

部の概要

分子生物科学部は、(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している。また、原爆被爆者のがん以外の疾患に関する生物学的機序を調べる調査も実施している。

遺伝的影響調査では、被爆者の家族(母、父、子)に観察された突然変異の頻度および性質について調べている。被爆者の家族に関する以前の調査では、親の放射線被曝による有意な遺伝的影響は示されず、親の被曝影響に関する最近の我々の動物を用いた研究は、比較的大きな欠失型や増幅型の突然変異率が1ゲノムあたり $1 \times 10^{-2}/\text{Gy}$ であることを示した。この突然変異誘発率は、マウスのマーカー遺伝子の研究から予測された率を大幅に下回る。親の放射線被曝による影響がマウスよりもヒトの方が低い理由は分かっていない。この問題に正面から取り組むために、被爆者の家族について全ての突然変異スペクトルを検出することが可能な次世代シーケンシング(NGS)技術を用いた全ゲノム配列決定に基づく遺伝的調査を計画しているところである。減数分裂や受精および胚発生の過程における変異生殖細胞の運命を調べるために精原幹細胞突然変異をNGSにより測定するためのマウスモデルも構築している。

発がん機序の調査は、放射線被曝とがん発生との機序的関係の解明を目標とする。寿命調査において甲状腺がん組織標本を使い以前実施された研究は、若年で高線量に被曝した人たちの甲状腺乳頭がんにおいて、RET や ALK の遺伝子再配列が高頻度で発生していることを示した。これらの再配列遺伝子が発がんに関わる可能性について、生体内・試験管内実験により評価を進めている。肝臓の炎症および線維化と放射線に関連した肝がんとの関わりの可能性という観点から、放射線被曝に起因する慢性的な炎症が肝臓の代謝異常や線維化を介して肝がんを発生させているかもしれないという仮説を立てた。この仮説を検証するために、肝臓の脂肪合成および線維化と放射線に誘発された肝がんとの関わりを調べる動物モデルを構築中である。また、乳がんや甲状腺がんの遺伝的要因を調べている。胎内被爆者のリンパ球染色体転座は線量に依存して増加しないことが以前の調査で示されている。胎仔中の染色体異常を有する幹細胞は負の選択を受けるという仮説を検証するために、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、原爆被爆者の疾患と放射線被曝とを結びつけるバイオマーカーを同定し評価する努力をしている。現在評価しているバイオマーカーは、原爆被爆者のがんを含む慢性疾患リスクの増加に関連すると思われる免疫エンドポイントと肥満指標である。AHS では、造血と免疫細胞のホメオスタシスが放射線被曝により乱されると心血管疾患および肝臓の線維化やがんなどの炎症性疾患の発生につながる可能性があるという仮説を検証することを目的とした縦断調査をデザインしているところである。また、放射線に関連した疾患の生物学的機序の理解を深めるため、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクス、プロテオミクスなど、複数の分子(オミック)エンドポイントの統合解析を実施するために外部専門家との共同研究も計画中である。血中T細胞の染色体異常頻度および歯エナメル質の電子スピン共鳴(ESR)シグナルの強度に関する生物学的線量推定データは、DS02R1 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対する情報を提供し、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。

2017 年度業績

放射線と遺伝影響

- 放射線によりマウスの精原細胞に生じた欠失型突然変異の特徴は、サイズが 200 kb 以上と大きく、再結合部に相動的な塩基配列がほとんどないことである(小平、Radiat Res 2017; 187:722-31)。目的:この研究の目的は、仔マウスに遺伝したマウス精原細胞の放射線に誘発された欠失の構造と配列の特性を明らかにすることである。方法:精原細胞段階で放射線照射した雄マウスから生まれた仔と非照射の対照マウスから得られた 33 個の新規コピー数変異(27 個の欠失と 6 個の重複)の再結合した部位における配列を解析した。結果:欠失を以下の 3 つのグループに大きく分類することが可能である:グループ 1-欠失の大きさは 1 kb から 1 Mb であり、再結合部に長い相動的な塩基配列(200-6,000 bp)を共有(例:非正統的組み換え);グループ 2-欠失の長さは 200 kb 未満で、0-7 bp の相動的な塩基配列(マイクロ相同介在による)のみを共有;グループ 3-欠失の大きさは 200 kb よりも長く 0-2 kb の相動的塩基配列(典型的な NHEJ)を共有。グループ 3 は主に照射ゲノムに発生した欠失であった。結論:これらのデータは、再結合部位周辺に配列相同性がほとんど見られない 200 kb を超える大規模欠失は、マウスにおける放射線に誘発された欠失の特徴である可能性を示唆した。
- 放射線照射した精原細胞または成熟卵母細胞に由来する F1 マウスにおいて放射線に誘発された小規模のインデル(挿入欠失変異)と複合突然変異が同定された。目的:精原細胞や成熟卵母細胞に対する放射線による遺伝影響を評価するために、マウスを用いた WGS 検査を実施した。方法:4 Gy のガンマ線に照射する前と後の親に生まれた F1 マウスの WGS データを比較した。結果:放射線照射した精原細胞や卵母細胞に由来する F1 マウスでは、小規模インデルの頻度が増加した。さらに、これらのマウスでは 10 bp 以内に多重突然変異が誘発されているようである。そのような複合突然変異の頻度は、成熟卵母細胞の照射後および精原細胞の照射後に生まれたマウスにおいて増加した。結論:放射線は、精原細胞および成熟卵母細胞に遺伝性の小規模インデルを誘発する。また、成熟卵母細胞および精原細胞のガンマ線照射後に複合突然変異も誘発される。これらの結果は、原爆被爆者の家族において WGS 解析を計画する上で有益な情報を提供する。
- 精原幹細胞の培養・遺伝子操作・遺伝子導入のマウス実験を行う予備研究を生殖細胞突然変異に対する放射線影響を調べるために開始した。

放射線量推定

- 原爆被爆者が受けた原爆ガンマ線量の細胞遺伝学的手法による再構成:広い光子エネルギー分布と造血幹細胞/前駆細胞の寄与をどう考慮すべきか(中村、Radiat Res 2017; 187:412-8) 目的:原爆放射線の遡及的線量推定に係る不確実性に関する問題を細胞遺伝学的手法により克服するために、光子のエネルギー依存性が少ないと考えられている電子スピニング共鳴法(ESR)測定値を使った。方法:広島市の 107 人の原爆被爆者について ESR と細胞遺伝に基づく推定線量を得た。細胞遺伝学的線量は、標準 ^{60}Co ガンマ線を使用して推定した。

結果:両者のカーマ線量は互いによく一致しており、原爆のガンマ線量を推定する上でおそらく修正の必要がないことを示した。結論:以上の結果は、被爆者の物理的に推定された線量と細胞遺伝学的線量を直接比較できることを示した。その後、長崎の ESR データも要約された。

- 人に対する原爆放射線の影響を調べるために、AHS の原爆被爆者を対象に細胞遺伝学的線量測定研究を実施した。1 番、2 番および 4 番染色体が関わる転座を検出するために、2 色 FISH 法を用いて合計 1,869 人(広島が 1,179 人、長崎が 690 人)を調べた。以下が予備解析結果である:(1)広島・長崎共に明解な非線形の線量反応が見られた;(2)過去のギムザ染色法による研究時に見られたように両市において物理線量に対して個人間で転座頻度の広いばらつきが見られた;(3)ギムザ染色法を用いた過去の研究で見られた都市間差は、FISH 法による現在の研究ではかなり小さくなった;(4)長崎の工場内作業者の線量反応は、日本家屋内で被曝した人たちよりも有意に低かった;(5)今回都市間差が狭くなったことは、ギムザ染色法で過去に見られた都市間差は、広島研究所と長崎研究所の異常検出率が異なることが主たる理由であったことを示唆する。
- 放射線に誘発された修復不能な DNA の二重鎖切断(DSB):放射線の後影響における役割と生物学的線量測定への応用の可能性(野田, J. Radiat Res, 2017; 1-7) 目的:本研究は、過去に放射線に被曝した細胞や組織に残る修復不能な持続性 DSB の構造および生物学的役割について明らかにすることである。方法:放射線照射した正常なヒト 2 倍体線維芽細胞(NHDF)をモデル系として用いて修復不能 DSB を検出した。修復可能(修復容易)DSB とは異なる損傷の持続性および分子特異性を顕微鏡解析および生化学的解析により究明した。また、過去に放射線照射されたマウスの組織における損傷の検出についても調べた。結果:修復不能な DSB の両末端は核内で離れて位置することから、1 つの DSB は明確に区別できる 1 対の切断端(torn-off 構造)を産生することが分かった。損傷に関連すると考えられる新たなタンパク質を特定した。結論:このようなタンパク質をベースとする因子は、修復不能 DSB の検出や過去に受けた被曝線量推定の新たなバイオマーカーとして有益かもしれない。

放射線とがん

- 原爆被爆者の肺腺がんに対する ALK 再配列の関与を調べるために、LSS の保存肺がん組織を解析した。ALK再配列は、24 例の外科標本(被曝、非被曝それぞれ 12 例)の内、2 例(被曝、非被曝それぞれ 1 例)において見られたが、50 例の腺がんの剖検症例では見られなかった。ALK 再配列を有する症例数が少ないため、この結果から被曝との関連についての結論は得られていない。
- 原爆被爆者におけるがんリスク増加の機序に関する洞察を深めるため、放射線が PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント経路を介して腸腫瘍の進行を促進しているのではないかという仮説を検証する目的でマウス結腸がんモデル(CT26.CL25)を用いる予備研究を実施した。しかし、がん細胞を移植する 3 週間前に 3.5 Gy の X 線照射をしたマウスでは免疫チェックポイント分子を介した腫瘍増殖に対する免疫抑制作用は見られなかった。従って、このマウス結腸

がんモデルにおいて放射線の免疫抑制作用について調べることは難しいと結論した。

- DNA 修復に関与する遺伝子の突然変異ヘテロ接合体ががんを発症するリスクが高いかどうかを理解するために、XPA 創始者変異の保因者における皮膚がんリスクをモデル系として選択した。スクリーニングされた 1,698 人の対照者の内、14 人が XPA ヘテロ接合体(0.8%)であったが、日光を浴びた部位に基底細胞癌を発症した皮膚がん患者では、頻度は 2.5%(11/440)であった(p 値=0.01)。扁平上皮癌の患者ではリスクは増加しなかった。論文を投稿した。
- 放影研で最初に作成された遺伝子組み換えマウスである HPRT-dup-GFP マウスは MMRRC(遺伝子改変マウス保管機関)に送られ、MMRRC43688, B6J.Cg-Hprt^{tm1}1^{Reif}として認定された。放射線に誘発された腫瘍が p53 にドミナントネガティブ突然変異を持つ蛍光する遺伝子組み換えマウス(p53-GFP ノックインマウス)を作成した。このマウスに腫瘍を発症させるために、産業医科大学の天津山教授との共同研究で典型的な化学発がん物質である 3-MC(3-メチルコラントレン)を用いた予備研究を開始した。

放射線と免疫学的影響

- 若年期に放射線被曝を受けた高齢日本人コホートにおけるインフルエンザワクチン応答(林、投稿済み) 目的:本調査は、早期放射線被曝が加齢による免疫能の低下を悪化させ、季節性インフルエンザの予防接種に対する獲得防御免疫反応を高齢者が備える力を低下させているという仮説を検証することを目的とする。方法:2度のインフルエンザ流行期にわたり、292人のAHS対象者の血清抗体価をインフルエンザワクチン接種前と3週間後に測定しインフルエンザワクチンに対する免疫反応を調べた。結果:1 Gy以上に被曝した対象者では、低い線量の被曝者に比べ2つの抗原について抗体陽転率が高く、個人のワクチン応答に放射線被曝の悪影響はないことが示された。結論:高齢被曝者の季節性インフルエンザワクチンに対する反応は、早期放射線被曝によって抑制されない。インフルエンザワクチン接種前に測定された血漿中の炎症関連タンパク質の値とリンパ球サブセット・プロファイルはインフルエンザワクチンに対する反応を予測できる。
- ヒト循環型造血前駆細胞における Notch シグナル伝達によるグループ 3 に属する自然リンパ球および通常型ナチュラルキラー細胞系統の運命決定(京泉、J Immunol 2017;199:2777-2793) 目的:ヒト自然リンパ球(ILC)分化における Notch シグナル伝達の役割は明確ではない。本調査において、末梢血を循環するヒト造血前駆細胞(HPC)の亜集団の分化における Notch の機能を解析した。方法:HPC 亜集団の運命は、ハイスループットフローサイトメトリーを使ったクローン検定と限界希釈分析によって決定された。結果:IL-7と共に Notch シグナル伝達は、ヒト HPC が NKp44+ILC3 へ分化するのを誘導したが、逆に IL-15 に依存する NK 産生を抑制した。結論:Notch シグナル伝達は、ヒト HPC の異なる段階において NKp44+ILC3 と cNK 系列への分岐を決定するための対照的な二つの役割を果たす。
- 日本の高齢原爆被曝者の末梢循環樹状細胞集団における放射線と加齢に関係した変化(梶

村、Radiat Res 2018; 89:84-94) 目的:T細胞の活性化と分化に係る主要な調整役である樹状細胞(DC)に対する放射線の後影響を調べ、原爆放射線被曝が DC の早期老化を誘発し、その結果としてDCの数と機能を低下させるという仮説を検証した。方法:229人の原爆被曝者について、通常型 DC(cDC)と形質細胞様樹状細胞(pDC)の年齢と放射線量に関連する数のおよび機能的な変化を解析した。結果:以下が観察された。1)女性の pDC 数の線量に依存した減少;2)年齢とサイトカイン産生レベルの中央値が異なる通常型 DC の遺伝子発現プロファイルの二つの異なる型の階層的クラスター。結論:原爆放射線被曝後 65 年を経て、循環 DC の数と機能がほとんどの場合、正常レベル(同世代の非被曝群における通常レベル)に戻ったことを示している。

- 末梢血 T 細胞受容体のディープシーケンシングはヒト T 細胞レパートリーの 20 年にわたる加齢に関係する変化を明らかにした。(吉田、Exp Gerontol. 2017; 96:29-37) 目的:ヒト T 細胞受容体(TCR)レパートリーは加齢に伴い衰えるが、この衰えについて個別に縦断的に十分に調べられたことはない。方法:開始時年齢が 23 歳から 50 歳であった(全体として 23 歳から 65 歳)6 人の健康な成人(男女それぞれ 3 人)から約 10 年間隔で 3 度にわたり収集され凍結保存された末梢血 CD4 および CD8 T 細胞集団における、約 20 年間にわたる TCR β レパートリーをディープシーケンシングにより縦断的に解析した。結果:TCR レパートリーの長期的変化のディープシーケンシングにより以下が分かった。1)年齢に依存して CD8 TCR レパートリーの多様性が減少($P = 0.0008$)し、クローン集団の頻度が増加した($P = 0.0015$);2)CD4 は TCR レパートリーと多様性を保持した;3)20 年にわたり T 細胞クローンが持続し、さらに拡大さへしていた。結論:従って、本研究のデザインにより、年齢が異なる対象者それぞれについて 20 年にわたる T 細胞クローンの縦断的動態を明らかにすることができた。
- ヒトの胸腺の形状と機能に及ぼす電離放射線と加齢の後影響(伊藤、Radiat Res. 2017;187:589-598) 目的:胸腺機能に対する放射線の長期影響を調べるために、原爆被曝者の胸腺組織標本の詳細な組織学的評価を実施した。方法:165 人の原爆被曝者の胸腺の剖検組織標本について、胸腺の活動や構造の詳細な形態学的解析を実施した。結果:非被曝者(< 5 mGy)に比べて低線量(5 - 200 mGy)と中-高線量(>200 mGy)に被曝した人たちのほうが、胸腺退縮の顕著な特徴(胸腺上皮細胞と未熟なリンパ球の部分の減少)が増大した。結論:低線量であっても放射線被曝は、胸腺細胞増殖の低下を伴う胸腺の加齢を促進する。

放射線とがん以外の疾患

- 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)に 0.1 Gy の放射線を照射した場合、脳卒中の症状が発生する時期は対照群よりも有意に早まるが、0.05 Gy 照射の場合は早まらない。これは、0.05 Gy と 0.1 Gy の間に放射線の線量効果の閾値があることを示唆する。SHRSP ラットに蓄積線量が 0.5 Gy または 1 Gy(線量率はそれぞれ 1 日当たり 0.05 Gy または 0.1 Gy)に達するまで照射を継続した予備調査は、有意な放射線影響を示さなかった。さらに、メタボローム解析は、線量と共にタウリンが減少し、不飽和脂肪酸が増加することを示した。このような

データは、循環器疾患に対する放射線の影響について考え得る機序を推測する際に有益である。