

テーマ（２）

放射線による健康影響の解明及び放射線以外の要因による健康リスクの低減を含めた総合的な健康リスクに関する研究

- 2-1 低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか？低線量率放射線は？放射線関連循環器疾患の機序の解明
高橋 規郎（放射線影響研究所副理事長室 顧問）
- 2-2 DNA 損傷・修復に基づく放射線・化学物質影響の統合と個人差の評価に関する研究
松本 義久（東京工業大学 原子炉工学研究所物質工学部門 准教授）
- 2-3 放射線誘発小児甲状腺がんの特異性に関する実証研究
山田 裕（量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所福島再生支援本部 本部長）
- 2-4 小児期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響とメカニズム解明
鈴木 啓司（長崎大学 原爆後障害医療研究所放射線災害医療学研究分野 准教授）
- 2-5 エンリッチメント環境による小児期連続放射線被ばくの健康影響に対する低減化研究
森岡 孝満（量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 研究統括）
- 2-6 放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した「線量・線量率効果係数」 $DDREF=2$ の妥当性の検討
笹谷 めぐみ（広島大学 原爆放射線医科学研究所 准教授）

2-1 研究課題名；低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか？

低線量率放射線は？放射線関連循環器疾患の機序の解明

主任研究者：高橋 規郎（公益財団・放射線影響研究所・顧問）

分担研究者：中村 麻子（国立財団法人・茨城大学・理学部 教授）

研究要旨

放射線被曝が循環器疾患の発症リスクの上昇と相関すると報告されている。しかし、その結果には不確実性が存在するとの報告もある。我々は循環器疾患のリスクが被曝線量に相関して上昇するか否かを動物実験にて調べた。一方、低線量・低線量率放射線被曝と循環器疾患の関係およびその機序の解明を試みた。モデル動物として、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHRSP）を主に用いた。先行研究では、0.1Gy 照射群においては非照射群に比べて脳卒中症状の発症時期の早期化が見られた。本研究において、0.05Gy を照射した SHRSP については放射線被曝と発症の早期化との相関が全く認められなかったため、0.1Gy 近辺に“しきい値”の存在が推定された。更に、低線量率放射線の影響を調べた。0.05Gy/日および 0.1Gy/日の線量率で集積線量が 0.5Gy および 1Gy になるまで照射した SHRSP では、一括照射で認められた早期化は全く認められなかった。線量率効果因子が極めて高値であることが判明した。低線量照射した SHRSP より得た血清を用いて、種々のバイオマーカーを解析した。照射線量の増減、照射後の期間で変化するバイオマーカーが多く認められた。この結果を用いることにより、どのような機序で放射線被曝と循環器疾患の相関がもたらされるかの情報が得られた。更に、この結果はリスクの低減化法を考案することための重要な情報となりうることが判明した。

キーワード

動物モデル、循環器疾患リスク、放射線影響、放射線被曝、低線量・低線量率放射線

研究協力者

1. 津山尚宏(公立大学法人・福島医科大学・医学部・准教授)
2. 水野初(公立大学法人・静岡県立大学・薬学部・講師)
3. 大石和佳(公益財団法人・放射線影響研究所・臨床研究部・部長)
4. 三角宗近(公益財団法人・放射線影響研究所・統計部・研究員)
5. 村上 秀子(益財団法人・放射線影響研究所・分子生物科学部・来所研究員)

I. 研究目的

【研究の背景】放射線被曝が循環器疾患と関係することは、原爆被爆者集団などの疫学データから得られている。しかし、核関連施設の作業員などから得た低線量域での結果には矛盾も含まれる。更に、原子爆弾被爆等の精神的ストレスでも循環器疾患のリスクは上がるなど、交絡因子および修飾因子の存在が問題を複雑にしている。そのため、『原子放射線の影響に関する国連科学委員会 (UNSCEAR)』などは、動物実験により得られる低線量被曝と循環器疾患リスクの相関についての知見を求めている。しかし、他の研究施設での動物実験では比較的高い線量が使われているので、その結果は低線量被曝者には適応できない。先行研究の結果は、本研究でも使用した高血圧症自然発症ラット (SHR) は照射線量の増加にともない血圧値が上昇することを示した。また、SHRSP では、低い線量 (0.25Gy) の放射線が脳卒中発症時期を有意に早期化させることを示した。この SHRSP を用いれば、0.1Gy 未満のような低い線量、および低い線量率の影響が効率良く検証できる可能性を示した。その結果は放射性物質に汚染された地域の住民および核関連施設の作業員などの健康影響を考える際に、重要な示唆を与えることが期待される。

【目的】放射線影響研究所 (放影研) の原爆被爆者の調査結果は、循環器疾患のリスクが被曝線量と相関することを示唆している。この事象を動物実験で検証する。更に、放射線により循環器疾患がいかなる機序で生じるかを新しい方法を導入して検証する。得られた新規マーカーを用い、より低線量域・低線量率の放射線と循環器疾患の相関を脳卒中の発症などを指標として明らかにする。

ヒトを対象とした疫学研究の限界から、循環器疾患に影響を及ぼす線量に『しきい値』が存在するか否かの情報は希である。更に、循環器疾患の発症リスクと放射線被曝との相関における『線量率効果係数』についてのヒトに関する疫学情報もまた極めて少ない。これらの情報は、環境によりヒトへ及ぼされる影響を考える際には重要である。本研究では、循環器疾患を起こし易いと言う特殊な動物系を使用しているものの、循環器疾患の発症リスクに対する線量・線量率の低い放射線が主である環境放射線の影響を考える際には、重要な情報となることが期待される。

本研究では、放射線がいかにして循環器疾患発症のリスク上昇と相関するかの機序を調べる。機序の推定は、放射線による循環器疾患発症リスクの低減化に寄与することが期待できる。

本研究で得られた事象を、ヒトに直接的に適用することには慎重であらねばならないが、ヒトにおける放射線と相関する循環器疾患リスクを理解するのには有用と考えられる。

II. 研究方法

1. 低線量率放射線と脳卒中発症時期の相関実験。

研究に用いた SHRSP は疾患モデル研究センターより購入した 4 週齢のオスを 1 週間慣らし飼ったのち、即ち 5 週齢で広島大学・放射線医科学研究所の低線量率照射装置を用いて照射した。下記の照射期間が終了した後は、非照射野に移動して飼育し、脳卒中の発症時期を観察することにより線量率の変化が発症時期にどのような影響を及ぼすかを観察した。線量率としては 0.05Gy/日および 0.1Gy/日を、また集積線量としては 0.5Gy (0.1Gy/日×5 日) および 1Gy (0.05Gy/日×20

日および0.1Gy/日×10日)を用いた実験を行った。平成29年度に得た結果では、発症時期は低線量率照射したどの群においても、非照射群との間に差は認められなかった。そこで、その結果の再現性を検証するために、平成30年度でも同じ条件で照射したSHRSPを用いて実験を行った。

2. 放射線被曝がどのようにして循環器疾患をもたらすかの機序研究

研究に用いたSHR、SHRSPおよびWister-Kyoto(WKY)は、疾患モデル研究センターより購入した4週齢のオスを1週間慣らし飼いしたのち、即ち5週齢で広島大学・原爆放射線医科学研究所のガンマーセル照射装置を用いて照射した。対照群としては、照射していない各ストレインのラットを用いたが、その際において、放射線を照射した以外は、全て同じ環境(例えば、ストレスをできるだけ同一にするために、非照射群においても、照射群に行ったのと同じように、照射中の体位の変化を妨げるためにプラスチック容器に入れ、照射装置内に同じ時間置いた。但し、照射はしていない)で実験を行った。

平成28年度、平成29年度においては、種々の線量(0.1、0.25、0.5、1Gyおよび対照群として0Gy)をSHRSPに照射した後に1週目、3週目、5週目で全血採取し血漿・血清試料を得た。臓器はOCT(オプティマル・カッティング・テンペレチャー)に凍結包埋した。平成30年度においては、SHRSPに0.25、0.5、1、2Gyを照射して10週目に、また1および2Gyに関しては5週目にも、上記の試料を得た。更に、SHRおよびWKYにも種々の線量(0.25、0.5、1、2Gyおよび0Gy)を照射して、照射後5週目、10週目で試料を得た。また、必要に応じて、先行研究で得た4Gy照射した後、10週目、20週目の血清も用いた。

上記の試料は、その目的に応じて放影研で使用されるとともに、静岡県立大学および茨城大学に送付され、各々の目的のために用いられた。

① サイトカインの測定

サイトカイン類の測定はバイオラッド社製のマルチプレックスキットを用い、同社のマニュアルに従って、放影研で行った。

② 血球成分の分析

広島大学・原爆放射線医科学研究所の機器を使用して行った。試料としては抗凝固剤としてヘパリンを用いて得た血漿を使用した。

③ メタボローム解析 (研究協力者の津山と水野が実施した)

a) イオン化補正法の確立

本研究では、多数の血清検体を液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)で連続分析した。測定回数の増加にともない、イオン源の汚れ等により検出感度が低下し分析データがばらつくため、補正を行った。補正の為、試料全てを均一に混合させた標準試料(QC)を作成し、10試料測定

ごとにQC試料を測定した。QC試料を含むすべての試料データをアライメントした後、QCデータに含まれる各々のピーク強度の変動について測定回数との相関を求めた。この相関関数(補

正式) を用いて試料に含まれる同一ピークについて、測定回数によるピーク強度の補正を行った。

また、安定同位体窒素を用いた補正も行った。¹⁵Nにより標識したクロレラ乾燥粉末 100 mg に 10 mL のメタノールを加え、氷冷下で超音波処理することでクロレラ内の代謝物を抽出した。得られたクロレラ抽出液を親水クロマトグフィー(BEH Amide, 2.1×150 mm, Waters)で分離し、質量分析計(Xevo G2-XS QToF, Waters)で測定した。測定には正イオンを検出するポジティブおよび負イオンを検出するネガティブの両モードを使用した。得られた LC-MS データは理化学研究所・環境資源科学研究センター・メタボローム情報研究チームで開発された統合解析プログラム(MS-DIAL)を用いてピーク抽出およびアライメントを行った。得られたピークの精密質量値から¹⁵N 標識化クロレラ代謝物を抽出し、正規化のための内部標準ピーク候補とした。

b) 放射線照射により生じた血清中の変動分子の探索

放射線(4Gy)を照射した SHR および WKY を照射群として、また対照としては非照射群を用いた。照射後 5 週目、10 週目および 20 週目に採取した血清をメタノール処理し、抽出物を親水クロマトグフィー(BEH Amide, 2.1×150 mm, Waters)で分離し、質量分析計(Xevo G2-XS QToF, Waters)にて分析した。内部標準として各試料にクロレラ抽出液を等量添加した。また、連続分析による感度低下を補正するため、全ての測定試料を等量混合した QC 試料を 10 測定ごとに分析した。得られたデータは解析ソフト(Progenesis QI, Waters)にてピーク抽出、アライメント後、QC データと内部標準ピークによる補正を行った。これらのデータの分散分析、多変量解析、t-検定による試料間の比較を行い、線量にともない有意に増減したピークを抽出した。得られたピークの精密質量値からデータベース検索(KEGG, METLIN, LIPID MAPS)を行い、代謝物の推定を行った。

c) 低線量放射線照射により生じた血清中の変動分子の探索

SHRSP に 0.5Gy を照射したものおよび非照射群を対照として用いた。照射後 1 週目および 5 週目に採取した血清を同様に処理し、親水クロマトグフィーで分離し、質量分析計にて分析した。内部標準や QC 試料も同様に処理した。データ解析も同様に行った。

④ DNA 損傷、酸化損傷、炎症反応などの検査。分担研究者・茨城大学・中村麻子の報告書を参照。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトを研究対象として行うものではない。動物実験に関しては、広島大学動物実験指針を遵守するとともに、「動物の愛護及び管理に関する法律」並びに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に則って計画を作成し、広島大学動物実験委員会より承認を受けて行った。実施する動物実験等は通常の実験範囲のものであり、特段、倫理的に問題のあるものとは思われない。

III. 研究結果

1. 低線量率放射線と脳卒中発症時期との相関

平成 29 年度に、線量率としては 0.05Gy/日および 0.1Gy/日を、また集積線量としては 0.5Gy(0.1Gy/日×5日)および 1Gy(0.05Gy/日×20日および 0.1Gy/日×10日)を用いた実験を行ったところ、各照射群の脳卒中発症時期は非照射群と変わらないとの結果を得た。そこで平成 30 年度では、再現性を確認するための実験を行った。この実験においても、前年度と同様な結果、即ち、照射した各群では、非照射群と比べて発症時期の早期化は観察されなかった。そこで両年度の結果をまとめて報告する。下図(図 III-1)で示されるように、いずれの照射群においても、非照射群に比べ脳卒中発症時の有意な早期化は認められなかった。

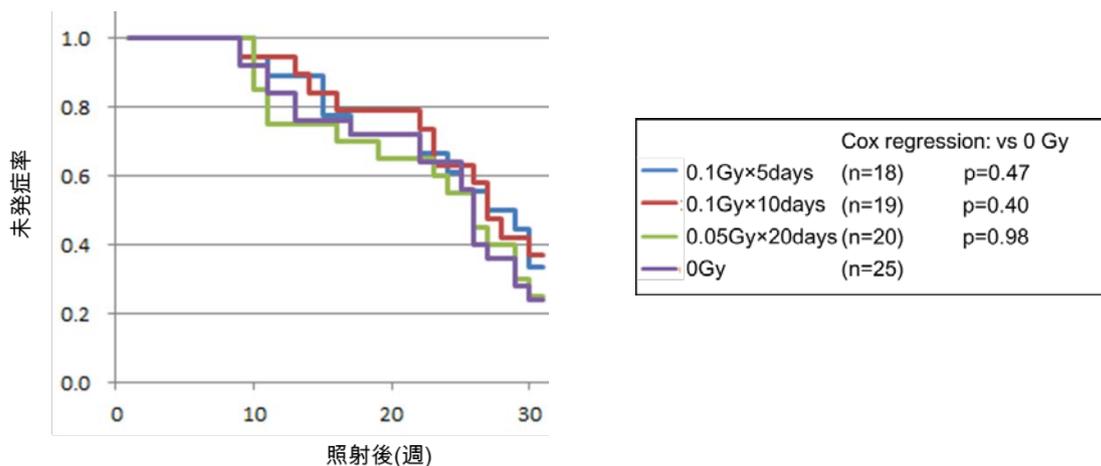
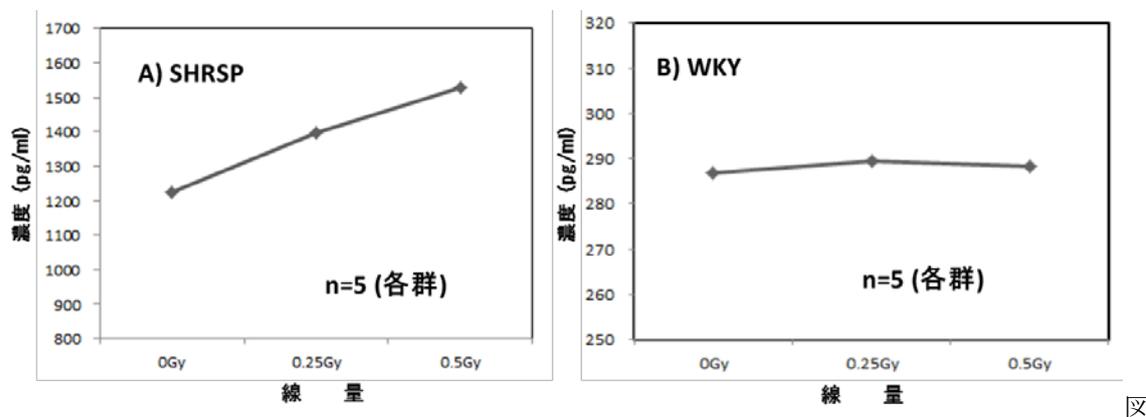


図 III-1 低線量率照射した放射線量と脳卒中発症時期の関係

2. 放射線被曝がどのようにして循環器疾患をもたらすかの機序研究

① サイトカイン測定の結果

測定したサイトカインはインターロイキン(IL)-1 α 、1 β 、2、4、5、6、10、12p70、13、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン(INF)- γ 、腫瘍壊死因子(INF)- α である。



III-2 照射線量とサイトカイン(IL-13)の測定値

(0.5Gy 照射した A)SHRSP と B)WKY から照射後 5 週目に得た血清の測定値)

照射後 1 週目に得た血清では、SHRSP においては、照射線量の上昇に伴い、10 種(IL-5 と GMCF を除く)のサイトカインで濃度の増加が認められたが、WKY では認められなかった。照射後 5 週目に得た SHRSP の血清では、IL-2、IL-13 および TNF- α で、この傾向は認められたのに対して、WKY ではこの傾向は認められなかった。(図 III-2) 一方、1、2Gy の照射後 5 週目の SHRSP で観察された濃度は多くのサイトカインで 0.5Gy と同程度であった。

② 血球成分の分析値

高線量(1Gy および 2Gy)照射した SHRSP は照射後 10 週目近辺で脳卒中発作を起こす場合が多々認められたので、測定には適さなかった。

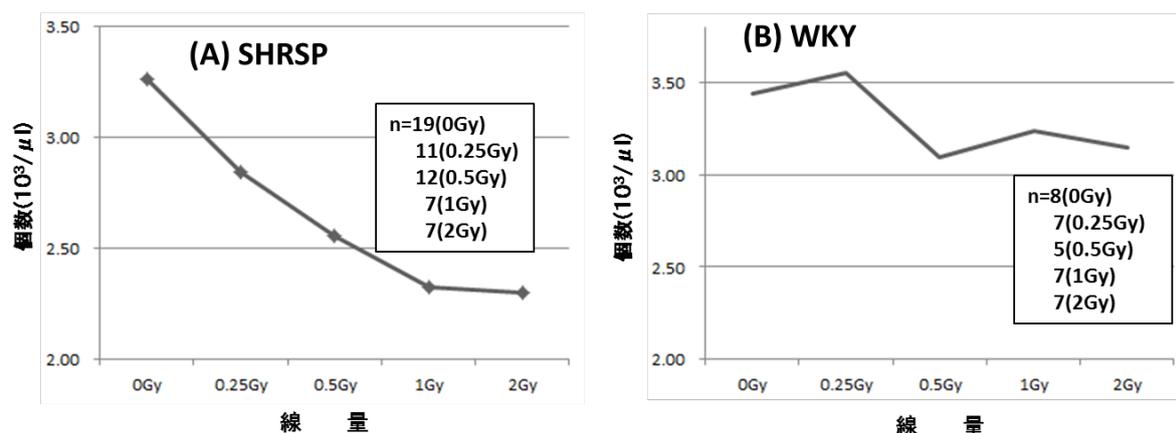


図 III-3 照射線量と白血球数 (照射した (A) SHRSP、(B) WKY から照射後 5 週目に得た血漿の値)

各線量(0Gy~2Gy)を照射したのち 5 週目で得た SHRSP および WKY の試料を用いて血球成分を測定した。図 III-3 に示すように、SHRSP においては線量の増加に伴い白血球数は急激に減少したが、WKY では減少は認められなかった。一方、照射後一週目では線量ともなう減少は WKY、SHRSP ともに観察された。WKY の方が SHRSP に比べて放射線による減少が早く回復することが観察された。他の血球成分(赤血球、血小板)には、線量ともなう激しい変化は観察されていない。

③ メタボローム解析

a) 安定同位体標識化クロレラと QC によるイオン化補正

各試料から得られたデータを解析したところ、エレクトロスプレーイオン(ESI)源の汚染による感度低下のため QC サンプルのピーク強度が測定開始後から徐々に低下していた。このピーク強度の低下が直線的であったため、測定間でピーク強度が一定になるように以下の補正式を考案した。

$$\text{補正式: } Y_n' = Y_n / (a \times X_n + b) \times (a \times X_{QC1} + b)$$

(Y_n' : 補正後のピーク強度、 Y_n : 補正前のピーク強度、 X_n : 測定したタイミング、 X_{QC1} : 1 本目の QC を測ったタイミング、 a : QC の傾き、 b : QC の切片)

補正式によるデータ補正を行った結果、各ピークの変動係数(CV)値は大幅に改善された。図 III-4 は QC 測定データにおけるアスパラギン酸イオンのピーク強度をプロットした結果で、補正前は徐々にピーク強度が低下しているのに対し、補正後はピーク強度がほぼ一定になった。また、

ポジティブイオンモードおよびネガティブイオンモードで検出された同一アミノ酸の放射線照射による挙動は同様の動きを示したため、本実験系の妥当性が示された。

クロレラ抽出液のLC-MS解析の結果、安定同位体 (^{15}N) 標識化クロレラの代謝物はポジティブイオンモード、ネガティブイオンモードで、それぞれ130本ほど検出された。¹ また、これらの代謝物中の窒素原子はほぼ全て安定同位体に置換されていることが確認されたことから、これらを内部標準物質として使用した。本正規化法の検証のため、プール血清にクロレラ抽出液を加えてLC-MSで連続分析 (n=9) した結果、検出された血清由来代謝物ピークのうち、CVが30%以下のものは20本であったのに対し、安定同位体標識クロレラ代謝物による補正後では80本ほどに大きく改善した。これらの結果から、安定同位体標識化したクロレラ代謝物を内部標準物質にした分析法の有用性が示された。

以上の結果より、補正式と安定同位体標識クロレラ代謝物を使用する正規化を用いることによってLC-MSによるデータ間のばらつきを補正し、正確なサンプル間比較を行うことができた。

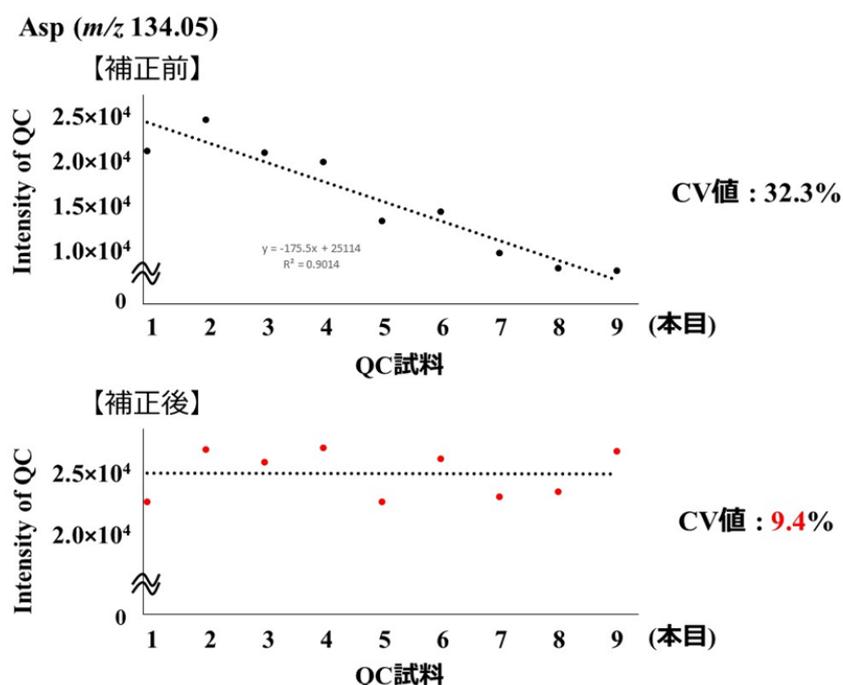


図 III-4 QC サンプル測定で検出されたアスパラギン酸イオン (m/z 134.05, $[\text{M}+\text{H}]^+$) のピーク強度。上段はイオン化補正前で、下段は補正式による補正後である。補正前のピーク強度平均値 (n=9) の CV 値は 32.3%であったが、補正後には 9.4%となり、ばらつきが改善した。

b) 放射線照射により生じた血清中の変動分子の探索

照射後 5 週目、10 週目、20 週目の SHR および WKY から得た血清の LC-MS データの主成分解析を行ったところ、照射の有無で明確にクラスタを形成した。(図 III-5)

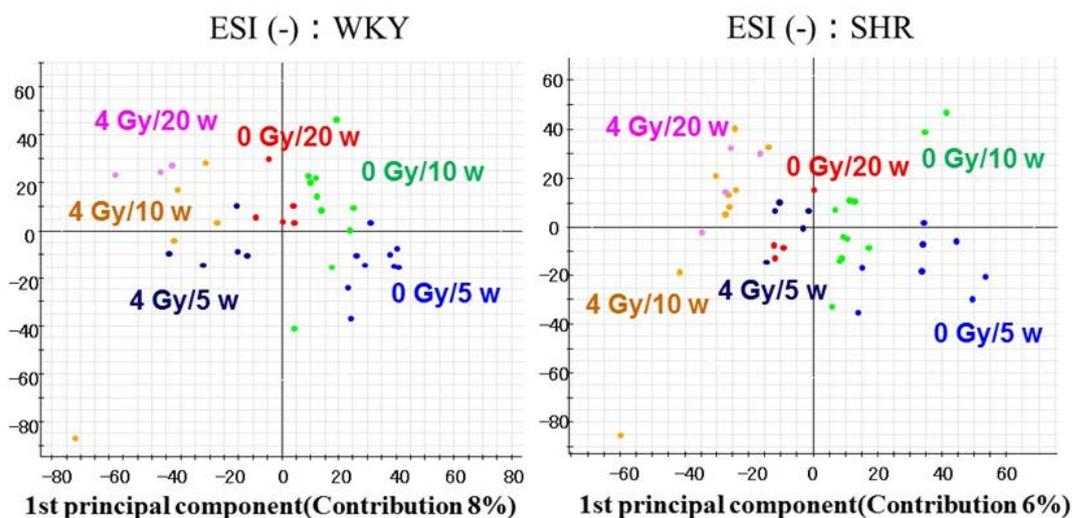


図 III- 5 左はWKY、右はSHRの放射線(0Gyおよび4Gy)照射後5週目、10週目および20週目の血清中の代謝物のLC-MSスペクトルを用いた主成分分析結果

また、照射後の期間別に、判別分析を用いて放射線照射によって有意に変動したピークを調べたところ、5週目、10週目、20週目でそれぞれ約5,000本、3,600本、750本が抽出された。この結果から照射後から時間が経つにつれて変動ピークの数が増える傾向が明らかとなった。とくに胆汁酸代謝物では、SHRとWKYのどちらのラットにおいても照射後に大きく変動を示した。(図III-6) その中でも胆汁酸生合成経路上のコール酸やケノデオキシコール酸はSHRとWKYとでは、放射線照射後の変化が大きく異なっていた。SHRでは照射後20週目に得た血清において、照射群のコール酸の値が非照射群に比べ高い値を示していることから、放射線被曝と高血圧症との関係を示すマーカー分子であることが示唆された。

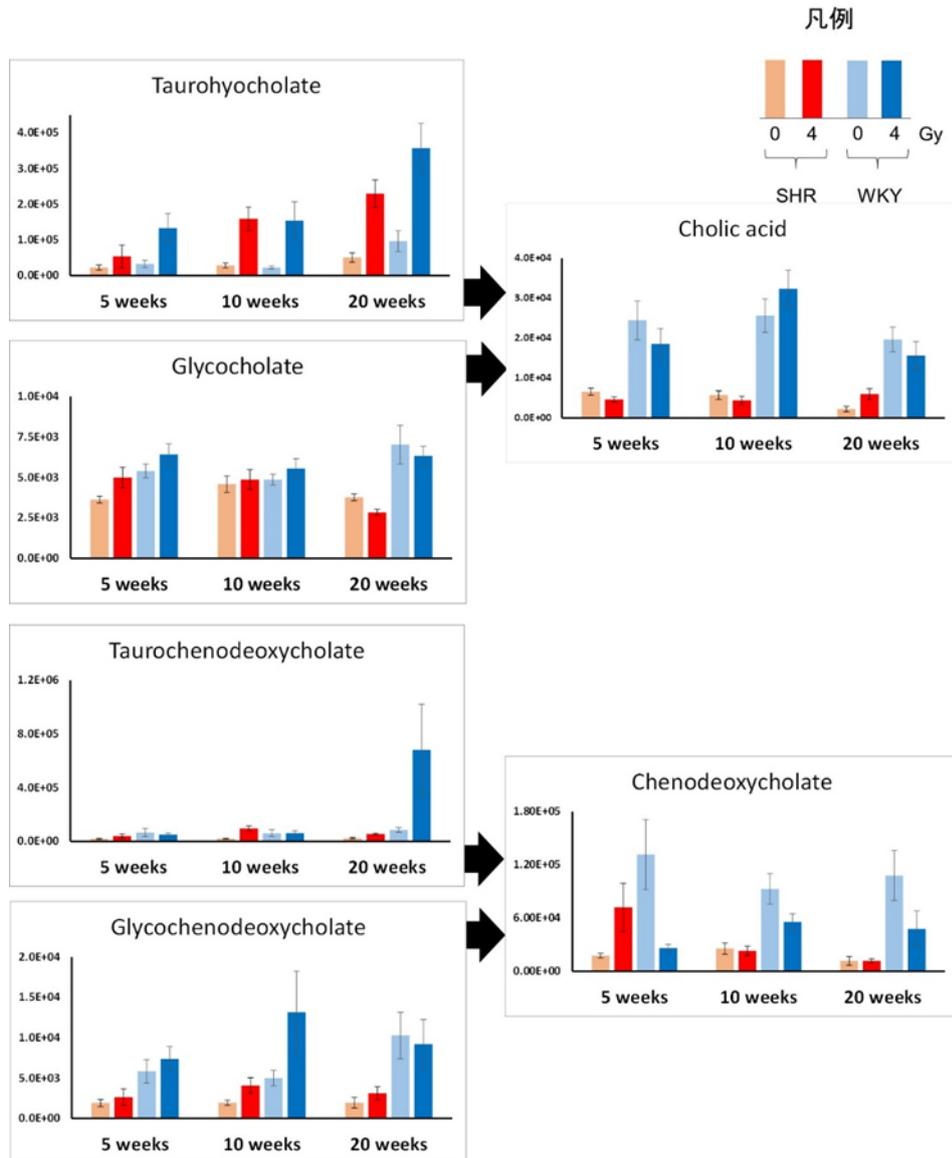


図 III-6 SHR および WKY から照射後 5 週目, 10 週目, 20 週目に得た血清の胆汁酸代謝物の変動解析の結果

c) 低線量放射線照射により生じた血清中の変動分子の探索

照射後 1 週目および 5 週目で SHRSP から得られた血清の各 LC-MS データの主成分解析を行ったところ、照射の有無により区別することができた。(図 III-7) さらに判別分析により、1 週目および 5 週目でそれぞれに特異的に変動が見られたピークを探索したところ、1 週目および 5 週目の試料で、それぞれで約 2,600 本、300 本が抽出された。これらのピークには、照射後 1 週目のみで変動しているピークと、1 週目・5 週目で継続的に変動しているピークの 2 通りあることが分かった。これらのピークの m/z 値から各種代謝物データベースを用いて代謝物を推定した結果、照射後 1 週目のみで変動の大きかった代謝物として TCA サイクルや糖代謝関連代謝物に加え、アデニンなどの核塩基の酸化物や不飽和脂肪酸などが挙げられた。一方で継続的に変化していた代謝物としてはコール酸やその代謝物が挙げられた (図 III-8)。

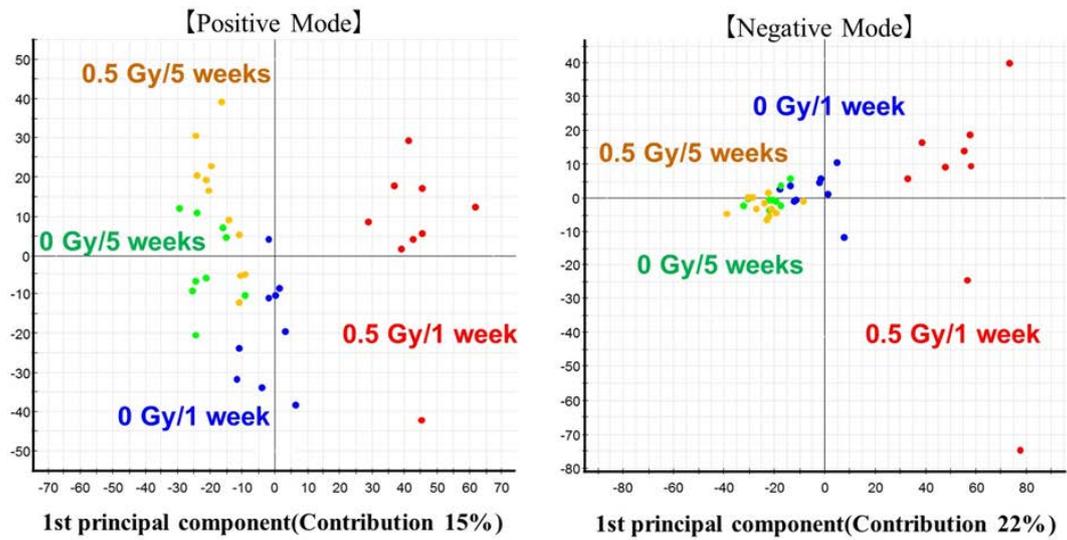


図 III-7 照射後 1 週目および 5 週目の SHRSP より得た血清における LC-MS データの主成分分析の結果。左はポジティブイオンモード、右はネガティブイオンモードの結果を示す

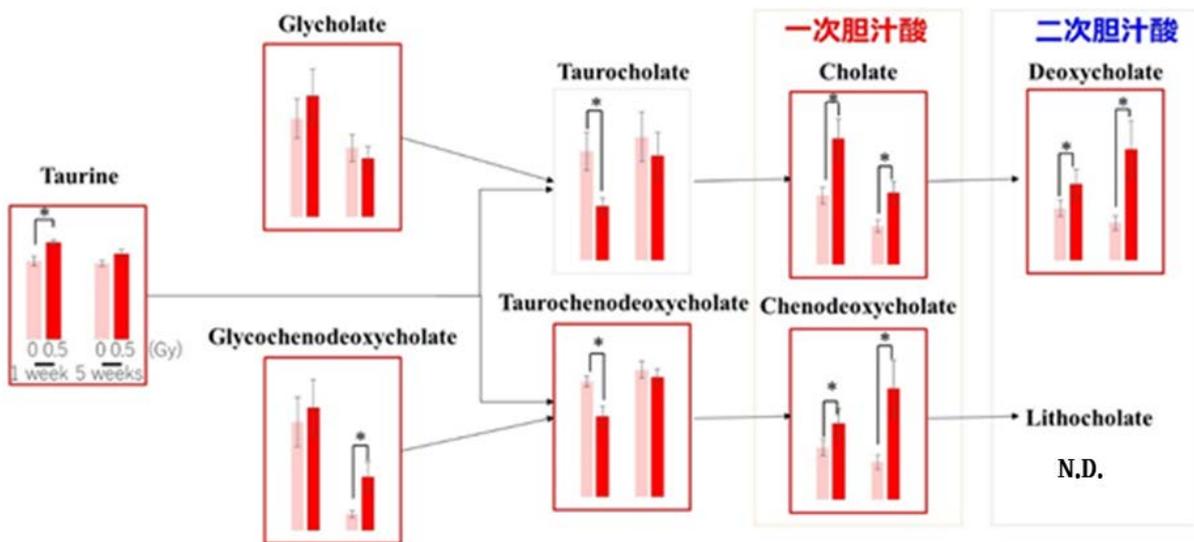


図 III-8 低線量放射線照射した SHRSP より得た血清中の胆汁酸合成に関連する代謝物の変動解析結果

IV. 考察

放射線被曝と循環器疾患リスクが相関することについては、高線量一括照射した SHR および SHRSP を用いた先行動物実験で、それがストレスなどの修飾要因ではなく放射線そのものの影響であることが有力に示唆された。同様に、先行研究として実施された、低線量(0.1Gy)照射した SHRSP では非照射群に比べ脳卒中発症時期の早期化が認められたが、その有意性は境界領域であった($p=0.056$)。本研究において実施した、0.05Gy 照射群では早期化は認められなかった。このことより、0.1Gy 近辺にしきい値が存在することが示唆された。放射線の循環器疾患への影響は従来多細胞影響と考えられ、しきい値の存在が報告された。しかし、その値は被曝したヒトの1%が10年以降に循環器疾患を発症する線量から類推したもので実際の観察に由来するものではない。(ICRP Publication 118²) 一方、Littleら³は、10集団からなる医療被曝および職業被曝したヒトおよび原爆被曝者のうち被曝線量が0.5Gy以下から得た死亡率データを用いて循環器疾患のメタ解析を行ったところ、その相対リスクは、しきい値なし直線仮説(LNT仮説)に適用していると考えられた。従って、この説に従えば、極めて低線量領域においても放射線量に比例して循環器疾患リスクが上昇することが示唆される。一方、今回我々が得た SHRSP を用いた実験結果では、少なくとも0.05Gyではリスクの上昇は認められなかった。この結果は、我々が用いたラットストレスインに由来するのかもしれないが、しきい値の存在を示唆するものである。

低線量率放射線と循環器疾患のリスクの相関を調べた結果は、興味深いものである。即ち、0.5Gy および1Gyの放射線が一括照射された SHRSP では脳卒中発症時期は非照射の発症時期に比べて有意に早期化していたのに対して、平成29年度に行った、低線量率(0.1Gy/日および0.05Gy/日)放射線を集積線量が0.5Gy および1Gyになるまで照射した SHRSP では、照射群の脳卒中発症時期と非照射 SHRSP の発症時期と間には全く差は認められなかった。これに対して、ICRP Publication 118³では、一括照射、分割照射、緩照射の間で、そのしきい値に差はないと仮定されている。このことは非常に重要なことと考えられるので、本年度(平成30年度)に前年度と同様な実験を行った。その結果は、前年度と同様に、いずれの照射群においても、非照射群と比較して、発症の早期化は認められなかった。(図 III-1) 即ち、昨年度の結果の再現性が認められた。本研究より得られた線量率効果係数は、報告されている値より極めて高いことが推定された。

照射後1週目で SHRSP より得た血清では、測定した12種の内 IL-5 と GM-CSF を除く10種のサイトカインの濃度は、非照射群のものより増加していた。一方、照射後5週目で得た血清中では、3種(IL-2, 13 および TNF- α)で増加していた。これに対して、WKY では線量依存的に増えていたものはなかった。(図 III-2) これらは循環器疾患に相関することで知られたサイトカイン類である。このことより、SHRSP では照射直後に、放射線により生じた炎症にともない種々のサイトカインが分泌され、その濃度が上昇する。しかし、時間経過にともない炎症の修復が起こるので、その濃度は減衰すると考えられる。その修復過程でも、サイトカインなどが産生され、種々の細胞の線維化が起こることは良く知られている。このように炎症に伴い分泌されたサイトカインは循環器疾患の一因となっているものと考えられる。これに対して脳卒中様症状を呈さない WKY ではそのようなサイトカイン類の濃度変化は観察されなかった。サイトカインの線量にともなう変化が、SHRSP の線量の増加にともなう脳卒中リスクの増加を促している可能性は考えられる。

血球成分の内、白血球の数値は照射後1週目では、WKY および SHRSP とともに線量の上昇にとも

ない減少していた。しかし、5 週目では SHRSP では減少が継続していたのに対して WKY では回復していて、線量にともなう変化は観察されなかった。(図 III-3) SHRSP で観察された、白血球数の回復力の低さが、SHRSP にのみで脳卒中の発症時期が放射線により早期化する原因とも考えられる。即ち、この回復力の相違が、脳卒中の発症時期の早期化が SHRSP にだけ認められ、WKY には観察されない要因である可能性が類推される。

4Gy の放射線を照射した SHR および WKY の血清代謝物分析により、照射後 5 週間では TCA サイクルや核酸代謝物など、エネルギー産生や DNA 合成に関与する分子等多くの代謝物に変化した。一方で照射 20 週目では変動を示した代謝物は少なかったことから、ほとんどの代謝物の変動が放射線被曝による一時的な細胞/組織障害に関与することが示唆された。その中でコール酸などの胆汁酸生合成経路上の代謝物では、20 週目においても持続的な変化が確認されたため、これらの胆汁酸代謝物が放射線照射と循環器疾患に関連するバイオマーカー候補となり得ることが示された。(図 III-6)次に、低線量照射した SHRSP の血清代謝物分析を行った結果、照射後に様々な代謝物に変化していることが分かった。特に SHRSP の低線量照射では、細胞のエネルギー産生に関与する TCA 回路や糖代謝に関係する代謝物が、照射後 1 週目という比較的短時間で大きく変動し、5 週目では照射していないグループとほぼ同等の数値に回復した。この結果は以前に我々が低線量放射線を照射した細胞を用いて細胞内代謝物の変動を調べた結果⁴と同様であり、放射線照射により細胞損傷や修復などラット体内において劇的な変化が一時的に起こっていることが示唆された。一方、胆汁酸生合成に関連するコール酸などの代謝物は、照射後 1 週目で大きく変動し、その後 5 週目でも変化し続けていることから、ラット体内で慢性的な脂質やコレステロールの代謝変化が起きていることが示唆された。(図 III-8)これらの事象もまた、放射線照射と循環器疾患に関連するバイオマーカー候補となり得ることが考えられた。

尚、本研究ではラット血清を用いた分析のため、ヒトにおいてバイオマーカーとしての有用性については更なる検討が必要であると考えられる。

V. 結論

本研究で用いているモデル動物では、我々の先行実験でも示されている通り、極めて高感度で放射線と循環器疾患の発症リスクとの関係を観察することができる。一方、このモデル動物は高血圧および脳卒中を発症するモデルであり、この成果が直ちに、ヒトにおける放射線と循環器疾患のリスクの相関を直接的に証明しているものではない。しかし、ヒトを用いた研究(例えば、疫学的研究)では、低線量・低線量率放射線の影響を証明することは極めて困難であり、また不確実性をともなっている。そのため動物実験で得られる情報も、大変有意義であると考えられた。

本研究の結果より、脳卒中発症時期を指標とした場合、0.1Gy 近辺にしきい値が存在することが推定された。また、低い線量率で照射した SHRSP では集積線量が高い場合でも、脳卒中の発症時期の早期化は観察されなかった。平成 30 年度に再度の実験を行ったところ、再現性は確認された。線量率効果係数は従来の結果より極めて高いことが推定された。線量率の変化にともなう影響の評価には、今回用いたような高感度な動物実験は有効であると思われた。

『どのような機序で放射線と循環器疾患リスクの上昇が相関するか?』と言う命題に関しては、

種々の興味あるデータが得られた。即ち、線量の増加にともない種々の生物的マーカー、即ち、血球成分、炎症マーカーレベルおよび循環器疾患に相関する代謝産物の変化などである。この結果より、種々の機序が想定されたが、不十分な点が多々あることは明らかであり、より確定的なものを得るためには更なる実験が必須である。

モデル動物より得られたものではあるが、本成果は、放射能汚染地域の住民、核関連施設の作業員、放射線取扱者、宇宙飛行士などの低線量・低線量率放射線被曝による循環器疾患リスクの上昇を考える上で、極めて有用な情報を提供している。更に、この過程で得られた種々のマーカーは個体のリスク評価を行うにあたり有用なだけでなく、それらを標的としたリスク低減化策の構築の可能性を示唆している。

VI. 次年度以降の計画

本研究は、SHRSP は低線量被曝で脳卒中の発症時期が早まるのに対し、SHR や WKY は高線量照射しても、脳卒中の発症時期が早期化しないことを示した。これは、放射線被曝と脳卒中発症リスクの変化は遺伝的素因により修飾されることを示唆している。この3種の系統のラットを、今回用いられた方法論などを駆使し比較することにより得られた相違点を基に、有効なヒトマーカーを同定できれば、放射線によりもたされる脳卒中ひいては循環器疾患リスクに対する『感受性の個人差』の指標とすることができる可能性がある。核施設作業員、環境汚染地域の居住者などに対する影響の軽減化についての有益な情報となることが期待される。更に、この情報は放射線治療の分野でも有効になると考えられる。即ち、個人の感受性の違いを用いた『個別化医療・治療』の分野にも展開できる可能性が期待される。

本研究は、線量率が下がると脳卒中発症時期の早期化が認められなくなることを示した。高線量率および低線量率放射線を照射した SHRSP の種々のマーカー（組織形態的な変化、遺伝子発現量の変化、代謝物量の変化など）を比較することにより得られる結果は、低線量率放射線を被曝しているヒトにおける脳卒中発症リスクを考える上で、極めて有用な情報を提供するものと期待される。

VII. 業績

A. 論文：査読あり

該当なし

B. 論文：査読なし

該当なし

C. 学内学会発表

1) 小泉久美子, 高橋規郎, 中村麻子. 放射線被ばくによる循環器疾患リスク増加における組織応答解析. 日本放射線影響学会第 61 回大会, 平成 30 年 11 月 7-9 日, 長崎市

2) 高橋規郎, 村上秀子, 大石和佳, 三角宗近, 長町安希子, 稲葉俊哉, 田中聡, 田中イグナシヤ, 津山尚宏, 中村麻子, 水野初. 低線量・低線量率放射線被曝と脳卒中リスクとの

関係 日本放射線影響学会第 61 回大会, 平成 30 年 11 月 7-9 日, 長崎市

3) 山本 健太、鎌田 淳史、水野 初、津山 尚宏、村上 秀子、長町 安希子、稲葉 俊哉、豊岡 利正、高橋 規郎、轟木 堅一郎. 低線量放射線被ばくによる血清中代謝物変動解析と循環器疾患関連分子探索 第 8 回新アミノ酸分析研究会、平成 30 年 12 月 17 日、大田区、東京都

D. 国際学会発表

1) Takahashi N, Murakami H, Ohishi W, Misumi M, Nagamachi A, Inaba T, Tanaka S, Tanaka I, Tsuyama N, Nakamura AJ, Mizuno H. The association between either low-dose or low-dose rate radiation exposure and increasing risk of circulatory diseases- Attempt to infer potential mechanisms underlying the radiation associated circulatory disease. 64th Annual Meeting of the Radiation Research Society, Sep. 23-26, 2018, Chicago, Illinois, USA,

E. 著書

該当なし

F. 講演

- 1) 『施設公開(オープンハウス)で環境中に放射線が存在することを実験的に示した。』平成 30 年 8 月 3 日、4 日、放射線影響研究所、広島
- 2) 『施設公開(オープンハウス)で環境中の放射線に関する実験および講演』平成 30 年 8 月 8 日、9 日、放射線影響研究所、長崎
- 3) 『出前授業;環境中の放射線に関する講演』平成 30 年 10 月 29 日、広島市立沼田高校
- 4) 『出前授業;環境中に放射線が存在することを実験的に示す』平成 30 年 11 月 28 日、広島県海田町立海田西小学校
- 5) 『出前授業;環境中の放射線測定器を用いて測定および講演』平成 30 年 12 月 27 日、広島市立口田中学
- 6) 『出前授業;環境中の存在する放射線の測定および説明』平成 30 年 12 月 27 日、広島市立戸坂中学
- 7) 『出前授業;環境中の存在する放射線の測定および説明』平成 31 年 1 月 23 日、24 日、広島市立古田中学
- 8) 『放射線に関する説明。放射線の測定方法などの実技演習および講演』平成 31 年 2 月 17 日広島市・平和記念資料館

G. 主催した研究集会

該当なし

H. 特許出願・取得

該当なし

I. その他

該当なし

VIII. 参考文献

1) Mizuno H, Ueda K, Kobayashi Y, Tsuyama N, Todoroki K, Min JZ, Toyo'oka T., The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics., *Biomed Chromatogr.* 31(1). doi: 10.1002/bmc.3864, 2017

2) ICRP, 2012. ICRP Statement on Tissue Reactions / Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs – Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context. ICRP Publication 118. *Ann. ICRP* 41(1/2), 2012.

3) Little MP, Azizova TV, Bazyka D, Bouffler SD, Cardis E, Chekin S, Chumak VV, Cucinotta FA, de Vathaire F, Hall P, Harrison JD, Hildebrandt G, Ivanov V, Kashcheev VV, Klymenko SV, Kreuzer M, Laurent O, Ozasa K, Schneider T, Tapio S, Taylor AM, Tzoulaki I, Vandoolaeghe WL, Wakeford R, Zablotska LB, Zhang W, Lipshultz SE. Systematic review and meta-analysis of circulatory disease from exposure to low-level ionizing radiation and estimates of potential population mortality risks. *Environ. Health Perspect* 120: 1503–1511, 2012

4) Tsuyama N, Mizuno H, Katafuchi A, Abe Y, Kurosu Y, Yoshida M, Kamiya K, Sakai A., Identification of low-dose responsive metabolites in X-irradiated human B lymphoblastoid cells and fibroblasts., *J Radiat Res.* 56(1):46-58, 2015

The association between either low-dose or low-dose rate radiation exposure and increasing risk of circulatory diseases. - Attempt to infer potential mechanisms underlying the radiation associated circulatory diseases -

N.Takahashi¹, H.Murakami², W.Ohishi³, M.Misumi⁴, N.Tsuyama⁵, A.J.Nakamura⁶, H.Mizuno⁷

¹ *Consultant, Radiation Effects Research Foundation (RERF),*

² *Dept. of Molecular Biosciences, Radiation Effects Research Foundation (RERF),*

³ *Dept. of Clinical Studies, Radiation Effects Research Foundation (RERF),*

⁴ *Dept. of Statistics, Radiation Effects Research Foundation (RERF),*

⁵ *Dept. of Radiation Life Science, Fukushima Medical University School of Medicine,*

⁶ *Dept. of Biological Science, College of Science, Ibaraki University,*

⁷ *Laboratory of Analytical and Bioanalytical Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka*

Key word : Model Animal, Risk of Circulatory Diseases, Radiation Effects, Radiation Exposure, Low-dose, Low-Dose Rate Radiation

Abstract

Previous epidemiological findings among atomic bomb survivors conducted at RERF suggested that radiation may be associated with increased risk of circulatory diseases (CD). On the other hand, inconsistencies have been observed among various studies, especially low-dose and low-dose rate occupational and environmental exposures. Given the uncertainties, studies using irradiated animals are being conducted to assess whether or not risk of CD is elevated with radiation exposure. We also have been obtaining information about biological mechanisms through animal model studies.

Stroke-prone spontaneous hypertensive rats (SHRSP), irradiated with even around 0.1 Gy, showed stroke symptoms earlier than unirradiated sham SHRSP. However, SHRSP irradiated with 0.05 Gy did not show those effects. This suggested there might be a threshold in the radiation dose effect around 0.1 Gy. With respect to low-dose rate exposure, examinations where SHRSP rats were chronically irradiated with an accumulated dose of 0.5 or 1 Gy (dose rate was 0.05 or 0.1 Gy/day, respectively), did not show any significant radiation effects. The data indicated the dose-rate factor might be higher than those previously reported.

To elucidate mechanisms of radiation-associated CD, we have measure blood markers, such as cytokines, blood cell components, biochemical substances, and metabolites. We collected the biomarker data from SHRSP, spontaneous hypertensive rat (SHR) and Wister-Kyoto (WKY) irradiated with various doses (0.1-2.0 Gy) and sequentially sacrificed at 1, 3, 5, 10 and 20 weeks after irradiation, and compared marker levels among dose groups.

Metabolome analyses for sera from SHRSP demonstrated that the levels of some metabolites, such as bile acids, were altered with radiation doses. Moreover, cytokines, IL-2, IL13 and TNF-alpha, were also altered among SHRSP but not WKY. Those were closely related with cause of CD.

The introduction of various assay systems may provide valuable data for inferring mechanisms of CD at lower-dose radiation exposure and long-term effects after irradiation.

2-1-a 低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか？低線量率放射線

は？放射線関連循環器疾患の機序の解明

(分担) 放射線被ばく後の DNA 損傷応答および炎症反応が 循環器疾患発生に与える影響の明確化

分担研究者：中村 麻子（茨城大学 理学部 教授）

研究要旨

放射線誘発生物影響として最も社会的関心が高い疾患が癌であるが、原爆被爆者に対する調査などから、循環器疾患も放射線によってその発症リスクが線量依存的に上昇する疾患として考えられている。しかしながら、これまでの疫学的な調査では放射線以外の環境リスク因子の影響を排除することの難しさなどから、放射線が循環器疾患リスク上昇の直接的な因子であるという証明には至っていない。一方、高血圧自然発症ラット（SHR）や易脳卒中発症ラット（SHRSP）などの動物モデルを用いた先行研究では、放射線線量依存的に血圧上昇や脳卒中発生頻度上昇が認められることが分かっている。

そこで、本研究では放射線誘発性循環器系疾患の発症メカニズムの解明および、発症リスク低減のための分子標的同定を最終目的として、動物モデルを用いて様々な放射線応答反応を評価した。具体的には、放射線照射された SHR および SHRSP 由来の臓器組織を用いて DNA 損傷レベル、酸化損傷レベル（8-OHdG）、溶血の検出、アポトーシスレベルなどについて免疫組織化学的手法を用いて検討を行った。さらに、放射線照射後のラット由来血清中の炎症性サイトカインレベルについて ELISA 法を用いて検討を行った。

本研究結果は、放射線誘発循環器疾患の発症メカニズム解明や責任臓器の同定につながると期待される。

キーワード

放射線、DNA 損傷、H2AX、炎症反応、循環器疾患

I. 研究目的

先行研究から放射線被ばくによって循環器系疾患のリスクが上昇することが示唆されている。しかしながら、循環器疾患リスク上昇と放射線線量・線量率との相関性や、発症の分子メカニズムについては全く不明である。現在懸念されている低線量率慢性放射線被ばくによる健康影響を評価するためには、放射線被ばくと循環器疾患リスクとの関係性を分子レベルで明確にし、リスク上昇の危険性がある場合にはその低減策を確立することが重要である。そこで本研究計画では、放射線による循環器疾患誘導を観察可能な動物モデル（SHR ラットモデルおよび SHRSP ラットモデル）を用いて、放射線被ばく後の経時的な細胞組織学的変化を様々な分子マーカーを用いて検討した。具体的には、放射線被ばく後の SHR ラットおよび SHRSP ラット由来の凍結臓器サンプルについて、薄切組織切片の作製し、DNA 二本鎖切断、アポトーシス、酸化 DNA 損傷、活性マクロファージに対する分子マーカーを用いた免疫蛍光染色による組織応答反応の評価を行った。

昨年度までに、放射線照射後の SHR ラット由来腎臓において顕著な DNA 損傷の誘導に加え、酸化 DNA 損傷の上昇や糸球体特異的な細胞死の誘導が検出された。また、心臓組織では線量依存的な線維化が検出されたことから、放射線照射による晩発的な腎機能障害が循環器臓器への負荷を増大されていることが予想された。

そこで本年度は、SHR モデルで認められた放射線誘発性組織応答変化が、脳卒中モデルである SHRSP ラットでも認められるのか、さらには低線量被ばくにおいても線量依存的な応答変化を生じるのかを検討するために、SHRSP ラット由来の凍結臓器サンプルについて、薄切組織切片の作製し、DNA 二本鎖切断などを解析した。

II. 研究方法

研究では循環器疾患発症における放射線誘発性細胞組織応答を解析するために、以下の実験手法を用いた。

1. ラットモデル

本研究では循環器疾患発症における放射線誘発性細胞組織応答を解析するために、易脳卒中発症性ラットである Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHRSP) のオスを用いた。

2. 凍結包埋臓器からの薄利組織切片スライドの作製

-80℃のフリーザーに保存した凍結包埋臓器を-19℃のクライオスタット内に移動して平衡化し、厚さ 4μm で薄利組織切片を作成した。作成した組織切片はスライドガラスに貼り付けてドライヤーで約 3 時間風乾または一晩置き、その後各組織染色に用いた。

3. 免疫蛍光染色

薄切組織切片の付着したスライドサンプルを PBS に浸して 15 分間親水処理を行った後、4%パラホルムアルデヒドにサンプルを浸して室温で 20 分固定処理を行った。サンプルに残った PFA を取り除いた後、PBS に 5 分間浸してサンプルに残った固定液の洗浄を行った。この洗浄は 2 回繰り返した。-30℃に冷やした 70%エタノールに浸し、4℃で一晩静置して脱水処理を行った。エタノールからサンプルを取り出し、PBS に 15 分間浸して親水処理を行った。親水処理後、スライドガラスに貼り付けたサンプルの周辺を撥水性である PAP PEN で囲み、染色範囲を限定した。5%BSA 溶液にて 1 時間室温でブロッッキングを行った。ブロッッキング後、サンプルを PBS に 5 分間浸して洗浄を行った。目的タンパク質に対する一次抗体と 1% BSA を含む一次抗体反応液にて 4℃で一晩一次抗体反応を行った。その後、蛍光標識抗体、1% BSA、0.05% Tween 20、0.1% Triton X を含む二次抗体反応液にて、室温で 1 時間二次抗体反応を行った。染色を行ったスライドサンプルは核染色用のヨウ化プロピディウム (PI) を含む封入剤を滴下した後、カバーガラスをかぶせて封入をした。染色が完了したスライドを蛍光顕微鏡で観察し、デジタル画像を取り込んだ後に観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、主任研究者（高橋規郎）より送付された血液および臓器サンプルにて行うものである。従って、茨城大学では新たな動物実験は実施しない。

III. 研究結果

1. 放射線照射後の SHRSP の脳における組織形態観察

放射線照射による脳卒中発症に先立って組織障害が認められるかを確認するために、放射線照射後の SHRSP ラット由来の脳組織の形態変化を評価した。評価方法としてはヘマトキシリン・エオシン染色による組織形態観察を用いた。

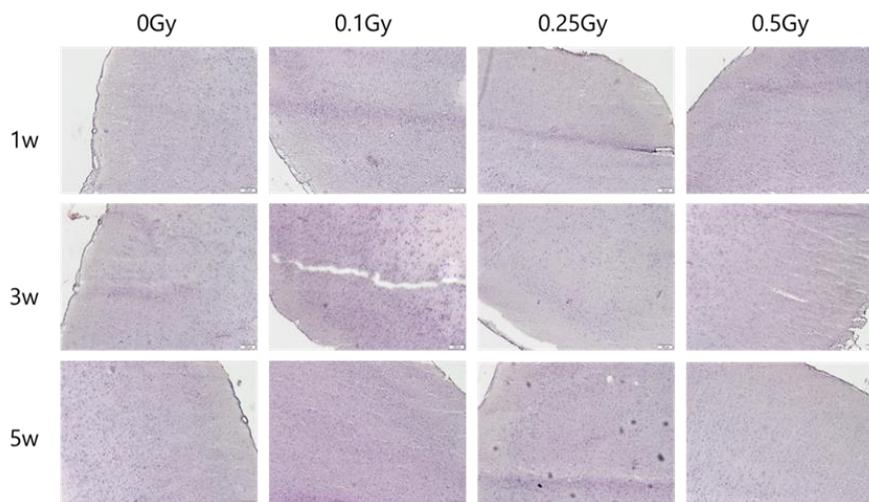


図 III-1 低線量放射線照射後の SHRSP の脳を用いた組織形態染色画像

0Gy、0.1Gy、0.25Gy、0.5Gy の低線量放射線照射し、それぞれ 1 週、3 週、5 週経過した脳切片のヘマトキシリン-エオシン染色画像 (n=1)。放射線照射による脳の組織損傷や形態変化は見られなかった

2. SHRSP ラット由来の脳組織における放射線照射後の DNA 損傷応答

SHRSP ラット由来の OCT コンパウンド包埋凍結臓器サンプルについて、薄切組織切片の作製を行い、DNA 二本鎖切断マーカーである γ -H2AX に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。 γ -H2AX フォーカスを検出することで、DNA 損傷レベルの評価を行った。その結果、全体的に γ -H2AX 陽性細胞は 0.3% 以下の低い割合でしか検出されず、さらに非照射と比較して DNA 損傷レベルの有意な増加傾向も観察されなかった。

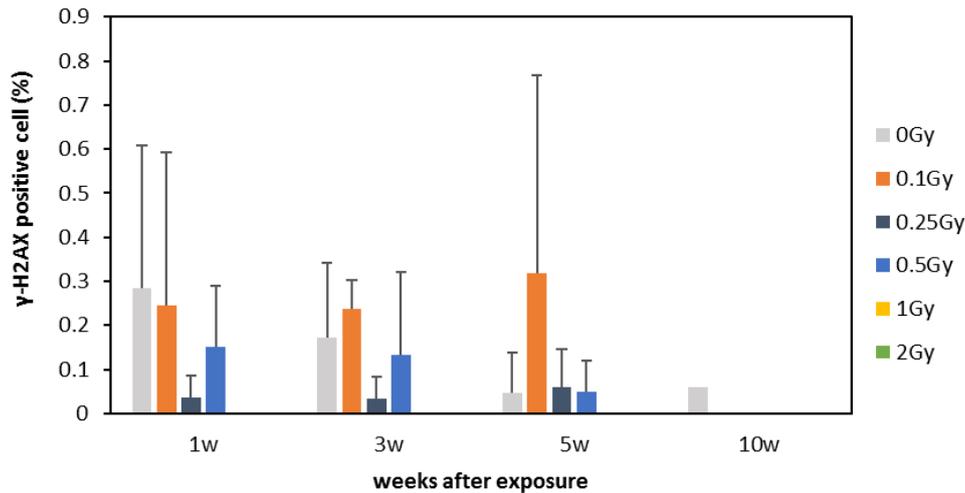


図 III-2 低線量放射線照射後の SHRSP の脳を用いた組織形態染色画像
放射線照射 (0Gy、0.1Gy、0.25Gy、0.5Gy、1Gy、2Gy) 照射 1 週、3 週、5 週、10 週後の脳における DNA 損傷レベルを表したグラフ (照射後 1 週、3 週、0.1Gy 照射後 5 週の個体は n=3、その他の個体は n=2)。非照射と比較して有意な DNA 損傷レベルの増加傾向は見られなかった。

3. 放射線照射後の SHRSP の血清中の CCL2 発現レベル解析

昨年度までの研究で、SHR における高血圧発症は炎症性サイトカインである CCL2 の血清中濃度が放射線照射後に上昇し、腎臓や心臓において様々な組織応答を引き起こしていることが示唆された。そこで、SHRSP においても放射線照射後に CCL2 誘導性の炎症反応が活性化しているかを検討するために、放射線照射後の SHRSP の血清中の CCL2 濃度を ELISA 法によって解析した。その結果、非照射と比較して照射群 (0Gy、0.1Gy、0.25Gy) で有意な CCL2 濃度の上昇は見られなかった。

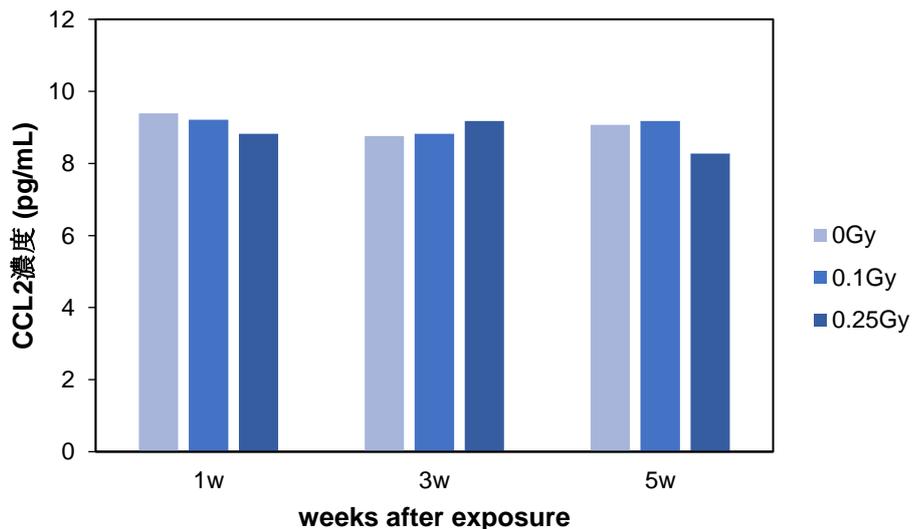


図 III-3 低線量放射線照射後の SHRSP 由来血清中に含まれる CCL2 レベル
放射線照射後 (0Gy、0.1Gy、0.25Gy) の SHRSP の血清を用いた ELISA による CCL2 発現レベル解析の結果を表したグラフ (n=2)。0.25Gy 以下の低線量放射線では非照射と比較して CCL2 濃度の増加傾向は観察されなかった。

IV. 考察

易脳卒中発症性ラット SHRSP を用いて放射線照射後の組織応答について免疫組織化学的手法を用いて検討を行った結果、これまでの SHR ラットでの結果と異なり、顕著な脳組織障害や腎機能障害は検出されなかった。このことは、SHRSP の放射線誘発性脳卒中発症メカニズムが SHR の放射線誘発性高血圧発症メカニズムと異なるという可能性を示している一方で、持続的な組織応答変化の結果生じる高血圧と異なり脳卒中は急性的な組織変化を伴う疾患であることから、本研究で解析した放射線照射後のサンプリングタイムでは組織応答変化を検出することができなかつたと考えるほうが現実的である。今回の臓器のサンプリングタイムは SHRSP ラットで脳卒中死が急激に上昇するタイミング（照射後 10 週前後）より若干早期であり、検出可能なレベルまで組織応答が変化していなかった可能性が高い。事実、脳卒中発症時期が低線量被曝ラットよりも早期化している高線量（2Gy）被ばくの SHRSP ラット由来脳組織では一部に溶血反応が検出されている。また、本年度は脳組織および血清中のサイトカインの解析のみであったことから、脳卒中発症のメカニズム解明のためには SHR ラット同様に腎臓組織を含めた循環器臓器の解析が重要であると考えられる。

V. 結論

昨年度までの研究から高血圧自然発症性ラット SHR では放射線照射後、CCL2 依存的な炎症反応が晩発的な DNA 損傷応答を腎臓や心臓で誘発していること、特に腎臓では糸球体特異的な細胞死が認められるなど、放射線誘発腎機能障害が認められることが明らかとなった。このことは放射線誘発性の腎機能障害が循環器疾患リスク上昇の重要な因子の一つであることを示しており、腎臓への局所照射が心臓機能障害を誘発するとする過去の論文とも一致する。また、本年度の研究では、SHRSP ラットの放射線誘発性脳卒中発症につながる直接的な組織応答の変化は検出することができなかつたが、乳がん患者の鎖骨および乳腺リンパ節への放射線療法が脳卒中のリスクを増加させるという報告などからも、放射線被ばくが脳卒中リスクを上昇させることは間違いなく、今後、より詳細な循環器臓器の解析が必要になると考えられる。

VI. 次年度以降の計画

これまで、低線量放射線被ばくによってどのような組織細胞応答が活性化することで循環器疾患リスクが上昇するのかを検討してきた。その結果、放射線照射による炎症反応活性化、そしてその後の腎機能障害が要因の一つであることが分かってきた。しかしながら、循環器リスク評価のバイオマーカーや、リスク低減策の解明には至っていない。今後、低線量被ばくによる循環器疾患リスクを評価する新しいバイオマーカーの探索や、リスク低減のための分子標的の同定などを行うことで、放射線被ばく後の医療方針、あるいは慢性的な低線量放射線被ばくリスクが懸念される住民に対する健康評価などに貢献できると考える。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 学内学会発表

- 1) 小泉久美子, 高橋規郎, 中村麻子, 放射線被ばくによる循環器疾患リスク増加における組織応答解析, 日本放射線影響学会第 61 回大会, Nov 7-9, 2018, 長崎

The radiation dose dependent cellular responses in an animal model of cardiovascular disease

Asako J Nakamura¹, Kumiko Koizumi¹, Norio Takahashi²

¹*Department of Biological Sciences, College of Science, Ibaraki University, Ibaraki, Japan*

²*Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, Japan*

Key word : radiation, DNA damage, H2AX, inflammation, cardiovascular disease

Abstract

The epidemiological studies of atomic bomb survivors, such as the Adult Health Study (AHS) and the Life Span Study (LSS) of Radiation Effects Research Foundation (RERF), revealed the causal link between radiation exposure and cardiovascular disease including stroke, heart failure, and myocardial infarction. In fact, the dose dependent increase of systolic blood pressure (SBP) in spontaneously hypertensive rats (SHR) model and motility related with stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive Rat (SHRSP) were demonstrated. These findings strongly suggest that radiation exposure associates cardiovascular disease. However, the molecular mechanisms of dose dependent effect and risk in cardiovascular disease have not been investigated in detail. Therefore, in this study, we aimed to clear the relationship between dose dependent cellular responses and cardiovascular disease in SHR / SHRSP rats and reveal the molecular mechanisms to identify the efficient clinical targets. The radiation-induced responses, such as DNA damage response, cellular senescence response and hemolysis response were evaluated by monitoring of γ -H2AX foci formation, the senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) level and Berlin blue staining, respectively. In addition, radiation-induced inflammatory response was assessed by measuring of cytokine, CCL2, in rat's serum.

2-2 DNA 損傷・修復に基づく放射線・化学物質影響の統合と

個人差の評価に関する研究

松本 義久（東京工業大学）

研究要旨

放射線影響は、環境や生活習慣に関係する内因・外因性の物質との複合曝露の結果として現れ、また、遺伝的要因による個人差も放射線の影響を大きく左右すると考えられる。本研究は、DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断の生成と修復に注目することにより、(1)放射線影響と化学物質影響の統合、(2)個人差の評価を行うことを目的として行った。

本年度、(1)では前年度までに考案した放射線と化学物質の影響を統合するための数理的モデルに関して、学会等での発表や専門家との会合などによって、妥当性と適用可能範囲の検討を行った。(2)では、日本人由来リンパ球細胞で健常人由来のもの、がん患者由来のもの 20 種類ずつ、計 40 種類の細胞について DNA 二重鎖切断修復に関わるタンパク質群の発現量や状態および放射線照射後の変化の解析を行った。また、これまでにがんリスクとの相関が報告されている XRCC4 A247S バリエントの機能解析を行った。さらに、次世代シーケンサーを用いた解析により、高線量率、低線量率放射線の遺伝子発現に与える影響と DNA-PK、ATM の役割を明らかにした。

キーワード

DNA 損傷、DNA 修復、タンパク質リン酸化、DNA-PK、ATM、ATR

研究協力者

Mukesh Kumar SHARMA (S.P.C.Government College (インド) Lecturer)

Rujira WANOTAYAN (Mahidol University (タイ) Lecturer)

研究参加者

島田 幹男（東京工業大学 科学技術創成研究院 先導原子力研究所 助教）

Ali Reza AMIRI MOGHANI（東京工業大学 大学院理工学研究科 大学院生）

土屋 尚代（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

Anie Day ASA De Castro（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

塚田 海馬（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

吉田 和起（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

今村 力也（東京工業大学 環境・社会理工学院 大学院生）

Milal ENKHBAATAR（東京工業大学 環境・社会理工学院 研究生）

Md. Ashikur RAHMAN（東京工業大学 科学技術創成研究院 先導原子力研究所 準客員若手研究員）

I. 研究目的

放射線影響は、環境や生活習慣に係る内因・外因性の物質との複合曝露の結果として現れ、また、遺伝的要因による個人差も放射線の影響を大きく左右すると考えられる。本研究は、DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断の生成と修復に注目することにより、放射線影響と化学物質影響の統合、個人差の評価を行うことを目的とする。

放射線影響は一般的には単独で現れるわけではなく、環境や生活習慣に起因する内因・外因性の物質との複合曝露の結果として現れると考えられる。また、遺伝的要因による個人差も放射線の影響を大きく左右すると考えられる。本研究は、DNA 損傷の生成と修復に注目することにより、放射線影響と化学物質影響の統合、個人差の評価を行うことを目的とする。

放射線と化学物質の複合曝露影響の重要性は広く認識され、疫学研究、動物実験が行われているが、ほとんどは定量的解析結果の記述を主としており、放射線と化学物質の影響を統合するための原理の探索が目的ではない。本研究で目指す統合とは、共通の「横軸」をもって、放射線影響と化学物質影響を比較したり、その複合影響を評価したりすることである。これまでは、主に、放射線については線量、化学物質については濃度および処理時間を横軸の変数として、生物学的効果（たとえば、細胞生存率、突然変異頻度など）の比較や複合曝露影響の評価が行われてきた。しかしながら、長期連続曝露状況を考える場合においては（図 I-1）、放射線については線量率、化学物質については濃度が横軸の変数として適切であると考えられる。化学物質の中で、放射性物質あるいは放射性標識化合物については、線量率と濃度は等価である。たとえば、トリチウム水（HTO）を含む培地で細胞を培養した場合、細胞が受ける吸収線量率（Gy/s）はトリチウム水の放射能濃度（Bq/L）に比例し、したがって、その物質濃度（mol/L; M）に比例する。さらに、線量率と濃度の等価性、互換性は、放射線と類似の作用を著す化学物質（DNA 損傷薬剤、突然変異原など）に拡張可能であると考えられる。

そして、1細胞当たり（あるいは1ゲノム当たり、1塩基当たりと考えてもよい）時間当たりの損傷生成量はこの線量率や濃度に比例すると考えられる。ただし、さまざまな DNA 損傷の種類やそれぞれの割合は、放射線と化学物質の間で、また、それぞれの種類によって異なると考えられる。培養細胞を用いた実験は生体内の環境や異種細胞との相互作用などを反映するものではないが、一方で、基本原理を明らかにする上では適していると考えられる。将来的には、時間あたりの DNA 損傷生成能を指標として、さまざまな種類の放射線、化学物質の換算係数を求めて、データベース化して行くことにより、放射線、化学物質影響を統一的に評価でき、複合曝露影響も個々の要素の加算として評価できるようになることが期待される。

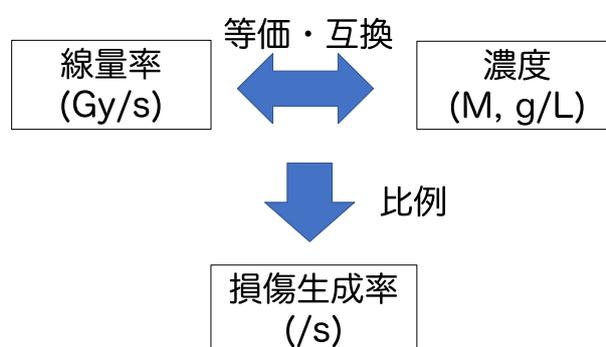


図 I-1 放射線と化学物質の影響の統合のために本研究で基本とする概念

放射線感受性の個人差もまた広く認識され、cDNA アレイによる遺伝子発現解析などが行われている。本研究は、リンパ球は一部の組織の DNA 修復特性、ゲノム安定性、ひいてはがんリスクを反映するものと捉えている。本研究では予算、期間の観点から約 40 種類の解析を計画しているが、理研細胞銀行には日本人由来の不死化リンパ球細胞 500 種類とさまざまな人種に由来する不死化リンパ球細胞 159 種類(園田・田島コレクション)が保有されていることから、本研究が契機となって、年齢や人種による違いなども含めたより大規模な研究に発展する可能性がある。

本研究では、損傷認識に関わるタンパク質リン酸化酵素 DNA-PK、ATM、ATR に特に注目する(図 I-2)。DNA-PK は、触媒サブユニット DNA-PKcs と二本鎖 DNA 末端に特異的に結合する Ku (Ku86 (Ku80 ともいう) と Ku70 のヘテロダイマー) から構成され、DNA 二本鎖切断を認識する。ATM は、Nbs1/Mre11/Rad50 複合体を介して DNA 二本鎖切断を認識する。ATR は、RPA (RPA70、RPA34、RPA14 の 3 成分からなる)、ATRIP を介して、一本鎖 DNA を認識する。これらは一部重複しながら、DNA 損傷に应答して、約 1,000 種類のタンパク質をリン酸化すること

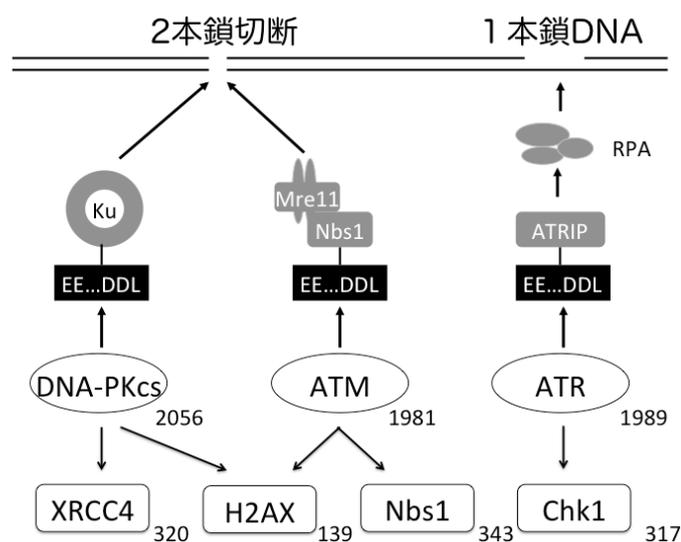


図 I-2 DNA 損傷を認識するタンパク質リン酸化酵素 (DNA-PK、ATM、ATR)

が明らかになっている(1)。そのうち、代表的なものとして、XRCC4、H2AX、Nbs1、Chk1 が挙げられる。また、それぞれ、自らをリン酸化することが知られ、その中で重要な部位が明らかになっている(2)。XRCC4 については、主任研究者が以前の研究で、放射線照射後に DNA-PK によってリン酸化を受けることを初めて示した。さらに、独自に XRCC4 の 4 カ所のリン酸化部位を同定し、うち 3 カ所が DNA 二重鎖切断修復に重要であることを見出した。また、以前報告されたものの(3,4)、細胞内でリン酸化が起こるかどうかわからなかった XRCC4 Ser320 のリン酸化が DNA 損傷に应答して DNA-PK 依存的に起こることを示した(5)。今後、XRCC4 Ser320 のリン酸化状態が DNA-PK 活性指標として広く用いられることが予想される。

平成 28 年度は、正常な DNA 修復機能を有するヒト線維芽細胞、リンパ球細胞を用いて、放射線と化学物質の影響の量的等価関係、加算性を調査した。平成 29 年度は、ヒト DNA 修復欠損細胞を用いて同様の解析を行い、正常細胞で得られた結果と比較検討することにより、損傷の種類や修復の難度を明らかにすることを目的として、研究を実施した。また、放射線および化学物質に対する感受性の個人差やがん罹患性との関連の調査の準備として、理研細胞銀行から健常者あるいはがん患者由来のヒトリンパ球細胞を 40 種類程度入手した。平成 30 年度は、前年度までに考案した放射線と化学物質の影響を統合するための数理的モデルに関して妥当性と適用可能範囲の検討を重ねるとともに、低線量率放射線照射後の細胞生存率測定実験による検証を行った。ま

た、放射線・化学物質影響の個人差に関連して、日本人由来リンパ球細胞で健常人由来のもの、がん患者由来のもの 20 種類ずつ、計 40 種類の細胞について DNA 二重鎖切断修復に関わるタンパク質群の発現量や状態および放射線照射後の変化の解析を行った。

II. 研究方法

1. 細胞培養

エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr Virus; EBV) で不死化した日本人由来リンパ球細胞 40 種類を理研細胞銀行から入手した(6) (次ページ表 II-1)。培地としては、RPMI1640 液体培地 (L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム含有)を用い、10%容の牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS)、抗生物質として 1%容のペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液 (各 10,000 U/ml、10,000 μ g/ml)、抗酸化剤として 50 μ M の 2-メルカプトエタノールを添加した。培養は 37°C、5% CO₂ 濃度、湿度 95%以上の条件で行った。継代は 3~7 日に一度行い、細胞濃度に応じて 2~10 倍に希釈した。

正常ヒトリンパ球由来 TK6 細胞の野生株は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 (JCRB) 細胞バンクから入手し、京都大学・武田俊一教授、笹沼博之准教授から DNA-PKcs、DNA ligase IV、Smarcal1、ATM の欠損細胞を頂いた(7)。これらの細胞の培養は、上記の EBV 不死化リンパ球細胞と同様の方法で行った。ただし、TK6 細胞群は EBV 不死化リンパ球細胞より増殖が早いことから継代は 3~4 日に一度行い、10~20 倍に希釈した。

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 およびその Ku86 変異株 XR-V15B、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 およびその Ku86 変異株 xrs5 は American Type Culture Collections (ATCC)より入手したものを用了(8-10)。培地としては、DMEM 液体培地 (4.5 g/l グルコース、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム含有)を用い、10%容の FBS、1%容のペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液 (各 10,000 U/ml、10,000 μ g/ml)、1%容の非必須アミノ酸混合溶液を添加した。培養は 37°C、5% CO₂ 濃度、湿度 95%以上の条件で行った。継代の際には、ディッシュまたはフラスコから培地を除去した後、ハンクス平衡塩溶液で洗浄し、2.5 g/L・トリプシン/1 mM EDTA 溶液で 37°C、2~3 分処理し、培地で 15 ml 遠心管に回収した。これを適当な濃度に希釈して、新しいディッシュまたはフラスコに播種した。

FBS は HyClone 社から、それ以外の試薬はナカライテスク社から購入した。

表Ⅱ-1 ヒトリンパ球細胞の一覧

健常人由来			乳癌患者由来		
細胞	性別	年齢	細胞	性別	年齢
HEV0012	女	46	HEV0135	女	53
HEV0013	女	42	HEV0157	女	58
HEV0100	女	55	HEV0261	女	47
HEV0160	女	38	HEV0272	女	50
HEV0190	女	21	HEV0303	女	55
HEV0195	女	59	HEV0312	女	37
HEV0236	女	34	HEV0317	女	62
HEV0311	女	50	HEV0337	女	41
HEV0333	女	29	HEV0345	女	52
HEV0401	女	27	HEV0378	女	68
HEV0011	男	27			
HEV0058	男	54	子宮頸癌患者由来		
HEV0091	男	21	細胞	性別	年齢
HEV0098	男	36	HEV0080	女	65
HEV0120	男	65	HEV0136	女	77
HEV0134	男	48	HEV0146	女	54
HEV0296	男	41	HEV0209	女	68
HEV0356	男	57	HEV0257	女	43
HEV0384	男	23	HEV0299	女	72
HEV0428	男	31	HEV0305	女	56
			HEV0352	女	36
			HEV0390	女	61
			HEV0438	女	48

2. 放射線照射と生存率測定

放射線照射は、東京工業大学コバルト照射実験施設において行った。線量率は実験や線量によって異なり、0.46~3.38 Gy/min の範囲であった。また、京都大学放射線生物研究センターの小林純也博士の協力を得て、ガンマセル、低線量率長期照射装置（いずれも ^{137}Cs 線源）を用いた照射を行った。ガンマセルの線量率は 855 mGy/min、低線量率長期照射装置の線量率は 1.00 mGy/min であった。

低線量率照射のために、平成 28 年度(平成 29 年 2 月 8 日)に、東京工業大学放射線総合センター大岡山放射線実験施設に放射線源を導入した。導入した線源は、 ^{60}Co 放射能標準ガンマ線源（日本アイソトープ協会、CO401CE、1 MBq、表示付認証機器）4 個である。この線源と細胞を大岡山放射線実験施設内の CO_2 インキュベータ内に置いて培養を行った（図 II-1）。線源は 4 個を格子状に互いに接するように、棚板の中心に配置した。細胞は直径 10cm の培養皿に播種し、その上下の棚板に正六角形状に配置した。棚板の間隔は 9.3 cm である。 ^{60}Co の実効線量率定数は $0.305 \mu\text{Sv} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{MBq}^{-1}$ であるから、導入時における線量率は平均（培養皿の中央）で $65 \mu\text{Sv/h}$ 、最大（培養皿のうち、最も中央に近い位置）で $109 \mu\text{Sv/h}$ 、最小（培養皿のうち、最も中央から遠い位置）で $39 \mu\text{Sv/h}$ であり、 ^{60}Co の半減期は 5.27 年であることから減衰を考慮した。

生存率測定はコロニー形成法によって行った。適切な数の細胞（コロニーの期待数が 100~200 個程度）を播種し、放射線照射または化学物質処理を行い、2~3 週間培養した後、形成されたコロニーを数えた。計数の際には、まず、培地を除去し、99.5%エタノールで固定した後、クリスタルバイオレットで染色し、50 個以上の細胞を含むコロニーの数を数え、以下の計算でプレーティング効率(P.E.)および生存率(S.F.)を求めた。

$$\text{P.E.} = (\text{形成されたコロニーの数}) / (\text{播種した細胞の数}) \times 100 (\%)、$$

$$\text{S.F.} = (\text{放射線照射または化学物質処理を行った場合の P.E.}) / (\text{対照の P.E.})。$$

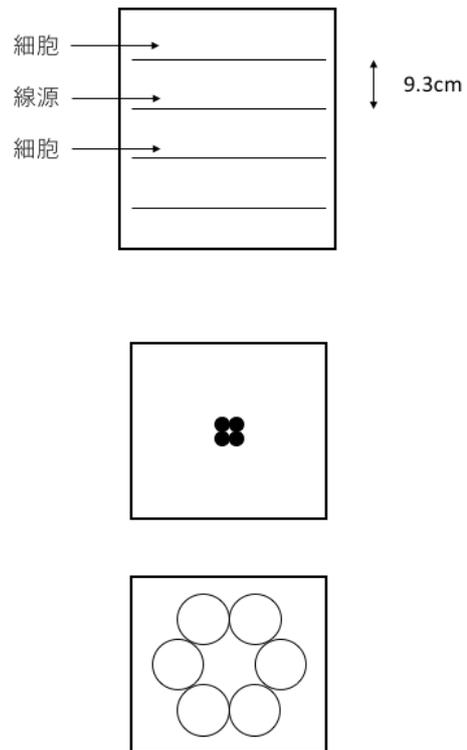


図 II-1 低線量率照射における線源と細胞の配置
 (上) インキュベータ全体の正面図。
 (中) 線源の段の平面図。黒丸が線源。
 (下) 細胞の段の平面図。白丸は培養皿。

3. ウェスタン・ブロッティング

ウェスタン・ブロッティングに用いた一次抗体およびその入手元は以下の通りである。Anti-Ku86：ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製²⁾； Anti-Ku70：ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製²⁾、Anti-XRCC4：ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製； Anti-XLF (3757-100)：ウサギポリクローナル抗体、Biovision； Anti-PCNA(sc-7907)：ウサギポリクローナル抗体、Santa Cruz。二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリンブタポリクローナル抗体(P0399、Dako)、同抗マウス免疫グロブリンヤギポリクローナル抗体(P0447、Dako)を用いた。発色は、PerkinElmer 社 Western Lightning キットあるいは LiCOR 社 Western Sure Substrate キットを用い、LiCOR digit を用いて画像を取得した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞は理研細胞銀行、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 (JCRB) 細胞バンク、American Type Culture Collections (ATCC) などの公的細胞バンクあるいは国内外にて細胞を樹立した研究者から入手し、使用条件を遵守して、研究を行った。放射線源の導入や取扱いは放射線障害防止法および関連法令を遵守して行った。CRISPR/Cas9 システムを用いた DNA 二重鎖切断修復遺伝子欠損細胞作製については研究開始時点で本学にて承認が得られており、ガイドラインを遵守して行った。

III. 研究結果と考察

1. ヒトリンパ球の DNA 修復タンパク質の放射線応答の解析

放射線感受性の個人差とその原因を探るために、理研細胞銀行から EBV で不死化したヒトリンパ球細胞 40 種類を入手し、DNA 修復タンパク質の放射線照射後の挙動をウェスタン・ブロッティング法にて解析した。特に、本研究室にて抗体を作製した XRCC4 の Ser320 のリン酸化状態に注目した(5)。

解析に先立ち、リンパ球由来の株化細胞 TK6 を用いた検討を行った。TK6 の野生株 (TSCE5)、LIG4、Smarcal1、DNA-PKcs 欠損細胞 (それぞれ LIG4^{-/-}、Smarcal1^{-/-}、DNA-PKcs^{-/-}、なお、LIG4 遺伝子座は 3 個ある) をそれぞれ 0、5、20 Gy の γ 線照射の 30 分後に回収し、ウェスタン・ブロッティングを行った結果を図 III-1 に示す。XRCC4 の Ser320 のリン酸化 (α -XRCC4-pS320) は野生株、LIG4 および Smarcal1 欠損細胞では線量に応じて増加が認められたが、DNA-PKcs 欠損細胞では非照射時、照射後とも全く認められなかった。このことから、以前、我々が他の細胞系を用いて示したように、リンパ球でも XRCC4 の Ser320 のリン酸化は DNA-PK によって行われていることが確認された。

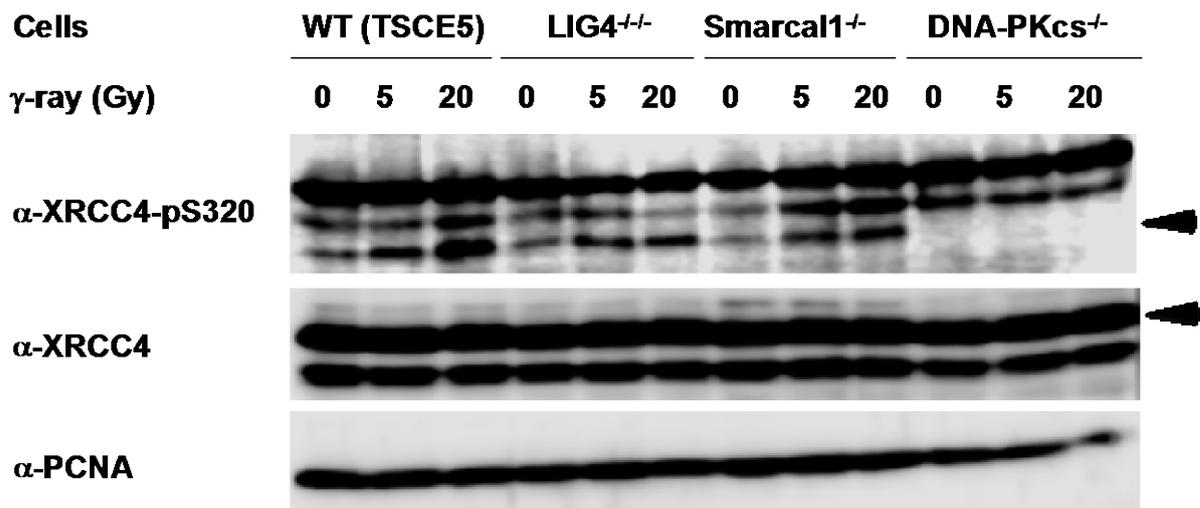


図 III-1 ヒトリンパ球株化細胞 TK6 由来細胞群における XRCC4 Ser320 のリン酸化状態のウェスタン・ブロッティングによる解析

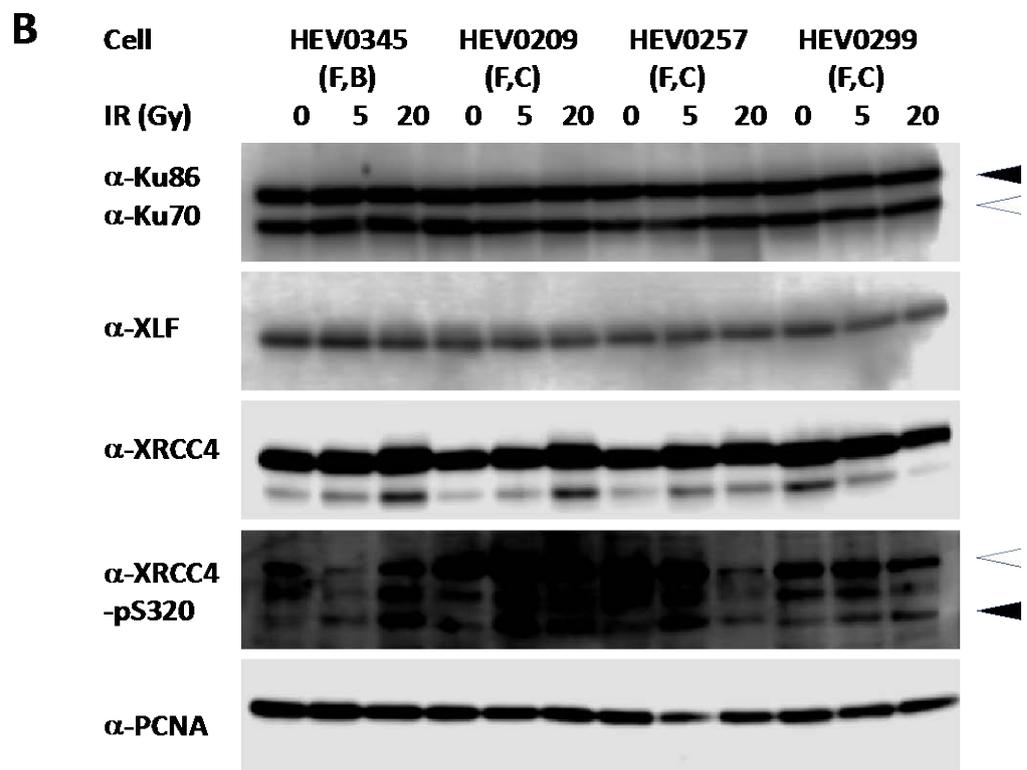
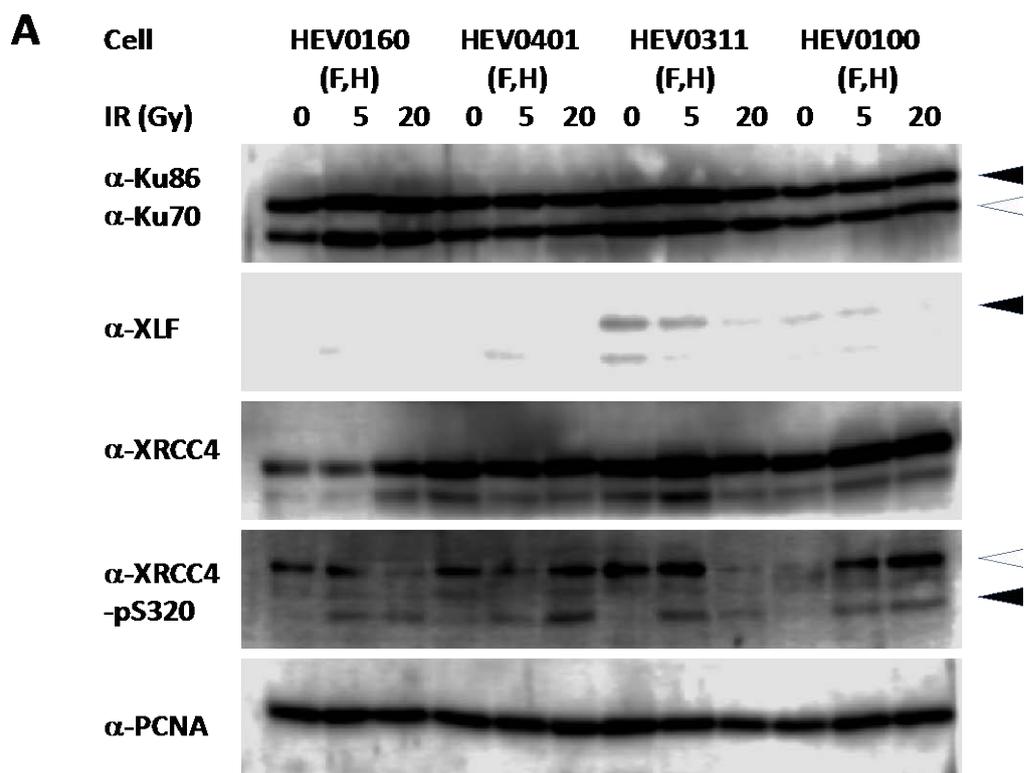
TK6 由来野生株 (TSCE5)、LIG4、Smarcal1、DNA-PKcs 欠損細胞を、コバルト 60 γ 線源を用いて 0、5、20 Gy 照射後 30 分に回収し、XRCC4 Ser320 リン酸化状態特異的抗体 (α -XRCC4-pS320)、XRCC4 抗体、ローディングコントロールとして PCNA 抗体を用いたウェスタン・ブロッティングを行った。XRCC4 のバンドは黒矢頭で示したものである。

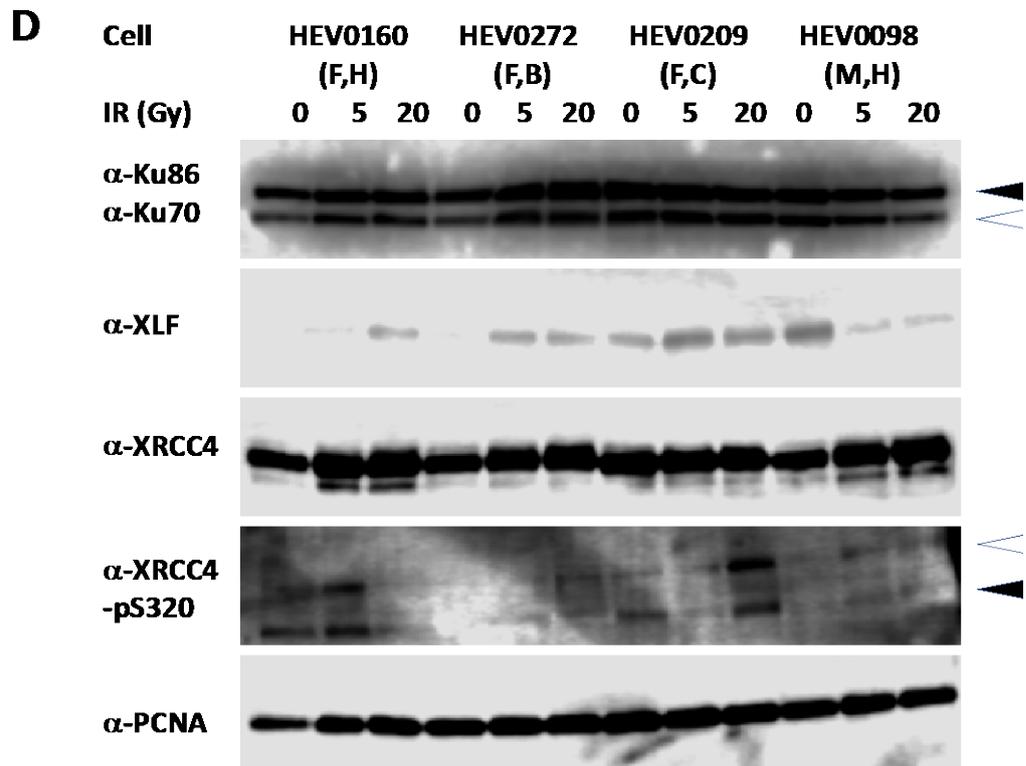
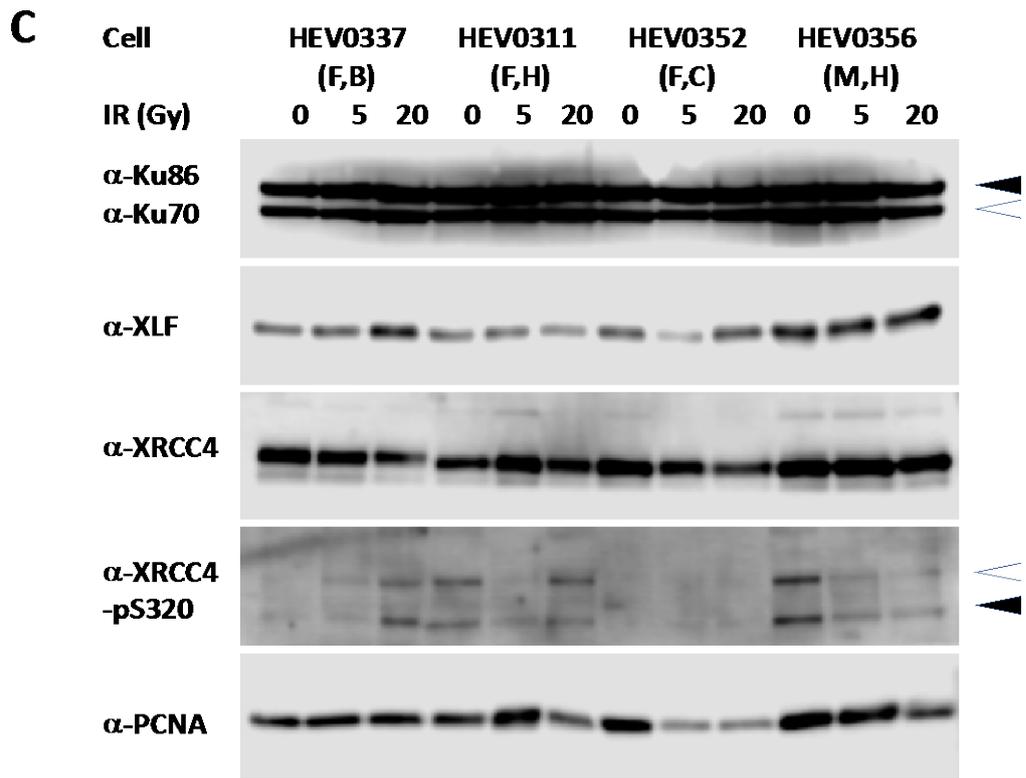
次に、EBV で不死化したヒトリンパ球細胞を培養し、0、5、20 Gy の γ 線照射の30分後に回収し、ウェスタン・ブロッティングによる解析を行った。一部の細胞は増殖能が低く、ウェスタン・ブロッティングに十分な細胞数が確保できるまで生育しなかった。解析できた細胞の全てで Ku86、Ku70、XRCC4 およびローディング・コントロールである PCNA の発現が確認できた。これらのタンパク質の発現量は非照射、照射後でほとんど変化がなく、細胞間での発現量の違いも認められなかった。しかしながら、XRCC4 については、我々が以前報告したとおり(11)、放射線照射後にバンドの一部がわずかに上方（高分子量側）にシフトした。これは DNA-PK によるリン酸化を反映したものであることを我々は以前示している(11)。XLF は実験によっては、シグナルが弱かったり、複数のバンドが観察されたりしたが、明瞭なバンドが確認できたものに関しては、細胞間や照射、非照射での差は認められなかった。

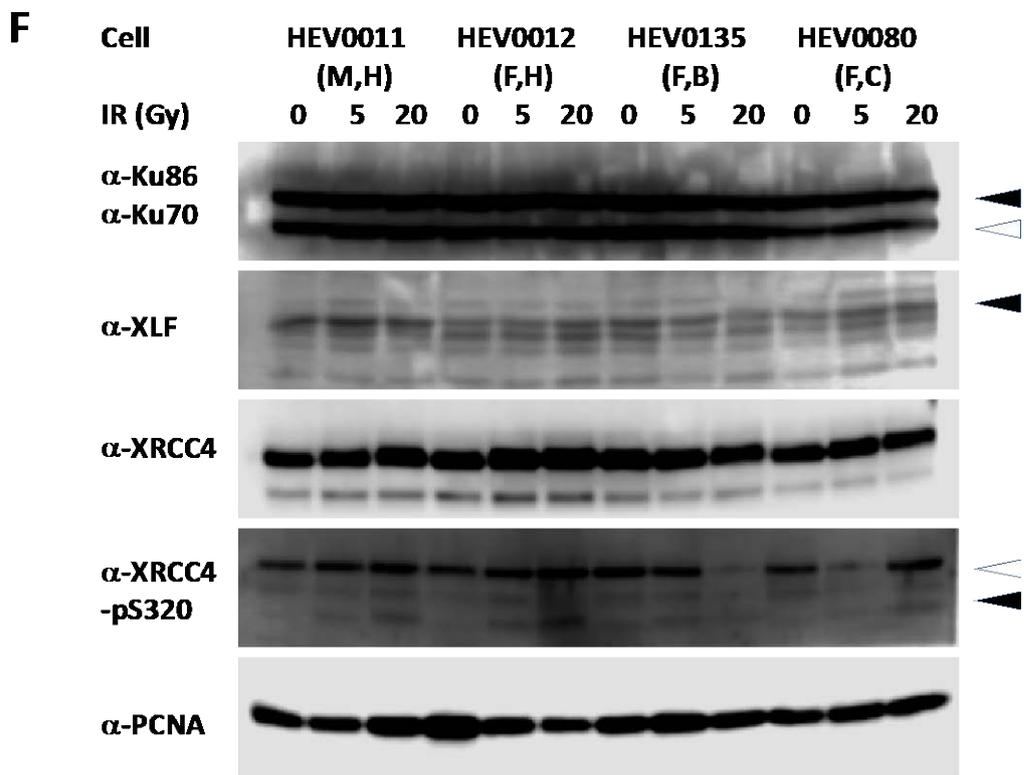
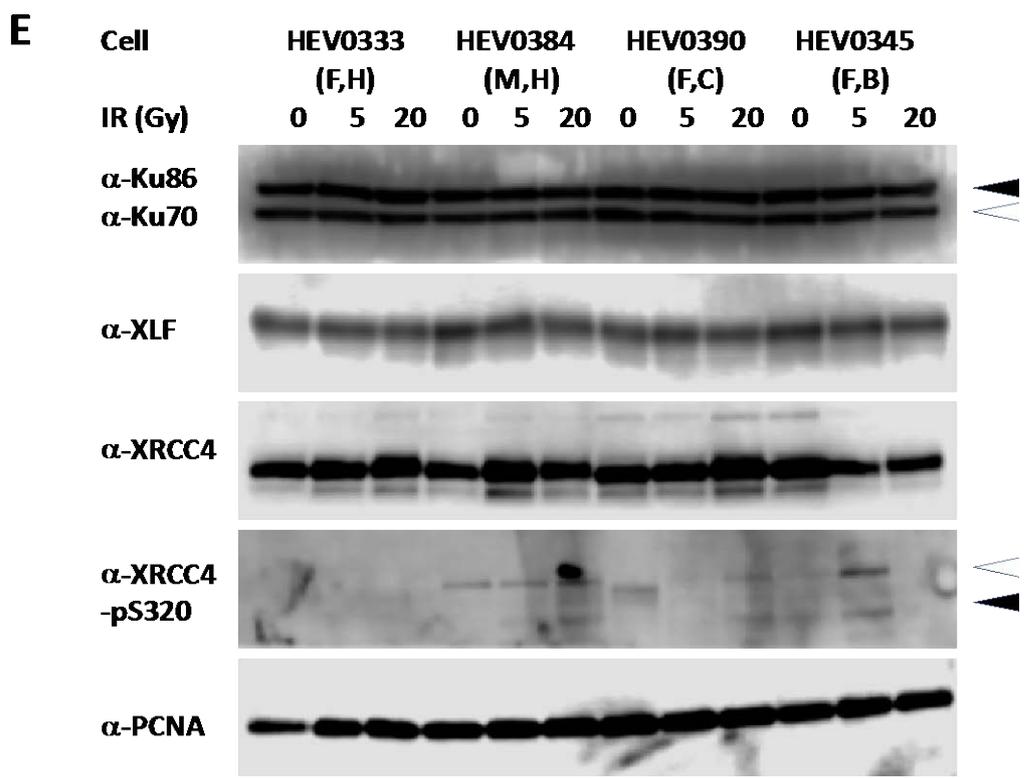
XRCC4 Ser320 のリン酸化は TK6 の場合に比べて検出が困難であった。しかしながら、F、G、H に示す結果のように、放射線量に応じてリン酸化の増加が確認できたものもあった。これらの実験では、健常者女性、乳がん患者女性、子宮頸がん患者女性、健常者男性各1人に由来するリンパ球を同時に解析している。F の実験では、健常者男女由来リンパ球（HEV0011 および HEV0012）に比べ、がん患者由来リンパ球（HEV0135 および HEV0080）で 20 Gy 照射後の XRCC4 Ser320 のリン酸化が少ないように見受けられた。G の実験では、子宮頸がん患者由来リンパ球（HEV0136）で 20 Gy 照射後のリン酸化が最も顕著に認められるとともに、非照射状態でもリン酸化が認められた。H の実験では、F の実験と同様に、健常者男女由来リンパ球（HEV0401 および HEV0428）でがん患者由来リンパ球（HEV0438 および HEV0378）に比べて 20 Gy 照射後のリン酸化が強い傾向が認められた。また、乳がん患者由来リンパ球（HEV0378）で非照射時にもリン酸化が認められた。これらを総合すると、放射線照射後の XRCC4 Ser320 のリン酸化が健常者由来リンパ球でがん患者由来リンパ球より高い、非照射時のリン酸化が一部のがん患者由来リンパ球で高い、という傾向があるのではないかと考えられるが、検証にはさらに多くの試料の検討が必要である。

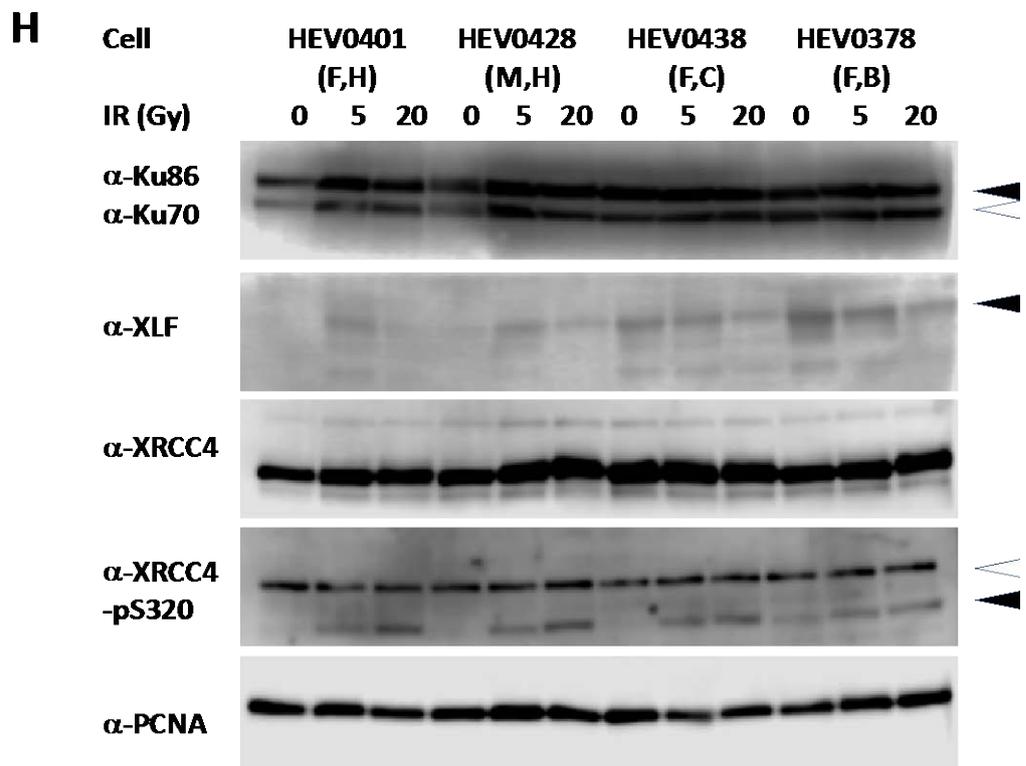
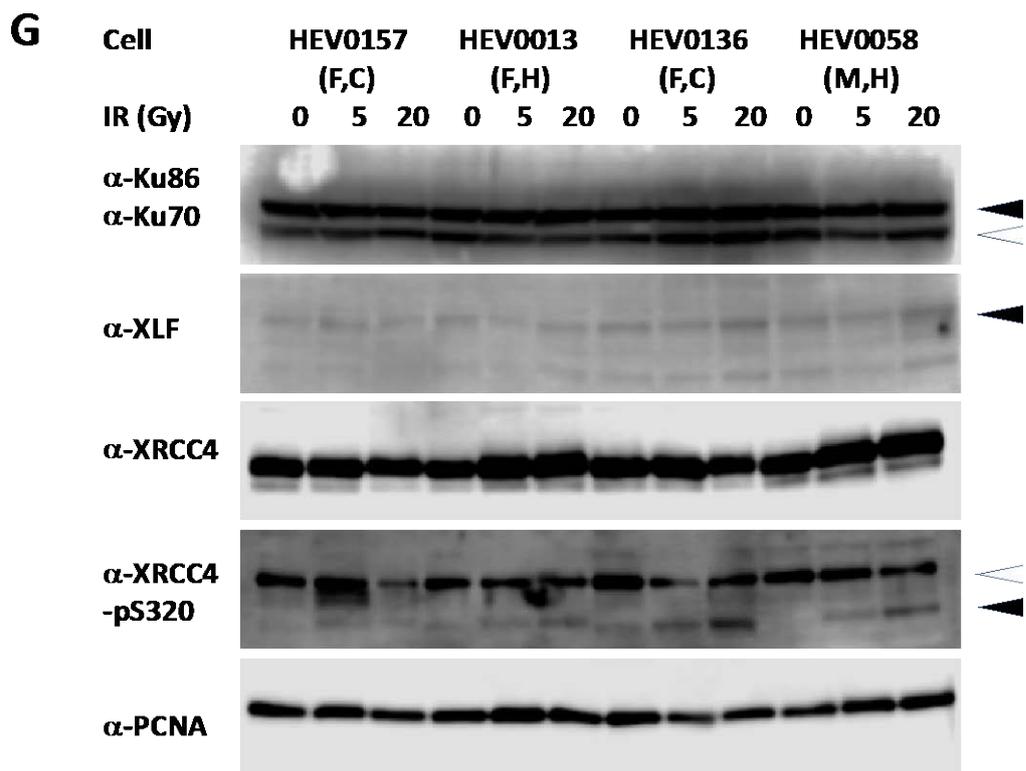
図 III-2 EBV で不死化したヒトリンパ球細胞のリン酸化状態のウェスタン・ブロッティングによる解析（次頁以降）

A-H は異なる実験の結果である。細胞名の下に () 内の F は女性由来、M は男性由来、H は健常者由来、B は乳がん患者由来、C は子宮頸がん患者由来であることを示す。各細胞を、コバルト 60 γ 線源を用いて 0、5、20 Gy 照射後 30 分に回収し、XRCC4 Ser320 リン酸化状態特異的抗体 (α -XRCC4-pS320)、Ku86 抗体、Ku70 抗体、XLF 抗体、XRCC4 抗体、ローディングコントロールとして PCNA 抗体を用いたウェスタン・ブロッティングを行った。Ku70 抗体と Ku86 抗体は混合して同時に検出した。上方の黒矢頭で示したバンドが Ku86、下方の白矢頭で示したバンドが Ku70 である。XLF では、実験によって複数のバンドが検出される場合があり、そのような場合には、分子量などから黒矢頭で示したバンドが XLF であると判断した。また、XRCC4 Ser320 リン酸化については、XRCC4 のバンドを黒矢頭、70 kDa 付近に見られる交差反応バンドを白矢頭で示している。









2. XRCC4 バリエントの機能解析

1.のウェスタン・ブロッティングによる解析では Ku86、Ku70、XRCC4 タンパク質の発現レベルが異なるリンパ球は解析できた範囲では見られなかったが、Ku86 と XRCC4 のバリエントとがんとの相関に関する報告がいくつかある(注：バリエントとは DNA 塩基配列の違いで、機能の変化や疾患につながるものもつながらないものも含まれる)。その中で、XRCC4 のアミノ酸置換を伴うバリエントで、がんリスクが高いという報告がある rs3734091 (c.G739T, p.A247S) に注目し(12,13)、機能解析を行った。具体的には、当研究室でこれまで用いてきた XRCC4 遺伝子に PCR を用いてこの置換を導入し、この置換型 XRCC4 遺伝子を XRCC4 欠損細胞 M10 に導入して安定発現株を樹立した。その細胞の特性を元の XRCC4 遺伝子を導入した株と比較した。

まず、コロニー形成法によって放射線感受性を比較した。4 Gy 照射後において、A247S 型 XRCC4 を発現する細胞は元の XRCC4 を発現する細胞より有意に低い生存率を示した。この結果は、以前の報告と一致しており、A247S 型 XRCC4 が元の XRCC4 に比べて DNA2 本鎖切断修復機能が低いことを示唆している。

また、以前の報告では A247S 型 XRCC4 が本来の核ではなく、細胞質に局在することを示していた。そこで、A247S 型 XRCC4 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合したタンパク質の発現ベクターをヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞に導入して生きた状態で蛍光顕微鏡観察を行った。以前の報告と異なり、A247S 型 XRCC4 は元の XRCC4 と同様に核への局在を示した。A247S 型 XRCC4 の DNA2 本鎖切断修復機能低下の原因についてはさらなる検討が必要と考えられた。

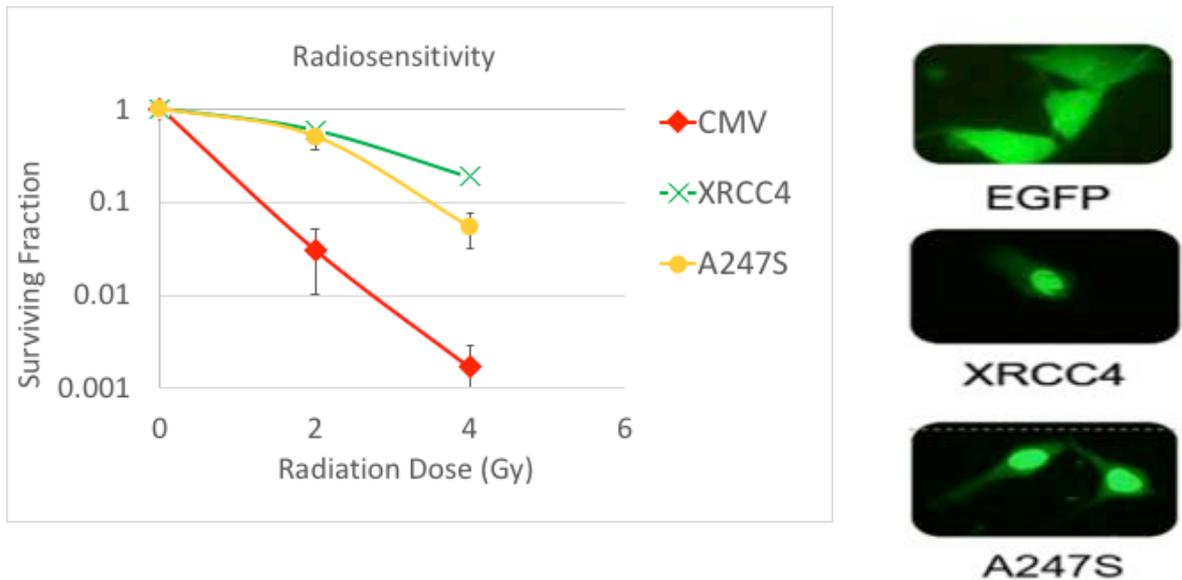


図 III-3 XRCC4 A247S バリエントの機能解析

左：XRCC4 A247S 発現細胞の放射線感受性。XRCC4 を欠損する M10 細胞に A247S 型 XRCC4、元の XRCC4 の発現ベクターおよび XRCC4 遺伝子を含まないベクター (CMV) を導入し、安定発現株の放射線感受性をコロニー形成法で測定した。放射線はコバルト 60 γ 線源を用いて照射した。右：A247S 型 XRCC4、元の XRCC4 を GFP に接続して U2OS 細胞で発現させ、蛍光顕微鏡観察を行った。上の EGFP は XRCC4 を接続していないものである。

3. 放射線と化学物質の影響を統合するための数理的モデルに関する検討

平成 29 年度の研究において得られた化学物質存在下での生存率の測定結果や、平成 29 年 11 月に韓国で開催された ICEM-ACEM2017 で情報収集した化学物質影響分野での評価指標などを参考にしながら、下記の数理的モデルを考案した。

細胞が 1 回の分裂に成功する確率を P 、無限に増殖する確率を Q とすると、

$$Q = 2 - \frac{1}{P}$$

の関係がある。コロニー形成率 (P.E.) は Q の近似値であると考えられる。細胞分裂 1 回あたりの平均の致死的損傷の数を λ とすると、実際に受ける致死的損傷の数はポアソン分布に従う。細胞分裂に成功するのは、致死的損傷が 0 個である場合なので、

$$P = e^{-\lambda}$$

となる。放射線の線量率を d とすると α 、 β を定数として

$$\lambda = \alpha + \beta d$$

と書ける。化学物質については、同様にその濃度を c とすると、 α 、 γ を定数として

$$\lambda = \alpha + \gamma c$$

と書ける。 α 、 β 、 γ はコロニー形成実験で求めることができ、放射線の線量率の単位を $1/\beta$ 、化学物質の濃度の単位を $1/\gamma$ とすることで、放射線と化学物質の影響を比較したり、加算したりすることができると考えられる。

このモデルに関して、日本放射線影響学会第 61 回大会におけるワークショップ (平成 30 年 11 月 6-8 日、長崎)、第 21 回菅原・大西記念癌治療増感研究シンポジウム in 奈良 (平成 31 年 2 月 2-3 日、奈良) での発表、および数理モデル専門家との研究打合せを通じて、妥当性や適用範囲の検討を行った。平成 31 年 1 月 21 日の「平成 30 年度放射線健康管理・健康不安対策事業 (放射線の健康影響に係る研究調査事業) 研究成果報告会」でもコメントがあったので、以降はその内容も含めて検討を行った。

本研究は細胞生存率に注目しているが、真鍋勇一郎博士、坂東昌子博士らによって、突然変異率に関する数理モデル (Whack-a-mole モデル) について一連の研究が行われている。この一連の研究では、線量率に注目することによって、幅広い生物種、線量率域で報告されている突然変異率を統一的に説明することに成功している(14 他)。エンドポイントは異なるが、低線量率長期照射の場合、照射中に修復のみならず、増殖が起こることも考慮する必要があり、線量率に注目することが有用であると考えられた。また、このモデルの基礎となっていることは、細胞分裂の際に比較的少数 (ポアソン分布に従う程度の数) の致死的損傷を受けるというモデルであり、低線量率放射線の他、放射線に類似した作用を示す物質、たとえば、DNA 損傷薬剤、突然変異原などに適用可能であると考えられた。一方、放射線とは作用が大きく異なる化学物質、たとえば、神経毒性物質や代謝拮抗剤などには適用されるものではないことを明示すべきであると考えられた。

4. DNA 修復欠損細胞の低線量率放射線感受性解析

平成 29 年度の研究において得られたデータを再度分析したところ、TK6 由来の DNA-PKcs 欠損細胞および ATM 欠損細胞が、高線量率放射線 (855-911 mGy/min) に比べて、低線量率放射線 (1.0-1.1 mGy/min) に対して高い感受性を示すことが分かった (図 III-4)。これは、一般的に知られる線量率効果とは逆で興味深い結果であるが、さらなる検討が必要と考えられた。そこで、他の DNA 修復欠損細胞を用いて、同様の傾向が認められるか検討を行った。その結果、マウス由来の DNA-PKcs 欠損細胞 (SCID) は、TK6 と異なり、低線量率放射線より高線量率放射線に対して高い感受性を示した (図 III-5)。DNA-PKcs と複合体を形成する Ku86、Ku70 については、低線量率放射線に対して、高線量率放射線と同等か、より高い感受性を示した。

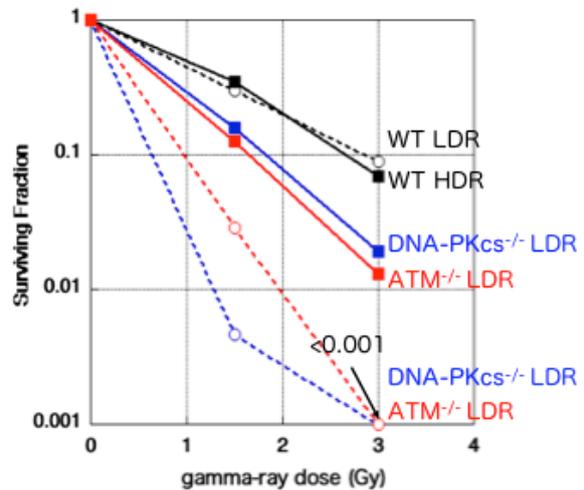


図 III-4 TK6 細胞由来 DNA-PKcs、ATM 遺伝子欠損細胞の高線量率放射線、低線量率放射線に対する感受性比較

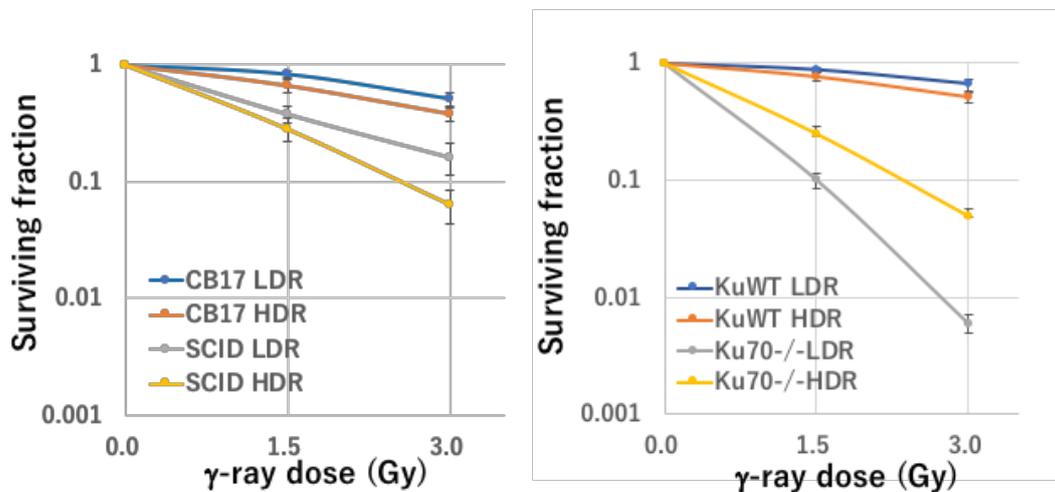


図 III-5 マウス由来 DNA-PKcs、Ku70 欠損細胞の高線量率放射線、低線量率放射線に対する感受性比較

本研究の一連の実験では、低線量率照射は最長で 2 日間、積算線量で 3 Gy までとした。3. (前頁) で述べた数理モデルでは、照射中に一定速度で細胞周期が進行していると仮定している。細胞周期チェックポイントで 1 細胞周期の時間が長くなる場合があることは考慮されているが、コロニー形成の途中で照射を終了した場合の挙動は考慮されていない。照射期間中と終了後の細胞周期動態によって差異が生じる可能性が考えられ、今後の検討が必要であると考えられた。

5. 高線量および低線量率放射線に対する遺伝子発現応答の包括的解析

TK6 細胞およびこれに由来する DNA-PKcs、ATM 遺伝子欠損細胞を図 II-1 に示したように低線量率ガンマ線照射を行いつつ、48 時間培養した後に回収した（線量率平均 57 μ Sv/h、最小 34 μ Sv/h、最大 95 μ Sv/h、総線量平均 2.7 mSv、最小 1.6 mSv、最大 4.5 mSv）。また、東京工業大学コバルト 60 照射施設を利用して 5 Gy のガンマ線照射を行い、4 時間 37°C で培養した後に回収した。回収した細胞から RNA を精製し、次世代シーケンサーによる配列解析 (RNAseq 解析) を実施し、それぞれ約 4000 万リードのデータを得た。

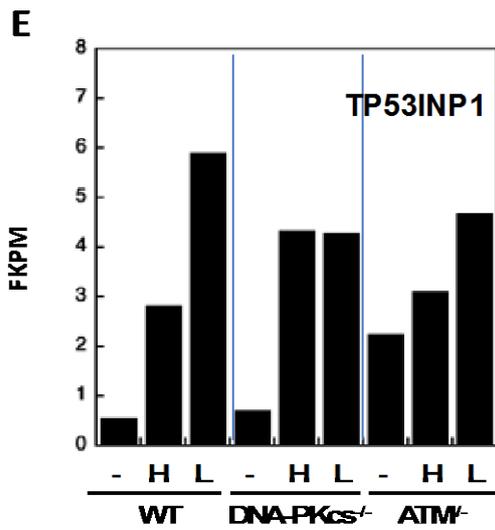
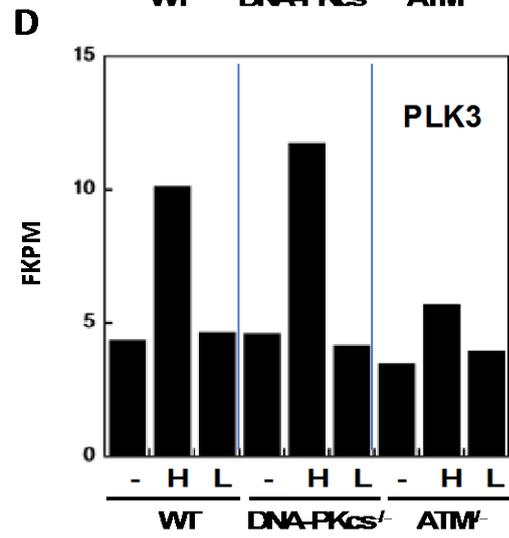
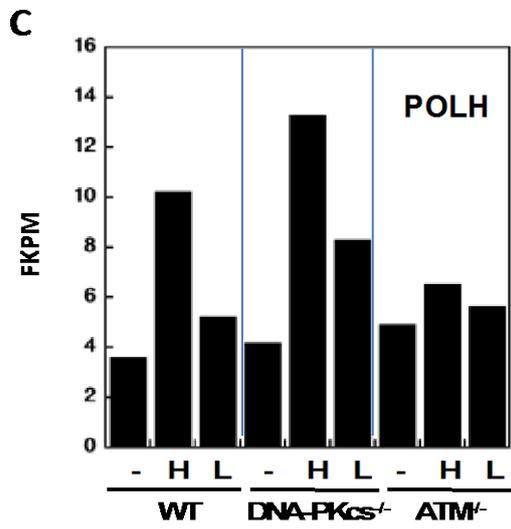
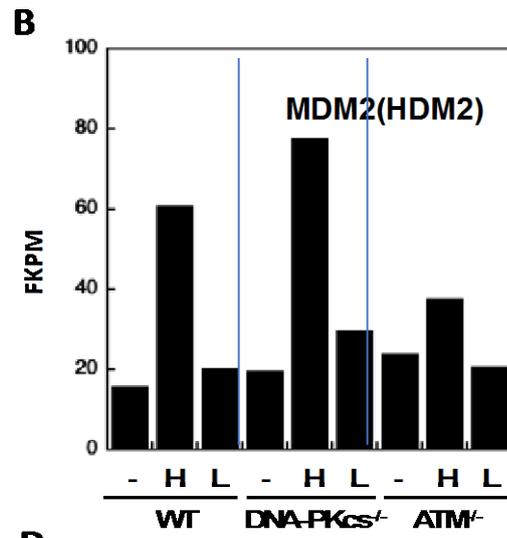
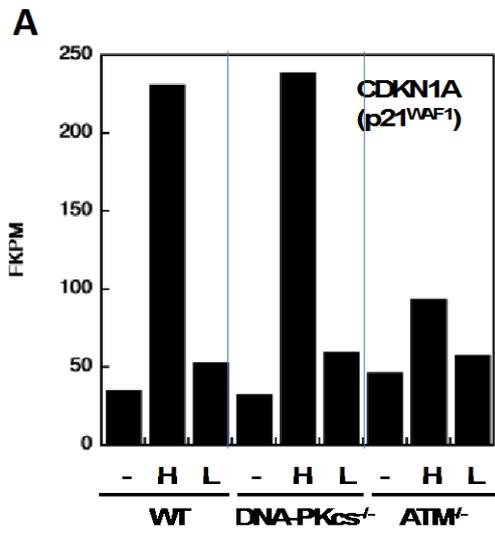
27,339 遺伝子のうち、507 遺伝子の発現が正常 TK6 細胞で 5 Gy 照射 4 時間後に 2 倍以上に増加した。また、低線量率照射で 2,226 遺伝子の発現が非照射に比べて 2 倍以上に増加した。ただし、これらの中には発現量が極めて低いものや、他の遺伝子と配列上同一で他の出現頻度で比例配分されたものなども含まれており、全てが実際に増加した訳でもないことに注意が必要であると考えられた。

放射線照射後に誘導されることが明らかになっている遺伝子の一つである *CDKN1a* に注目した。*CDKN1a* の発現は ATM、p53 によって制御されており、その産物は p21、WAF1、Cip1 などの名称で知られ、サイクリン依存性キナーゼ (CDK)、特に CDK2、CDK4 の活性を阻害する。これによって、*CDKN1a* は G1/S 期チェックポイントに重要な役割を担う。TK6 野生株を 5 Gy 照射 4 時間後、*CDKN1a* の発現は非照射時の 6.5 倍に増加した (図 III-6)。DNA-PKcs^{-/-}細胞では 7.4 倍に増加したが、ATM^{-/-}細胞では 2.0 倍にとどまった。この結果は、従来の報告とも合致しており、DNA2 本鎖切断に応答した *CDKN1a* の発現増加に ATM が関与することを示している。DNA-PKcs^{-/-}細胞で野生株より発現増強度が大きいのは、未修復の DNA2 本鎖切断が増加するためと考えられる。低線量率照射後では、5 Gy 照射後より小さいものの、野生型、DNA-PKcs^{-/-}細胞、ATM^{-/-}細胞で増加が認められた。しかしながら、ATM^{-/-}細胞では増加の程度が小さかった。*CDKN1a* 遺伝子の解析結果から、今回の解析は DNA 損傷に応答した遺伝子発現応答をきちんと捉えられていると判断した。また、線量率 100 μ Sv/h、総線量 5 mSv 以下の低線量率照射でも細胞周期チェックポイントに関わる遺伝子発現応答が起こっていると考えられた。

p53 の制御を受ける遺伝子として、p53 の分解を司る *MDM2* (*HDM2*)、DNA 修復に関わる *POLH*、細胞周期チェックポイントに関わる *PLK3* などが *CDKN1a* と同様のパターンでの応答が見られ、ATM、p53 による制御を受けている可能性が考えられた。また、アポトーシス誘導に関わる *TP53INP1* も放射線照射後に増加が見られた。しかしながら、*TP53INP1* は、*CDKN1a* と異なり、5 Gy 照射後より低線量率照射後の方が高い発現が認められず、また、非照射時の発現が ATM^{-/-}細胞において野生株や DNA-PKcs^{-/-}細胞より高かった。

図 III-6 TK6 細胞およびその DNA-PKcs、ATM 欠損細胞の RNA 発現解析結果の抜粋 (次頁)

非照射(-)、5 Gy γ 線照射 4 時間後(H)、低線量率 γ 線下 48 時間培養後(L)の細胞から RNA を調整し、次世代シーケンサーによる解析を行った。その中から、5 つの遺伝子を抽出した。FKPM は Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped reads の略で、遺伝子のエキソンの長さで補正した各遺伝子転写産物の出現頻度を示す。



IV. 結論

DNA 損傷応答に関する個人差の評価のために、40 種類の日本人由来の不死化リンパ球細胞での DNA2 本鎖切断修復タンパク質の発現量、存在状態の解析を行った。一部の細胞が十分な数の細胞を確保できるまで生育しなかったが、解析できた範囲においては、Ku86、Ku70、XRCC4 の発現に明確な違いは認められなかった。XRCC4 Ser320 のリン酸化については、放射線照射後のリン酸化が健常者由来リンパ球でがん患者由来リンパ球より高い傾向がある可能性、非照射時のリン酸化が一部のがん患者由来リンパ球で高い可能性が示唆された。検証にはさらに多くの試料の検討が必要である。また、これまでにがんリスクとの相関が報告されている XRCC4 A247S の機能解析を行った結果、これまでの報告と一致して放射線感受性を指標とした DNA 修復機能の低下が認められた。しかし、これまでの報告にあった核局在の異常は認められず、機序については、さらなる検討が必要と考えられた。

放射線と化学物質の影響の統合に関しては、昨年考案した細胞生存率をエンドポイントとした新しい数理モデルについての検討を行った。低線量率長期照射の場合、照射中に修復のみならず、増殖が起こることも考慮する必要があり、総線量に代わって、線量率に注目することが有用であると考えられた。また、このモデルは低線量率放射線の他、放射線に類似した作用を示す物質、たとえば、DNA 損傷薬剤、突然変異原などの影響評価に適している一方、神経毒性物質や代謝拮抗剤などには適用されるものではないことを明示すべきであると考えられた。

線量率 100 $\mu\text{Sv/h}$ 以下の低線量率照射では、細胞生存率の有意な低下は認められないものの、次世代シーケンサーを用いた包括的 RNA 発現解析の結果、細胞周期チェックポイント、アポトーシス、DNA 修復などに関わる遺伝子群の発現誘導が起こっていることが明らかになった。

V. 今後の展望

放射線・化学物質の影響の統合については、細胞分裂 1 回あたり致死的損傷を与える線量率あるいは化学物質の濃度を単位として線型結合可能となるモデルを考案した。今後の課題として、「損傷」の実体の解明（例えばどのような DNA 損傷かを明らかにすること）、「標準」となる細胞の選定などが挙げられる。これらの課題を解決してプロトコルを標準化し、さまざまな種類の放射線、化学物質についての換算係数を求めてデータベース化していく事業と国内外への展開を考えている。

遺伝的背景に起因する個人差については、ゲノム情報解析技術やゲノム編集技術の成熟とともに重要課題と位置づけられ、米国の DOE (Department of Energy)、欧州の MELODI (Multidisciplinary European Low Dose Initiative) などの研究ネットワークが構築されている。我が国でも、ゲノム情報、分子生物学、疫学、理論・数理生物学などさまざまな分野の連携へ向けたボトムアップな活動が始まっている。環境省、原子力規制庁、文部科学省における原子力、放射線影響関連事業に加え、文部科学省や厚生労働省や科学研究費などでの大型・ネットワーク研究も必要である。本研究とその成果をコアの一つとしてそうした枠組みの実現に貢献したいと考えている。

VI. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

なし

B. 論文：査読なし

なし

C. 国内学会発表

1) ○松本 義久, DNA 損傷・修復の視点から見た低線量率放射線影響. 日本放射線影響学会第 61 回大会, 平成 30 年 11 月 7 日～9 日, 長崎ブリックホール(長崎), ワークショップ 2 低線量・低線量率放射線影響の体系的・定量的理解のための新たな視点・概念, WS2-4.

2) ○香川 望, 塚田 海馬, 島田 幹男, 松本 義久. iPS 細胞におけるゲノム安定性維持に関わるリン酸化・脱リン酸化機構解析. 日本放射線影響学会第 61 回大会, 平成 30 年 11 月 7 日～9 日, 長崎ブリックホール(長崎), 口頭発表(優秀演題賞候補演題)OA3 損傷・修復など, OA3-1.

3) ○Ali Reza Amiri Moghani, Mukesh Kumar Sharma, Yoshihisa Matsumoto. In cellulo phosphorylation of DNA double-strand break repair protein XRCC4 on Ser260 by DNA-PK. 日本放射線影響学会第 61 回大会, 平成 30 年 11 月 7 日～9 日, 長崎ブリックホール(長崎), 口頭発表 O7 損傷・修復(2), O7-7.

4) ○松本 義久. 低線量率放射線影響の DNA 損傷・修復からの考察. 第 21 回菅原・大西記念癌治療増感研究シンポジウム in 奈良, 平成 31 年 2 月 2-3 日, 奈良県文化会館(奈良), P3(ポスター発表).

5) ○Md. Ashikur Rahman, Milal Enkhbaatar, Ali Reza Amiri Moghani, Mikio Shimada, Yoshihisa Matsumoto. Variation in the Radiosensitivity among Human Individuals Studied Using EBV-immortalized Lymphocytes. 第 21 回菅原・大西記念癌治療増感研究シンポジウム in 奈良, 平成 31 年 2 月 2-3 日, 奈良県文化会館(奈良), P4(ポスター発表).

D. 国際学会発表

1) ○Anie Day Asa DC, Rujira Wanotayan, Mikio Shimada, Mukesh Kumar Sharma, Yoshihisa Matsumoto. Functional analysis of XRCC4 mutations associated with microcephaly and growth defects. The 2nd International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology & The 34th Radiation Biology Center International Symposium, Kyoto University (Kyoto), 10-12 November 2018, Poster and short talk.

2) ○Ali Reza Amiri Moghani, Mukesh Kumar Sharma, Yoshihisa Matsumoto. DNA damage-induced phosphorylation of XRCC4 on Ser260 and Ser320 by DNA-PK. 3R&3C Symposium, 12-16 November 2018, Kanazawa Bunka Hall (Kanazawa), P50 (poster).

E. 著書

なし

F. 講演

なし

G. 主催した研究集会

なし

H. 特許出願・取得

なし

I. その他

なし

VII. 参考文献

- 1) Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007; **316**: 1160-1166.
- 2) Chen BPC, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, Botvinick E, Qin J, Chen DJ. Cell Cycle Dependence of DNA-dependent Protein Kinase Phosphorylation in Response to DNA Double Strand Breaks. *J Biol Chem* 2005; **280**: 14709-14715.
- 3) Yu Y, Wang W, Ding Q, et al. DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair* 2003; **2**: 1239-1252.
- 4) Lee K-J, Jovanovic M, Udayakumar D, et al. Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutation at these sites on DNA end joining in a cell-free system. *DNA Repair* 2003; **3**: 267-276.
- 5) Sharma MK, Imamichi S, Fukuchi M, Samarth RM, Tomita M, Matsumoto Y. In cellulo phosphorylation of XRCC4 Ser320 by DNA-PK induced by DNA damage. *J Radiat Res* 2016; **57**: 115-20.
- 6) Iwakawa M, Goto M, Noda S, Sagara M, Yamada S, Yamamoto N, Kawakami Y, Matsui Y, Miyazawa Y, Yamazaki H, Tsuji H, Ohno T, Mizoe J, Tsujii H, Imai T. DNA repair capacity measured by high throughput alkaline comet assays in EBV-transformed cell lines and peripheral blood cells from cancer patients and healthy volunteers. *Mutat Res* 2005; **588**: 1-6.
- 7) Keka IS, Mohiuddin, Maeda Y, et al. Smarcal1 promotes double-strand-break repair by nonhomologous end-joining. *Nucl Acid Res* 2015; **43**: 6359-72.
- 8) Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, et al. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 1994; **265**: 1442-5.
- 9) Smider V, Rathmell WK, Lieber MR, et al. Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science* 1994; **266**: 288-91.
- 10) Umeda N, Matsumoto Y, Yin H-L, Tomita M, Enomoto A, Morita A, Mizukoshi T, Sakai K, Hosoi Y, Suzuki N. Difference in the heat sensitivity of DNA-dependent protein kinase activity among mouse, hamster and human cells. *Int J Radiat Biol* 2003; **79**: 671-80.
- 11) Matsumoto Y, Suzuki N, Namba N, Umeda N, Ma X-J, Morita A, Tomita M, Enomoto A, Serizawa S, Hirano K, Sakai K, Yasuda H, Hosoi Y. Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett* 2000; **478**: 67-71 (2000).
- 12) Lin ZH, Chen JC, Wang YS, Huang TJ, Wang J, Long XD. DNA repair gene XRCC4 codon 247 polymorphism modified diffusely infiltrating astrocytoma risk and prognosis. *Int J Mol Sci* 2013; **5**(1):250-260.

- 13) He M, Hu X, Chen L, Cao AY, Yu KD, Shi TY, Kuang XY, Shi WB, Ling H, Li S, Qiao F, Yao L, Wei Q, Di GH, Shao ZM. A recessive variant of XRCC4 predisposes to non-BRCA1/2 breast cancer in chinese women and impairs the DNA damage response via dysregulated nuclear localization. *Oncotarget* 2014; 5(23): 12218-12232.
- 14) Manabe Y, Ichikawa K, Bando M. A Mathematical Model for Estimating Biological Damage Caused by Radiation. *J Phys Soc Jpn* 2012; 81: 104004.

Unification of effects of radiation and chemical substance and evaluation of personal variance in sensitivity

Yoshihisa Matsumoto

*Laboratory for Advanced Nuclear Energy, Institute of Innovative Research,
Tokyo Institute of Technology*

Keywords: DNA damage, DNA repair, protein phosphorylation, DNA-PK, ATM, ATR

Abstract

Effects of radiation, in general, appears not by itself but as the consequence of combined exposure to endogenous and exogenous substances arising from environment and life style. In addition, personal variance in genetic factors is thought to modify the effects of radiation considerably. This study aimed (1) to develop a method to unify the effects of radiation and chemical substance and (2) to evaluate the variance in sensitivity among individuals, based on the induction and repair of DNA damages.

In FY2018, regarding the first aim, we examined the appropriateness and the scope of application of the mathematical model for quantitative evaluation and unification of the effects of low dose rate radiation and chemicals, which was invented FY2017, through presentations in academic conferences and discussions with experts in mathematical modeling. Regarding the second aim, we examined the expression and status of DNA double-strand break repair proteins in 40 Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes from Japanese individuals. Finally, we analyzed the effects of low dose rate irradiation on the expression of genes in genome-wide range and the roles for DNA double-strand break sensors, DNA-PKcs and ATM, therein.

2-3 放射線誘発小児甲状腺がんの特異性に関する実証研究

山田 裕

(量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門 高度被ばく医療センター 福島再生支援研究部)

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故後に「県民健康調査」が実施されており、その甲状腺検査結果において、我が国の地域がん登録で把握されている甲状腺がんの罹患統計などから推定される有病数に比べて多い数値が示されている。このような状況については未だその原因が放射線によるものなのか、他の要因によるのか明らかにはなっていないことから、放射線誘発甲状腺がんの特異性を調べ、そのリスクや作用機序を明らかにすることは、今後、福島において発生している小児甲状腺がんの原因を理解する上で重要である。

そこで本研究では、小児期の放射線被ばく、特に低線量率連続被ばくによる甲状腺がん特異的な生物反応を明らかにし、小児期の放射線被ばくにより誘発される甲状腺がんのリスク評価、および診断のための基礎情報を得ることを目的として行うこととした。

実験では、まず B6C3F1 マウスを用いた動物実験試料のアーカイブを利用して、放射線照射により誘発した甲状腺がんの病理・分子解析をおこない、その特異性を明らかにすること、ついでヒトの甲状腺がんで見られる遺伝子変異を持つマウスに低線量・低線量率放射線を照射し、その遺伝子変異により誘発される甲状腺がんと修飾要因としての被ばくとの関連性を調べることを計画した。

この研究により、小児期の放射線被ばくによる甲状腺がんの線量効果関係とその遺伝子変異の特異性に関わる情報、その発がん機序と修飾要因としての被ばくとの関連性に関する情報が得られることが期待される。これらの成果は、小児期に低線量率放射線に被ばくした時に見られる甲状腺がんに関する理解を深め、適確な放射線防護対策を行っていくために重要な科学的根拠を提供する。

本年度は、動物実験病理アーカイブ (B6C3F1 雄雌マウス) よりガンマ線 (高線量率一回、1 週齢、及び 7 週齢) 照射マウスの甲状腺組織の病理診断を追加し、甲状腺病変の線量効果関係、照射時年齢による違いを調べた。その結果、放射線誘発甲状腺腫瘍の相対リスクは 1 週齢照射で 4.6/Gy、7 週齢照射で 1.4/Gy であり、1 週齢で 3.3 倍高いことがわかった。また、甲状腺腫瘍モデル動物である BRaf^{CA}; TPO-Cre-ER^{T2} マウスを長崎大学より導入して、SPF 施設への搬入のため微生物クリーン化を行い、照射実験のための準備を進めた。

キーワード

放射線発がん、甲状腺がん、小児被ばく、低線量率放射線、マウス

研究参加者

柿沼 志津子（量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部）

森岡 孝満（量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部長期低線量発がん病理研究グループ）

臺野 和広（量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部 発達期被ばく影響研究グループ）

金 小海（量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部 長期低線量発がん病理研究グループ）

I. 研究目的

2001-2010 年のがん罹患率に基づく福島県における 18 歳までの小児甲状腺がんは 2.1 人と推計されるが、「県民健康調査」において既に 160 人を超えて悪性ないしその疑いがあると診断されている。この解釈として、被ばくによる過剰発生の可能性を完全に否定するものではないが、将来的に臨床診断されるようながんを診断（過剰診断）している可能性が高いと考えられている^{1,2)}。よって現時点において放射線被ばくとの因果関係を明確に肯定あるいは否定することは困難な状況にある。

そこで本研究では、これまで行われてきた動物実験試料のアーカイブを利用して、放射線照射により誘発した甲状腺がんの病理・分子解析をおこない、その特異性を明らかにする。ついでヒトの甲状腺がんで見られる遺伝子変異を持つマウスに低線量・低線量率放射線を照射し、その遺伝子変異により誘発される甲状腺がんと修飾要因としての被ばくとの関連性を調べる。以上より、小児期の放射線被ばくにより誘発される甲状腺がんのリスク評価、および診断のために有益な基礎情報を得ることを目的として行う。

昨年度は、既存試料（放射線照射及び非照射、生涯飼育マウス甲状腺組織）の病理診断と放射線影響評価を行った。甲状腺において「過形成」から「腺腫」、「腺癌」まで段階的に変化する像が観察されること、甲状腺腫瘍の発生頻度は、線量依存性、線量率依存性、照射時年齢依存性を示す傾向があることがわかった。

本年度は、動物実験データと試料の病理解析をさらに進め、放射線誘発甲状腺がんの線量効果関係と照射時年齢による違いを定量的に調べてそのリスクを算出することを目的とした。また、遺伝子改変動物を導入し、遺伝子タイピングの方法を立ち上げ、照射実験のための準備を進めた。

II. 研究方法

1. 既存資料の解析

これまでの動物実験データ、病理スライド標本、及び組織試料を蓄積整理した動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）を利用して解析を行った。アーカイブシステムよりガンマ線（高線量率一回、あるいは低線量率連続、1 週齢及び 7 週齢）照射マウス(図 II-1)の試料を抜き出し、甲状腺がんの組織型（乳頭癌、濾胞癌等）を病理診断し、その線量効果関係、線量率、照射時年齢による違いを調べた。

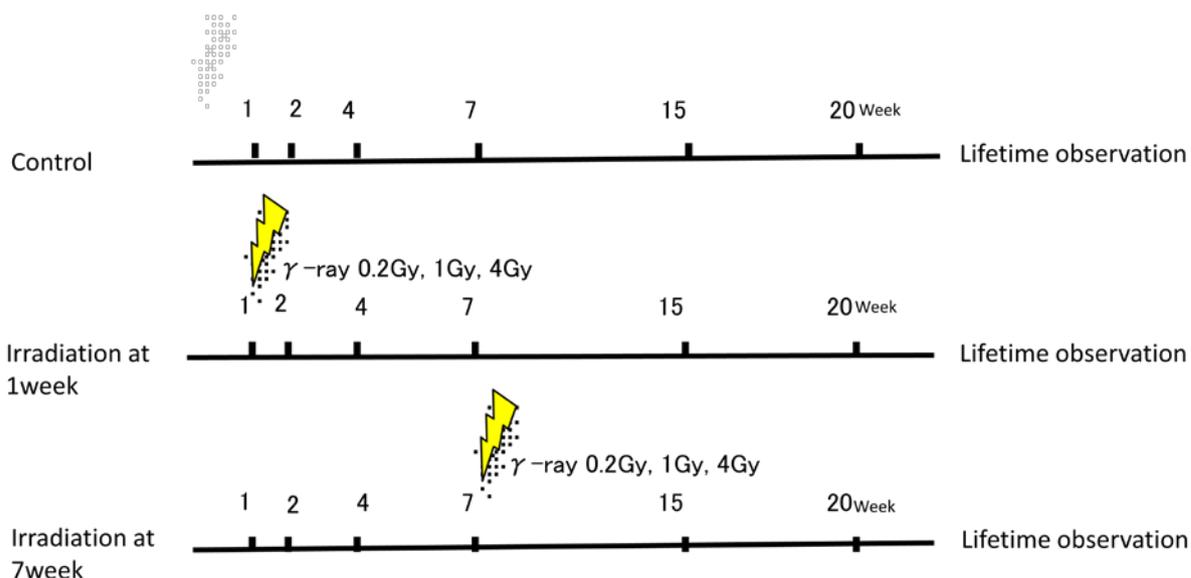


図 II-1 マウス放射線誘発甲状腺腫瘍実験プロトコール

2. 遺伝子改変動物導入

ヒト甲状腺がんの特異的遺伝子変異を持ち、放射線照射実験に最適な遺伝子改変動物を長崎大学より導入した。PCR による遺伝子タイピング法を立ち上げると共に、研究所の動物実験施設に適合する SPF の衛生状態にするため、微生物スクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」や「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第七十一号)に基づき、量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所内の「動物実験委員会」において実験内容の妥当性が審議され、理事長の承認を受けた上で遂行されている。動物実験従事者には所内規程に基づいた教育訓練の受講が義務である。

III. 研究結果

1. 既存試料の解析

1-1. 放射線による甲状腺腫瘍の病理組織像

B6C3F1 雌マウスに高線量率一回照射、あるいは低線量率連続照射して生涯飼育した動物から得た甲状腺の組織像を示す (図 III-1)。

老齢マウスの甲状腺は、萎縮性変化を伴う上皮により形成される、様々な大きさの濾胞より成っていた(A)。甲状腺における腺腫は、増殖し過染性を示す濾胞細胞と間質により形成される小塊で、コロイドを含む濾胞を伴い、濾胞型(B)あるいは乳頭型(C)に分けられた。

甲状腺における過形成は、一層以上の濾胞細胞の層によって内側を覆われた小胞によって形成されていた(D)。甲状腺における腺癌は腺腫よりも大きく、腺癌細胞の広範な増殖と多形態性および浸潤性を示し、濾胞型(E)あるいは乳頭型(F)に分けられた。

しかしながら、病理組織像において、特に照射や照射時年齢による明らかな違いは認められなかった。

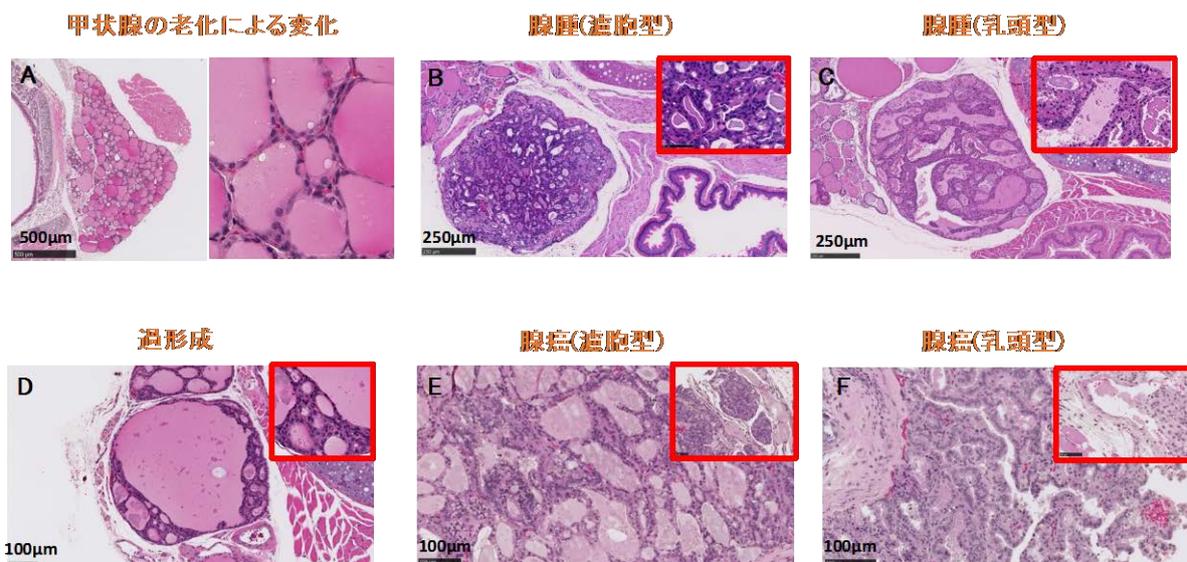


図 III-1 放射線による甲状腺腫瘍の病理組織像

1-2. 甲状腺病変の発生頻度

コントロール (非照射) 群と照射群において、甲状腺組織の病理解析結果をまとめた (表 III-1)。調べた実験群は、コントロール群と、1 週齢あるいは 7 週齢における 0.2, 1, 4Gy の一回照射群である。

表 III-1 放射線により生じる甲状腺病変の病理解析まとめ

照射週齢	照射線量(Gy)	動物数	過形成	(%)	腺腫	(%)	腺癌	(%)
コントロール	0	172	46	27	2	1	3	2
1	0.2	99	33	33	1	1	4	4
1	1	100	26	26	11	11	2	2
1	4	97	11	11	3	3	1	1
7	0.2	102	26	25	1	1	1	1
7	1	99	25	25	1	1	2	2
7	4	100	25	25	3	3	0	0

放射線による甲状腺上皮の過形成および腫瘍病変の発生頻度をまとめた(図 III-2)。甲状腺腫瘍(腺腫と腺癌を合わせたもの)の発生頻度は照射線量依存性に増加し、1週齢照射の0.2, および1Gy照射群で腫瘍の頻度が増加した(それぞれ5%, 13%)。なお、4Gy照射群では甲状腺腫瘍の発生率が4%に減少したのは、高線量の被ばくにより甲状腺以外のところに発生した腫瘍によりマウスの寿命が短縮し、甲状腺腫瘍が発生する前に死亡してしまった(リスクの競合)ためと考えられる。

一方、7週齢照射において甲状腺腫瘍はコントロールに比べてほとんど増加せず、1週齢照射の方が7週齢照射にくらべて腫瘍誘発に関して感受性が高い事が分かった。しかしながら、過形成については、照射により増えることはなかった。

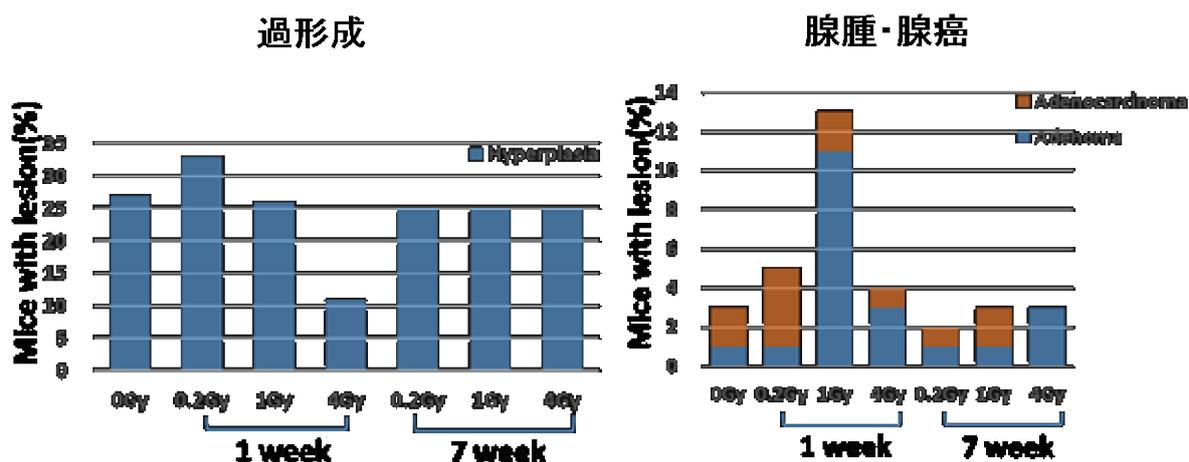


図 III-2 放射線による甲状腺過形成・腫瘍の発生頻度

1-3. 放射線による甲状腺腫瘍リスクと照射時年齢依存性

放射線によるリスクを定量的に求めるため、甲状腺腫瘍の発生と寿命を加味した甲状腺腫瘍リスクをハザード比として縦軸に取り、横軸を線量にして線量効果関係をプロットした。その結果、甲状腺腫瘍の相対リスクは1週齢照射で1Gyあたり4.6、7週齢照射では1Gyあたり1.4であり、1週齢照射で3.3倍高い事が分かった。

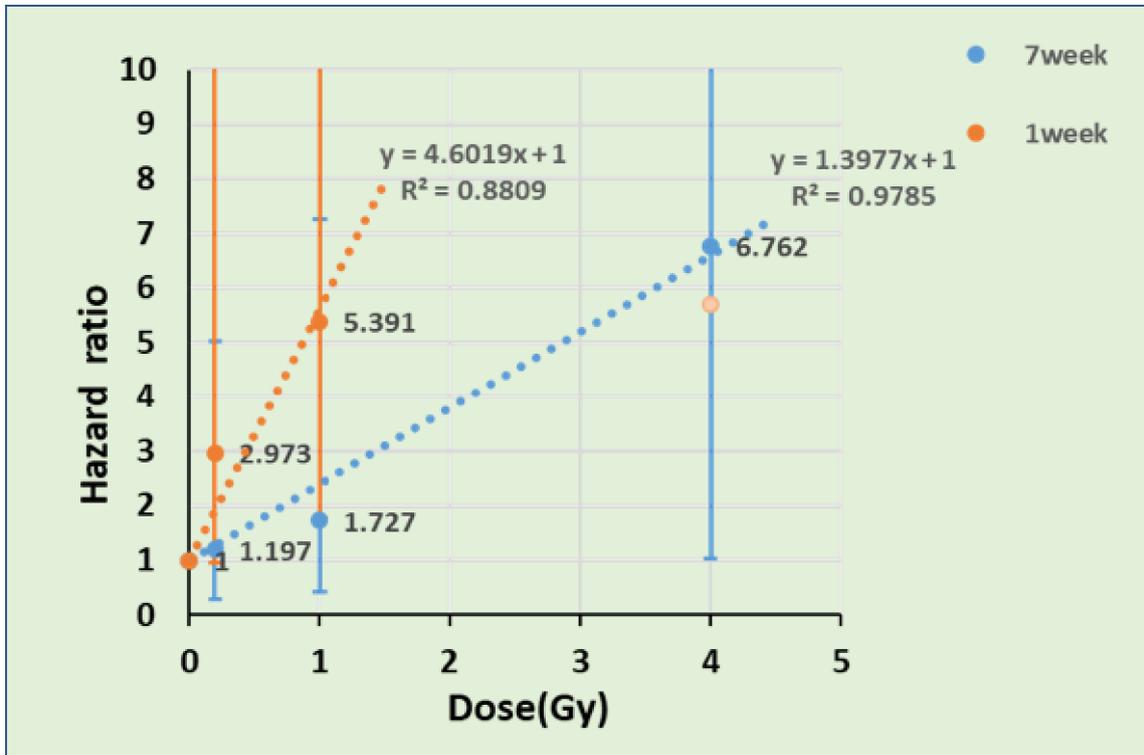


図 III-3. 放射線による甲状腺腫瘍リスクと照射時年齢依存性

2. 遺伝子改変動物導入の検討

2-1. 遺伝子改変動物導入と原理

放射線照射時年齢を変えてその影響を調べるため、甲状腺腫瘍の発生時期をコンディショナルに変えることのできる遺伝子改変マウスを検討した。標的遺伝子は福島県の小児甲状腺がんで変異が認められている BRAF 遺伝子とした。長崎大学より導入したこのマウス(BRaf^{CA}; TPO-Cre-ER^{T2}マウス)は、甲状腺濾胞上皮細胞で発現しているサイロイドペルオキシダーゼのプロモーター領域および Cre リコンビナーゼとエストロゲンリセプター(ER)の融合タンパク遺伝子を有しており、さらに Braf のエクソン 15 のコドン 600 に点突然変異(V600E)を持つ変異 Braf 遺伝子をも持つマウスである(図 III-4)³⁾。タモキシフェン投与により ER に結合して Cre リコンビナーゼと共に核内移行し、正常コドンが外れて変異 Braf が発現する。発現後数週間で甲状腺腫瘍を誘発する。

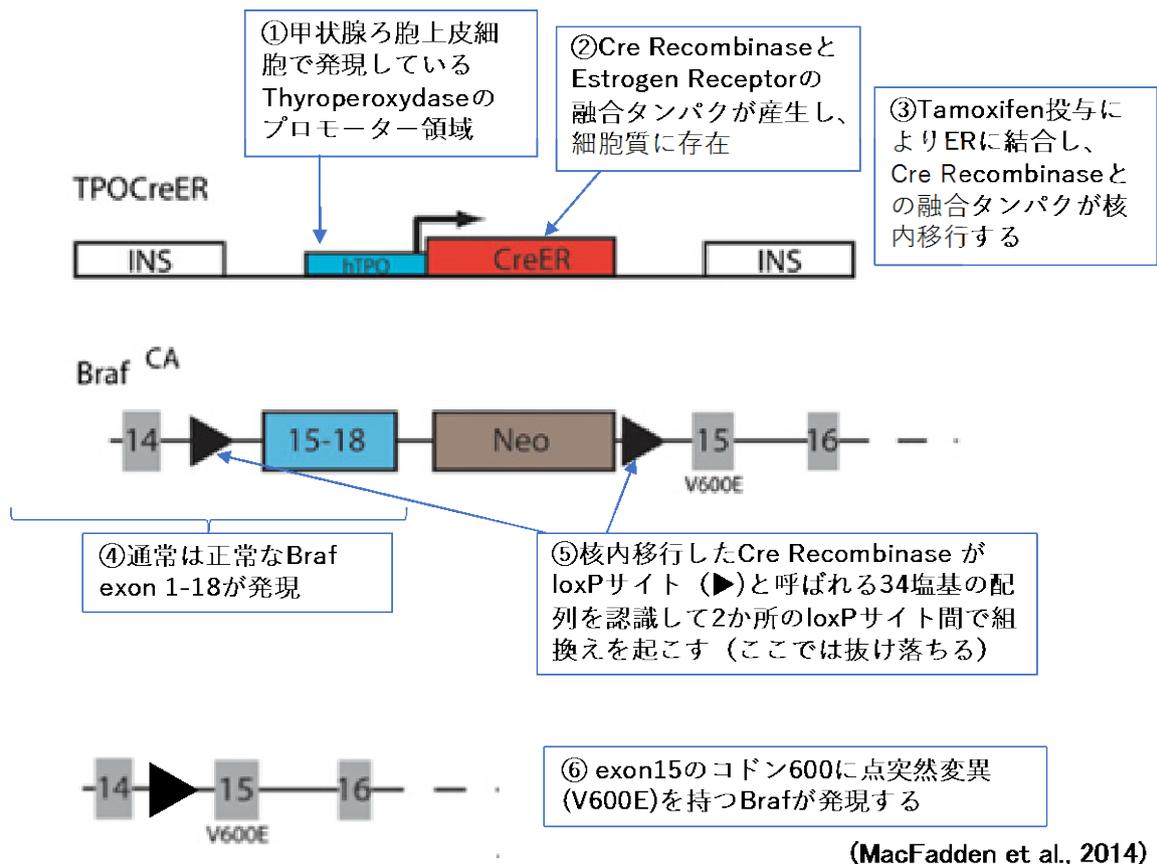


図 III-4 遺伝子改変動物の原理 (説明は図中を参照)

2-2. 遺伝子改変動物の遺伝子型タイピング

導入されたマウスの尾の先端を一部採取して DNA を抽出し、ジャクソン研究所の方法^{4,5)}にしたがって遺伝子型のタイピング方法を確立した(図 III-5)。長崎大学より提供を受けて放医研の動物実験施設に導入した動物については、放医研 SPF 施設の基準に合致させる必要があるため、体外受精と移植による微生物クリーン化を行った。

本年度3月末までに、Cre 遺伝子陽性 (ホモ型かヘテロ型かは区別できない) でかつ BRAF 遺伝子がホモ型の個体について、雌6匹、雄3匹が作出された。今後、SPF 施設へ搬入し、交配により雌雄マウスを増やして、卵子及び精子を採取し、受精卵移植により出産時期をそろえたマウスを実験に供する予定である。

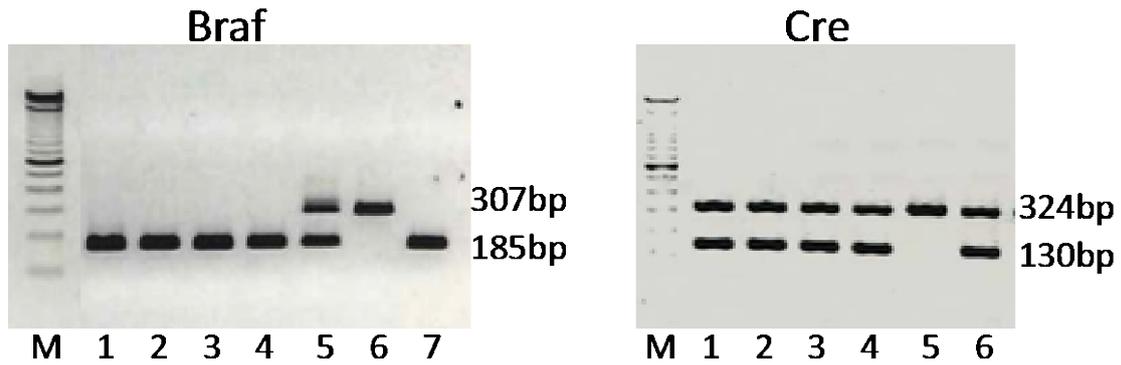


図 III-5 遺伝子型タイピングのための PCR 産物のゲル電気泳動像

左：BRAF 遺伝子のタイピング。野生型のアレルからは 185bp のバンドが現れるが、変異があるアレルからは 307bp のバンドが現れる。よって 1-4 と 7 が野生型、5 が BRAF 遺伝子変異(V600E)を片方のアレルに持つヘテロ型、6 がホモ型になる。

右：Cre 遺伝子のタイピング。内部陽性対照として 324bp のバンドがいずれの試料でも現れる。TPO-Cre-ER^{T2} 遺伝子が入っていると 130bp のバンドが現れる（ただし両アレルを区別することが出来ず、ホモ型でもヘテロ型でも一本のバンドになる）。ここでは、5 が野生型、1-4 と 6 が変位型である。

M：マーカー

IV. 考察

これまで実験動物に放射線を照射して発生する甲状腺がんのリスクに注目して調べた研究は少ない。成体期のマウスに照射、あるいは放射性ヨウ素を投与して発がん影響を調べた研究はあるが⁶⁾、成体期のマウスを使用したために甲状腺がんの発生率が少なく、リスクとして定量的に調べるのが困難であった事が理由の一つであると推測される。本研究では、1 週齢照射において甲状腺腫瘍の増加を観察することができたため、7 週齢照射のそれと比較することにより甲状腺腫瘍リスクの照射時年齢依存性に関する貴重なデータを得ることができた。

動物実験のメリットは、種々の条件を制御して、放射線そのものの影響を調べることが出来ることである。また、動物における作用機序がヒトと共通か類似していれば、動物実験での結果をヒトに応用することも可能である。

今回、放射線誘発甲状腺腫瘍について若齢期で高い感受性を示したが、その理由の一つとして、若齢期において細胞増殖がより活発であり、放射線により影響を受けた甲状腺濾胞上皮細胞(あるいはその幹細胞)が分裂して増えることにより将来の腫瘍の発生率が高くなったと考えられる。実際、4 週齢のラット甲状腺においては、7 週齢に比べて細胞増殖のマーカーである Ki67 陽性細胞が多いとの報告がある⁷⁾。チェルノブイリ事故における 18 歳以下の子どもの甲状腺がんリスクも、4 歳未満で最も高く、4-12 歳、12-18 歳になるに従って低下する⁸⁾。ヒトの場合においても同様な理由によって放射線発がん感受性が規定されている可能性が考えられる。

通常ヒトにおいて、放射線による固形がんの発生は数年から十数年かかるが、チェルノブイリでは事故後約 4 年後から甲状腺がんの増加が観察された。このように潜伏期が短いのは、その発がん過程を促進する何らかの修飾要因が存在する可能性が考えられるが、はっきりしたことは分かっていない。ヒトの進行した甲状腺がん組織の中には腫瘍関連マクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) が高密度に浸入しており、発がん過程に何らかの影響をおよぼしていることが推察される。甲状腺において BRAF 遺伝子変異(V600E)をコンディショナルに誘発できるマウスモデル(本研究において導入したマウスと同等)を用いた研究では、まず BRAF 遺伝子変異が誘発されると甲状腺組織内に TAM を引きつける化学遊走物質 Csf-1 と Ccl-2 が発現し、次いで TAM の侵入が生じ、がん化が進行するという過程が示されている⁹⁾。つまり、TAM が腫瘍形成性を支持(pro-tumorigenic)していると考えられる。しかしながら、放射線で誘発される甲状腺腫瘍においてこのような発がん修飾機構がどの様に係わっているのかは不明である。

発がんの特異性を調べ、その発がんメカニズムとそれを修飾する要因を明らかにすることにより、ヒトでのリスク評価を行う上での根拠を提供することになると期待される。次年度においては、遺伝子変異マウスモデルを用いて放射線誘発甲状腺がんの発生機序を調べていく予定である。

V. 結論

本年度は既存試料(放射線照射及び非照射、生涯飼育マウス甲状腺組織)の病理診断と放射線影響評価を継続して行うとともに、遺伝子改変動物を導入し実験準備を進めた。

動物実験病理アーカイブ(B6C3F1 雄雌マウス)よりガンマ線(高線量率一回、1 週齢、及び 7 週齢)照射マウスについて、各実験群約 100 症例に増やして病理診断を行い、その線量効果関係

と照射時年齢による違いを調べた。放射線誘発甲状腺腫瘍の相対リスクは1週齢照射で4.6/Gy、7週齢照射で1.4/Gyであり、1週齢で3.3倍高いことがわかった。

また長崎大学より甲状腺腫瘍モデル動物である BRaf^{CA}; TPO-Cre-ER^{T2} マウスを導入し、尾組織より DNA を抽出して PCR の条件を設定し、BRaf^{CA} 遺伝子および TPO-Cre-ER^{T2} 遺伝子型のタイピング方法を確立すると共に、SPF 施設への搬入のため微生物クリーン化を行った。

VI. 次年度以降の計画

1) 既存試料の解析

動物実験病理アーカイブ (B6C3F1 雄雌マウス) よりガンマ線 (高線量率一回、あるいは低線量率連続、1週齢、及び7週齢) 照射マウスの病理診断を継続し、その低線量率照射と照射時年齢による違いをまとめる。

甲状腺腫瘍について、マイクロダイセクションによりがん細胞部分を取り出して DNA を抽出し、放射線照射後に生じた甲状腺がん組織の遺伝子変異を全エクソンシーケンスにより調べる。

2) 動物照射実験

BRaf^{CA}; TPO-Cre-ER^{T2} マウスを飼育・交配し、実験用個体を増やす。小児期に放射線 (低線量率、高線量率) を照射し、甲状腺がんの病理診断を行って発生率を求め、その線量依存性、線量率依存性を調べる (図 VI-1)。

がん細胞部分を取り出し、2nd ヒットの遺伝子変異がさらに生じているのかを次世代シーケンスにより調べる。

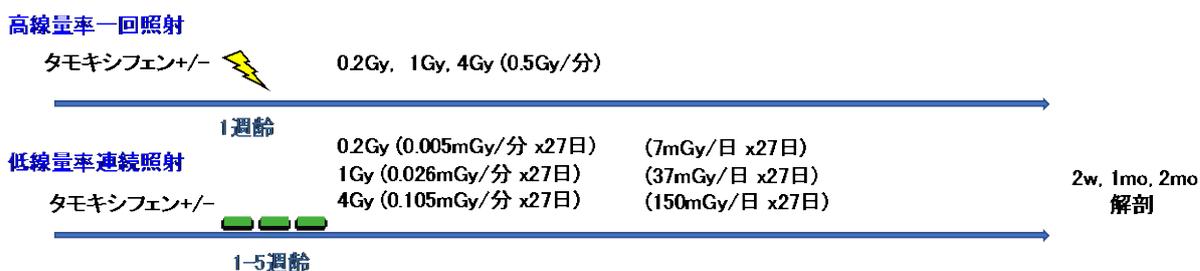


図 VI-1 遺伝子改変動物照射実験のプロトコール

3) 分子生物学的解析実験

上記小児期マウスに照射し、経時的に甲状腺および血清を採取する。免疫組織化学的に甲状腺組織の初期応答 (γ H2AX, Caspase3, 53BP1) や増殖能 (Ki-67) を調べるとともに、血清中の甲状腺関連ホルモン (TSH, T4 等)、免疫及び炎症関連因子 (インターロイキン等) 等を測定する。

非照射群と比較することにより照射群に特異的な変化をマーカーとして抽出し、どのような因子が放射線誘発小児甲状腺がんの発がん過程に関与するのか定性的、かつ定量的に明らかにする。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

なし

B. 論文：査読なし

なし

C. 学内学会発表

1) γ 線照射後のマウス甲状腺病変の被ばく時期年齢依存性について、日本放射線影響学会第61回大会(2018.11.8、長崎)

D. 国際学会発表

1) Effect of age at exposure on the incidence of thyroid lesions after γ -ray irradiation in mice. 44th European Radiation Research Congress (2018.8.21~25、ハンガリー)

E. 著書

なし

F. 講演

なし

G. 主催した研究集会

なし

H. 特許出願・取得

なし

I. その他

なし

VIII. 参考文献

1) 津金昌一郎

「福島県における甲状腺がん有病者数の推計」

福島県「県民健康調査」検討委員会 第4回「甲状腺検査評価部会」、2014/11/11

2) 福島県県民健康調査検討委員会甲状腺検査評価部会

「甲状腺検査に関する中間とりまとめ」

第19回「県民健康調査」検討委員会、 2015/5/18

3) DG. McFadden, A. Vernona, PM. Santiago, R. Martinez-McFaline, A. Bhutkara, DM. Crowley, M. McMahon, PM. Sadowd, and T. Jacksa, p53 constrains progression to anaplastic thyroid carcinoma in a Braf-mutant mouse model of papillary thyroid cancer. Proc Natl Acad Sci USA. (2014) 111(16):E1600-9. doi: 10.1073/pnas.

- 4) The Jaxon Laboratory, B6.129P2(Cg)-Braftm1Mmcm/J, Stock No: 017837 | BRafCA, <https://www.jax.org/strain/017837>.
- 5) The Jaxon Laboratory, B6(Cg)-Tg(TPO-cre/ERT2)1139Tyj/J, Stock No: 026512 <https://www.jax.org/strain/026512>.
- 6) G. Walinder, Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. I. Irradiation of adult mice. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* (1972) 11(5), 433-451.
- 7) M. M.-Matsuyama, K. Shichijo, K. Okaichi, T. Kurashige, H. Kondo, S. Miura and M. Nakashima, Effect of age on the sensitivity of the rat thyroid gland to ionizing radiation. *J Radiat Rese,* (2015) 56(3), 493–501.
- 8) AV. Brenner, MD. Tronko, M. Hatch, TI. Bogdanova, VA. Oliynik, JH. Lubin, LB. Zablotska, VP. Tereschenko, RJ. McConnell, GA. Zamotaeva, P. O'Kane, AC. Bouville, LV. Chaykovskaya, E. Greenebaum, IP. Paster, VM. Shpak, E. Ron. I-131 dose response for incident thyroid cancers in Ukraine related to the Chornobyl accident. *Environ Health Perspect.* (2011) 119(7), 933-939.
- 9) M. Ryder, M. Gild, TM. Hohl, E. Pamer, J. Knauf, R. Ghossein, J.A. Joyce, J.A. Fagin. Genetic and pharmacological Targeting of CSF-1/CSF-1R inhibits tumor-associated macrophages and impairs BRAF-induced thyroid Ccancer Progression. *PLoS ONE* (2013) 8(1): e54302. doi:10.1371/journal.pone.0054302

Study of carcinogenesis of radiation-induced thyroid cancer in childhood mice

Yutaka Yamada¹, Shizuko Kakinuma², Takamitsu Morioka², Kazuhiro Daino², Xiaohai Jin²

1: Department of Radioecology and Fukushima Project, Center for Advanced Radiation Emergency Medicine,

*2: Department of Radiation Effect Research, National Institute of Radiological Sciences,
National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology.*

Key word : Radiation carcinogenesis, thyroid cancer, childhood radiation exposure, low-dose-rate radiation, mice

Abstract

Since the nuclear accident in Fukushima Daiichi nuclear power plants, people living in contaminated areas are concerned about health effects including cancer caused by long-term low dose rate radiation exposure. There is an increasing interest in the radiation exposure effects of children with particularly high radiation susceptibility. Currently, thyroid cancer has been found by ultrasound thyroid screening. However, it is not clear whether thyroid carcinogenesis is associated with radiation exposure. A purpose of this study is to get clarifying carcinogenesis of thyroid cancer due to low-dose-rate radiation exposure at childhood period, and basics of thyroid cancer information for a risk estimation and a diagnosis.

By the experiment, pathological analysis of radiation-induced thyroid cancer is performed with the archive of the animal experiment sample. B6C3F1 male and female mice were irradiated at 1 or 7 weeks of age with 0, 0.2Gy, 1Gy or 4Gy of γ -ray doses. After pathological examination, the incidence of thyroid lesion was calculated, and determined the risk of thyroid tumor.

The relative risk of radiation-induced thyroid tumor is 4.6 per 1Gy by 1 week of age and 1.4 per 1Gy by 7 weeks of age at exposure. The radiation risk of thyroid tumor is 3.3 times higher in a 1 week of age radiation exposure mouse than 7 weeks of age radiation exposure.

Then, transgenic mice (BRaf^{CA}; TPO-Cre-ER^{T2}) with gene mutation to be seen for human thyroid cancer were introduced from Nagasaki University, and treated for SPF condition. Thyroid cancer induction and association with the radiation exposure as the modifying factor will be investigated.

2-4 成体期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響

とメカニズム解明

主任研究者：鈴木 啓司

(国立大学法人長崎大学 原爆後障害医療研究所 放射線災害医療学研究分野 准教授)

分担研究者：柿沼 志津子

(国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部 部長)

研究要旨

本研究は、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的として計画された。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) モデルを組み合わせた実験系により証明することを目指している。低線量 (100mGy) の放射線被ばくを含む小児期 (1 週齢) での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と終生飼育により追跡し、同時に、発がんのプロセスを、組織における DNA 障害、細胞死、細胞老化、炎症、を含む組織微小環境の変化から解析し、放射線照射直後から微小がんあるいはがん成立までの各プロセスでの DIO の影響を統合的に解析する。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究には、長崎大学および放射線医学総合研究所 (放医研) の 2 機関が参画し、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当する。放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射 (100mGy および 4Gy)、経時的標本採取、および発がん解析を担当する。放射線照射は B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、60%脂肪食を与えて飼育し、その後通常食に戻して経過観察を行う。採取した組織標本は、病理切片を長崎大に送付して、組織微小環境の解析に供する。組織微小環境の解析は、特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色法により実施する計画である。

平成 30 年度は、B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期 (1 週齢) における放射線照射 (γ 線、100mGy および 4Gy、線量率は 0.5Gy/min) を実施した。その後、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢の間に、高脂肪食 (60%脂肪食) を与えて飼育し、再び通常食に戻して終生飼育を継続している。これと同時に、組織微小環境の変化 (DNA 損傷、細胞死、細胞増殖、炎症、微小血管およびリンパ管の障害) を解析するための蛍光免疫染色実験条件の最適化を完了し、放射線被ばくの初期影響、および DIO の組織微小環境への影響の解析に着手した。

キーワード

放射線、低線量、発がん、生活習慣、組織反応

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱くことになった。事故から 8 年がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるに従い、専門家会議の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後の被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、事故当時に子ども期を過ごした子供たちの生活習慣等の変化が、放射線発がんリスクを修飾する可能性が懸念される。中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取バランス変調に基づく一時的な肥満は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要がある、健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。これまでの、小児期の肥満の影響を調査する研究により、小児期の肥満は、放射線発がんリスクに影響をおよぼさない可能性が示唆されている。今後、当時子ども期にあった子どもたちは成長して、やがて青年~成人になっていくことを鑑みると、これまでの研究を補完する研究としても、小児期の被ばくによる発がんリスクが、成体期の生活習慣等の変化で修飾されるか否かを明らかにする研究を実施する必要がある。福島県民、とりわけ、小児期に事故を経験した子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、子供たちの今後の生活習慣等が、小児期の低線量放射線被ばくによる健康影響におよぼす影響を対象とした研究は、極めて重要である。

このため本研究は、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的として計画された。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた実験系により証明することを目指している。具体的には、低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む小児期（1 週齢）での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と終生飼育により追跡し、同時に、①DNA 障害の誘発と除去、②細胞死（細胞老化）を含む初期組織反応、③組織障害の回復と炎症性反応、④初期がんと発がん微小環境、および、⑤がんの成立と進展、の各プロセスにおいて、成体期の DIO の影響を組織微小環境の変化に着目して統合的に解析する。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究には、長崎大学および放射線医学総合研究所（放医研）の 2 機関が参画し、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当する。放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射（100mGy および 4Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当する。放射線照射は B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、60%脂肪食を与えて飼育し、その後通常食に戻して経過観察を行う。採取した組織標本は、病理切片を長崎大に送付して、組織微小環境の解析に供する。組織微小環境の解析は、特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色法により実施した。

本研究では、動物発がんモデルを用いた高脂肪食による一時的な肥満の実験系を用い、小児期被ばくによる発がんリスクが変化するかどうかを明らかにするが、その結果、肥満などの生活習

慣等による自然発がん要因が低線量放射線被ばくの健康影響にどのような影響をおよぼすか評価する際に不可欠な科学的知見が得られる。とりわけ、本研究では、低線量放射線として 100mGy の影響を評価するが、これまでの研究成果から、100mGy 単独照射群においては、本研究が解析対象とする発がんリスクの有意な増加は認められないと予想される。本研究の成果により、100mGy による放射線被ばくと生体期の生活習慣等とが相互作用した場合でも、発がんリスクに有意な増加が認められなければ、100mGy 以下の低線量放射線でも、放射線被ばく単独はもちろんのこと、生活習慣等の変化があった場合でも発がんリスクの増加は予想されないと結論できる。これらにより、生活習慣等の変化により懸念される放射線発がんリスクの低減に向け、機構論に基づいた対策を可能にする科学的基盤が提供できる。

平成 30 年度は、B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期（1 週齢）における放射線照射、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢の間の高脂肪食（60%脂肪食）摂餌、再び通常食に戻してからの終生飼育を開始した。これと同時に、組織微小環境の変化（DNA 損傷、細胞死、細胞増殖、炎症、微小血管およびリンパ管の障害）を解析するための蛍光免疫染色実験条件の最適化を完了し、放射線被ばくの初期影響、および DIO の組織微小環境への影響の解析に着手した。

II. 研究方法

本研究では、福島原発事故を経験した子どもたちが成長してからの生活習慣等の変化を念頭に、小児期（1 週齢）に放射線照射を行ったマウスに、成体期に相当する期間（20 週齢から 24 週齢）の間、高脂肪食（通常食が 10%脂肪含有であるのに対し 60%脂肪含有餌。おおよそ 36%のカロリー増になり、15~20 歳程度の青年で換算すると、1 日あたりの標準エネルギー量である 2300~3100kcal に対して、2700~3400kcal 相当になる。）を給餌し、その後、終生飼育をすることによってがんの発生を解析する実験プロトコルを採用した（図 II-1）。具体的には、放医研において、B6C3F1 雄マウスに、1 週齢で放射線（ γ 線（0.5Gy/分）、100mGy および 4Gy）を照射し、その後、20 週齢から 24 週齢まで高脂肪餌を与えて DIO を誘導し、その後通常餌に戻してから長期飼育を行っている。放射線照射後は一定期間毎に組織標本を採取して、組織微小環境変化の継時観察を実施する。放射線発がんの対象とするがんのタイプは、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇する、リンパ腫、肝がん、および肺がんである。採取した組織からは薄切切片を作成し、長崎大学において、抗原賦活化以降の処理を行い、蛍光免疫染色法による DNA 障害、細胞死、炎症反応や組織微小環境の解析を行っている（図 II-2）。

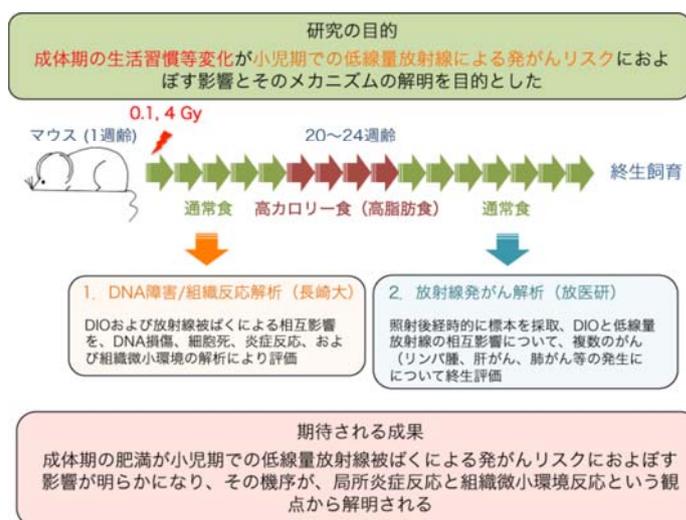


図 II-1. 研究概要図

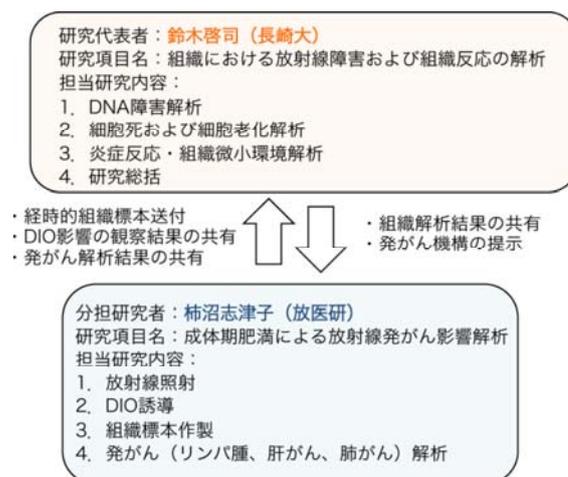


図 II-2. 研究組織間の連携図

DIOを誘導するための高カロリー餌としては、Research Diet社のD12492を用いた。D12492は、カロリーの60%が脂肪に由来し、残りの20%ずつが蛋白質と炭水化物の飼料である。単位重量あたりのカロリー量は、コントロール餌（D12450J、10%脂肪）にくらべおおよそ140%増加しており、多くのDIO研究の標準飼料として汎用されている。

1. 組織における放射線障害および組織反応の解析

DIOあるいは放射線による組織障害あるいは組織微小環境変化を定量的に評価するため、放医

研において採取された胸腺・脾臓、肝臓、肺および脂肪組織を、ホルマリン中で固定した後にパラフィン中に包埋し、薄切標本（厚さ 4 μ m）を作成して解析に供した。発がんの対象となる組織は、胸腺・脾臓、肝臓および肺であるが、高脂肪食による全身性の影響に関与する脂肪組織も解析の対象に含めた。スライドガラス上に固定した薄切切片は、脱パラフィン処理を施した後に PBS 中に保管し、蛍光免疫染色を行うまで、冷蔵庫中で保存した。

標本の染色を行う当日に、賦活化溶液中で 95°C のウォーターバスに 40 分間浸け、抗原の賦活化を行った。その後、5% skim milk を含む TBS-T（0.5% Tween-20 を含む TBS 緩衝液）に一次抗体を希釈して、切片と 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後、PBS で十分に洗浄した後、二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa 蛍光標識抗体を用いた。標本は、1 μ g/ml の DAPI を含む 10% グリセリン PBS 溶液中で封入して保存した。作成した標本は、蛍光顕微鏡下で観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システムにより一次抗体のシグナルを解析した。

一次抗体としては、DNA 損傷の検出には、抗 53BP1 抗体（Bethyl、A300-272）を、組織障害および回復の解析には、複数の抗 Ki-67 抗体を検討した。炎症反応は、組織におけるマクロファージ、好中球および樹状細胞の浸潤を、これらの細胞に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した。細胞死は、アポトーシスの誘導および老化様細胞死の誘導を、また、組織微小環境は、上皮細胞および間葉系細胞を細胞骨格系蛋白質に対する特異的抗体によって、さらに微小血管やリンパ管は、血管内皮細胞あるいはリンパ管内皮細胞に対する特異的抗体によって可視化を検討した。今年度は、これら特異的抗体の選別や染色条件の最適化を行った。

2. 成体期肥満による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期（1 週齢）に放射線照射（ γ 線、100mGy および 4Gy、線量率は 0.5Gy/min）を行った。その後、通常餌で飼育を行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、高脂肪食（60% 脂肪食）を与えて飼育し、その後、再び通常食に戻して終生飼育を実施した。

終生飼育を行う群は、0Gy、100mGy、および 4Gy 照射群の 3 群を、それぞれ通常脂肪食と高脂肪食で飼育し、合計 6 群を設定した。1 群は 60 匹で、発がんを観察する終生飼育用には計 360 匹を使用した。飼育観察および体重測定を継続し、がんの発生および病状の悪化が認められるマウスについては解剖し、病理サンプルの保存および解析を行っている。成体期の肥満の影響は、リンパ腫、肝がん、および肺がんに着目して各実験群におけるリスクの違いを比較することにより評価する。

（倫理面への配慮）

本研究計画では、動物実験は、放医研において実施する。このため、以下に記述するように、動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた（承認番号 18-1003）。また、長崎大学では、各所において作成された組織切片を用いた解析のみを行うため、動物実験委員会等の承認は不要である。放医研においては、動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた上で、動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」「実験動物取扱者の健康管理等に関する基準」及び「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実験を行っている。

III. 研究結果

1. 組織における放射線障害および組織反応の解析

放射線による組織障害あるいは組織微小環境変化、およびこれらに対する DIO の影響を定量的に評価するため、放医研において採取される胸腺・脾臓、肝臓、肺および脂肪組織において、蛍光染色法による解析のための実験条件の最適化を行った。組織標本は、ホルマリン中で固定した後にパラフィン中に包埋し、薄切標本（厚さ $4\mu\text{m}$ ）を作成して解析に供した。スライドガラス上に固定した薄切切片は、脱パラフィン処理を施した後に PBS 中に保管し、蛍光免疫染色を行うまで冷蔵庫内で保存した。

1-1. 抗原賦活化条件の最適化

標本の染色を行う当日に、賦活化溶液中で 95°C のウォーターバスに 40 分間浸け、抗原の賦活化を行った。通常の標本の賦活化は、クエン酸ベースの pH6.0 緩衝液を賦活化溶液として用いる。本研究でも、これまで pH6.0 の賦活化溶液を用いてきたが、抗体によっては、十分なシグナルが得られないものも多数あり、蛍光免疫染色法の最適化のために、まず、異なる賦活化溶液を検討した。具体的には、トリス塩酸ベースの pH9.0 緩衝液を検討した。検討のための一次抗体として、DNA 損傷の検出に用いる抗 53BP1 抗体 (Bethyl、A300-272)、および、組織増殖の解析に用いる抗 Ki-67 抗体 (eBioscience、SolA15) を利用した。一次抗体は、5%skim milk を含む TBS-T (0.5%Tween-20 を含む TBS 緩衝液) に希釈して、切片と 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後、PBS で標本を十分に洗浄した後、二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa 蛍光標識の抗ウサギ抗体 (抗 53BP1 抗体用) および抗ラット抗体 (抗 Ki-67 抗体用) を用いた。抗体反応終了後の標本は、 $1\mu\text{g/ml}$ の DAPI を含む 10%グリセリン PBS 溶液中で封入して保存した。作成した標本は、蛍光顕微鏡下で観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システムにより一次抗体のシグナルを解析した。

同一の組織から作成された 2 枚の薄切標本を、1 枚は pH6.0 緩衝液中で、またもう 1 枚は pH9.0 緩衝液中で同時に賦活化処理を行い、2 種類の抗体を同時に反応させてその染色性を観察したところ、抗 53BP1 抗体のシグナルは 2 種類の緩衝液間で差違を認めなかったが、抗 Ki-67 抗体においては、pH9.0 緩衝液により賦活化を行った標本において、顕著なシグナル強度の改善が認められた。このため、以降の実験では、pH6.0 の緩衝液に加え、pH9.0 の緩衝液による抗原の賦活化も同時に検討した。

1-2. 組織障害および組織微小環境変化の解析条件の最適化

放射線による組織障害や組織微小環境の変化は、様々な抗体を複数同時に組み合わせる多重蛍光免疫染色法により統合的に解析を行った。まず、DNA 損傷の検出には、抗 53BP1 抗体を用いた。放射線影響の誘発には、放射線エネルギーの吸収により生じる様々なタイプの DNA 損傷のうち、DNA 二重鎖切断が関係するため、DNA 二重鎖切断を検出する分子マーカーとして用いられている 53BP1 蛋白質の集積 (これを一般的にフォーカスと呼ぶ) を応用した。1 個の DNA 二重鎖切断 (以降は DNA 損傷と呼ぶ) に対応して 1 個の 53BP1 フォーカスが生成されるため、フォーカス数を計測する事で、DNA 損傷数が間接的に評価できる。

図 III-1 には、4Gy の γ 線照射 1 時間後の肝臓の染色像を示したが、肝臓を構成する細胞の核

に多数の 53BP1 フォーカスが観察される。細胞核は、DAPI により染色されているので楕円形の青色シグナルとして検出される。53BP1 フォーカス数は、照射線量に応じてその数が変化し、また、照射後初期に多数観察されるフォーカスは、照射後の時間が経つにつれてその数が減少する。組織の中には、図 III-1. 左中央のように、高レベルの 53BP1 蛋白質を発現している細胞が局在する部分がある。これらの細胞は、門脈領域の胆管を構成する細胞で、細胞の種類により 53BP1 蛋白質が異なる発現パターンを示す事も明らかになった。

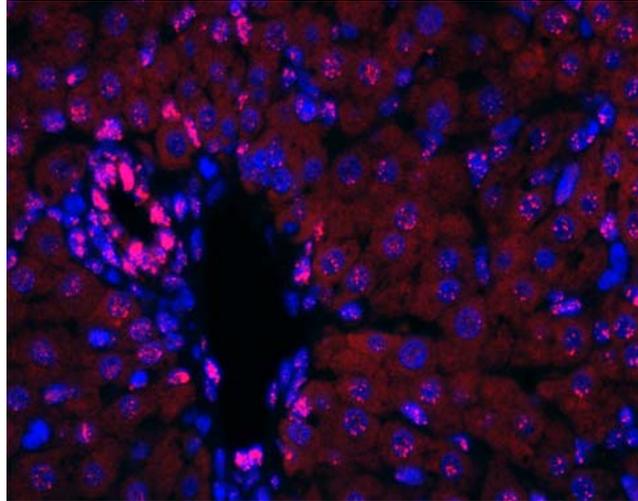


図 III-1. 抗 53BP1 抗体による DNA 損傷の検出
赤色（二次抗体に Alexa555 標識の抗体を使用）の斑点状のシグナルが 53BP1 フォーカスで、DAPI で染色された青色の細胞核上に局在している。

細胞増殖の検出には、抗 Ki-67 抗体の応用を検討した。図 III-2. には、1 週齢のマウスから採取した肝臓の染色像を示したが、組織内に Ki-67 陽性細胞（水色で染色されている細胞）が観察される。この標本では、数ヶ所に、Ki-67 陽性細胞が集合したクラスターが検出されるが、これ

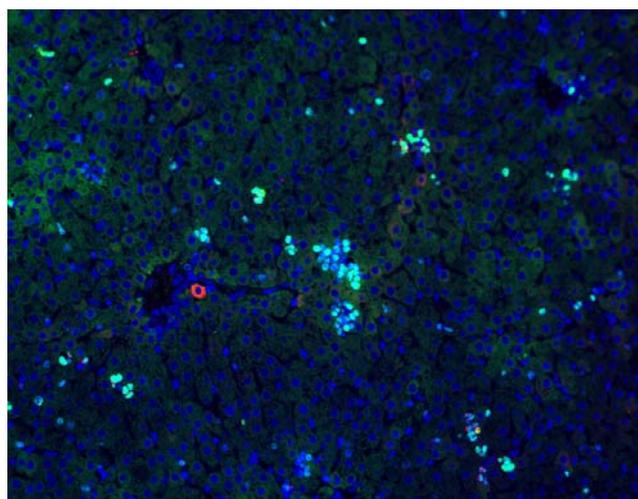


図 III-2. 抗 Ki-67 抗体による増殖細胞の検出
青色の細胞核に共局在する Ki-67 シグナル（緑色、図では核の青色と重なるため水色に見える）が観察される。

らは1週齢の肝臓内に存在する造血細胞で、若齢のマウスでは、骨髄だけでなく、肝臓でも造血が行われている事が確認された。一方、散在するKi-67陽性細胞は肝細胞に由来するシグナルで、1週齢マウスでは、肝臓全体の増殖活性が高い事が明らかになった。

放射線照射後の組織障害は細胞死の誘導によって惹起されるが、造血系組織である胸腺や脾臓ではアポトーシスによる細胞死が誘導される一方で、肝臓や肺等、主要な臓器ではアポトーシスは誘導されない。これらの臓器では、老化様細胞死（細胞周期の不可逆的停止が老化と同等の細胞状態を誘導する細胞死様式）が主要な細胞死であり、このため、Ki-67陽性細胞から陰性細胞への変化は、老化様死細胞を可視化するためにも応用できる。

組織微小環境は、上皮細胞とそれを取り巻く間質を構成する間葉系細胞からなる複合的組織野である。組織微小環境には、さらに微小血管やリンパ管等が分布して、複雑な環境を形成している。これまで、放射線の影響は、特定の細胞を標的にしてのみ評価されてきたが（例えば骨髄では血球やリンパ球の動態だけ、消化管障害では消化管上皮細胞だけというように）、放射線影響の統合的理解のためには、組織微小環境への影響を十分に理解する事が求められる。なぜならば、傷害を受けた組織が回復するためには、組織幹細胞と、その増殖・分化を支持する組織微小環境が必須だからである。組織微小環境の障害は、組織の回復を遅延させ、放射線被ばくの急性影響の原因になる。組織微小環境の障害は、一方で、長期間の組織微小環境の変化を招来し、例えば、長期にわたる慢性炎症は、放射線の晩発影響に係わる組織反応として認知されるようになってきた。

そこでまず、組織微小環境を把握するために、組織を構成する上皮細胞および間質細胞を、細胞骨格系蛋白質に対する特異的抗体を用いて可視化する蛍光染色法を最適化した。細胞の形態を規定する細胞骨格系蛋白質には、アクチンフィラメント、微小管、および中間径線維という3つの異なる種類の線維性蛋白質が関わっている。このうち、細胞種毎に異なるものが中間径線維で、上皮細胞はサイトケラチン、間質細胞はビメンチンを主とする中間径線維を有している。そこで、これらの中間径線維蛋白質に対する抗体を使い分ける事によって、組織内での上皮細胞の構築の解析を可能にした。ここでは特に、上皮細胞の検出に、サイトケラチン8+18を用いた。

図III-3.には、肝臓での解析の結果を示したが、サイトケラチン8+18で描画される、肝臓組織を構築する主要な細胞である肝細胞の分布様式とともに、肝細胞の間隙に位置する類洞、さらには、間隙に局在するKi-67陽性の増殖性細胞の存在などを確認する事ができ、放射線照射による組織微小環境変化の評価を可能にした。

加えて、組織微小環境の変化として知られる炎症反応では、マクロファージ、好中球および樹状細胞の浸潤が予想されるため、これらの細胞に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法の最適化も実施した。特にマクロファージは、肝臓内に常駐しており、クッパー細胞と呼ばれている。組織障害のクリアランスに係わっている重要な細胞であるため、マクロファージのマーカーであるF4-80、CD11b、CD68に対する抗体等の複数の抗体を検討して、染色条件の最適化を検討した。その結果、F4-80抗体（Bethyl、ラット抗体）の染色性が最も優れていたため、次年度以降の研究では、同抗体を用いる事とした。

放射線被ばくによる初期影響および DIO の組織微小環境への影響の解析にも着手した。まず、4Gy の放射線照射後の DNA 損傷の消長については、抗 53BP1 抗体による解析を実施し、照射後に多数見られる 53BP1 フォーカスは、照射後の時間の経過とともに減少する傾向を確認した。

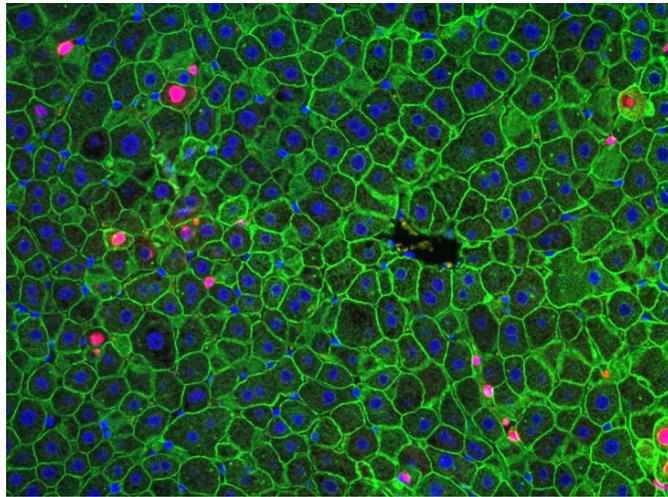


図 III-3. サイトケラチンによる肝細胞の描画

青色は細胞核、緑色は肝細胞のサイトケラチン線維で、細胞の輪郭に沿ってシグナルが検出される。赤色は Ki-67 陽性細胞。肝細胞からなる肝臓では、肝細胞同士が接着する部分と、肝細胞間に間隙が認められる部分とがある事がわかる。また、間隙には、Ki-67 陽性の小型の核を持つ細胞が局在する事など、肝臓の微小環境の構築の様子が描画できた。

また、高脂肪食給餌の影響を確認するために、肝細胞における脂肪滴の蓄積を確認した (図 III-4.)。その結果、4 週間の一時的な肥満は、肝細胞に顕著な脂肪滴の蓄積をもたらす事が明らかに

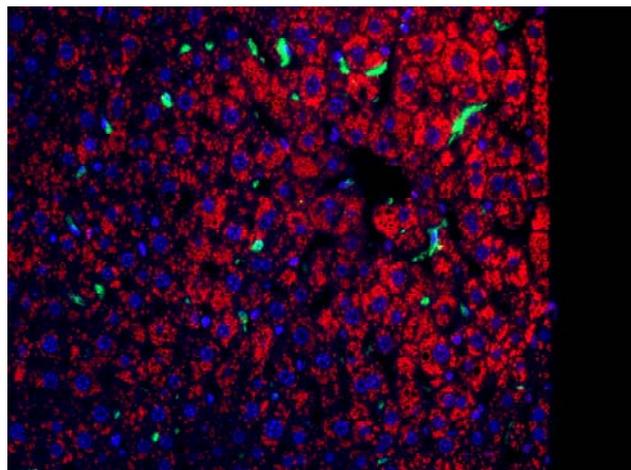


図 III-4. 肝臓における脂肪性組織反応

DIO 給餌開始 4 週間後の肝臓。PLIN2 抗体 (微細な赤色粒状シグナル) により肝細胞内に多数の脂肪滴の蓄積を認めた。緑色の染色は、F4-80 抗体により検出されたクッパー細胞。肝細胞間の間隙である類洞に分布するのが観察される。

なった。図 III-4. では、同時にマクロファージの分布を検出したが、この時点では、顕著な変化は認められなかった。

以上の検討から、組織障害や組織微小環境の変化を解析するための蛍光免疫染色実験条件の最適化を完了し、次年度に向けた放射線影響解析に着手した。

2. 成体期肥満による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期(1 週齢)における放射線照射(γ 線、100mGy および 4Gy、線量率は 0.5Gy/min) と、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢の間に高脂肪食(60%脂肪食)を与えることによる影響を解析する実験に着手した。

まず、1 週齢 B6C3F1 マウスを入手するため妊娠後期マウス 106 匹を購入し、雄 F1 マウス 360 匹を作製した。放射線照射は、B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に 0、0.1、または 4Gy の γ 線を全身照射することにより実施した(線源 ^{137}Cs 、線量率 0.5Gy/min)。ついで、離乳後にマウス群を飼育し(5 匹/ケージ)、通常の実験マウス用餌で飼育を継続した。その後、成体期(20 週齢)に、標準餌(摂取カロリーの 10%が脂肪由来)または高脂肪餌(摂取カロリーの 60%が脂肪由来)を 4 週間摂取させて DIO を誘導した。4 週間後は、通常餌に戻し、終生飼育を実施している。この間、定期的な体重測定や、毎日の観察を継続し、がんの発生等に伴う全身状態の悪化が認められるマウスについては解剖し、病理サンプルの保存および解析を継続した。

これまでに、子ども期(1 週齢)高線量放射線被ばく(γ 線 4Gy 全身照射)によって顕著な体重低下が認められた。また、成体期(20 週齢から 24 週齢)の高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加を示したが、通常餌に戻すことにより高脂肪餌の影響が改善される傾向を確認できた。さらに、寿命 240 日まで観察した段階で、子ども期(1 週齢)高線量被ばく(γ 線 4Gy 全身照射)による早期の胸腺リンパ腫の発症を認めた。しかし、高脂肪餌群と標準餌群共に胸腺リンパ腫の発症が見られ、摂取餌による発症時期、発症頻度の差は観察しなかった。非照射及び低線量照射群(0.1Gy)にマウスの死亡はなかった(詳細は分担研究者の研究報告書を参照)。

IV. 考察

放射線および一時的な DIO による組織障害および組織微小環境の変化を定量的に評価するため、今年度は、蛍光免疫染色法の最適化を実施した。

まず第一に、作成した組織標本の抗原賦活化条件を最適化した。抗原の賦活化には、オートクレーブや電子レンジを用いる方法の他に、ウォーターバスを用いる方法が一般的であるが、本研究では、ウォーターバスを用いる方法を採用した。その理由は、この方法が最も穏やかな条件で抗原の賦活化ができ、また、賦活化後、速やかに抗体反応のステップに進めるからである。抗原の賦活化には、一般的に賦活化溶液が用いられるが、これまで、クエン酸ベースの pH6.0 緩衝液を用いてきた。しかし、他の研究で、特に核に発現する抗原の賦活化には、トリス塩酸ベースの pH9.0 緩衝液がより効果的である場合がある事が判明した。そこで、抗 53BP1 抗体および抗 Ki-67 抗体を利用して、2 枚の薄切標本を、1 枚は pH6.0 緩衝液中で、またもう 1 枚は pH9.0 緩衝液中で同時に賦活化処理を行い、染色性を比較した。その結果、抗 Ki-67 抗体において、pH9.0 緩衝液による賦活化により、顕著なシグナル強度の増強が認められ、pH9.0 緩衝液の有用性が明らかになった。そこで、これ以降の抗体についても、常に 2 種類の抗原賦活化溶液を比較検討し、ほぼ全ての抗体で、pH9.0 緩衝液を用いた方が染色結果がより良好であることを確認し、今後の解析では、新たに、pH9.0 緩衝液を応用する事を決定した。

次に、組織障害および組織微小環境変化解析に適する抗体の探索と染色条件の最適化を行った。放射線による組織障害や組織微小環境の変化は、様々な抗体を複数同時に組み合わせる多重蛍光免疫染色法による統合的解析が不可欠なため、抗体の選択には工夫が必要である。まず、DNA 損傷の検出には、これまで研究での使用実績が最もある抗 53BP1 抗体を用いた。この抗体はウサギ由来の抗体であるため、同時に染色する抗体は、ウサギ以外の動物種から作成した抗体になる。抗体の作成に一般的に用いられている動物は、ウサギに加え、マウス、ラット、モルモット、トリ、ヤギ、ヒツジ、ロバなどがあるが、この中で、目的に合致する抗体を探索して、その適用性を検討していった。例えば、細胞増殖を検出するために用いる Ki-67 抗体は、ラット由来の抗体を優先的に検索し、eBioscience 社から販売されているクローン SolA15 抗体を選択した。以上の検討から、組織障害や組織微小環境の変化を解析するための多重蛍光免疫染色実験条件の最適化を完了した。

成体期肥満による放射線発がん影響解析の研究では、すでに、B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期（1 週齢）における放射線照射（ γ 線、100mGy および 4Gy、線量率は 0.5Gy/min）と、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢の間の高脂肪食（60%脂肪食）摂餌を完了し、終生飼育を継続している途中である。

通常の DIO の誘導と異なり、本研究では、成体期に相当する 20 週齢から 24 週齢までに限定して高脂肪餌を与えた。本研究計画で使用する B6C3F1 マウスでは、年齢増加にともなう体重変化が収束するのがおおよそ 20 週齢付近であり、B6C3F1 マウスにおける 20 週から 24 週は、人間集団ではおおよそ 20 歳代後半から 30 歳代に相当する時期にあたりと考える事ができる。したがって、新生活や就業などの生活環境の変化により、一時的に生活習慣が変化して肥満傾向を経験しても、その後の生活習慣の改善により、小児期の放射線被ばくの健康リスクを低減できることを示すことができると考えた。また、4 週間の一時的な高脂肪食の給餌は、成体期の一時的な生活習慣の変化を想定した事と、昨年度まで実施していた研究計画で、4 週齢から 8 週齢までの

4 週間に高脂肪食を給餌していたこととの比較が可能になるようにとの目的で設定したものである。

これまでの観察の結果、子ども期（1 週齢）高線量放射線被ばく（ γ 線 4Gy 全身照射）による顕著な体重低下を確認した。一方で、成体期（20 週齢から 24 週齢）の一時的な高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加をもたらした。興味深い事に、通常餌に戻すことによる高脂肪餌の影響の改善は成体期でも確認でき、小児期のみならず、成体期でも、一時的な肥満は生活習慣の改善により改善できる事が示唆された。今後は、組織レベルでの影響の解析により、一時的な肥満の解消の機構的背景を明らかにする事が必要である。

すでに、一部のマウスにおいては子ども期（1 週齢）に高線量被ばく（ γ 線 4Gy 全身照射）を受けた事による早期の胸腺リンパ腫の発症が認められているが、現時点で、一時的な高脂肪餌の摂取による影響は認められていない。今後飼育期間が長くなるにつれて、胸腺リンパ腫だけでなく肝がんなどの発症も予想されるため、放射線発がんへの成体期肥満の影響は、次年度以降の継続観察により、更に明らかにしていく事が重要である。

V. 結論

平成 30 年度は、B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期（1 週齢）における放射線照射（ γ 線、100mGy および 4Gy、線量率は 0.5Gy/min）を実施した。その後、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢の間に、高脂肪食（60%脂肪食）を与えて飼育し、再び通常食に戻して生涯飼育を継続している。これと同時に、組織微小環境の変化（DNA 損傷、細胞死、細胞増殖、炎症、微小血管およびリンパ管の障害）を解析するための蛍光免疫染色実験条件の最適化を完了し、放射線被ばくの初期影響、および DIO の組織微小環境への影響の解析に着手でき、平成 30 年度に予定したマイルストーンは全て達成した。

VI. 次年度以降の計画

初年度は、予定した終生飼育用の DIO 動物の飼育を開始し、放射線被ばくによる組織微小環境変化の解析条件の最適化を完了したため、平成 31 年度以降は、放射線照射および DIO 動物の終生飼育を継続し、発がんについての観察を継続する。また、微小環境変化解析用の実験群の飼育を開始し、定期的に採取した組織標本において、組織微小環境の変化を解析する。特に、終生飼育中の実験群は、現在、早期発症腫瘍（胸腺リンパ腫）の好発時期であり、飼育観察を継続して行い瀕死マウスの解剖を進め臓器サンプルの保存と病理解析も行う。また、採取した血清サンプルを用いて、脂質代謝、内分泌関連因子の解析について検討する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

学内学会発表

1) 鈴木啓司、尚奕、森岡孝満、柿沼志津子、組織反応における放射線と生活習慣等の相互作用、第 61 回日本放射線影響学会、長崎、2018 年 11 月 7-9 日

Analysis of the effects of life-style in adulthood on low-dose radiation carcinogenesis and its mechanism

Keiji Suzuki^{*1}, Shizuko Kakinuma^{*2}

**1Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Atomic Bomb Disease Institute*

**2Department of Radiation Effects Research, National Institute of Radiological Sciences, National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology*

Key word : Radiation, low-dose, carcinogenesis, life-style, tissue response

Abstract

After the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident in Japan, much attention has been paid for the health risks associated with annual low-dose radiation exposure. The Health Management Survey governed by the Fukushima prefecture has reported that probable radiation dose delivered to children could be sufficiently low not to cause any noticeable delayed effects. However, enormous change in the life style and the school life of children might have affected the physical and psychological condition of those affected children. In addition, as children are growing up, changes in their life-style causes related complications, one of which is an excess calorie intake. Resulted obesity must be one of the health problem that should take into consideration in relation to the estimation of radiation-induced cancer risk.

Accumulating evidences so far have implicated notable relationship between obesity and the incidence of multiple types of cancer, including thyroid cancer. However, little is known about the effect of obesity on radiation-induced cancer. Therefore, the study has intended to determine whether a temporal excess calorie intake affects the cancer risks from low-dose ionizing radiation or not. A final goal is to define the mechanisms underlying the possible interaction between an excess calorie intake in adulthood and childhood radiation exposure.

Since an excess calorie intake could cause systemic inflammation, alteration of tissue microenvironments is expected to promote radiation carcinogenesis. Therefore, B6C3F1 mice were exposed to 0.1 or 4 Gy of gamma-rays, and experienced high fat diets between 20 and 24 weeks. Tissues/organs, including thymus, spleen, liver, and lung, were obtained from the mice, and subjected to the analyses of tissue response. Experiments investigating the effects of radiation exposure were performed by immunofluorescence, so that the experimental conditions have been successfully optimized.

The study should provide a fundamental scientific basis towards the possible countermeasures for mitigation of any possible risks from low-dose/low-dose-rate radiation exposure, together with the mechanisms underlying the late effects of low-dose ionizing radiation.

2-4-a 成体期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす

影響とメカニズム解明（成体期肥満による放射線発がん影響解析）

分担研究者：柿沼 志津子（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

放射線医学総合研究所放射線影響研究部）

研究要旨

本研究計画は、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的としたものである。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた実験系により証明することを目指す。低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む小児期（1週齢）での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と終生飼育により追跡し、同時に、発がんのプロセスを、組織における DNA 障害、細胞死、細胞老化、炎症、を含む組織微小環境の変化から解析し、放射線照射直後から微小がんあるいはがん成立までの各プロセスでの DIO の影響を統合的に解析する。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究には、長崎大学および放射線医学総合研究所（放医研）の 2 機関が参画し、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当する。放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射（100mGy および 4Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当する。H30 年度は B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に放射線照射を行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、60%脂肪食を与えて飼育し、その後通常食に戻して経過観察をしている。随時死亡個体から解析対象臓器を採取し、寿命と発がん解析をするための組織標本作製した。

キーワード

低線量、100mGy、高カロリー食、肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデル、成体期肥満

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱くことになった。事故から数年がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるに従い、専門家会議の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後の被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、事故当時に子ども期を過ごした子供たちの生活習慣等の変化が、放射線発がんリスクを修飾する可能性が懸念される。中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取バランス変調に基づく肥満は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要がある、健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。そこで、平成 27 年度~29 年度にかけて、小児期の肥満の影響を調査する研究に着手し、現時点までの結果から、小児期の肥満が、放射線発がんリスクに影響をおよぼす可能性について解析が進んでいる。今後、当時子ども期にあった子どもたちは成長し、やがて青年~成人になっていくことを鑑みると、これまでの研究を補完する研究としても、小児期の被ばくの発がんリスクが、成体期の生活習慣等の変化で修飾されるか否かを明らかにする研究を実施する必要があると考えた。福島県民、とりわけ、小児期に事故を経験した子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、子供たちの今後の生活習慣等が、小児期の低線量放射線被ばくによる健康影響におよぼす影響を対象とした研究は、極めて重要である。

本研究では、動物発がんモデルを用いた高脂肪食による肥満の実験系を用い、小児期被ばくによる発がんリスクが変化するかどうかを明らかにする。その結果、肥満などの生活習慣等による自然発がん要因が低線量放射線被ばくの健康影響にどのような影響をおよぼすか評価する際に不可欠な科学的知見が得られる。これにより、生活習慣等の変化により懸念される放射線発がんリスクの低減に向け、機構論に基づいた対策を可能にする科学的基盤が提供できる。

年次計画としては、平成 30 年度は、終生飼育用の DIO 動物の飼育を開始する。また、誘発されたがんの遺伝子変異・発現解析のための条件の最適化を行う。

II. 研究方法

本研究では、福島原発事故を経験した子どもたちの生活習慣等の変化を念頭に、小児期に放射線照射を行ったマウスに、成体期に相当する期間から高脂肪食を給餌し、その後、終生飼育をすることによってがんの発生を解析する実験プロトコルを採用した。具体的には、放医研において、B6C3F1 雄マウスに、1週齢で放射線（ γ 線（0.5Gy/分）、100mGy および 4Gy）を照射し、その後、20週齢から24週齢まで高脂肪餌を与えてDIOを誘導し、その後通常餌に戻してから長期飼育を行う。放射線照射後は一定期間毎に組織標本を採取して、組織微小環境変化の継時観察を実施する。放射線発がんの対象とするがん種は、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇する、リンパ腫、肝がん、および肺がんである。また、採取した組織は、長崎大学に送付し、DNA障害、細胞死、炎症反応や組織微小環境の解析を行う。

放医研はSPFレベルでのマウスの長期飼育およびガンマ線照射が可能な施設を有しており、本研究ではこの施設を使用した。分担者のグループでは、これまで長期飼育実験の実績が十分ある。また、マウスの発がん実験設定から終生飼育の終了までに3年半を要するが、これまでの経験から発がんに対する影響は約2年半で明らかになると予測できることから、中間段階での発がんリスク解析を取りまとめる予定である。なお、研究期間終了後も終生飼育を継続し、本発がん実験の最終的なリスク解析としてまとめる。

1. DIOによる放射線発がん影響解析

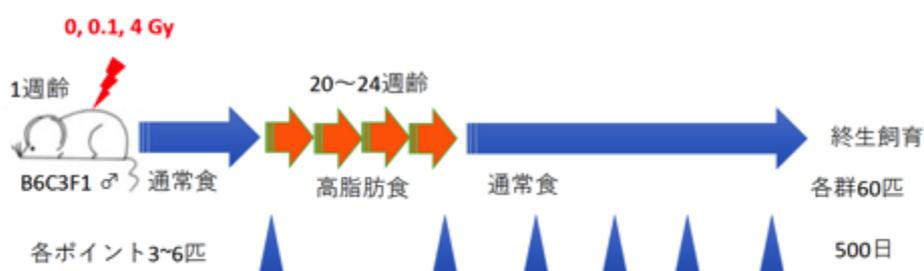
① 実験群の設定

1週齢 B6C3F1 マウスの作製は妊娠後期マウスを購入し、実験を行う SPF 環境下で出産させ、母マウスあたり子マウス6匹での飼育を行い体重のばらつきを最小限にした。妊娠後期マウスは平均8匹のF1マウスを出産し、その半数が雄であることより25匹の妊娠後期マウスの購入で雄100匹の作製可能である。出産異常が一定の確率で生じるため、雄F1マウス360匹の作製に、妊娠後期マウス106匹を購入した。

表II-1. 発がん実験群条件とマウスの匹数（計360）

実験群	線量 (Gy)	餌 (脂肪由来カロリー)	匹数
1	0	10%	60
2	0	60%	60
3	0.1	10%	60

実験計画



- ①終生飼育（発がん実験）：各群60匹、合計360匹
- ②高脂肪食の短期影響：20、24、28週齢にサンプリング、各ポイント3~6匹
- ③高脂肪食の長期影響：300日齢から100日ごとサンプリング、各ポイント3~6匹

図II-1：実験計画

② 放射線照射

B6C3F1 雄マウスの1週齢時に0、0.1、または4Gyの γ 線を全身照射した（線源 ^{137}Cs 、線量率0.5Gy/min）。

③ DIO 誘導

離乳後マウス群飼育し（5匹/ケージ）、通常の実験マウス用餌で飼育した。成体期 B6C3F1 雄マウス（20～24 週齢）に標準餌（摂取カロリーの10%が脂肪由来）または高脂肪餌（摂取カロリーの60%が脂肪由来）を4週間摂取させてDIOを誘導した。4週間後通常餌に戻し、終生飼育を行う。定期的に体重を測定し（2週間毎、20～24週齢1週間毎）、毎日観察を継続し、がんの発生等に伴う全身状態の悪化が認められるマウスについて解剖し、病理サンプルの保存および解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究計画では、動物実験は、放医研において実施する。放医研においては、動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた（動物実験計画書18-1003、平成30年6月26日承認）。動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」「実験動物取扱者の健康管理等に関する基準」及び「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実験を行っている。

III. 研究結果

1. DIO による放射線発がん影響解析

1-1. DIO 誘導による体重変化

図III-1に、体重変化についてのグラフを示した。

子ども期（1週齢）高線量放射線被ばく（ γ 線 4Gy 全身照射）によって有意な体重低下が認められた。成体期（20週齢から24週齢）の高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加を示したが、通常餌に戻すことにより高脂肪餌の影響は改善される傾向が見られた。

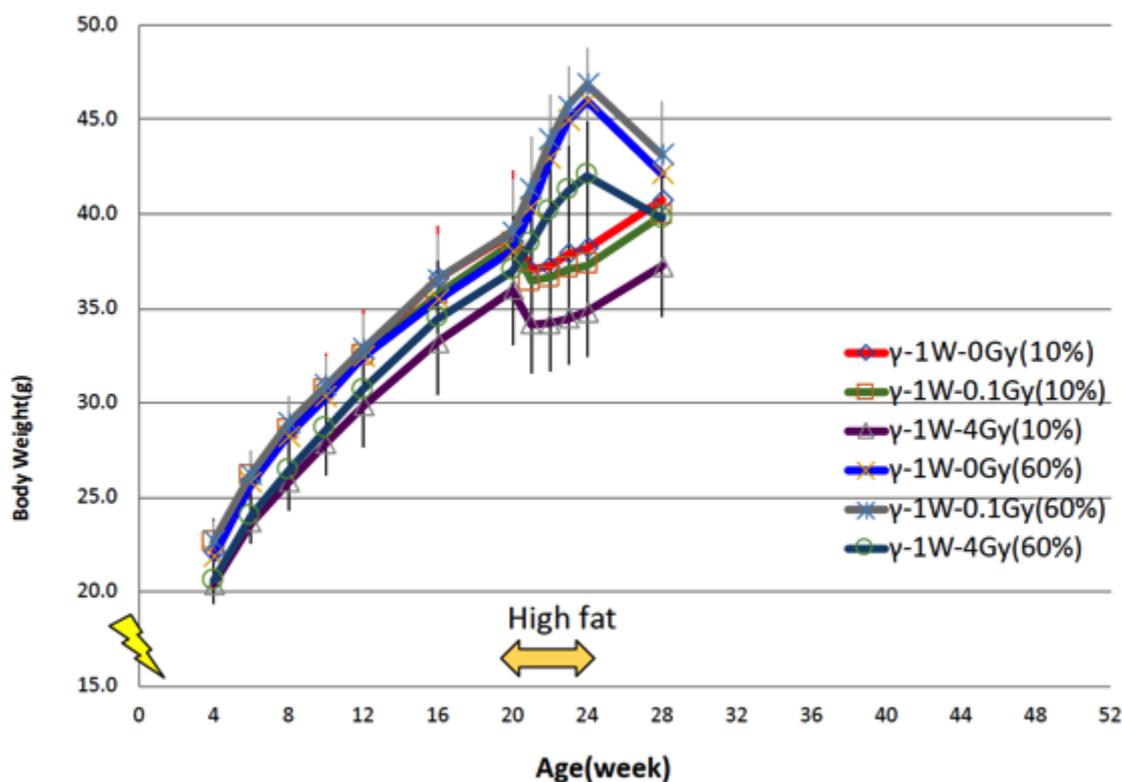


図 III-1 子ども期放射線被ばく及び成体期 DIO 誘導による体重変化

1-2. 早期発症腫瘍の発生

子ども期（1週齢）高線量被ばく（ γ 線 4Gy 全身照射）によって早期に胸腺リンパ腫が発症した。寿命 240 日まで観察した結果では、高脂肪餌群と標準餌群共に、胸腺リンパ腫の発症が見られた一方、摂取餌による発症時期、発症頻度の差が認められなかった。非照射及び低線量照射群（0.1Gy）にマウスの死亡はなかった。

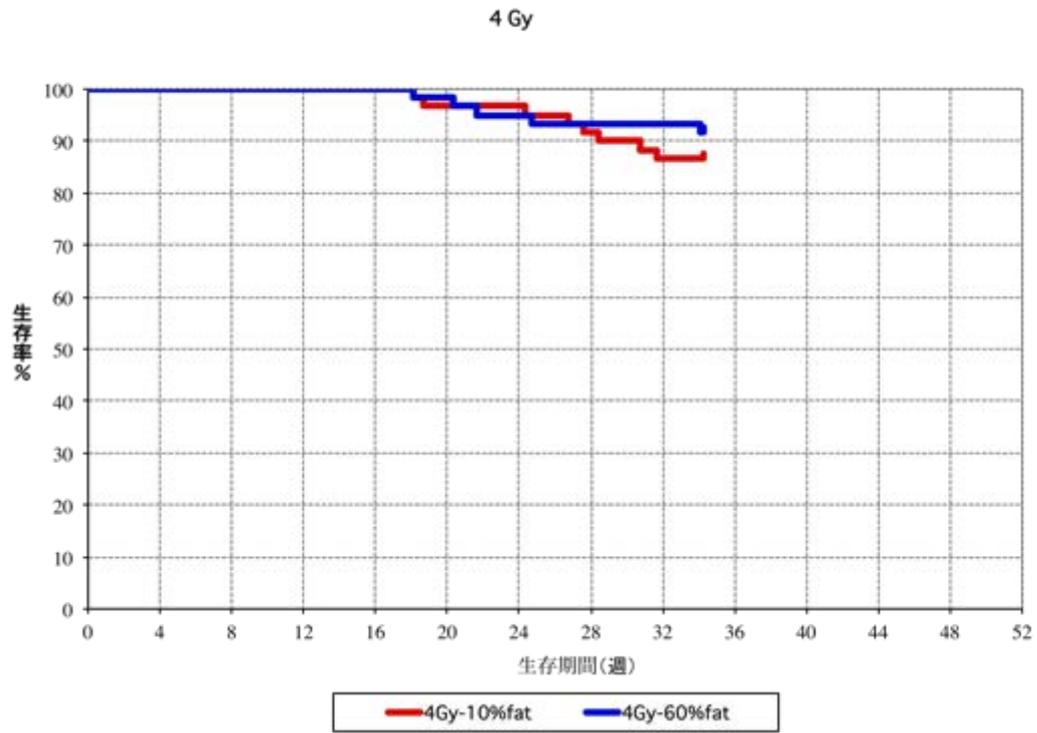


図 III-2 子ども期放射線被ばく及び成体期 DIO 誘導による寿命変化と腫瘍発生

IV. 考察

今年度には成体期の高脂肪食摂取による肥満の実験系を用い、小児期被ばくによる発がんリスクがどう変化するかを検証するための発がん実験を開始した。短期間の高脂肪食摂取による体重増加と通常餌に戻した後の体重回復傾向が観察された。また、小児期高線量被ばくによる早期発生腫瘍である胸腺リンパ腫の発症も確認された。

V. 結論

前述実験群の設定が実験計画通り実施し、成体期高脂肪食摂取による肥満の誘発に成功した。また、通常餌に戻した後の肥満解消も先行した子ども期高脂肪食摂取実験系と類似した傾向が見られたが、今後長期的影響を引き続き観察する必要がある。胸腺リンパ腫が早期発症腫瘍であり、被ばくの影響が大きく、DIO実施する前に既に発症したため、摂取カロリーによる影響は受けていないと考えられる。

VI. 次年度以降の計画

終生飼育中の実験群は、現在早期発症腫瘍（胸腺リンパ腫）の好発時期であり、飼育観察を継続して行い瀕死マウスの解剖を進め臓器サンプルの保存と病理解析を行う。また、採取した血清サンプルを用いて、脂質代謝、内分泌関連因子の解析について検討する。次年度は終生飼育を継続する。さらに、組織微小環境影響の経時変化を調べるための動物実験を開始する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

なし

VIII. 参考文献

なし

Uncovering the interaction of adulthood-lifestyle factors in children with low dose radiation-induced cancer risk and carcinogenic mechanisms

Shizuko Kakinuma

Department of Radiation Effects Research

National Institute of Radiological Sciences

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Key word: Low dose, 100 mGy, high calorie diet, obesity, diet-induced obesity model

Abstract

The aim of this research is to identify the impact that lifestyle changes in adult have on the risk associated with childhood exposure to low dose radiation and the mechanisms underlying radiation-induced cancer. Specifically, the high calorie diet-induced obesity (DIO) mouse model will be used to test the hypothesis that 'systemic inflammation associated with high calorie intake in adult will alter their risk of radiation-induced cancer.' Following a low dose radiation exposure (100 mGy), the interaction of a high calorie diet on (1) DNA damage and repair; (2) initial tissue reactions including cell death; (3) subsequent tissue recovery; (4) the microenvironment for early cancer development; and, (5) the development of established tumors, will be examined by investigations at the molecular, cellular and tissue levels. The cancers of interest for induction by irradiation of young animals in this model will be thymic and splenic lymphomas, as well as lung and liver cancers.

As a part of this co-operative research, B6C3F1 mice are to be irradiated as infants (100 mGy or 4 Gy) before initiating diet-induced obesity (DIO) by rearing on a high-fat diet. In the annual plan for fiscal year 2018, the rearing of the DIO experimental animals was to be started, with subsequent observation of body weight change and cancer induction. We confirmed the body weight gain in the mice reared on the adult high-fat diet. Thereafter, we also observed the weight was reversed to normal level after changing to the normal diet.

2-5 エンリッチメント環境による小児期連続放射線被ばくの健康影響

に対する低減化研究

主任研究者 森岡孝満（量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所）

研究要旨

原発事故や地震、津波などの災害時における長期の避難生活や仮設住宅でのこもりきりの生活は心身ともに健康に悪影響を及ぼす。更に、東日本大震災に伴う福島原発事故を受けて、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。特に、子どもは成人と比較すると放射線被ばく後の発がんリスクが高いことより、子どもの健康影響が危惧されている。

本研究課題では、生活環境改善が小児期の低線量連続被ばくによる健康影響を低減するかを実験動物にエンリッチメント環境（Enriched Environment, EE）を提供することで検証することを計画した。本年度は、動物飼育室内に EE として、「遊び、運動、認知行動の刺激環境」をセットアップした。自然発症ならびに小児期の放射線誘発の消化管腫瘍に対する EE の予防効果を明らかにするため、ヒト家族性大腸腺腫瘍のモデルマウスである *Apc^{Min/+}*マウスを用いて、生後 1 週齢から 2 週間 γ 線を連続照射し、総線量 0.1、2 及び 4 Gy の被ばく群と非照射群を設定した。生後 3 週齢で離乳し、EE と通常飼育環境（Standard Environment, SE）で飼育を開始した。全群ともに、経時的に体重と餌摂取量の測定を行った。更に、一部のマウスを 10 週齢で解剖を行い血液、小腸、大腸及び主要臓器を採取し、血漿検査及び病理組織解析用に保存した。その結果、EE 群は、SE 群に比べて体重増加の抑制傾向が認められた。逆に、餌摂取量は EE 群において有意に増加した。EE の体重増加抑制は、生殖器周囲の白色脂肪重量を有意に減少させたことに起因するものと考えられた。更に、血漿検査より EE 群は SE 群に比較し有意な脂質代謝の改善が認められた。EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する効果として、小腸においては腫瘍サイズ、大腸においては腫瘍の発生を抑制する可能性が示唆された。

今後、EE 及び SE での飼育を継続し、20 週齢と 30 週齢時に解剖を行い 10 週齢と同様に血液と主要臓器を採取し保存する。また、保存した血漿と臓器を用いて血漿の生化学検査と病理組織解析を進め、EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する予防効果についての科学的知見をまとめる。

キーワード：低線量、小児期被ばく、エンリッチメント環境、がん予防

I. 研究目的

原発事故や地震、津波などの災害時において、長期の劣悪な避難生活や仮設住宅でのこもりきりの生活は心身ともに健康に悪影響を及ぼす。それに加え、十分な睡眠、運動（子どもの場合は好奇心のでの遊び）、そして社会的なつながりも十分ではなくなる。上記を予防するには、適切な住環境や社会環境が必要なのは言うまでも無いが、実際は長期避難を強いられるケースも多い。近年、動物実験において EE は動物が持つ本来の行動を刺激することから、動物愛護の観点より重要であると指摘されている。さらに、EE は脳の機能を活性化しアルツハイマー病などの老化を予防し、肥満予防、がん予防にも寄与することが、実験的に明らかとなってきたり。

子どもは成人と比較すると、放射線被ばく後の発がんリスクが高いことが、原爆被ばくやチェルノブイリ発電所の事故調査で明らかになっている^{2,3)}。我々も、マウスやラットを用いて、思春期以前の幼若期での被ばくは、成体期に比べ発がんリスクが高くなり、寿命も短くなることを示してきた。東日本大震災に伴う福島原発事故を受けて、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。そこで、本研究は放射線による晩発影響のひとつである発がんのリスクを EE で低減可能ではないかと予測した。本研究では、EE 飼育が幼若期被ばくによる発がんリスクを低減することを期待し、幼若期（生後 3 週齢、離乳期）からの EE による体内環境を正常に保つ働きを高め維持するホメオスタシス増進効果を定量的に比べることにした。発がん予防効果実験には、消化管腫瘍のモデルマウスである *Apc^{Min/+}*マウスを用いる。*Apc^{Min/+}*マウスは、ヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスで、数ヶ月以内に多数の小腸・大腸ポリープを発症する。生後 1 週齢前後の被ばくで発がんリスクが最も高いことより、この時期に低線量率連続被ばく実験を設定する。EE の発がんリスク低減効果の評価と機序解明のため、経時的に実験動物を解剖し、消化管腫瘍数の抑制効果、病理組織学的解析による腫瘍の進展抑制効果及び血漿中の脂質成分、レプチンやアディポネクチンなどの脂肪細胞由来ホルモン、炎症性サイトカインなど、放射線被ばくによる発がんリスクを修飾する要因を多角的に調べる。本研究成果を通して、放射線の健康影響を、生活の環境改善で低減できることを示すことで、災害等による避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復（維持）の施策の基礎情報に成り得る。本年度は、実験群を設定し EE と SE での飼育を開始する。一部の実験動物を 10 週齢で解剖し、病理組織学的解析及び分子解析用に組織の保存を行う。また、採取した血漿を用いて生化学検査を行う。

II. 研究方法

1. C3B6F1 Apc^{Min/+}マウスの作出

量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所（以下「放医研」という）の SPF 実験動物飼育室にて系統維持されている雄 C57BL/6J Apc^{Min/+}マウスと購入した雌 C3H マウス交配させ、C3B6F1 Apc^{Min/+}マウスを作製し実験に用いた。

2. EE による幼若期放射線被ばく誘発消化管腫瘍に対する予防効果の実証研究

① 低線量率連続 γ 線照射群の設定

図 II-1 に本実験のデザインを示す。作製した C3B6F1 Apc^{Min/+}マウスを用いて、放射線高感受性の時期である 1 週齢から 2 週間、 γ 線を低線量率で連続照射し総線量が 0.1、2 及び 4 Gy の群を設定した（図 II-2）。その後、EE で飼育する群（第 1~3 群）と SE で飼育する群（第 4~6 群）に分けた。また、非照射群として、3 週齢から EE で飼育する群（第 7 群）と SE で飼育する群（第 8 群）も加え、合計 8 群を設定した。飼育条件は、室温 23±1℃、湿度 45%±5%、12 時間明暗照明サイクルで行った。EE 飼育は、通常ケージ（300×170×110mm）の約 8 倍程度のケージ（542×426×200mm）に遊具（回転盤や隠れ家、トンネル、ブロックなど）を設置し、ケージ当たり 5 匹（1 ケージ 5 匹）で飼育する環境、SE 飼育は、通常ケージに同様に飼育する環境を設定した（図 II-3）。全群ともに、10、20、30 週齢で経時的に解剖を行い、採血、小腸及び大腸とその他の主要臓器（胸腺、脾臓、肝臓、肺、白色及び褐色脂肪組織など）の摘出分の実験動物を設定し飼育を開始した。

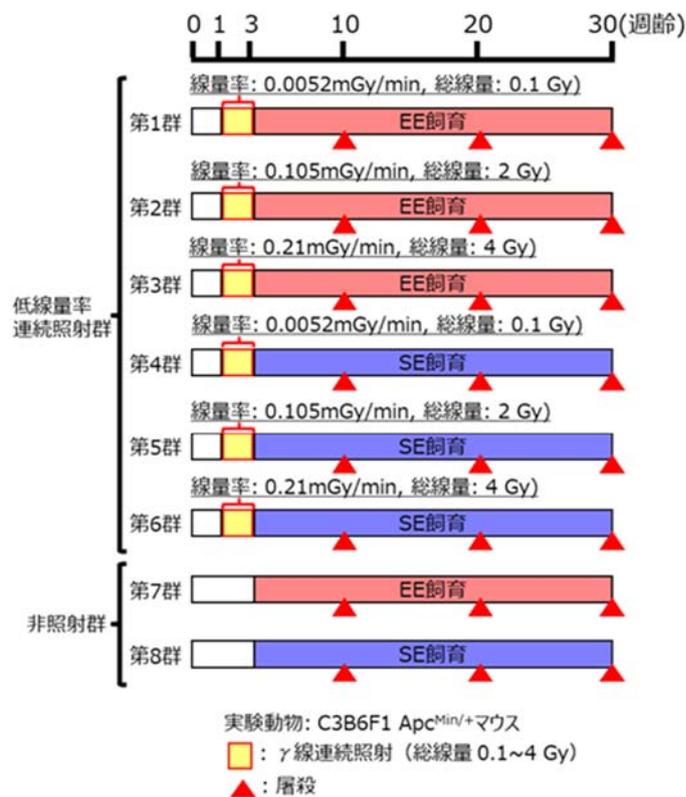


図 II-1 実験デザイン



図 II-2 γ 線連続照射装置

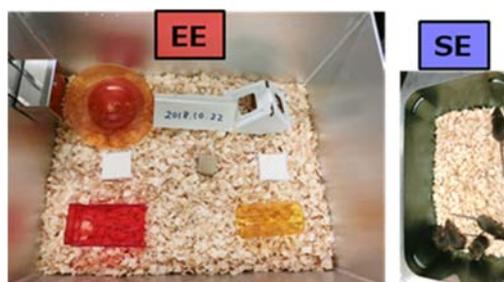
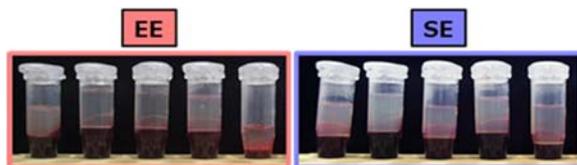


図 II-3 飼育環境

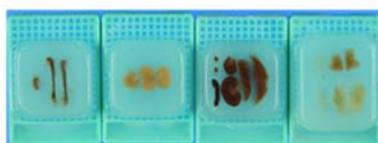
また、体重と摂餌量は、週1回の測定を開始した。本年度は、10週齢での解剖を行った。採取した血液は、血漿分離し脂質、糖質成分及びホルモン等の測定のために凍結保存を行った（図II-4）。摘出した主要臓器（胸腺、脾臓、肝臓、肺、白色及び褐色脂肪組織など）は、一部を病理組織学及び免疫組織学的解析用としてホルマリン固定し（図II-5）、パラフィンブロックを作製した（図II-6）。加えて、小腸及び大腸腫瘍を分子解析用に実体顕微鏡下で採取し凍結保存した（図II-7）。



図II-4 採取した血漿



図II-5 ホルマリン固定された臓器



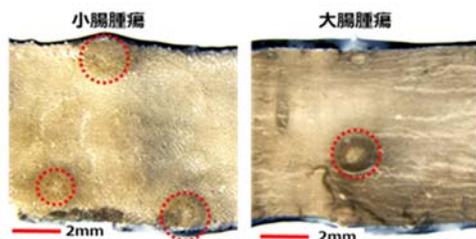
図II-6 作製したパラフィンブロック



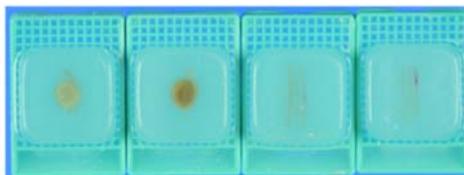
図II-7 採取した腫瘍の凍結サンプル

② 病理組織学及び免疫組織化学的解析

10週齢で解剖し、ホルマリン固定された小腸と大腸の腫瘍性病変は、実体顕微鏡下でカウントと長径の計測を行い、EEによる消化管腫瘍に対する抑制効果の評価に向けたデータの取得を行った（図II-8）。その後、腫瘍性病変は、病理組織学的検索（組織型と悪性度）と免疫組織化学的解析のためにパラフィン包埋した（図II-9）。



図II-8 小腸及び大腸腫瘍の実体顕微鏡像



図II-9 パラフィン包埋された腫瘍性病変

③ EE によるホメオスタシス増強効果の検討

10 週齢で解剖し採取した血漿（凍結保存）を用いて、糖代謝の指標であるグルコースと脂質成分である総コレステロール、中性脂肪、LDL（悪玉コレステロール）、HDL（善玉コレステロール）及び NEFA（遊離脂肪酸）を測定し、EE の糖代謝と脂質代謝への修飾効果について評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究計画では、動物実験は、放医研において実施する。動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた（動物実験計画書 16-1008-3）。動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」「実験動物取扱者の健康管理等に関する基準」及び「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実験を行っている。

III. 研究結果

1. EE の健康増進効果の検討

① 体重への効果

3 週齢から EE 及び SE で 7 週間飼育したマウスの外表所見を図 III-1 に示す。EE で飼育したマウスは、SE に比較して若干、小柄であった。3 週齢から 10 週齢までの体重変化を図 III-2 に示す。EE 飼育群は、SE 飼育群に比較して体重の減少傾向を示したが統計的有意差は認められなかった。

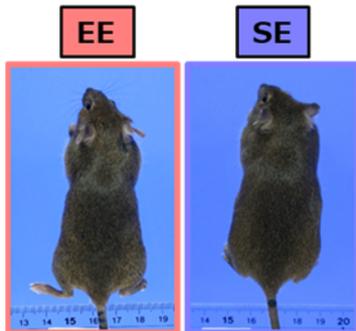


図 III-1 EE 及び SE で飼育した 10 週齢マウスの外表所見

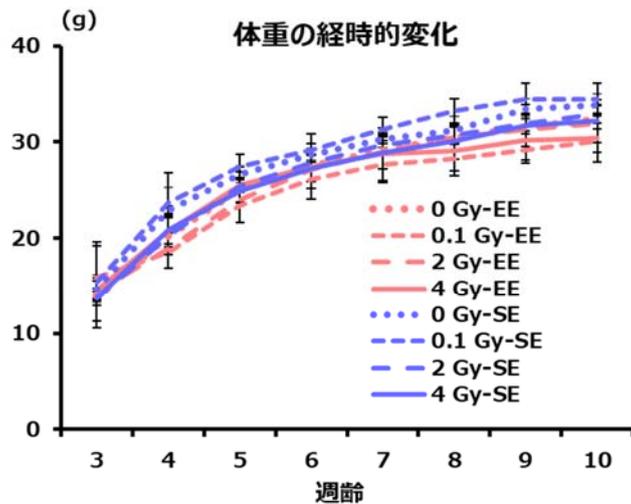


図 III-2 EE 及び SE で飼育したマウスの体重の経時的変化データは、平均値±標準偏差で示す。

② 摂餌量への効果

EE 飼育群は、SE 飼育群に比べて摂餌量が有意に増加した (図 III-3)。

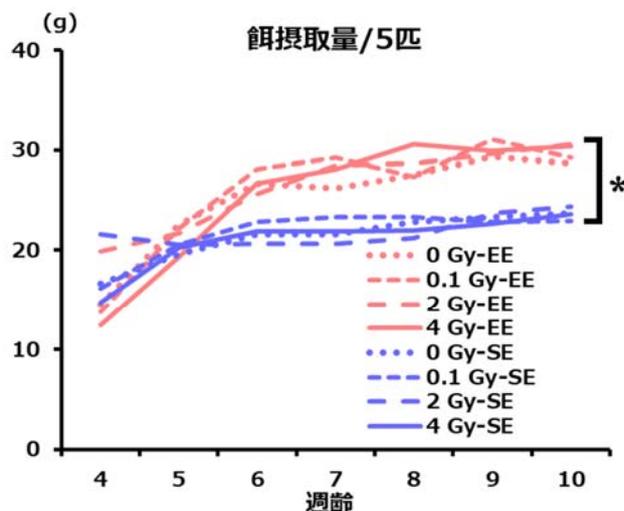
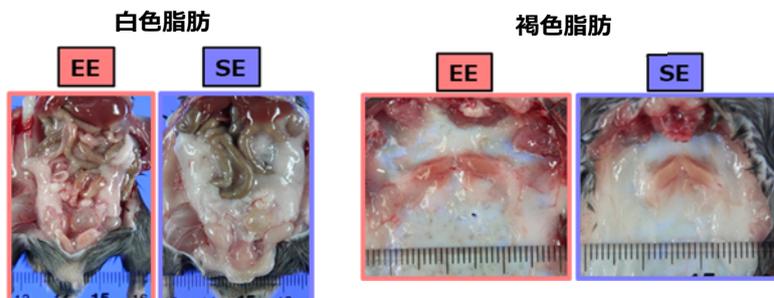


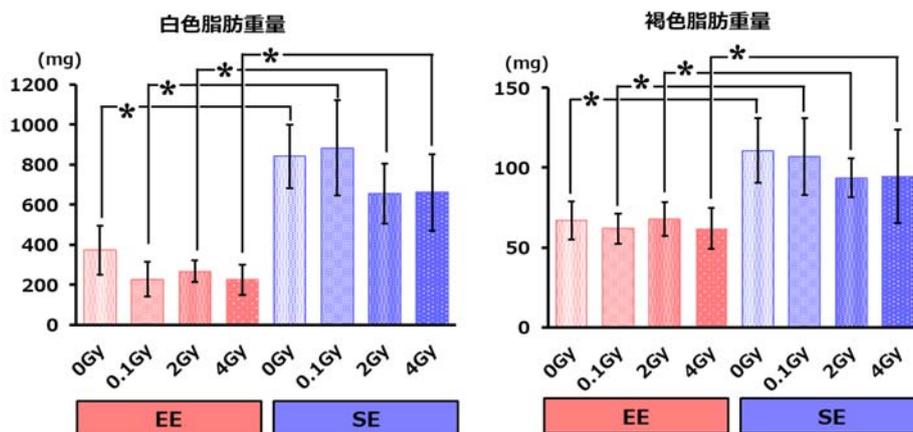
図 III-3 EE 及び SE で飼育による摂餌量の経時的変化 (* $p < 0.001$ 、反復測定分散分析)

③ 白色脂肪及び褐色脂肪重量への効果

EE 及び SE で 7 週間飼育したマウスの骨盤内白色脂肪と肩甲骨下褐色脂肪の肉眼像を図Ⅲ-4 に示す。EE 群は、SE 群に比べて白色脂肪の沈着が少なかった。褐色脂肪は、EE により褐色調が強くなることが分かった。各群の白色脂肪と褐色脂肪重量を図Ⅲ-5 に示す。EE 群は、SE 群に比べて有意に白色脂肪重量と褐色脂肪重量が低かった。



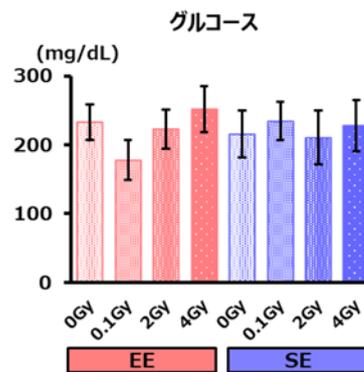
図Ⅲ-4 EE 及び SE で飼育した 10 週齢マウスの白色脂肪と褐色脂肪の肉眼像



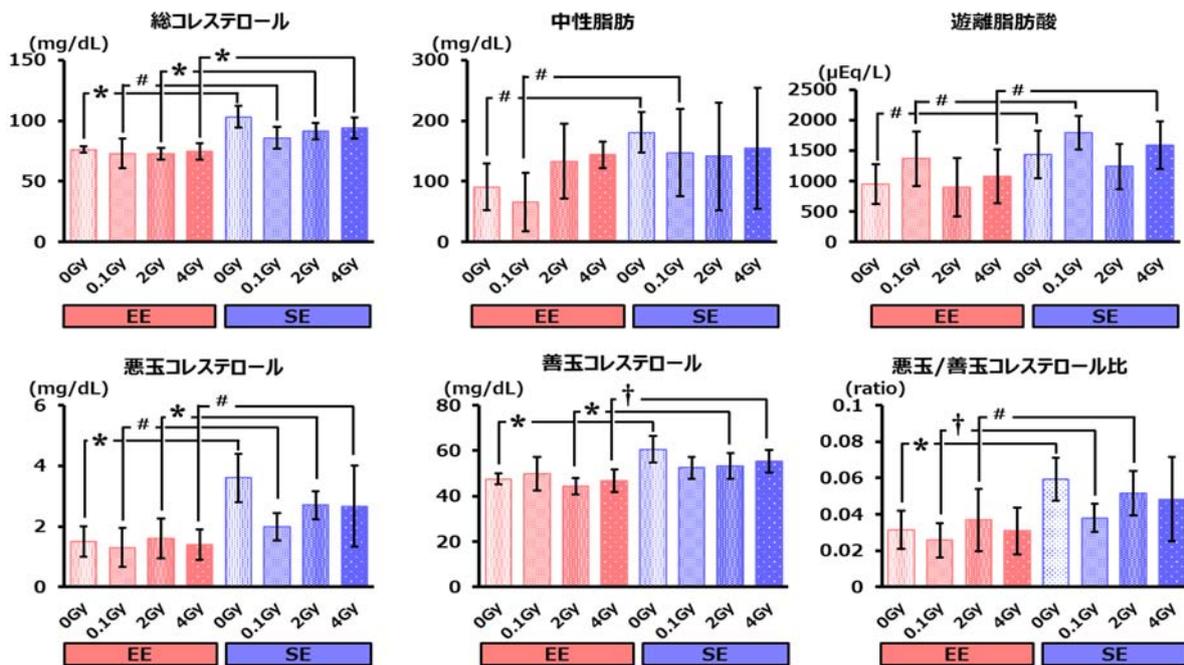
図Ⅲ-5 EE 及び SE で飼育した 10 週齢マウスの白色脂肪と褐色脂肪重量データは、平均値±標準偏差で示す。 (* p<0.005)

④ 糖代謝及び脂質代謝への効果

凍結保存した血漿を用いて血中グルコース値を測定した結果、EE 群と SE 育群との間に有意な差は認められなかった (図III-6)。次に、血中脂質成分を測定した結果を図III-7に示す。EE 群は、SE 群に比較して、総コレステロール値と悪玉コレステロール値が有意に減少を示した。この効果は、被ばく総線量に関係無く認められた。中性脂肪、遊離脂肪酸、善玉コレステロールは、EE により一部の群においてのみ有意に減少することが分かった (図III-7)。今回測定した脂質成分は、被ばく総線量による有意な変動は認められなかった。



図III-6 EE 及び SE で飼育した 10 週齢マウスの血中グルコース値
データは、平均値±標準偏差で示す。

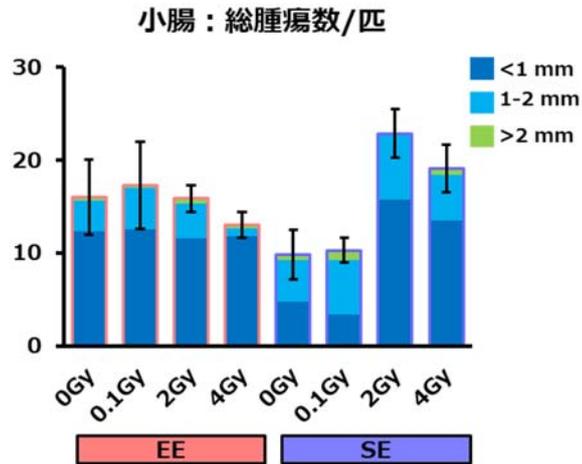


図III-7 EE 及び SE で飼育した 10 週齢マウスの生化学データ
データは、平均値±標準偏差で示す。 (# $p<0.05$, † $p<0.01$, § $p<0.005$, * $p<0.001$)

2. EE の放射線誘発消化管腫瘍抑制効果の検討

① 小腸腫瘍に対する効果

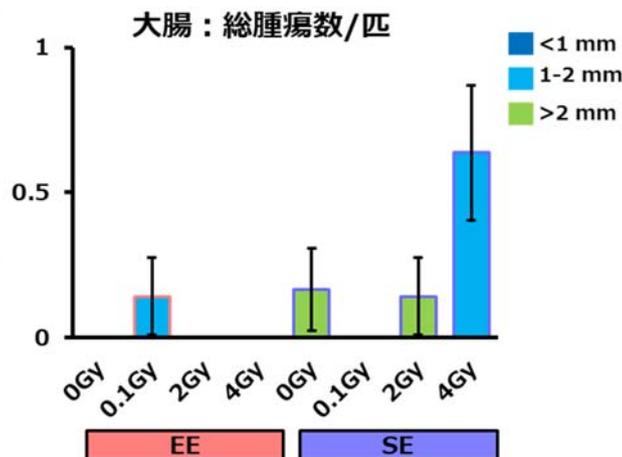
3週齢から7週間、EE及びSEで飼育した10週齢マウスの小腸に認められた腫瘍の1匹あたりの総数を図III-8に示す。EE群の小腸総腫瘍数は、被ばく総線量依存的な増加は認められなかった。SE群においては、総線量0.1Gy照射群の総腫瘍数は非照射群(0Gy)と同等であり、腫瘍数の増加がみられなかった。一方、総線量2Gyと4Gy照射群では、腫瘍数の増加傾向を認めた。また、総線量2Gyと4Gy照射のEE群は、同線量照射したSE群に比較して総腫瘍数の減少傾向が認められた。加えて、EE群において、腫瘍径が1mmから2mm大と2mm以上大の腫瘍数は、SE群に比べて少ない傾向が認められた。



図III-8 EE及びSEで飼育した10週齢マウスの小腸腫瘍数データは、平均値±標準偏差で示す。

② 大腸腫瘍に対する効果

図III-9に3週齢から7週間、EE及びSEで飼育した10週齢マウスの大腸に認められた腫瘍の1匹あたりの総数を示す。EE群は、被ばく総線量による腫瘍の発生数には有意な違いはみられなかった。SE群においては、4Gy照射群において増加傾向を示した。EE群は、SE群に比べて腫瘍の発生数が低い傾向が認められた。



図III-9 EE及びSEで飼育した10週齢マウスの大腸腫瘍数データは、平均値±標準偏差で示す。

IV. 考察

本研究の目的は、低線量率・低線量放射線を照射したヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスを用いて EE の健康増進（維持）効果と放射線誘発消化管腫瘍に対する予防効果を経時的に検証することにある。本研究成果を通して、放射線の健康影響や災害等による避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復の施策に繋げることを最終目標としている。

今年度は、3年計画の1年目であり、図II-1に示す実験群の設定と EE 及び SE での飼育を開始することが出来た。飼育開始後からの経時的な体重と摂餌量の測定により、EE は SE に比べて摂餌量が有意に増加するにも関わらず体重の増加を抑制することが分かった。3週齢から EE 及び SE で7週間飼育した10週齢のマウスを屠殺し、生殖器周囲の白色脂肪と肩甲骨下の褐色脂肪重量を測定した結果、有意に EE 飼育により減少していた。このことより、EE による体重増加抑制は、脂肪重量の減少が起因したと考えられた。

EE による糖及び脂質代謝への効果を評価するため、10週齢で屠殺し凍結保存した血漿を用いて生化学検査を行った。その結果より、血中グルコースは EE 及び SE による違いはみられなかった。総コレステロール、悪玉コレステロールは EE により有意に減少することが分かった。また、一部の EE 群において中性脂肪、遊離脂肪酸が有意に減少した。これらの減少効果は、EE による運動量やそれに伴うエネルギー消費の増加によるものと考えられた。加えて、動脈硬化の指標として用いられる悪玉/善玉コレステロール比は、EE 群において低い傾向を示し、将来の動脈硬化予防にも効果的である可能性が示唆された。

次に、EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する抑制効果について、10週齢で屠殺し摘出した小腸と大腸に発症した腫瘍数とサイズを計測し検証した。その結果、EE は小腸においては総線量の多い群（2 Gy と 4 Gy）では、数とサイズの抑制効果が、大腸においては、腫瘍の発生を抑制する可能性が示唆された。

今年度は、EE 条件下で7週間飼育したマウスを用いて EE の効果を検証したことより、EE の効果に統計学的な有意差が得られない項目も存在した。来年度以降、3週齢から EE 条件下で17及び27週間飼育したマウスを用いて EE の効果を検証する予定である。

V. 結論

EE 条件下で7週間飼育したマウスにおいて、体重の増加抑制、脂肪重量の増加抑制、脂質代謝の改善及び消化管腫瘍数の抑制効果の可能性を確認した。今年度は、短期の EE 飼育での評価であったことより、EE の効果が小さかったと考えられた。来年度以降の長期の EE で飼育したマウスを用いた評価が重要と考えている。

VI. 次年度以降の計画

本年度は、図II-1に示す実験群を設定し EE と SE での飼育を開始した。EE で7週間（3週齢から10週齢まで）飼育する群を解剖し EE の効果を検証した結果、体重増加の抑制、有意な脂肪重量増加の抑制、脂質代謝の改善及び消化管腫瘍数の抑制傾向が認められた。次年度は、EE での飼育期間を延長することによる効果を検証すべく、実験群の飼育を継続して行い、全身状態の観

察と体重測定（1回/週）を行う。20及び30週齢で解剖を行い、血液採取、小腸と大腸の腫瘍性病変のカウント及び採取の後、保存する。また、主要臓器も採取してホルマリン固定後、パラフィンブロックを作製する。凍結保存した血漿に関しては、脂質代謝、脂肪細胞由来ホルモン、炎症性サイトカインの測定を行う。腫瘍性病変と主要臓器に関しては、病理組織標本作製し、EEによる効果を病理組織学的に評価する。加えて、凍結保存した腫瘍性病変を用いて網羅的遺伝子発現解析を進め、EEのがん予防メカニズム解明を進める。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

なし

VIII. 参考文献

- 1) Cao L. et al. Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell*, 142(1), 52-64, 2010.
- 2) Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A. et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950–2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res*, 177, 229-243, 2012.
- 3) Pearce MS, Salotti JA, Little MP. et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet*, 380, 499-505, 2012.

Study for risk reduction of childhood continuous radiation exposure-induced health effects by enriched environment

Takamitsu Morioka

*Department of Radiation Effects Research, National Institute of Radiological Sciences
National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology*

Key words: Low dose, Childhood exposure, Enriched environment, Cancer prevention

Abstract

Long-term evacuation life caused by disasters such as nuclear accident, earthquake, and tsunami have an adverse effect on physical and mental health. After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, many people are concerned about the health effects of low-dose radiation exposure. Low-dose radiation induced cancer risk is considered really small but many people worry about it, especially to children. It is important to establish a new prevention method for children's stress and radiation effects. Enriched environment (EE) provide positive physical and psychological stress. EE has been mainly reported to activate the central nervous, immune and endocrine systems. However, whether EE prevent the radiation associated tumor is unknown. In this study, we examined the modifying effects of EE against radiation-induced intestinal tumors in mice.

Male C3B6F1 *Apc^{Min/+}* mice were irradiated γ -rays for 2 weeks from 1 week of age to the low-dose rate (0.0052-0.21 mGy/min), receiving 0, 0.1, 2 or 4 Gy total dose. After irradiation, mice were housed in EE or SE (Standard environment) cage from 3 weeks of age for 7 weeks. Mice were sacrificed under the anesthesia at 10 weeks of age. Blood, small intestine and colon were collected for biochemical and histopathological examinations.

EE showed decrease of body weight, white and brown adipose tissue weights. In EE groups, plasma total cholesterol, low- and high-density lipoprotein cholesterols and triglyceride were lower than that of SE groups. EE also reduced the tumor size in small intestine and total number of tumors in colon. These results suggested that EE has possible improvement effect of lipid metabolism, and potent cancer preventive effect in this intestinal carcinogenesis bioassay system. The goal of the present study is to provide the scientific evidences that should contribute to the scientifically proven prevention against radiation exposure-induced health effects.

2-6 放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

「線量・線量率効果係数」 $DDREF=2$ の妥当性の検討

主任研究者：笹谷 めぐみ（広島大学）

分担研究者：志村 勉（国立保健医療科学院）

分担研究者：河合 秀彦（広島大学）

分担研究者：小林 純也（京都大学）

研究要旨

現在、100 mSv 以下の低線量放射線被曝や低線量率の長期間被曝に対する発がんリスクは未解明である。その為、低線量や低線量率被曝におけるリスクを推定するために線量・線量率効果係数（Dose and Dose Rate Effectiveness Factor: $DDREF$ ）が用いられている。現在、国際放射線防護基準では、 $DDREF$ を 2 と定めており、低線量・低線量率放射線のリスクは、高線量での値の半分であると推定されている。放射線の健康リスクに対し、防護と社会が向き合う上では、この $DDREF$ の定義が極めて重要である。しかしながら、 $DDREF$ の妥当性については、現在議論が行われており、より正確な科学的知見の提供が求められている。

我々は、これまでの研究から放射線発がん高感受性マウス ($Apc^{Min/+}$ マウス) を用いて、100 mGy のガンマ線被曝で、有意ながんの増加を検出することに成功した。さらに、放射線照射に特有の遺伝子変異（放射線の爪痕）をより高感度に検出できる $Apc^{Min/+}$ マウスを作成し、線量率効果には染色体組換え頻度が重要な役割を果たしているという知見を得た。このことは、これまで明らかとされていなかった線量・線量率効果の分子機構解明に極めて重要といえる。

本申請研究では、放射線発がんを高感受性かつ染色体組み換えを検出可能な $Apc^{Min/+}$ マウスを用いて線量率の変化による腫瘍発生頻度への影響を解析することにより、 $DDREF$ 値の策定に寄与するデータを収集、提供する。またゲノム DNA 損傷、ミトコンドリア損傷、がん関連繊維芽細胞（Cancer Associated Fibroblasts: CAF）に着目し、細胞レベルで $DDREF$ 値の妥当性について検討する。さらに、最先端機器である共焦点レーザー全自動画像撮影装置(Opera Phenix)を用いることにより、線量率効果の分子機構に関わる因子のスクリーニングを行う。このように、分子から個体レベルまで多角的観点から線量率の変化による放射線応答への影響を明らかにし、 $DDREF=2$ の妥当性について検討する。得られた学術成果を国際原子力機構 (International Atomic Energy Agency: IAEA) や国際放射線防護委員 (International Commission on Radiological Protection: ICRP) などの国際機関へ提言することにより、新しい放射線防護体系の基盤確立に貢献し、最終的には放射線リスクや社会不安の低減化を目指す。

キーワード

線量・線量率効果係数(Dose and Dose Rate Effectiveness Factor: DDREF)、*Apc^{Min/+}*マウス、活性酸素、がん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts: CAF)、DNA 損傷、ミトコンドリア

研究協力者

なし

I. 研究目的

ヒトにおける放射線発がんリスク評価は、広島・長崎原爆被爆者の疫学調査から得られた知見がその基礎となっている^{1,2)}。しかしながら、低線量域での発がんリスク評価についての十分な情報が得られていないのが現状である。さらに、低線量率長期被曝に関する高自然放射線地域住民を対象とした疫学調査では、がんの相対リスクの増加がみられないことが報告されているが、調査期間や信頼限界値などの点において最終的な結論には至っていない³⁾。現在、低線量・低線量率放射線発がんリスク評価において、ICRP では DDREF=2 を用いた低線量・低線量率放射線発がんのリスク推定が行われている。DDREF の数値の妥当性については、現在でも議論が続いている。

そこで我々は、分子レベルから個体レベルまで多角的観点から、線量率の変化による生体応答への影響を解析することにより、DDREF=2 の妥当性について検討し、新しい放射線防護体系の基盤確立への貢献するための知見を提供することを目的とする。

II. 研究方法

1. 遺伝子改変マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果

①マウスの飼育：マウスの飼育は、原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設内の動物飼育スペースにて行った。飼料は、MF (オリエンタル酵母工業 (株)) を用い、餌、水を自由摂取させて飼育した。マウスは、基本的に 1 ケージ(30×40×20 cm)あたり 4、5 匹で飼育し、週 1 回のケージ交換ならびに、週 2 回の給水瓶の交換を行った。

②放射線発がん実験：放射線発がん実験を行うために、繁殖に適した 8 週齢以上の *Apc^{+/+}* マウスのメスと *Apc^{Min/+}* マウスのオスを準備し交配を行った。妊娠したメスマウスが確認されたら、別ケージに移動させ個別飼育を行い、毎日観察することにより、出産日を記録した。得られた仔マウスは生後 11 日目に高線量率および低線量率放射線照射を行った。照射には、広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置された Gammacell[®] 40 Exactor (Best[™] Theratronix 社 (¹³⁷Cs 線源、線量率：~0.9 Gy/min)) および低線量率ガンマ線照射装置 (Pony 工業 (¹³⁷Cs 線源、線量率：~2.7 mGy/min)) を用いた。約 4 週齢時に、マウスの尻尾から DNA を抽出し、遺伝子型決定により *Apc^{Min/+}* マウス、*Apc^{+/+}* マウスの判定を行った。定期的にマウスの様子を確認し、衰弱していないか観察を行った。

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

- ①培養細胞株と培養条件：ヒト由来正常線維芽細胞株（MRC-5、TIG-3）は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入した。細胞は、MEM（ナカライ社）に 10% ウシ胎児血清と抗生物質を添加した培養液を用いて、37°C、5%CO₂の条件で培養した。
- ②照射条件：照射には、国立保健医療科学院に設置されたエックス線照射装置（日立、MBR-1505R2）または、広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置された Gammacell[®] 40 Exactor（Best[™] Theratronics 社（¹³⁷Cs 線源、線量率：～0.9 Gy/min））を用いて、高線量率（0.7 Gy/min）の急性照射と長期分割照射（1 回当たり 0.01Gy または、0.05Gy の照射を週に 5 日間 1 か月間：累積線量 0.46 Gy または、2.3 Gy）を行った。低線量率の慢性照射は広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置された低線量率ガンマ線照射装置を利用し、25 mGy または、625 mGy/day の線量率で 4 日間行い 累積線量 0.1Gy または、2.5Gy の照射を行った。
- ③がん関連線維芽細胞の指標である α -SMA タンパクの発現解析：anti- α -SMA 抗体（Sigma 社）と anti- α -SMA 抗体を認識するための蛍光抗体として anti-IgG-Alexa 蛍光標識抗体（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡（キーエンス社）で 100 個以上の細胞を観察した。解析ソフト Hybrid Cell Count software を用いて、しきい値を設定して染色される領域を決定し、 α -SMA の輝度を測定した。細胞核の染色で細胞数を求め、1 細胞当たりの α -SMA の輝度の総量を計測した。

3. 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

- ①培養細胞株と培養条件：ヒト由来線正常維芽細胞株（TIG-3、BJ-1/hTERT、MRC-5、HE-4）を用いた⁴⁾。全ての細胞の培養には Alpha modification of Eagle's MEM（SAJ 社）に 10%牛胎児血清（FBS）と L-Glutamine Solution（ナカライテスク社）を加えた培養液を用いて、37°C、5%CO₂の条件で培養した。
- ②照射条件：放射線照射には広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置された Gammacell[®] 40 Exactor（Best[™] Theratronics 社、¹³⁷Cs 線源、線量率：～0.9 Gy/min）および低線量率ガンマ線照射装置（産業科学、¹³⁷Cs 線源、線量率：～1.388 mGy/min）を用いた。
- ③イメージング解析：ガンマ線照射した細胞を固定し、ミトコンドリアを検出するために一次抗体として anti-Tom20 抗体（Cell signaling 社）、DNA 二重鎖切断を検出するために一次抗体として anti- γ -H2AX 抗体（Merk Millipore 社）を用いた。その後、二次抗体として anti-IgG-Alexa 蛍光標識抗体（ThermoFisher Scientific 社）を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342

(ThermoFisher Scientific 社) で蛍光標識し、全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix (PerkinElmer 社) で画像データを取得した。データ画像は画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer 社) を用いて、蛍光強度を指標に各解析を行った。また、データ解析には TIBCO SpotFire (PerkinElmer 社) を用いた。

4. 放射線感受性の個人差の課題の検討

①培養細胞株と培養条件：放射線感受性が高いと知られているヒト毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia-telangiectasia; AT)由来繊維芽細胞を SV40 ウイルスで不死化した ATM(ataxia telangiectasia mutated)欠損細胞(AT5VIBA)および ATM cDNA 導入相補した細胞(AT5VIBA/ATM-wt)、ナイミーヘン症候群(Nijmegen breakage syndrome: NBS)患者由来 NBS1 欠損細胞 (GM7166：同様に SV40 で不死化) と NBS1 cDNA 導入した相補細胞 (GM7166/NBS1-wt)、及び正常人由来繊維芽細胞 48BR (テロメラーゼ導入して不死化した細胞) を用いた。培養には、DMEM (ThermoFisher Scientific 社) に、10%ウシ胎児血清 (ThermoFisher Scientific 社) と抗生物質を添加した培養液を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した^{5,6)}。

②照射条件：細胞への照射には、京都大学放射線生物研究センターに設置された Gammacell[®] 40 Exactor (BestTM Theratronics 社 (¹³⁷Cs 線源、線量率：～0.9 Gy/min)) および、低線量長期放射線照射装置 (産業科学 (¹³⁷Cs 線源、線量率：～ 1 Gy/day)) 用いた。

③ミトトラッカー染色法 (ミトコンドリアの可視化)：照射後の細胞は、MitoTracker Green FM (ThermoFisher Scientific 社) あるいは MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific 社)溶液を用いて染色し、核酸染色試薬 (DAPI) 入りの封入剤 (VECTASTAIN: Vector)を滴下し、封入後に蛍光顕微鏡 (Leica 社) で観察し、画像データを取得した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いに関しては、広島大学実験動物取り扱い指針にしたがい、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行う。また、本申請研究には放射性同位元素を使用する実験が含まれているため「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づき広島大学原爆放射線医科学研究所放射線障害予防規程にしたがって承認を得て行った。

III. 研究結果

1. 遺伝子改変マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果

放射線発がん実験を行うために、繁殖に適した8週齢以上の $Apc^{+/+}$ マウスのメス約50匹と $Apc^{Min/+}$ マウスのオス約15匹を準備し交配を行った。妊娠したメスマウスが確認されたら、別ケージに移動させ個別飼育を行った。毎日観察することにより、出産日を記録し、計139匹の仔マウスを得た。そのあと、マウス尻尾を用いて Genotyping を行い、 $Apc^{Min/+}$ マウスおよび $Apc^{+/+}$ マウスの判定を行った。 $Apc^{Min/+}$ マウスは、表 III-1 に示す非照射群 (0 mGy)、高線量率照射群 (100 mGy、線量率: 262 Gy/day)、低線量率照射群 (100 mGy、線量率: 50 mGy/day) の3群に分け、生後11日目に放射線照射を行った。放射線照射には、広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置された Gammacell® 40 Exactor および低線量率ガンマ線照射装置を用いた。その後、定期的にマウスの様子を確認し、衰弱していないか観察を行った。

表 III-1 放射線発がん実験に用いたマウスの数

Dose	Dose rate	Female	Male	Total
0 mGy	-	17	13	30
100 mGy	262 Gy/day	8	11	19
100 mGy	50 mGy/day	14	10	24

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

がん組織に含まれる線維芽細胞は正常線維芽細胞とは異なり CAF と呼ばれ、液性因子を放出してがん細胞の増殖を促進する^{7,8)}。そこで、放射線発がんにおける CAF の役割を調べるため、ヒト正常線維芽細胞 MRC-5、TIG-3 細胞にエックス線照射を行い、被曝線量と CAF 出現頻度との相関関係を検討した。CAF の検出には、画像解析ソフトを用いて α -SMA 陽性領域内の輝度を計測し、Hoechst33342 の核染色で計測した細胞数から、1細胞当たりの α -SMA 発現量を求めた。急性照射の結果を図 III-1A に示した。TIG-3 細胞、MRC-5 細胞ともに、5 Gy 以上の照射で、非照射コントロールと比べ統計的に有意に α -SMA の発現量が増加した。照射後、 α -SMA の発現誘導は持続されず、照射から7日以降には消失した。一方、1か月間の長期分割照射では、MRC-5、TIG-3 細胞において、急性照射よりも低い累積線量 0.46 Gy または、2.3 Gy の照射で CAF が誘導されることを明らかにした (図 III-1 B)。

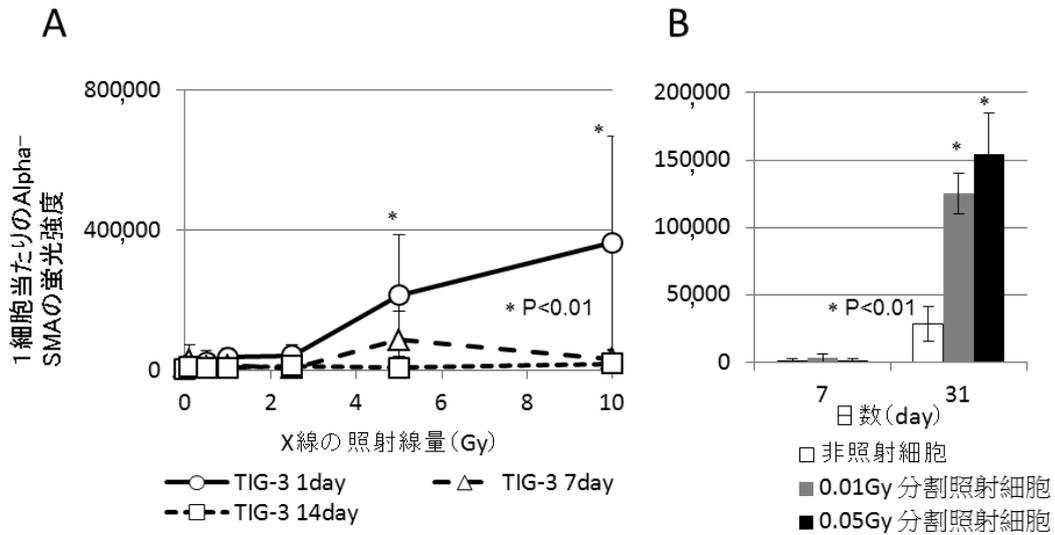
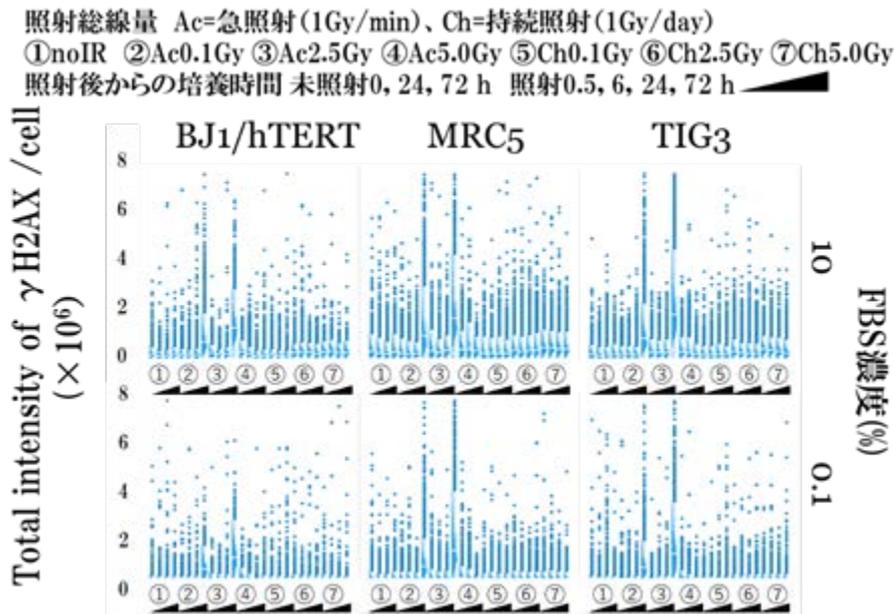


図 III-1. エックス線照射による CAF の誘導

3. 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

放射線被曝による細胞運命に直接関与する細胞応答機構に関して、照射条件（線量-線量率効果）との関係性の解析を行った。 γ -H2AX および Tom20 検出量の変化を指標として、放射線照射で生じる DNA 損傷量、ミトコンドリア量を検出した。画像解析の結果の一部を図 III-2 に示した。 γ -H2AX を指標とした DNA 損傷量の解析からは 2.5 Gy 以上のガンマ線急照射で細胞の種類や増殖に関わらず DNA 損傷は一過的に増加するものの、そのほとんどが 24 時間後には消失することが確認された。一方、持続照射では 500 mGy/day 以上で γ -H2AX 蛍光強度の増加が認められたが、急照射で同じ線量を照射した場合よりもその強度は低かった。

次に、Tom20 を指標とした画像解析の結果から、ミトコンドリア量は、照射総線量に依存して増加することが明らかとなった。また、急照射された細胞よりも持続照射された細胞に顕著な増加傾向がみられることから、ミトコンドリアは持続的な放射線照射に対して高感度に応答する、あるいは、影響を受ける可能性が示唆された。



図III-2. γ -H2AX を指標とした DNA 損傷量と照射線量—線量率との関係

4. 放射線感受性の個人差の課題の検討

ATM あるいは NBS1 遺伝子が欠損した放射線高感受性遺伝病患者由来細胞及び相補細胞（正常細胞）を用いて、低線量率及び高線量率でガンマ線照射し、照射終了から 6 時間及び 24 時間経過した後、MitoTracker Green で染色し、ミトコンドリア形態について検討を行った（図 III-3）。ガンマ線非照射の場合、正常細胞及び患者由来細胞（NBS および AT 細胞）は、ミトコンドリアが鎖状で連結して、2 極の方向に広がった分布を示す細胞がほとんどであった。高線量率照射を行った場合は、24 時間後にミトコンドリア鎖が顕著な伸張を示すものや、多方向にミトコンドリア鎖が広がる異常形態を示す細胞（図内で黄色で丸く囲んだ細胞）が出現したが、正常細胞と NBS、AT 細胞の間で頻度の差は認められなかった。一方、低線量率照射を行った場合は、細胞核・細胞質ともに肥大化した細胞老化様の形態を示す細胞（図内で黄色で丸く囲んだ細胞）が出現し、これら細胞はミトコンドリア鎖の伸張に異常形態を示した。とくに NBS 細胞では照射終了の 6 時間後からこのような異常形態を示す細胞が出現した。この結果から、NBS 細胞では低線量率放射線影響を特異的に検出できる可能性が考えられる。

放射線影響の指標として従来から微小核検定が知られており、放射線以外にも活性酸素や他のゲノムストレスとなる様々な変異原物質についての影響評価の指標として用いられてきている⁹⁾。そこで、ATM 阻害剤を用いて、放射線照射によって誘発される DNA 二本鎖切断陽性 (γ -H2AX 陽性) 微小核出現頻度を求めた。高線量率照射では、 γ -H2AX 陽性微小核の出現頻度は、ATM 阻害剤の有無にかかわらず低かった。一方、低線量率照射後では、ATM 阻害剤未添加では γ -H2AX 陽性微小核の形成頻度は同様に低かったが、ATM 阻害剤を添加した場合には、顕著に γ -H2AX 陽性微小核が出現するとともに、 γ -H2AX を伴わない微小核を持つ細胞も少数出現した。ヒト正常細胞に ATM 阻害剤処理を組み合わせることで微小核形成を検討することにより、低線量(率)

放射線影響を高感度に検出できる可能性が示唆された。

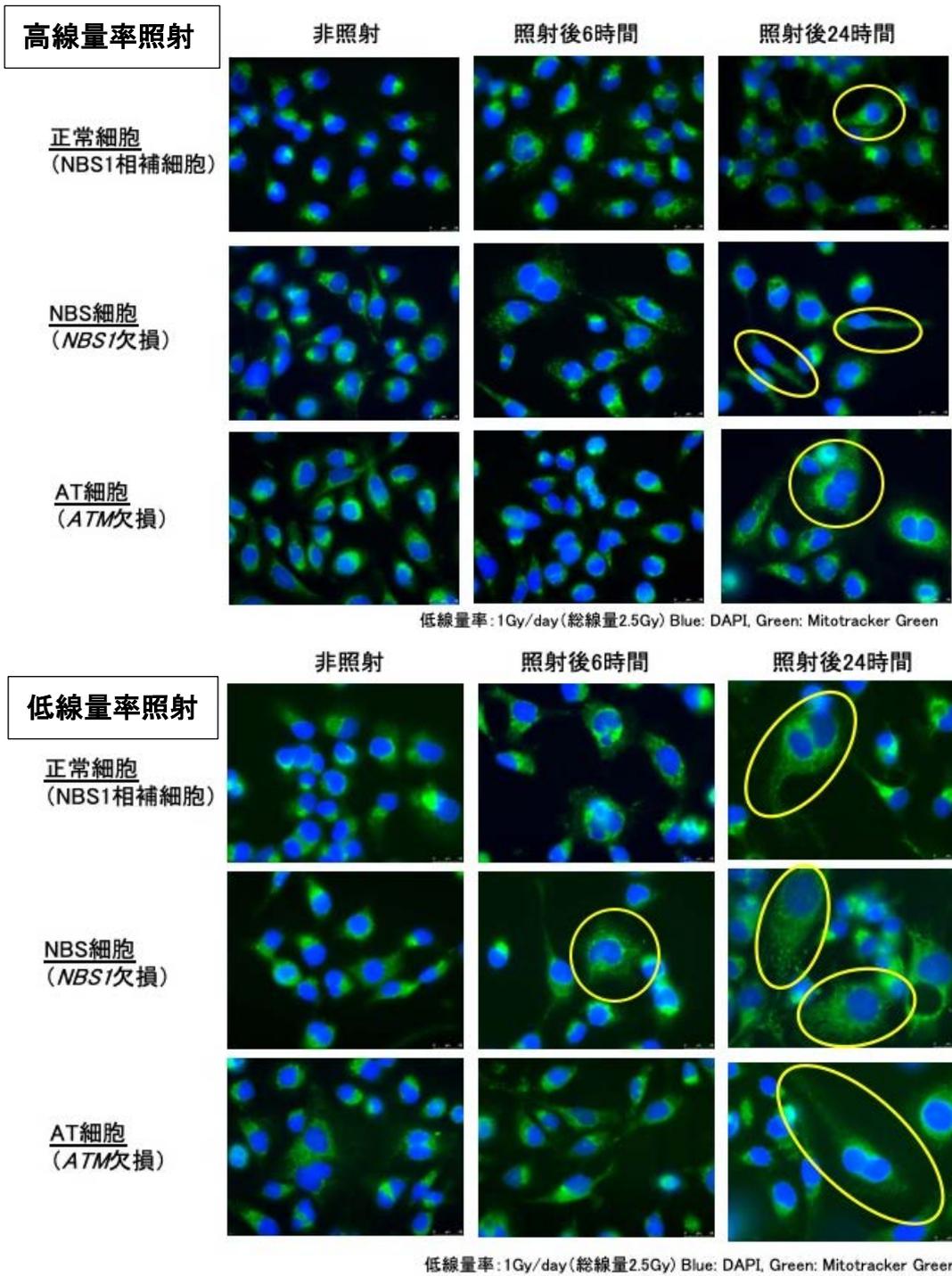


図 III-3. 放射線高感受性細胞におけるガンマ線照射によるミトコンドリアの変化

IV. 考察

本研究では、分子レベルから個体レベルまで多角的観点から、線量率の変化による生体応答への影響を解析することにより、DDREF=2の妥当性について検討し、新しい放射線防護体系の基盤確立への貢献するための知見を提供することを目的とする。

まず、線量率の違いによる放射線発がんリスクへの影響を調べるため、ヒト大腸がんモデルマウスとして知られている *Apc^{Min/+}* マウスに着目した。我々はこれまでの研究により、*Apc^{Min/+}* マウスが放射線に高発がん性であるという知見を得ている。また、遺伝的背景の異なる *Apc^{Min/+}* マウスを用いて線量率の異なる放射線発がん実験を行った結果、遺伝的背景が *Apc^{Min/+}* マウス小腸腫瘍における「線量率効果」に影響を与えるという知見を得ている。そこで本研究では、「線量率効果」が検出でき、かつ、遺伝子変異解析を行うことのできる *Apc^{Min/+}* マウスを用いて、総線量を 100 mGy とし、高線量率および低線量率放射線発がん実験を開始した。現時点で衰弱したマウスは検出されていないことから、来年度以降、マウス小腸における腫瘍計測および、得られた腫瘍を用いた遺伝子変異解析を行っていきたいと考えている。

次に、放射線発がんの機構解明のため、がん細胞だけでなく、腫瘍組織の周辺部の細胞とがん細胞の相互作用に着目し、 α -SMA の発現を指標にした CAF の検出を行った。急性照射と長期分割照射で TIG-3 と MRC-5 細胞に α -SMA の発現が誘導され、正常線維芽細胞から CAF が形成されることを明らかにした。さらに、分割照射や慢性照射では、より低い線量で CAF が誘導されることを明らかにした。CAF の誘導には、活性酸素による細胞の増殖や分化に関与する TGF- β シグナル経路の活性化が必要で、活性酸素は、急性照射に比べ、分割照射ではより低い線量で誘導される^{10,11)}。これらの結果から、抗酸化剤は活性酸素を除去して CAF の形成を抑制し、放射線の晩発影響である発がんの発症を抑制することが期待される。

線量率効果を規定する因子のスクリーニングでは、異なる線量と線量率の放射線被曝に対する細胞への損傷と細胞の応答性を評価するため、間質細胞である線維芽細胞とハイスループット解析手法を用いて、DNA 損傷量、ミトコンドリア量に関して、照射条件と各因子の挙動との関係性について定量的解析を試みた。その結果、細胞の種類や増殖状態に依存して、放射線被曝に対するそれぞれの因子の応答や影響が異なることが明らかとなった。また、急照射と持続照射とでは残存する DNA 損傷やミトコンドリア量といった細胞応答性が異なる可能性も示唆された。このことは、異なる線量率の放射線被曝から生じる生物影響は、放射線による複合的な要素を考慮すべきであることを支持するものである。

放射線感受性の個人差の課題の検討では、放射線高感受性を示すヒト遺伝子欠損細胞を用いた放射線障害が蓄積される条件化で、DDREF=2の妥当性の再評価に利用できる低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系の確立を目指した。低線量率照射では、高線量率照射と異なり、NBS 細胞でのみ照射終了 6 時間後から、異常ミトコンドリア鎖構造体が出現していた。このことは NBS1 遺伝子欠損で引き起こされる放射線障害蓄積下で、ミトコンドリア形態変化を指標にして、低線量・低線量率放射線影響を高感度で検出できる可能性を示唆した。また、微小核形成は放射線をはじめとする様々なゲノムストレスの影響を評価する指標として使われてきているが、これまで低線量（率）域放射線に対しての利用の可能性は示されてはいなかった⁹⁾。ATM 活性阻害剤を用いて微小核形成を検討すると、低線量率放射線照射時にのみ、 γ -H2AX 陽性微小核が増加

していたが、この時、酸化ストレス応答が阻害剤未添加時よりも増強されていることが、ウェスタンブロット法で明らかとなった（データ未掲載）。これらの結果から、ATM 阻害剤により ATM の酸化ストレス応答機能が抑止され、放射線誘発活性酸素が過剰に細胞内に蓄積され、微小核の出現頻度が上昇させたことが考えられる。低線量率放射線曝露時には酸化ストレスの放射線影響への占める割合が高くなっていると考えられることから、このような ATM 活性阻害条件下での微小核形成率測定は、低線量率放射線影響の高感度検出系開発に利用できる可能性が考えられる。

V. 結論

現在、低線量・低線量率放射線被曝の影響は未解明の部分が多く残されている。そのため、低線量・低線量率放射線発がんのリスク評価には、DDREF を用いたリスク推定が行われている。この DDREF の数値の妥当性については、現在でも議論が続いている。

そこで本年度は、放射線発がんを高感受性を示すモデルマウスを用いて、高線量率放射線被曝及び、低線量率放射線被曝による発がん実験を行い、線量率の違いによる発がんリスクへの影響について解析を行うための発がん実験を開始した。

放射線発がんにおけるがん微小環境の役割については、放射線照射により CAF が形成されること、急性照射よりも、分割照射ではより低い線量で CAF が誘導されることを明らかにした。

線量率効果を規定する因子のスクリーニングでは、DNA 損傷量、ミトコンドリア量、何れも異なる線量率の照射に対して異なった影響や挙動が検出され、それらの間には関連性は認められなかった。このことは放射線被曝による健康影響に対する線量－線量率効果は、複雑な複合的要素を含むことを示唆する。放射線被曝が細胞に与える影響には、細胞死、細胞老化、変異などがあり、それぞれが晩発性の健康影響に寄与するものであると考えられる。

放射線感受性の個人差の課題の検討については、NBS1 遺伝子欠損した NBS 患者細胞におけるミトコンドリア形態変化、および ATM 活性を阻害したヒト正常細胞での微小核形成は、低線量・低線量率放射線影響の高感度検出系の開発のための有用な指標と考えられ、広範囲な線量域でのこれら応答性の検討が高感度検出系の確立に重要だと考えられる。

VI. 次年度以降の計画

今年度は、放射線発がん実験を開始したため、引き続き、発がん実験の継続を行う。定期的にマウスの様子を確認し、衰弱した場合には、マウスを屠殺し、腫瘍の計測を行う。また、得られた腫瘍を用いて遺伝子変異解析を行う。

放射線発がんにおけるがん微小環境の役割については、本年度明らかにした放射線誘発 CAF の再現性の確認し CAF が誘導される放射線のしきい線量についての検討を進める。放射線応答に関わる分子と放射線 CAF の関係や、細胞増殖が必要かなど、放射線誘発のメカニズムについての解析を進める。さらに、抗酸化剤を用いて、放射線誘発 CAF を抑制し、発がんの防護効果を持つかどうかの検討を行う予定である。

線量率効果を規定する因子のスクリーニングについては、異なる照射線量率での変異誘発機構

に注目して、放射線被曝による LOH と染色体組み換えに関与する遺伝子を遺伝子発現を抑制することのできる(small interfering RNA)siRNA スクリーニングによって同定を試みることで、放射線誘発 LOH に関わる遺伝的背景の解明につながるデータを得る。

放射線感受性の個人差の課題の検討については、今年度、低線量率放射線影響の高感度検出の可能性が示唆された核肥大化を伴うミトコンドリア形態異常を示す細胞を指標とし、NBS 細胞を用いた MitoTracker 染色法で、線量率を複数設定して線量率効果について検討を行う。ATM 阻害剤添加条件でのヒト正常細胞における γ -H2AX 陽性微小核形成は、低線量・低線量率放射線影響を検出する有用な指標と考えられるので、線量率を複数設定して線量率効果について検討を行う。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

該当なし

B. 論文：査読なし

該当なし

C. 学内学会発表

- 1) 笹谷めぐみ, 土居主尚, 飯塚大輔, 神谷研二: *Apc^{Min/+}*マウスを用いた低線量放射線発がんリスク評価. 日本放射線影響学会第 61 回大会, 2018.11.07, 長崎
- 2) 志村勉, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 神谷研二, 小林純也, 小松賢志, 櫻田尚樹 放射線誘発がん関連線維芽細胞は、活性酸素による TGF β シグナリング経路の活性化を介してがんの増殖を促進する. 第 61 回日本放射線影響学会, 2018. 11.07, 長崎
- 3) Meng Qingmei, Qi Fei, 河村香寿美, 小林純也. 低線量率照射による DNA 損傷と酸化ストレス応答因子. 日本放射線影響学会 61 回大会, 2018. 11.07, 長崎

D. 国際学会発表

- 1) Elena Zaharieva, Megumi Sasatani and Kenji Kamiya: Differential Radiation Dose Rate Effects in Primary Murine Fibroblasts isolated from Kidney, Lung and Small Intestine, 3rd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2019.01.13-14, 2019, Fukushima, Japan
- 2) Kobayashi J, Kawamura K, Qi F, Meng Q, Komatsu K. Relationship between endogenous ROS accumulation and mitochondria responses under low dose rate irradiation. The 3rd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2019.01.13-14, 2019, Fukushima, Japan

E. 著書

- 1) Kobayashi J. Ataxia-Telangiectasia and Nijmegen Breakage Syndrome. DNA Repair Disorders (Editors: Nishigori C & Sugawara K)の p191-p201 を執筆担当. Springer (Berline), 2019.

F. 講演

- 1) 小林純也. 低線量(率)放射線誘発細胞応答におけるタンパク質マーカーの探索. NIFS 一

般共同研究研究会「大型ヘリカル装置の初期 DD 実験における水素同位体挙動と安全管理」. 2018.08.03-04, 土岐

- 2) 小林純也. 低線量率放射線照射による ROS 産生とミトコンドリア影響との関係. 若手放射線生物学研究会・平成 30 年度専門研究会. 相模原. Sep. 1-2. 2018.

G. 主催した研究集会

該当なし

H. 特許出願・取得

該当なし

I. その他

該当なし

VIII. 参考文献

- 1) Grant EJ, Brenner A, Sugiyama H, et al. Solid Cancer Incidence among the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958-2009. *Radiat Res.* 2017; 187(5):513-537.
- 2) Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res.* 2012; 177(3):229-43.
- 3) Nair R R, Rajan B, Akiba S, Jayalekshmi P, et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. *Health Phys.* 2009; 96:55-66.
- 4) Cao L, Kawai H, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F. A novel ATM/TP53/p21-mediated checkpoint only activated by chronic γ -irradiation. *PLoS One.* 2014. 9(8):e104279.
- 5) Sakamoto S, Iijima K, Mochizuki D, et al. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene.* 2007; 26: 6002-6009.
- 6) Zhou H, Kawamura K, Yanagihara H, et al. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms; ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50 and cell cycle dependent-degradation of protein. *J Radiat Res.* 2017; 58: 487-494.
- 7) Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2016; 16(9): 582-98.
- 8) Kalluri, R, Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2006; 6(5): 392-401.
- 9) Vral A, Fenech M, Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionizing radiation exposure. *Mutagenesis.* 2011; 26:11-17.
- 10) Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, et al. Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGF β Signaling. *Molecular cancer research: MCR.* 2018; 16(11): 1676-86.
- 11) Shimura, T, Sasatani, M, Kamiya, K, et al. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget.* 2016; 7(3): 3559-70.

Is applying a Dose and Dose Rate Effectiveness Factor = 2 a valid approach in radiation cancer risk estimation?

Megumi Sasatani¹, Tsutomu Shimura², Hidehiko Kawai³, Junya Kobayashi⁴

¹*Departments of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University,*

²*Department of Environmental Health, National Institute of Public Health,*

³*Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Radiation Biology Center,*

⁴*Graduate School of Biostudies, Kyoto University*

Keywords: Dose and Dose rate effectiveness factor: DDREF, radiation-induced cancer risk, low dose/low dose rate, *Apc^{Min/+}* mice

Abstract

It is a well established fact that exposure to ionizing radiation (IR) may produce deleterious consequences in humans, including cancer induction. Our knowledge regarding the relationship between absorbed radiation dose and cancer risk is mainly based on epidemiological evidence from the Life Span Study of Japanese A-bomb survivors. The traditional approach to radiation-induced cancer risk estimation is to extrapolate the risk from high and moderate doses down to low doses and low dose rates which are relevant to contemporary radiological protection. The International Commission on Radiological Protection (ICRP) recommends using the so-called Dose and Dose Rate Effective Factor (DDREF =2) to estimate the cancer risk per unit dose at low doses/low dose-rates. However, with the accumulation of new epidemiological and radiobiological data, the validity of this extrapolation has been questioned, and the ICRP has re-opened the debate on whether the DDREF should be applied. There is also a growing appreciation for the need to elucidate the molecular events governing the dose rate effect.

In this project, we are planning to contribute to the reassessment of the DDREF value by addressing the issue of dose rate effects from multiple viewpoints at the molecular, cellular and organismal levels. Using a mouse model susceptible to tumor induction, we will conduct an *in vivo* study providing direct evidence for the carcinogenic potential of radiation at different doses and dose rates. In addition, our *in vitro* experiments will allow us to explore the relationship between radiation dose-rates and biological effects, such as genomic DNA damage, mitochondria damage and the induction of cancer associated fibroblasts (CAF), and to shed light on the molecular mechanisms underlying these phenomena. Thus, our study is expected to produce variable datasets and analysis of the biological effectiveness of different doses/dose rates of radiation, and we believe it may be a step towards developing a new scientifically based concept of radiation risk estimation.

2-6-a 放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した 「線量・線量率効果係数」DDREF=2の妥当性の検討 (分担) 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

分担研究者 河合 秀彦 (広島大学大学院医歯薬保健学研究科)

研究要旨

低線量・低線量率の放射線被曝による健康影響の実態とその発現機構はそのほとんどが不明である。本分担研究者は、これまで低線量・低線量率放射線被曝の生物影響を解明することを目的に、ガンマ線持続照射設備(広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端照射施設、 ^{137}Cs 線源 培養細胞: 0.001~1.4 mGy/min、実験動物: 0.001~2.8 mGy/min)を用いて、幅広い線量率のガンマ線を異なる種類の培養細胞に持続照射することで、照射線量率や照射期間に依存して現れる細胞応答や細胞運命の変化を解析してきた。これまでに、ヒトの初代培養細胞やがん細胞、iPS細胞などのさまざまな種類の細胞を用いた研究によって、持続照射の放射線応答の決定に関与する因子を明らかにしている[1]。

本研究では、放射線被曝発がんと線量率効果の関係を分子レベルで明らかにすることを目的として、異なる線量率の放射線被曝で誘発される変異の違いに関与する遺伝子のsiRNAスクリーニングを行う。放射線誘発変異と線量率効果に関わる因子を同定することにより、低線量・低線量率放射線被曝による発がんリスクの解明に貢献する。

キーワード

放射線発がん、持続照射、細胞老化、siRNAスクリーニング

I. 研究目的

福島第一原発事故以降、低線量、そして、持続的な低線量率の放射線被曝の発がんへの影響は福島県民のみならず国際的にも最優先に解明すべき課題となっている。低線量率の放射線被曝による発がんリスクは、高線量率被曝よりも低いとされ、放射線の防護基準を勧告する国際放射線防護委員会 (ICRP) では、DDREF=2 を用いた低線量・低線量率放射線発がんのリスク推定が行われている。しかし、DDREF の数値の妥当性については、現在でも議論が続いている。

培養細胞を用いて線量・線量率効果の検証を行う利点は、各種ヒト由来細胞を用いて放射線の生物学的影響データを効率的に得ることにより、そのデータ量と再現性から、ごくわずかな生物学的影響を定量的に解析できる点にある。われわれは低線量・低線量率被曝影響の全容解明を目的に、これまでに持続放射線被曝影響解析システムを構築し、持続照射が急照射よりも効果的に恒久的な細胞周期の進行停止である細胞老化を誘導すること、また、持続放射線誘発細胞老化に関わる分子を明らかにしてきた。これらの経験に基づき、主任研究者、分担研究者と協力して網羅的な実験系を用いて、放射線発がんに関わる新規因子の同定に取り組む。解析対象としては、がん細胞に限らず、がん組織に含まれる間質細胞を対象に、放射線発がんの特異的に観察される変化を捉え、放射線発がんの分子経路を明らかにすることを目的とする。

本研究では、持続放射線被曝影響解析システムを用いたスクリーニングを行うことにより染色体組み換えに携わる候補因子についての新規知見を提供する。

II. 研究方法

1. 培養細胞株と培養条件：本実験にはヒト由来線維芽細胞株 (TIG-3、BJ-1/hTERT、MRC-5、HE-4) を用いた[1]。全ての細胞の培養には Alpha modification of Eagle's MEM (SAJ 社) に 10% 牛胎児血清 (FBS) と L-Glutamine Solution (ナカライテスク社) を加えた培養液を用い、ガンマ線の持続照射中を含めて 37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で細胞を維持した。継代培養には、100-mm の培養 dish、画像解析用の培養には 384-well imaging plate Cell Carrier Ultra (PerkinElmer 社) を用いた。

2. 照射条件：ガンマ線の持続照射には広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置されたガンマセル (¹³⁷Cs 線源、線量率：~0.9 Gy/min) および低線量率ガンマ線照射装置 (¹³⁷Cs 線源、線量率：~1.388 mGy/min) を用いた。

3. イメージング解析：ガンマ線照射した細胞を 3.7% パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton X-100 で処理した後、anti-Parkin 抗体 (Abcam 社 1:500)、anti-Tom20 抗体 (Cell signaling 社、1:200)、anti-53BP1 抗体 (BD バイオサイエンス社、1:4000)、anti-γ-H2AX 抗体 (Merk Millipore 社)、anti-P53 (Santacruz 社、1:500) と anti-IgG-Alexa 蛍光標識抗体 (ThermoFisher Scientific 社、1:2000) を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342 (ThermoFisher Scientific 社) で蛍光標識し、全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix (PerkinElmer 社) で画像データを取得した。データ画像を画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer 社) を用いて、蛍光強度を指標に各解析を行った。また、データ解析には TIBCO SpotFire (PerkinElmer 社) を用いた。

4. Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) 解析：SASP の解析には、フロービーズアレイ解析 (LEGENDplex、BioLegend 社) を用いた。照射した培養細胞の培養液を交換し、24 時間培養した培養上清と各種分泌因子に対する抗体で標識されたフロービーズと反応させ、フローサイトメーター (FACS Canto、BD Bioscience 社) を用いて SASP 構成因子を定量解析した。

5. siRNA ライブラリーによる遺伝子スクリーニング：各遺伝子の機能によって分類された siRNA サブライブラリー (ThermoFisher Scientific 社) を、トランスフェクション試薬 RNAiMAX (ThermoFisher Scientific 社) を用いて 384-well plate に播種された細胞に導入し、24 時間培養した後、異なる条件でガンマ線持続照射処理と解析を行った。

(倫理面への配慮)

本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いての解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

1. 放射線によるミトコンドリア損傷の機構解明

異なる線量率のガンマ線照射に対するミトコンドリア損傷の定量解析を行うにあたり、384-well plate を用いた実験を行うための細胞播種、培養条件の検討を行い、各細胞での実験条件を決定した。図 III-1 に、培養液中の血清濃度を 10%（上段）又は 0.1%（下段）とし、同数の細胞を播種して 8 日間培養した場合の各線維芽細胞の蛍光免疫染色画像を示した。線維芽細胞の種類により、接触障害が生じる細胞密度が異なることが明らかとなった。異なる線量率で照射処理を行った細胞について、ミトコンドリア量の指標となる抗 Tom20 抗体とミトコンドリア損傷の指標である抗 Parkin 抗体で染色を行い、撮影した画像の解析結果の一部を図 III-2 および図 III-3 に示した。

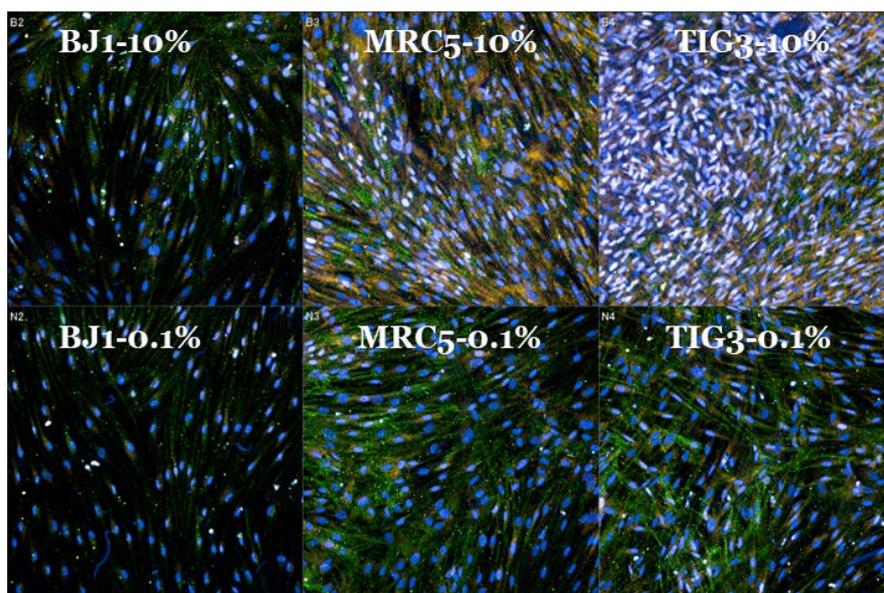


図 III-1. 各種ヒト由来線維芽細胞での Tom20 と Parkin の発現変化（細胞核：Hoechst33342 青、ミトコンドリア：Tom20 黄、ミトコンドリア損傷：Parkin 緑）

照射総線量 Ac=急照射(1Gy/min)、Ch=持続照射(1Gy/day)

①noIR ②Ac0.1Gy ③Ac2.5Gy ④Ac5.0Gy ⑤Ch0.1Gy ⑥Ch2.5Gy ⑦Ch5.0Gy

照射後からの培養時間 未照射0, 24, 72 h 照射0.5, 6, 24, 72 h

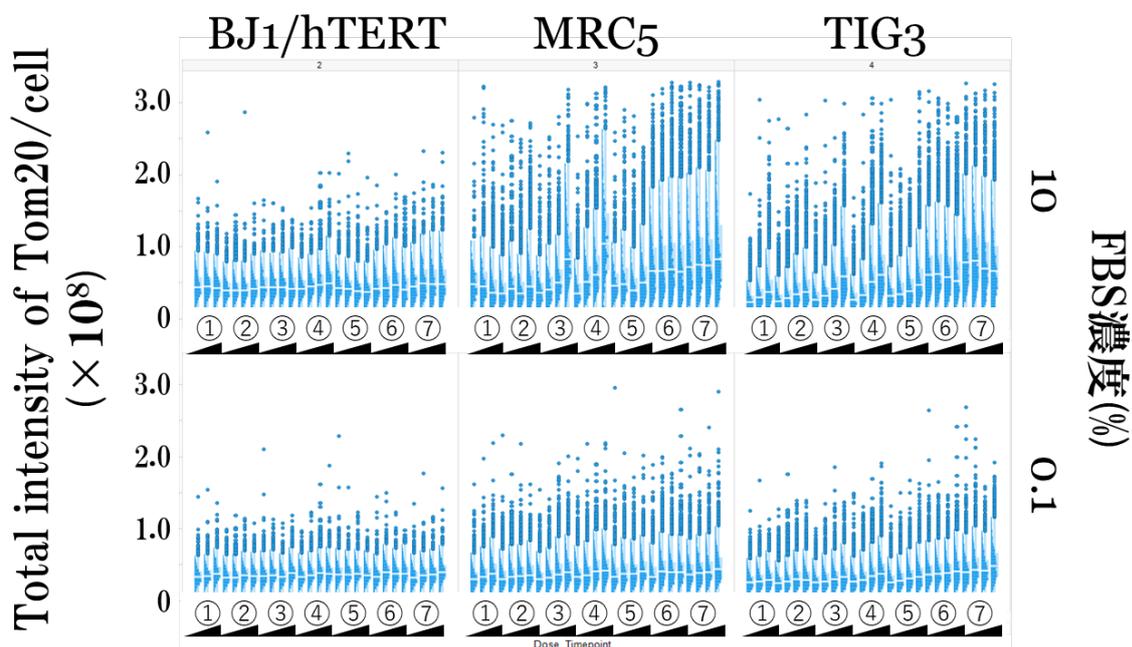


図 III-2. Tom20 の染色蛍光強度を指標とした異なる照射条件でのミトコンドリア量のボックスプロット (白線：中央値)

照射総線量 Ac=急照射(1Gy/min)、Ch=持続照射(1Gy/day)

①noIR ②Ac0.1Gy ③Ac2.5Gy ④Ac5.0Gy ⑤Ch0.1Gy ⑥Ch2.5Gy ⑦Ch5.0Gy

照射後からの培養時間 未照射0, 24, 72 h 照射0.5, 6, 24, 72 h

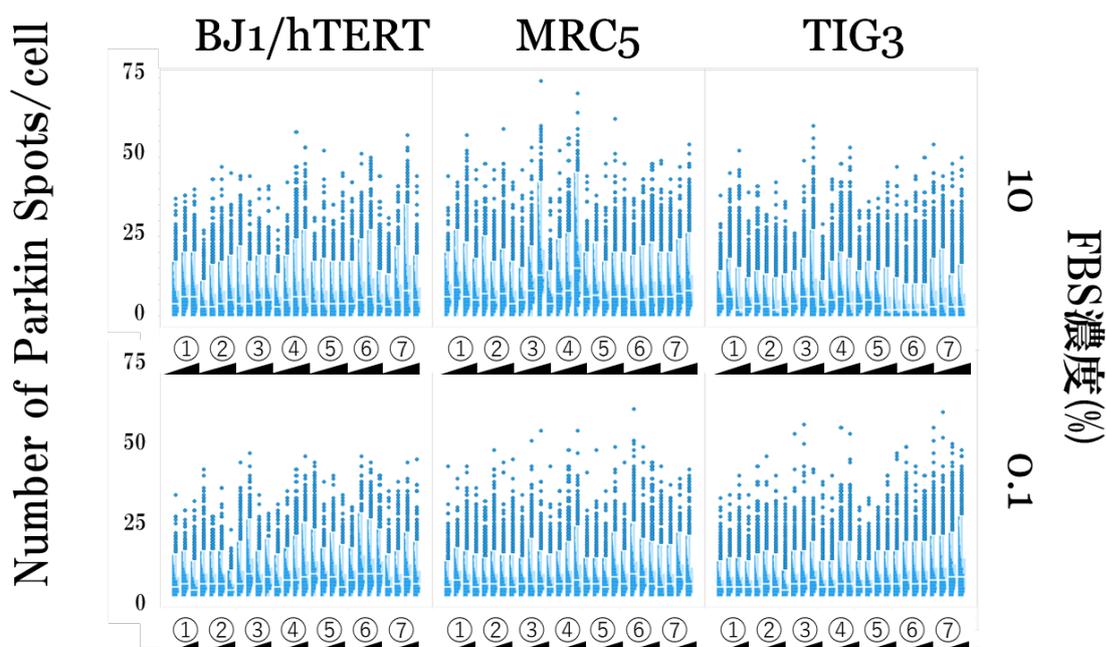


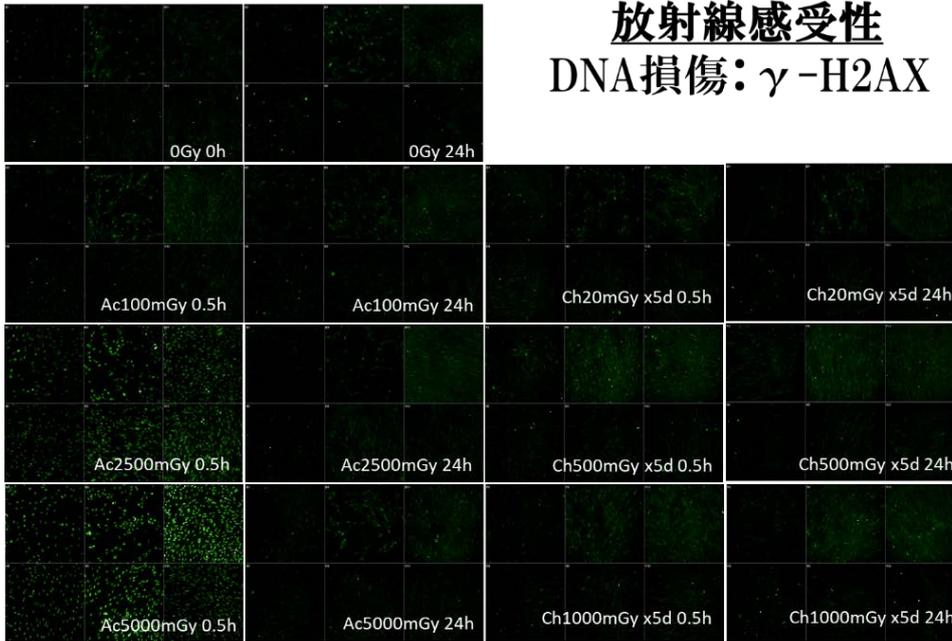
図 III-3. Parkin のスポット形成を指標とした異なる照射条件でのミトコンドリア損傷のボックスプロット (白線：中央値)

Tom20 の発現量の画像解析 (図 III-2.) の結果から、細胞による違いは見られるもののミトコンドリアの量が照射総線量に依存して増加することが明らかとなった。10%血清 (FBS) 含有培地で培養された細胞ではよりミトコンドリアが増加する傾向が認められた。また、急照射 (図中 Ac) された細胞よりも持続照射 (図中 Ch) された細胞に顕著な増加傾向がみられることから、ミトコンドリアは持続的な放射線照射に対して高感度に応答する、あるいは、影響を受ける可能性が示唆された。一方で、ミトコンドリア損傷の指標として解析を行った Parkin のスポット数は 10%血清含有培地で培養された細胞において、2.5 Gy 以上の急照射のみの高線量域で顕著な増加が確認された。培養条件で増加の傾向が変わることから、生体において全ての種類の細胞の放射線被曝の影響を解析する指標とするためには、細胞の選定と条件検討が重要であると考えられる。100 mGy の急照射、持続照射のいずれの場合でも未照射と比較して有意な差は検出されなかった (図 III-2.①、②)。

2. 放射線感受性を決定する因子の同定

放射線被曝による細胞運命に直接関与する DNA 損傷の修復機構と細胞応答機構に関して、照射条件 (線量-線量率効果) との関係性の解析を行った。III-1 と同様の照射培養条件で処理した各線維芽細胞において、放射線で生じる DNA 損傷とその修復効率に関しては DNA 損傷部位に集積してフォーカスを形成する γ -H2AX および 53BP1 の検出量の変化を指標として、また、放射線による細胞のストレス応答に関しては P53 の発現量の変化を指標として解析を行った。撮影した蛍光画像の一部を図 III-4 に、画像解析の結果の一部を図 III-5 に示した。 γ -H2AX を指標とした DNA 損傷の解析からは 2.5 Gy 以上のガンマ線急照射で細胞の種類や増殖に関わらず DNA 損傷は一過的に増加するものの、そのほとんどが 24 時間後には消失することが確認された。100 mGy の急照射においては微小かつ少数のフォーカス形成が確認された。また、持続照射では 500 mGy/day 以上で γ -H2AX 蛍光強度の増加が認められたが、急照射で同じ線量を照射した場合よりもその強度は低かった。しかし、照射後においてもその蛍光強度の減少は観察されず、DNA 損傷が持続して存在している可能性が示唆された。このことは、急照射と持続照射によって生成、残存する DNA 損傷の種類の違い、あるいは修復機構の違いの存在を示唆する。また、興味深いことに、P53 の発現量は、急照射よりも持続照射の方でより高い発現量が確認され、照射後も P53 の発現量が安定して増加し続けていることも明らかとなった。

放射線感受性 DNA損傷： γ -H2AX



放射線感受性 DNA損傷：P53

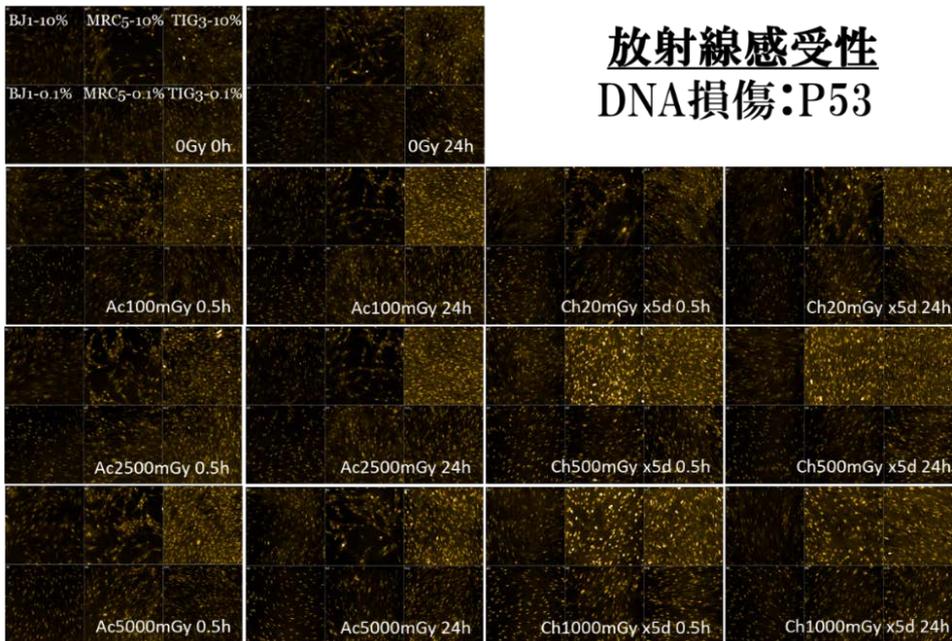


図 III-4. 各種ヒト由来線維芽細胞の DNA 損傷量とストレス応答。上) DNA 損傷フォーカス： γ -H2AX 緑、下) ストレス応答：P53 黄

53BP1 は、 γ -H2AX と同様に放射線照射による DNA 損傷を認識してフォーカス形成する。しかし、53BP1 の発現量の挙動は γ -H2AX とは異なり、照射条件によってその増減傾向が異なることが明らかとなった。53BP1 の細胞核内の蛍光強度は、急照射では γ -H2AX とほぼ同様の挙動傾向を示したが、持続照射においては、細胞の種類と血清濃度、照射条件に依存して挙動が全く異なった。100 mGy/day の照射条件では照射後から増加、500 mGy/day 以上の照射条件では照射終了後に減少した。53BP1 のこうした変化は低血清の培養条件ではほとんど認められなかったことから細胞周期に依存した挙動が反映されたものと考えられる。

照射総線量 Ac=急照射(1Gy/min)、Ch=持続照射(1Gy/day)
 ①noIR ②Ac0.1Gy ③Ac2.5Gy ④Ac5.0Gy ⑤Ch0.1Gy ⑥Ch2.5Gy ⑦Ch5.0Gy
 照射後からの培養時間 未照射0, 24, 72 h 照射0.5, 6, 24, 72 h

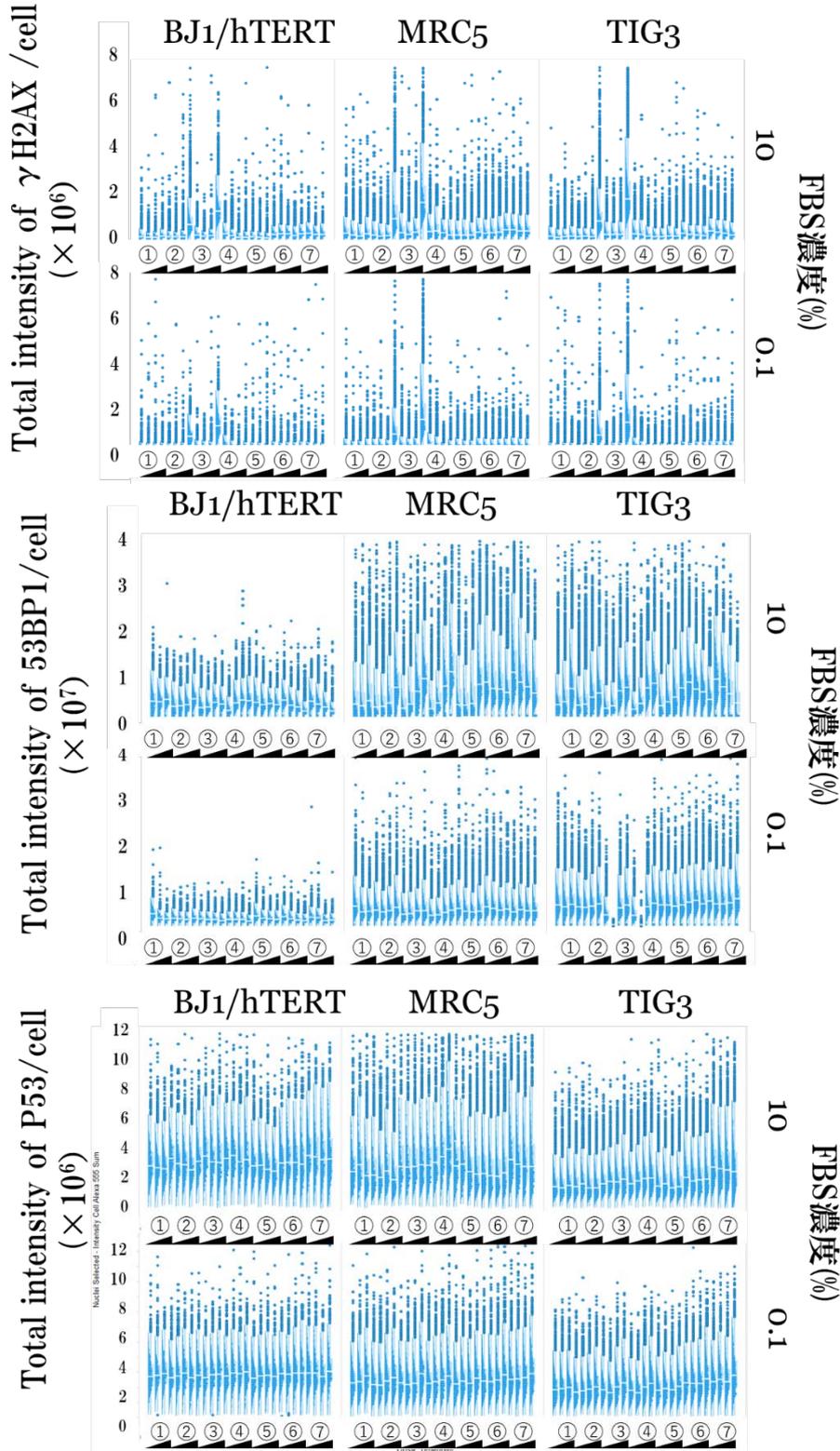


図 III-5. γ -H2AX、53BP1 を指標とした DNA 損傷量および P53 の発現量を指標としたストレス応答反応と照射線量—線量率との関係 (ボックスプロット、白線：中央値)

3. 放射線による細胞老化の分子機構の解明

これまでの研究から、線維芽細胞に対する持続照射が効率的に細胞老化を誘導することを明らかとしていた[1]。そこで、放射線照射によって生じる老化様増殖停止細胞から、線量や線量率依存的に分泌される液性因子、増殖因子、サイトカインの同定を試みた。検出には ELASA 法よりも、多検体の液性因子の同時定量解析が可能なフロービーズアレイ法を採用した。それぞれのデータは示さないが、TIG-3 細胞では、IGFBP-4、IL-6、Mip-3a が線量率に非依存的かつ線量依存的な増加が確認された。MRC-5 細胞では、TIG-3 細胞で検出された 3 種類に加えて、HGF、IL-8 の増加が観察された。一方、BJ1/hTERT 細胞においては、他の線維芽細胞とは異なり、IGBP-4 に加えて IGBP-6 の発現のみが検出され、サイトカインは検出されなかった。

IV. 考察

本分担研究では、異なる線量と線量率の放射線被曝に対する細胞への損傷と細胞の応答性を評価するため、間質細胞である線維芽細胞とハイスループット解析手法を用いて、ミトコンドリアとその損傷、DNA 損傷、細胞応答、SASP に関し、照射条件とそれぞれの因子の挙動との関係性について定量的な解析を試みた。その結果、細胞の種類や増殖状態に依存して、放射線被曝に対するそれぞれの因子の応答や影響が異なることが明らかとなった。また、急照射と持続照射とでは残存する DNA 損傷や細胞へのストレスとその応答性が異なる可能性も示唆された。特に、持続照射によって生じた影響や分子応答性は照射後も長く続く傾向がみられることが明らかとなった。このことは、異なる線量率の放射線被曝から生じる生物影響は、放射線による複合的な要素を考慮すべきであることを支持するものである。また、100 mGy 以下の線量では、本研究で用いた全ての指標において検出することが困難であった。

V. 結論

本研究で行った実験結果を表 V-1 にまとめた。ミトコンドリア、DNA 損傷、細胞応答、SASP の何れも異なる線量率の照射に対して異なった影響や挙動が検出され、それらの間には関連性は認められなかった。このことは放射線被曝による健康影響に対する線量-線量率効果は、複雑な複合的要素を含むことを示唆する。放射線被曝が細胞に与える影響には、細胞死、細胞老化、変異などがあり、それぞれが晩発性の健康影響に寄与するものであると考えられる。なかでも、放射線によるゲノム DNA の変異は、直接的に放射線発がんに関わる可能性が示唆される。そこで次年度から、異なる照射線量率での変異誘発機構に注目して、線量-線量率効果に関わる因子の同定を試みる。

表 V-1. 画像解析による各指標の変化のまとめ（矢印は時間経過に伴う量的変化を示す）

Ac/Ch (h)	Ac 0.1			Ac 2.5			Ac 5.0			Ch 0.1			Ch 2.5			Ch 5.0			
	0	0.5	6	0	0.5	6	0	0.5	6	0	0.5	6	0	0.5	6	0	0.5	6	
Tom20 Int.	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	Growth dependent
Parkin Spots	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	Cell line dependent
P53 Int.	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	Cell line dependent
γH2AX Int.	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	Stable Growth dependent
53BP1 Int.	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	Unstable? Should be considered

VI. 次年度以降の計画

放射線発がんの感受性は、個人レベル、或いは、同一個体内でも細胞レベルで異なる。放射線被曝した細胞がヘテロ接合体でがん抑制機能を有する遺伝子に変異を有する場合には、正常アレルの LOH が発がんに寄与することで、がん化率が上昇するものと考えられる。事実、がん抑制遺伝子 *TP53* のヘテロノックアウトマウスでは、放射線照射による発がん頻度の顕著な上昇と *TP53* 遺伝子の正常アレルでの LOH が検出される。放射線による正常アレルの遺伝子機能喪失には、放射線が直接的・間接的に誘発する点変異や欠失変異、あるいは転写抑制などが関与する。本研究課題の主任研究者・笹谷による WNT Signaling Pathway Regulator *APC* の *min/+* ヘテロマウスを用いた放射線誘発性小腸腫瘍の発がん実験の結果から、染色体組み換えを介した LOH では放射線被曝の線量率の影響が現れにくい可能性が示唆されている。DDREF の妥当性を検討するにあたっては、放射線による個別の生物学的影響への線量率効果の有無や寄与率と、それぞれに関与する分子機構を明らかにすることが重要である。そこで、本研究項目では放射線被曝による LOH と染色体組み換えに関与する遺伝子を siRNA スクリーニングによって同定を試みることで、放射線誘発 LOH に関わる遺伝的背景の解明につながるデータを得る。

業績

該当なし

引用文献

1. Cao L, Kawai H*, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F. A novel ATM/TP53/p21-mediated checkpoint only activated by chronic γ -irradiation. PLoS One 9(8):e104279, 2014.

用語説明

siRNA : 21-23 塩基対からなる二本鎖 RNA 断片であり、small interfering RNA と呼ばれる。細胞内に導入すると相補的な塩基配列を持つ mRNA を分解あるいは翻訳抑制することができ、特定の遺伝子の発現を抑制することができる。

DDREF : 線量・線量率効果係数 (dose and dose rate effectiveness factor; DDREF)。国際放射線防護委員会 (ICRP) によって、2 が用いられている。低線量率被曝の単位線量当たりの放射線によるリスクが高線量率被曝の値の 2 分の 1 であることを示す。

間質細胞 : 線維芽細胞や免疫細胞など上皮細胞の支持組織を構成する細胞の総称。

Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) : 細胞老化に伴って炎症などを引き起こすさまざまな分泌性タンパク質 (炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素、増殖因子など) が高発現する。この現象を細胞老化関連分泌現象 (Senescence-Associated Secretory Phenotype; SASP) と呼び、細胞老化の指標の一つであり、また、発がんの要因の一つでもある。

トランスフェクション : 動物細胞にプラスミドや siRNA などの核酸を導入する操作のこと。

サイトカイン : 細胞から分泌性の低分子タンパク質の総称。

ELISA 法 : 細胞培養の上清などの溶液中に含まれる目的の抗原を、特異抗体で補足し、酵素反応を利用して検出・定量する方法

フロービーズアレイ法 : 細胞培養の上清などの溶液中に含まれる複数の成分を、蛍光標識などを行った特異抗体結合ビーズで補足し、フローサイトメーターを用いて同時に検出・定量する方法。

ヘテロ接合体 : 遺伝子において、染色体の一方のみに変異があり、異なった対立遺伝子を持つもの。

TP53 遺伝子 : 転写因子 p53 の遺伝情報をコードする。遺伝子産物 TP53 は、細胞周期や DNA 修復、アポトーシスなどに関わる遺伝子を活性化することにより発がんを抑制する。ヒトにおいて最も重要ながん遺伝子の一つであり、半数のがんで変異や欠失が検出される。

点変異 : 1 塩基が別のヌクレオチド塩基に置換されて生じる変異。

Screening for molecular factors that have determining role for the dose-rate effect

Hidehiko Kawai

Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University,

Key word: Radiation-induced carcinogenesis, Chronic irradiation, Cellular senescence, siRNA screening

Abstract

Low dose and low dose-rate radiation-induced health effects are still unclear, and their underlying biological mechanisms need to be better understood. In order to address this issue, we have established at the Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, an experimental set-up where a Cs-137 source radiation facility can be operated at a wide range of dose rates (0.001~1.4 mGy/min for cell cultures, and 0.001~2.8 mGy/min for experimental animals). In our previous work, we have utilized this facility to conduct studies on the effects of chronic irradiation on various types of cultured cells, such as primary cells, tumor cell lines and iPS cells. Consequently, we have been able to single out several factors involved in cellular radiation responses and cell fate decisions triggered by low dose-rate gamma radiation .

In this study, in order to explore the potential relationship between radiation-induced carcinogenesis and radiation dose-rates, we are planning to conduct siRNA screening, which we expect will allow us to identify factors distinctively associated with gene mutations induced by different dose-rates of gamma-irradiation. This study is expected to make a significant contribution to understanding the mechanisms of radiation-induced carcinogenesis and biological effects of low dose and low dose-rate radiation exposure.

2-6-b 放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した 「線量・線量率効果係数」 DDREF=2 の妥当性の検討 (分担) 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

分担研究者 志村 勉 (国立保健医療科学院)

研究要旨

これまでの放射線発がん研究では、放射線の標的である DNA 上の特異的な変異 (放射線のシグナチャー) の同定を目的に研究が進められている。しかし、現在までに放射線発がんの機序解明には至っていない。我々は、放射線発がんにおけるがん細胞と周辺部の細胞の相互作用 (がんの微小環境) の役割に焦点を当てて解析した。がん組織に含まれる線維芽細胞はがん関連線維芽細胞 (Cancer Associated Fibroblasts: CAF) と呼ばれ、正常線維芽細胞とは異なり傍分泌により、周辺のがん細胞の増殖や浸潤を促進することが報告されている。我々のヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 TIG-3、MRC-5 を用いた解析から、一か月間の長期分割照射により活性酸素量が増加し、酸化ストレスを誘導することを明らかにした。過剰な活性酸素は細胞の増殖や分化に関与する TGFbeta シグナル経路を活性化して下流の平滑筋用アクチン (alpha-SMA) の発現を誘導し、線維芽細胞から CAF を形成することを報告した。さらに、ヌードマウスを用いたヒトがん移植片の解析により、放射線で誘発される CAF が放出する液性因子が、がん細胞の増殖を促進することを明らかにした (志村ら *Molecular cancer research* 2018; 16(11), 1676-1686)。以上より、放射線による酸化ストレスは、CAF の形成を介して放射線発がんに関与することが考えられる。本研究では、alpha-SMA の発現を指標として CAF が誘導される放射線の照射条件を検討した。活性酸素は、急性照射に比べ、分割照射ではより低い線量で発生し、CAF を誘導することを明らかにした。本研究のがんの微小環境の解析により、従来の方法では解析困難であった放射線によるがんの発症メカニズムの解明が期待される

キーワード

放射線発がん、微小環境、活性酸素、がん関連線維芽細胞

I. 研究目的

世界保健機構（WHO）や国連科学委員会（UNSCEAR）の福島原発事故に関する線量推計及び健康リスク評価では、一般公衆の被ばく線量は限定的で、放射線に関連する疾患の過剰発症は検出されないと報告されている。しかし、福島県のみならず全国においても低線量・低線量率の放射線を長期にわたり被ばくした場合に影響が蓄積されるのかどうかの高い不安の声があり、放射線の発がん影響の解明が必要とされている。生涯にわたる健康を見守ることを目的とした福島県県民健康調査の一環として、平成 23 年 3 月 11 日時点で 0 歳から 18 歳までの全県民 36 万人を対象とし、甲状腺の超音波検査を実施している。放射線により小児甲状腺がんが発症するまでには 4~5 年かかるといわれていることから、今後この調査でがんが検出された場合に、自然発がんなのかまたは、放射線被ばくが原因であるのかの判断を求められることが予想される。このため、放射線発がん機構の解明は早急の課題であり、放射線発がんの特異的な痕跡を明らかにする研究を推進する必要がある。

がん組織に含まれる線維芽細胞は、正常線維芽細胞とは異なり、がん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts:CAF)と呼ばれ、液性因子を放出してがん細胞の増殖を促進する[1, 2]。しかし、放射線発がんにおける CAF の役割は、十分に解っていないのが現状である。これまでのヒト正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 やヌードマウスを用いたヒトがん移植片の解析から、一か月間の長期分割照射により CAF を誘導することを報告した。さらに、放射線による CAF の誘導には、ミトコンドリア由来の活性酸素による TGFbeta シグナル経路の活性化が関与することを明らかにした[3]。本研究では、放射線で誘発される CAF の照射条件や、CAF 形成の分子機構を明らかにし、放射線発がんの原因となる標的分子を明らかにすることを目的とする。放射線は、水分子への作用やミトコンドリアのエネルギー産生の活性化を介して活性酸素を増加し、酸化ストレスを誘導する。ミトコンドリア酸化ストレスは、がんを含む様々な疾病に関与することから、放射線発がんにおけるミトコンドリア酸化ストレスの役割を解明することが重要であると考えられる。本申請研究の成果により、放射線発がんリスク評価の根拠となる科学的知見の蓄積が期待される。

II. 研究方法

1. 細胞と培養条件：ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 MRC-5 と TIG-3 は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入した。ヒト子宮頸部がん細胞 HeLa は、東北大学加齢医学研究所より入手した。細胞は、フラスコ内で、10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した培養液を用いて、37℃、5%CO₂の条件で培養した。

2. 照射条件：X線照射装置（日立、MBR-1505R2）または、γ線照射装置（ガンマセル 40 エグザクタ）を用いて、高線量率（0.7Gy/min）の急性照射と長期分割照射（1回当たり 0.01Gy または、0.05Gy の照射を週に 5 日間 1 か月間：累積線量 0.46Gy または、2.3Gy）を行った。低線量率の慢性照射は広島大学原爆医学研究所の放射性セシウム 137 を線源とするガンマ線照射装置を利用し、0.025Gy または、0.625Gy/day の線量率で 4 日間行い 累積線量 0.1Gy または、

2.5Gy の照射を行った。

3. alpha-SM の発現解析: 細胞を照射から 24 時間後に固定して、alpha-SMA の抗体(シグマ社)を用いて蛍光免疫染色を行い、陽性細胞を定量した。蛍光免疫染色したスライドグラス毎に、キーエンス社 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X700 で 100 個以上の細胞を観察し、alpha-SMA で染色される陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。また、CCD カメラで 1 つのスライドグラスに対して無作為に蛍光画像を 5 枚取得し、キーエンス社の解析ソフト Hybrid Cell Count software を用いて、画像解析を行った。しきい値を設定して染色される領域を決定し、同じ解析条件で全ての画像を自動で解析し、alpha-SMA の輝度を測定した。細胞核の染色から細胞数を求め、1 細胞当たりの alpha-SMA の輝度の総量を計測した。

4 統計処理: エラーバーは標準偏差を示す。全ての実験は、少なくとも 3 回以上の独立した試料を用いて繰り返し実験を行った。エクセル統計 2012 解析ソフトを用いて、一元配置 ANOVA 後に、Dunnett 法を用いて多重比較検定を行った。

(倫理面への配慮)

本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いての解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

1. alpha-SMA 染色量の数値化による発現量の解析

これまで alpha-SMA の発現誘導の解析は、alpha-SMA の抗体を用いて蛍光免疫染色をしたスライドを蛍光顕微鏡で観察し、目視により alpha-SMA で染色される陽性細胞を判断してその頻度を求めた。alpha-SMA で染色された細胞は、細胞質が大きく扁形を示す。染色パターンはファイバー状に明確に観察されることから、陽性細胞の判断は容易である。しかし、この方法では一度に多くの細胞を観察することは困難で、解析に時間がかかる。このため、蛍光画像を習得し、自動で一度に大量の細胞について画像解析ソフトを用いて輝度の数値化を行い、客観的な評価法の確立を試みた。図 III-1 の画像解析の一例を示す。alpha-SMA の蛍光強度から白抜きで表示される部分を選択し、その領域内の輝度を計測した。ヘキストの核染色で計測した細胞数から、1 細胞当たりの alpha-SMA の発現量を求めた。

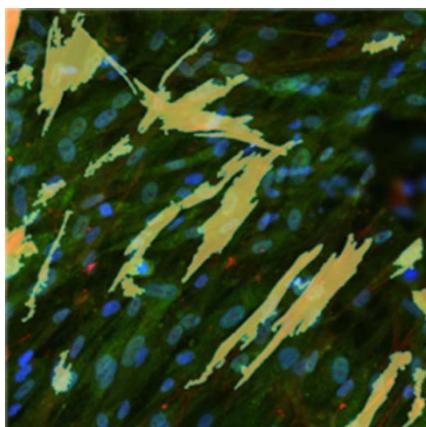


図1 Alpha-SMAの発現量の定量
Alpha-SMAで染色される部分を選択し、画像解析ソフトを用いて輝度を数値化した。

図 III-1 画像解析ソフトを用いた alpha-SMA の発現量の解析

2. X線照射による CAF の誘導

MRC-5、TIG-3 細胞に X 線の急性照射 (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10Gy) を行い、24 時間後に細胞を固定して被ばく線量と alpha-SMA 発現誘導の相関関係を検討した。図 III-2 の急性照射の結果を左図に示す。TIG 細胞では非照射コントロールと比べ統計的に有意に、5Gy 以上の照射で alpha-SMA の発現量が増加することを明らかにした。alpha-SMA の発現誘導は持続されず、照射から 7 日以降には消失した。MRC-5 細胞においても同様の結果で、5Gy 以上の X 線の急性照射 24 時間後に alpha-SMA の発現量が増加することを明らかにした。一方、1 か月間の長期分割照射では、MRC-5、TIG-3 細胞において、急性照射よりも低い累積線量 0.46 または、2.3Gy の照射で alpha-SMA で染色される CAF が誘導されることを明らかにした。

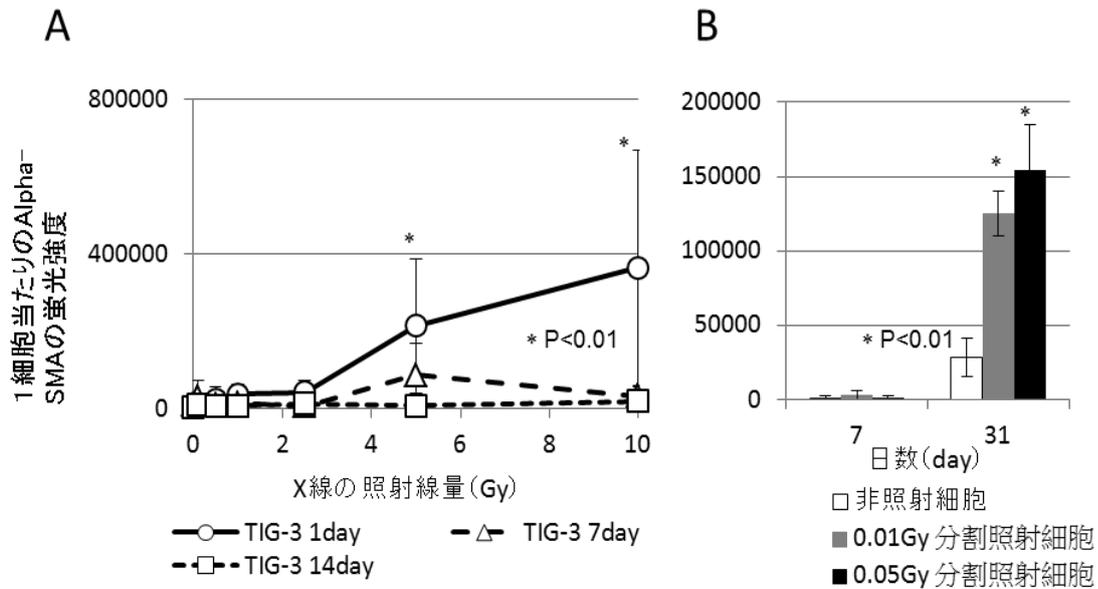


図 III-2 X線照射によるCAFの誘導

3. γ 線を用いた放射線誘発CAFの照射条件の検討

放射性セシウムを線源とする γ 線によるCAFの誘導を検討した。MRC-5、TIG-3細胞に2.5Gy以下の急性照射では、X線と同様にalpha-SMAの発現は誘導されなかった(図III-3)。一方、同じ2.5Gyでも γ 線慢性照射の場合は、照射24時間後にalpha-SMAで染色される細胞が観察され、CAFが誘導されることを明らかにした(図III-3)。この放射線誘発CAFは、照射7日後には観察されなかった。

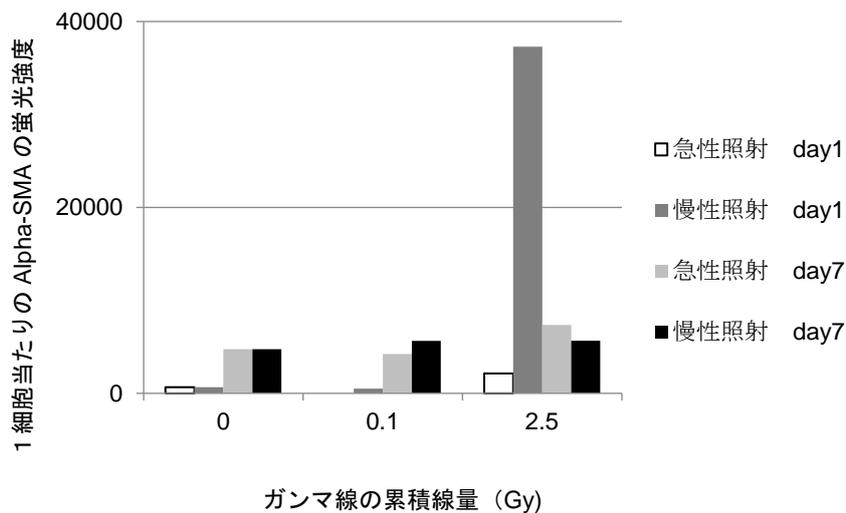


図 III-3 慢性照射によるCAFの誘導

IV. 考察

本研究では、放射線発がんに関わる放射線の影響を明らかにするため、がん細胞だけでなく、腫瘍組織の周辺部の細胞とがん細胞の相互作用に着目して結合組織を構成するヒト繊維芽細胞の放射線影響についての解析を行った。CAFの指標であるalpha-SMAの発現解析では、これまで蛍光顕微鏡観察で目視によるalpha-SMA陽性細胞の評価を行っていたが、より迅速な解析方法として、画像解析ソフトを用いた輝度の数値化による評価法を検討した。後者の画像解析ソフトを用いた解析は、一度に大量の細胞を自動で、短時間に解析が可能である利点を持つ。2つの方法のどちらにおいても、急性照射と長期分割照射でTIG-3とMRC-5細胞にalpha-SMAの発現が誘導され、正常繊維芽細胞からCAFが形成されることを明らかにした。CAFの誘導には活性酸素によるTGFbetaシグナル経路の活性化が必要で、活性酸素は、急性照射に比べ、分割照射ではより低い線量で誘導される[3, 4]。このため、急性照射ではCAFの誘導に5Gy以上の照射線量が必要であるが、分割照射や慢性照射では、より低い線量でCAFが誘導されることを明らかにした。放射線照射後、活性酸素は、放射線応答によるミトコンドリアのエネルギー産生の活性化により副産物として発生する[5]。以上の結果から、抗酸化剤は活性酸素を除去してCAFの形成を抑制し、放射線の晩発影響である発がんの発症を抑制することが期待される。実際に、細胞内の抗酸化物質グルタチオンを増加させるN-アセチルシステインは、放射線によるCAFの形成を抑制することを報告した[3]。また、茶葉に含まれるエピカテキンは、放射線によるミトコンドリア損傷を抑制し、酸化ストレスを抑える[6]。これらの抗酸化剤は、放射線発がんの抑制効果を持つことが期待される。

V. 結論

CAFの指標として用いられるalpha-SMAの発現量の解析により、急性照射と比べて分割照射や慢性照射ではより低い累積線量で細胞内の活性酸素量が増加し、CAFを誘導することを明らかにした。本研究は放射線発がん解析の新たな視点としてがんの微小環境に着目することで、従来の方法では解析困難であった放射線によるがんの発症メカニズムの解明が期待される。

VI. 次年度以降の計画

本年度明らかにした放射線誘発CAFの再現性の確認しCAFが誘導される放射線のしきい線量についての検討を進める。放射線応答に関わる分子と放射線CAFの関係や、細胞増殖が必要かなど、放射線誘発のメカニズムについての解析を進める。さらに、抗酸化剤を用いて、放射線誘発CAFを抑制し、発がんの防護効果を持つかどうかの検討を行う予定である。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

論文発表 該当なし

学会発表

1) 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、小林純也、小松賢志、樺田尚樹 放射線誘発がん関連線維芽細胞は、活性酸素による TGFβシグナリング経路の活性化を介してがんの増殖を促進する 第 61 回日本放射線影響学会, 2018. 11. p52.

VIII. 参考文献

- 1) Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2016; 16(9): 582-98.
- 2) Kalluri, R, Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(5): 392-401.
- 3) Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, et al. Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGFbeta Signaling. *Molecular cancer research : MCR*. 2018; 16(11): 1676-86.
- 4) Shimura, T, Sasatani, M, Kamiya, K, et al. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget*. 2016; 7(3): 3559-70.
- 5) Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, et al. ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle*. 2017.
- 6) Shimura, T, Koyama, M, Aono, D, et al. Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. *FASEB journal (in press)*. 2019: fj201802246RR.

Title Analysis of the role of the tumor microenvironment on radiation-induced carcinogenesis

Tsutomu Shimura

Affiliation1 Department of Environmental Health; National Institute of Public Health

Key word: Radiation-induced carcinogenesis, tumor microenvironment, ROS, Cancer-associated fibroblasts

Abstract

DNA is a major target for the detrimental biological effects of radiation. DNA mutations associated with radiation-related carcinogenesis, the so-called “radiation signature,” have been intensively investigated to elucidate the risk of radiation-induced cancer. However, radiation signatures remain a matter of debate in a variety of cancers because the development of cancer is a multistep process that occurs over long periods of time. Therefore, basic research on radiation-related carcinogenesis is indispensable for obtaining a rigorous body of scientific evidence on the estimated risk of cancer following ionizing radiation.

Fibroblasts are cells in connective tissue that contribute to the synthesis and deposition of extracellular matrix (ECM) to induce changes in the tissue microenvironment. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), which are related to myofibroblasts, are an activated form of fibroblasts in tumor tissues, are distinguishable from their normal counterparts. CAF control the release of paracrine signals that promote tumor growth and cancer cell aggressiveness, such as tumor angiogenesis, extracellular matrix remodeling, tumor proliferation, invasion, and metastasis. Expression of α -SMA characterizes fibroblast-to-myofibroblast differentiation. However, the role of tumor microenvironments in radiation-induced carcinogenesis is not well understood.

We here investigated the association between oxidative stress and the formation of tumor microenvironments during the development of radiation-related tumors. Alterations in stromal cells can contribute to radiation-related tumors. Radiation affects malignant cancer cells directly and indirectly via the tumor stroma.

2-6-c 放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した 「線量・線量率効果係数」DDREF=2の妥当性の検討 (分担) 放射線感受性の個人差の課題の検討

分担研究者 小林純也 (京都大学大学院生命科学研究科)

研究要旨

放射線は、DNA 損傷と活性酸素種 (reactive oxidative species: ROS) 蓄積による酸化ストレスをともに誘発し、高線量照射ではゲノム DNA への損傷の誘発が放射線細胞影響の多くを占めると考えられる。一方、低線量 (率) 放射線ではこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかでない。本研究では、放射線障害・影響が蓄積されると考えられるヒトの放射線高感受性特定遺伝子欠損細胞を用いて、低線量 (率) 放射線影響を高感度に検出する実験系を確立することを目的としている。今年度の研究ではこのような高感度検出系の指標の候補として、ミトコンドリア動態、ミトコンドリア性 ROS 蓄積とともに、従来指標である微小核形成について、低線量率及び高線量率ガンマ線照射に対する応答・変化を検討した。ミトコンドリア染色色素ミトラッカーを用いた検討では高線量率照射では AT (ataxia telangiectasia : 毛細血管拡張性運動失調症) 患者細胞、NBS (Nijmegen breakage syndrome : ナイミーヘン症候群) 患者細胞、正常人細胞で照射 24 時間後に同程度のミトコンドリア異常が検出されたが、低線量率照射では NBS 細胞で照射終了 6 時間後から同様の形態異常が検出された。MitoSox (ミトコンドリア性 ROS 染色試薬) を用いたミトコンドリア性 ROS 蓄積の検討では、細胞核への ROS 蓄積が指標として利用しうると示唆された。さらに、ATM キナーゼ (AT 原因遺伝子由来タンパク質リン酸化酵素) 阻害剤を用いて AT 患者と同様な放射線障害蓄積条件で微小核形成を検討すると、低線量率照射でのみ、 γ H2AX (放射線誘発 DNA 二本鎖切断損傷発生時にリン酸化されるヒストンの一種 : 放射線誘発 DNA 損傷のマーカーとして使用されている) 陽性微小核が顕著に増加していた。これらの結果から、ミトコンドリア形態異常および γ H2AX 陽性微小核の頻度検定は低線量・低線量率放射線影響の高感度検出系確率の候補指標となりうることが明らかとなった。

キーワード

活性酸素、酸化ストレス、ミトコンドリア、放射線高感受性、ATM

I. 研究目的

医療被ばく、職業被ばく、原発事故では、低線量放射線による放射線の晩発性の身体的影響である発がんが懸念されている。しかし、低線量・低線量率の放射線影響については未解明な部分が多く、その評価の元となるデータ自体が乏しいのが現状である。放射線は DNA 損傷と ROS 蓄積による酸化ストレスをともに誘発するが、低線量（率）放射線生体影響におけるこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかでない。本研究では、放射線高感受性のヒト特定遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線影響が蓄積される条件化で、低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系を確立する。影響評価の指標としては、細胞内での ROS の最大発生源であるミトコンドリアを対象とし、従来指標である微小核形成とも比較することにより、DDREF=2 の妥当性を再評価できる放射線影響評価法を確立する。さらに、酸化ストレスによるミトコンドリア機能異常の放射線発がんへの寄与についても明らかにすることを目的とする。

本年度研究では、*ATM (ataxia telangiectasia mutated)*あるいは *NBS1(Nijmegen breakage syndrome 1)* 遺伝子が欠損した放射線高感受性遺伝病患者由来細胞を用いて、放射線照射後のミトコンドリア動態およびミトコンドリア性 ROS の蓄積を検討し、低線量率放射線影響を特異的に検出可能な条件の探索を行う。さらに、*ATM* 欠損患者細胞と同様な細胞状態を再現できる *ATM* キナーゼ阻害剤や放射線影響の従来指標である微小核形成についても合わせて検討し、低線量率放射線影響の解析に適した指標・解析手法の候補を明らかにする。

II. 研究方法

1. 細胞と培養条件

ヒト毛細血管拡張性運動失調症 (AT) 患者由来皮膚細胞を SV40 ウイルスで不死化した *ATM* 欠損細胞(AT5VIBA)および *ATM* cDNA 導入相補した細胞(AT5VIBA/*ATM*-wt)、ナイミーヘン症候群 (NBS) 患者由来 *NBS1* 欠損細胞 (GM7166 : 同様に SV40 で不死化) と *NBS1* cDNA 導入した相補細胞 (GM7166/*NBS1*-wt)、及び正常人由来繊維芽細胞 48BR (テロメラーゼ [染色体テロメア末端合成酵素] を導入して不死化した細胞) は、100 mm プラスティックディッシュ内で 10%ウシ胎児血清 (ギブコ) と抗生物質を添加した培養液 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; ギブコ) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した^{1,2)}。

2. ガンマ線照射

細胞へのガンマ線の高線量率急照射は Gammacell 40Ex (MDS Nordion 社 : 線量率 0.9 Gy/min) を用いて室温で行った。低線量率緩照射は低線量長期放射線照射装置 (産業科学:線量率 1 Gy/day) を用いて、CO₂ インキュベーター内に細胞を播種したディッシュを静置して行った。両方の装置とも照射線源は ¹³⁷Cs であり、累積線量は 2.5 Gy として行った。

3. ミトトラッカー染色法（ミトコンドリアの可視化）

100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス（マツナミ）上に 1.0×10^5 個の細胞を播種し、インキュベーター内で 8 時間培養した後に低線量率照射を開始した（高線量率照射は播種 73 時間後に行った）。照射終了後、インキュベーターで培養を 5 時間 30 分あるいは 23 時間 30 分続けた後、MitoTracker Green FM (Thermo Fisher) あるいは MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher) 溶液を細胞培地で 500 倍に希釈されるように添加し、インキュベーター内で 30 分間静置した。スライドガラスは冷 PBS（phosphate buffer saline：リン酸緩衝液）で洗浄し、冷メタノールに浸して氷上で 20 分間固定した後、冷 PBS で洗浄を行い、核酸染色試薬（DAPI）入りの封入剤（VECTASTAIN: Vector）を滴下し、封入後に蛍光顕微鏡（ライカ社）で観察し、画像データを取得した。

4. MitoSOX 染色法（ミトコンドリア性 ROS の検出）

チャンバースライド（4well, Nunc）にウェルあたり 10^5 個の細胞を播種し、インキュベーター内で上記 3 と同じ時間培養してから、ガンマ線照射を行った。照射終了後、インキュベーターで培養を 23 時間 30 分続けた後、MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator (Thermo Fisher) を細胞培地で 1000 倍に希釈されるように添加し、インキュベーター内で 10 分間静置した。スライドガラスは PBS で洗浄した後、ヘキスト $10 \mu\text{g/ml}$ 33343（和光）/PBS を滴下して封入し、蛍光顕微鏡（ライカ社）で観察し、画像データを取得した。

5. 免疫蛍光染色法

100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス（マツナミ）上に 1.0×10^5 個の細胞を播種し、インキュベーター内で上記 3 と同じ時間培養してから、ガンマ線照射を行った（ATM 阻害剤添加群は同時に阻害剤 [$10 \mu\text{M}$] を添加した）。細胞固定の 30 分前（照射終了 6 時間後）に MitoTracker Red を $5 \mu\text{l}$ 添加して、インキュベーター内で静置した。スライドガラスは冷 PBS で洗浄し、冷メタノールに浸し氷温で 20 分間固定、さらに冷 PBS で洗浄後、0.5% Triton X-100（界面活性剤の一種）/PBS に浸し氷上で 10 分処理を行い、冷 PBS で洗浄した。続いて、5% BSA (bovine serum albumin) /PBS に室温で 20 分間反応させ、PBS で一度洗浄後、PBS で 1000 倍に希釈した抗 γH2AX 抗体（ミリポア）に 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1.0% BSA / PBS で 1000 倍に希釈した二次抗体（Alexa488 標識 mouse IgG 抗体：Molecular Probe）溶液に 1 時間反応させた。PBS 洗浄後、DAPI 入りの封入剤を滴下し、カバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡（ライカ社）で観察し、画像データを取得した。

（倫理面への配慮）

本申請研究では基礎研究目的として樹立され、学術雑誌^{1,2)}に報告済みのヒト培養細胞のみを用いるため、倫理委員会の審査は必要としない。また、本分担研究では動物実験を行う予定は無い。

III. 研究結果

1. 放射線被ばくによるミトコンドリア形態への影響

① ヒト正常 48BR 細胞を用いたミトトラッカー染色の検討

ミトコンドリアを可視化してその形態・動態への放射線影響を検討するために、ミトコンドリア特異的に染色するミトトラッカー染色色素を用いることとしたが、緑色や赤色の蛍光を呈する複数の色素が知られ、それぞれの性質が異なることから、酸化ストレス応答・ミトコンドリア関連因子との二重染色への適応も考え、MitoTracker Green 及び MitoTracker Red について検討を行った。対数増殖期にある 48BR 細胞の培地中にこれら色素を同時に添加して 30 分間染色すると細胞質に分布するミトコンドリアが緑と赤の色素でほぼ同様な形態に染色され、大きなミトコンドリアでは内部構造まで鮮明に確認できた。また、これらの染色は DAPI による細胞核の青色の染色領域とは一致していなかった (図 III-1)。このことから、どちらの色素を用いても、ミトコンドリアを正常な形態に染色できることが確認できた。

次に 48BR 細胞を低線量率あるいは高線量率でガンマ線照射した直後に MitoTracker Green を添加し、30 分後に固定して観察した (図 III-2)。非照射条件ではほとんどの細胞でミトコンドリアの多くが鎖状に連結して、2 極の方向に広がっており、高線量率照射後もほぼ同じ形態を示した。一方、低線量率照射後はミトコンドリアの鎖状構造は短くなっており、多方向にそれらの鎖が広がっていた。これらの結果から、ミトトラッカー染色により、高線量率と低線量率照射でのミトコンドリアの反応性の差異を検出できることが明らかとなった。



図 III-1 48BR 細胞のミトトラッカー染色像

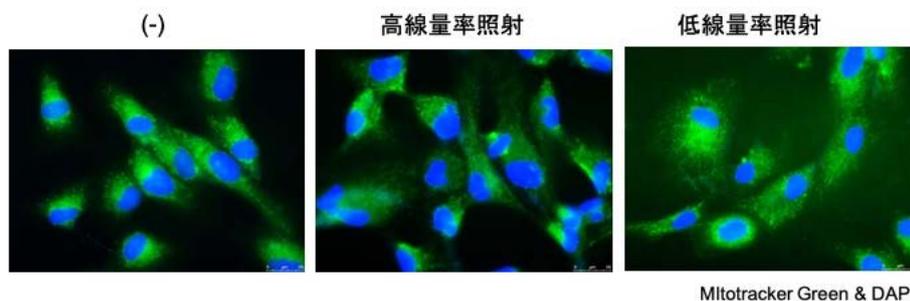


図 III-2 ガンマ線照射後の 48BR 細胞におけるミトコンドリアの細胞内分布

② 放射線高感受性患者細胞を用いた検討

次に、ATM あるいは NBS1 遺伝子が欠損した放射線高感受性遺伝病患者由来細胞及び相補細胞 (正常細胞) を用いて、低線量率及び高線量率でガンマ線照射し、照射終了から 6 時間及び 24 時間経過した後、MitoTracker Green で染色し、ミトコンドリア形態について検討を行った (図 III-3)。ガンマ線非照射の場合、正常細胞及び患者由来細胞 (NBS および AT 細胞) は 48BR 細

胞と同様に、ミトコンドリアが鎖状で連結して、2極の方向に広がった分布を示す細胞がほとんどであった。高線量率照射を行った場合は、24時間後にミトコンドリア鎖が顕著な伸張を示すものや、多方向にミトコンドリア鎖が広がる異常形態を示す細胞（図内で黄色で丸く囲んだ細胞）が出現したが、正常細胞と NBS, AT 細胞の間で頻度の差は認められなかった。一方、低線量率照射を行った場合は、細胞核・細胞質ともに肥大化した細胞老化様の形態を示す細胞（図内で黄色で丸く囲んだ細胞）が出現し、これら細胞はミトコンドリア鎖の伸張に異常形態を示した。とくに NBS 細胞では照射終了の 6 時間後からこのような異常形態を示す細胞が出現した。この結果から、NBS 細胞では低線量率放射線影響を特異的に検出できる可能性が考えられる。

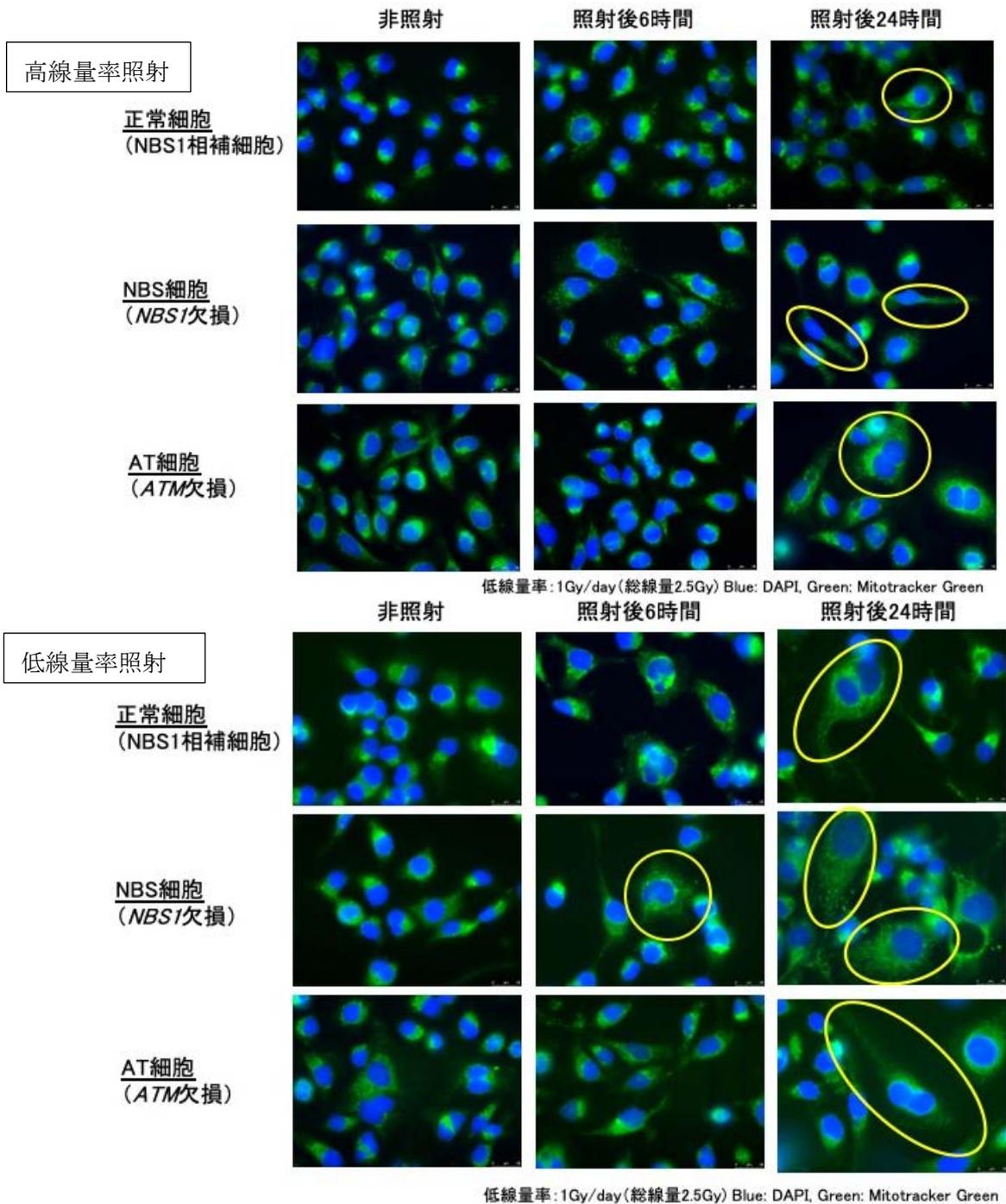


図 III-3 放射線高感受性細胞におけるガンマ線照射によるミトコンドリアの変化

2. 放射線被ばくによるミトコンドリア性 ROS の蓄積

図 III-2,3 から、放射線被ばくはミトコンドリア形態に異常を誘発しうることが示されたことから、このような異常ミトコンドリアからは ROS が漏洩している可能性が考えられる。このようなミトコンドリア性 ROS (スーパーオキシド) の漏洩が放射線影響の検出指標になるかを、検討した。非照射細胞では正常相補細胞および患者細胞とともに、細胞質が MitoSOX 色素により赤く染色され、スーパーオキシドが細胞質全体に広がっていた (図 III-4 内、黄色で丸く囲んだ細胞と同様な染色)。一方で、低線量率ガンマ線照射 24 時間後の細胞では核にも赤い染色が広がった細胞 (緑色で丸く囲んだ細胞) が出現した。正常細胞と患者細胞でこのような核染色される細胞の出現頻度に差があるかは本実験では明確でないので、放射線影響を検討するための指標として、さらなる検討が必要と考えられる。

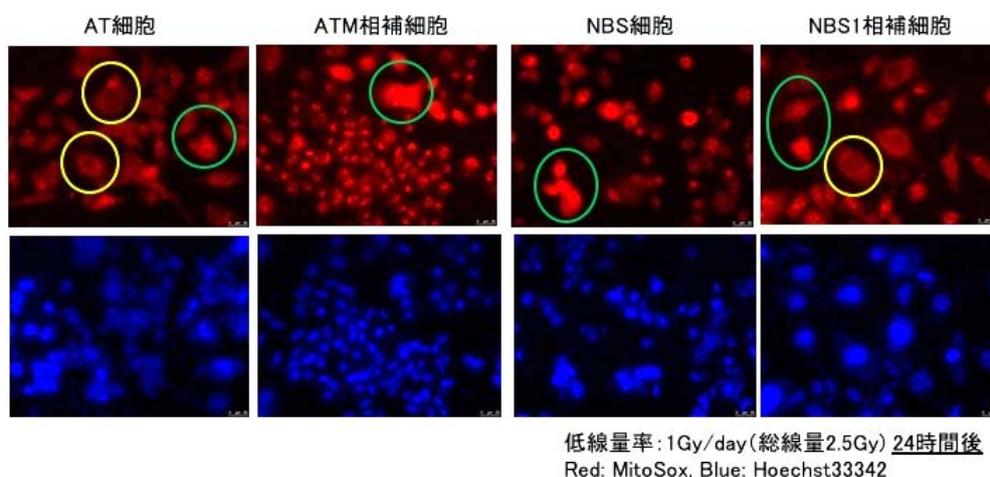


図 III-4 低線量率ガンマ線照射によるミトコンドリア性 ROS の蓄積

3. ATM キナーゼ阻害条件での微小核形成の検討

放射線影響の指標として従来から微小核検定が知られており、放射線以外にも活性酸素や他のゲノムストレスとなる様々な変異原物質についての影響評価の指標として用いられてきている³⁾。放射線では高線量急照射での適用性は知られるが、放射線高感受性細胞で放射線影響を蓄積させることにより、低線量領域まで、放射線影響を検出できる可能性がある。一方、これまでの解析に用いた患者細胞は SV40 ウイルスによるトランスフォームでゲノム不安定性を内在しており、非照射時でも微小核形成頻度が高い可能性があるため、ヒト正常 48BR 細胞で KU55933 (シグマ) で ATM キナーゼを阻害して AT 患者細胞と同等の状態として、微小核形成頻度を検討することとした。微小核形成は DAPI 染色により細胞質に存在が検出できるが、このような微小核において DNA 二本鎖切断損傷のマーカである γ H2AX に対する特異的抗体を用いて、DNA 二本鎖切断損傷の蓄積の有無を免疫蛍光染色法で検討した (図 III-5)。

非照射細胞では ATM キナーゼを阻害しなかった場合、微小核は検出されなかったが、阻害剤添加により微小核 (黄色の矢印) を形成した細胞が出現した。この微小核には γ H2AX も局在しており、DNA 二本鎖切断損傷を含むことが示唆された。このような γ H2AX 陽性微小核は高線量率照射では ATM 阻害剤の有無にかかわらず、出現頻度は低かった。一方、低線量率照射後では、ATM 阻害剤未添加では γ H2AX 陽性微小核の形成頻度は同様に低かったが、ATM 阻害剤を添加

した場合には、顕著に γ H2AX 陽性微小核が出現するとともに、 γ H2AX を伴わない微小核（緑色の矢印）を持つ細胞も少数出現した。ATM 阻害剤添加群では、 γ H2AX 陽性微小核の発生頻度は、非照射 5.00%、高線量率照射 11.8%、低線量率照射 43.8%であったことから、ヒト正常細胞に ATM 阻害剤処理を組み合わせることで微小核形成を検討することにより、低線量（率）放射線影響を高感度に検出できる可能性が示唆された。

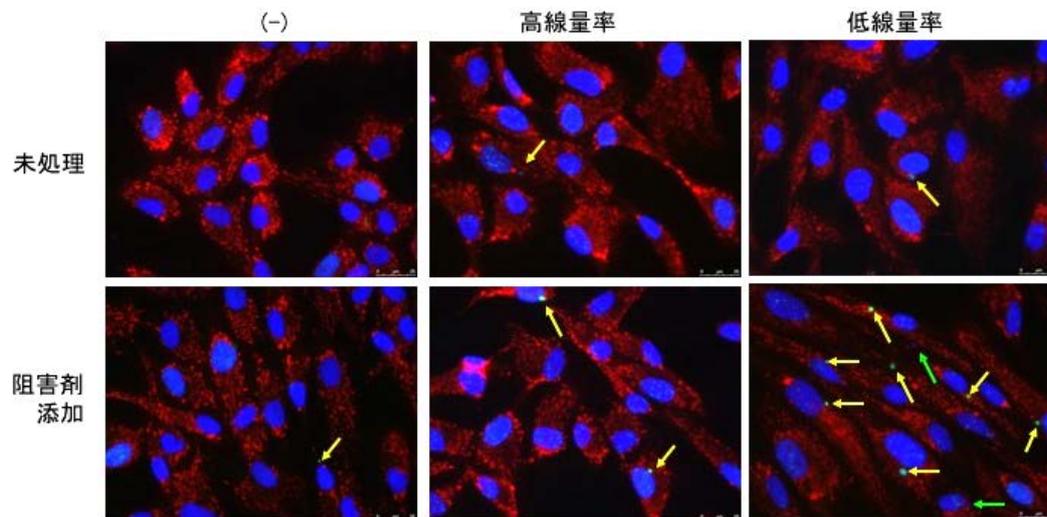


図 III-5 放射線誘発微小核形成に対する ATM キナーゼ阻害の効果

赤色：MitoTracker Red、青色：DAPI（核・微小核を染色）、
 緑色（青色と重なるため、図中の染色は明瞭でない）： γ H2AX（青色と重なるため）

IV. 考察

本研究では、放射線高感受性を示すヒト特定遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線障害が蓄積される条件化で、ROS の最大の発生源であるミトコンドリアを主な指標対象として、DDREF=2 の妥当性の再評価に利用できる低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系の確立をめざし、本年度研究では放射線高感受性遺伝病患者由来細胞および ATM キナーゼ阻害条件下で、ミトコンドリア形態、ミトコンドリア性 ROS 蓄積、微小核形成について、低線量率放射線影響を特異的に検出可能か、検討を行った。これまで高線量（率）放射線照射ではミトコンドリア異常と相関してミトコンドリア性 ROS が蓄積することが知られていた⁴⁾。ミトコンドリアが連結した鎖構造体が高線量率照射では正常細胞と患者細胞で同頻度に異常形態に変化することが見出された一方で、低線量率照射時では NBS 細胞でのみ照射終了 6 時間後から、異常ミトコンドリア鎖構造体が出現していた（図 III-3）。このことは NBS1 遺伝子欠損で引き起こされる放射線障害蓄積下で、ミトコンドリア形態変化を指標にして、低線量・低線量率放射線影響を高感度で検出できる可能性を示唆した。一方、ミトコンドリア性 ROS は過剰蓄積による核内へ流入した顕微鏡像が観察されたが（図 III-4）、正常人細胞と比べ患者細胞で高感度に検出可能かは、さらなる検討が必要だと考えられる。

微小核形成は放射線をはじめとする様々なゲノムストレスの影響を評価する指標として使われてきているが、これまで低線量（率）域放射線に対しての利用の可能性は示されてはいなかった³⁾。ATM キナーゼは放射線曝露で DNA 損傷が誘発された場合だけでなく、過酸化水素などの酸化ストレス誘発時でも活性化されることが明らかとなっている⁵⁾。ATM キナーゼ阻害剤を用いて微小核形成を検討すると、低線量率放射線照射時にのみ、 γ H2AX 陽性微小核が増加していたが（図 III-5）、この時、酸化ストレス応答が阻害剤未添加時よりも増強されていることが、ウェスタンブロット法で明らかとなった（データ未掲載）。これらの結果から、ATM 阻害剤により ATM の酸化ストレス対抗機能が抑止され、放射線誘発 ROS が過剰に細胞内に蓄積され、微小核の出現頻度を上昇させたことが考えられる（図 IV-1）。低線量率放射線曝露時には酸化ストレスの放射線影響への占める割合が高くなっていると考えられることから、このような ATM キナーゼ阻害条件下での微小核形成率測定は、低線量率放射線影響の高感度検出系開発に利用できる可能性が考えられる。

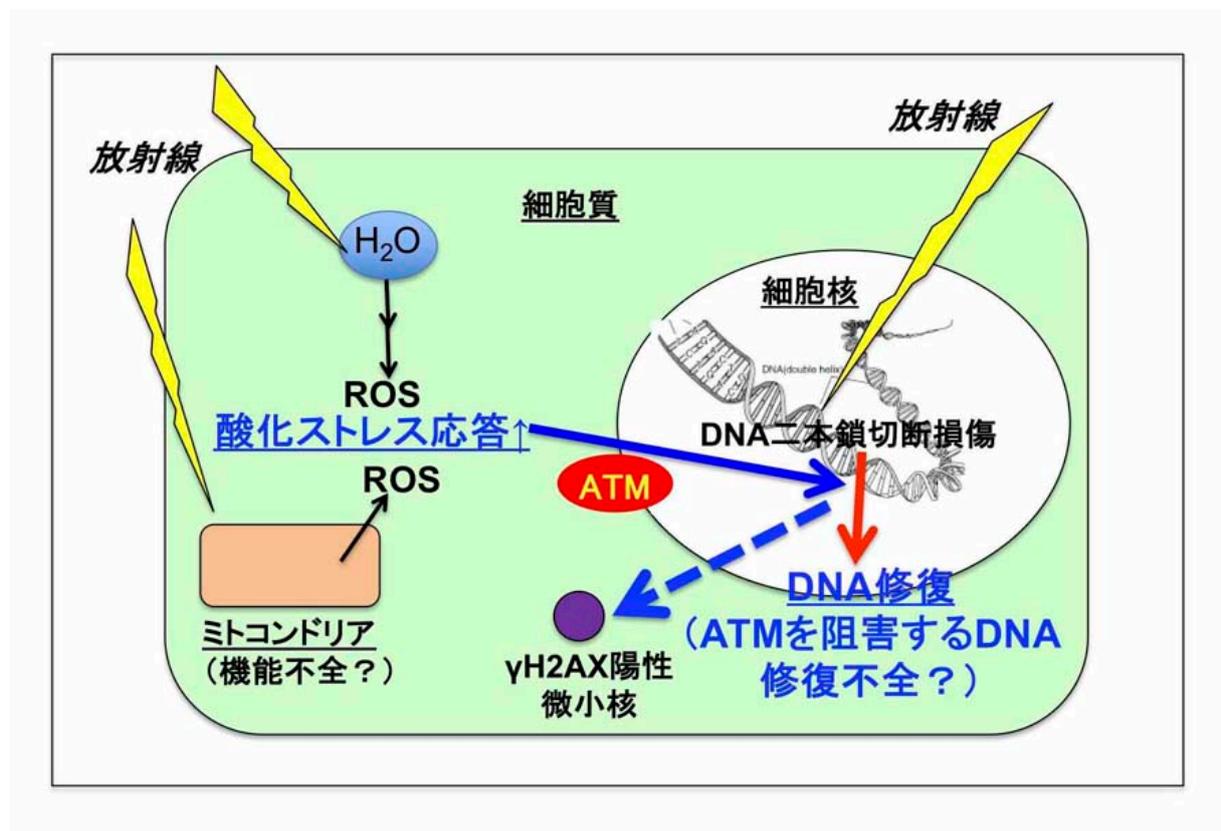


図 IV-1 微小核形成に対する ATM キナーゼの抑制効果

低線量率放射線曝露で酸化ストレスが発生しても、ATM キナーゼの機能で細胞核内のゲノム DNA の修復への影響は防がれる。一方、特異的阻害剤で ATM キナーゼ活性が抑制されると酸化ストレスが細胞核へ伝搬して DNA 修復を妨げて、DNA 二本鎖切断損傷を含む微小核 (γ H2AX 陽性) が形成され。細胞分裂を経て、細胞質へ放出される。

V. 結論

NBS1 遺伝子欠損した *NBS* 患者細胞におけるミトコンドリア形態変化、および *ATM* キナーゼ活性阻害したヒト正常細胞での微小核形成は、低線量・低線量率放射線影響の高感度検出系の開発のための有用な指標となる可能性が示唆された。今後は、広範囲な線量域でのこれら応答性の検討が、高感度検出系の確立に重要だと考えられる。

VI. 次年度以降の計画

今年度、低線量率放射線影響の高感度検出の可能性が示唆された核肥大化を伴うミトコンドリア形態異常を示す細胞を指標とし、*NBS* 細胞を用いたミトトラッカー染色法で、線量率を複数設定して線量率効果について検討を行う。ミトコンドリア性活性酸素の核蓄積も利用しうる可能性が考えられるので、*MitoSOX* 染色法で患者細胞を主に用いて、線量率特異的な差異が認められるかを検討する。*ATM* 阻害剤添加条件でのヒト正常細胞における γ -*H2AX* 陽性微小核形成は、低線量・低線量率放射線影響を検出する有用な指標と考えられるので、線量率を複数設定して線量率効果について検討を行う。さらに、*DNA* やタンパク質の酸化、損傷ミトコンドリアの除去反応（ミトファジー）など、低線量率放射線影響の高感度検出に利用しうる指標が他にあるかについても、引き続き探索を行う。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり 該当なし

B. 論文：査読なし 該当なし

C. 学内学会発表

1) Kobayashi J, Kawamura K, Qi F, Meng Q, Komatsu K. Relationship between endogenous ROS accumulation and mitochondria responses under low dose rate irradiation. The 3rd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science. Fukushima. Jan. 13-14, 2019

2) Meng Qingmei, Qi Fei、河村香寿美、小林純也. 低線量率照射による *DNA* 損傷と酸化ストレス応答因子. 日本放射線影響学会 61 回大会. 長崎. Nov. 7-9. 2018.

D. 国際学会発表 該当なし

E. 著書

1) Kobayashi J. Ataxia-Telangiectasia and Nijmegen Breakage Syndrome. *DNA Repair Disorders* (Editors: Nishigori C & Sugawara K)の p191-p201 を執筆担当. Springer (Berline), 2019.

F. 講演

1) 小林純也. 低線量(率)放射線誘発細胞応答におけるタンパク質マーカーの探索. NIFS 一般共同研究研究会「大型ヘリカル装置の初期 DD 実験における水素同位体挙動と安全

管理」. 土岐. Aug. 3-4. 2018.

2) 小林純也. 低線量率放射線照射による ROS 産生とミトコンドリア影響との関係. 若手放射線生物学研究会・平成 30 年度専門研究会. 相模原. Sep. 1-2. 2018.

G. 主催した研究集会 該当なし

H. 特許出願・取得 該当なし

I. その他 w 該当なし

VIII. 参考文献

- 1) Sakamoto S Iijima K Mochizuki D, et al. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene* 2007; 26: 6002-6009.
- 2) Zhou H Kawamura K Yanagihara H, et al. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms; ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50 and cell cycle dependent-degradation of protein. *J Radiat Res* 2017; 58: 487-494.
- 3) Vral A Fenech M Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionizing radiation exposure. *Mutagenesis* 2011; 26:11-17.
- 4) Kawamura K Qi F Kobayashi J. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. *J Radiat Res* 2018; 59 (suppl_2): ii91-ii97.
- 5) Guo Z Kozlov S Lavin MF, et al. ATM activation by oxidative stress. *Science* 2010; 330: 517-521.

Relationship between radiosensitivity and genetic individual difference

Junya Kobayashin

Radiation Biology Center, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Key word: ROS, oxidative Stress, mitochondria, radiosensitivity, ATM

Abstract

Exposure to ionizing radiation causes both DNA damage and oxidative stress induced by excess accumulation of ROS (reactive oxidative species). In the case of acute radiation, the biological effects of radiation are most induced by generation of genomic DNA damage, while it is unknown about the contribution between DNA damage and oxidative stress to the biological effects by low dose (rate) radiation. In this project, we attempt to develop hypersensitive detection system of the effect by low dose (rate) radiation using radiation hypersensitive genetic disorders. And, we investigated whether mitochondria morphology, mitochondrial ROS and micronucleus are useful to develop such systems in this year. Mitochondria staining showed that high dose rate irradiation by gamma-ray caused mitochondria morphology changes at same level between normal and patient cells, while low dose rate irradiation induced earlier change of mitochondria morphology in NBS1-defective patient cells. MitoSOX staining also showed that mitochondrial ROS accumulation may be useful to develop the system. We also investigated micronucleus formation in ATM-defective cells by ATM-specific inhibitor (KU55933) with irradiation. High dose rate irradiation did not increased gammaH2AX-positive micronucleus, but low dose rate irradiation remarkably induced gammaH2AX-positive micronuclei. From these results, mitochondria morphology test in NBS cells and micronucleus test in ATM-defective cells might be useful markers to develop hypersensitive detection system of the effect by low dose (rate) radiation.