

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 放射線感受性遺伝子プロジェクト   |
| Author(s)    | 岩川, 真由美; 今井, 高志; 原田, 良信 他   |
| Citation     | 日本医学放射線学会雑誌. 2002, 62(9), p. 484-489  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/20320">https://hdl.handle.net/11094/20320</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 放射線感受性遺伝子プロジェクト

岩川真由美 今井 高志 原田 良信 伴 貞幸 道川 裕市  
三枝公美子 相良 雅史 辻 厚至 野田 秀平 石川 敦子

放射線医学総合研究所フロンティア研究センター

### RadGenomics Project

Mayumi Iwakawa, Takashi Imai, Yoshinobu Harada,  
Sadayuki Ban, Yu-ichi Michikawa, Kumiko Saegusa,  
Masasi Sagara, Atsushi Tsuji, Shuhei Noda,  
and Atsuko Ishikawa

Human health conditions are largely determined by a complex interplay among genetic susceptibility, environmental factors, and aging. The RadGenomics project, which began in April 2001, promotes analysis of genes in response to irradiation, identification of their allelic variants in the human population, development of an effective procedure for quantitating individual radio-sensitivity, and analysis of the interrelationship between genetic heterogeneity and susceptibility to irradiation. Major groups of genes with which the project will concern itself include DNA repair genes, cell cycle genes, oncogenes, tumor suppressor genes, genes for programmed cell death, genes for signal transduction, and genes for oxidative processes.

The outcome of the RadGenomics project should lead to improved protocols for personalized radiotherapy and reduce the possible side effects of treatment. The project will contribute to future research on the molecular mechanisms of radiation sensitivity in humans and stimulate the development of new high-throughput technology for a broader application of the biological and medical sciences. Identification of functionally important polymorphisms in the radiation response genes may determine individual differences in sensitivity to radiation exposure.

The staff members, who are specialists in a variety of fields including genome science, radiation biology, medical science, molecular biology, and bioinformatics, have come to the RadGenomics project from various universities, companies, and research institutes.

Research Code No.: 400, 600

Key words: Radiosensitivity, SNP, Array

Received June 25, 2002

Frontier Center, National Institute of Radiological Sciences

本論文は第60回日本医学放射線学会学術発表会(2002年4月)の一般教育講演において「放射線感受性遺伝子研究プロジェクト」の演題で発表されたもので、日本医学放射線学会誌編集委員会より執筆依頼した。

別刷請求先

〒263-8555 千葉県稲毛区穴川4-9-1

放射線医学総合研究所フロンティア研究センター

岩川真由美

### はじめに

21世紀、生命科学は新しい時代の、すなわち31億の文字の解読・ゲノム解析ドラフト結果発表という衝撃的なスタートをきった。このヒトゲノム配列の解明がもたらすインパクトを最も大きく受けるのは、臨床の先生方そして、一般国民であろう。21世紀のゲノム解析を足がかりに、生活習慣病など、多遺伝子が関与する複雑な病態の解明、そしてその早期発見・予防医学発展の可能性が生まれた。すなわち、ゲノム解析のような網羅的研究でしかなしえない、そして、コンピュータ技術に代表される21世紀の英知の集積でしかなしえない科学技術革命が勃発した。病態解明は、これまでも、臨床の先生方・基礎研究者たちにより、たゆまず行われてきた。数多くの臨床研究や臨床経験は、各疾患の特徴(表現型)に対する網羅的記載の蓄積である。病理組織型しかり、病期の進行度を示す病期しかり、性別・年齢などによる分類もその有効な分類法の一つであろう。ヒトゲノム配列の解明のもたらす技術革新は、これら臨床現場でのデータ蓄積に対する、遺伝子型の詳細な対応を可能とする。発現形質と遺伝形質の詳細な対応により、多くの疾患の遺伝的背景を明らかにすることが可能となり、現在不明とされている病態の解明が進行する。そして、繰り返すが、その早期発見・予防医学発展が可能となることが予測される。この網羅的な遺伝形質の解析の対象として、DNAの多型解析、特に一塩基多型(SNP, スニップ, スニップス)がある。

2001年、新しい21世紀の幕開けにタイミングを合わせたごとく、放射線医学総合研究所に新しいプロジェクト、放射線感受性遺伝子プロジェクトRadGenomics(ラドジェノミクス)が開始された。RadGenomicsは、放射線感受性を規定するヒト遺伝子群を網羅的に解析し、臨床上の放射線に対する反応(副作用)とゲノム中に存在する塩基配列の違いの相関関係を明らかにすることを目的としている。そしてスニップ解析を中心に多方面からの研究により、個人間で異なる放射線感受性を予測する診断デバイスが開発できると確信し、5年間の時限付きプロジェクトとしてこのRadGenomicsを開始した。本稿の目的は、医学放射線学会会員の皆様に、スニップ解析研究の進め方および、本プロジェクト自体をご理解いた

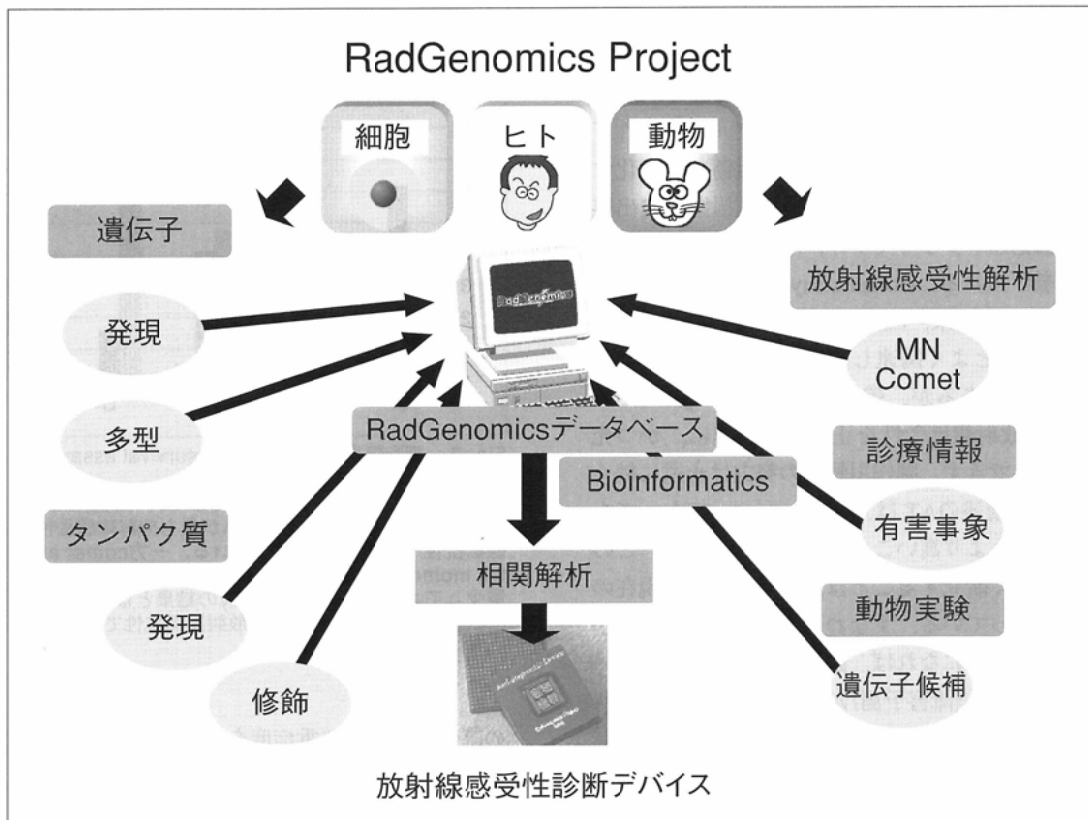


Fig. 1 RadGenomicsプロジェクトの概要  
 種々の実験プロトコルを、多方面から統合解析しつつ放射線感受性診断デバイスの開発を目的にプロジェクトを進行している。

だくことにある (Fig. 1)。

### 障害予測

放射線治療が始まった初期の間、すなわちエネルギーが低いので、皮膚障害がでることが最も重要な関心事であり、皮膚発赤線量 (skin erythema dose) が耐容線量を代表し、表皮の急性期反応が、他の臓器においても、治療線量上限を決定していた。続く時代、臨床の先生方の臨床経験から、この急性期反応が、各臓器の晩期障害とすべてが一致するわけではないことが明らかとなった。と同時に、一部の例外、すなわち ataxia telangiectasia (AT) の患者さんがいることも判明した。これら AT の患者さんは、遺伝的に hypersensitive であると決定づけられていると理解され、放射線高感受性という概念が生まれた。その結果、放射線生物研究領域における放射線感受性予測検査 (predictive assay) 研究の大流行をもたらした。研究の対象となったのはリンパ球や線維芽細胞が主であった<sup>1)</sup>。

これらの研究の目標は、現在に至るまで、各臓器・各個人の放射線耐容量の評価にあり、放射線治療のゴールである最小の放射線障害を伴う、最大の放射線治療効果 “To minimize late effects of effective radiation therapy” を目指している。

① Radiation survival assay : 細胞に対する放射線障害・効果を表す最も一般的な評価は、in vitro においては、照射線

量と生残した細胞比との関係を描く cell-survival curve である。評価対象が survival cell であるためには、細胞が増殖可能あるいは増殖期にあることが条件となる。そして、この増殖能を失うこと (loss of reproductive integrity) が cell death と定義され、生き残り、判別可能な一定の大きさのコロニーを形成できる (clonogenic) 細胞だけが、survivor と定義される。よって、Survival assay は、増殖能の高い癌細胞や骨髄細胞などを対象とした研究において、非常に有益な手段である。しかし、この死の範疇に入るのは、非常に限られた放射線生物学の領域でしかない。増殖能を失ったとしても、細胞は物理的に存在し、蛋白あるいは RNA 合成が可能なのは充分ある。

② SF<sub>2</sub> : 皮膚の生検から得られた線維芽細胞に 2 Gy 照射して得られた生残細胞割合 (the fraction of cells surviving a dose of 2 Gy) は皮膚の晩期障害を非常に有意に予測可能である。しかし、線維芽細胞の培養には長期間を要すること、また、急性期障害は予測できないなどの欠点が指摘されてきた。

③ Micronuclei formation : DNA 損傷・染色体損傷の評価に用いられる核分裂を利用した方法である。核分裂時に娘細胞核に含まれず取り残される染色体断片を小核 (micronuclei) とし、その数を測定する。PHA を用いて芽胞細胞分裂を誘導し、染色体の動原体の部分を取り残されて小核となる。分裂間期で cytochalasin-B により蓄積 (停止) させた二核細胞における出現頻度で算定される。

④Comet assay (コメットアッセイ) : comet assay (single cell gel electrophoresis) は1984年に開発された細胞障害検査で、個々の細胞レベルでDNA損傷を検出する技術として発展した。ゲルに包埋した有核細胞を溶解した後、アルカリ条件下でDNA unwindingと電気泳動を行い、DNA損傷を定量化する。本方法の利点としては、低レベルのDNA損傷の検出感度がよく、必要細胞数が少なくすみ、解析が容易に短時間でできることが挙げられる。Comet assayと照射後のsurvival assayをともに検討した結果、Comet assayを用いた解析は放射線感受性を示すD<sub>10</sub>とよく関連し変化した (Fig. 2)。

以上、種々の検査があるが、残念ながら、どのpredictive assayも、各個人の放射線感受性を正しく、迅速に、かつ十分に予測することはできず、副作用軽減の努力は永遠に続くかに思える。唯一、前述のATは、heterozygotesであっても放射線感受性が健常人より高いことが報告されており、このような遺伝子を数多く研究することは、未来あるいは現在の有望な研究課題となっている。すなわち、放射線感受性にかかわる遺伝子群が明らかになれば、臨床での(実験ではなく)患者さんの放射線感受性(障害予測)が可能になると期待される。こうした背景を受け、RadGenomicsが開始された。放射線感受性遺伝子としての候補遺伝子絞り込みの目的で、RadGenomicsでは、現在のところ、Radiation survival assay, Micronuclei formation assay, Comet assayをヒト細胞・動物実験において施行している。

### 副作用

現在、治療法は大きく変化している。最近のIntensity-Modulated Radiotherapy (IMRT)の発展や、線量分割の工夫、1回線量の変化、化学療法剤との併用など、放射線治療に伴う副作用出現予測に関するパラメーターは複雑な様相を呈してきた。元来、放射線の生物に対する反応は、放射線による非常に短時間に終了する物理学的・化学的反応が、短期から長期のさまざまな期間を経て生物学的反応として発現する。腫瘍の制御は、腫瘍総線量に依存する可能性があっても、その隣接・周囲の正常組織の耐容線量(特に晩期障害に対する耐容線量)が重要な決定基準となる。正常組織の耐容線量は5%の症例に障害が発生する線量として代表されるが、臨床上知見から、個人間の差異があることが知られている。これこそが、RadGenomicsの研究を想起するに至った経緯であり、有害事象の発生した患者さんの協力を得て、そのゲノム研究を行うことが、放射線感受性遺伝子デバイス開発につながると考えている。

現在、副作用の評価法としては、早期有害事象はNational Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI/CTC)共通毒性基準、およびRTOGのAcute Radiation Morbidity Scoring Criteriaを用い、晩期障害については、RTOG/EORTC遅発性放射線反応評価基準および、late effects of normal tissues (LENT); Subjective, Objective, Management and Analytic (SOMA)を用いている。全国の有害事象発症例に対して、こ

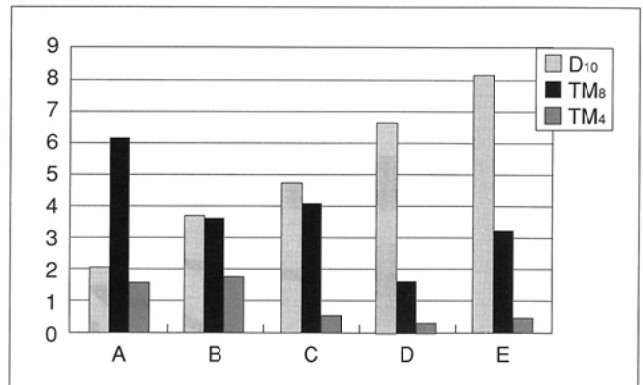


Fig. 2 細胞障害性評価法であるsurvival assayおよびcomet assayの結果

細胞株A, B, C, D, EにおけるD<sub>10</sub>は、細胞株A, B, C, D, Eの順に増加している。すなわち、Aが最も放射線感受性であり、Eが放射線抵抗性であることを示している。一方comet assayの結果であるtail momentは8Gy, 4Gy処理群ともにほぼA, B, C, D, Eの順に減少しており、survival assayの結果とほぼ同様に、A, Bが最も放射線感受性であり、D, Eが放射線抵抗性であることを示している。

の評価に基づいて重症度を判定して、解析へのステップを進めている。

### 実験動物モデル

放射線障害・効果を研究する目的で動物実験モデルは長年用いられている<sup>2)</sup>。clonogenic assayの限界を乗り越えようと、動物を用いたin situ実験が数多くあり、RadGenomicsにおいても、放射線感受性にかかわる遺伝子群の候補探しを目的に、多系統のマウスを用いて、以下のような多種類のassayを行っている。照射後、腸管クリプト細胞の再生能を応用した評価法、骨髓幹細胞脾内髄外造血コロニー評価法、皮膚反応評価、筋肉拘縮評価法、肺機能評価法など、さまざまな評価法を用いて、各系統マウス実験を行っている。すでに、照射後の障害発生形式に系統間差異を見出している。その結果をもとに、congenic mouseを作成してその放射線感受性に関与する遺伝子の絞り込みに役立てている。また、放射線効果に関与する遺伝子をターゲットにknockout mouseを用いる実験も計画しており、放射線感受性遺伝子候補の基礎実験を実行中である。系統により、皮膚反応の出現時期・重症度に差異が認められた。

### microarray

DNAチップはスライドガラス上に多種類の異なったDNAを整列化し固定化して、その上で標識RNA (DNA)のhybridizationを行いプローブ上の蛍光シグナルを検出する技術である。RadGenomicsでは公共DNAデータベースから約14,000種類のヒト遺伝子配列を抽出し、Agilent社に委託、オリゴアレイを作成し、発現量の変化を検討中である (Fig. 3)。発現データはその再現性を確認後、放射線感受性に応じたクラ

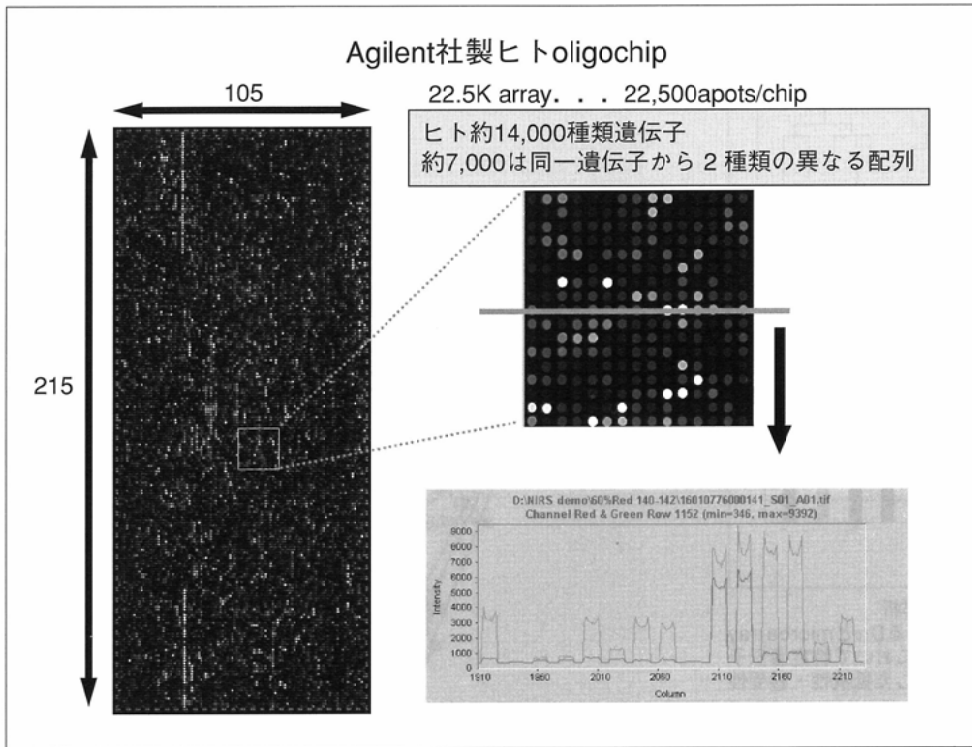


Fig. 3 ヒトoligochipを用いたRNA発現量解析結果  
赤と緑にラベルしたreference試料(例えば赤)とtarget試料(例えば緑, 検討対象試料)において, 発現量の違いが色の混じり方(黄色)として表現される. 整理化した14,000遺伝子(遺伝子断片)それぞれにhybridizationした試料が蛍光として可視化できる. アレイ全体のうち, その小さな一部, さらにその一行における蛍光強度をreference試料とtarget試料それぞれで示した.

スタリングの可能性, 照射後発現量の経時的变化などにつき解析しており, 放射線感受性遺伝子の絞り込みを目的に研究している. これら, 遺伝子発現クラスタリングは遺伝子発現情報の関係性も明らかにする可能性があり, 網羅的遺伝子群の解析に有用である. このようにmicroarrayの登場により, 数百から数万の遺伝子について一度に解析することが可能となってきた. 最近, microarrayを用いた癌の個性診断報告が盛んである. それぞれの癌における遺伝子発現を包括的にとらえ, その発現プロファイルに基づいた解析が行われている. 発現プロファイルの違いからグループ間で新しい亜分類を行い, その亜分類に基づいたグループ間で予後に差を認めたとの報告もある<sup>3)-6)</sup>. 放射線感受性に関連する遺伝子変異・多型性部位の同定に供する遺伝子の選択には, microarray解析により得られた放射線応答遺伝子群を第一候補として用いる予定である. 実験結果の一部であるが, ヒト腫瘍培養細胞の放射線感受性に関するD<sub>10</sub>とmicroarrayの結果をFig. 4に示す. この結果は, ある細胞において特定遺伝子群の発現量を決定することにより, D<sub>10</sub>を指標とした抵抗性・感受性の予測が可能であることを示唆している.

**SNP, スニップ, スニップス**

SNP, スニップ, スニップスとは, single nucleotide polymorphismの略であり, 個人間における一遺伝暗号(一塩基)の違いを意味する. スニップは数百塩基対から1,000塩基対に一つの割合で存在するとされており, 全ゲノム中には300万から1,000万のスニップがあると予想されている. ヒトを識別するための目印, マーカーとして, まず1980年代前半

に登場したのがRFLP (restriction fragment length polymorphism: 制限酵素切断片長多型)であり, サザンブロット法を用いて, 犯罪捜査などで華々しいデビューを飾った. ついで, 1980年代後半にはVNTR (variable number of tandem repeat: 数塩基から数十塩基の繰り返し配列)の時代となり, 1990年代にはマイクロサテライト多型の時代となった. スニップは遺伝子多型マーカーの第4世代であり, 21世紀にふさわしい新技術である. 必要なサンプル量が少量でよいこと, ゲノム内に数百万から1000万以上存在すること, 判定が容易であること, 信号化が可能で, 情報処理が容易であることなどから, 高速で大量のタイピングが実現でき, high-throughputがキーワードである21世紀生物研究の主役となっている<sup>7)</sup>. 遺伝子研究により, 副作用の予測が既に可能となった例もあり, 成人病などのリスク予測も研究の視野に入ってきた. スニップを用いる研究では, 表現型と直接関係するSNP, スニップ, スニップスのみを扱うのが効率的であり, 全ゲノムに対する解析を実行するのは経済面で現実的でない. しかし, 正常組織の放射線感受性にかかわる表現型, すなわち有害事象の多くは, 炎症といった一般的生体反応であり, 明らかな疾患としての固有の表現型を持ちにくい. RadGenomicsのプロジェクト戦略の難しさはそこにある. 可能な限り全国から有害事象を呈した放射線治療後の患者さんの協力を得ることが重要である.

**Bioinformatics**

ゲノムの網羅的解析に欠かせないのは膨大な量のデータであり, そのデータを高度なIT技術を用いて利用・統合するこ

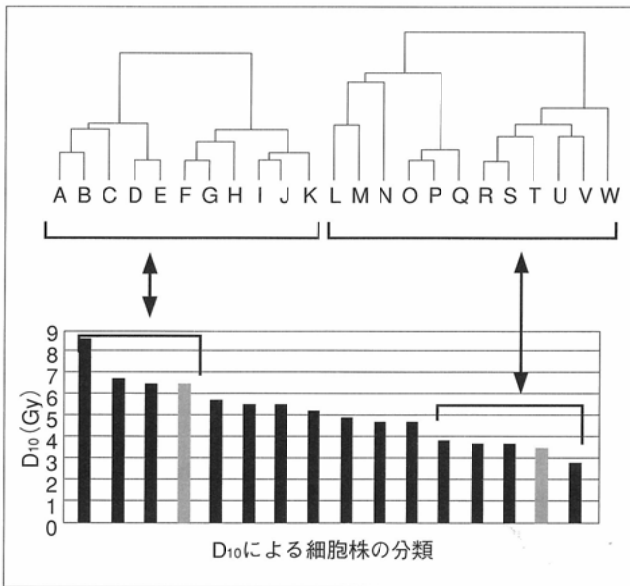


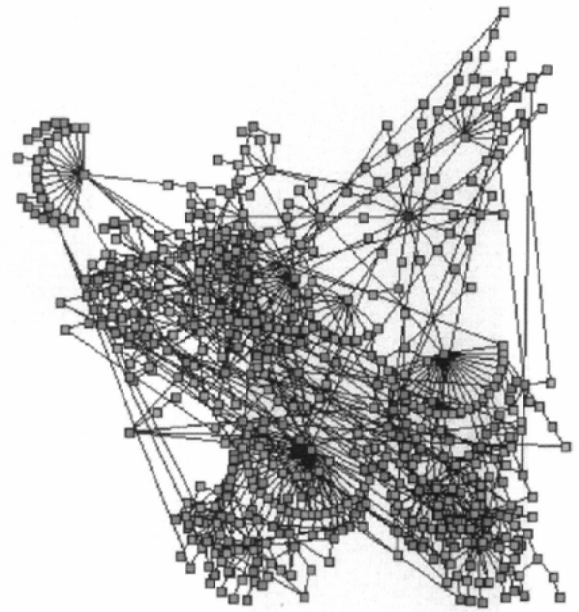
Fig. 4 遺伝子発現パターンによるクラスター解析  
ヒト腫瘍培養細胞AからWの放射線感受性に関する $D_{10}$ とmicroarrayの結果をグラフに示す。この結果は、ある細胞において特定遺伝子群の発現量を決定することにより、 $D_{10}$ を指標とした抵抗性・感受性の予測が可能であることを示唆している。

とが大きな柱である。Bioinformaticsは、生物学・医学・健康に関するデータの取得・蓄積・体系化・データベース化、解析・可視化を含めた展開のためのcomputer toolおよびアプローチの研究、その開発・応用と定義される。ゲノム解析、アミノ酸配列、機能、トランスクリプトームのデータとともに、そのデータ間の関係の世界を理解することにより生命をシステムとして理解することを志向している<sup>8)</sup>。すなわち分子・蛋白質間の相互作用、細胞内局在位置にも着目し、シミュレーションさえも行う(Fig. 5)。現在、GenBank, EMBL, DDBJといったデータベースにバイオ企業であるIncyte, Celera, Genelogicなども加わり、情報のヴァーチャル世界を作り上げている。RadGenomicsでも、これらを最大限に活用し、効率の良い研究を行っている。Ras pathwayを視覚化したFig. 5を参考に示した。RadGenomicsでは固有のSNP, スニップ, スニップス data baseの構築を目指している。

### 最後に

RadGenomicsは、5年の期限付きのプロジェクトであり、既に1年を経過した。平成13年度(RadGenomics初年度)は、臨床との連携においては、まず、ヒト遺伝子研究に必要なインフォームドコンセント、血液・組織等試料採取のプロトコルを確立した。8月より、ボランティア95人に対する血液

## Ras pathway



BIOINFORMATICS 2001

Fig. 5 Ras pathwayのイメージ表示<sup>8)</sup>  
データベースの一つTranpath上のRas pathwayを示した。『Bioinformatics』誌上で紹介されている。一つ一つの□印が遺伝子を示している。遺伝子間距離も想起できる配置となっている。□印を選択することにより、その各遺伝子情報、さらに原著論文にたどることができる。

採取、10月より癌患者に対する試料採取を開始し、これまでに400人以上の協力を得た。研究協力機関として、放射線医学総合研究所重粒子医科学センター、川上診療所、千葉大学医学部第二外科、第一外科、千葉県立がんセンター、市立豊中病院から既に試料提供が行われており、自治医科大学、駿河台日本大学病院、埼玉県医科大学総合医療センター、聖路加国際病院、和歌山県立医科大学、滋賀医科大学、大阪市立総合医療センター、癌研究会附属病院、東京医科歯科大学、北海道大学の倫理委員会に申請中である。

RadGenomicsのようなゲノム研究は、倫理的に注意深く行う必要がある。ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「個人」を対象にした研究に大きく依存し、また、研究の過程で得られた遺伝情報が、その試料提供者やその家族の遺伝的素因を明らかにする可能性があり、その取り扱いによっては、倫理的、法的、社会的問題を招く危険性を持つ。時代の要望を受け、文部省、厚生省、通商産業省および科学技術庁が共同でまず、「基本原則」を策定した。この「基本原則」はヒトゲノム研究における「憲法的文書」として位置付けられ、研究者・医師達が遵守すべき倫理規範であるとともに、試料提供者を含む社会一般が念頭におくべき基本的考え方である。平成12年4月28日には、厚生科学審議会先端医療技術評価部会とりまとめによる「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」が作成され、文部科学省審議会、厚生省厚生科学審議会、通商産業省化学品審議会、科学技術会議生命倫

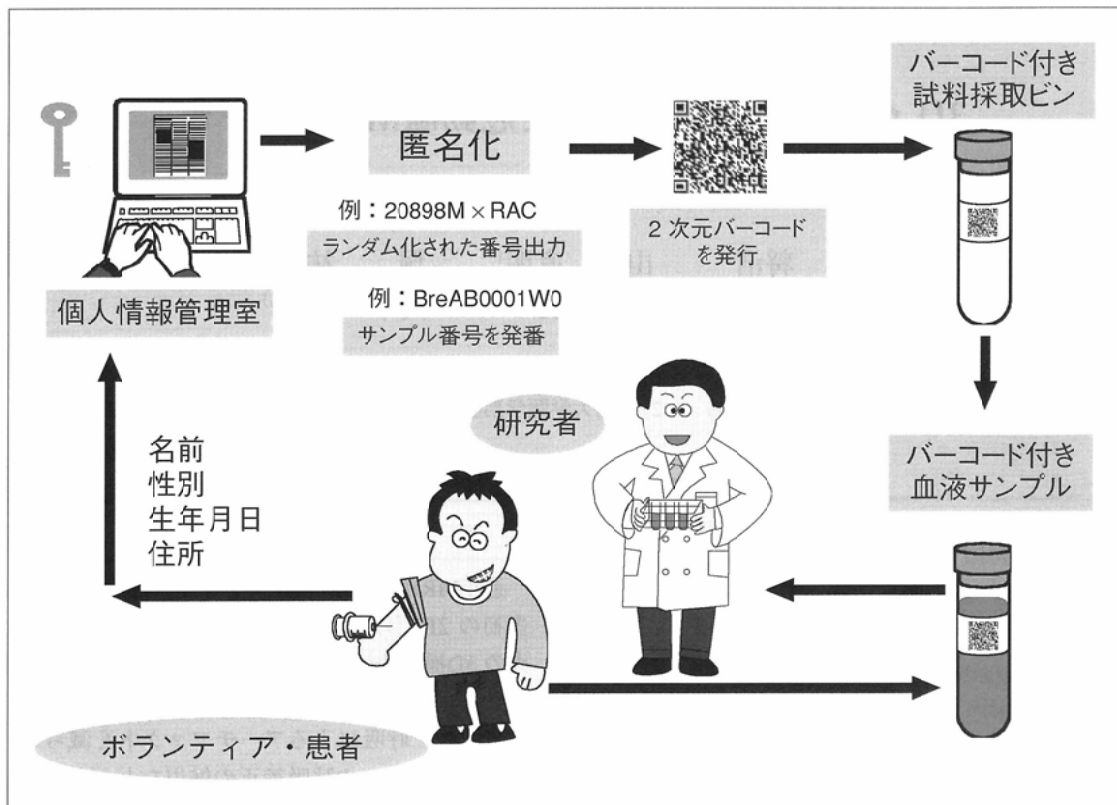


Fig. 6 匿名化システム  
倫理指針に基づいて、RadGenomicsプロジェクトにおける匿名化システムを模式図に示した。

理委員会においてさらに審議され、最終的に昨年3月末、倫理指針として発表されるに至った。RadGenomicsはこの指針を遵守し、厳重な個人情報管理および匿名化を行ったうえで、研究を行っている (Fig. 6)。

残すところ4年の間に放射線感受性遺伝子に関するSNIP

を明らかにするため、多数の臨床医の協力を得、統合的な研究を行っている。

日本医学放射線学会会員の先生方のご指導よろしくお願いいたします。

## 文 献

- 1) He JL, Chen WL, Jin LF, et al: Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat Res* 469: 223–231, 2000
- 2) Rube CE, Uthe D, Schmid KW, et al: Dose-dependent induction of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *J Radiat Oncol Biol Phys* 47-4: 1033–1042, 2000
- 3) Khodarev NN, Park JO, Yu J, et al: Dose-dependent and independent temporal patterns of gene responses to ionizing radiation in normal and tumor cells and tumor xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 98-22: 12665–12670, 2001
- 4) Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, et al: Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res* 61: 6474–6479, 2001
- 5) Veer LJ, Dai H, Vijver MJ, et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530–536, 2002
- 6) Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, et al: Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26: 163–175, 2000
- 7) Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, et al: Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 280: 103–110, 2000
- 8) Schacherer F, Choi C, Gotze U, et al: The TRANSPATH signal transduction database: a knowledge base on signal transduction networks. *Bioinformatics* 17-11: 1053–1057, 2001
- 9) Mehlman MJ: The effect of genomics on health services management: ethical and legal perspectives. *Frontiers* 17(3): 17–26, 2001