

# 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 | 低線量被ばくによる発がん高感受性臓器のがんに至る細胞動態解明 |
| 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 | 飯塚 大輔 | 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研究所<br>放射線影響予防研究部老化・炎症研究グループ・グループリーダー |
| 分担研究者 |       |                                                                |
| 若手研究者 |       |                                                                |

## 1. 研究の概要

東京電力福島第一原子力発電所事故以来、特に子どもの被ばくによる将来的な健康影響（殊にがんリスクの上昇）が特に近隣住民に大きな不安材料として残されている。環境省「放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料」でも 100 mSv (mGy) 未満では発がんリスクを検出することが難しいと書かれており、このことはこれまでの研究成果では不十分で、100 mGy 以下の被ばくによる発がんリスクについてのさらなる研究が求められているといえる。低線量被ばく影響の全貌はいまだ明らかとなっていないが、疫学だけでは低線量リスクを完全に明らかにするには困難であることから、生物学の成果との統合が必要であると考えられている。発がんメカニズムに基づく低線量被ばくリスクの解明が求められている<sup>1)</sup>。放射線発がんのメカニズム解明は、主に放射線発がんの「痕跡」（放射線被ばく特異的ゲノム変異）を探すアプローチで行われている。しかしながら、チヨルノーベリ原発事故後に見られたヒト小児甲状腺がんでも明確な痕跡にたどり着いてはいない<sup>2)</sup>。また、これらのことは、ゲノム変異以外のアプローチ、すなわち細胞の増殖速度や自己複製能などのがんを構成する個々の細胞の特徴や細胞同士の相互作用（細胞競合）の解析が放射線発がんメカニズムの解明に重要であることを示唆している。

主任研究者はこれまでに、放射線発がんリスクの高い乳腺において、放射線被ばくからがんに至る細胞動態（細胞増殖、細胞分化、細胞競合など）を捉えることが可能な細胞系譜追跡実験を用いることで、時間と共に拡大するクローンが 100 mGy の被ばくで縮小すること、細胞が分化異常を起こすことを見出した。

本研究では、放射線発がん感受性の高い乳腺と肺に注目し、細胞系譜追跡により 100 mGy やそれ以下の低線量被ばく後のがんに至る細胞動態を明らかにすることを目的とした。

## 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    | 本研究は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構千葉地区遺伝子組換え実験安全委員会（番号：H29-03-6）および動物実験委員会（番号：20-1014-2）の承認を得て実施した。 |
| 令和4年度   |                                                                                           |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | <p>実施項目 1. 乳腺の低線量被ばくによる細胞動態解析</p> <p>細胞系譜追跡実験では乳管を形成する 2 種類の内腔および基底細胞の細胞動態を、ケラチン 8 もしくはケラチン 14 の遺伝子プロモーターを用いて追跡した。</p> <p>「(1) 発がん感受性系統における放射線誘発クローン拡大変化の解析」について、先行研究では乳がんになりにくい C57BL/6 等のマウス系統を用いた。そのため、乳がんになりやすい BALB/c 系統への戻し交配を 10 回行った。BALB/c 系統へ 5 回の戻し交配を行ったマウスを用いた被ばく後 12 週までの検討を行い、クローン拡大が被ばくにより抑制される既存の結果との比較検討を行うことで、BALB/c 系統で特徴的な細胞動態の有無を明らかにした。</p> <p>実施項目 2. 放射線発がん感受性の高い臓器肺の低線量被ばくによる細胞動態解析</p> <p>「(1)細胞標識の条件検討」では、すべての細胞で発現する Rosa26 遺伝子に着目し、この遺伝子プロモーターの下流で CreERT2 が発現するマウスを用いた。肺における標識効率の至適な条件を見出すために、BALB/c 系統に 5 回の戻し交配をおこなったマウスのタモキシフェン濃度、投与時期、投与回数等の条件検討を行った。</p>                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 2 年目    | <p>本研究は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構千葉地区遺伝子組換え実験安全委員会（番号：H29-03-7）および動物実験委員会（番号：20-1014-3）の承認を得て実施した。</p> <p>実施項目 1. 乳腺の低線量被ばくによる細胞動態解析</p> <p>「(2) クローン増殖変化と前癌病変の関連の証明」について、令和 4 年度の研究により BALB/c 系統での被ばく後 12 週までのクローン増殖の変化を見出した。しかしながら、発がんメカニズム解明という目的を達成するためには、このクローン増殖の変化が異形成や過形成等の前癌病変に進展するかどうかの証明が必要であった。これを証明するため、被ばく後、中長期（12 週間以上）のクローン増殖の変化と病理組織学的変化の解析を開始した。「(3)クローン増殖分子メカニズム解明」では、先行研究において、被ばくによりクローン拡大の抑制と細胞の分化異常があることを見出した。この分子メカニズム明らかにするために遺伝子やタンパク質の発現解析を行った。「(4)系統差を利用した発がん関連メカニズムの絞り込み」では先行研究でおこなったオリジナルの系統と BALB/c 系統との比較により、発がんのどの段階に遺伝因子が関与しているかを明らかにすることができると考えられた。クローン増殖の変化や遺伝子発現の変化を解析した。</p> <p>実施項目 2. 放射線発がん感受性の高い臓器肺の低線量被ばくによる細胞動態解析</p> <p>「(1)細胞標識の条件検討」では、昨年度に引き続き、肺における標識効率の至適な条件を見出すために、前述のマウスのタモキシフェン濃度、投与時期、投与回数等の条件検討を行った。「(2)クローン拡大の解析」では、(1)で確定させた実験条件を用い、放射線被ばく後、経時的に各種臓器を採取し、単一の蛍光たんぱく質で標識された細胞集団からなる、クローン性増殖の変化を探索した。</p> |
| 令和 5 年度 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 3 年目    | <p>本研究は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構千葉地区遺伝子組換え実験</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 令和 6 年度 | <p>安全委員会（番号：H29-03-7）および動物実験委員会（番号：20-1014-3）の承認を得て実施した。</p> <p>実施項目 1. 乳腺の低線量被ばくによる細胞動態解析</p> <p>「(2) クローン増殖変化と前癌病変の関連の証明」では、被ばく後、中長期（12 週間以上）の観察を行い、単一の蛍光たんぱく質で標識された細胞集団からなる、クローン性増殖や形態学的に正常な乳管構造とは異なる過形成等を探索した。さらに、放射線誘発乳がんリスクが高い BALB/c-<i>Trp53</i><sup>+/+</sup> 系統においても細胞系譜追跡を行った。「(3) クローン増殖分子メカニズム解明」では過去に、被ばくによりクローン拡大の抑制と細胞の分化異常があることを見出した。この分子メカニズムを明らかにするために主に遺伝子発現解析を行った。「(4) 系統差を利用した発がん関連メカニズムの絞り込み」では乳がんになりにくいオリジナルの系統と BALB/c 系統との比較により、発がんメカニズムを明らかにできると考えられ、クローン増殖の変化や遺伝子発現の変化を解析した。「(5) 住民の不安等軽減に資する取り組み」では、得られたデータのヒトへの外挿を目指し、当事業内の横のつながりを活かしてシミュレーションに取り込む方向性を検討した。</p> <p>実施項目 2. 放射線発がん感受性の高い臓器肺の低線量被ばくによる細胞動態解析</p> <p>「(2) クローン拡大の解析」では、前年度までに確定させた実験条件を用い、放射線被ばく後、経時的に肺を採取し、単一の蛍光たんぱく質で標識された細胞集団からなる、クローン性増殖の変化を探索した。</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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>実施項目 1(1)では、マウス 5 系統の BALB/c 系統への 10 回の戻し交配を完了させた。BALB/c 系統への 5 回の戻し交配を行ったマウスを用いると、基底細胞、内腔細胞どちらも、12 週後の非被ばく群ではオリジナルの系統と同様にクローンが拡大していた。2 Gy 被ばくでは、オリジナルの系統と同様に大部分のクローンが抑制されたが、一部は被ばくしても拡大していた。</p> <p>実施項目 1(2)について、基底細胞の細胞動態は、非被ばく群ではオリジナルの系統も BALB/c 系統も時間経過とともに、クローンが拡大していた。2 Gy 被ばくでは、オリジナルの系統ではクローン拡大が抑制されると、それが被ばく後 48 週まで抑制された。一方で、BALB/c 系統では、大部分のクローン拡大が抑制された後、再拡大していた。内腔細胞の細胞動態は、オリジナルの系統では、前述の基底細胞と同様に、被ばくによりクローン拡大が抑制されたが、BALB/c 系統では、それが観察されなかった。これらのクローン拡大と前癌病変との関連は解析できた限りでは見いだせなかったが、網羅的な遺伝子発現解析から、乳腺全体として発がんの方向に進んでいることが示唆された。</p> <p>実施項目 1(3)について、細胞周期進行に関わる p16 遺伝子発現はオリジナルの系統では被ばく後 8 週で増加したが、BALB/c 系統では、同様の傾向はあるものの、一部の乳腺で増加は観察されなかった。網羅的解析により、オリジナルの系統では被ばく後 4 週で細胞分化を含む、発達過程を調節する遺伝子群の変化が観察された。</p> <p>実施項目 1(4)では、オリジナルの系統に比べ BALB/c 系統で被ばくにより細胞外マトリックスなど</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

の周囲環境の変化が示唆された。実施項目 1(5)では、本研究で得られたデータをシミュレーションに取り込む方向性を検討した。「クローン拡大の線量依存性」の要素をモデルに取り込んで行くべきと考えられた。

実施項目 2(1)では、肺のクローンの観察のためのタモキシフェンの投与濃度や回数を確定させた。実施項目 2(2)では、長期にわたる被ばくによる細胞動態解析を行ったところ、被ばく後 24 週において、4 Gy 被ばくしても拡大を続ける一部のクローンが観察された。

以上より、BALB/c 系統ではごく一部、高線量被ばくにより長期間にわたり拡大するクローンが観察され、これが発がんに関与する可能性が示唆された。

## ② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

3 年目の令和 6 年度は、放射線誘発乳がんリスクが高い BALB/c-*Trp53*<sup>+/-</sup>マウスにおいても細胞系譜追跡を行った。この実験では、乳腺基底細胞の既存の細胞系譜追跡のマウスに、*Trp53* 遺伝子の変異をもった BALB/c-*Trp53*<sup>+/-</sup>マウスと掛け合わせて実験用のマウスを得る必要があり、十分な結論を得るだけのマウスを作出することができなかった。引き続き、マウスの作出を行い、乳がんまでの細胞動態を捉えるとともに、内腔細胞の細胞系譜追跡でも同様の *Trp53* 遺伝子に変異を持つ状態で行うことで、内腔細胞と基底細胞のどちらが放射線誘発乳がんの起源になるのか明らかにできると考える。

## ③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

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

前述の通り、本研究においては、BALB/c 系統ではごく一部、乳腺と肺で高線量被ばくにより長期間にわたり拡大するクローンが観察されたが、被ばくしても拡大を続けるクローンががんの起源なのかどうかは明らかになっていない。乳がんに加え、肺がんの発がん感受性も高い BALB/c-*Trp53*<sup>+/-</sup>マウスでの細胞系譜追跡により、このマウスに生じたがんでラベルされた細胞の存在を明らかにすることが必要であると考えられる。これが実現されると、未だ不明な点の多い、放射線誘発乳がんおよび肺がんにおける起源細胞が明らかになることが期待される。

また、がんに至る細胞動態が明らかになると、生じたがんに加え、被ばく後の様々な段階におけるクローンのゲノム解析を行うことで、放射線発がんに特徴的なゲノム変異の有無を明らかにできると考えられる。一方で、このゲノム変異が見つからない場合は、がんの起源細胞の周囲環境（慢性炎症）の役割を明らかにすることが必要であると考ええる。それは、がんの起源細胞のゲノム変異ではなく、全身性の炎症が放射線被ばくで引き起こされ、がんが発生しやすい状態を作っているという考え方が提唱<sup>3)</sup>されているからである。

さらに、本研究で見出された、被ばくによるクローン拡大の変化でヒトの発がんリスクを外挿できるのかの検証が必要である。様々な線量での細胞動態を明らかにし、それをヒトの放射線発がんに関する数理モデルのパラメーターとして適用していくことが求められる。

## 引用文献

- 1) NCRP 2015. Health Effects of Low Doses of Radiation: Perspectives on Integrating Radiation Biology and Epidemiology. *NCRP Commentary No. 24*, 2015.
- 2) Morton LM, Karyadi DM, Stewart C, et al. Radiation-related genomic profile of papillary thyroid carcinoma after the Chernobyl accident. *Science*, 2021; 372: eabg2538.
- 3) Nakamura N. A hypothesis: radiation carcinogenesis may result from tissue injuries and subsequent recovery processes which can act as tumor promoters and lead to an earlier onset of cancer. *Br. J. Radiol.*, 2020; 93: 20190843.