

## 放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度年次報告書（詳細版）

研究課題名	放射線による“ゲノム不安定性・がん”のリスク上昇メカニズムと、リスク診断法・制御法の研究 「動物モデルでの放射線発がんとその予防影響の検証」
研究期間	令和3年4月1日～令和4年2月28日

氏名		所属機関・職名
主任研究者	吉岡研一	国立がん研究センター研究所・ゲノム安定性制御研究ユニット・ユニット長
分担研究者	益谷美都子	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子標的医学分野・教授

氏名		所属機関・職名
研究協力者	田代聡	広島大学・原爆放射線医学研究所・研究所長・教授
研究協力者	間野博行	国立がん研究センター研究所・研究所長

研究要旨	研究項目「動物モデルでの放射線発がんとその予防影響の検証」について、C57BL/6 マウスをモデルとして用い、広く放射線発がんのモデル実験で用いられる4 Gy程度の放射線照射の影響（主な影響として高頻度でリンパ腫を発症する）を解析し、特に、ゲノムスタビライザーの摂取による“放射線発がんの抑制効果（これに伴う早期死亡の抑制効果）”と“これに伴う健康状態（運動能力）への影響”の検証のため、4 Gy程度のガンマ線全身照射された背景で、主に“がんを死因とする寿命に対する影響”、さらに、“その抑制に伴う生存影響”を Kaplan-Meier 法で解析するための実験系を予備実験を行って構築した。ゲノムスタビライザーの投与方法（0.01%、0.03%、0.1%含有の飲水による摂取）の至適化を行い、実験開始後、リンパ腫の発症の経過について、継続した観察を行った。ゲノムスタビライザーの投与によりガンマ線全身照射後の体重抑制の減少が観察された。
キーワード	ゲノム不安定性、放射線発がん、リンパ腫、がん予防

## I 研究目的

〈背景〉 放射線ばく露はがんのリスク要因である。これまで、放射線ばく露によって様々なタイプの DNA 損傷が確認されているが、これまで、『どのタイプの損傷が、どの様に発がんリスクに影響しているのか』は、明確でなかった。最近我々は、『修復され難い二本鎖 DNA 切断 (DSB) は複製ストレスに伴って誘導され (広い線量率域で出現)、これがゲノム不安定性 (及び、これに伴うクローン進化) のリスク要因になっている』ことを見出した。しかし、疑問なのは、放射線照射された細胞で、『どの様にゲノム不安定性の高リスク状態 (即ち、複製ストレスに伴う DSB が蓄積しやすい状態) に陥ってしまうのか』という点である。

〈目的〉 本研究では、高リスク状態の細胞で誘導され得る“ゲノム安定性の保持・制御メカニズム”を解明し、最終的に、放射線リスクの診断法・抑制法の創出を最終ゴールとする。具体的には、超高解像共焦点顕微鏡と次世代シーケンスの解析によって高リスクのクロマチン状態を特定し、その誘導メカニズムを解明することを目指す。さらに、放射線によって生じた“ゲノム不安定性リスクの解消”に資する“ゲノムスタビライザー”を用い、その制御メカニズムの解明を目的としている。また、ゲノムスタビライザーの効果の検証も目的とする。最終的には、作用機序の明確な放射線発がんに対する“がん予防薬”の創出を目的として目指す。環境保健行政に対しては、放射線発がんの新規概念の創出、放射線発がんのリスク抑制法の創出、放射線発がんのリスク診断法の創出、に対しての貢献を目的としている。

## II 研究方法

本研究課題は、【3項目】から解析を実施する。

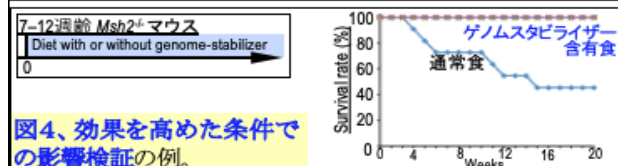
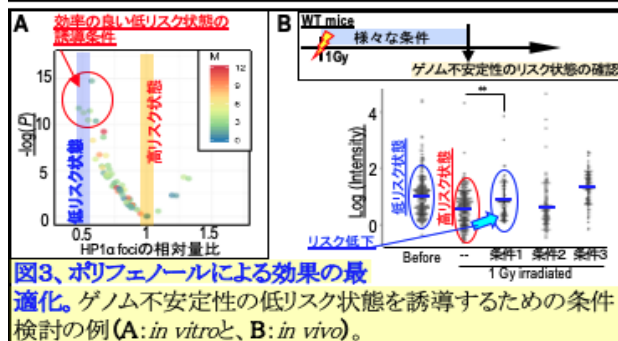
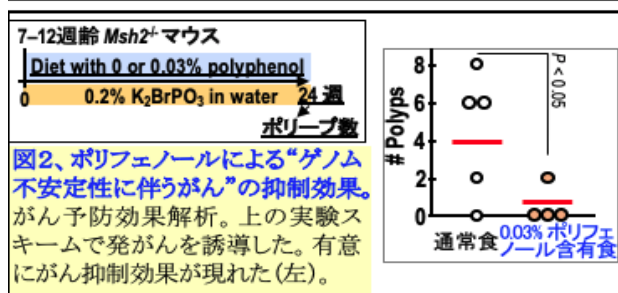
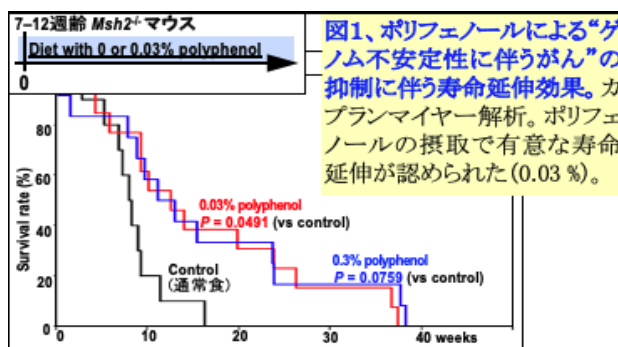
【1】ゲノム不安定性リスクの高い細胞状態の特定と、高リスク状態の誘導メカニズムの研究 (主任研究者の担当)

【2】ゲノム安定性制御を作用点としたリスク抑制とそのメカニズムの研究 (主任研究者の担当)

【3】放射線発がんの予防影響の検証 (分担研究者の担当)

〈本項目の目的〉 ゲノム安定性効果を示す成分 (主任研究者らが見出したゲノムスタビライザー) の摂取による“放射線発がん”の予防効果検証を目的とした。

〈本項目の背景〉 これまでに主任研究者らは、ゲノム不安定性を伴って発がん・死に至



るモデル (*Msh2*<sup>-/-</sup>マウス) を用い、一部のポリフェノール (*in vitro* 解析でゲノムスタビライザー効果を示した成分) を摂取した背景で、“ゲノム不安定性に伴うがん” に対する予防効果が現れることを認めている<sup>2)</sup> (図1、2)。また、さらなる解析で、複数の同義的成分を認め、さらに効率を高めた“ゲノム安定性効果” を示す条件を見出している (図3)。

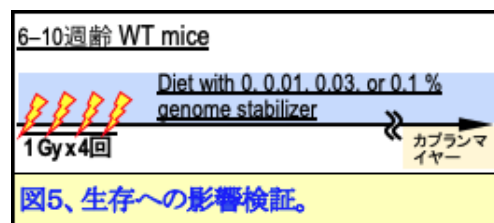
そこで、ここでは、より高効率のゲノムスタビライザーの摂取による“放射線発がんに対する予防効果”を検証する。ゲノムスタビライザーの摂取条件は、予備的解析で、一定の効果の認められた0.03%の含有量付近(0.01%, 0.03%, 0.1%)での解析を開始した(図3、4)。

**〈基本モデル〉** ここでは、C57BL/6 マウスをモデルとして用い、広く放射線発がんのモデル実験で用いられる4 Gy程度の放射線照射の影響(主な影響として高頻度でリンパ腫を発症する)を解析した。特に、ゲノムスタビライザーの摂取による“放射線発がんの抑制効果(これに伴う早期死亡の抑制効果)”と“これに伴う健康状態(運動能力)への影響”の検証のため、次の2種類の実験を実施した。

**〈実験1：がんが死因となるモデルでの“寿命延伸”への影響解析〉**

図3の投与濃度の付

近の3条件(0.01%, 0.03%, 0.1%含有の飲水による摂取)で、4 Gy程度のガンマ線全身照射された背景で、主に“がんを死因とする寿命に対する影響”、さらに、“その抑制に伴う生存影響”を Kaplan-Meier 法で解析した(図5: life Timeでの影響解析)。コントロールを含め、以下の5群で比較し、各々N=20で実施した。



- ・非照射群 (通常水)
- ・4 Gy(1Gy×4) 照射群 (通常水)
- ・4 Gy(1Gy×4) 照射群 (0.01%ゲノムスタビライザー混入水)
- ・4 Gy(1Gy×4) 照射群 (0.03%ゲノムスタビライザー混入水)
- ・4 Gy(1Gy×4) 照射群 (0.1%ゲノムスタビライザー混入水)



図6、運動能力に対する影響検証。

**〈実験2：がん予防に伴う健康状態への影響の解析〉**

これ

までの主任研究者らの解析からは、“細胞老化”に伴ってゲノム不安定性リスクの上昇が認められている<sup>3)</sup>。そこで、全身状態を観察するとともに、このリスク回避に伴う健康への影響、特に、“運動能力”の維持への効果をテストすることとした(図6、7:ローターロッド等)。特に、実験1に合わせて実施し、3ヶ月ごと等の各段階で、各個体の運動能力テストの条件検討を実施した。



図7、運動能力評価機器。

(倫理面への配慮)

本研究プロジェクトにおける動物実験の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守した。

また、「所属研究機関における動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出し、機関長の実施承認を得た。実際の実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行うこととし、機関承認（長崎大学）を得た（承認番号2107261735、2107261735-2）。機関承認後に動物実験を開始した。

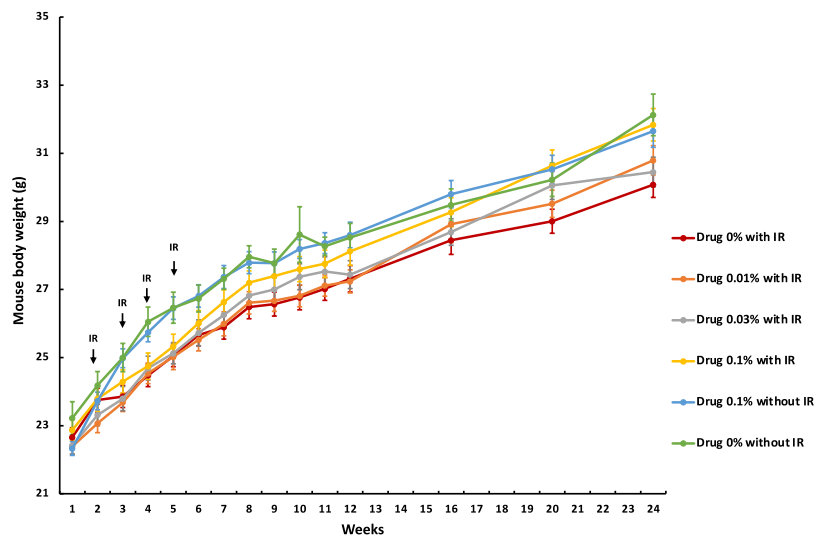
### III 研究結果

#### 〈実験1：がんが死因となるモデルでの“寿命延伸”への影響解析〉

C57BL/6 雄マウスをモデルとして用い4 Gy 程度のガンマ線全身照射された背景で、主に“がんを死因とする寿命に対する影響”、さらに、“その抑制に伴う生存影響”をカプランマイヤー法で解析する実験系の予備実験を行い、実験系を構築した。主任研究者と共にゲノムスタビライザーの成分、調製法と投与方法（0.01%、0.03%、0.1%含有の飲水による摂取）の至適化を行った。

調製方法の検討の結果、60分の超音波処理を行い、1週間分を調製し飲水としての投与を行う条件を選定した。実験開始後、体重変化と胸腺リンパ腫の発症による生存率低下の経過について、継続した観察を行った。ガンマ線全身照射後の体重増加抑制が観察された。ゲノムスタビライザー0.1%摂取群では、ガンマ線全身照射後の体重減少への抑制効果が観察された（図8）。ゲノムスタビライザー摂取による飲水量への影響は観察されなかった。

図8、ガンマ線全身照射後の体重変化推移



#### 〈実験2：がん予防に伴う健康状態への影響の解析〉

ゲノム不安定性リスクの回避に伴う健康への影響、特に、“運動能力”の維持への効果をロータロッド法でテストする予備実験について、行動研究の経験のある研究者のアドバイスのもとに行った。試験方法の条件検討を行い、実験系の構築が完了した。無処理マウスにおいて落下までの時間は約100秒程度であった。実験1のマウスについて1-2日の期間で評価が可能である見通しが立った。

### IV 考察

C57BL/6マウスをモデルとして用い、3.5-4 Gyのガンマ線の全身照射後、致死性の胸腺リンパ腫発症による生存率低下と運動能力についてゲノムスタビライザーの継続摂取の影響の検討を開始した。ゲノムスタビライザー（0.01%、0.03%、0.1%含有）の継続的な飲水投与により、飲水量に影響はなかったが、ゲノムスタビライザー0.1%含有飲水摂取群ではガンマ線全身照射後の体重減少への抑制効果が観察された。これまでにゲノムスタビライザーと同様な成分の化合物による放

放射線照射後の体重減少抑制や運動能力への影響は報告されていない。ゲノム不安定性リスクの回避に伴う健康への影響、特に、“運動能力”の維持への効果はロータロッド法で継続的に検討することが可能と判断できた。来年度にかけて継続した観察が必要と考えられる。

## V 結論

本研究により、3.5-4 Gyのガンマ線全身照射された背景で、ゲノムスタビライザーの長期的飲水投与が放射線照射による影響（主な影響として高頻度でリンパ腫を発症する）を生存、体重増加、全身状態、運動能力の変化について観察する実験系を構築し、実験を開始した。今後、継続して観察することで、来年度中にゲノムスタビライザーのこれらの変化への影響の概要が明らかになると考えられる。

## VI 次年度以降の計画

**〈実験3：がんと“がんのリスク”への影響解析〉** 本年より実施している**実験1**の条件の照射群では、1年程度から死個体が現れると予測される。そこで、1年の時点で解剖し、この段階への影響（各群のリスク状態への影響）を解析する。各々、 $N=5-20$ で実施し、以下の4点を解析する。

1. 胸腺組織（パラフィン切片）などの組織のヘマトキシリン-エオシン染色等による**病理学的解析**。これにより、実際に発がんへの影響を明確にする。
2. 胸腺組織（パラフィン切片）などを対象とした  $\gamma$ H2AX と HP1 $\alpha$  フォーカスの**免疫染色による解析**。これにより、ゲノムスタビライザーによる“高リスクのゲノム状態の解消”への効果を解析する。
3. **トランスクリプトームの主成分解析**。主任研究者らが明確にした“高リスク状態で現れる特徴（トランスクリプトームの主成分解析）”に照らし、各群のリスク状態（高リスク、あるいはその高リスク回避状態）を明確にする。胸腺組織と血球（リンパ球）細胞を対象に実施する。
4. **高リスク状態で現れる特徴の解析**。主任研究者らが明確にした“高リスク状態で現れる特徴（ChIP-seq等の次世代シーケンス解析）”を指標に、上（項目3）と同様に各状態を明確にする。

この研究に関する現在までの研究状況、業績  
現段階ではなし

## 引用文献

- 1) Matsuno Y, Hyodo M, Suzuki M, 他. Replication stress-associated DSBs arisen by ionizing radiation risk genomic destabilization and the associated clonal evolution. *iScience*. 2021;24:102313.
- 1) Matsuno Y, Atsumi Y, Alauddin M, 他. Resveratrol and its related polyphenols contribute to the maintenance of genome stability. *Sci Rep*. 2020;10:5388.
- 2) Matsuno Y, Atsumi Y, Shimizu A, 他. Replication stress triggers microsatellite destabilization and hypermutation leading to clonal expansion in vitro. *Nat Commun*. 2019;10:3925.

# Cancer risks arisen by radiation exposure and those regulation through genome stabilization

Mitsuko Masutani<sup>1</sup>, Takae Onodera<sup>1</sup>, Ken-ichi Yoshioka<sup>2</sup>

1 Department of Genomic and Molecular Biomedicine, Center for Bioinformatics and Molecular Medicine,  
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Sakamoto, Nagasaki, Japan

2 Laboratory of Genome Stability Maintenance, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji, Chuo-ku,  
Tokyo, Japan

*Keywords:* genomic instability; cancer;  $\gamma$ -irradiation; mouse; thymic lymphoma

## **Abstract**

Radiation exposure is associated with cancer risk by inducing genome destabilization. Genomic destabilization risks arisen from the radiation exposure are theoretically suppressible by genome stability maintenance. Using C57BL/6 mouse strain as a model, we have started to evaluate the effect of continuous intake of the genome stabilizer on incidence of thymic lymphoma and physical performance ability after whole body  $\gamma$ -irradiation at approximately 4 Gy. The oral administration of the genome stabilizer was started after optimizing the administration condition for those components. The mice taking the genome stabilizer and the control were subjected to several tests, including the bodyweight, physical performance ability, and the incidence of lethal thymic lymphoma. We found that administration of genome stabilizer reduced the decrease in bodyweight after  $\gamma$ -irradiation.