

## 放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和 4 年度～令和 6 年度実施総括報告書

|       |                                                                          |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|
| 研究課題名 | 低線量率放射線発がんリスクの予測モデル構築及び遺伝的素因に関する基礎的研究（若手研究：Brca1 遺伝子欠損個体の低線量率放射線影響の機序解明） |
| 研究期間  | 令和 4 年度～令和 6 年度（3 年間）                                                    |

|       | 氏名   | 所属機関・職名            |
|-------|------|--------------------|
| 主任研究者 | 今岡達彦 | 量子科学技術研究開発機構・部長    |
| 分担研究者 |      |                    |
| 若手研究者 | 永田健斗 | 量子科学技術研究開発機構・主任研究員 |

### 1. 研究の概要

放射線の健康影響の科学的評価の不確かさは関係者の不安の一因となっている。また、一般に提供されている情報は大きな集団の解析で得られた平均的な人の情報であり、平均的とは限らない個人の不安対策や健康管理に役立てるための情報が求められる。本研究ではその平均的でない例の一つとして遺伝性がんの原因遺伝子である Brca1 に着目し、Brca1 遺伝子欠損個体における低線量率放射線影響が現れる過程の DNA 二重鎖切断修復、遺伝子発現等の動態を評価する。若手研究で得られる成果は、本体研究（項目 2）で得られる結果を補強するとともに、本体研究（項目 1）の数理モデルを Brca1 遺伝子欠損個体に拡張するための基礎的知見となりうる。

動物実験は所属機関の倫理審査で承認を得た計画に基づき、定められた指針を遵守して以下のように実施した。研究 1 年目においては、3～4 週齢のラットに高線量率（0.4 Gy/min）もしくは低線量率（0.05 mGy/min）の放射線を照射し、DNA 二重鎖切断修復動態および遺伝子発現解析のため乳腺サンプルの収集を行った。研究 2 年目においては、乳腺組織の蛍光免疫染色を行い非照射時および照射後の DNA 二重鎖切断修復動態を解析した。その結果、Brca1 ヘテロ欠損個体では野生型と比較し非照射時の DNA 損傷数は多く、さらに BRCA1 が関与する相同組換え修復が生じる 6～24 時間後の DNA 二重鎖切断数は野生型よりも Brca1 ヘテロ欠損個体で多い傾向が観察され、相同組換えによる DNA 二重鎖切断の修復が減弱している可能性を示唆した。研究 2,3 年目においては、放射線被ばく後初期の遺伝子発現変化を検討するため、乳腺組織由来の RNA のシーケンス解析を実施した。その結果、BRCA1 が転写調節因子として機能し、かつ乳腺分化に関与する一遺伝子の発現量は、野生型に比べ Brca1 ヘテロ欠損個体において低い傾向にあることを確認した。Brca1 ヘテロ欠損個体においては低線量率被ばくに比べ高線量率被ばくで炎症に関わる遺伝子の発現が有意に増加することを確認した。

以上の知見は、主任研究者の研究の結論をメカニズムの観点から補強し、支持するものである。

### 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    | 令和 4 年度は Brca1 遺伝子欠損個体における低線量率放射線影響が現れる過程 |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 令和4年度 | <p>の DNA 二重鎖切断修復、遺伝子発現等の動態を評価するために必要な実験動物の準備、放射線照射実験およびラット乳腺組織のサンプル収集を実施した。</p> <p>DNA 二重鎖切断修復動態解析においては、Brca1 ヘテロ欠損個体の高線量率照射後の DNA 二重鎖切断修復動態の速度は、野生型ラットのそれよりも低いのか、また低線量率連続照射後の DNA 二重鎖切断の残存量は、上記の修復動態から予測される計算上の残存量と一致するか検討する。そのため、高線量率 (1 Gy, 0.4 Gy/min) 照射後の 3~4 週齢ラットの乳腺、ならびに低線量率 (1 Gy, 0.05 mGy/min) 照射後の 4 週齢ラットの乳腺を収集し、ホルマリン固定、パラフィンブロックの作製を終えた。前回事業において、異なる種類の乳腺上皮細胞 (基底細胞、内腔前駆細胞、内腔成熟細胞) を多重蛍光免疫染色法により区別する手法を確立させている (Nagata et al., 2024 Jornal of Radiation Research) *<sup>1</sup>。この手法に従い上記サンプルの一部を用いて、乳腺上皮細胞および DNA 二重鎖切断修復動態を多重蛍光免疫染色によって識別するための実験条件の設定を終えた。</p> <p>遺伝子発現解析においては、Brca1 ヘテロ欠損個体で生じる放射線影響を評価するための準備を行った。BRCA1 が転写調節因子として機能する標的遺伝子の推定のため高線量率照射後の乳腺組織を準備したほか、放射線被ばく後数日の遺伝子発現の評価のために、高線量率照射および低線量率照射後の乳腺組織を準備した。</p> |
| 2 年目  | 令和5年度は、放射線を照射し一定時間後に回収した乳腺組織 (令和4年度に収集) の蛍光免疫染色を行い、非照射時の DNA 二重鎖切断 (53BP1 フォーカス) 数及び照射後の 53BP1 フォーカスの減少動態を解析した。その結果、Brca1 ヘテロ欠損個体では非照射時の乳腺上皮細胞における DNA 二重鎖切断数は野生型と比較し有意に多かった。さらに BRCA1 が関与する相同組換え修復が生じる 6~24 時間後の DNA 二重鎖切断数は野生型よりも Brca1 ヘテロ欠損個体で多い傾向が観察された。この結果から Brca1 遺伝子に変異があることで DNA 二重鎖切断の相同組換え修復が減弱している可能性を示唆した。また、低線量率照射による DNA 二重鎖切断数は野生型および Brca1 ヘテロ欠損個体においてほとんど増加しなかった。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 令和5年度 | <p>さらに、Brca1 遺伝子の転写調節機能に関連する遺伝子発現への影響を解析するため、乳腺組織から抽出した RNA のシーケンス解析を行い、高線量率被ばく後 24 時間後の発現変動遺伝子の抽出およびその機能のバイオインフォマティクス解析を実施した。Brca1 の下流で機能し細胞周期制御に関わる一部の遺伝子の発現が野生型では被ばく後に有意に上昇していたが、Brca1 ヘテロ欠損個体では変化が確認されないなど、Brca1 遺伝子欠損による効果が認められた。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 3 年目  | 令和6年度は、放射線を照射し一定時間後に回収したラット乳腺組織 (令和4年度に収集) から抽出した RNA のシーケンス解析を行い、放射線被ばく後の発現変動遺伝子の抽出およびその機能のバイオインフォマティクス解析を実施した。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 令和6年度 | 放射線被ばく後 10 日における Brca1 ヘテロ欠損個体の乳腺組織では炎症に関する遺伝子の発現が有意に増加した。さらに Brca1 ヘテロ欠損個体の乳腺組織においては低線量率被ばくでは高線量率被ばくに比べ炎症に関わる遺伝子の発現が有意に低く、炎症が乳腺内腔細胞の近傍で生じていることを蛍光免疫染色法で確認し                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|  |                                                                                                                                                                                                         |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | た。また、すでにデータベースで公開されている BRCA1 が転写調節因子としての標的になり得る遺伝子は 1757 個あるが、そのうち 11 遺伝子が高線量率の放射線被ばくによって遺伝子発現の変動を示した。そのうち Brca1 ヘテロ欠損個体で発現が減少していた乳腺分化に関する一遺伝子について組織中の局在を検討したところ、野生型と Brca1 ヘテロ欠損個体ともに内腔細胞に局在することを確認した。 |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### 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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>本研究ではラット乳腺組織中の異なる種類の乳腺上皮細胞（基底細胞、内腔前駆細胞、内腔成熟細胞）を多重蛍光免疫染色法により区別する手法を用いて、DNA 二重鎖切断を示す 53BP1 フォーカスの解析により Brca1 ヘテロ欠損個体では放射線非照射時の乳腺上皮細胞における DNA 二重鎖切断数は野生型と比較し有意に多いことを明らかにした。また、低線量率被ばく（0.05 Gy/min）による DNA 二重鎖切断数は野生型および Brca1 ヘテロ欠損個体においてほとんど増加しなかった。BRCA1 は DNA 二重鎖切断の相同組換え修復に関与するタンパク質である。本研究においては BRCA1 が関与する相同組換え修復が生じる 6～24 時間後の DNA 二重鎖切断数は野生型よりも Brca1 ヘテロ欠損個体で多い傾向が観察され、これは Brca1 遺伝子の変異により正常な DNA 二重鎖切断の修復が行われていない可能性を示唆している。</p> <p>さらに遺伝子発現解析により、Brca1 ヘテロ欠損個体では低線量率放射線よりも高線量率放射線で炎症が促進されることを示唆した。放射線は細胞の DNA に二重鎖切断を誘導し、それが細胞の増殖を停止させ細胞老化を引き起こす他、老化細胞からは炎症性サイトカイン等の因子が放出し炎症を加速させることが知られている。炎症性因子は周囲の組織の慢性炎症を引き起こしそれが発がんの一要因であることが示唆されている。本研究では Brca1 ヘテロ欠損個体では非照射時から DNA 二重鎖切断数は野生型と比較し有意に多かったことから、そのような DNA 二重鎖切断数の違いにも炎症が関与する可能性がある。</p> <p>主任研究者の本体研究では Brca1 ヘテロ欠損個体においては高線量率被ばくよりも低線量率被ばくで発がん率が低いことを大規模な動物実験において明らかにした。本若手研究によって高線量率放射線被ばく後に炎症が生じることが明らかとなったが、これが Brca1 ヘテロ欠損個体における発がんメカニズムの一つの候補である。</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### ② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

|      |
|------|
| 特になし |
|------|

#### ③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

|      |
|------|
| 特になし |
|------|

### 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

|                                              |
|----------------------------------------------|
| 若手研究におけるメカニズム研究では、低線量率被ばくに比べ高線量率被ばくで炎症に関わる遺伝 |
|----------------------------------------------|

子の発現が有意に増加することを **Brcal** ヘテロ欠損乳腺組織において確認した。本体研究で明らかとなった「低線量率被ばく後の発がん率が高線量率被ばくよりも低い」ことのメカニズムとして、若手研究で見出した炎症が関与する可能性がある。そこで、炎症が関与する **Brcal** ヘテロ欠損ラットの放射線による発がんの機序をさらに詳しく明らかにすることを新たな研究課題として提案したい。

まず、若手研究で実施した遺伝子発現解析は、組織全体から抽出した **RNA** を用いたため遺伝子が上皮細胞、間質細胞、脂肪細胞のいずれかで発現しているか特定には至っていない。そこでシングルセル解析により、個別の遺伝子発現プロファイルを細胞ごとに取得する。

また、我々が作製した **Brcal** ヘテロ欠損ラットは高線量率の放射線で発がんが誘導される。動物実験を通じて放射線により発がんを誘導した後、動物に抗炎症剤を投与することで炎症が改善し発がんが抑制されるか否か、検討を行いたい。以上の研究提案は、**Brcal** に変異を持つ乳がん患者に対するがん予防的治療法の確立につながる可能性のある基礎的研究である。

## 引用文献

- 1) K Nagata, M Nishimura, K Daino et al., Luminal progenitor and mature cells are more susceptible than basal cells to radiation-induced DNA double-strand breaks in rat mammary tissue, *Journal of Radiation Research*, Volume 65, Issue 5, September 2024, Pages 640–650.