範囲にまで及んでいるかという分析も行なったが、その結果も上記の推論を支持するものであった。多くの癌抑制遺伝子の不活化はLOHによることが知られているので、低線量領域で放射線によるLOHが起きていることを発見したのは大変重要な知見であり、高く評価できるものである。

以上のように、本申請に関わる研究は、これまで損傷や変異が検出できなかったような低線量の放射線によって誘発される変異を検出する方法を確立し、さらにそれを放射線による DNA の二本鎖切断にまで関連づけることが出来た、という点で、大変重要な成果である。ヒト細胞を使っているので人に対する遺伝的リスクの研究につながるという点も評価できる。以上のような判断に基づき、本審査委員会は、森本茂子氏の学位申請論文を全員一致で合格と判定した。