

放射線発がん関連新規Np95遺伝子は放射線抵抗性を賦与する

以前から放射線誘発がんの機構を、マウスを使用して研究してきたが、当時から、何とかして放射線発がん特異的蛋白を同定すべく、Freund Adjuvant(注1)とともに、放射線誘発T細胞リンパ腫粗抽出物でラットを頻回免疫し、細胞融合法により種々の抗原に反応するモノクローナル抗体(注2)を得ていた。その中の1つのクローンとして、S期特異的に発現する核蛋白(注3)に反応するモノクローナル抗体(Th-10a)を得た。この抗体が認識する核蛋白質は、95kDaの分子量を持つので、NP95と名付けられた。この核蛋白は、放射線発がん高発系B10系マウスでは前がん細胞の発生する時期に高発現するが、低発系STS/A系マウスでは同じ条件で照射しても、正常胸腺細胞における発現と同程度であった。また放射線誘発リンパ腫では細胞周期によらず異常発現することが示された。

図1は、m5S細胞を二重染色して解析したもので、左から、S期、anaphase(注4)、aphidicolin処理G1期(注5)の細胞で、Cell Structure and Function(Vol.25, 149-159, 2000)誌の表紙の図を、出版社の許可を得て掲載したものである。2段目の緑色がNP95を示し、3段目の赤色がPCNA(注6)の存在を示す。この図からも明らかのように、S期において核内でNP95とPCNAが、ドット状に一致して分布していることが示される。PCNAは、ポリメラーゼ δ 及び他の多数の因子とでDNA複製複合体を形成し、DNA複製に重要な働きをしており、また放射線照射により誘導されたp21, サイクリン等と結合して、DNA複製を停止させ、修復の効率を高めることに寄与しているものと考えられる。

この核蛋白質NP95の遺伝子をクローニングするために、 λ gt 11発現ベクターに挿入されたPre T細胞リンパ腫株KKF細胞のcDNAライブラリーを使用して、モノクローナル抗体Th-10aと反応するプラークをつりあげた。陽性プラークのDNAをpGEMプラスミドベクターに挿入して、DNA塩基配列を決定した結果、782アミノ酸のORF(注7)を含む3530塩基のcDNAが分離された。予想されるアミノ酸配列から解析すると、種々のリン酸化部位やDNA結合モチーフ及びLXCXE及びIXCXEというRb結合モチーフ等が見いだされ、ホモロジー検索の結果、新規遺伝子であることが明らかになった(Fujimori et al. Mammalian Genome, 9, 1032-1035, 1998)。そこで特別研究「放射線生体防御要因の機能解析:遺伝子改変細胞・動物等による新しいアプローチ」において、この遺伝子の機能をさらに解析するために、Np95の遺伝子のターゲティングベクターを作成し、ES細胞に導入した。さらにネオマイシンの濃度を上げることによって、もう一方の対立遺伝子も欠損している細胞株ES.Np95^{-/-}を作成することが出来た。これらのNp95遺伝子欠損ES.Np95^{-/-}細胞について、放射線、紫外線(UVC)及びアルキル化剤MNNGに対する応答性を調べたところ、放射線に対して感受性であること、さらに紫外線(UVC)やMNNGに対して

も感受性であることが明らかになった(金成、他、第22回日本分子生物学会、福岡、平成11年12月)。

さらにヒトへの放射線影響におけるこの遺伝子の関与を探るため、マウスNp95遺伝子のヒトホモログを分離・同定した。マウスNP95のアミノ酸配列のデータに基づいて、GenBankのデータベースの検索を行った結果、マウスNP95の2つの部分アミノ酸配列と類似性を持つヒトESTクローン(注8)が、いくつか存在することが明らかになった。そこで、それらのcDNA断片の塩基配列を基にして、primerを合成し、ヒトtestis cDNAライブラリーを使用して、cDNA断片の増幅を行った。5'領域及び3'領域の増幅は、ライブラリーのベクター領域のprimerを合成し、Two-step PCR法により行った。最終的に793アミノ酸をコードする1つの大きなORF(注7)を含む3295塩基のcDNAを分離することが出来、マウスNP95に対して、アミノ酸で74%の相同性があることが示された。またマウスNp95遺伝子は、第17番目染色体D-E1.1領域に存在するが、ヒトの場合も、マウスと相同性のある領域にマップされた。以上の結果から、NP95は、細胞周期及びDNA修復の過程を調節する何らかの転写因子の可能性が示唆される。

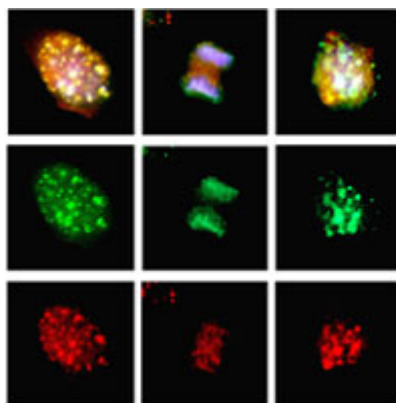


図1:m5S細胞を固定後、FITC(緑)標識した抗NP95抗体、Texas-Red(赤)標識した抗PCNA抗体で二重染色した。その後DAPI(青)で、DNAを染色した。左から、S期、anaphase、aphidicolin処理G1期の細胞を示す。

(付記)この研究は、生物影響研究部、第4研究室のメンバーにより行われた(文責:生物影響研究部第4研究室、武藤正弘)。

<注意1> Freund's Adjuvant: 体液性および細胞性免疫を増強させる目的で抗原とともに投与する物質で、動物に投与された抗原は、局所より徐々に放出され、免疫細胞を持続的に刺激し効果的に免疫応答を誘導する。

<注意2> モノクローナル抗体: 単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体。抗体産生細胞と骨髄腫細胞株との細胞融合により、均一な抗原特異性を有し、高価の抗体が、半永久的に生産可能である。

<注意3> S期特異的に発現する核蛋白: 細胞は増殖に際し、そのゲノムDNAを複製、娘細胞に均等に分配したのち、分裂するというサイクルを繰り返す。DNAが複製する時期をS期と言い、その時期に限定して発現してくる核内のタンパク質。

<注意4>anaphase:有糸分裂や減数第二分裂において姉妹染色分体が、減数第一分裂においては相同染色体が分離する時期

<注意5>aphidicolin処理G1期:aphidicolinは、ポリメラーゼ α 、 δ 及び ϵ の特異的阻害剤で、細胞周期のG1期で細胞が停止する。

<注意6>PCNA:Proliferating cell nuclear antigen, 約260アミノ酸残基からなる増殖細胞核抗原

<注意7>ORF:open reading frame、終止コドンに中断されずにアミノ酸のコドンが続く遺伝暗号の読みとり枠。

<注意8>EST: expression sequence tagの略。細胞や組織からRNAを抽出し、cDNAを合成して、ベクターに組み込み、各cDNA クローンの一部の塩基配列を かたっぱしから解析して、登録したデータベース。

サイエンスキャンプ 2000を終えて

今年も高校生を対象とした科学技術庁、科学技術振興事業団主催のサイエンスキャンプが8月22日から3泊4日の日程で開催された。放医研への希望者53名の中から、生徒達の作文をもとに夢いっぱい16名の参加者を決定した。

この選考作業は決して易しいものではない。むしろ熱意溢れる生徒すべてに参加の機会を与えられないことへの無念さが残る。16名の将来の希望は科学を目指すもの、医療関係を目指すものなどいろいろであるが、大学受験の準備等で忙しい夏休みをこのサイエンスキャンプのために時間を割き、自費で日本各地から千葉へと集まって来た生徒達である。今年は遺伝子解析とMRI(磁気共鳴断層装置)診断に関する説明文とともに放射線のはなしと題する本を事前に送付した。また、松永昭画伯作の放医研の絵をプリントしたTシャツを会場で配付した。今回のキャンプでは放射線の医学利用を主テーマに掲げ、昨年よりも医療関係に多くの時間を割り当て、MRIによる頭部撮影、治療用固定器具の製作、内視鏡による診断を体験すると共に、放射線計測器を自ら作成したり、自分の頭髪の遺伝子解析を手がけたり、飲料水中の微量元素の測定や活性酸素の測定を行うなど放医研で実施されている研究、医療を幅広く経験できるように企画した。講師陣の努力により、生徒達は新しい分野に触れ、興味、知識欲を掻き立てられ、積極的に実習に取り組んでいた。対応した講師陣は40名を数え、しかも、限られた時間内で高度な分析手法を見せるため長時間の下準備を行うなど多大の努力が払われた。課題毎に参加者の興味に大小は存在したものの、全体として充分満足できる構成内容になったと感じている。特に生徒達が主体的に取り組める実習は好評であった。最終日のディスカッションでは生徒達から感激と喜びと感謝の言葉が聞かれ、放医研への就職方法を質問する生徒まで現れ、今回のキャンプを通して大きなものを掴んでくれたようである。どの顔も初日のオリエンテーションが初めての出会いであったものの、半日も経つと和気藹々と解け合い、3日後には親友へと変わっていった。若い一時期、志を同じくする者が共に過ごし、意見を交換し合った経験は放医研で学んだことより大きいのかもしれない。別れ際には同窓会を結成する話まで持ち上がっていた。今回の放医研での体験を通して、高校生達が将来いろいろな分野において大きく羽ばたいてくれればと願うものである。最後にご協力いただいた方々に誌面を借りてお礼を申し上げたい。



(普及啓発部会委員長 藤元 憲三)

放医研シンポジウム

International Symposium on Medical Imaging at NIRS, 2000 – A New Horizon for Molecular Imaging –



- 日時： 11月16日(木) 8:30～9:30(登録)
9:30～18:30
- 11月17日(金) 9:00～16:45
- 11月18日(土) 9:00～11:45
- 場所： 放医研重粒子治療推進棟大会議室ほか
- 参加費： 無料
- 問い合わせ先：
放医研企画室統計係
〒263-8555 千葉市稲毛区穴川4-9-1
TEL 043-251-2111(内線233)
FAX 043-256-9616
E-mail:sympo-32@nirs.go.jp

– 主なプログラム –

〔1日目〕

- 9:45～10:45 **Session 1** : Panel discussion
1(Japanese)
GMP in PET/SPECT facility
- 11:00～12:00 **Session 2** : Panel discussion
2(Japanese)
Optimum production system for clinical PET
- 13:15～14:30 **Session 3** : Panel discussion
3(Japanese)
Pre-clinical evaluation and clinical trial for

〔2日目〕

- 9:00～9:45 **Session 5** : Comprehensive special lecture (English)
Molecular Imaging: Past, Present and Future
- 9:45～10:55 **Session 6** : Invited lectures 2(English)
Instrumentation and data processing (1)
PET
- 11:10～12:20 **Session 7** : Invited lectures 3 (English)
Instrumentation

short-lived
radiopharmaceuticals

and data processing
(2) NMR/CT

- 14:45～16:45 **Session 4** : Invited lectures 1(English)
Radiopharmaceuticals and related topics

- 13:30～15:00 **Session 8** : Invited lectures 4 (English)
Neurosciences by PET

- 16:45～18:30 見学(画像診断棟)

- 15:15～16:45 **Session 9** : Invited lectures 5 (English)
Neurosciences by NMR

- 18:30～20:00 懇親会

〔3日目〕

- 9:00～10:30 **Session 10** :
Symposium
(English)
New cancer imaging

- 10:45～11:45 見学(HIMAC棟)

日本放射線影響学会奨励賞を受賞

去る8月31日開かれた日本放射線影響学会第43回大会で、放医研障害基盤研究部の王冰さんが、「日本放射線影響学会奨励賞を受賞」し、その授賞式および受賞講演会が行われた。王冰さんの講演の要旨は次のとおり。

『放射線誘発発生異常とアポトーシスに関する研究』



器官形成期の放射線照射により、高率に奇形が生じ、これと細胞死との関係が40年ほど前から論じられているが、その機構の詳細は未だ不明であった。私たちはこの問題について、マウス指肢形成系(手と足の指の形成系)を用い、器官形成後期の照射による放射線誘発奇形とアポトーシスの関係について調べた。マウスの妊娠日齢11および12日は指肢形態形成期であり、私はこの時期の照射について調べた。その結果、マウス放射線誘発指肢奇形は線量に依存して、指肢欠損の重篤度とその発生率が高くなることがわかった。

器官形成期の放射線誘発奇形とアポトーシスの関係についての実験には、C57BL系マウスを用い、妊娠12日目に1から4Gyの線量を一回照射し、照射後6時間目に胎児を取り出し、HE染色でアポトーシスの発現を調べた。また、出生直前に胎児を取り出し、生存胎児数、死亡胎児数、生存胎児の指肢奇形を調べた。

正常の発生では、指の間の細胞が生理的なアポトーシスにより除去され、指ができる。ところが、放射線照射では指となる部分の細胞すなわち、指原基細胞が特異的にアポトーシスをおこし、指が欠損する奇形の原因となることが私たちの研究により初めて明らかにした。

放射線誘発アポトーシスは多くの場合、p53遺伝子が関与することが知られている。私たちは、p53野生型、p53ヘテロおよびノックアウトのC57BL系マウス胎児について実験を行った。指原基細胞のアポトーシス頻度の結果については、p53野生型のマウスに比べて、同じ線量で照射した場合、p53ヘテロでは、1/2に低下し、p53ノックアウトマウスではさらに著しく低下した。この結果から、マウス指原基の放射線誘発アポトーシスは、p53依存性であることが明らかとなり、さらに奇形発生率のみならずその重篤度はp53依存性アポトーシス発生と相関することも突きとめた。

以上の結果から、マウス指芽形成期照射による指肢の奇形は、指原基細胞のp53依存性アポトーシスによると結論づけられる。

次に、この系を用いて発生段階での放射線適応応答の存在を初めて見出した実験を報告する。

放射線誘発適応応答現象は多数の細胞株や動物を用いた実験で認められている。しかし、これまで発生段階での放射線適応応答の存在は知られていなかった。

方法は、前述の実験とほぼ同様で、放射線奇形を起こす線量3Gy照射の前に、低線量前照射を一日前に行った。妊娠9～11日目に1～50cGyの線量の前照射を行い、翌日3Gyを照射した。あとは前と同じ方法を用いた。

前照射の時期に関しては、いろいろ検討したが、p53野生型、妊娠11日目に行った場合にのみ、適応応答が見られた。5cGyおよび30cGy前照射し、妊娠12日目で3Gy照射した時にのみ、前照射なしの場合に比べて、有意な生存胎仔数の増加と奇形発生率の低下が認められた。このきわめて限られた条件で、発生過程での放射線適応応答現象が生じることを初めて見出すことができた。

マウス胎児指肢奇形発生の観察から、p53野生型では奇形の頻度が高いばかりではなく、3Gy照射で指3本がほぼ欠損する重度の奇形が認められたが、前日の5cGyあるいは30cGy前照射により、奇形の頻度が低下するとともに、奇形の重篤度の軽減も認められた。ところが、p53ヘテロのマウスでは、奇形の重篤度、頻度が低く、野生型と同じ条件では適応応答は認められなかった。

なお、組織病理切片の観察結果から、この5cGyあるいは30cGy前照射によって、指原基細胞のアポトーシスが低下することが分かり、この放射線誘発適応応答現象にも、放射線誘発アポトーシスが関与することも明らかになった。

以上、発生過程での放射線適応応答現象が認められる条件を初めて明らかにし、この放射線適応応答現象の誘導にp53が決定的な役割を果たしていることも明らかにすることができた。

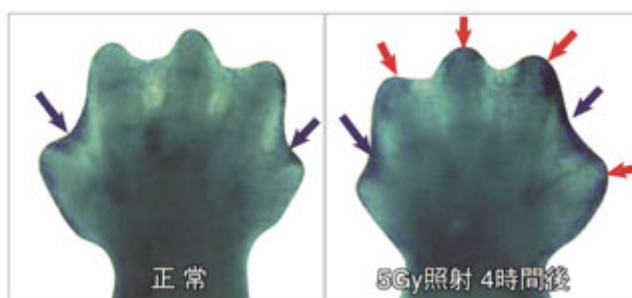


図1 放射線誘発指肢奇形とアポトーシス(アポトーシス部位:青く染まっている) 妊娠12日目、正常(図左)では生理的に指間の細胞のアポトーシスが起こり(青矢印)、指が形成される。一方、5Gy照射すると(図右)、将来指になる細胞(指原基細胞)もアポトーシスを起こし(赤矢印)、奇形の原因となる。

体脂肪について

暑い夏も終わり食欲の秋がやってきました。秋の味覚を満喫しているうちにベルトがきつくなったりしないよう、体重と一緒に体脂肪も測ってみてはいかがでしょうか。健康管理室にも体重、体脂肪測定機があるのでご利用下さい。今回は体脂肪についてお話ししたいと思います。

●体脂肪計の原理は？

BIA法という方法です。これは体の電気抵抗を測る方法で、筋肉は電気を通しますが、脂肪分は電気を通さないことに着目しています。電流の流れやすさから筋肉量がわかり、体重の割に筋肉の少ない人は脂肪の割合が高いと判断するのです。

●一日何回か測ると数字が違うのはなぜ？

体の水分の分布によって値が変動します。これが朝夕の差の原因です。朝よりは夕方体脂肪率が少なくなっていくので就寝前入浴後に計測してください。体脂肪は大きく変動するものではないので、週一回か月一回など決まった期間の測定で経過を見るようにしてください。

●乗って測るタイプと手に持って測るタイプの違いは？

どちらでも大差はありません。

●体脂肪の適正範囲は？

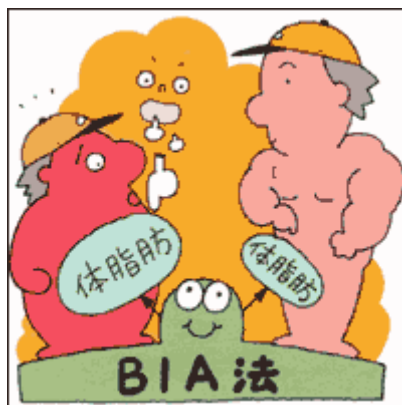
男性は30歳未満14～20%、30歳以上は17～23%。25%以上が肥満です。女性は30歳未満17～24%、30歳以上は20～27%。30%以上が肥満です。

●男性と女性で適正範囲の違いは？

女性は出産という大切な機能があるので体脂肪が男性より多いです。体脂肪を推定する計算式は男性女性それぞれあります。

●脂肪の減らし方は？

栄養バランスのよい食事をとること。三食きちんと食べ、野菜を多めにして全体のカロリーは減らすようにしましょう。運動は20分以上継続すると体脂肪が燃え始めるので、無理のないウォーキングや水泳などの有酸素運動が効果的。週に2～3回位行くと良いです。定期的に体重と体脂肪を測り、ダイエットと運動の効果を確かめましょう。



(健康管理室 海老原 幸子)

お知らせ

国際シンポジウム『東海村ウラン加工工場臨界事故』

－ 千葉県文化会館で開催 －

「東海村ウラン加工工場臨界事故」に関する国際シンポジウム(International Symposium on the Criticality Accident in Tokaimura : medical aspects of radiation emergency)を千葉県文化会館で12月14日(木)から15日(金)の日程で開催します。

昨年の9月30日、茨城県東海村のウラン加工工場で臨界事故が起こり3人の従業員が高線量被ばくを受け、急性放射線障害を発症しました。

本シンポジウムは、緊急被ばく医療関係者を対象とし、今回の臨界事故に専門機関がどのように関わり、高線量被ばく者の被ばく線量の推定や治療を行ってきたかを報告し、国際的な討論の場を提供するために開催するものです。

●連絡先:

〒263-8555 千葉市稲毛区穴川4-9-1

国際シンポジウム 企画運営委員会

辻井博彦(委員長) 電話 043-206-3301(直通)

明石真言(事務局) 電話 043-206-3119(")

広岡 隆(事務局) 電話 043-206-3025(")