

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和 5 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 若手研究項目名：Brca1 遺伝子欠損個体の低線量率放射線影響の機序解明
令和 5 年度研究期間	令和 5 年 4 月 3 日～令和 6 年 2 月 29 日
研究期間	令和 4 年度 ～ 令和 6 年度（2 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、Brca1 遺伝子、線量率効果、乳腺
-------	-----------------------------------

本年度研究成果
I 研究背景 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。 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 BRCA1 をコードする遺伝子 <i>BRCA1</i> と DNA 損傷部位に集積する 53BP1 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⁾。BRCA1 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 Brca1 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 BRCA1 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。 II 目的 Brca1 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、Brca1 下流遺伝子の遺伝子発現を解明する。 III 研究方法

1. 組織標本作製

昨年度に準備が完了したパラフィン包埋を行った乳腺組織を 3 μm 厚に連続的に薄切した。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。

2. 画像データ取得及び解析

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。

3. 遺伝子発現解析

凍結保存した乳腺組織から RNA 抽出キット (キアゲン社、RNeasy Micro Kit) を用いて totalRNA を抽出した。遺伝子発現解析に必要なデータの取得はアゼンタ株式会社に委託し、取得したデータを用いてサンプル間の遺伝子発現変動比較、主成分解析を行った。また、個々の遺伝子の機能については、データベースを通じて検索した。

(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

1. DNA 損傷修復動態データの取得

1 Gy の高線量率放射線 (30 Gy/h) 被ばく後 1 時間において、Brcal の遺伝子型に関わらず DNA 損傷数はピークとなり、以降減少することがわかった。また、高線量率被ばくした野生型と変異型とでは、解析した一部の時間において DNA 損傷動態 (53BP1) に差の傾向があることが判明した。1Gy の低線量率放射線 (3 mGy/h) 照射 1 時間後の DNA 損傷数は、高線量率と比べて有意に小さいが、実験に使用した線量では、低線量率群と非照射群の間に有意な差はみられなかった。

2. Brcal 変異の有無によるその下流遺伝子の発現変化の相違点

高線量率被ばくによる急性応答の検証のため、放射線被ばく後 24 時間の乳腺の遺伝子発現を解析したところ、Brcal 遺伝子の下流で機能する細胞周期関連遺伝子の発現が Brcal^{+/+}では放射線によって強く誘導されるものの、Brcal^{L63X/+}では非照射と比較して有意な発現上昇は認められなかった。

3. 今後の研究方針

次年度は、放射線被ばく後数日の乳腺サンプルを解析し、照射から十分な時間経過後の遺伝子発現の機能的特徴を解明し、遺伝子発現解析を完了させる。

V 結論

本年度計画していた DNA 損傷修復動態データの取得、および高線量率被ばくによる急性応答の検証のための RNA シーケンス解析を実施し、Brcal 変異の有無による放射線応答の一部を明らかにした。

引用文献

1. Shibata A and P A Jeggo. Roles for the DNA-PK complex and 53BP1 in protecting ends from resection during DNA double-strand break repair, J Radiat Res 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.