

分子生物科学部

概要

遺伝学部および放射線生物学／分子疫学部を統合し昨年発足した分子生物科学部は、厚生労働省による正式認可後初めての年を迎える。同研究部は、(1)遺伝的影響調査、および(2)発がん機序調査に関わる基礎研究プログラムを実施することになる。

遺伝的影響調査では、被爆者の家族(母、父、子)に観察された遺伝的突然変異の頻度および性質について、超可変ミニサテライトおよびマイクロサテライト遺伝子座、およびゲノム当たり約 1,000–2,500 個の遺伝子座における突然変異のスクリーニングにより調査してきた。これまでのいずれの調査においても統計的に有意な親の放射線被曝による遺伝的影響は示唆されなかった。最近、ゲノム全体における比較的大きな欠失型や増幅型の突然変異の検出のため、100 万個を超えるプローブを用いた高密度マイクロアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)法を導入した。この方法を用いてまずモデル動物の子どもにおける放射線の継世代影響を推定し、現在は原爆被爆者の子どもについて調べている。また、突然変異スペクトル全体を検出することのできる次世代シーケンシング技術を用いた全ゲノム配列決定に基づく遺伝的調査も開始している。また、生殖細胞突然変異の定量的測定用に緑色蛍光タンパク質(GFP)マウスモデルも開発中である。

発がん機序の調査は、放射線被曝とがん発生との間の機構的関係の解明を目標とする。この目標のために、寿命調査における甲状腺がん、結直腸がん、肺がんの発生に係る初期分子事象について解析している。また生体内・試験管内実験により、これらの放射線関連がんを観察された遺伝子変化が発がんに関わる可能性についても評価を進めている。また、乳がん、甲状腺がん、皮膚がんについて遺伝的因子を調べている。さらに、染色体異常を有する胎仔幹細胞は負の選択を受けるという仮説を検証するため、甲状腺や造血系など種々の臓器および器官系の細胞について胎生期に放射線照射したマウスにおける細胞遺伝学的損傷の評価を進めている。

また、原爆被爆者の放射線被曝と疾患とを関連付けるバイオマーカーの同定と評価にも取り組んでいる。原爆被爆者における放射線誘発による免疫機能の減弱および慢性疾患リスクの増加に関連すると思われる免疫学的評価のためのバイオマーカーについて現在検討を進めている。さらに、免疫機能における個人間の差異に関係する遺伝的要因、および放射線関連疾患感受性に及ぼす遺伝的要因の影響を調べている。放射線被曝後の疾患リスク増加をもたらすエピジェネティックな機序について調べるため、放射線による修復不能な DNA 損傷、DNA メチル化や転写に関する解析を実施中である。蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)法を用いて安定型染色体異常(転座)頻度を測定したところ、物理線量に対して個々の転座頻度が広範囲に点在していることが示されたが、FISH 法は、もうひとつの独立した生物学的線量推定法である歯のエナメル質を用いる電子スピン共鳴(ESR)法に対してはバラつきが幾らか少ないことが示された。このような生物学的線量推定データにより、DS02 線量推定方式で計算された個人の被曝線量における線量の確率的不確実性および系統的な不確実性に関する情報が得られ、がんリスク推定に際して重要な情報になると期待している。

分子生物科学部

2015 年度業績

遺伝学部および放射線生物学／分子疫学部を統合し昨年発足した分子生物科学部は、厚生労働省による正式認可後初めての年を迎える。同研究部は、(1)遺伝的影響調査、および(2)発がん機序調査に関わる基礎研究プログラムを実施することになる。

放射線と遺伝的影響

- マウスを用いた実験研究を完了し、親由来の突然変異について特定した。その結果、放射線の継世代影響に対する効果の平均はマウスの 7 遺伝子座テストでみられた効果の平均から予想されるよりもはるかに低いことが示唆された。
- 原爆被爆者の子どもおよびその親から入手した DNA 試料 667 検体について、140 万個のプローブを用いた高密度マイクロアレイによる CGH 実験を完了した。その結果、新規の欠失 6 個および重複 6 個を同定し、突然変異を起こした染色体個々のハプロタイピングにより欠失 6 個および重複 4 個は親に由来するものであることを確定した。現在、残りの重複型突然変異についてハプロタイピングを実施中である。
- 放射線を照射されたヒト細胞クローンの全ゲノム配列決定(WGS)調査についてまとめた。全ゲノム解析が実際に可能であることを示す論文が所内審査に向けほぼ整った。
- 文科省科研費を獲得したため、放射線照射したオスの精原細胞由来の F1 マウスの全ゲノム配列決定に着手した。オスの生殖細胞への放射線照射前後に生まれたオスのマウス 6 匹各々の全ゲノム配列を決定した。既に配列の未加工データを得ている。
- 生体内で放射線に誘発された体細胞および生殖細胞の突然変異を検出する HPRT-dup-GFP マウスの作製およびその特徴に関する最初の論文を発表した(Noda, *PLoS One* 2015; 10(8): e0136041)。

放射線量推定

- 原爆被爆者における蛍光 in-situ ハイブリダイゼーション(FISH)解析を完了した。物理線量と比較した場合に個人別転座頻度が広く分散しており、これは以前のギムザ染色法を用いた調査でも見られた。
- 広島市の成人健康調査(AHS)対象者 228 名から提供された大臼歯 298 件および長崎市の被爆者 25 名から提供された大臼歯 26 件を ESR 法により測定した。同一の試料提供者について得られた DS02 線量および細胞遺伝学的な推定線量と当該データを比較するため統計解析を実施している。
- ある種の修復不能な二本鎖切断(DSB)は核膜に結合して、核膜の機能不全を生じることが判明した。概要報告を発表した(Noda, *Gene Environ*, 2015; 37(13):1-12)。
- トランスクリプトームおよびプロテオーム解析を用いて、過去に放射線照射を受けた細胞の特徴となる可能性がある新規の遺伝子・タンパク質を特定しているところである。初期発生に関与する転写因子タンパク質もその候補のひとつと考えられる。

放射線とがん

- 放射線関連甲状腺乳頭がん発生における *EML4-ALK* 融合遺伝子の生物学的役割を明らかにするため、*EML4-ALK* 融合遺伝子の cDNA およびウシのサイログロブリン遺伝子プロモーターを用いて pTet-On システム (CLONTECH) によりコンストラクトを作製した構築を行った。コンディショナル・トランスジェニックマウスの作成は民間企業であるユニテック株式会社に外注し、創始マウス 5 株を作成した。甲状腺に対して高い特異性を示し高レベルの *EML4-ALK* 発現を示した F1 マウス 1 株を用いて甲状腺がんを生成するため、ドキシサイクリン処理実験を開始した。また、ドキシサイクリン処理したトランスジェニックマウスの甲状腺組織のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した切片を用いて組織学的変化についても解析中である。
- 種々の胎生期に放射線照射し、その結果に関する論文原稿を完成した。これらのデータにより、妊娠初期での放射線照射と妊娠後期での放射線照射を比較した場合、成体マウスの甲状腺細胞における転座頻度が異なることが示された。また、胎生期の造血幹細胞における染色体異常誘発に関する放射線感受性について予備実験に着手した。
- 1,170 例の非黒色皮膚がん試料および対照として 680 例の染色体スライド標本 (過去の F1 細胞遺伝学調査に用いられた顕微鏡スライドのリンパ球) において *XPA* 創始者突然変異の保因者のスクリーニングを完了した。現在、統計解析を行い、*XPA* ヘテロ接合体保因者では非黒色皮膚がんリスクが増加するか否かについて調べている。
- p53 遺伝子座における放射線誘発による前進突然変異を *in vivo* で検出するため、p53-GFP トランスジェニックマウス・ノックインマウスを作製した。放射線発がん実験を計画している。

放射線と免疫学的影響

- 細胞老化の指標である DNA テロメアの短縮も、がんおよびその他の慢性疾患リスクをもたらす可能性がある。放射線被曝が白血球のテロメア長にもたらす長期的な有害影響は線量および被曝時年齢の両方に依存する。尿酸代謝、炎症性サイトカインおよび T 細胞数などのバイオマーカーの変化も観察した。
- 広島原爆被爆者 231 名について、循環性造血幹・前駆細胞の種々のサブタイプにおける年齢および放射線関連の変化を評価した。放射線被曝後長い年月が経過し、高齢化が進み、生存している被爆者の造血幹・前駆細胞の細胞数と機能は総じて正常レベルに回復していることが示唆された (Kyoizumi, *Radiat Res* 2016; 185(1):69-76)。
- コブルストーン領域形成細胞アッセイにより評価したところ、循環性造血幹・前駆細胞のサブセットの一部について、放射線量とガンマ H2AX フォーカス出現頻度の間に負の相互作用効果が観察され、循環性造血幹・前駆細胞の自己複製能における DNA 損傷の影響は原爆放射線被曝による修飾を受ける可能性が示唆された (Kajimura, *Mutat Res-Gen Tox En*, 2016; 802:59-65)。
- 原爆被爆者における B 細胞および NK 細胞の比率に対する放射線量と代謝指標 (ヘモグロビン A1c [HbA1c] および脂肪肝発生) の相互作用効果が観察され、放射線被曝がリンパ球サブセットにおよぼす長期的影響は代謝状態による修飾を受けるかもしれないという仮説を裏付けた。
- 原爆被爆者において、T 細胞テロメアの短縮と HbA1c 値の上昇または脂肪肝発生の間には関連性があり、T 細胞テロメア長に対する放射線量と C 反応性タンパク (CRP) または HDL コレステロール値の相互作用効果が見られた。T 細胞テロメアの維持に及ぼされる長期的な放射線影響は個人

の代謝状態による修飾を受けることが示唆された。

- 免疫蛍光染色技術の改善により、最大で 60 年前に作成された胸腺パラフィン包埋組織試料からノイズ信号を低く抑えたハイコントラストな高品質の画像が得られた。放影研で長期間保存された胸腺の剖検試料について胸腺機能に及ぼす放射線影響を調べる際に、免疫蛍光法を用いた効率的な解析が可能となった(Kajimura, J Histochem Cytochem 2016; 64(2): 112-24)。
- 参照群(非被曝の *ATM-111 A/A* または *ATM-111 G/A* の保有者)と比較すると、乳がんの相対リスクは最も高い線量群の *ATM-111 G/G* 保有者において最も高かった。原爆被爆者における放射線関連乳がん発生リスクの個人差に *ATM* 遺伝子型が関与する可能性が示唆された。
- 遠位および近位結直腸がん(CRC)の相対リスクは、それぞれ *CD14-911 A/A* 遺伝子型、および *IL18-137 G/G* 遺伝子型をもつ高線量被爆群において高かった。表現型-遺伝子型解析では、*CD14-911 A/A* 遺伝子型の膜結合型および可溶性 CD14 タンパク質レベルが他のふたつの遺伝子型に比べ有意に高く、*IL18-137 G/G* 遺伝子型の血漿中 IL-18 レベルは他のふたつの遺伝子型より低い傾向を示した。これらの結果は原爆被爆者の遠位結直腸がんの発生には CD14 を介した炎症性応答、近位結腸がんの発生には IL18 を介した炎症性応答が関与する可能性を示唆する(Hu, Human Genome Variation, 2015; 2(15035) 2015; 1-9)。

放射線とがん以外の疾患

- コペンハーゲン大学と共同で、非 AHS ボランティアのナイーブ CD4T 細胞の DNA 試料を用いて Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 法に基づく全ゲノム DNA メチル化アッセイによる検討を行った。遺伝子数百個、特に *IRAK1* 遺伝子を含む炎症性 IL-1 シグナル経路において、若い健常者ボランティアと高齢の健常者ボランティアの間で DNA メチル化に差異が見られた。
- 易脳卒中発症性高血圧自然発症 (SHRSP) ラットにおける脳卒中様症状は 0.25 Gy 照射の場合でさえ対照群に比べ有意に早く生じ、放射線量の増加に伴い寿命の有意な短縮が示された。心筋の線維症および炎症などの病理学的所見、収縮期血圧の上昇および体重増加の遅れは放射線量と有意に関連していた。