

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和4年度研究報告書

研究課題名	低線量率放射線発がんリスクの予測モデル構築及び遺伝的素因に関する基礎的研究 若手研究項目「 <i>Brcal</i> 遺伝子欠損個体の低線量率放射線影響の機序解明」
令和4年度研究期間	令和4年4月1日～令和5年2月28日
研究期間	令和4年度 ～ 令和6年度（1年目）

氏名	所属機関・職名
主任研究者 今岡 達彦	量子科学技術研究開発機構・グループリーダー
若手研究者 永田 健斗	量子科学技術研究開発機構・研究員

キーワード	低線量率放射線、DNA 損傷、 <i>Brcal</i> 遺伝子、線量率効果、乳腺
-------	---

本年度研究成果
<p>I 研究背景</p> <p>東京電力福島第一原子力発電所事故以降、福島第一原発周辺地域では放射性物質による居住地の汚染により一部の住民は避難を余儀なくされており、住民への健康不安対策の充実や、放射線被ばく影響に関する正しい情報を提供することは重要な課題である。日本における原爆被爆者の疫学的研究により高線量率放射線による健康影響のリスクが明らかとされてきた。一方で、低線量率の連続的な被ばくによるヒトの健康影響やそのメカニズムに関する知見は少なく、細胞レベルでのメカニズム研究においては報告例がある。</p> <p>放射線などにより生じた DNA 損傷は、細胞に存在する修復関連タンパクによって修復される。DNA 損傷が修復されずに残存すると、不正確な機構で修復されて変異が生じ、発がんの機会を作ると考えられる。DNA 損傷修復関連タンパクの一つである <i>BRCA1</i> をコードする遺伝子 <i>BRCA1</i> と DNA 損傷部位に集積する <i>53BP1</i> は拮抗的に作用し、非相同末端結合による損傷修復、相同組換え修復の機構を選択して修復を行う¹⁾。<i>BRCA1</i> 遺伝子は日本人を含む人類で数百人に1人がその変異を持ち、この変異を1コピー持つと乳がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん等のリスクが高まる。大規模な動物実験において、高線量率の放射線に被ばくした <i>Brcal</i> 遺伝子ヘテロ接合性変異を持つ個体では、野生型に比べて乳がん発生率が高くなる²⁾。しかし、放射線被ばく直後の DNA 損傷応答やその線量率依存性、さらには <i>BRCA1</i> の変異の有無による影響の差異についてはよくわかっていない。</p> <p>II 目的</p> <p><i>Brcal</i> 遺伝子欠損個体において、低線量率放射線被ばく後の過程の DNA 損傷修復動態や、<i>Brcal</i> 下流遺伝子の遺伝子発現を解明する。</p>

III 研究方法

1. 放射線照射

雌ラット (Jcl:SD 系統、野生型 *Brcal*^{+/+} 及びヘテロ接合性変異体 *Brcal*^{L63X/+})² を自然交配によって作出し、 γ セル照射装置 (Nordion 社、線量率 30 Gy/時、線量 1 Gy) による高線量率照射 (3 週齢)、あるいは母体と共に連続 γ 線照射装置 (ポニー工業株式会社、線量率 3 mGy/時、合計線量 1 Gy) による低線量率照射 (2 週齢から開始し、2 週間) を行った。高線量率 (1 Gy, 0.4 Gy/分) 照射 1, 3, 6, 12, 24 時間後、および 2~7 日後の乳腺、ならびに低線量率 (1 Gy, 0.05 mGy/分) 照射 1, 24 時間後の乳腺を収集し、ホルマリン固定した。

2. 組織標本作製

パラフィン包埋を行った乳腺組織を 3 μ m 厚に連続的に薄切した。切片の一部をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、解析対象となる末梢芽状突起 (TEB) が含まれることを確認した。その後、連続薄切した切片を、パラフィン除去後に 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中 121°C 15 分で抗原賦活化処理を行い、10% ブロッキング液 (Dako 社) を含む 0.05% Tween-20 含有 トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) に希釈した一次抗体 (抗 53BP1 抗体、抗 *Brcal* 抗体、抗 Ki-67 抗体、抗 サイトケラチン 14 抗体、抗 サイトケラチン 8/18 抗体を使用) と 4°C で一晩反応させ、TBS-T で洗浄後、同様に希釈した蛍光標識二次抗体を室温で 1 時間反応させ、TBS-T で洗浄した。その後、4',6'-ジアミジノ-2-フェニリンドール (DAPI) を含む封入剤 (Vector 社) で封入した。

3. 画像データ取得及び解析

HE 染色した標本の画像取得には、スライドスキャナ (NanoZoomer、浜松ホトニクス株式会社) を、蛍光染色した標本の画像取得にはディスク走査型共焦点顕微鏡システム (DSU-IX81、オリンパス株式会社) を、画像解析ソフトウェアとして ImageJ (米国国立衛生研究所) をそれぞれ使用した。

(倫理面への配慮)

動物実験及び遺伝子組換え実験については、量子科学技術研究開発機構の動物実験委員会 (承認番号 22-1016) 及び遺伝子組換え実験委員会 (承認番号 H26-2) の承認の下に行った。人を対象とする研究には該当しない。

IV 研究結果、考察及び今後の研究方針

放射線照射実験を実施し、乳腺組織サンプルの収集を予定通り終えた。HE 染色をした乳腺の観察により、約 200 μ m の長さの TEB が第 4 乳頭を起点とした 2cm 以内の領域に多く存在することが分かり、同領域を細胞動態の解析対象範囲とした。多重蛍光免疫染色により乳腺上皮細胞 (基底細胞、内腔細胞) および DNA 損傷動態 (53BP1) を確認するため、抗原の賦活化条件 (温度、使用する緩衝液等)、抗体条件 (希釈価、温度、反応時間等) を決定し、マイルストーンを達成した。

さらに、高線量率放射線により誘導された 53BP1 フォーカスは、*Brcal*^{+/+} と *Brcal*^{L63X/+} の乳腺で照射 1 時間後の時点で、組織切片において細胞の断面あたり、基底細胞では約 1.2 個、内腔細胞では約 1.7 個誘導されるが、照射後 12 時間までには 2~3% 程度まで減少することを、予備的に各 1 検体で確認した。次年度は、1) 収集した全サンプルの DNA 損傷動態を解析し、*Brcal* 遺伝子の有無による DNA 損傷修復の差異を定量的に評価する他、2) RNA シーケンス等による遺伝子発現解析により *Brcal* 下流遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにする実験に着手する。

V 結論

本年度計画していた放射線照射実験をすべて終了し、乳腺組織サンプルを収集した。乳腺上皮細胞および DNA 損傷動態を検出するための多重蛍光免疫染色の実験条件を決定し、次年度実施予定の DNA 損傷の定量解析の準備が整った。

引用文献

1. Shibata A and Penny A Jeggo. Roles for the DNA-PK complex and 53BP1 in protecting ends from resection during DNA double-strand break repair, *Journal of Radiation Research* 2020; 61 (5) , 718–726.
2. Nakamura Y, Kubota J, Nishimura Y et al. *Brca1*^{L63X/+} rat is a novel model of human BRCA1 deficiency displaying susceptibility to radiation-induced mammary cancer, *Cancer Sci* 2022; 113: 3362–3375.