

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度～令和5年度実施総括報告書

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年度～令和5年度（3年間）

	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放射線医学研究所・ 上席研究員
分担研究者		
若手研究者	鈴木 健之	量子科学技術研究開発機構放射線医学研究所・ 研究員

1. 研究の概要

東京電力福島第一原子力発電所事故後、周辺住民が抱える放射線による健康不安は、がんの発生であるが、低線量や低線量率の被ばくにおいては、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。そこで本研究は、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¹⁾のうち、放射線発がん感受性の高い臓器のがんである肺がん、乳がん、消化管がんについて次世代シーケンシングによる全ゲノムの解析を行い、被ばくによる発がん機構と発がんリスク評価に有用な被ばくの分子指標を明らかにすることを目的とした。

研究の結果、肺がんのリスク解析では、線量率効果が見られることを確認した。さらに、変異パターンの解析から、照射群のがんでは、非相同末端結合（Non-homologous end joining、NHEJ）と呼ばれる修復による DNA 二重鎖切断修復の痕跡を示す変異パターンが認められることが分かった。また、照射群の乳がんでは、マイクロホモロジーと呼ばれる相同配列を利用した末端結合（Microhomology-mediated end joining、MMEJ）修復の関与や、挿入を伴う結合も観察されることが分かった。照射群のがんでは、非照射群に比べ、染色体構造異常の数が増加し、特に、逆位が特徴的に見られることが分かった。染色体欠失のサイズについて調べた結果、照射群のがんでは、欠失サイズの増大が観察されることが分かった。動物データのヒトへの外挿に関して、ヒトがんと共通する主要な遺伝子変異を同定するとともに、発がんに関連するシグナル経路の異常を明らかにした。

本研究により得られた成果は、これまでただ「わからない」とされることが多かった低線量・低線量率の被ばくによるがんリスクの直接的評価や、動物実験データのヒトリスク評価への外挿における信頼性の向上に繋がると期待される。

2. 研究期間内に実施した内容

年目／実施年度	実施した内容
1年目	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

令和3年度	<p>存してきたアーカイブ腫瘍のうち肺病変の病理解析を行い、非照射群及び、低線量率（毎時 1.6 mGy または 6.3 mGy）、高線量率（毎時 30 Gy）放射線照射群（総線量 200 mGy から 4 Gy のガンマ線照射群）に発生したマウス（B6C3F1 系統）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、肺がん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。また、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がん検体の選出を行った。</p> <p>非照射群及び、低線量率（毎時3 mGy～60 mGy）、高線量率（毎時30 Gy）放射線照射群（総線量4 Gyのガンマ線照射群）に発生したラット（Sprague-Dawley系統）乳がん及び、同一個体の非がん部正常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。次いで、PCR-free法によりDNAライブラリーを作製、次世代シーケンシングを行い、全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。</p> <p>雄 C57BL/6J <i>Apc</i>^{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 <i>Apc</i>^{Min/+}を作出し、非照射群及び、低線量率（毎時 6 mGy）、高線量（毎時 30 Gy）放射線照射実験群（総線量 2 Gy のガンマ線照射群、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（小腸腫瘍及び、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。</p>
2年目	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（毎時 1.6 mGy
令和4年度	<p>または 6.3 mGy）、高線量率（毎時 30 Gy）放射線照射群（総線量 200 mGy から 4 Gy のガンマ線照射群、各群 50～100 匹）に発生したマウス（B6C3F1 系統）由来肺病変の病理診断を引き続き実施した。また、肺病変の周辺組織における老化細胞の存在や炎症状態を確認するため、免疫組織化学染色法に用いる各種抗体（抗 p16 タンパク質抗体、抗 F4/80 タンパク質抗体等）の染色条件の確立を行った。さらに、肺腫瘍からゲノム DNA を抽出し、DNA の品質確認及びサンプル調製を行った。その後、次世代シーケンシングにより全ゲノム配列データを取得し、データの解析を行った。</p> <p>非照射群及び、低線量率（毎時 6 mGy）、高線量率（毎時 30 Gy）のガンマ線照射群（総線量 2 Gy）に発生したマウス消化管腫瘍について、発生数を調べるとともに、ゲノム DNA の抽出を行った。本研究で用いた消化管腫瘍のマウスモデル（C3B6F1 <i>Apc</i>^{Min/+}系統）では、放射線被ばくにより腫瘍の原因となる遺伝子 <i>Apc</i> を含む 18 番染色体上の領域が欠失することから、ヘテロ接合性消失の解析を行い、同領域の欠失が観察される腫瘍と欠失が観察されない腫瘍に分類した。その後、DNA の品質確認及び、サンプル調製を行い、次世代シーケンシングにより全ゲノム配列データを取得した。</p> <p>前年度に取得したラット（Sprague-Dawley 系統）由来乳がんの全ゲノム配列データの情報解析を引き続き行った。</p>

3年目	肺腫瘍については、放射線発がん実験アーカイブ腫瘍のうち、非照射群及び、
令和5年度	<p>低線量率（毎時 1.6 mGy または 6.3 mGy）、高線量率（毎時 30 Gy）放射線照射群（総線量 200 mGy から 4 Gy のガンマ線照射群、各群 50～100 匹）に発生したマウス（B6C3F1 系統）に由来する肺病変の病理診断を引き続き実施した。その後、肺がん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。また、免疫組織化学染色法を用いて、肺病変の周辺組織における老化細胞や炎症の検出を行った。</p> <p>腫瘍のゲノム解析については、非照射群及び、低線量率（毎時 1.6 mGy または 6.3 mGy）、高線量率（毎時 30 Gy）放射線照射群（総線量 200 mGy から 4 Gy のガンマ線照射群）に発生したマウス肺がん、低線量率（毎時 6 mGy）、高線量率（毎時 30 Gy）のガンマ線照射群（総線量 2 Gy）に発生したマウス消化管腫瘍、低線量率（毎時 3 mGy～60 mGy）、高線量率（毎時 30 Gy）放射線照射群（総線量 4 Gy のガンマ線照射群）に発生したラット乳がんから取得した全ゲノム配列のデータを用いて、塩基置換、挿入、欠失変異、原因遺伝子変異、染色体欠失等のゲノム構造異常の検出を行うとともに、変異のパターンや DNA 切断部位周辺の配列の解析を行った。また、ヒトがんのゲノムアトラス等の公共データベースに登録されたゲノム異常の情報をもとに、動物腫瘍で検出されたがんの原因遺伝子変異との類似性を評価した。</p>

3. 研究終了時に得られた結果・結論

① 研究結果・結論（総括）・成果など

本研究では、我々がこれまでに実施してきた放射線発がん実験で収集してきた動物腫瘍試料のうち肺病変の病理診断を行い、その結果をもとに肺がんの発生率の算出及び、リスク解析を行った。その結果、低線量率の放射線被ばくでは、高線量率被ばくに比べ、がんリスクが小さくなる線量率効果が観察されることが分かった。

また、次世代シーケンシングにより腫瘍のゲノム DNA に見られる異常を解析した結果、非照射と照射群に由来するがんでは、体細胞変異の数や塩基置換のパターンに違いはないことが分かった。一方、非照射群に比べ、照射群の肺がん及び、乳がんでは、非同末端結合（NHEJ）と呼ばれる修復機構による DNA 二重鎖切断修復の痕跡を示す変異パターンが認められることが分かった。また、照射群の乳がんでは、マイクロホモロジーと呼ばれる短い相同配列を利用した末端結合（MMEJ）修復の関与や、挿入を伴う結合も観察されることが分かった。さらに、照射群の肺がん及び、乳がんでは、非照射群に比べ、染色体構造異常の数が増加すること、特に、逆位と呼ばれる染色体構造異常が特徴的に見られることが分かった。また、染色体欠失のサイズについて解析した結果、照射群の乳がんでは、染色体欠失のサイズの線量率依存的な増加が観察されることが分かった。加えて、照射群の乳がんでは、染色体において数十～数千箇所にも及ぶ崩壊と再編成が起こるクロモソリプシスと呼ばれる異常に類似した染色体の構造異常が観察されることが分かった。また、動物データのヒトへの外挿に関して、肺がん及び、乳がんにおいてヒトがんと共通する主要ながんの原因遺伝子変異を同定するとともに、発がんに関連するシグナル経路の異常を明らかにした。

放射線被ばくによる肺がん発生において線量率効果が見られた結果は、「統一的な基礎資料」の充実に繋がると共に、低線量・低線量率放射線被ばくによる健康影響の評価において重要な科学的知見

となる。また、本研究により得られた被ばく起因するがんの特徴的なゲノム異常や、ヒトがんと共通するがんの原因遺伝子変異に関する知見は、これまでただ「わからない」とされることが多かった低線量・低線量率の被ばくによるがんリスクの直接的評価や、動物実験データのヒトリスク評価への外挿における信頼性の向上に繋がると期待される。

② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

マウス肺病変の病理診断の達成率は91%（全666検体中605検体の確定診断が終了）であり、予備診断の情報と合わせてがんのリスク評価（線量率効果の推定）には十分であるものの、確定診断の一部が課題として残された。これは、計画の途中で腫瘍の病理画像をアーカイブしているシステムに不具合が生じたためである。現在、病理標本を直接診断することにより計画を進めており、今後達成が可能である。

次世代シーケンシングによる肺がん及び、乳がんのゲノム解析は当初の計画通り達成できた。一方、全ゲノムから得られた大規模なDNA配列データの解析と検出されたゲノム異常のデータ確認に想定以上の時間がかかったことから、消化管がんに見られるゲノム解析の一部（変異パターンと染色体構造異常の解析）が課題として残された。肺がん、乳がんにおいてゲノム異常の解析手法は確立しているため、今後達成が可能である。

③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

本研究において、免疫組織化学染色法を用いたマウス肺組織における老化細胞と炎症の検出条件を確立することができた。放射線被ばくにより老化細胞や炎症が誘導されることが明らかにされつつあり、がん細胞周辺の環境を変えることによる発がんへの寄与が示唆されている。今後、病変部における老化細胞や炎症の誘導を定量的に評価することで、低線量・低線量率放射線被ばくによるがん発生との関係の有無が明らかに出来ると考えられる。

また、次世代シーケンシングによる腫瘍の全ゲノム解析により、照射群の乳がん検体では、染色体において数十～数千箇所にも及ぶ崩壊と再編成が起こるクロモソリプシスと呼ばれる異常に類似した染色体構造の異常が観察されることが分かった。クロモソリプシスは、新しい発がんの機構として近年注目されており、放射線による発がんメカニズムの一つである可能性が示唆された。

4. 研究成果の活用方策の提案

本研究をさらに発展させる新たな研究や事業化の提案

今後、本研究で観察されたゲノム異常の特異性について十分な検証を行い、放射線被ばくの分子指標として発がんメカニズム研究に利用することで、被ばくによる発がん経路の全容解明が期待される。そして、被ばくの分子指標や発がんに至るイベントのヒト細胞や検体における検証を通じて、動物とヒトにおける知見を統合し、生物学的データに基づいた線量反応の数理モデルを開発することで低線量・低線量率の被ばくによるがんリスクの推定が可能になると考えられる。

引用文献

1. 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).