

成体期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響と メカニズム解明

主任研究者：鈴木 啓司（国立大学法人長崎大学 原爆後障害医療研究所

放射線災害医療学研究分野 准教授）

分担研究者：柿沼 志津子（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

放射線医学総合研究所 放射線影響研究部 部長）

研究要旨

本研究は、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的として計画された。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた実験系により証明することを目指した。低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む小児期（1 週齢）での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と終生飼育により追跡し、同時に、発がんのプロセスを、組織における DNA 障害、細胞死、細胞老化、炎症、を含む組織微小環境の変化から解析し、放射線照射直後から微小がんあるいはがん成立までの各プロセスでの DIO の影響を統合的に解析する。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究には、長崎大学および放射線医学総合研究所（放医研）の 2 機関が参画し、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当した。放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射（100 mGy および 4 Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当した。放射線照射は B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、60%脂肪食を与えて飼育し、その後、通常食に戻して生涯飼育を行った。定期的に採取した組織標本は、作成した病理切片を長崎大に送付して、組織微小環境の解析に供した。組織微小環境の解析は、特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色法により実施した。

令和 2 年度は、1 週齢で照射したマウスを、累積の飼育日数で 1,000 日を超える期間、飼育および観察を継続した。このうち、高脂肪食は、20 週齢から 24 週齢まで与え、体重の一時的な増加を認めていたが、通常食に戻してから 4 週間には通常の体重に戻り、その後の観察期間でも通常食群との違いは認められなかった。一方、放射線照射群では、4 Gy 照射群で、生涯にわたる顕著な体重減少を認めたが、100 mGy 照射群の体重変化は、非照射群と同様であった。

生存率について検討したところ、4 Gy 照射群でコントロールと異なる有意な減少を認め、飼育開始 100~200 日頃から胸腺リンパ腫による生存率の減少が観察された。飼育日数が 500 日を超えると、再び生存率の低下が促進され、この時期には肝腫瘍の発生が確認された。4 Gy による発

がんによる生存率の低下は、成体期の高脂肪食の摂取によって変化する事はなかった。また、100 mGy 照射群は、コントロールと同様の生存率を示した。

組織微小環境の解析から、血清中の総コレステロールの一時的な増加に加え、高脂肪食の摂取による影響は肝臓において主に認められ、PLIN2 陽性脂肪滴の顕著な蓄積が確認された。その後、脂肪滴の蓄積は改善されたが、飼育日数が進むにつれ、コントロール群でも脂肪滴の蓄積が認められるようになり、放射線照射（4 Gy のみ）によって脂肪滴の蓄積が促進する事が明らかになった。さらに、脂肪滴の蓄積に連動して肝細胞の巨核化や増殖性の亢進が認められ、当初予想した炎症性反応の関与は認めなかったものの、放射線照射による脂肪性障害が、肝腫瘍発生の背景にある事が示唆された。

以上の結果から、1) 成体期の一時的な肥満は、小児期の放射線照射による発がんリスクを増加させない事、2) 100 mGy の低線量放射線には、過剰な発がんリスクは認められない事が明らかになり、3) 放射線発がんには組織老化の早期化に関わっている新モデルが提唱された。

キーワード：放射線、低線量、発がん、生活習慣、組織反応

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱くことになった。事故から 10 年がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるに従い、専門家会議の中間取りまとめでも、また本年公開された UNSCEAR 報告書でも、福島県および福島近隣県において、発がんリスクの有意な増加はないと結論づけている。しかしながら、原発事故後の被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、事故当時に小児期を過ごした子供たちの生活習慣等の変化が、放射線発がんリスクを修飾する可能性が懸念される。中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取バランス変調に基づく一時的な肥満は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要がある。健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。これまでの、小児期の肥満の影響を調査する研究により、小児期の肥満は、放射線発がんリスクに影響をおよぼさない可能性が示唆されている。今後、当時小児期にあった子どもたちは成長して、やがて青年~成人になっていくことを鑑みると、これまでの研究を補完する研究としても、小児期の被ばくの発がんリスクが、成体期の生活習慣等の変化で修飾されるか否かを明らかにする研究を実施する必要がある。福島県民、とりわけ、小児期に事故を経験した子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、子供たちの今後の生活習慣等が、小児期の低線量放射線被ばくによる健康影響におよぼす影響を対象とした研究は、極めて重要である。

このため本研究では、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的とした。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた

実験系により証明することを目指した。研究項目としては、低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む小児期（1 週齢）での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と生涯飼育により追跡し、①DNA 障害の誘発と除去、②細胞死（細胞老化）を含む初期組織反応、③組織障害の回復と炎症性反応、④初期がんと発がん微小環境、および、⑤がんの成立と進展、の各プロセスにおいて、成体期の DIO の影響を組織微小環境の変化に着目して統合的に解析を行った。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究には、長崎大学および放射線医学総合研究所（放医研）の2機関が参画し、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当し、放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射（100mGy および 4Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当した。放射線照射は B6C3F1 雄マウスの1 週齢時に行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、60%脂肪食を与えて飼育し、その後通常食に戻して生涯飼育を行った。また定期的に採取した組織標本は、病理切片を長崎大に送付して、特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色法により組織微小環境の解析を実施した。

本研究では、動物発がんモデルを用いた高脂肪食による一時的な肥満の実験系を用い、小児期被ばくによる発がんリスクが変化するかどうかを明らかにするが、その結果、肥満などの生活習慣等による自然発がん要因が低線量放射線被ばくの健康影響にどのような影響をおよぼすか評価する際に不可欠な科学的知見が得られる。とりわけ、本研究では、低線量放射線として 100 mGy の影響を評価するが、これまでの研究成果から、100 mGy 単独照射群においては、本研究が解析対象とする発がんリスクの有意な増加は認められないと予想される。本研究の成果により、100 mGy による放射線被ばくと生体期の生活習慣等とが相互作用した場合でも、発がんリスクに有意な増加が認められなければ、100 mGy 以下の低線量放射線でも、放射線被ばく単独はもちろんのこと、生活習慣等の変化があった場合でも発がんリスクの増加は予想されないと結論できる。これらにより、生活習慣等の変化により懸念される放射線発がんリスクの低減に向け、機構論に基づいた対策を可能にする科学的基盤が提供できる。

令和2年度は、1 週齢で照射したマウスを、累積の飼育日数で 1,000 日を超える期間、飼育および観察を継続した。このうち、高脂肪食は、20 週齢から 24 週齢まで与え、体重の一時的な増加を認めていたが、通常食に戻してから 4 週間には通常の体重に戻り、その後の観察期間でも通常食群との違いは認められなかった。一方、放射線照射群では、4 Gy 照射群で、生涯にわたる顕著な体重減少を認めたが、100 mGy 照射群の体重変化は、非照射群と同様であった。

生存率について検討したところ、4 Gy 照射群でコントロールと異なる有意な減少を認め、飼育開始 100~200 日頃から胸腺リンパ種による生存率の減少が観察された。飼育日数が 500 日を超えると、再び生存率の低下が促進され、この時期には肝がんの発生が確認された。4 Gy による発がんによる生存率の低下は、成体期の高脂肪食の摂取によって変化する事はなかった。また、100 mGy 照射群は、コントロールと同様の生存率を示した。

組織微小環境の解析から、血清中の総コレステロールの一時的な増加に加え、高脂肪食の摂餌による影響は肝臓において主に認められ、PLIN2 陽性脂肪滴の顕著な蓄積が確認された。その後、脂肪滴の蓄積は改善されたが、飼育日数が進むにつれ、コントロール群でも脂肪滴の蓄積が認められるようになり、放射線照射（4 Gy のみ）によって脂肪滴の蓄積が促進する事が明らかになっ

た。さらに、脂肪滴の蓄積に連動して肝細胞の巨核化や増殖性の亢進が認められ、当初予想した炎症性反応の関与は認めなかったものの、放射線照射による脂肪性障害が、肝がん発生の背景にある事が示唆された。

以上の結果から、1) 成体期の一時的な肥満は、小児期の放射線照射による発がんリスクを増加させない事、2) 100 mGy の低線量放射線には、過剰な発がんリスクは認められない事が明らかになり、3) 放射線発がんには組織老化の早期化が関わっている新モデルが提唱された。

II. 研究方法

本研究では、福島原発事故を経験した子どもたちが成長してからの生活習慣等の変化を念頭に、小児期に放射線照射を行ったマウスに、成体期に相当する期間の間、高脂肪食（通常食が 10%脂肪含有であるのに対し 60%脂肪含有餌。おおよそ 36%のカロリー増になり、15~20 歳程度の青年で換算すると、1 日あたりの標準エネルギー量である 2,300~3,100kcal に対して、2,700~3,400kcal 相当になる）を給餌し、その後、生涯飼育をすることによってがんの発生を解析する実験プロトコルを採用した（図 II-1）。具体的には、放医研において、B6C3F1 雄マウスに、小児期である 1 週齢において放射線（ γ 線（0.5 Gy/分）、100 mGy および 4 Gy）を照射し、その後、成体期に相当する 20 週齢から 24 週齢までの期間に高脂肪餌を与えて DIO を誘導し、その後通常餌に戻してから長期飼育を実施した。本研究計画で使用している B6C3F1 マウスでは、年齢増加にともなう体重変化が収束するのがおおよそ 20 週齢付近であり、この週齢は、ヒトでは、生活習慣の大きな変化が想定される 20 歳代後半から 30 歳代に相当することから、20 週齢から 24 週齢の間の 4 週間の高脂肪食給餌を設定した。

放射線照射後は一定期間毎に組織標本を採取して、組織微小環境変化の継時観察を実施した。放射線発がんの対象とするがんのタイプは、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇する、リンパ腫、肝がん、および肺がんであるため、これらの臓器・組織を採取し、その後薄切切片を作成し、抗原賦活化の後に蛍光免疫染色法による DNA 障害、細胞死、炎症反応や組織微小環境の解析に供した（図 II-2）。

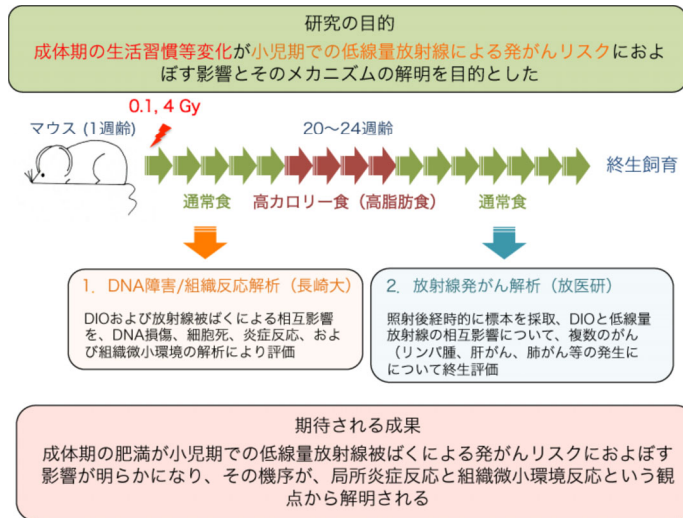


図 II-1. 研究概要図

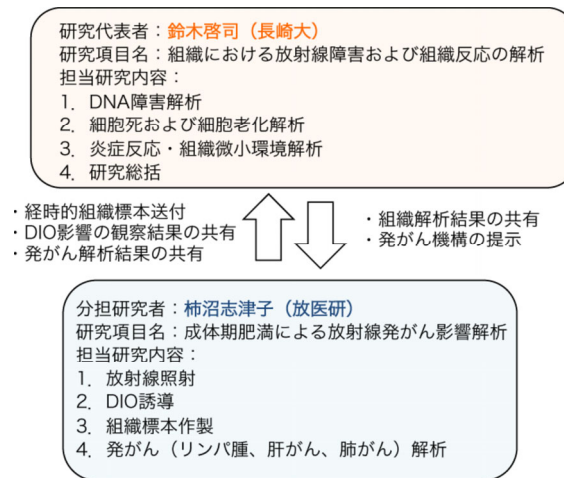


図 II-2. 研究組織間の連携図

DIO を誘導するための高脂肪餌としては、Research Diet 社の D12492 を用いた。D12492 は、カロリーの 60%が脂肪に由来し、残りの 20%ずつが蛋白質と炭水化物の飼料である。単位重量あたりのカロリー量は、コントロール餌 (D12450J、10%脂肪) に比べおおよそ 140%増加しており、多くの DIO 研究の標準飼料として汎用されているものである。一方、通常餌には、脂肪含有率が 10%以外は同じ組成の餌を用いた。

1. 組織における放射線障害および組織反応の解析

DIO あるいは放射線による組織障害あるいは組織微小環境変化を定量的に評価するため、採取された胸腺・脾臓、肝臓、肺および脂肪組織を、ホルマリン中で固定した後にパラフィン中に包埋し、薄切標本（厚さ $4\mu\text{m}$ ）を作成して解析に供した。発がんの対象となる組織は、胸腺・脾臓、肝臓および肺である。スライドガラス上に固定した薄切切片は、脱パラフィン処理を施した後に PBS 中に保管し、蛍光免疫染色を実施するまでは冷蔵庫中で保存した。

標本の染色を行う当日に、賦活化溶液中で 95°C のウォーターバスに 40 分間浸け、抗原の賦活化を行った。その後、5%skim milk を含む TBS-T（0.5%Tween-20 を含む TBS 緩衝液）に一次抗体を希釈して、標本切片と 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後、PBS で十分に洗浄した後、二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa 蛍光標識抗体を用いた。標本は、 $1\mu\text{g/ml}$ の DAPI を含む 10%グリセリン PBS 溶液中で封入して保存した。作成した標本は、蛍光顕微鏡下で観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システムにより一次抗体のシグナルを解析した。

一次抗体としては、DNA 損傷の検出には、抗 53BP1 抗体（Bethyl、A300-272）を、組織障害および回復の解析には、抗 Ki-67 抗体を検討した。炎症反応は、組織におけるマクロファージ、好中球および樹状細胞の浸潤を、これらの細胞に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した。細胞死は、アポトーシスの誘導および老化様細胞死の誘導を、また、組織微小環境は、上皮細胞および間葉系細胞を細胞骨格系蛋白質に対する特異的抗体によって、さらに微小血管やリンパ管は、血管内皮細胞あるいはリンパ管内皮細胞に対する特異的抗体によって可視化した。

2. 成体期肥満による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期（1 週齢）に放射線照射（ γ 線、 100mGy および 4Gy 、線量率は 0.5Gy/min ）を行った。その後、通常餌で飼育を行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、高脂肪食（60%脂肪食）を与えて飼育し、その後、再び通常食に戻して生涯飼育を実施した。

生涯飼育を行う群は、 0Gy 、 100mGy 、および 4Gy 照射群の 3 群を、それぞれ通常脂肪食と高脂肪食で飼育し、合計 6 群を設定した。1 群は 60 匹で、発がんを観察する終生飼育用には計 360 匹を使用した。飼育観察および体重測定を継続し、がんの発生および病状の悪化が認められるマウスについては解剖し、病理サンプルの保存および解析を行った。成体期の肥満の影響は、リンパ腫、肝がん、および肺がんに着目して、各実験群における生存率の減少動態の違いを比較することにより評価した。

3. 統計解析

解析標本は、最低 3 匹の個体より採取したサンプルを用いた。群間差の有意差検定には、Student's *t*-test を用い、一方、マウスのグループ間の生存率の差は log-rank test により有意差を検定した。いずれも、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

（倫理面への配慮）

本研究計画では、動物実験は、放医研において実施する。このため、以下に記述するように、

動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた（承認番号 18-1003）。また、長崎大学では、各所において作成された組織切片を用いた解析のみを行うため、動物実験委員会等の承認は不要である。放医研においては、動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた上で、動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「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」および「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実験を行った。

III. 研究結果

1. 組織における放射線障害および組織反応の解析

放射線による組織障害あるいは組織微小環境変化、およびこれらに対する DIO の影響を定量的に評価するため、採取された胸腺・脾臓、肝臓、および肺組織において、蛍光染色法による組織反応の解析を行った。

1-1. 成体期の一時的な肥満に対する組織反応

同一の個体から採取された胸腺・脾臓、肝臓、肺および脂肪組織において組織反応の検討を行ったところ、20 週齢から 4 週間の一時的な高脂肪食の給餌により、顕著な変化が認められたのは、肝臓における脂肪性障害であった。そこで、脂肪の蓄積により肝細胞内に生じる脂肪滴の構成蛋白質であるペリリピン 2 (PLIN2) を抗体を用いて可視化した。通常食で飼育した 20 週齢のマウス肝臓では、PLIN2 陽性の細胞は、類洞と肝細胞との間に存在するディッセ腔に位置する肝星細

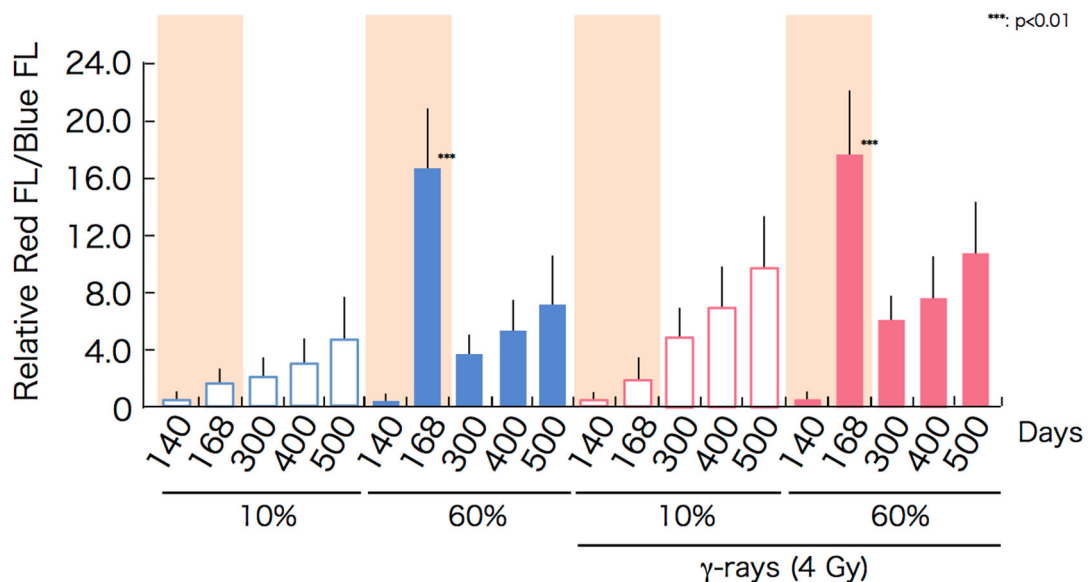


図 III-1 脂肪滴蓄積の経時変化

DAPI (Blue FL) あたりの PLIN2 蛍光値 (Red FL) を相対値として表した。横軸の数字は飼育日数を示している。白抜きバーは通常餌の結果を表し、青はコントロール、赤は 4 Gy 照射群で得られた結果を示す。また、橙色のエリアは、20 週齢から 24 週齢の高脂肪食を摂餌した期間である。

胞（Hepatic stellate cell : HSC）のみで検出された。一方、高脂肪食摂餌後は、肝細胞の細胞質に微細な脂肪滴の蓄積が観察された。そこで、細胞あたりの脂肪滴の蓄積を評価するために、任意のエリアの肝細胞数を DAPI で定量し、それに対する PLIN2 の蛍光値を測定した（図 III-1）。

その結果、20 週齢から 24 週齢の高脂肪食を給餌した 4 週間期間では、脂肪滴の蓄積が急激に進行し、極度の脂肪肝の状態になっている事が明らかになった。しかしながら、その 4 週間後には、コントロールとほぼ同程度の状態にまで改善し、その後は、500 日までの観察期間で、やや増加している傾向は認められるものの、一時的な高脂肪食の摂餌の影響は一時的である事が判明した（図 III-1）。

1-2. 放射線照射と一時的肥満との組織反応における相互作用

放射線による組織障害に対する組織反応と、一時的な高脂肪餌給餌による影響との相互作用を検討するために、放射線照射群と非照射群との比較も行った（図 III-1）。非照射マウスの通常食給餌でも、飼育日数が増えるにつれて肝臓の一部に脂肪滴の蓄積を確認するようになるが、4 Gy の γ 線照射マウスでは、PLIN2 陽性の微小脂肪滴が充満した肝細胞がクラスター状に局在する状態が、肝臓の全体で無数に観察されるようになった。組織学上、これらのクラスターの分布は、主に中心静脈周辺に分布する事が明らかになり、放射線照射によって、脂肪滴の蓄積が明らかに促進されている事がわかった。高脂肪食摂餌群でも、放射線照射による脂肪滴蓄積の促進は認められたが、一時的な高脂肪食の影響は、長期的には認められなかった。図 III-1 に示す数値の比較から、コントロールの数値と同程度の数値は、照射群では、飼育日数で 100 日前と同等であるため、放射線照射によって、肝臓の脂肪性障害が 100 日程度早期化したと考える事ができる。

肝臓では、照射後 500 日を超える飼育日数あたりから肝腫瘍の発生が認められる。初期の肝腫瘍は Ki-67 陽性細胞による増殖性の微小クラスターとして組織中に検出されるが、興味深い事に、これら増殖性クラスターは、脂肪滴を蓄積した脂肪性障害が顕著な領域に局在し、当該領域には、巨核細胞や多核細胞が高頻度に混在する事も観察された。肝細胞における脂肪性障害は、アディポサイトカイン遺伝子等の発現制御に変調をもたらし、増殖性反応を惹起するのではないかと考えられ、その結果、多倍体の肝細胞が増加し、そのような細胞の中に倍数性を減少させる細胞が出現して肝腫瘍の細胞に変化していくのではないかと想定される。

肝臓の脂肪性障害は、ヒトでは非アルコール性脂肪性肝障害（NAFLD）として知られ、肝炎の前段階として位置づけられている。そこで、代表的な炎症性細胞であるマクロファージの局在をマクロファージのマーカーである F4-80 を指標に検討した。その結果、F4-80 陽性のマクロファージは、もともと肝臓内に常駐している事が確認できたが、その数は、高脂肪食の摂餌や放射線照射による脂肪性肝障害で増加する事はなかった。活性化マクロファージのマーカーである Iba-1 についても検討を行ったが、同様に、高脂肪食や放射線照射により一時的に脂肪滴を蓄積した肝組織において Iba-1 陽性細胞の増加は認められなかった。以上の結果から、マウスにおける肝腫瘍の発生に炎症性反応が関わっている可能性は低く、放射線発がんにおける炎症性反応の位置づけを再考する必要があるかもしれない。

2. 成体期肥満による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスの小児期（1 週齢）において放射線照射（ γ 線、100 mGy および 4 Gy、線量率は 0.5 Gy/min）および成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢の間に高脂肪食（60%脂肪食）を与えたマウスを累積の飼育日数で 1,000 日を超える期間、飼育および観察を継続した。その結果、小児期（1 週齢）に高線量放射線照射（ γ 線 4 Gy 全身照射）を受けた群は、照射後に有意な体重低下を示しただけでなく、その後も長期にわたり体重の減少傾向を示す事がわかった。一方、成体期（20 週齢から 24 週齢）の高脂肪餌摂取により顕著な体重増加は、24 週齢以降、通常餌に戻した飼育により改善したが、その後も高脂肪食摂取による影響は認められず、一時的な現象である事が明らかになった。低線量（100 mGy）照射群においては、一切の体重変化は認められずコントロールと同じ挙動を示した。

放射線によるがん発生の検討では、小児期（1 週齢）に高線量被ばく（ γ 線 4 Gy 全身照射）を受けた群では、照射後 100～200 日において早期に胸腺リンパ腫の発症を認めた。しかし、発症頻度は、高脂肪餌給餌群と通常餌給餌群との間に差はなく、同様の発症傾向が認められた。また、飼育日数が、500 日を超える付近から、再び生存率の低下が確認され、この時期には肝腫瘍の発生が認められた。4 Gy による発がんによる生存率の低下は、成体期の高脂肪食の摂取によって変化する事はなく、成体期の一時的な肥満は、生涯の発がんリスクを変化させない事が明らかになった。一方、100 mGy 照射群は、コントロールと同様の生存率の挙動を示し、飼育日数で 600 日を過ぎたあたりから両群で低下が観察されるようになってきた。コントロールおよび 100 mGy 照射群での生存率の低下は、肝腫瘍の発生によるものであるが、その発生率は両群間で違いは認められず、以上の結果から、100 mGy 照射は発がんリスクを増加させないと結論できる。

IV. 考察

放射線および一時的な肥満による発がんへの影響を、生涯飼育による観察と組織障害および組織微小環境の変化を定量的に評価する事により解析した。その結果、飼育日数で 1,000 日を超える期間の観察により、4 Gy 照射群では、生存率が 5%近くまで減少した。生存率の減少はがんの発生によるもので、照射後 100 日を超える飼育日数では胸腺リンパ腫が、飼育日数 500 日を超えるあたりからは肝腫瘍の発生が認められ、放射線による発がんの大半のケースを観察する事ができた。4 Gy 単独照射群と高脂肪食を摂取した群では、生存率の減少動態に明らかな差を認めず、成体期の一時的な肥満が、生涯の発がんリスクに影響をおよぼさない事が明らかになった。20 週齢から 24 週齢までの 4 週間の高脂肪食の摂取は、明らかな脂肪肝の状態をもたらしたが、その後 4 週間程度でその状態は解消し、その結果、長期間に渡るような影響にはならなかったと結論できる。したがって、福島原発事故後の生活環境や生活習慣の変化により、肥満の状態がもたらされたとしても、その後状態が改善される事によって発がんリスクを高める要因にはならないといえる。

高線量（4 Gy）照射により明らかながん誘発が認められるのに対し、低線量（100 mGy）照射群では、コントロール群との差は観察されなかった。コントロール群でも、飼育日数で 600 日を超える頃から生存率に低下が認められるが、これは、肝腫瘍の発生によるもので、その発生率は両

群間で同等であった。この結果から、100 mGy 照射は、自然の発がん率に影響をおよぼさないと結論する事ができる。また、一時的に高脂肪食を摂餌した 100 mGy 照射群でも検討したが、コントロール群との有意差は認められず、成体期の一時的な肥満が、低線量の発がんリスクを増加させる事実もないと結論できる。

発がんメカニズムの解明につながる組織反応の解析を行った結果、4 Gy の γ 線照射マウスでは、照射後 300 日において、PLIN2 陽性の微小脂肪滴が充満した肝細胞が局在するクラスターが、肝臓全体で無数に観察された。もともと、脂肪滴の構成蛋白質である PLIN2 を指標にした検討から、20 週齢から 24 週齢までの一時的な高脂肪食の給餌により、肝臓では、顕著な脂肪性障害が認められたが、肝細胞における脂肪滴の蓄積は、4 週間の高脂肪餌給餌終了時から通常餌の飼育に戻す課程で急激に解消されていき、通常食 4 週間後には通常食マウス由来の肝臓とほぼ同等の PLIN2 陽性細胞のパターンに戻った。この結果から、成体期であっても、一時的な肝脂肪性障害は、その後の生活習慣を見直す事で改善できることが示されたが、その後、再び肝脂肪性障害が見られたのである。血清中の総コレステロールの測定でも同様の傾向がみられ、全身性の脂肪代謝の変調と同調している事がわかる。

興味深い事に、同様の脂肪滴の蓄積はコントロール群でも飼育日数が増加するにつれ観察されるようになった。脂肪滴を蓄積した肝細胞クラスターの分布は、主に中心静脈周辺であり、放射線照射群とコントロール群の違いは認められなかった。つまり、マウス個体の年齢が上昇するにつれ脂肪性肝障害が発症する時期が、放射線照射によって、早められている可能性が示されたのである。近年、放射線が、個体の老化を促進する事によって発がんのリスクを上昇させる可能性が提唱されており (1)、本研究で得られた結果も、その可能性を支持している。また、発がんリスクの上昇が認められなかった 100 mGy 照射群では、脂肪性肝障害の見られる時期がコントロールと同等であった事も、放射線による老化の早期化と発がんリスクの増加が相関している事を示している。従来、放射線照射により発症したがんは、放射線により“誘発“されたものと解釈されているが、以上の事に鑑みると、“早期化”と解釈する方が適当であるかもしれない。事実、チェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺がんのドライバー遺伝子変異パターンも、放射線起因のケースと散発性のケースとで顕著な差は認められず、放射線被ばくによる小児甲状腺がんは、自然発症のがんの早期化と考える事ができる (2, 3)。だとすると、過剰相対リスクなどの表現ではなく、発がんまでの潜伏期の短縮等の表現で、放射線の影響を説明する工夫が必要になる。現時点では、自然発生の肝腫瘍と、放射線誘発の肝腫瘍との違いは明らかではないが、今後両者のゲノム変異の違いなどを解析する事によって、この新仮説が正しいかどうかを検証していく事が重要であるといえる。

肝臓で観察された脂肪性障害は、ヒトで考えられる非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と同等の状態である (4)。これは、マウスでもヒトでも、肝がんに至るプロセスが共通している事を示しているが、ヒトでは、NAFLD から脂肪性肝炎 (NASH) への変遷がよく知られている。NASH は、炎症性の病変であることから、炎症反応の主導役であるマクロファージについて検討した。マクロファージには、もともと組織内に常時在中する組織球と、炎症反応により組織外から浸潤してくるマクロファージとがあり、肝臓では、組織内に常駐しているマクロファージはクッパー細胞として知られている。そこで、脂肪滴を抗 PLIN2 抗体で評価し、抗 F4-80 抗体によりマクロ

ファージを可視化して解析を行ったところ、いずれのケースでも、マクロファージは肝臓全体に疎に分布し、従来知られているクッパー細胞の分布とその数は何ら変わる事はなかった。特に、脂肪的の蓄積が見られた肝細胞クラスター周辺においても詳細な観察を行ったが、マクロファージの分布に変化はなく、以上の結果から、一時的な肥満、並びに放射線照射による脂肪性肝障害は、炎症反応を惹起する状態ではない事が明らかになった。したがって、放射線による肝腫瘍の発生には、炎症反応が主体的に関わっている可能性は低く、放射線発がんによる発症プロセスの再考が必要になった。今後、経時的に採取された組織を用いて、多面的な解析を行う事によって、発がんプロセスに関わる分子変化が見出す研究の展開が必要である。

V. 結論

高線量の 4 Gy 照射群では、照射後 100 日程度で胸腺リンパ腫が、また、500 日程度で肝腫瘍の発生を認めたが、100 mGy 照射群では、コントロールと同様の生存率が観察され、低線量放射線照射による発がんリスクの増加は認められなかった。また、高脂肪食摂餌は、一時的な肥満をもたらしたが、その結果、がんの発生が観察された 4 Gy 照射群においても、発がんリスクに影響は見られなかった。

組織微小環境の解析から、飼育日数が進むにつれ、コントロール群で、脂肪滴の蓄積が認められるようになったが、放射線（4 Gy）照射群では、脂肪滴の蓄積が顕著に促進する事が明らかになり、放射線照射による脂肪性障害の早期化が、肝腫瘍発生に関わっている事が示唆された。さらに、脂肪滴の蓄積に連動して肝細胞の巨核化や増殖性の亢進が認められ、当初予想した炎症性反応の関与は認めなかったものの、放射線発がんの新メカニズムにつながる知見が得られた。

以上の結果より、1) 成体期の一時的な肥満は、小児期の放射線照射による発がんリスクを増加させない事、2) 100 mGy の低線量放射線には、過剰な発がんリスクは認められない事が判明し、さらに、3) 放射線発がんには組織老化の早期化に関わっている新たな放射線発がんモデルが提唱された。

VI. 今後の展望

今後の展望として、得られた成果を更に発展させる研究として、まず、放射線被ばく後の発がんリスク低減に向けた介入の実証的研究が望まれる。放射線誘発肝腫瘍では、生活習慣に密接に関連する肥満（脂肪性障害）が重要なステップとして関わっている事が判明したため、脂肪性障害の発生を抑制することにより、発がんリスクの低減に繋げる対策が可能である。肥満に関連する先行研究から、いくつかの有効な手段が開発されているため、これらを、放射線発がんリスクの修飾要因として応用して放射線発がんリスクの低減を図る事が可能である事を証明する研究が望まれる。

次に、老化早期化の視点からの放射線発がんの基盤メカニズムの解明研究が必要不可欠である。放射線被ばくによるがんの発生は、放射線による発がん突然変異の誘導により”誘発”される現

象であるとこれまで解釈されてきた。そのため、放射線被ばくによる影響は、過剰相対リスクとして表現されてきたが、がんは、放射線を被ばくしていないヒト集団にも起こる疾患であり、更に、原爆被爆者において発症したがんやチェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺がんでは、発がん突然変異に明らかな放射線起因性が認められない事から、未だに放射線発がんの真のメカニズムは解明されないままになっている。本研究の成果から、肝がんの発生に関わる肝臓の脂肪性障害が、コントロール群でも起こる事から、放射線照射は自然に起こるプロセスをより早期に発症する効果があるといえる。このため、放射線発がんの基盤メカニズムは、”誘発”ではなく、自然発がんの”早期化”であるとの仮説が提唱できる。この仮説が正しければ、放射線発がんのリスクは、過剰リスクとしてではなく、寿命短縮リスクとして議論するのが妥当であることになり、また、放射線による確率的な DNA 損傷の誘発は関係ない事になるため、発がんは確率的影響ではなく、発がんの線量依存性も、直線的ではない可能性が出てくる。これらは、放射線の健康影響の理解、および放射線防護の基盤を一新する可能性があるため、放射線影響のより正しい理解のためにも、この仮説の検証を最優先に進めるべきである。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

該当なし

VIII. 引用文献

1. 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.* 92, 20190843, 2020.
2. Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Yamashita S. Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. *Cancer Sci.* 106, 127-133, 2015.
3. Suzuki K, Saenko V, Yamashita S, Mitsutake N. Radiation-induced thyroid cancers: overview of molecular signatures. *Cancers* 11, 1290, 2019.
4. Hui ST, Kurt Z, Tuominen I, Norheim F., et al. The genetic architecture of diet-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology.* 68, 2182-2196, 2018.

Analysis of the effects of life-style in adulthood on low-dose radiation carcinogenesis and its mechanism

Keiji Suzuki^{*1}, Shizuko Kakinuma^{*2}

**1Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Atomic Bomb Disease Institute*

**2Department of Radiation Effects Research, National Institute of Radiological Sciences, National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology*

Key word : Radiation, low-dose, carcinogenesis, life-style, tissue response

Abstract

After the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident in Japan, much attention has been paid for the health risks associated with annual low-dose radiation exposure. The Health Management Survey governed by the Fukushima prefecture has reported that probable radiation dose delivered to children could be sufficiently low not to cause any noticeable delayed effects. However, enormous change in the life style and the school life of children might have affected the physical and psychological condition of those affected children. In addition, as children are growing up, changes in their life-style causes related complications, one of which is an excess calorie intake. Resulted obesity must be one of the health problem that should take into consideration in relation to the estimation of radiation-induced cancer risk.

Accumulating evidences so far have implicated notable relationship between obesity and the incidence of multiple types of cancer, including thyroid cancer. However, little is known about the effect of obesity on radiation-induced cancer. Therefore, the study has intended to determine whether a temporal excess calorie intake affects the cancer risks from low-dose ionizing radiation or not. A final goal is to define the mechanisms underlying the possible interaction between an excess calorie intake in adulthood and childhood radiation exposure.

Since an excess calorie intake could cause systemic inflammation, alteration of tissue microenvironments is expected to promote radiation carcinogenesis. Therefore, B6C3F1 mice were exposed to 100 mGy or 4 Gy of gamma-rays, and experienced high fat diets between 20 and 24 weeks. Tissues/organs, including thymus, spleen, liver, and lung, were obtained from the mice, and subjected to the analyses of tissue response, which was examined by immunofluorescence.

While significant liver steatosis was observed after high fat diet, it was apparently ameliorated during the subsequent normal diet feeding for 4 weeks. The fatty liver was brought about again 300 days after 4 Gy-irradiation, and the PLIN2-positive hepatocytes were significantly increased in irradiated cases. It should be noted that fatty liver was also observed in the control mice, although it took much longer days than the 4 Gy-irradiated group. It is suggested that radiation exposure accelerated steatosis.

Over 1000 days' observation exhibited excess liver tumors in 4 Gy-irradiated mice, which was

well correlated with decreased survival. Although liver tumors were detected in the control and 100 mGy-irradiated mice, the latency periods were much longer than the 4 Gy-irradiated mice, indicating that 100 mGy did not accelerate tumor incidence.

The study provided a fundamental scientific basis towards the possible countermeasures for mitigation of any possible risks from low-dose/low-dose-rate radiation exposure, together with the mechanisms underlying the late effects of low-dose ionizing radiation.