

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 | 被ばくの分子指標を用いた低線量・低線量率放射線によるがんリスクの直接評価 |
| 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 | 臺野 和広 | 量子科学技術研究開発機構・研究統括 |
| 若手研究の活用状況 | 鈴木 健之 | 量子科学技術研究開発機構・研究員 |

| | |
|-------|---|
| 研究要旨 | <p>原爆被爆者や医療放射線に被ばくした集団の疫学調査から、放射線の被ばく量に比例してがんリスクが上昇することが示されている。しかしながら、低線量や低線量率の被ばくではがんの発生率が低いために正確な発がんのリスクは解明されていない。</p> <p>本研究では、放射線発がん実験で収集された動物腫瘍について次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い、低線量・低線量率被ばくによるがんリスクを直接評価することが出来る分子指標を同定することを計画した。本年度は、非照射群及び、低線量率（6 mGy/時）、高線量率（30 Gy/時）照射群（総線量 0.2～4 Gy）に生じたマウス肺病変の病理診断を行い、肺癌からゲノム DNA の抽出を開始するとともに、予備的データではあるが、肺癌発生に線量率効果が見られることを明らかにした。また、非照射群、低線量率（3～60 mGy/時）、高線量率（30 Gy/時）照射群（総線量 4 Gy）に生じたラット乳癌からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる解析を開始した。さらに、消化管腫瘍のモデルマウスを作出し、非照射群、低線量率（6 mGy/時）、高線量率（30 Gy/時）照射群（総線量 2 Gy）を設定、腫瘍の収集を開始した。計画通り研究が進捗しており、今後被ばくの分子指標に関する情報が得られると期待される。</p> |
| キーワード | 低線量、低線量率、がん、ゲノム、分子指標 |

I 研究目的

低線量の放射線被ばくによる発がんリスクは、喫煙等の生活習慣要因によるリスクと比べて圧倒的に小さいため、バイアスが問題となりやすい疫学的手法によって正確に評価することは困難である。これまで、主任研究者の所属研究部では、脳腫瘍を自然に発症する遺伝子改変モデルマウス (*Ptch1*^{+/−}マウス) においてゲノム異常 (介在型染色体欠失) を指標として被ばくに起因するがんを自然に発生したものから鋭敏に識別できることを利用し、低線量率被ばく (5.4 mGy/時) では高線量率被ばく (32 Gy/時) に比べ、同じ総線量であっても被ばくに起因するがんのリスクが小さくなること、さらに、線量率が一定以下 (1.1 mGy/時) になるとそのリスクが非被ばく群と区別できなくなることを明らかにしてきた¹⁾。さらに、乳がんのモデルでは、線量率をそれ以下に下げると乳がんリスクがほとんど増加しない「しきい値」が 24 mGy/時と 60 mGy/時の間にあることを確認している²⁾。このように、放射線リスク評価のゴールドスタンダードになっている原爆被爆者の線量率 (10⁶ Gy/時程度以上) より低く、実験を行うのは困難であるが福島で問題になりうる線量率 (20 mGy/年、すなわち 2 μGy/時) より高い線量率において、リスク評価の観点で意味のある線量率効果が観察されることから、5~60 mGy/時程度の線量率で誘発された腫瘍を調べることに意味があると考えます。

本研究は、主任研究者らがこれまでに実施してきた放射線発がん実験によって収集された動物腫瘍のうち、放射線発がん感受性の高い臓器のがん (肺がん、乳がん、消化管がん) について、非照射群及び、低線量率 (3 mGy/時~60 mGy/時)、高線量率 (30 Gy/時) の放射線照射群に生じた腫瘍のゲノム解析を行うことで被ばくの分子指標を同定し、低線量・低線量率被ばくによるリスクの直接評価を目指す。

原発事故後、周辺住民が抱える放射線による健康不安は、がんの発生であり、「平成26年福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議の中間取りまとめ」(環境省) においても、被ばくによる影響は主にがんについて検討する必要性が示されている。本研究により、低線量・低線量率の被ばくによるがんリスクの予測や、動物実験データのヒトリスク評価への外挿の信頼性向上のための基礎情報が得られることが期待される。これらの成果は、これまでただ「わからない」とされることの多かった低線量・低線量率被ばくのがんリスクを科学的に明らかにする新しい原理を示すものであるため、住民の健康不安の解消に役立つ情報となる。

II 研究方法

1. マウス肺腫瘍の病理解析とゲノム DNA の抽出

主任研究者の所属研究部において放射線誘発がんのアーカイブとして整理、保存してきたアーカイブ腫瘍³⁾のうち肺病変の病理解析を行い、非照射群及び、低線量率 (6 mGy/時)、高線量率 (30 Gy/時) 放射線照射群 (総線量 200 mGy から 4 Gy の γ 線照射群) に発生した悪性腫瘍の病理診断を行った (肺腫瘍の解析は、若手研究者が中心になって実施した)。その後、肺癌の発生率を算出すると共に、生存解析及び、ハザード解析によりリスク解析を行った。その後、病理組織像などの情報をもとに、ゲノム解析に使用する肺癌検体の選出を行った。

2. ラット乳癌のゲノム DNA 抽出と次世代シーケンシング解析

非照射群及び、低線量率（3 mGy/時～60 mGy/時）、高線量率（30 Gy/時）放射線照射群（総線量 4 Gyの γ 線照射群）に発生したラット乳癌及び、同一個体の正常非癌部乳腺組織からゲノムDNAを抽出し、分解のないことや2本鎖DNAの純度が十分であることを確認した。その後、PCR-free法によりDNAライブラリーを作製し、次世代シーケンシングを行い、ゲノム配列のデータを取得した。その後、配列データの情報解析を行い、塩基置換や短い塩基の欠失・挿入、DNAコピー数異常、染色体欠失等のゲノム構造異常の検出を開始した。

3. 消化管腫瘍モデルマウスを用いた発がん実験の設定と腫瘍サンプルの収集

雄 C57BL/6J *Apc*^{Min/+}マウスと雌 C3H マウスを交配させることにより、消化管腫瘍のモデルマウス C3B6F1 *Apc*^{Min/+}を作出し、非照射群及び、低線量率（6 mGy/時）、高線量（30 Gy/時）放射線実験群（総線量 2 Gy の γ 線照射群、各群 10 匹）を設定した。30 週齢時にマウスの解剖を行い、各群に生じた腫瘍（小腸及び、大腸腫瘍）のサンプルを収集し、病理組織解析及び、ゲノム DNA の抽出を開始した。

（倫理面への配慮）

本研究計画において使用する試料に関わる動物実験は、動物愛護法ならびに量子科学技術研究開発機構の「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、「動物実験委員会」承認のもとに実施した。

III 研究結果

1. 肺腫瘍の病理解析とゲノム DNA の抽出

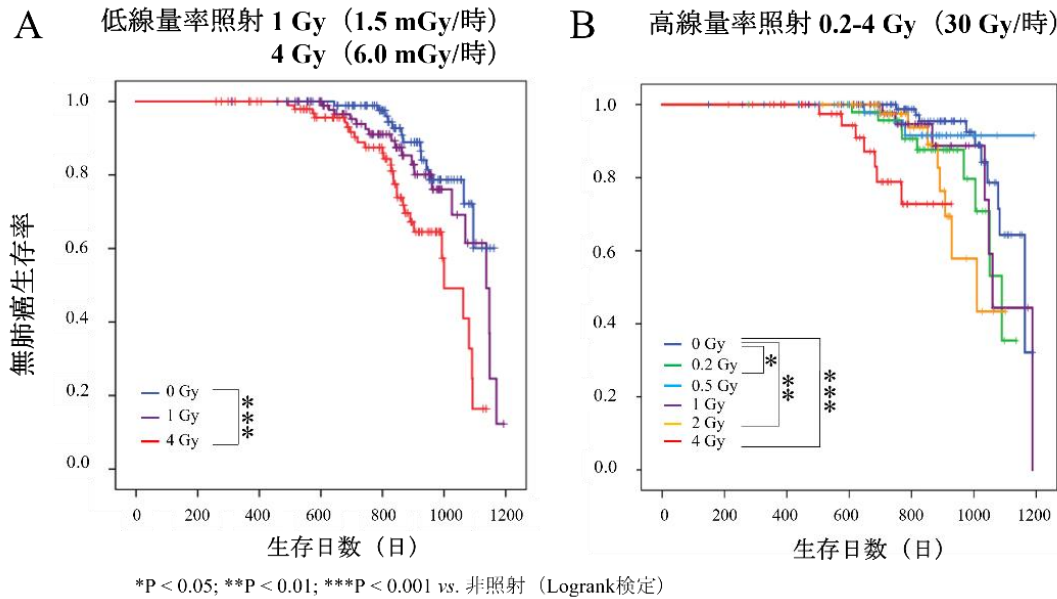
放射線発がん実験アーカイブ腫瘍のうち、非照射群及び、低線量率（6 mGy/時）、高線量率（30 Gy/時）放射線照射群に発生したマウス肺病変の病理診断を行った。病理学者による確定診断前の予備的データとして、肺癌の発生率を調べた結果、高線量率照射群に生じた肺癌の数が、低線量率照射群よりも少ないという結果が得られた（表III-1）。

表III-1 低線量率および高線量率照射マウスにおける肺がんの発生率

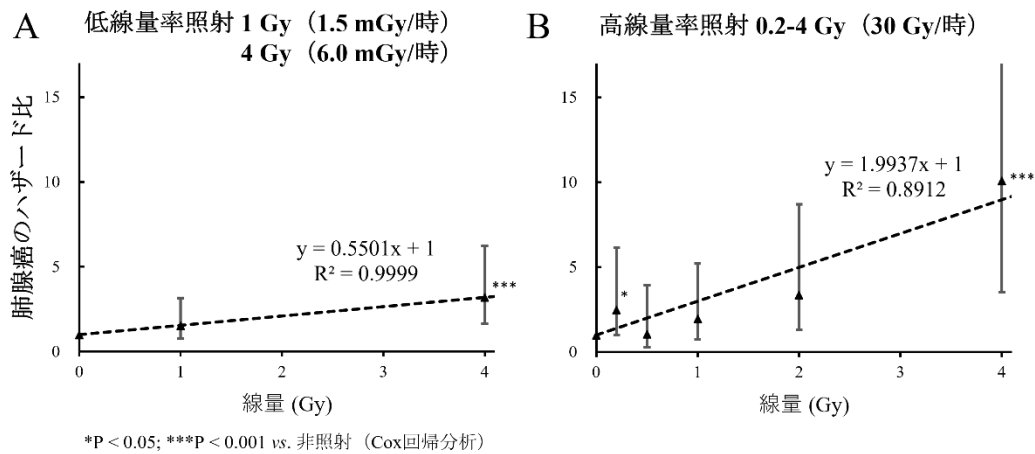
| 実験群 | 総線量 (Gy) | 線量率 (毎時) | マウスの匹数 | 腺腫の発生数 (%) | 腺癌の発生数 (%) | 平均寿命 (日) |
|-----------------|----------|----------|--------|------------|------------|----------|
| 低線量率照射実験 | | | | | | |
| 非照射 | 0 | 0 Gy | 100 | 14 (14.0) | 13 (13.0) | 858 |
| γ 線 | 1 | 1.5 mGy | 100 | 11 (11.0) | 19 (19.0) | 812 |
| | 4 | 6.0 mGy | 103 | 14 (13.6) | 28 (27.2) | 768 |
| 高線量率照射実験 | | | | | | |
| 非照射 | 0 | 0 Gy | 111 | 14 (12.6) | 10 (9.0) | 850 |
| γ 線 | 0.2 | 30 Gy | 51 | 5 (9.8) | 9 (17.6) | 853 |
| | 0.5 | 30 Gy | 50 | 3 (6.0) | 3 (6.0) | 816 |
| | 1 | 30 Gy | 50 | 3 (6.0) | 7 (14.0) | 809 |
| | 2 | 30 Gy | 51 | 3 (5.9) | 8 (15.7) | 802 |
| | 4 | 30 Gy | 50 | 1 (2.0) | 7 (14.0) | 635 |

一方、肺がん発生による生存解析及び、ハザード解析を行った結果、総線量 4 Gy での比較では、低線量率照射群の肺がん発生時期が、高線量照射群に比べて遅くなることが分かった（図III-1）。また、低線量率照射による肺腺癌発生の単位線量あたりのハザード比は、高線量率照射の 4 分の

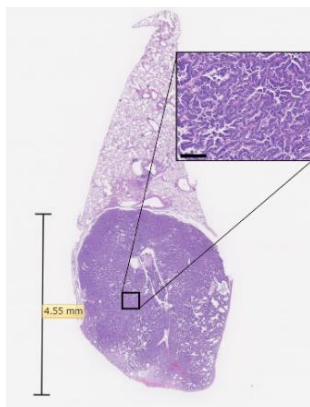
1 程度になり、肺がんの発生に線量率効果が見られることが明らかになった (図III-2)。また、病理組織像などの情報をもとに、次世代シーケンシングによるゲノム解析に使用する肺癌検体の



図III-1 低線量率および高線量率照射マウスにおける無肺がん生存率の解析 (A) 低線量率照射群、(B) 高線量率照射群



図III-2 低線量率および高線量率照射マウスにおける肺がんのハザード解析 (A) 低線量率照射群、(B) 高線量率照射群

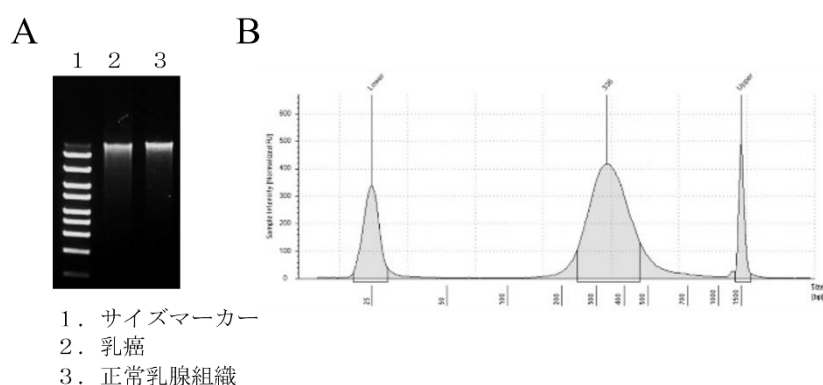


図III-3 マウス肺がんの病理組織像
拡大像、スケールバー、100 μm

選出を行った (図III-3)。

2. 乳癌のゲノム DNA 抽出と次世代シーケンシング解析

非照射群に生じた自然発症乳癌3検体、低線量率 (3~60 mGy/時) 照射群に生じた乳癌9検体、高線量率 (30 Gy/時) 照射群に生じたラット乳癌3検体及び、同一個体の正常非癌部乳腺組織から抽出したゲノムDNAを材料にDNAライブラリーを作製した (図III-4)。次いで、次世代シーケンシングを行い、乳癌では、1検体当たり平均168.1ギガ塩基 (シーケンスカバレッジ56.0x)、対応する正常乳腺組織では平均103.7 ギガ塩基 (シーケンスカバレッジ34.6x) と、予定していた量の配列データを取得することに成功した (表III-2)。取得した配列データの情報解析により、塩基置換や短い塩基の欠失・挿入、DNAコピー数異常、染色体欠失等のゲノム構造異常の抽出と、それらの頻度や特徴に関する解析を開始した。



図III-4 ラット乳がんゲノム DNA の抽出と DNA ライブラリーの作製

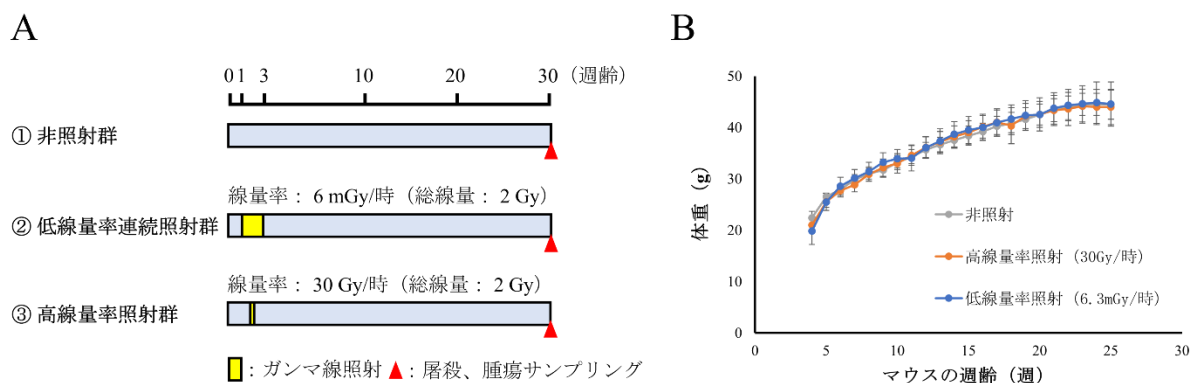
- (A) ラット乳癌及び、正常乳腺組織から抽出したゲノム DNA の電気泳動像、
 (B) 作製した DNA ライブラリーの電気泳動データ

表III-2 次世代シーケンシングにより取得したゲノム配列データ

| 検体 | 線量率 (mGy/時) | 総線量 (Gy) | 乳癌 | | 正常乳腺組織 | |
|----|-------------|----------|---------------|---------------|-------------|---------------|
| | | | リード数 | データ量 (Mbases) | リード数 | データ量 (Mbases) |
| 1 | 0 | 0 | 1,115,394,380 | 167,309 | 722,346,896 | 108,352 |
| 2 | 0 | 0 | 1,113,425,292 | 167,014 | 702,314,206 | 105,347 |
| 3 | 0 | 0 | 1,106,385,786 | 165,958 | 683,371,354 | 102,506 |
| 4 | 3 | 4 | 1,126,435,438 | 168,965 | 663,564,180 | 99,535 |
| 5 | 12 | 4 | 1,111,868,412 | 166,780 | 680,961,980 | 102,144 |
| 6 | 12 | 4 | 1,098,818,328 | 164,823 | 712,303,006 | 106,845 |
| 7 | 24 | 4 | 1,098,287,980 | 164,743 | 690,806,348 | 103,621 |
| 8 | 24 | 4 | 1,107,806,918 | 166,171 | 683,264,748 | 102,490 |
| 9 | 24 | 4 | 1,146,408,274 | 171,961 | 701,274,324 | 105,191 |
| 10 | 60 | 4 | 1,153,505,680 | 173,026 | 655,935,910 | 98,390 |
| 11 | 60 | 4 | 1,110,353,994 | 166,553 | 651,752,472 | 97,763 |
| 12 | 60 | 4 | 1,100,398,768 | 165,060 | 681,130,296 | 102,170 |
| 13 | 30000 | 4 | 1,109,347,674 | 166,402 | 696,734,202 | 104,510 |
| 14 | 30000 | 4 | 1,113,508,592 | 167,026 | 682,328,524 | 102,349 |
| 15 | 30000 | 4 | 1,178,776,354 | 176,816 | 721,787,672 | 108,268 |

3. 消化管腫瘍モデルマウスを用いた発がん実験の設定と腫瘍サンプルの収集

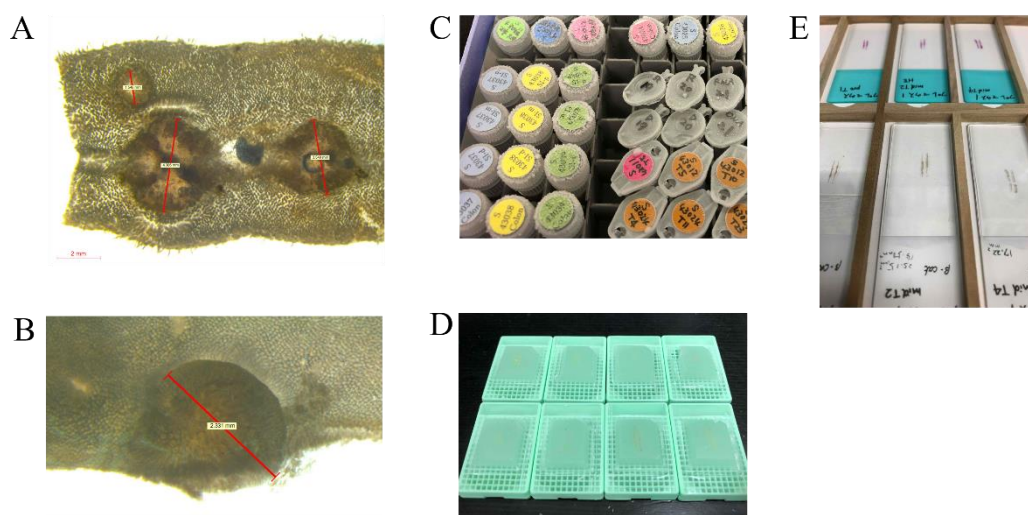
消化管腫瘍のモデルであるC3B6F1 *Apc^{Min/+}*マウスを作出し、非照射群、低線量率（6 mGy/時）、高線量率（30 Gy/時）放射線照射群を設定し、マウスの飼育観察及び、体重の変化を測定した（図III-5）。照射による体重の変化は観察されなかった。



表III-5 消化管腫瘍モデルマウスを用いた発がん実験の設定

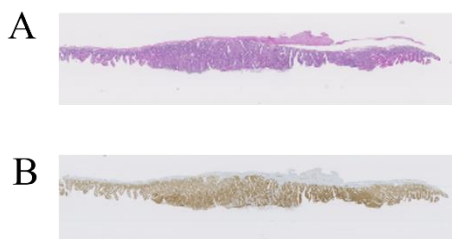
(A) 消化管腫瘍モデルマウスを用いた発がん実験概要、(B) マウスの体重変化

30週齢時にマウスの解剖を行い、各群に生じた腫瘍（小腸腫瘍及び、大腸腫瘍）サンプルを収集した（図III-6）。また、腫瘍の病理組織解析を開始し、ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin Eosin, HE）染色像や免疫染色によるβ-カテニン陽性腫瘍細胞の確認を行い、悪性腫瘍の診断を行った（図III-7）。悪性と診断された腫瘍からゲノムDNAの抽出を開始した。



表III-6 消化管腫瘍検体の収集

(A) 消化管腫瘍モデルマウスに生じた小腸腫瘍のマクロ像、(B) 大腸腫瘍のマクロ像、(C) 腫瘍の新鮮凍結組織、(D) パラフィンブロック標本、(E) 病理組織標本



図III-7 消化管腫瘍の病理組織染色像
 (A) 小腸腫瘍病理組織標本の HE 染色像、(B)
 β -カテニン染色像

IV 考察

マウスを用いた肺がんの解析では、高線量率照射群における肺がんの発生数が、低線量率照射群と比べ少ないという結果が得られた。この理由として、肺がんは、他のがんと比べ発症までの期間が長いことから、高線量率照射群では他のがんの発症により早期に死亡する個体が多くなり、肺がんの発生数が少なくなったと考えられた。このようなケースでは、ハザード解析のような癌発生による生存期間を考慮した解析が、がんリスクの推定に有効であると考えられた。

V 結論

マウスに生じた肺がんにおいて、低線量率の放射線被ばくでは、高線量率の被ばくに比べ、がんリスクが小さくなる線量率効果の存在が示唆された。また、乳がんの全ゲノム解析を開始し、肺がん、消化管腫瘍については、ゲノム解析のための材料の取得が順調に進んだ。

VI 次年度以降の計画

放射線発がん実験で得られた動物腫瘍（肺がん、乳がん、消化管腫瘍）の次世代シーケンシングによる全ゲノム解析を継続する。非照射群に発生した自然発症腫瘍のデータとの比較を行い、被ばくに起因する腫瘍に見られるゲノム異常の特徴（原因遺伝子変異、突然変異パターン、染色体欠失等のゲノム構造異常など）を明らかにし、被ばくの分子指標を抽出する。また、公共データベースに登録されたヒトがんゲノム情報をもとに、動物腫瘍から得られたデータとの類似性を評価する。さらに、発がんの数理モデル構築に有用な遺伝子変異等のパラメーターの抽出や、双方に共通する発がんメカニズム、対応するがんの亜型などを明らかにし、ヒトへの外挿の可能性を検討する。若手研究者の協力により、ゲノム解析により同定された被ばくの分子指標（遺伝子変異など）について、被ばく線量の異なる検体を追加し、線量依存性を明らかにする。また、前がん段階にある病変や良性腫瘍を用いて、同定された分子指標の検出を行い、いつ、どの細胞において、遺伝子変異を持った変異細胞が生じるのかを明らかにするとともに、エピゲノム異常や炎症、細胞老化といった癌微小環境の変化にも注目する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 学会発表等

- 1) Suzuki K, Daino K., Morioka T., *et al.* Lung cancer risk in mice after low-dose-rate irradiation. 日本放射線影響学会第64回大会

イ) 受賞

- 1) 日本放射線影響学会第 64 回大会・優秀演題発表賞、受賞者、鈴木 健之

引用文献

- 1) Tsuruoka C, Blyth JB, Morioka T., *et al.* Sensitive Detection of Radiation-Induced Medulloblastomas after Acute or Protracted Gamma-Ray Exposures in Ptch1 Heterozygous Mice Using a Radiation-Specific Molecular Signature. *Radiat Res.*, 186(4):407-414, 2016.
- 2) Imaoka T, Nishimura M, Daino K., *et al.* Prominent Dose-Rate Effect and Its Age Dependence of Rat Mammary Carcinogenesis Induced by Continuous Gamma-Ray Exposure. *Radiat Res.*, 191(3):245-254, 2019.
- 3) Morioka T, Blyth JB, Imaoka T., *et al.* Establishing the Japan-Store house of animal radiobiology experiments (J-SHARE), a large-scale necropsy and histopathology archive providing international access to important radiobiology data. *Int J Radiat Biol.*, 95(10):1372-1377, 2019.

Cancer Risk Assessment from Low-Dose and Low-Dose-Rate Radiation Using Molecular Signatures of Radiation Exposure

Kazuhiro Daino

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

Keywords: low-dose; low-dose-rate; cancer; genome; molecular signatures

Abstract

Epidemiological studies on atomic bomb survivors and patients who have undergone radiotherapy have established that ionizing radiation is a risk factor for cancer. However, the exact risk of cancer induction by low-dose and low-dose-rate radiation has not been elucidated due to the low incidence of cancer.

This study aimed to identify molecular signatures that distinguish radiation-induced cancers from spontaneously developed cases by conducting whole-genome sequencing of animal tumors, including lung, breast, and intestinal tumors, from radiation carcinogenesis experiments. Whole-genome sequencing was performed using genomic DNAs extracted from mammary carcinomas developed in non-irradiated and 4 Gy of γ -irradiated rats at low-dose-rate (3-60 mGy/hour) or high-dose-rate (30 Gy/hour). For lung tumor, we initially performed pathological diagnosis of lung lesions developed in non-irradiated and a total of 0.2-4 Gy of γ -irradiated mice at low-dose-rate (6 mGy/hour) or high-dose-rate (30 Gy/hour). As preliminary data, dose-rate effect was observed for lung adenocarcinoma. In addition, *Apc*^{Min/+} mice were non-irradiated or 2 Gy of γ -irradiated at low-dose-rate (6 mGy/hour) or high-dose-rate (30 Gy/hour) to obtain intestinal tumors. To perform whole-genome sequencing of these tumors, genomic DNA extraction from lung and intestinal carcinomas is currently in progress.