

1. 研究課題名：DNA 修復欠損細胞における放射線誘発遅延性損傷の解析
2. 研究機関：長崎大学薬学部保健衛生薬学講座放射線生命科学教室<sup>1</sup>、科学技術振興事業団長崎研究室<sup>2</sup> (s-kodama@net.nagasaki-u.ac.jp)
3. 研究者：児玉靖司<sup>1, 2</sup>
4. 研究協力者：鈴木啓司<sup>1</sup>、横山兼久<sup>2</sup>、森田直子<sup>2</sup>、中山由紀子<sup>2</sup>、渡邊正己<sup>1</sup>
5. 研究期間：平成10年～平成11年
6. 要約

放射線被曝後 20 回以上分裂した生存細胞に、遅延性損傷が生じることが知られている。この放射線による遅延性損傷は、コロニー形成率の低下、巨大細胞の生成、染色体異常の生成、及び遺伝子突然変異の生成などの変化を細胞にもたらす。これらの異常はいずれも、細胞の持つ遺伝子安定保持機構の乱れに起因するものであり、特に放射線発癌を考える上で重要な現象である。本研究は、放射線による遅延性損傷の誘発に DNA 損傷修復機構がどのように関わっているのかを明らかにするために、DNA 鎖切断の非相同末端結合に関わる DNA 依存的プロテインキナーゼ (DNA-PK) の機能に欠損を示す *scid* マウス細胞を用いて、放射線による遅延性損傷の誘発について調べた。*scid* 細胞の X 線感受性は、野生型 及び *scid* ヘテロ細胞に比べて、約 4 倍感受性であった。そこでそれぞれの細胞で 10% 生存率を与える X 線線量を用いて、遅延性増殖死について調べたところ、いずれの細胞でも同程度に誘発されることが分かった。しかし、遅延性染色体異常に関しては、野生型および *scid* 細胞ともに自然発生頻度が高いために、放射線による染色体異常頻度の明確な上昇を示す結果は得られなかった。そこで、両細胞から自然染色体異常頻度の低い細胞を分離して、放射線による遅延性増殖死と染色体異常について調べた。その結果、野生型細胞に比べて、*scid* 細胞では依然として自然染色体異常頻度が 2 ~ 5 倍高く、また、放射線による遅延性増殖死と染色体異常が大きく現れる傾向があることが分かった。このことは、同じ生存率で比べた場合、*scid* 細胞では野生型細胞より遅延性損傷が高感度に発現される可能性を示唆している。

## 7. 研究目的

放射線被曝後の生存細胞にみられる遅延性損傷に関する報告は、最近着実に増加している<sup>1,2)</sup>。我々のこれまでの研究から、遅延性損傷は紫外線によっては誘導されないこと、また、低線量放射線の前照射によって軽減化されることが明らかとなっている。これらの結果は、放射線による遅延性損傷の誘導には、DNA 鎖切断とその修復過程が関わっていることを示唆している。こうした放射線による遅延性損傷の誘導に、DNA 修復過程がどのように関わっているのかを調べるには、特定の DNA 修復欠損細胞を用いるのが有効である。そこで本研究では、DNA 鎖切断の非相同末端結合に関わる DNA 依存的プロテインキナーゼ (DNA-PK) の機能に欠損を示す *scid* マウス細胞を用いて、放射線による遅延性損傷の誘導動態を調べた。

## 8. 材料と方法

### (1) 細胞と細胞培養

細胞は、*scid* 変異に関してホモ接合型 (-/-)、ヘテロ接合型 (+/-)、及び野生型

(+/+) を示す CB17 マウス胎児よりそれぞれ樹立した細胞である SD/SD、SD/CB 及び CB/CB 細胞を用いた。これを、20 mM HEPES、10% 牛胎児血清 及び Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) を含む  $\alpha$ -MEM 培地を用い、37 °C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

## (2) X線照射

X 線は、軟 X 線発生装置 (SOFTEX.M-150WE) を用いて、管電圧 150kVp、管電流 5 mA で、0.1 mm 銅板フィルターを使用し、線量率 0.43 Gy / min で室温で照射した。

## (3) 遅延性増殖死と遅延性染色体異常

X 線照射した細胞を 2 週間培養して 1 世代目コロニーを形成させた。そのコロニーを回収して再度 2 週間培養し、2 世代目コロニーの形成率を調べて遅延性増殖死を算出した。また、2 世代目コロニーを回収してコルセミド (50 ng / ml, 6 hr) 処理し、分裂中期細胞を集め、染色体標本作製した。

## (4) Cバンド染色法

マウスの二動原体染色体を判別しやすくするために、Cバンド染色によって動原体ヘテロクロマチン部分を濃染した。染色体標本を、0.2 N 塩酸に 15 分間浸した後軽く水洗し、37 °C の 5% 水酸化バリウム水溶液で 5 分間処理した。その後十分水洗し、65 °C の 2XSSC に 2 時間浸した。その後染色体標本を軽く水洗し、5%ギムザ染色液 (pH 6.8) で 90 分間染色した。

## (5) 単一コロニー由来細胞の分離

単一コロニー由来細胞の遅延性増殖死と遅延性染色体異常頻度を知るために、X線照射後の 2 世代目コロニーをランダムに単離して十分な細胞数に達するまで増殖させた。その後、個々の単一コロニー由来細胞 (9~19 個) について、それぞれコロニー形成率および染色体異常頻度を調べた。

## 9. 結果

### (1) X線による遅延性増殖死の誘導

*scid* (SD/SD) 細胞は、野生型 (CB/CB) 及び *scid* ヘテロ (SD/CB) 細胞より約 4 倍高い X 線感受性を示した。そこで、それぞれの細胞で、10%生存率を与える X 線線量、すなわち、野生型及び *scid* ヘテロ細胞では 6 Gy、*scid* 細胞では 2 Gy を用いて、遅延性増殖死誘導について調べた (図 1)。

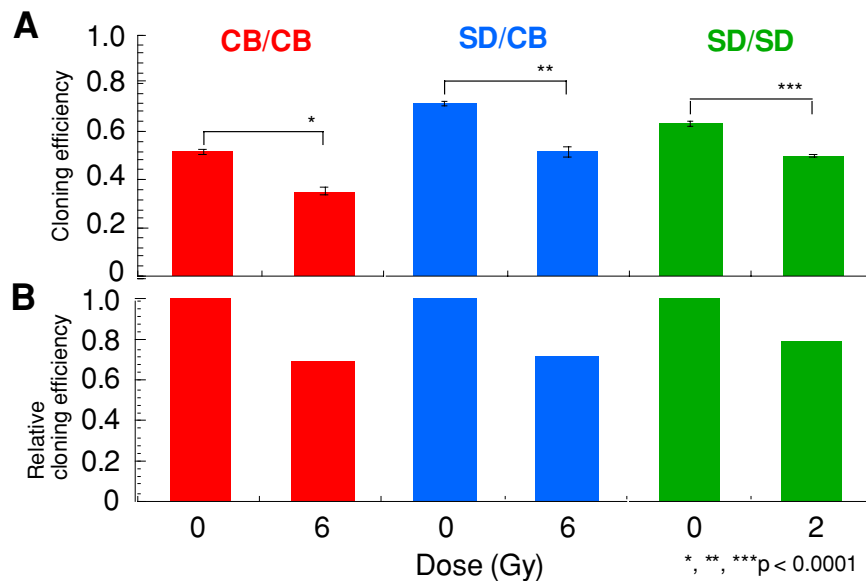


図1 X線による遅延性増殖死の誘導  
 A: CB/CB及びSD/CB細胞は6Gy、SD/SD細胞は2GyのX線を照射後、2世代目のコロニー形成能を調べた。CB/CB及びSD/CB細胞は3回、SD/SD細胞は9回の実験結果の平均値とその標準誤差を示した。検定は、Student's t-testを用いた。  
 B: 未照射群に対する相対的コロニー形成率を示した。

X線照射後の生存コロニーを全て回収して2回目のコロニー形成能(CE)を調べたところ(平均約20回分裂時)、いずれの細胞でも未照射群に比べて約20%のCE低下が見られた( $p < 0.0001$ )。すなわち、同一の生存率を与える線量で比べた場合、X線による遅延性増殖死の誘導には、3種の細胞間で感受性の差は見られなかった。

## (2) 単一コロニー由来細胞におけるX線による遅延性増殖死の誘導

個々の細胞における遅延性損傷の誘導について調べるために、野生型細胞および *scid* 細胞から、X線未照射および照射2世代目コロニーを9~19個分離して、それぞれの単一コロニー由来細胞におけるコロニー形成能(CE)を調べた。このとき、野生型細胞はX線照射後約29~33回、また、*scid*細胞は約26~30回分裂していると考えられる。その結果、野生型細胞では、X線による遅延性増殖死が全く見られなくなった(図2A)。

これは主に親細胞群に比べてコロニー由来細胞では、未照射群におけるCEが低く出たことに起因すると考えられる。*scid*細胞の場合は、5%有意水準で差があり、照射群で遅延性増殖死の誘導が見られた(図2A)。

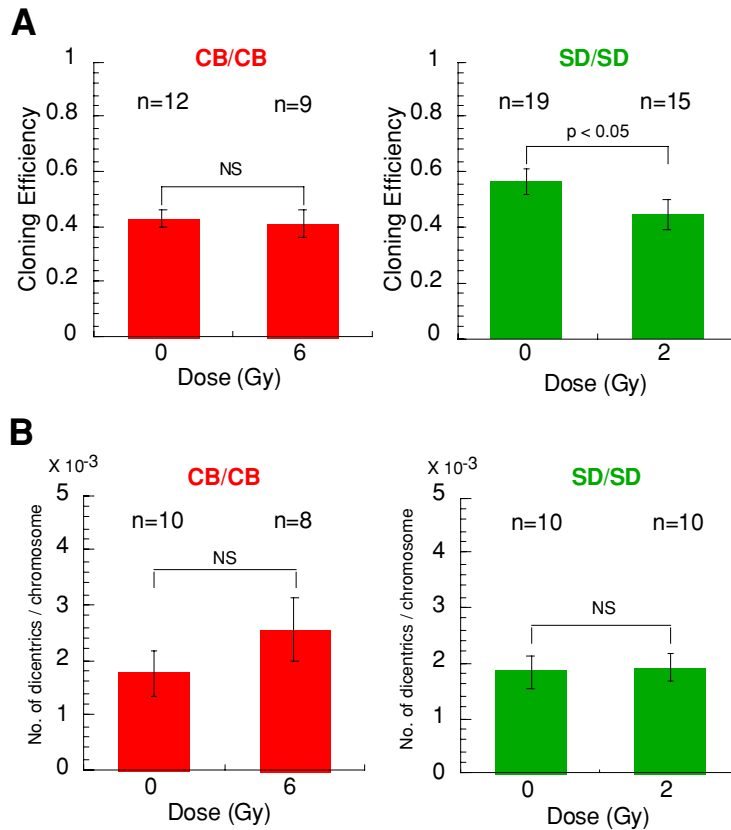


図2 単一コロニー由来細胞におけるX線による遅延性増殖死と遅延性染色体異常の誘導。A: 遅延性増殖死、B: 遅延性染色体異常検定には、Student's t-testを用いた。染色体異常は、染色体当たりの二動原体染色体の頻度で表した。NS: not significant

### (3) 単一コロニー由来細胞におけるX線による遅延性染色体異常の誘導

(2)で単一コロニー由来細胞におけるX線による遅延性増殖死の誘導を調べたので、次に、同様に2世代目コロニー 8~10個について遅延性染色体異常について調べた。染色体異常は、代表的な不安定型異常であり、判別が容易な二動原体染色体を指標とした。野生型細胞の場合は、未照射群およびX線照射群における遅延性染色体異常頻度の平均値は、それぞれ  $1.8 \times 10^{-3}$ 、および  $2.6 \times 10^{-3}$  であり、X線による頻度の上昇傾向はみられたが、その程度は1.4倍と小さく有意ではなかった(図2B)。一方、*scid*細胞では、未照射群とX線照射群の遅延性染色体異常頻度の平均値はともに  $1.8 \times 10^{-3}$  であり、両群の間に全く差が見られなかった(図2B)。

### (4) 再分離した単一コロニー由来細胞におけるX線による遅延性増殖死の誘導

野生型細胞と *scid* 細胞から自然発生染色体異常頻度の低いコロニー由来細胞を2個ずつ分離して、再度X線による遅延性増殖死を調べた。野生型細胞では09と031細胞、また、*scid*細胞では、01と02細胞を実験に用いた。2世代目コロニー形成時で、野生型細胞では、X線照射後約28~32回、また、*scid*細胞では約20~24回分裂していると考えられる。X線による遅延性増殖死は、野生型09細胞、および031細胞で約20%~35%の低下が見られ、

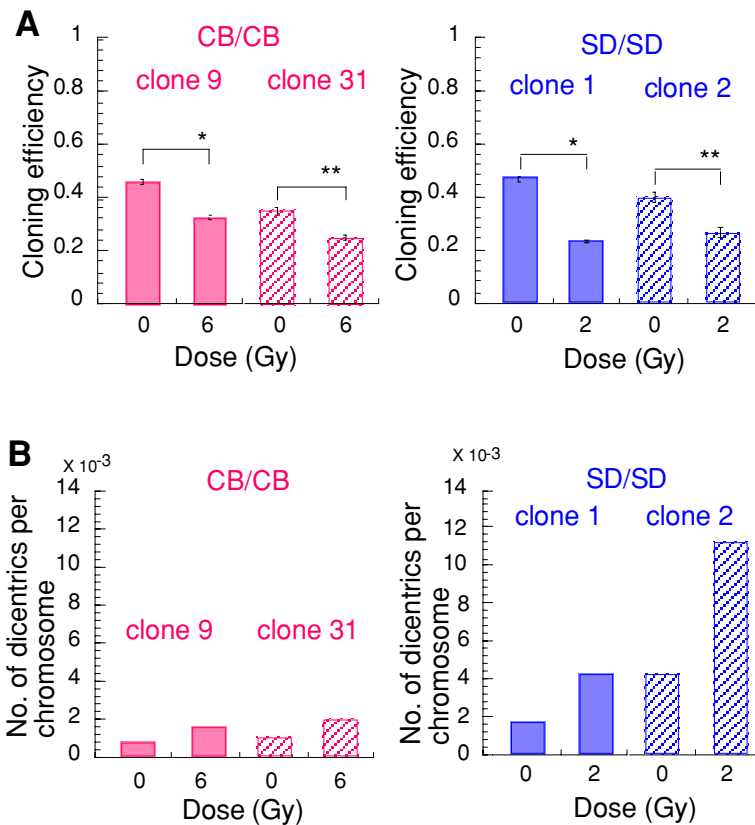


図3 再分離した単一コロニー由来細胞におけるX線による遅延性増殖死と遅延性染色体異常の誘導。A: 遅延性増殖死、B: 遅延性染色体異常。野生型 (CB/CB) 細胞は、0 9、0 3 1細胞を、*scid* (SD/SD) 細胞は、0 1、0 2細胞をそれぞれ用いて調べた。検定には、Student's t-testを用いた。染色体異常は、染色体当たりの二動原体染色体の頻度で表した。(\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$ )

親細胞とほぼ同等の誘導が見られた (図3 A)。一方、*scid* 細胞では、01 及び 02 細胞ともに、親細胞集団で見られた未照射群の CE に対して 20%低下するというX線による遅延性増殖死の誘導よりやや高い 40~50%の CE 低下が見られた (図3 A)。

#### (5) 再分離した単一コロニー由来細胞におけるX線による遅延性染色体異常の誘導

野生型 09 および 031 細胞の自然染色体異常頻度は、それぞれ  $0.7 \times 10^{-3}$ 、 $1.0 \times 10^{-3}$  であった。X線照射によりそれぞれの遅延性染色体異常頻度は、 $1.6 \times 10^{-3}$ 、 $1.9 \times 10^{-3}$  に上昇した (図3 B)。したがってX線誘発遅延性染色体異常頻度は、ともに  $0.9 \times 10^{-3}$  であることが分かった。一方、*scid* 01 および 02 細胞の自然染色体異常頻度は、それぞれ  $1.6 \times 10^{-3}$ 、 $4.3 \times 10^{-3}$  であり、異常頻度の低い細胞を分離したにも関わらず、野生型に比べて高いレベルであることが分かった。X線照射により遅延性染色体異常頻度は、それぞれ  $4.2 \times 10^{-3}$ 、 $11.2 \times 10^{-3}$  に上昇した (図3 B)。したがってX線誘発遅延性染色体異常頻度は、それぞれ  $2.6 \times 10^{-3}$ 、 $6.9 \times 10^{-3}$  になった。このことは、*scid* 細胞では野生型細胞に比べて、X線による遅延性染色体異常が、2.9~7.7 倍高く検出されることを示している。

一方、野生型 09 細胞、*scid*01 細胞について、それぞれ 10%生存率を与える 6 Gy、及び 2

Gy の X 線照射群の生存コロニーを、非照射群とともに分離してその遅延性染色体異常の頻度を調べた (図 4)。この解析では、暫定的にひとつのクローン当たり 50 個分裂細胞しか解析していないので、いくつか二動原体染色体の見られなかったクローンもあるが、少なくとも X 線照射群では分析数を増やせば異常は検出できるものと考えられる。コロニー由来細胞は、単一細胞起源であるので、ここで見られる染色体異常は、全て X 線によって間接的に誘発されたものであることが図 3 に示した解析よりは明確に分かる。*scid* と野生型とを比較すると、*scid* の方が、ある一定レベルの異常頻度を持つクローンが多いことが分かる。例えば、染色体当たり 2 個以上の異常を持つクローンの割合は、野生型では、2/9 であるのに対し、*scid* では、7/9 である (図 4)。しかし、野生型細胞クローンにも X8 のように異常数 6 以上を示すものが含まれるために、クローン間の異常数の平均値を計算すると、統計学的に野生型と *scid* は、有意差が見られない結果となった (data not shown)。

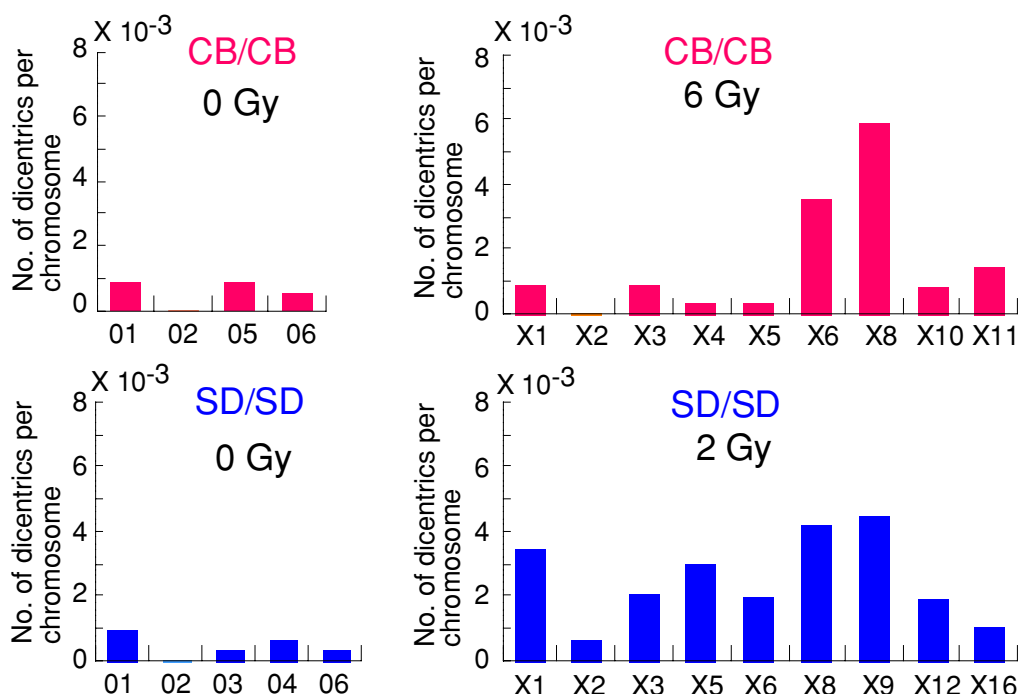


図 4 CB17野生型マウス細胞株 (CB/CB/09) と *scid* マウス細胞株 (SD/SD/01) に対する X 線による遅延性染色体異常の誘発。それぞれの細胞は、X 線照射群、あるいは非照射群の生存コロニーから分離して染色体異常を調べた。50 分裂細胞を解析し、染色体当りの二動原体染色体数で表した。

## 10. 考察

電離放射線による DNA 鎖切断は、相同組換え修復と非相同末端結合修復によって修復されると言われている<sup>3,4)</sup>。DNA-PK は、非相同末端結合修復に関わると考えられているタンパク質であり、*scid* マウス細胞はこの DNA-PK の機能に欠損を示すために、放射線高感受性である<sup>5,6)</sup>。本研究では、放射線による遅延性損傷の生成過程に、DNA 修復がどのように関わっているのかを探るために *scid* 細胞を用いた。最初に 10% 生存率を与える線量で、野生型、*scid* ヘテロ及び *scid* 細胞について、被曝後約 20 回分裂した時点での遅延性増殖死を調

べたところ、ほぼ同程度の誘導であった(図1)。したがって、この時点では *scid* 細胞における遅延性損傷に対する感受性は、生存率を揃える限り、野生型と変わらないものと推定された。しかし、被曝後2世代目コロニーをいくつか分離して、遅延性増殖死と染色体異常を調べてみると、野生型細胞における遅延型増殖死と *scid* 細胞における遅延性染色体異常で、放射線の効果が全く消失していた(図2)。こうした現象は、少なくともヒト胎児由来細胞を用いた場合には観察されていない。親細胞集団とそのコロニー由来細胞とで結果が同一でない理由として、2つの可能性が考えられる。1つは、コロニーを分離した場合、そのことによって被曝後の分裂回数が約10回増加するが、この分裂回数増加の間に遅延性損傷の原因となる放射線効果が消失したという可能性である。しかし、被曝後30~40回分裂しても遅延性損傷が誘導されるという報告はいくつもあることから<sup>1,2)</sup>、単にコロニー分離に伴う細胞分裂数の増加がその遅延性効果消失の原因という可能性は低いものと考えられる。2つめは、細胞の性質の不均一性に由来する可能性である。すなわち、コロニー分離によって親細胞集団とは異なる性質の細胞集団が生じてきたために、放射線効果が消失したという考えである。親細胞集団では、2世代目コロニーで大多数を占めていた細胞亜集団の性質がそのまま結果に反映されるのに対し、コロニーを分離した場合には、少数の細胞から多数の細胞数にまで増殖させる間に選択が生じて、必ずしも親細胞集団と同様の性質を示す細胞集団にはならない可能性がある。特に、不死化細胞の場合には、原理的には1個の細胞でも生き残ることになるので、有限寿命細胞よりも細胞集団としての性質が不均一になる可能性が高くなる。そこでこの点の改善を目的として、本研究でも親細胞集団の性質を均一にするために、野生型および *scid* 細胞から自然染色体異常頻度の低いコロニー由来細胞を選んで十分に細胞数を確保し、これらについて、2世代目コロニー全てを回収してその細胞集団における遅延性細胞死と遅延性染色体異常を調べてみた。ここで得られた結果の方が、ヘテロな細胞集団で得られた結果よりも、野生型と *scid* 細胞の本来の性質を反映しているものと考えられる。この場合、もし放射線による遅延性損傷の生成過程に主に非相同末端結合修復の方が関わっているならば、野生型細胞よりも相同組換えに偏って損傷を修復するであろう *scid* 細胞では、遅延性損傷の出現率が低下することが期待される。しかし、本研究の結果は、同じ生存率を与えるX線線量で比べた場合、*scid* 細胞ではむしろ野生型細胞よりも遅延性損傷の出現率が高くなることを示すものとなった(図3)。このことは、単純に考えると、相同組換えに偏った修復を行うと、遅延性損傷が上昇することを意味している。しかし、本研究の結果だけで、相同組換え修復と遅延性損傷生成とを関連づけるのは危険かも知れない。*scid* 細胞では、DNA修復欠損細胞にしばしば指摘されるような自然染色体異常頻度の亢進が見られた。なぜ、*scid* 細胞で自然染色体異常頻度が亢進しているのかそのメカニズムは不明であるが、この自然レベルのゲノム不安定性の亢進が、放射線による遅延性損傷の高感度発現に関わっている可能性がある。すなわち、*scid* 細胞には、DNA-PK欠損に由来する自然レベルのゲノム不安定性誘導機構が元々存在し、放射線は、その自然レベルをさらに押し上げるように作用することによって、最終的に遅延性損傷の生成率を増大させるのではないだろうか(図5)。



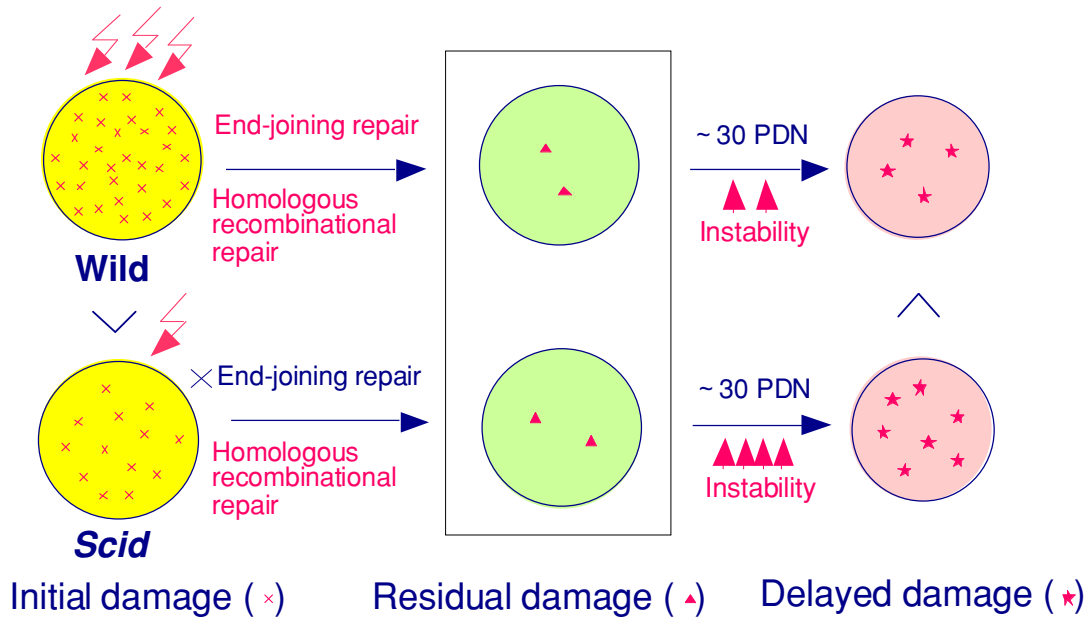


図5 *scid* 細胞では野生型細胞に比べて遅延性損傷が高感度に発現される。同一生存率を与えるX線線量を野生型と*scid*細胞に照射すると、初期損傷としてのDNA鎖切断数は野生型細胞の方が多い。DNA鎖切断は直ちに修復されるが、非相同末端結合修復に欠損がある*scid*細胞は、野生型に比べて修復効率が悪いから、この場合には生存率が同じになる。生存細胞が約30回分裂した時点で二動原体染色体の出現率を比べると、野生型よりも*scid*細胞の方が多くなる。

もし、放射線が自然レベルの染色体異常を押し上げるように作用していると仮定すると、図3Bに見られたように*scid*細胞での放射線による遅延性染色体異常の頻度が高くなるのは、元々の自然レベルが高いからであるという解釈も可能である。例えば、放射線によって、遅延性染色体異常頻度が自然発生レベルの何倍になったかという観点から比較すると、野生型細胞と*scid*細胞は、ともに2~3倍になり差は見られなくなる。すなわち、放射線が自然レベルをどれくらい押し上げるのかという観点から*scid*細胞をみると、その感受性は特に高いとは言えないことになる。*scid*細胞が野生型細胞よりも、放射線による遅延型染色体異常に対して感受性が高いのか、あるいは同等なのかに関しては、単一コロニー由来細胞についての解析をさらに進めて見極める予定である。

## 11. 今後の展開

放射線による遺伝的不安定性は、放射線の生体影響を考えるうえで、非常に重要な問題を含んでいる。特に、放射線発がんのメカニズム、およびそれを基にした放射線リスクを考える際に問題となる。放射線生物学上の大きな問題でありながら、これまでの研究は散発的なものが多かった。その理由の一つは、メカニズムに迫る良い実験系が無かったことによる。したがって、今後の大きな課題は、メカニズム解明のための実験系構築であろう。それと同時に、現時点で有効な実験において、可能な限り実験データを集める必要がある。

本研究で取り組んだが、*scid*細胞において、同一生存率を与える放射線に対して遅延性影



響の感受性が高くなるのか否かは早急に結論を出す必要がある。また、他の修復欠損細胞では遅延性影響がどのように現れるのかについて検討することも重要である。それは、DNA 修復機構と遅延性影響の発生メカニズムとの関係を明らかにできる可能性があるからである。

さらに今後取り組むべき重要課題として、*in vitro* だけでなく、*in vivo* における放射線の遅延性影響に関する研究があげられよう。放射線発がんに遺伝的影響がどのように関与しているのかを探るには、*scid* マウスを用いた *in vivo* 実験系が大変すぐれている。1-2 Gy の 1 回照射により高率に胸腺リンパ腫を発症するので、その過程に遅延性染色体異常がどのように関与するのかを調べることができる。

放射線による遅延性影響のメカニズム解明に迫る実験系構築のヒントは、低線量放射線による遅延性影響の低減化にあるように思われる。低減化されるということは、修復によって遅延性影響の原因となるものが除かれていることを意味する。しかもその原因となるものは、細胞の世代を超えて存在し続けることから DNA 上に刻印されていると考えられる。この「DNA 上の刻印」という現象を確認できる実験系を今後構築していく予定である。

## 12. 参考文献

- 1) Little, J. B. Changing views of cellular radiosensitivity. *Radiat. Res.*, 140, 299-311, 1994.
- 2) Little, J. B. Radiation-induced genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74, 663-671, 1998.
- 3) Ivanov, E. L. and Haber, J. E. DNA repair: RAD alert. *Curr. Biol.*, 7, R492-495, 1997.
- 4) Tsukamoto, Y. and Ikeda, H. Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. *Genes Cells*, 3, 135-144, 1998.
- 5) Kirchgessner, C. U., Patil, C. K., Evans, J. W., Cuomo, C. A., Fried, L. M., Carter, T., Oettinger, M. A. and Brown, J. M. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science*, 267, 1178-1183, 1995.
- 6) Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C. M., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A. and Jackson, S. P. Defective DNA-dependent protein kinase activity is klinked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine *scid* mutation. *Cell*, 80, 813-823, 1995.

## 13. 研究業績

### 13-1. 原著論文

- 1) S. Koyama, S. Kodama, K. Suzuki, T. Matsumoto, T. Miyazaki and M. Watanabe: Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation, *Mutation Res.*, 421, 45-54 (1998)
- 2) K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe: Effect of low-dose preirradiation on induction of the HSP70B-LacZ fusion gene in human cells treated with heat shock. *Radiat. Res.*, 149, 195-201 (1998)

- 3) K. Suzuki, R. Takahara, S. Kodama and M. Watanabe: In situ detection of chromosome bridge formation and delayed reproductive death in normal human embryonic cells surviving X irradiation, *Radiat. Res.*, 150, 375-381 (1998)
- 4) K. Suzuki, S. Kodama and M. Watanabe: Suppressive effect of low-dose preirradiation on genetic instability induced by X rays in normal human embryonic cells, *Radiat. Res.*, 150, 656-662 (1998)
- 5) K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe: Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*, 274, 25571-25575 (1999)
- 6) J. C. Ghosh, K. Suzuki, S. Kodama and M. Watanabe: Effects of protein kinase inhibitors on accumulation kinetics of p53 protein in normal human embryo cells following X-irradiation. *J. Radiat. Res.*, 40: 23-37 (1999)

13-2 . 著書、総説等   なし

13-3 . 国際学会発表

- 1) S. Kodama, G. Kashino, K. Suzuki, M. Oshimura, M. Watanabe and J. Carl Barrett, Failure to complement abnormal phenotypes of SV40 transformed Werner syndrome cells by introduction of a normal human chromosome 8, *Keystone Symposia, "Aging: Genetic & Environmental Influences on Life Span"*, February 2-7, 1999, Tamarron, CO, USA.
- 2) S. Kodama, K. Ishi and M. Watanabe, Role of intercellular communication in the adaptive response by radiation in human embryo cells, *11th International Congress of Radiation Research*, July 18-23, 1999, Dublin, Ireland.
- 3) S. Kodama, M. Md Desa, K. Roy, K. Suzuki and M. Watanabe, Radiation-induced delayed chromosomal instability in cultured mouse cells, *11th International Congress of Radiation Research*, July 18-23, 1999, Dublin, Ireland.
- 4) S. Kodama, I. Mori, K. Suzuki and M. Watanabe, Cellular senescence in rodent cells does not require telomerase repression, *July 24-25, 1999, Cork, Ireland.*

13-4 . 国内学会発表

- 1) 児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：細胞癌化とテロメア、日本薬学会第 118 年会、平成 10 年 3 月 31 日-4 月 2 日、京都。
- 2) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：放射線で誘導された遺伝的不安定性の生物学的意義、日本薬学会第 118 年会、平成 10 年 3 月 31 日-4 月 2 日、京都。
- 3) 児玉靖司、Mohamad Bin MD.Desha、鈴木啓司、渡邊正己：放射線による遅延型損傷生成と DNA 修復機構との関わり、第 39 回原子爆弾後障害研究会、平成 10 年 6 月 7 日、長崎。
- 4) 渡邊正己、K. Roy、児玉靖司、鈴木啓司、鈴木雅雄：低線量放射線照射による異常細胞

- 分裂誘発、第39回原子爆弾後障害研究会、平成10年6月7日、長崎.
- 5) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ストレス応答遺伝子誘導に及ぼす低線量放射線の影響、第39回原子爆弾後障害研究会、平成10年6月7日、長崎.
  - 6) 楊 治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：低線量放射線による細胞寿命延長におけるテロメアの関与、第39回原子爆弾後障害研究会、平成10年6月7日、長崎.
  - 7) J. C. Ghosh, K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe: Analysis of p53 protein accumulation through signal transduction pathway in normal human cells following X-irradiation, 第39回原子爆弾後障害研究会、平成10年6月7日、長崎.
  - 8) 山口健太郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：放射線による G1 停止機構における Gadd45 遺伝子の役割、第39回原子爆弾後障害研究会、平成10年6月7日、長崎.
  - 9) 早稲田聡美、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：レポーター遺伝子を用いた放射線誘発遺伝的不安定性の検出、第39回原子爆弾後障害研究会、平成10年6月7日、長崎.
  - 10) 児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：放射線による遅延型損傷誘発機構、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 11) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：放射線による p53 機能活性化のメカニズム、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 12) K. Roy、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：X-ray-induced genetic instability in normal human embryo cells、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 13) 都田真奈、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：温熱処理による正常ヒト細胞の RB 非依存的細胞周期制御、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 14) 山口健太郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Gadd45 遺伝子による細胞増殖抑制機構、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 15) 早稲田聡美、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：放射線誘発遺伝的不安定性のレポーター遺伝子を用いた検出、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 16) 森 勲、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：齧歯類細胞の不活化過程におけるテロメラーゼの役割、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 17) 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：XP バリエント細胞における p21 機能欠損、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡.
  - 18) 児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：細胞不活化過程におけるテロメア動態 ヒトと齧歯類との比較、日本癌学会第57回総会、平成10年9月30日-10月2日、横浜.
  - 19) 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：放射線で誘導された遺伝的不安定性の細胞がん化への寄与、日本癌学会第57回総会、平成10年9月30日-10月2日、横浜.
  - 20) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒト細胞における X線照射および野生型 p53 蛋白質誘導による老化様形質の発現、日本癌学会第57回総会、平成10年9月30日-10月2日、横浜.
  - 21) J. C. ゴーシュ、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒトの正常細胞における放射線による p53 蛋白質への情報伝達、日本癌学会第57回総会、平成10年9月30日-10月2日、横浜.

- 22) 都田真奈、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒト細胞の温熱応答性に対する P53 蛋白質の蓄積、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日-10 月 2 日、横浜。
- 23) 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：XP バリエント細胞の高突然変異性への p53 経路の関与、日本癌学会第 57 回総会、平成 10 年 9 月 30 日-10 月 2 日、横浜。
- 24) 児玉靖司、Mohamad Bin MD. Desa、鈴木啓司、鈴木文男、渡邊正己：scid マウス細胞における放射線誘発遅延型損傷の解析、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 25) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X 線照射正常ヒト細胞における p53 蛋白質活性化シグナルの受容と伝達、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 26) J. C. ゴーシュ、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X 線線量に依存したヒト正常細胞における p53 蛋白質蓄積の二相性、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 27) K. Roy、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：ヒト胎児由来細胞における X 線誘発遅延型損傷、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 28) 横山兼久、児玉靖司、渡邊正己：ラット肝細胞細胞凝集体形成での機能発現における活性酸素の関わり、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 29) 山口健太郎、児玉靖司、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己：ヒト細胞の放射線による G1 停止機構における Gadd45 遺伝子の役割、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 30) 都田真奈、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：正常細胞における温熱処理後の p53 を介する RB 非依存的細胞周期制御、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 31) 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：紫外線照射された XP バリエント細胞における細胞周期制御異常、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 32) 森雅子、児玉靖司、鈴木啓司、宮崎哲郎、田中隆、渡邊正己：放射線誘発長寿命ラジカルの生物効果、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 33) 森 勲、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：齧歯類細胞はなぜ不死化しやすいか テロメア維持機構からの解析、日本放射線影響学会第 41 回大会、平成 10 年 12 月 2 日-12 月 4 日、長崎。
- 34) 児玉靖司、菓子野元郎、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群細胞におけるゲノム不安定性の解析、日本薬学会第 118 年会、平成 11 年 3 月 29 日-31 日、徳島。
- 35) 児玉靖司、漆原あゆみ、鈴木啓司、渡邊正己：放射線による遅延性染色体異常生成に対する scid 突然変異の影響、第 36 回放射線影響懇話会、平成 11 年 8 月 7 日、福岡。
- 36) 森 勲、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：齧歯類細胞の老化過程におけるテロメア制御

- 機構、第 36 回放射線影響懇話会、平成 11 年 8 月 7 日、福岡。
- 37) 中山由紀子、児玉靖司、鈴木啓司、横山兼久、渡邊正己：低酸素ストレスの細胞分裂寿命に与える影響、第 36 回放射線影響懇話会、平成 11 年 8 月 7 日、福岡。
  - 38) 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：XP バリエーション細胞における DNA 合成制御異常、第 36 回放射線影響懇話会、平成 11 年 8 月 7 日、福岡。
  - 39) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：部位特異的リン酸化による p53 蛋白質の制御、第 36 回放射線影響懇話会、平成 11 年 8 月 7 日、福岡。
  - 40) 児玉靖司、鈴木啓司、鈴木文男、島田義也、渡邊正己：適応応答と遺伝的不安定性の誘導、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 41) ロイカナクラタ、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：X 線による遅延性損傷誘発への酸化ストレスの関与、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 42) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X 線照射正常ヒト細胞における p53 蛋白質 Ser15 のリン酸化制御、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 43) 森田真希子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：wild type p53 を有するがん細胞における放射線照射後の p53、p21 の誘導、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 44) 森 勲、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：テロメラーゼ活性の抑制を必要としない齧歯類細胞の老化過程、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 45) 中山由紀子、児玉靖司、鈴木啓司、横山兼久、渡邊正己：ヒト細胞の分裂寿命に対する酸素分圧の影響、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 46) 長迫信一、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：Werner 症候群細胞の異常形質発現に及ぼす WRN 遺伝子変異の影響、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 47) 沼田敬直、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：温熱ストレスによる MAPK の活性化、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 48) 後藤佐智子、鈴木啓司、児玉靖司、森俊雄、渡邊正己、：XP バリエーション細胞における高突然変異発現機構の解析、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-3 日、広島。
  - 49) 児玉靖司、鈴木啓司、鈴木文男、島田義也、荻生俊昭、渡邊正己：放射線による遅延性染色体異常生成に対する *scid* 突然変異の影響、日本癌学会第 58 回総会、平成 11 年 9 月 29 日-10 月 1 日、広島。
  - 50) 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：X 線照射正常ヒト細胞における p53 および BRCA1 蛋白質のリン酸化および ATM 蛋白質の関与、日本癌学会第 58 回総会、平成 11 年 9 月 29 日-10 月 1 日、広島。
  - 51) 漆原あゆみ、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：*scid* マウス細胞における放射線誘発遅延型染色体異常の解析、第 16 回日本薬学会九州支部大会、平成 11 年 12 月 11 日-12 日、長崎。

- 52) 長迫信一、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：4NQO 高感受性を示す Werner 症候群細胞の原因解析、第 16 回日本薬学会九州支部大会、平成 11 年 12 月 11 日–12 日、長崎。
- 53) 森田真希子、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：Wild-type p53 をもつガン細胞における放射線応答、第 16 回日本薬学会九州支部大会、平成 11 年 12 月 11 日–12 日、長崎。
- 54) 沼田敬直、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：温熱ストレスによる ERK1/2 および JNK1/2 の活性化、第 16 回日本薬学会九州支部大会、平成 11 年 12 月 11 日–12 日、長崎。

13-5 . 新聞等 なし

13-6 . 特許 なし

14 .

(1) Radiation-induced delayed damage in DNA repair deficient cells

(2) <sup>1</sup>Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan, <sup>2</sup>Laboratory of Cell and Stress Biology, Japan Science and Technology Corporation at Nagasaki, 2-1303-8 Ikeda, Omura 856-0026, Japan.

( s-kodama@net.nagasaki-u.ac.jp )

(3) Seiji Kodama<sup>1,2</sup>

(4) Keiji Suzuki<sup>1</sup>, Kanehisa Yokoyama<sup>2</sup>, Naoko Morita<sup>2</sup>, Yukiko Nakayama<sup>2</sup>, and Masami Watanabe<sup>1</sup>

(5) 1998 – 1999

(6) Abstract

To know the effect of DNA repair deficiency on induction of delayed radiation damage, we studied delayed lethality and chromosome aberrations in *scid* mouse cells which defected in DNA dependent protein kinase (DNA-PK) activity. The *scid* cells were 4-fold sensitive to X-rays compared with wild-type or *scid* hetero cells. We reseeded primary surviving colonies after X-irradiation, isolated secondary colonies and investigated the delayed radiation damage in those colony-derived cells. However, a clear increase in delayed lethality and chromosome aberrations by X-irradiation was not observed in progeny of survivors of both wild-type and *scid* cells. Because heterogeneous subpopulations in both wild-type and *scid* cells might make the result obscure, we reisolated colonies retaining a low frequency of spontaneous chromosome aberrations. The reisolated colony-derived cells showed the delayed lethality and the delayed dicentric formation by X-irradiation. We demonstrate here that the *scid* cells show an increased

frequency of spontaneous dicentrics and form higher yield of X-ray-induced delayed dicentrics than the wild-type cells when they are exposed to the equivalent survival dose, suggesting that a defect in DNA strand break repair may promote the delayed chromosomal instability induced by radiation.