

放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

「線量・線量率効果係数」 DDREF=2 の妥当性の検討

線量率効果を規定する因子のスクリーニング

分担研究者 河合 秀彦 (広島大学大学院医系科学研究科)

研究要旨

低線量 (率) の放射線被曝による健康影響は、その実態を含めて明らかにすることは困難である。当分担研究者は、これまで低線量 (率) 放射線被曝の生物影響を明らかにすることを目的として、ガンマ線持続照射設備 (広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端施設、 ^{137}Cs 線源 培養細胞 : 0.001~1.4 mGy/min) を用いて、幅広い線量率のガンマ線を異なる種類の培養細胞に持続的に照射しながら培養し、照射線量率や照射期間に依存して現れる細胞応答や細胞運命の変化に注目して解析を行ってきた。これまでに、ヒトの初代培養細胞や様々な組織由来のがん細胞株、iPS 細胞など、異なる種類の細胞を用いた研究から、持続照射の放射線応答の決定に関与する因子やシグナル伝達経路を明らかとしてきた。

当分担研究課題では、線量率効果を規定するいくつかの候補遺伝子を同定し、線量率と放射線発がんリスクに関する DDREF について、分子レベルでアプローチできる可能性を模索することを目的に研究を行った。放射線発がんの標的モデル細胞として、多能性幹細胞である iPS 細胞を用い、異なる線量率の放射線照射で誘発される LOH を規定する可能性のある因子を siRNA ライブラリーによってスクリーニングした。その結果、放射線誘発 LOH に関与する可能性がある遺伝子を複数種類同定することができた。LOH の頻度が上昇する因子は急照射と持続照射とでは明らかに異なっており、急照射では細胞周期進行、特に DNA 複製開始に関わる遺伝子が複数同定されたのに対し、持続照射では DNA 損傷修復とヒストンのメチル化に関与する因子が同定された。主任研究者の研究結果から、放射線誘発性の LOH に関わる因子が発がんリスクの線量率効果の決定因子の一つである可能性が示唆されている。この分担研究の結果からも、iPS 細胞では照射線量率に依存した放射線誘発性の変異を規定する遺伝子が異なっている可能性が示唆された。この結果は、主任研究者の結果を支持するものであると考える。組織や個体間での特定の因子の機能の差は、特定の線量率での照射による健康影響のみでその差が現れる可能性が示唆される。こうした研究結果は、将来的に、DDREF は個人差を考慮して決定する必要があることを意味する。今後、更に、線量率効果に関わる因子や分子機構などが同定され、放射線被曝による発がん機構の実態が明らかとなることで、人類にとってより有益性の高い DDREF を決定することができるものと期待する。

キーワード

放射線発がん、持続照射、細胞老化、siRNA スクリーニング

I. 研究目的

福島第一原発事故以降、低線量、そして、持続的な低線量率の放射線被曝の発がんへの影響は福島県民のみならず国際的にも最優先に解明すべき課題となっている。低線量率の放射線被曝による発がんリスクは、高線量率被曝よりも低いと言う多くの様々な研究結果から、放射線の防護基準を勧告する国際放射線防護委員会（ICRP）では、DDREF=“2”を用いた低線量率の放射線被曝による発がんのリスク推定を行っている。しかし、その数値の妥当性については、議論が必要とされている。

放射線被曝の線量・線量率効果に関する研究は、疫学解析、動物実験、細胞・分子生物学的な解析まで幅広く行われている。我々が行ってきた培養細胞を用いて放射線被曝の線量・線量率効果の解析を行う利点は、異なる組織由来の細胞を多くの異なる条件での放射線照射に対する応答や影響について、効率的にデータを得ることが可能となることであり、実験の再現性を確認しながら、ごくわずかな現象まで定量的に解析できるといった点にある。我々は低線量・低線量率被曝影響の一端を解明することを目的として、これまでに持続放射線被曝影響解析システムを構築し、持続照射が急照射よりも効果的に半永続的な細胞周期の進行停止である細胞老化を誘導すること、また、持続放射線誘発細胞老化に関わる分子を明らかにしてきた[1]。放射線発がんの感受性は、個人レベル、あるいは、同一個体内でも細胞レベルで異なるが、その違いは遺伝的背景が寄与する部分も大きいと考えられる。放射線発がんの場合には、放射線被曝した細胞ががん抑制機能を有する遺伝子にヘテロ接合体で変異を有する場合において、変異アレルの存在に伴って生じる正常アレルの消失、すなわち LOH（loss of heterozygosity/ヘテロ接合性の消失）が、がん化に寄与することにより、がんの発生率が上昇するものも多いものと考えられる。事実、がん抑制遺伝子 *TP53* ヘテロノックアウトマウスでは、放射線照射による発がん頻度の顕著な上昇、および *TP53* 遺伝子正常アレルにおいての変異が検出される[2,3]。放射線による正常アレルの遺伝子機能喪失には、放射線が直接的・間接的に誘発する点変異や欠失変異、あるいは転写の抑制などが関与することが明らかとなっている。本研究課題の主任研究者・笹谷による WNT Signaling Pathway Regulator *APC* の *min/+* ヘテロマウスを用いた放射線誘発性小腸腫瘍の発がん研究の結果からは、染色体組み換えを介した LOH では被曝線量率の影響が現れにくい可能性が示唆されており、DDREF の妥当性を検討するにあたっては、放射線による個別の生物学的影響への線量率効果の有無や寄与率と、それぞれに関与する分子機構を明らかにすることが重要であると考えられる。そこで、本研究項目では放射線被曝による LOH と染色体組み換えに関与する候補遺伝子を、多能性幹細胞である iPS 細胞を用いて、siRNA スクリーニングによる同定を試みることで、幹細胞において放射線誘発 LOH に関わる遺伝的背景の解明につながるデータを得ることを目的とした。

II. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞株 (*p53*^{+/+}、*p53*^{del/+}、*p53*^{del/del}) と培養条件：本実験において iPS 細胞は Human Episomal iPSC Line (hiPSC-*TP553*^{+/+}) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (Takara Bio) で培養し、ガンマ線の持続照射中も含めて、37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した。継代培養には 35-mm dish (Thermo Fisher Scientific)、実験培養には

384-well imaging plate Cell Carrier Ultra (PerkinElmer) を用いた。2 種類の *TP53* 遺伝子欠損細胞株、*hiPSC-TP53^{del/+}* (hetero-deletion mutant) と *hiPSC-TP53^{del/del}* (homo-deletion mutant) は、*TP53* 正常 *hiPSC* から CRISPR-Cas9 と Blasticidin 耐性遺伝子の一本鎖 DNA によって、前年度までの本分担研究課題で樹立したものをを用いた。

2. ガンマ線照射条件：ガンマ線の照射には広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置されたガンマセル (^{137}Cs 線源、線量率： ~ 0.9 Gy/min) および低線量率ガンマ線持続照射設備 (^{137}Cs 線源、線量率： ~ 1.388 mGy/min) を用いた。

3. siRNA ライブラリーとその導入：DNA 損傷修復と DNA 損傷応答に関わる siRNA のカスタムライブラリー (Silencer Select, Thermo Fisher Scientific, 315 遺伝子) を、核酸導入 (トランスフェクション) 試薬 RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて 384-well plate に播種された *hiPSC* 細胞 (*p53^{+/+}*、*p53^{del/+}*、*p53^{del/del}*) に導入した。照射を行う場合には、トランスフェクションから 24 時間培養後に、異なる条件でガンマ線の急照射あるいは持続照射を行い、それぞれの解析を行った。

4. *p53*-LOH と細胞応答のイメージング解析：ガンマ線照射した細胞 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で固定し、0.2% Triton X-100 で処理した後、anti-*TP53*-FL393 (SantaCruz, 1:500) あるいは anti-*TP53*-Ab-6 (Millipore, 1:1000) と、anti-rabbit IgG-Alexa555 または anti-mouse IgG-Alexa488 蛍光標識抗体 (Thermo Fisher Scientific, 1:2000) を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific, 1 $\mu\text{g/ml}$) で蛍光標識し、全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix (PerkinElmer) で蛍光画像データを取得した。データ画像は画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer) を用いて、蛍光強度のデータから解析を行った。また、グラフ作成とデータ解析には TIBCO SpotFire (PerkinElmer) を用いた。

(倫理面への配慮)

本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いた解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

iPS 細胞の照射線量率に依存した染色体組み換え LOH 検出

がんは各組織の幹細胞より生じることを考慮し、当分担研究課題では、放射線誘発 LOH のモデル細胞として、培養が安定に行うことが可能な多能性幹細胞である *iPS* 細胞 (*iPSC*) を用いた。ヒト正常細胞由来 *iPSC* (*hiPSC*) による放射線誘発 LOH を解析するにあたり、ゲノム DNA 中の *TP53* 遺伝子の LOH を指標としてスクリーニングすることが可能な *in vitro* 実験系を構築した。まず、昨年度までに CRISPR-Cas9 を用いて *hiPSC-TP53^{del/+}* (hetero-deletion mutant) と *hiPSC-TP53^{del/del}* (homo-deletion mutant) を樹立した。正常 *hiPSC*、*hiPSC-TP53^{del/+}*、*hiPSC-TP53^{del/del}* を用いて、*TP53* タンパク質の細胞の免疫蛍光染色を行い、細胞の蛍光画像を全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix で取得し、画像解析ソフト Harmony で解析を行った。その結果、画像解析を行うことで、それぞれの細胞での *TP53* の発現量の違いを識別できることが明らかとなった (図 III-1)。

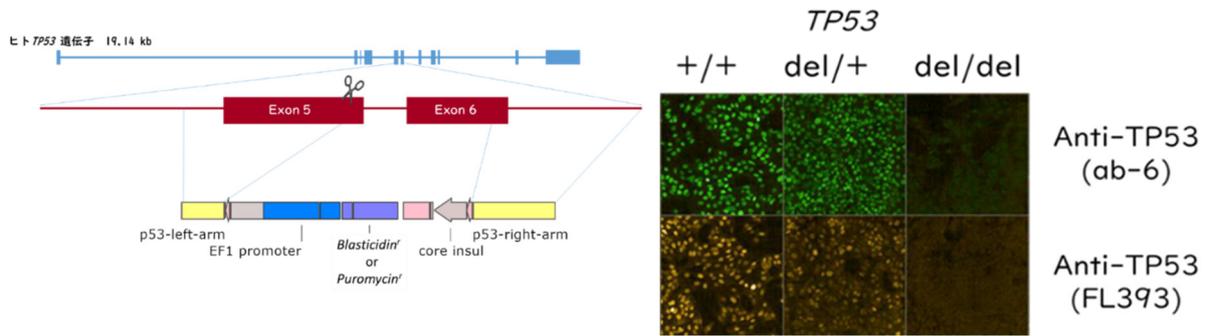


図 III-1. LOH 解析用 *TP53* 変異 hiPS 細胞株

【図左】CRISPR-Cas9 と一本鎖 DNA による *TP53* の遺伝子のノックアウトの概略図。ゲノム DNA の *TP53* 遺伝子の Exon 5 の切断位置 (ハサミ) と薬剤耐性遺伝子 (*blastidicin^r* または *puromycin^r*) DNA フラグメント。【図右】hiPSC-*TP53*^{del/+} と全自動蛍光画像撮影解析装置 Opera Phenix を用いた LOH 検出に用いる免疫蛍光染色画像。左から hiPSC-*TP53*^{+/+} (野生型、+/+)、hiPSC-*TP53*^{del/+} (欠失変異ヘテロ接合型、del/+)、hiPSC-*TP53*^{del/del} (欠失変異ホモ接合型、del/del)。Hoechst33342 での核染色 (青)、TP53 タンパク質を認識する一次抗体 (ab-6 : mouse-monoclonal 抗体、FL393 : rabbit-polyclonal 抗体) と蛍光色素で標識された 2 種類の二次抗体 (anti-mouse-IgG-Alexa488 抗体 : 緑色、anti-rabbit-IgG-Alexa555 抗体 : 橙色)。

本年度は、放射線照射によって誘発される LOH について siRNA ライブラリーによる遺伝子スクリーニングを行うにあり、siRNA の導入法の検討と同時に *TP53* の発現量検出の確認実験を行った。*TP53* 遺伝子に対する siRNA を用いて、異なる種類の siRNA 導入試薬を用いて確認を行なったところ、RNAiMax を用いた場合に、最も p53 遺伝子発現量の抑制が確認されることが明らかとなった (図 III-2)。そこで、siRNA ライブラリーの導入には RNAiMax を用いることとした。

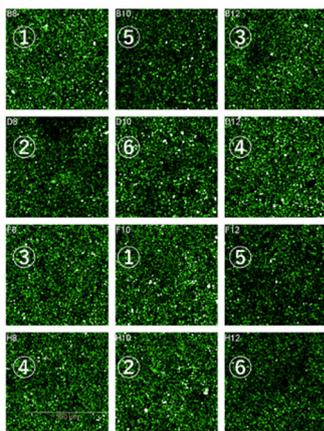


図 III-2. hiPSCs に対する siRNA 導入試薬の検討と *TP53* 遺伝子ノックダウンと *TP53* タンパク質発現量変化の確認

① 未処理、② MagBeads (Funakoshi)、③ Deremfect (Funakoshi)、④ MagBeads+Dreamfect、⑤ RNAiMax、⑥ MagBeads+RNAiMax を用いて、p53 に対する siRNA (silencer select, Ambion) を導入。TP53 の発現量を蛍光免疫染色 (anti-TP53 : ab-6、anti-mouse IgG-Alexa488) 画像 (各 2 well)。遺伝子発現抑制が認められた siRNA 導入試薬のみの結果を示した。

次に、hiPSC-*TP53*^{del/+} に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA カスタムライブラリーを導入した。24 時間後に、2 Gy/2.5 min (急照射)、または、2 Gy/days (持続照射) で、細胞にガンマ線を照射し、合計 5 日間培養した後、TP53 を蛍光免疫染色し全自動共焦点蛍光レーザー顕微鏡撮影装置で蛍光画像を取得し、画像解析を行った (図 III-3)。

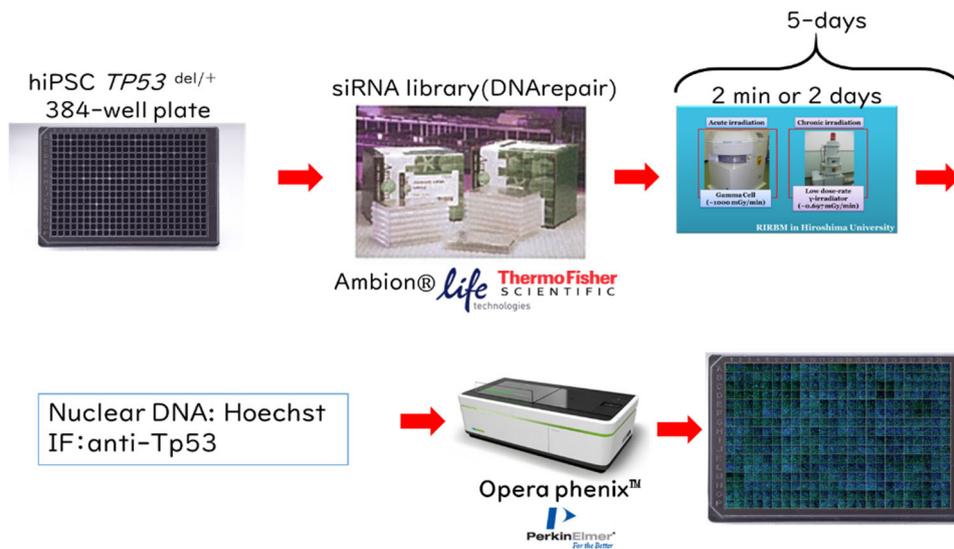


図 III-3. 放射線誘発 LOH 関連因子の siRNA スクリーニングの概略図

hiPSC-TP53^{del/+} を 384-well plate に播種し、翌日に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA ライブラリーを導入した。翌日に急照射 (2 Gy/2.5 min) または持続照射 (2 Gy/2days) し、照射期間を含めてそれぞれ 5 日間培養を行い、固定後、Hoechst33342 で核染色 (青)、TP53 タンパク質抗体 (ab-6 : mouse-monoclonal 抗体、FL393 : rabbit-polyclonal 抗体) と、蛍光色素で標識された 2 種類の二次抗体 (anti-mouse-IgG-Alexa488 抗体 : 緑色、anti-rabbit-IgG-Alexa555 抗体 : 橙色) で免疫蛍光染色し、全自動蛍光顕微鏡画像撮影装置で撮影し、それぞれの蛍光値を解析した。

siRNA ライブラリーを導入後に、ガンマ線未照射、急照射、持続照射の *hiPSC-TP53^{del/+}* について、各 well (各 siRNA) の細胞数と TP53 の発現量を比較した (図 III-4)。それぞれの核について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットとしたグラフを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のみのデータを抽出して、それぞれの DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を TP53 非発現細胞 (LOH 細胞) として抽出した。

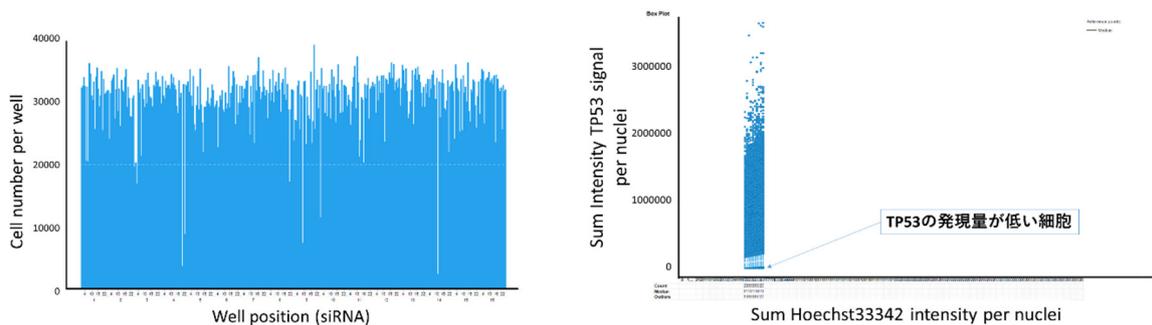


図 III-4. siRNA の導入による細胞数変化と照射による TP53 の発現量低下

【図左】図 III-3 の操作後の各 well (各 siRNA) を横軸に、それぞれの細胞数を縦軸にプロットしたグラフ例 (未照射)。【図右】全て細胞について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のデータ例。DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を矢印で示した。

スクリーニングによって、急照射と持続照射にそれぞれにおいてのみ TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子とその機能を、結果を表 1 に示した。これらの遺伝子が無い場合には、TP53 の発現量が低下した細胞がそれぞれのガンマ線照射によって低下したことから、LOH が生じた可能性も考えられる。

表 1：照射によって TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子と機能

急照射	持続照射
<p>WDR48 : DNA 損傷応答に関わる USP1 結合因子 (DNA 複製にも関わる)</p> <p>CDC6 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>C15orf42 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>CKS2 : 細胞周期進行に必要な CDK 結合因子</p> <p>ERCC6 : 転写共役修復に必要な因子</p>	<p>EXO1 : DNA 損傷修復に関わる 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性と RNase 活性を持つ因子</p> <p>DNA2 : DNA 複製と DNS 損傷修復に関わるヘリカーゼ/ヌクレアーゼ</p> <p>KPNA2 : タンパク質の核内移行に必要な因子 V(D)J リコンビネーションに関わる可能性</p> <p>WDR77 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性化因子</p> <p>CARM1 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ</p>

IV. 考察

本分担研究課題では、主任研究者（笹谷）による *min/+* ヘテロマウスを用いた放射線誘発性小腸腫瘍の発がん実験の結果を踏まえて、異なる線量率での放射線照射によって誘発されるゲノム DNA の LOH に注目して実験を行った。まず、LOH に影響を与える因子を siRNA ライブラリーを用いることでスクリーニングすることが可能な実験モデルを確立した。実験には、がんの標的細胞である組織幹細胞のモデルとしてヒト由来の iPS 細胞を用いることとして、siRNA ライブラリーは DNA 損傷修復に対する細胞応答性と DNA 損傷修復に関わる遺伝子のカスタムライブラリーを用いた。TP53 遺伝子の片アレルが欠損した hiPSC-TP53^{del/+}と抗 TP53 抗体を用いて、急照射と持続照射のそれぞれで生じる LOH に関わる因子を siRNA ライブラリーによってスクリーニングした。その結果、表 1 に示したように、急照射では特に DNA 複製や細胞周期進行に関わる因子が候補因子として同定された。一方、持続照射では、DNA 損傷修復に関わるヌクレアーゼが 2 種類、及び、ヒストンのメチル化に関わる因子が 2 種類、候補因子として同定された。再現性を含めて確認実験および検証実験を行う必要があるが、それぞれの照射条件で、異なる同一経路の遺伝子群が候補因子として同定されたことは、興味深い。急照射については、iPS 細胞の複製機構が放射線誘発 LOH に影響を与える可能性、持続照射については、DNA 損傷修復機構とクロマチン構造の変化が LOH に影響を与える可能性が示唆された。また、未照射時に TP53 の発現量低下細胞の出現頻度増加する因子にもヒストンのメチル化に関わる因子がいくつか見出されていることから、

更に検証は必要であるものの特にヒストン修飾によるクロマチン構造変化が LOH に影響している可能性があることも考えられる。

V. 結論

これまでの様々な研究から、異なる線量率で放射線を持続照射した細胞では、細胞の種類や由来組織、状態などに依存して、損傷修復機構や細胞応答などが異なることが明らかとなっている。このことは、ヒトを構成する様々な細胞が持つ極めて多様な放射線応答性は、線量率が異なる放射線被曝の健康影響にも強く影響を与えている可能性を意味する。本研究課題の目的である DDREF の = 2 の妥当性を検討するためには、放射線被曝による一つ一つの生物学的影響への線量率効果の有無とその寄与率、そして、それらに関与する分子機構を明らかにすることが重要である。放射線被曝によって増加するゲノム DNA の変異は、直接、間接に関わらず、放射線発がんを含む様々な健康影響に寄与していることから、その変異の分子機構について線量率の影響の詳細を明らかにすることは重要であると考えられる。

これまでの我々のヒト由来の初代培養細胞などを用いた研究結果から、細胞の持続照射に対する放射線応答性は、急照射によるものとは異なる応答性が異なる分子機構で制御されていることが明らかとなっている。本研究課題の結果からも、幹細胞における LOH 変異と言った重要な生物学的影響の出現頻度が、異なる種類の遺伝子や分子機構の違いによって、線量率に依存して変化する可能性が示唆された。細胞や組織、個体間での特定の DNA 損傷修復遺伝子の機能の差は、高線量・高線量率被曝に対する放射線感受性だけでなく、低線量・低線量率被曝のみに対する健康影響に影響を与える可能性があることが明らかとなったものと考えられる。こうした結果は、将来的に、DDREF は個人差を考慮して決定する必要があることを意味するものである。今後、更に、線量率効果に関わる因子や経路などが同定され、低線量・低線量率放射線被曝による発がん機構の実態が明らかとなることで、人類にとってより有益性の高い DDREF を決定することができるものと期待する。

VI. この研究に関する現在までの研究状況、業績

論文発表

該当なし

VII. 引用文献

- 1) Cao L, Kawai H*, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F. A novel ATM/TP53/p21-mediated checkpoint only activated by chronic γ -irradiation. PLoS One 9(8):e104279, 2014.
- 2) Miyazawa T, Sato H, Hatakeyama K, Kitagawa T, Kominami R. Allelic losses in mouse skin tumors induced by gamma-irradiation of p53 heterozygotes. Jpn J Cancer Res. 93(9):994-9, 2002.

3) Aizawa S, Tanaka K, Mori M, Tsuji S, Yoshida K. Direct detection of p53 $-/-$ thymocyte appearing at an early stage of radiation-induced thymic lymphomagenesis in p53 $+/-$ heterozygous B10 mice. *Int J Radiat Biol.* 83(4):259-67, 2007.

用語説明

ヘテロ接合体：遺伝子において、染色体の一方のみに変異があり、異なった対立遺伝子を持つもの。

LOH (loss of heterozygosity/ヘテロ接合性の消失)：ヘテロ接合体における正常遺伝子座の欠失のこと。片方の遺伝子座に変異がある場合、残りの正常なアレルに変異が誘発されやすいことが知られており、放射線被曝によっても生じる。がん抑制遺伝子の不活性化にも寄与し、発がんメカニズムの1つでもある。

siRNA：21-23塩基対からなる二本鎖 RNA 断片であり、small interfering RNA と呼ばれる。細胞内に導入すると相補的な塩基配列を持つ mRNA を分解あるいは翻訳抑制することができ、特定の遺伝子の発現を抑制することができる。

siRNA ライブラリー：パスウェイの解析や創薬ターゲット分子の探索など、網羅的な遺伝子スクリーニングに用いられる。個別の遺伝子に対する siRNA が多数マルチウェルに分注されたものや、選択培養した後に同定できるように設計され全ての遺伝子に対する siRNA (shRNA) が混合されたものなどがあるが、本研究では前者を用いた。

DDREF：線量・線量率効果係数 (dose and dose rate effectiveness factor; DDREF)。国際放射線防護委員会 (ICRP) によって、2 が用いられている。低線量率被曝の単位線量当たりの放射線によるリスクが高線量率被曝の値の 2 分の 1 であることを示す。

トランスフェクション：動物細胞にプラスミドや siRNA などの核酸を導入する操作のこと。

TP53 遺伝子：転写因子 p53 の遺伝情報をコードする。遺伝子産物 TP53 は、細胞周期や DNA 修復、アポトーシスなどに関わる遺伝子を活性化することにより発がんを抑制する。ヒトにおいて最も重要ながん遺伝子の一つであり、半数のがんで変異や欠失が検出される。

点変異：1塩基が別のヌクレオチド塩基に置換されて生じる変異。

Screening for molecular factors that have determining role for the dose-rate effect

Hidehiko Kawai

Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University,

Key word: Radiation-induced carcinogenesis, Chronic irradiation, Cellular senescence, siRNA screening

Abstract

Low dose and low dose-rate radiation-induced health effects are still unclear, and the underlying biological mechanisms need to be better understood. In order to address this issue, we have established at the Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, an experimental set-up where a Cs-137 source radiation facility can be operated at a wide range of dose rates (0.001~1.4 mGy/min for cell cultures). In our previous work, we have utilized this facility to conduct studies on the effects of chronic irradiation on various types of cultured cells, such as primary cells, tumor cell lines and iPS cells. Consequently, we have been able to single out several factors involved in cellular radiation responses and cell fate decisions triggered by low dose-rate gamma radiation.

In this study, in order to explore the potential relationship between radiation-induced carcinogenesis and radiation dose-rates, we have planned to conduct siRNA screening, which we expect would allow us to identify factors distinctively associated with gene mutations induced by different dose-rates of gamma-irradiation. In fact, we could identify several candidate genes that may be involved in the loss of heterozygosity induced by either acute or chronic radiation exposure. This study is expected to make a significant contribution to understanding the mechanisms of radiation-induced carcinogenesis and biological effects of low dose and low dose-rate radiation exposure.