

## 低線量率の放射線が細胞に与える影響を調べる手法の開発



森島 信裕  
Morishima Nobuhiro

### 1 はじめに

低線量率放射線の生物影響を定量的に評価することは放射線生物学にとって長年の課題である。本稿では低線量率の放射線が生体に与える影響を調べるために従来と異なるアプローチで筆者らが開発した手法<sup>1,2)</sup>について紹介する。放射線被ばくは日常生活上の問題でもあり、放射線を利用した臨床検査や航空機での移動で多くの人が低線量率放射線に被ばくする。また、原発等の事故によって広範な地域が汚染されれば故郷での生活が維持できるのかという深刻な問題も生じる。低線量率放射線、日常的な言葉で言えば弱い放射線による生体への影響には不明な点が多く、長年の課題となっているのはなぜだろうか。解析を難しくする大きな理由は放射線による物理的ダメージが小さいことだが、それだけではない。非常に強い放射線は細胞へ大きなダメージを与え、組織の損傷や更には個体の死という明確な影響を直ちにもたらす。一方、弱い放射線の影響は急性で現れるとは限らないが、特に長期被ばくは遺伝子損傷、変異による発がんの危険性が懸念される。そのためDNA傷害が注目され、DNAに生じる低レベルの傷害やそれによる遺伝子変異を高感度検出する手法の開発が続けられている<sup>3,4)</sup>。ところが生体を対象とした解析には物理量の測定とは異なる特有の問題がある。一般的にそもそも測定値が1つには定まらず（例外：染色体の本数、細胞内の中心体構造の数等）、更に細胞活動の変化や代謝の進行に伴っ

て値が時間と共に変動しやすい上に個体差によるばらつきも伴う。これに対処するには多数試料の測定が必要となる。しかし、DNA傷害の高感度検出には高価な装置や大きな労力を必要とする場合が多い上にスループット性は概して低い。以上の問題に加え、低線量率放射線による被ばくにおいては、放射線によって二次的に発生する活性酸素種が細胞成分（タンパク質、核酸、脂質）に与えるダメージも無視できない。活性酸素種は様々な病気の発症因子や老化の促進因子であることから、DNA傷害以外のダメージについての解析も重要になる。

### 2 開発した手法に関する原理的な考察

弱い放射線が生物に与える影響を解析するために、多数試料を精密かつ効率よく測定し、生体に関する測定につきものの測定値ばらつきにも対処できる解析を行い、それによって生体（細胞）の健康や異常について推定・判定できる手法を開発する必要があると筆者らは考えた。筆者らのアプローチの基礎となるアイデア、原理を次に述べる。

1. 解析対象は放射線が与える傷害そのものではなく、傷害への対応のために細胞内に備わっているダメージ修復、ストレス応答のシステム及び細胞増殖や細胞老化、細胞死等の細胞運命を制御するシステムがどれくらい作動しているかを解析する。なお、細胞における「ストレス」とは、細胞が正常な状態から外れた状態を指し、有害な物質

の発生と除去のバランスの乱れや細胞小器官の機能障害を招く。

2. これらの修復系，応答系，細胞運命制御を担うのはそれぞれのシステムを構成するタンパク質群である。図1は，生物学，医学分野においてこうしたシステムの説明に使われるフローチャート様の図（異なる種類のタンパク質間のシグナル伝達を示す）である。このタンパク質群の中には，ダメージやストレスの発生やその程度に応じて分子数が増減するものが含まれる。同様に，細胞運命を制御するタンパク質群の中にも運命決定の際に増減するものがある。
3. したがって，タンパク質の増減を精密に測定できれば，細胞がダメージを受けているか，ストレスが蓄積しているかを判定できる可能性がある。また，細胞運命を制御するタンパク質の量に変動があれば，細胞分裂が鈍化したり，老化や死に向かっているかを推定できる可能性がある。
4. タンパク質の量的変動を精密測定するために，プロテインアレイ法（後述）を用いる。これにより，同一条件下で多重に調製された多数の検体を効率よく解析し，更に個々の検体を繰り返し測定することが容易になる。この目的のために，新たに自動アレイ作製装置を開発する。

放射線，有害化合物，熱ショック等

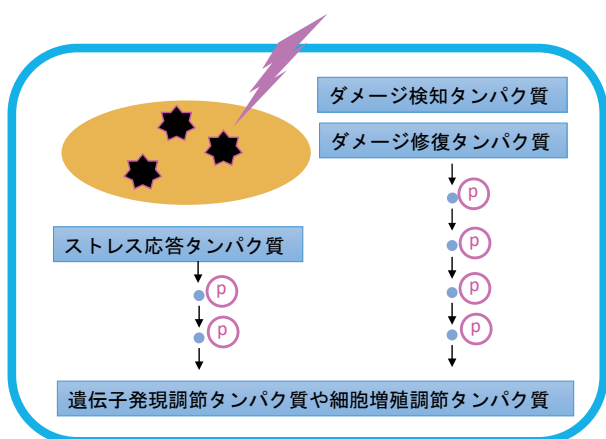


図1 ダメージやストレスに対する細胞内の応答（概念図）

青い四角や丸はタンパク質の種類を表す。細胞内に生じたダメージやストレスに対して特異的な検知，修復，応答タンパク質が対処する。また，シグナル伝達タンパク質によって遺伝子発現調節や細胞増殖調節に関わるタンパク質に異常が伝えられる。図ではシグナル伝達様式の1つ，リン酸化による伝達の様子を“P”で示している

これらのアイデアにはそれぞれ目論みや期待があった<sup>1)</sup>。ここで問題となるのはタンパク質量の変化の程度である。細胞を放射線や薬剤で処理し，細胞が受ける影響の指標となる特定のタンパク質を定量することは生物学，医学研究ではごく一般的な実験である。ただし，この実験条件は特定のタンパク質が例えば2倍，3倍に増えるように設定されている。もし，ある処理条件下でタンパク質量の変化が10%や20%しかなければ誤差の範囲内と判断されたり，有意な変化ではないと結論されることが多い。しかし，比較的弱い放射線に被ばくした細胞内では～倍というような大きな変化は起きるとは限らない。筆者らは精密なタンパク質量と統計学的解析との組合せによる解決を試みた。

### 3 タンパク質量法と自動アレイ作製装置の開発

生体を対象とした測定を精密化するための基本は，同一の実験条件下で生体試料を複数調製して測定に用いること（多重測定），及び個々の試料については測定を繰り返すこと（繰り返し測定）である<sup>5)</sup>。本研究では実験材料として培養細胞を使い，手法の妥当性を検証した。培養細胞から同質な測定試料を多数調製することは実験動物を用いた場合に比べて容易である。いったん手法が確立すれば，将来実験動物やヒト試料の解析を行うことにもつながると考えた。筆者らは，京都大学放射線生物研究センターの低線量・低線量率照射装置を用いて，ヒト由来繊維芽細胞にγ線を50時間照射（3 Gy）し，ダメージ修復やストレス応答の指標になる細胞内タンパク質を中心に，それらの量を照射した細胞と照射しなかった細胞とで比較することにした。用いたγ線の線量率1 mGy/分は，「原子放射線の影響に関する国連科学委員会」<sup>6)</sup>によって定められた中線量率域（0.1～99 mGy/分）の下限近くに相当する。中線量率域の放射線は，長時間の照射によって細胞に微小な影響を及ぼすとされており，その下限近くでは前述のような2倍，3倍のタンパク質量変化は起こりにくく，解析が容易ではないことが既に知られている<sup>7)</sup>。細胞試料に対して変性剤処理と超音波処理を施し，タンパク質量に用いる細胞破砕液（細胞抽出液）を調製した。

次に，タンパク質量法として，生物学分野でドッ

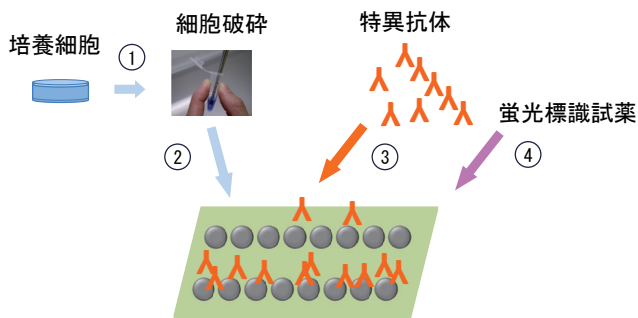


図2 ドットブロット法によるタンパク質の定量

シャーレ中の培養細胞を回収し、変性剤処理と超音波処理を行った後にニトロセルロース膜にドット状に吸着させてブロットを作製する。ブロットに対して特異抗体を加え、スポット内に存在する特定のタンパク質に結合させる。特異抗体に対して更に蛍光性試薬を反応させる

ブロット法と呼ばれる手法を応用することにした。ドットブロットとは細胞抽出液や精製によって純化されたタンパク質溶液をニトロセルロース膜等にドット（点）状にスポットして作られるブロット（染み）や染みのついた膜のことを指す（図2）。タンパク質分子はニトロセルロースに触れると疎水性相互作用等によって物理的に吸着する。このブロットに対して、特定のタンパク質を認識する抗体（特異抗体）を反応させると、ドット内のタンパク質量に応じた量の特異抗体が結合する。いわゆる抗原抗体反応であり、実験室内では1時間～半日程度かけて行われる。この特異抗体に対して蛍光性の試薬（蛍光標識二次抗体）を反応させると結合した特異抗体の多寡に応じた蛍光を発するようになる。蛍光をスキャナーによって検出、定量すると、蛍光強度は間接的にドットに含まれている特定のタンパク質の量を反映する。また、同じドットに含まれている、いわゆる内部標準タンパク質（その量が比較的安定しているハウスキーピングタンパク質と呼ばれるものを使用した）に対しても同時に、特異抗体と蛍光性試薬（蛍光波長は解析対象タンパク質用とは異なる）による反応を行い、二色性の蛍光検出によって解析対象タンパク質の量を規格化した。

筆者らはタンパク質定量を精密化するために多数のドットからなるブロットの作製を目指した。具体的には、多重測定のために被ばく実験1回につき4枚の培養シャーレを用いて同質の細胞試料を4個調製し、それぞれの細胞試料をニトロセルロース膜上に8回スポットして繰り返し測定を行うことを計画した。また、統計学的解析に適したデータを取得するため、被ばく実験は3回繰り返した。したがって、

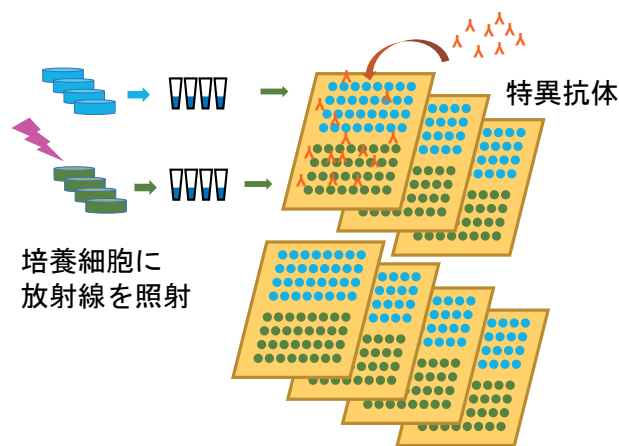


図3 タンパク質精密定量のためのプロテインアレイ

この図では単純化のために照射実験1回分の試料を並べたアレイを示している（実際には3回分の試料すべてを1枚の基板に並べる）。1回の照射実験に4枚の培養シャーレを用いて同質の細胞試料を4個ずつ調製し、それぞれの細胞試料を基板上に8回スポットする。図では非照射細胞試料（青）と照射細胞試料（緑）がそれぞれ32個ずつ並べられている（実際には計3回分の試料、計96スポットが並べられる）。また、図では7枚のアレイがレプリカとして作られている様子を示しており、これらはそれぞれ異なる種類のタンパク質を定量するのに用いることができる。作製されたプロテインアレイに特異抗体を加え、スポット内に存在する特定のタンパク質に結合させて定量を行う

1つの条件下での被ばく試料とその対照となる非照射条件の試料の組合せだけでも2×96個のドットを作る必要がある（図3）。比較的面積の小さな基板や膜に多数のタンパク質試料のスポットを並べて固定させたものはプロテインアレイと呼ばれる（アレイは整列、配列の意）。ドットブロットもアレイも解析対象とするタンパク質の種類の数に応じた枚数が必要になるが、多数のドットからなるアレイを多数枚、実験者がマイクロピペットを使って作製することは容易ではない。筆者らはプロテインアレイ法による解析を比較的低いコストで実現するため、自動アレイ作製装置（アレイヤー）の開発を行った。

図4はアレイヤーの外観を示す。医学、生物学研究室で見られる汎用機器と同程度のサイズ（横幅約75cm）を持つ。アレイヤーの心臓部は、384サンプル用試料プレートの半分に対応するサイズの192ピン・スタンプヘッドであり、その動きは3次元自動制御されている。試料プレートに入れた細胞抽出液はスタンプヘッドのピン先につけられ、基板となる7×8.5cmのニトロセルロース膜の上に塗布される。塗布量は約50nL（ナノリットル）である。アレイヤーの製作費用は250万円以内に収まり、多くの生物学、医学研究室に設置されている汎用機器

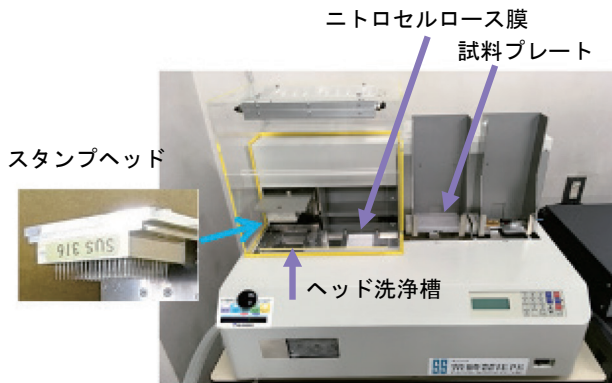


図4 開発したアレイヤーの外観

左側のスポット作製用スタンプヘッドと右側の384ウェル試料プレートがそれぞれ装置の中央付近に移動し、ピンの先をウェル内の試料液に浸すことで50 nL程度の細胞抽出液をピン先に付ける。試料プレートが右側に退いた後、スタンプヘッドがニトロセルロース膜上に移動し、試料液をスポットする

(PCR, 蛍光スキャナー等)のエントリーモデルの価格と同程度であった。

#### 4 タンパク質の増減から分かった生物試料の特徴

筆者らが今回解析対象としたタンパク質は46種類である。この中には、放射線によって傷ついたDNAの修復に関わるタンパク質、放射線によって作られる活性酸素種に対応するタンパク質、細胞ストレス応答タンパク質の他に、ダメージやストレスに影響される細胞増殖制御タンパク質等が含まれている。選択したタンパク質のほとんどは比較的大きなDNAダメージや多量の活性酸素種への対応、あるいは細胞増殖制御等のために増加することが知られているものである(一部のタンパク質は抑制性の働きがあり、逆に減少する)。制御システム(図1)の働き具合を知るために代表的なタンパク質を選抜している。細胞内に存在する数万種類のタンパク質の中から少数種類のタンパク質を解析して放射線の影響を調べる点は筆者らが開発した手法の特徴の1つである。

解析を始める前は、46種類のタンパク質量がそれぞれ照射前と照射後でどのレベルにあるかを3回の繰り返し実験の結果から平均して評価する予定であった。ところが、実際に結果を見ると非照射時のタンパク質量(基底量)が実験ごとに数十%程度異なり、照射による増減の程度とあまり変わらないケースが多いことが判明した。図5には、DNA傷害の修復に関わるリン酸化ATM1タンパク質と活

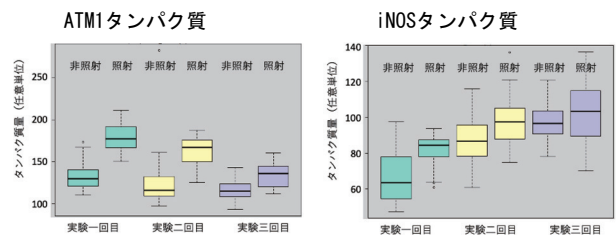


図5 3回の繰り返し実験で見られた細胞内タンパク質量の変化

(左) リン酸化ATM1のタンパク質量。非照射試料中では1回目が一番多い。照射によって毎回増加した。(右) iNOSタンパク質量。非照射試料中では3, 2, 1回目の順に多い。照射によって毎回増加している

性酸素種が生成されると増える一酸化窒素合成酵素(iNOS)の定量結果を示してある。1回の照射実験で得られる32個のデータから箱ひげ図を作成して、タンパク質量の測定値のばらつき具合や中央値を示している。3回の実験間で基底値(非照射)の値は比較的大きくばらついており、性質がそろっているはずの培養細胞内でもタンパク質の規定値が微妙に変動している可能性を示している。解析したタンパク質の多くについて、この変動が被ばくによって起こる変動と同程度であることから、3回分の実験結果を単純平均することは妥当ではないと判断した。ここで注目すべき点は被ばくによって変化するタンパク質量の割合(増減率)は各実験回で再現的だったことである。そこで、この増減率をタンパク質量の変化の指標として使うことにした。

#### 5 統計学的手法を用いたデータ解析結果の解釈

統計学で用いられているメタ解析の手法を使い、3回の実験で得られたタンパク質量の増減率を1つの値に統合した。本研究におけるメタ解析の意味は、実験回ごとのデータセットの質(値のばらつき)を考慮した重み付き計算による統合値の取得である。メタ解析を実施するにあたり、各データセットに対して異質性、同質性の検定を行い、その結果によって異なる計算式を用いている<sup>1)</sup>。メタ解析により得られた代表値を見ると、46種類のタンパク質のうち20種類の増減率は10%以内、18種類が10~30%、残り8種類の中で最大の増加率は約130%、最大の減少率が約50%であった。10%以上の増減を示すタンパク質は、活性酸素種の発生に応答するストレスシグナルタンパク質(図6)と、放射線に

よる DNA 傷害の修復, 細胞増殖の抑制, 細胞老化の前兆現象に関わるタンパク質だった。これらの結果を細胞内シグナル伝達系の知見に照らしてリーズナブルな解釈を試みると, 放射線による直接的損傷または活性酸素種の生成を介した間接的な作用で DNA がダメージを受け, その結果として細胞増殖が鈍化したり, 老化が始まっていることが示唆された。これは, 今回と同じ照射条件下で DNA 傷害や活性酸素種が微増することを示唆する従来のデータを裏付けると共に放射線が細胞の健康状態に与える影響の情報を示す。今回開発した手法は 10% 程度の小さなタンパク質量の変化もしっかり捉えていると筆者らは評価している。

## 6 おわりに

本研究では比較的低い線量率の放射線が細胞に直接的, 間接的に傷害を与えていることと, 細胞増殖が抑制され, 細胞老化の前兆が現れていることを示唆する結果が得られた。この結果は開発した手法の有効性を示している。この手法を用いると, 放射線被ばくによるダメージやストレスの種類と程度だけではなく, 被ばく細胞の行く末に関する定量的なデータが得られる。これは小さな前進ではあるが, 今後弱い放射線の影響がどの程度危険か, 又はそうでないかを定量的に議論する道を開く可能性がある。また, これまでほとんど解明されてこなかった低線量率域放射線 (0.1 mGy/分未満) による長時間照射の影響を調べることも可能だと筆者らは考えている。読者の中で, 低線量率域放射線を用いて被ばく試料を作っておられ, この手法に興味をお持ちになった方はぜひご連絡いただきたい。また, この手法は放射線による傷害のほかに, 低用量薬剤や刺激物によって生じる傷害や慢性的なストレス状態を検出したり, それらが細胞の生理状態, 健康状態に与える影響の解析にも応用可能である。

### 活性酸素種の発生

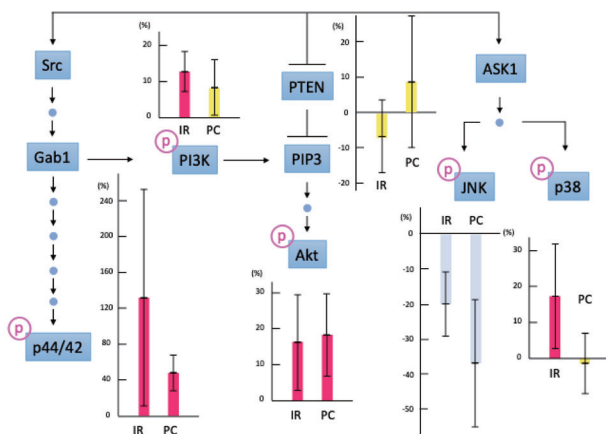


図 6 活性酸素種の発生によって起動した細胞内ストレス応答系

青い四角や丸はタンパク質の種類を表す。活性酸素種が発生すると, それを感知するタンパク質から下方のタンパク質へ, リン酸化 (ピンク色の p で表示) を介したシグナル伝達が始まる。図中の棒グラフは, 放射線照射下 (IR) と活性酸素発生下 (PC: 対照実験) でのタンパク質の増減率 (メタ解析を適用後) を示す。棒グラフの赤は 10% 以上の増加, 青は 10% 以上の減少, 黄は 10% 未満の増減を示す

### 参考文献

- 1) N. Morishima, *et al.*, *Genes Cells*, **28**, 288-306 (2023)
- 2) 理研プレスリリース (2023 年 2 月 17 日)  
[https://www.riken.jp/press/2023/20230217\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2023/20230217_1/index.html)
- 3) G.Khorsandgolchin, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 10315-10323 (2019)
- 4) S.Brunner, *et al.*, *Pathol. Oncol. Res.*, **27**, 1609971 (2021)
- 5) B. Klaus, *EMBO J.*, **34**, 2727-2730 (2015)
- 6) UNSCEAR 1993 report to the general assembly, with scientific annexes. (1993) <https://www.unscear.org/unscear/en/publications/1993.html>
- 7) Q. Meng, *et al.*, *Redox Report*, **26**, 160-169 (2021)

(理化学研究所 開拓研究本部)