

放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

「線量・線量率効果係数」DDREF=2の妥当性の検討

笹谷 めぐみ（広島大学・准教授）

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故以降、低線量、低線量率放射線被ばくによる発がんリスクが問題となっており、科学的根拠にもとづく放射線リスク評価が求められている。現在、国際放射線防護委員会（ICRP）では、線量・線量率効果係数（DDREF）=2を用いて低線量（率）発がんリスクの推定が行われている。しかしながら、その数値の妥当性については、現在でも議論が続けられている。

放射線発がんリスクには、遺伝的背景、生活習慣や年齢のみならず、発がんに関わる多数の標的細胞とその個々の細胞内応答機構が修飾要因として多大な影響を与えることが示されている。これらの要因が、放射線発がんリスクを指標としたDDREF値を正確に算定することを困難にし、DDREF値の多様化につながっていると考えられる。DDREF値の妥当性を検討するためには、放射線被ばくによる個々の細胞におけるそれぞれの細胞内応答の線量率効果の有無、放射線発がんへの寄与といった生物学的影響解明が必要といえる。

そこで本申請研究では、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた動物実験、最先端技術を用いた細胞・分子学的解析を行うことにより、多角的視点からDDREF値の妥当性の検討を行った。その結果、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた動物実験結果により、低線量効果係数（LDEF）と線量率効果係数（DREF）は、個別に算定する必要があるという知見を得た。さらに、DREFは、遺伝的背景により多様性を示すことが明らかにされた。

さらに、細胞・分子学的な解析から、DNA損傷修復関連因子、組み換え修復制御因子、ミトコンドリア分裂・誘導因子、細胞シグナル伝達因子等をDREF値の多様化に寄与する候補因子として同定することに成功した。

以上の結果より、DDREFは、LDEF、DREF個別に評価する必要があるといえる。また、LDEF値は2よりも低く、DREF値は多様性を示すことが明らかにされた。さらに、DREF値の多様性に影響を与える候補因子、すなわち、低線量（率）放射線発がんハイリスクな集団を抽出するための候補因子を同定することに成功した。これらの研究成果は、DDREF値の策定に寄与するための科学的知見を提供できると期待される。

キーワード：放射線発がん、線量・線量率効果係数（DDREF）、低線量効果係数（LDEF）、線量率効果係数（DREF）、幹細胞、微小環境、DNA損傷、がん関連繊維芽細胞

研究協力者

なし

I. 研究目的

ヒトにおける放射線発がんリスク評価は、広島・長崎原爆被ばく者の疫学調査から得られた知見がその基礎となっている^{1,2)}。しかしながら、低線量域での発がんリスク評価についての十分な情報が得られていないのが現状である。さらに、低線量率長期被ばくに関する高自然放射線地域住民を対象とした疫学調査では、がんの相対リスクの増加がみられないことが報告されているが、調査期間や信頼限界値などの点において最終的な結論には至っていない³⁾。現在、低線量・低線量率放射線発がんリスク評価において、ICRP では DDREF=2 を用いた低線量・低線量率放射線発がんのリスク推定が行われているが、DDREF の数値の妥当性については、現在でも議論が続いている。

そこで本研究では、独自に開発した放射線発がん高感受性モデルマウス系を発展させた放射線発がん実験から DDREF 値の算定を行い、遺伝的背景や被ばく時年齢に着目した DDREF=2 の妥当性を検討する。さらに、ヒト細胞を用いて DDREF 値の多様化に寄与する候補因子の探索を行う。将来的に、我々が明らかにした候補因子を指標とした、低線量（率）放射線発がんハイリスクな集団の抽出による低線量（率）放射線発がんリスクを個々で評価できる放射線防護体系の新規基盤確立に貢献することを目指す。

II. 研究方法

1. 遺伝子改変マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果

- 1-1. LDEF、DREF 値の検討：本研究により得られた放射線発がん実験に加え、これまで我々の研究室で得られた発がん実験結果をもとに、放射線発がんリスクにおける線量効果反応解析を行い、LDEF、DREF 値の検討を行った。更に、遺伝的背景が LDEF 値、DREF 値に及ぼす影響について検討を行った。
- 1-2. 放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析：昨年度開始した放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析を継続する。採取した小腸は、その後、ホルマリン固定、アルカリフォスファターゼ染色を行い、実体顕微鏡下観察することにより、マウス 1 匹あたりの腫瘍数の計測を行った。
- 1-3. ゲノム変異解析：昨年度の低線量・低線量率放射線発がん実験から得られた腫瘍を用いて、ゲノム変異の解析を行う。実際には、腫瘍から抽出した DNA を用いて、表 1 に示すように 18 番染色体上に存在するマイクロサテライト (Mit) マーカーと呼ばれる領域にプライマーを設計し、PCR を行った。その後、MultiNA を用いて、増幅された PCR 産物の定量を行い LOH の判定を行い、ゲノム変異の同定を行った。

表 1 ゲノム変異解析に用いた primer

Mit Marker	Position (cM)	Primer sequence
D18Mit64	4.46	Fw: TCAGATTCAGTCTAAGTCT Rv: AGCAAGAAAAGCAGGTGAGG
D18Mit64	5.84	Fw: AGCATTTTACTCCTGAACTATGTCC Rv: TTTGATTCCATTTTATACACAAAAGG
D18Mit64	18.21	Fw: ATCACAACCCCCCTACTTCC Rv: TCACGTGTTCTGTCTCCAGTG
D18Mit64	19.41	Fw: ACTGCACTGGTCCCATTTTC Rv: CAATAGTTGGAAATCAGACAGGC
D18Mit64	37.11	Fw: GGTAGGAGTCACTTTCCGTCC Rv: TTTTGTGAGCATTTTATAACCATT
D18Mit64	51.91	Fw: CTAGCATGCTTGAGGCTATGG Rv: GGAATGCCAGAGAACATGGT

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

- 2-1. 細胞と培養条件：ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 MRC-5 と TIG-3 は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団と理研細胞バンクより購入した。細胞は、細胞培養用 T25 フラスコ内で、10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した α -minimum essential medium (α -MEM) 培養液を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した。細胞は、飽和状態になる前に PBS (-) で洗浄した後に、トリプシンで処理してはがした。一部を新しいフラスコにまいて希釈して維持した。
- 2-2. 照射条件：X線照射装置（日立、MBR-1505R2）または、ガンマ線照射装置（ガンマセル 40 エグザクタ）を用いて、高線量率（0.7 Gy/min）の急性照射を行った。長期分割照射は、1 回当たり 0.01 Gy または、0.05 Gy の照射を一日 2 回、週に 5 日間行った。3 週間（21 日間）での累積線量は 1 回当たり 0.01 Gy の場合、 $0.01 \times 2 \times 5 \times 3 = 0.3$ Gy、1 回当たり 0.05 Gy の場合 $0.05 \times 2 \times 5 \times 3 = 1.5$ Gy になる。低線量率の慢性照射は広島大学原爆医科学研究所の放射性セシウム 137 を線源とするガンマ線照射装置を利用し、25 mGy、625、1250 mGy/day の線量率で 4 日間行い 累積線量 0.1、2.5、5 Gy の照射を行った。
- 2-3. 蛍光免疫染色法：細胞を照射から 24 時間後に固定して、 α -SMA の抗体（シグマ社）、Nrf2 の抗体（abcam 社）、parkin の抗体（Proteintech 社）、二次抗体 anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488、または、anti-mouse IgG Alexa Fluor 647（Invitrogen 社）を用いて蛍光免疫染色を行い、陽性細胞を定量した。蛍光免疫染色したスライドガラスは、キーエンス社 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X700 でランダムに 5~10 枚の画像を習得した。 α -SMA の解析では、100 個以上の細胞を観察し、陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。Nrf2 の解析では、Hybrid Cell Count software の画像解析ソフトを用いて、しきい値を設定して染色される領域を選び、同じ解析条

件で全ての画像を自動で解析して蛍光量を定量した。

- 2-4. 統計処理：エラーバーは標準偏差を示す。全ての実験は、少なくとも 3 回以上の独立した試料を用いて繰り返し実験を行った。エクセル統計 2012 解析ソフトを用いて、一元配置 ANOVA 後に、Dunnett 法を用いて多重比較検定を行った。

3. 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

- 3-1. ヒト iPSC 細胞株 ($p53^{+/+}$ 、 $p53^{\text{del}/+}$ 、 $p53^{\text{del}/\text{del}}$) と培養条件：本実験において iPSC 細胞は Human Episomal iPSC Line (hiPSC- $TP53^{+/+}$) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (Takara Bio) で培養し、ガンマ線の持続照射中も含めて、37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した。継代培養には 35-mm dish (Thermo Fisher Scientific)、実験培養には 384-well imaging plate Cell Carrier Ultra (PerkinElmer) を用いた。2 種類の $TP53$ 遺伝子欠損細胞株、hiPSC- $TP53^{\text{del}/+}$ (hetero-deletion mutant) と hiPSC- $TP53^{\text{del}/\text{del}}$ (homo-deletion mutant) は、 $TP53$ 正常 hiPSC から CRISPR-Cas9 と Blasticidin 耐性遺伝子の一本鎖 DNA によって、前年度までの本分担研究課題で樹立したものをを用いた。
- 3-2. ガンマ線照射条件：ガンマ線の照射には広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置されたガンマセル (¹³⁷Cs 線源、線量率：~0.9 Gy/min) および低線量率ガンマ線持続照射設備 (¹³⁷Cs 線源、線量率：~1.388 mGy/min) を用いた。
- 3-3. siRNA ライブラリーとのその導入：DNA 損傷修復と DNA 損傷応答に関わる siRNA のカスタムライブラリー (Silencer Select、Thermo Fisher Scientific、315 遺伝子) を、核酸導入 (トランスフェクション) 試薬 RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて 384-well plate に播種された hiPS 細胞 ($p53^{+/+}$ 、 $p53^{\text{del}/+}$ 、 $p53^{\text{del}/\text{del}}$) に導入した。照射を行う場合には、トランスフェクションから 24 時間培養後に、異なる条件でガンマ線の急照射あるいは持続照射を行い、それぞれの解析を行った。
- 3-4. $p53$ -LOH と細胞応答のイメージング解析：ガンマ線照射した細胞 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で固定し、0.2% Triton X-100 で処理した後、anti- $TP53$ -FL393 (SantaCruz、1:500) あるいは anti- $TP53$ -Ab-6 (Millipore、1:1000) と、anti-rabbit IgG-Alexa555 または anti-mouse IgG-Alexa488 蛍光標識抗体 (Thermo Fisher Scientific、1:2000) を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific、1 µg/ml) で蛍光標識し、全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix (PerkinElmer) で蛍光画像データを取得した。データ画像は画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer) を用いて、蛍光強度のデータから解析を行った。また、グラフ作成とデータ解析には TIBCO SpotFire (PerkinElmer) を用いた。

4. 放射線感受性の個人差の課題の検討

- 4-1. 細胞と培養条件：ヒト毛細血管拡張性運動失調症由来繊維芽細胞を SV40 ウイルスで不死化

した ATM 欠損細胞 (AT5VIBA) および ATM cDNA 導入相補した細胞 (AT5VIBA/ATM-wt)、ナイミーヘン症候群患者由来 NBS1 欠損細胞 (GM7166 : 同様に SV40 で不死化) と NBS1 cDNA 導入した相補細胞 (GM7166/NBS1-wt)、正常人由来繊維芽細胞 48BR (テロメラゼ導入して不死化した細胞)、及びヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞は、100 mm プラスティックディッシュ内で 10%ウシ胎児血清 (ギブコ) と抗生物質を添加した培養液 (DMEM:ギブコ) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した^{4,5)}。また、ヒト胎児臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUE-101) はコラーゲン I コート 60mm ディッシュ (イワキ) 内で、HuMedia-EG2 培地 (クラボウ) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した⁶⁾。分裂寿命があるため、40PDL (population doubling time) 未満の継代数の細胞のみを実験に用いた。

- 4-2. ガンマ線照射 : 細胞へのガンマ線の高線量率急照射は Gammacell 40Ex (MDS Nordion 社 : 線量率 0.9 Gy/min) を用いて室温で行った。低線量率緩照射は低線量長期放射線照射装置 (産業科学 : 線量率 1 Gy/day) を用いて、CO₂ インキュベーター内に細胞を播種したディッシュを静置して行った。両方の装置とも照射線源は ¹³⁷Cs であり、累積線量は 2.5 Gy として行った。
- 4-3. ウェスタンブロット法 : ガンマ線照射を行った後、細胞はトリブシン処理で剥離して回収し、PBS で一度洗浄を行った。回収した細胞は RIPA 液 (10 mM Tri·HCl /pH7.5, 1% NP-40, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) でタンパク質成分を可溶化し、遠心して上清として回収した。回収した溶液はタンパク質濃度を定量し、各サンプルそれぞれ、50 μg を SDS-PAGE 電気泳動を行った。泳動分離されたタンパク質はセミドライ式エレクトロドブロット装置 (アトー) で PVDF 膜 (イモビロン : ミリポア) に転写した後、転写された PVDF 膜は、ブロッキング溶液 (5% Skim milk/TBS-T) 内で 1 時間浸透した。次に、TBS-T 適当な濃度に希釈した一次抗体液に一晩反応させ、その後、TBS-T 液で洗浄を行った。さらに、1%BSA/TBS-T で適当な濃度に希釈した horseradish peroxidase 標識した二次抗体 (GE ヘルスケア) に 1 時間反応させた後、TBS-T で洗浄した。その後、目的とするたんぱく質のバンドは、ECL-prime (GE ヘルスケア) を用いて発行させ、X 線フィルムに露光することによって検出した。ウェスタンブロット法に用いた抗体は、抗 MFN1 抗体 (Proteintech)、抗 MFN2 抗体 (Proteintech)、抗 OPA1 抗体 (Santa Cruz)、抗 MFF 抗体 (Proteintech)、抗 β actin 抗体 (シグマ) である
- 4-4. 活性酸素種の染色法 : 100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス (マツナミ) 上に 1.0×10^5 個の細胞を播種し、インキュベーター内で一晩培養してから、ガンマ線照射を行った後に、ROS 総量染色には dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を、Superoxide 及び RNS 染色には ROS/RNS Detection Kit (Enzo Life Sciences) 内の特異的染色液を培地に添加し 15 分間後に PBS でスライドガラスを洗浄後、カバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡 (ライカ社) で観察し、画像データを取得した。
- 4-5. DIA プロテオーム解析 : 血管内皮細胞は高線量率あるいは低線量率ガンマ線照射終了 30 分後に回収し、PBS で洗浄した後、細胞のみ液体窒素で急速冷凍した。同様に凍結した非照射細胞とともに、株式会社かずさゲノムテクノロジーズに送付して、DIA プロテオーム解析を行った。解析結果については同定タンパク質名とその相対発現量のリストとして提供された。

（倫理面への配慮）

動物の取り扱いに関しては、広島大学実験動物取り扱い指針に従い、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行う。また、本申請研究には放射性同位元素を使用する実験が含まれているため「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づき広島大学原爆放射線医科学研究所放射線障害予防規程にしたがって承認を得て行った。

III. 研究結果

1. 遺伝子改変マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果

1-1. LDEF 値、DREF 値の検討：我々の本研究による、放射線発がん高感受性マウスを用いて得られた結果および、これまでに行った放射線発がん実験結果をもとに、高線量率照射による放射線発がんリスクの線量効果反応を解析した。その結果、線量依存的に腫瘍数の増加が観察された。また、500 mGy 以下の低線量域においても線量依存的な腫瘍数の増加が観察された。得られた線量効果反応は直線しきい値なしモデルが当てはまるといえ、すなわち、LDEF は 1 に近い数値であるという結果が得られた。遺伝的背景の異なる *Apc^{Min/+}* マウスでの実験結果を比較した結果、LDEF 値は、遺伝的背景の影響をほとんど受けなかった。次に、高線量率放射線発がん実験、低線量率放射線発がん実験結果を基に、DREF 値の検討を行った。その結果、DREF 値は、B6/B6 系統; DREF=2.57, C3H/B6 系統; DREF=2.31, B6/B6-consomic 系統; DREF=1.24 を示し、DREF 値遺伝的背景の影響を受け、1～3 までの多様性を示した。

1-2. 放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析：原爆被ばく者の疫学研究から若年期の被ばくにおける発がんリスクは成人期のリスクよりも高いことが報告されている。そこで、昨年度は、*Apc^{Min/+}* マウスを用いた放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性を解析するため、生後、1、11、21、41、61 日目にガンマ線照射を行い、19～24 週齢で屠殺しマウス 1 匹あたりの腫瘍数を計測し、生後 11、21 日に照射を行った群が最も放射線腫瘍数が多い結果が得られた。今年度は、各実験群で得られた腫瘍組織を用いて、ゲノム変異解析を行った。その結果、非照射では、主に分裂異常に由来するゲノム変異が主に検出された（図 1）。一方、放射線照射群では、分裂異常に加えて、欠失をもつゲノム変異が検出された（図 1）。放射線発がんにおける年齢依存性と、誘発欠失頻度には相関性が観察された。

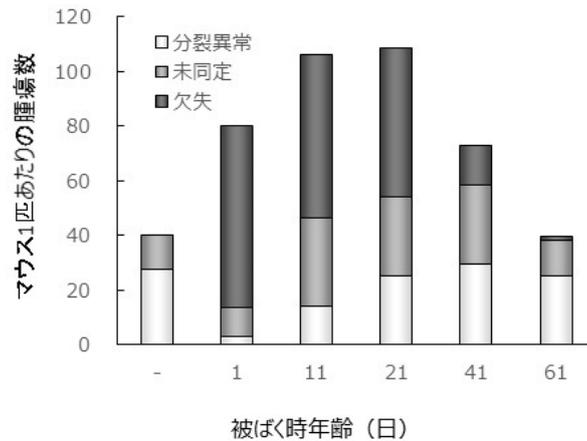
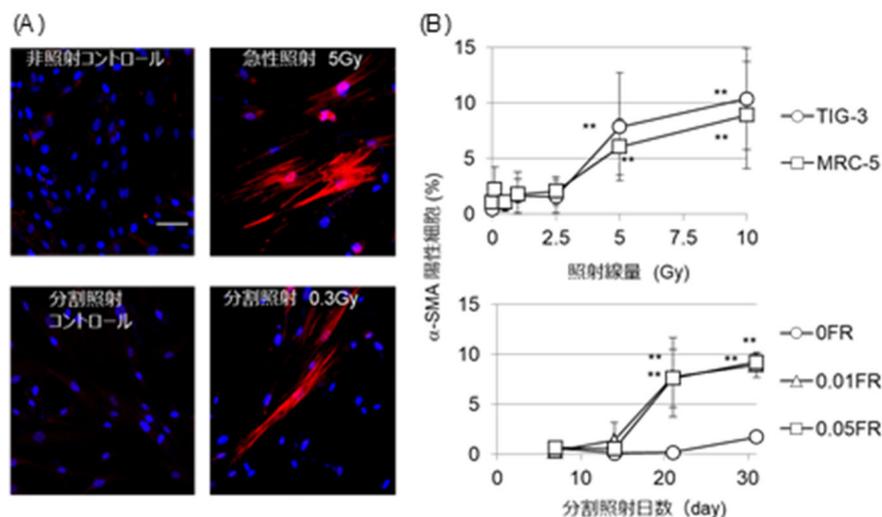


図 1 放射線発がんにおける年齢依存性とゲノム変異頻度

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

がんの発達には、がん細胞だけでなく、免疫細胞や結合組織などの周辺部の細胞との相互作用（がんの微小環境）が関与している。がん組織に含まれる線維芽細胞は正常線維芽細胞とは異なりがん関連線維芽細胞（Cancer Associated Fibroblasts: CAF）と呼ばれる。CAF は、増殖因子の分泌をはじめとした様々なメカニズムによりがん細胞の増殖と浸潤を促進する、がん微小環境の重要な成分の 1 つとされている。放射線発がんにおいても、単にがん細胞の遺伝子変異の蓄積だけでなく、がん微小環境の形成が重要と考える。しかし、放射線発がんにおける CAF の役割は十分に解っていないのが現状である。これまでのヒト肺正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いた解析から、 α -SMA 発現陽性細胞を CAF と定義し、放射線が CAF を誘導することを報告した^{7,8)}。

放射線で誘発される CAF の照射条件について、急性照射と分割照射で違いがあるかどうかを検討した。ヒト正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いて、CAF の指標である α -SMA の発現を蛍光免疫染色法で検出した。図 2A の画像より α -SMA はファイバー状の染色パターンで、 α -SMA



陽図 2 急性照射と分割照射による CAF の誘導

性細胞は細胞質が大きく扁形の形態の特徴を示した（図 2 (A)）。この細胞を目視により計測して α -SMA 陽性細胞の割合を求めた。非照射細胞をコントロールとして統計解析により、2 つの細胞で α -SMA 陽性細胞の増加は 5 Gy 以上の急性照射で観察された（図 2 (B)）。一方の 31 日間の分割照射では、照射期間が 21 日を超えると α -SMA 陽性細胞が出現し、一回照射線量 0.01 Gy で 21 日間の総線量は 0.3 Gy になった（図 2 (B)）。同様に一回線量 0.05 Gy の分割照射においても照射量に関係なく同時期に α -SMA 陽性細胞が出現した。

3. 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

放射線発がんの感受性は、個人レベル、あるいは、同一個体内でも細胞レベルで異なるが、その違いは遺伝的背景が寄与する部分も大きいと考えられる。放射線発がんの場合には、放射線ばくした細胞ががん抑制機能を有する遺伝子にヘテロ接合体で変異を有する場合において、変異アレルの存在に伴って生じる正常アレルの消失、すなわち LOH (loss of heterozygosity/ヘテロ接合性の消失) が、がん化に寄与することにより、がんの発生率が上昇するものも多いものと考えられる。事実、がん抑制遺伝子 *TP53* ヘテロノックアウトマウスでは、放射線照射による発がん頻度の顕著な上昇、および *TP53* 遺伝子正常アレルにおいての変異が検出される^{9,10}。

がんは各組織の幹細胞より生じることを考慮し、当分担研究課題では、放射線誘発 LOH のモデル細胞として、培養が安定に行うことが可能な多能性幹細胞である iPS 細胞 (iPSC) を用いた。ヒト正常細胞由来 iPSC (hiPSC) による放射線誘発 LOH を解析するにあたり、ゲノム DNA 中の *TP53* 遺伝子の LOH を指標としてスクリーニングすることが可能な *in vitro* 実験系を構築した。まず、昨年度までに CRISPR-Cas9 を用いて hiPSC-*TP53*^{del/+} (hetero-deletion mutant) と hiPSC-*TP53*^{del/del} (homo-deletion mutant) を樹立した。正常 hiPSC、hiPSC-*TP53*^{del/+}、hiPSC-*TP53*^{del/del} を用いて、TP53 タンパク質の細胞の免疫蛍光染色を行い、細胞の蛍光画像を全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix で取得し、画像解析ソフト Harmony で解析を行った。その結果、画像解析を行うことで、それぞれの細胞での TP53 の発現量の違いを識別できることが明らかとなった。

本年度は、放射線照射によって誘発される LOH について siRNA ライブラリーによる遺伝子スクリーニングを試みた。hiPSC-*TP53*^{del/+} に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA カスタムライブラリーを導入した。24 時間後に、2 Gy/2.5 min (急照射)、または、2 Gy/days (持続照射) で、細胞にガンマ線を照射し、合計 5 日間培養した後、TP53 を蛍光免疫染色し全自動共焦点蛍光レーザー顕微鏡撮影装置で蛍光画像を取得し、画像解析を行った。

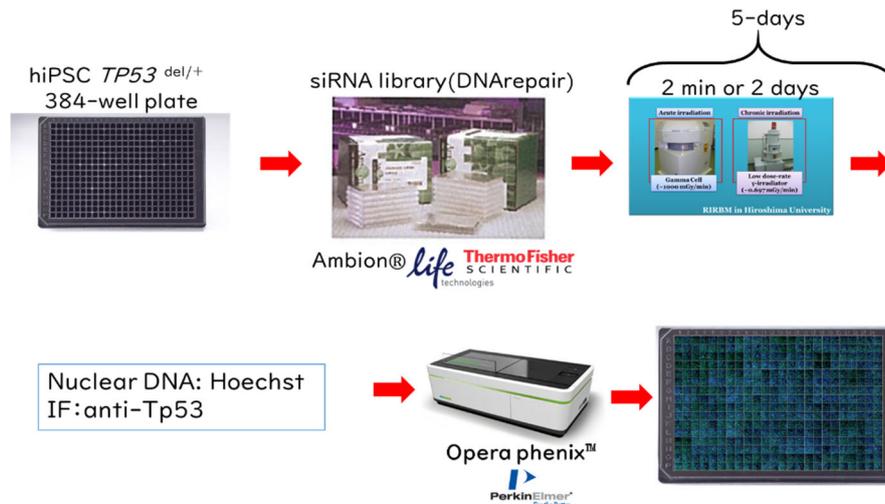


図 3 放射線誘発 LOH 関連因子の siRNA スクリーニングの概略図

hiPSC- $TP53^{del/+}$ を 384-well plate に播種し、翌日に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA ライブラリーを導入した。翌日に急照射（2 Gy/2.5 min）または持続照射（2 Gy/2days）し、照射期間を含めてそれぞれ 5 日間培養を行い、固定後、Hoechst33342 で核染色（青）、TP53 タンパク質抗体（ab-6：mouse-monoclonal 抗体、FL393：rabbit-polyclonal 抗体）と、蛍光色素で標識された 2 種類の二次抗体（anti-mouse-IgG-Alexa488 抗体：緑色、anti-rabbit-IgG-Alexa555 抗体：橙色）で免疫蛍光染色し、全自動蛍光顕微鏡画像撮影装置で撮影し、それぞれの蛍光値を解析した。

siRNA ライブラリーを導入後に、ガンマ線未照射、急照射、持続照射の hiPSC- $TP53^{del/+}$ について、各 well（各 siRNA）の細胞数と TP53 の発現量を比較した（図 3）。それぞれの核について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットとしたグラフを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のみのデータを抽出して、それぞれの DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を TP53 非発現細胞（LOH 細胞）として抽出した。

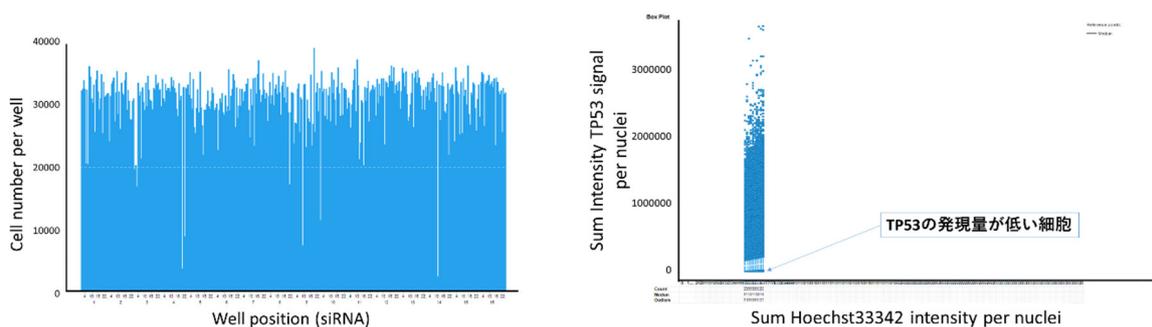


図 4 siRNA の導入による細胞数変化と照射による TP53 の発現量低下

【図左】図 3 の操作後の各 well（各 siRNA）を横軸に、それぞれの細胞数を縦軸にプロットしたグラフ例（未照射）。【図右】全て細胞について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のデータ例。DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を矢印で示した。

スクリーニングによって、急照射と持続照射にそれぞれにおいてのみ TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子が観察された（図 4）。その標的遺伝子とその機能を表 2 に示した。これらの遺伝子が無い場合には、TP53 の発現量が低下した細胞がそれぞれのガンマ線照射によって低下した。

表 2 照射によって TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子と機能

急照射	持続照射
<p>WDR48 : DNA 損傷応答に関わる USP1 結合因子 (DNA 複製にも関わる)</p> <p>CDC6 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>C15orf42 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>CKS2 : 細胞周期進行に必要な CDK 結合因子</p> <p>ERCC6 : 転写共役修復に必要な因子</p>	<p>EXO1 : DNA 損傷修復に関わる 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性と RNase 活性を持つ因子</p> <p>DNA2 : DNA 複製と DNS 損傷修復に関わるヘリカーゼ/ヌクレアーゼ</p> <p>KPNA2 : タンパク質の核内移行に必要な因子 V(D)J リコンビネーションに関わる可能性</p> <p>WDR77 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性化因子</p> <p>CARM1 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ</p>

4. 放射線感受性の個人差の課題の検討

放射線は DNA 損傷と活性酸素種 (ROS) 蓄積による酸化ストレスをともに誘発するが、低線量(率)放射線生体影響におけるこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかとされていない。本研究では、放射線高感受性のヒト遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線影響が蓄積される条件化で、低線量(率)放射線影響を高感度に検出する実験系を確立する。影響評価の指標としては、活性酸素の発生源であるミトコンドリアを対象とし、従来指標である微小核形成とも比較することにより、DDREF=2 の妥当性を再評価できる放射線影響評価法を確立する。さらに、酸化ストレスによるミトコンドリア機能異常の放射線発がんへの寄与についても明らかにすることを目的とする。

これまでの解析から、低線量率ガンマ線照射は細胞内酸化ストレスの蓄積、ミトコンドリア動態の変化が顕著に認められ、ヒト正常細胞では特に顕著であった。ミトコンドリアは細胞内で最大の ROS/酸化ストレス発生源であることから、低線量率照射ではミトコンドリアの機能不全が、酸化ストレスの蓄積につながっている可能性が示唆された。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返しながら、損傷ミトコンドリアをマイトファジー（オートファジーの一種）で排除して機能維持をしており、融合・分裂サイクルの異常が機能不全につながると考えられている¹¹⁾。それゆえ、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響を検討した。

最初にヒト正常 48BR 細胞及びがん細胞 HeLa で ROS 総量 (total ROS)、ミトコンドリア性 ROS

(superoxide)、活性窒素種 (RNS) のガンマ線照射後の細胞内蓄積を特異的色素を用いて検討すると (図 5)、正常細胞では total ROS 及び superoxide が低線量率照射時で非照射時と比べて、有意に増加していたが、高線量率照射では増加していなかった。しかし、RNS は低線量率、高線量率の両方の照射で増加していた。一方、HeLa 細胞では高線量率、低線量率にかかわらず、照射後にこれらの増加は認められなかった。

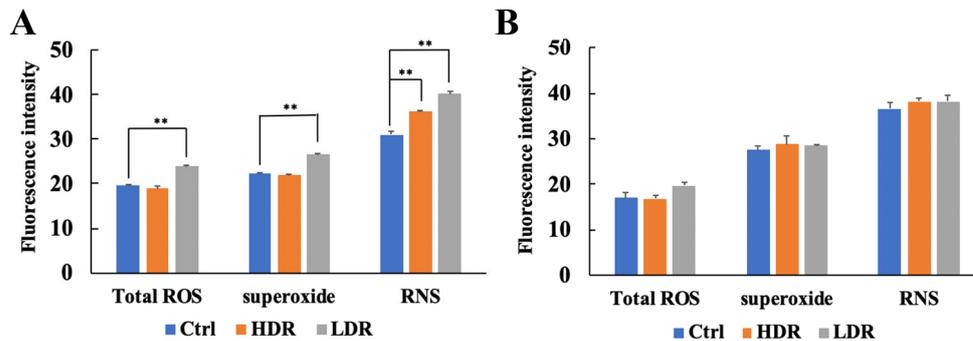


図 5 ガンマ線照射における ROS, RNS 蓄積

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、特異的色素で細胞染色して、ROS, superoxide, RNS の蓄積を検討した (A: 48BR 細胞 ; B: HeLa 細胞)。Ctrl : 非照射

** p<0.01

次に、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響をウェスタンブロット法で検討すると、ミトコンドリア融合制御因子である MFN1 および MFN2 は低線量率照射後では非照射細胞と比べて、有意な減少が見られ、その低下は照射 24 時間後でも認められたが (図 6)、高線量率照射時には見られなかった。また、別の融合制御因子 OPA1 も低線量率照射終了直後から顕著に低下し、その低下は 24 時間後まで持続していた (図 6)。一方、分裂制御因子 MFF は低線量率照射でも明確な差は認められなかった。

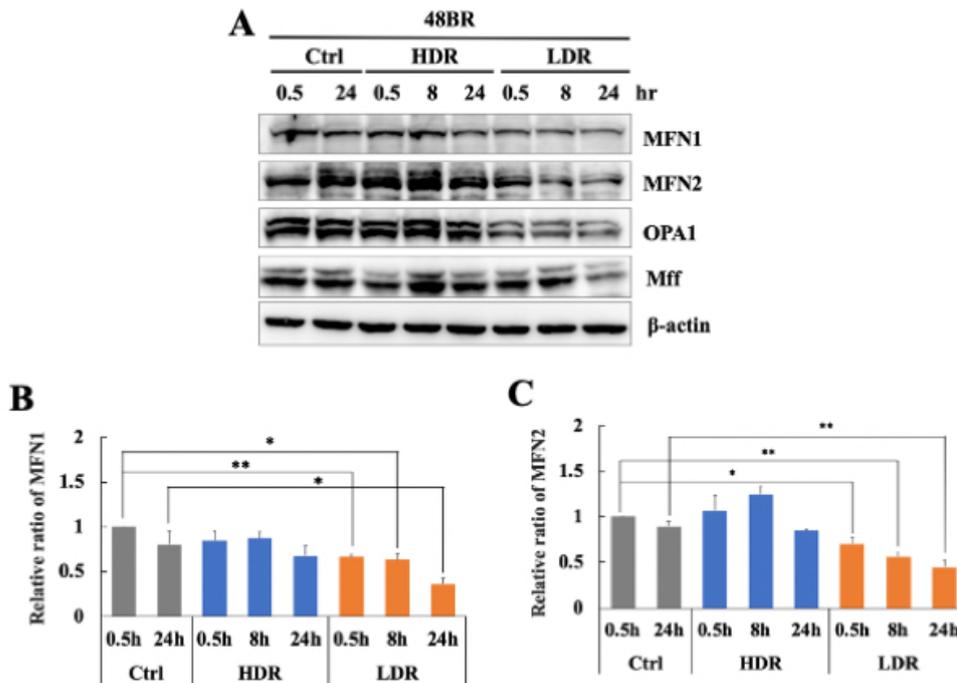


図 6 48BR 細胞におけるミトコンドリア融合・分裂因子の発現

高線量率（HDR）あるいは低線量率（LDR）ガンマ線照射後、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。MFN1（B）、MFN2（C）は（A）を含む 3 回の実験データで統計解析を行った結果である（* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ）。

5. 血管内皮細胞における微小核形成誘導機構の検討

昨年度までの解析から、低線量率ガンマ線照射では γ H2AX 陽性微小核形成が誘導され、特に血管内皮細胞では顕著に認められた。 γ H2AX 陽性微小核は DNA 二本鎖切断損傷が含まれると考えられ、ゲノム DNA の損傷に起因して発生し、ゲノム不安定化による発がんや cGAS を介した炎症応答の活性化による細胞機能低下・細胞老化にもつながる可能性がある¹²⁾。それゆえ、血管内皮細胞での γ H2AX 陽性微小核の形成機構の解明を目的とし、発現タンパク質の網羅的解析を DIA（Data independent acquisition）プロテオーム法を用いて行い、非照射細胞と比べて発現量が顕著に変化するタンパク質の同定を試みた。従来の DDA（data-dependent acquisition）法によるプロテオーム解析では発現量の低いタンパク質を同定する検出感度は無く、原理上、定量解析が行えないが、今回 DIA 法で検討した結果、6500 種類あまりのタンパク質の同定に成功した(図 7)。それらの中で、131 種類のタンパク質は非照射と比べて低線量率照射時に 2 倍以上に増加し、増殖因子シグナル伝達、炎症応答、酸化ストレス応答、p53 関連のタンパク質が含まれていた。一方、低線量率照射で二分の一以下に低下するタンパク質は 145 種類同定し、DNA 複製、ヒストン・クロマチン、M 期制御にかかわる因子が含まれていた。さらにこの 145 種類のうち 85 種類のタンパク質は高線量率照射では変動せず、低線量率照射でのみ顕著な低下をしていたが、Cystoscape 3.8/string APP 解析を行うと、明白なクラスターを形成し、このクラスター内には KIFC1, KIF20A, KIF14, KIF15, KIAA0101 など、微小核形成制御への関与が示唆される因子が含まれていた。一方、

低線量率照射でのみ増加する因子は 32 個同定されたが、明確なクラスターの形成がみられなかった。

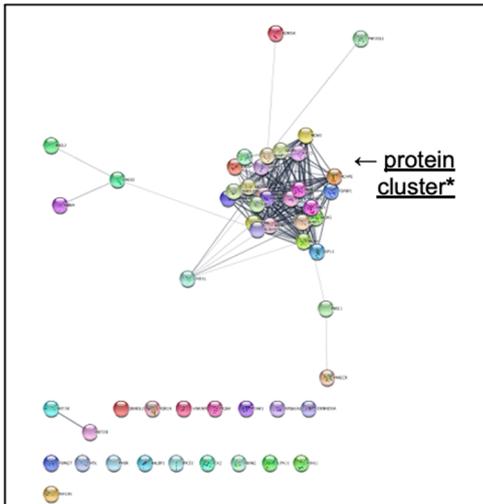


図 7 低線量率照射特異的に減少するタンパク質のクラスター形成

血管内皮細胞において低線量率照射特異的に減少するタンパク質 85 種類について、Cystoscape 3.8/string APP で解析を行った。

IV. 考察

現在、国際放射線防護委員会（ICRP）では、線量・線量率効果係数（DDREF）=2 を用いて低線量（率）発がんリスクの推定が行われている。DDREF 値の妥当性については、現在でも議論が続けられており、発がんを指標とした DDREF 値を検討することが重要である。そこで、本研究課題では、我々が独自に開発した放射線発がん高感受性モデルマウスを用いて低線量効果係数（LDEF）と線量率効果係数（DREF）を個別に算定し、遺伝的背景や被ばく時年齢に着目した DDREF=2 の妥当性の検討を行った。その結果、我々が用いたマウスにおける放射線発がん頻度の過剰相対リスクは、被ばく線量に対して、直線の線量効果関係を示し、直線閾値なし（LNT）モデルを支持する結果が得られた。放射線誘発 DNA 二重鎖切断量の線量反応関係結果からも、LDEF 値は 2 よりも小さいことが示唆された。

次に、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた異なる線量率被ばくによる発がん実験結果を解析した結果、DREF 値は、遺伝的背景の違いにより、 $1 < DREF < 3$ と多様性を示す結果が得られた。さらに、被ばく時年齢が、放射線発がん感受性に及ぼす影響について解析を行った結果、若年期が最も放射線発がん感受性が高い結果が得られた。このことは、被ばく時年齢と被ばく期間が DREF 値に多様性を与えることを示す結果といえる。我々の共同研究結果においても、マウスを用いたがん死亡率を指標にした DREF 値にも被ばく時年齢が影響を及ぼすことが明らかにされており、本研究結果を支持する知見が報告されている¹³⁾。

放射線発がんリスクには、遺伝的背景、生活習慣や年齢のみならず、発がんに関わる多数の細胞内応答機構が修飾要因として放射線発がんリスクに多大な影響を与えることが示されている¹⁴⁾¹⁵⁾。これらの要因が、放射線発がんリスクを指標とした DDREF 値を正確に算定することを困難にし、DDREF 値の多様化につながっていると考えられる。そこで、DNA 損傷応答、ミトコンドリア損傷応答、がん関連繊維芽細胞誘導に着目し、DDREF 値の多様化に影響を与える候補因子の探

素を行った。がん関連繊維芽細胞の誘導解析では、放射線で誘発される CAF の照射条件と酸化ストレスの役割を検討した。これまでの我々の研究結果と本研究で得られた成果を表 1 にまとめた。分割照射では、急性照射に比べてより低い線量で活性酸素が増加する²⁾。ミトコンドリアで発生した活性酸素は、主にグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の働きで、細胞内の抗酸化物質還元型 (GSH) が活性酸素と反応して自身は酸化型 (GSSG) へと変化して除去される。我々は、急性照射と分割照射で活性酸素が増加するメカニズムが異なる原因として、GPx の発現抑制と不活性化が関与することを明らかにした (論文投稿中)。このため、急性照射では CAF の誘導に 5 Gy 以上の照射線量が必要であるが、分割照射や慢性照射ではより低い線量で活性酸素が増加し CAF が誘導される。また、分割照射や慢性照射では、急性照射よりも低い線量で parkin と Nrf2 の染色が観察され、酸化ストレス応答が誘導された。以上の結果から、放射線による活性酸素酸化ストレスが CAF の誘導に重要であることを明らかにした。

次に、DNA 損傷として、LOH に影響を与える因子を siRNA ライブラリーを用いることでスクリーニングすることが可能な実験モデルを確立した。実験には、がんの標的細胞である組織幹細胞のモデルとしてヒト由来の iPS 細胞を用いることとして、siRNA ライブラリーは DNA 損傷修復に対する細胞応答性と DNA 損傷修復に関わる遺伝子のカスタムライブラリーを用いた。TP53 遺伝子の片アレルが欠損した hiPSC-TP53^{del/+} と抗 TP53 抗体を用いて、急照射と持続照射のそれぞれで生じる LOH に関わる因子を siRNA ライブラリーによってスクリーニングした。その結果、表 1 に示したように、急照射では特に DNA 複製や細胞周期進行に関わる因子が候補因子として同定された。一方、持続照射では、DNA 損傷修復に関わるヌクレアーゼが 2 種類、及び、ヒストンのメチル化に関わる因子が 2 種類、候補因子として同定された。再現性を含めて確認実験および検証実験を行う必要があるが、それぞれの照射条件で、異なる同一経路の遺伝子群が候補因子として同定されたことは、興味深い。急照射については、iPS 細胞の複製機構が放射線誘発 LOH に影響を与える可能性、持続照射については、DNA 損傷修復機構とクロマチン構造の変化が LOH に影響を与える可能性が示唆された。また、未照射時に TP53 の発現量低下細胞の出現頻度増加する因子にもヒストンのメチル化に関わる因子がいくつか見出されていることから、更に検証は必要であるものの特にヒストン修飾によるクロマチン構造変化が LOH に影響している可能性があることも考えられる。

放射線誘発ミトコンドリア損傷解析を行った結果、ヒト正常繊維芽細胞では高線量率放射線被ばく時には損傷したミトコンドリアがマイトファジー機構で除去され、損傷ミトコンドリアからの ROS の漏えいには至らないが、低線量率放射線長期被ばくではミトコンドリア融合タンパク質の低下によりマイトファジーが誘導されず、損傷ミトコンドリアが残存して ROS を漏えいし続け、細胞内に過度な蓄積を引き起こし、微小核形成につながる可能性がある。血管内皮細胞では低線量率放射線照射により、 γ H2AX 陽性微小核形成制御にかかわる一群のタンパク質が低下して、微小核が誘発されると考えられる。それゆえ、 γ H2AX 陽性微小核、ミトコンドリア融合タンパク質、マイトファジー制御因子、さらに血管内皮細胞で低線量率照射特異的に上昇する 32 種類のタンパク質は、低線量率放射線長期被ばくの細胞影響の高感度検出、線量率効果の再検討において、有力な指標になり得ると考えられる。

以上の結果から、DNA 損傷修復関連因子、組み換え修復制御因子、ミトコンドリア分裂・誘導

因子等を DREF 値の多様化に寄与する候補因子として同定することに成功した。

V. 結論

DDREF は、LDEF、DREF 個別に評価する必要があるといえる。LDEF 値は 2 よりも低く、一方、DREF 値は多様性を示すことが明らかにされた。さらに、DREF 値の多様性に影響を与える候補因子、すなわち、低線量(率)放射線発がんハイリスクな集団を抽出するための候補因子を同定することに成功した。これらの研究成果は、DDREF 値の策定に寄与するための科学的知見を提供できると期待される。

VI. この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 論文・雑誌等

- 1) Shimura T, Ando T, Narao M, Sasatani M, Kamiya K, Ushiyama A. Mechanism of turnover or persistence of radiation-induced myofibroblast in vitro. *Cell Cycle*. 2020 19; 3375-3385
- 2) Zaharieva E, Sasatani M, Matsumoto R, Kamiya K. Formation of DNA Damage Foci in Human and Mouse Primary Fibroblasts Chronically Exposed to Gamma Radiation at 0.1 mGy/min. *Radiation Res. in press*

イ) 学会発表等

- 1) 小林純也. 「低線量放射線の生体影響の解明」 日本歯科放射線学会第 1 回秋季学術大会・特別講演、2020 年 10 月 31 日、松本市（オンライン開催）
- 2) 小林純也. 低線量放射線影響研究と放射線生物学教育. 放射線生物学東京談話会（東京 RBC）、2021 年 2 月 13 日、東京（オンライン開催）

ウ) 書籍・総説

- 1) 「低線量リスクに関するコンセンサスと課題」(第 1 章 DNA・細胞レベルで起きること、執筆担当, p105-114) 日本保健物理学会・日本放射線影響学会 低線量リスク委員会 (甲斐 倫明、今岡 達彦、小笹 晃太郎、児玉 靖司、小林 純也、小村 潤一郎、酒井 一夫、佐々木 道也、島田 義也、田内 広、高原 省五、富田 雅典、吉永 信治). 放射線生物研究 55 巻第 2 号 (特別号), 2020.
- 2) Shimura T. Roles of fibroblasts in microenvironment formation associated with radiation-induced cancer. Birbrair, Alexander (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology. Tumor microenvironment: Novel Concepts 2020 in press*
- 3) Shimura T. The role of mitochondrial oxidative stress and the tumor microenvironment in radiation-related cancer. *Journal of Radiation Research*. 2020 *in press*

エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

該当なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

1) 環境省・放射線健康管理・健康不安対策事業「長期的視点に立った放射線に関する科学リテラシー涵養とリスクコミュニケーション人材育成のための小中学校における「目で見る」放射線科学教育の実践研究」・放射線科学セミナー「放射線について」（小林純也講師）、郡山市立湖南小中学校（オンライン開催）、令和 3 年 2 月 16 日

VII. 引用文献

- 1) Grant EJ, Brenner A, Sugiyama H, et al. Solid Cancer Incidence among the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958-2009. *Radiat Res.* 2017; 187(5):513-537.
- 2) Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res.* 2012; 177(3):229-43.
- 3) Nair R R, Rajan B, Akiba S, Jayalekshmi P, et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. *Health Phys.* 2009; 96:55-66.
- 4) Sakamoto S Iijima K Mochizuki D, et al. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene*, 2007; 26: 6002-6009.
- 5) Zhou H Kawamura K Yanagihara H, et al. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms; ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50 and cell cycle dependent-degradation of protein. *J Radiat Res*, 2017; 58: 487-494.
- 6) 阿武久美子. 血管内皮細胞の培養. 広島大学技術センター報告集, 2004; 第 1 号:72-75.
- 7) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGFbeta Signaling. *Molecular cancer research*, 2018; 16:1676-86.
- 8) Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low dose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget*, 2016; 7:3559-70.
- 9) Miyazawa T, Sato H, Hatakeyama K, Kitagawa T, Kominami R. Allelic losses in mouse skin tumors induced by gamma-irradiation of p53 heterozygotes. *Jpn J Cancer Res.* 2002; 93(9):994-9.

- 10) Aizawa S, Tanaka K, Mori M, Tsuji S, Yoshida K. Direct detection of p53 $-/-$ thymocyte appearing at an early stage of radiation-induced thymic lymphomagenesis in p53 $+/-$ heterozygous B10 mice. *Int J Radiat Biol.* 2007; 83(4):259-67.
- 11) Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* 2017; 11:637-645.
- 12) Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature.* 2017; 548:466-470.
- 13) Doi K, Kai M, Suzuki K, Imaoka T, Sasatani M, Tanaka S, Yamada Y, Kakinuma S. Estimation of Dose-Rate Effectiveness Factor for Malignant Tumor Mortality: Joint Analysis of Mouse Data Exposed to Chronic and Acute Radiation. *Radiat Res.* 2020; 194(5):500-510.
- 14) Nicolas F Catherine C, Michel B. 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence. *Radiology.* 2012; 264(3):627-31.
- 15) Journy N, Rehel J-L, Le Pointe H Ducou, Lee C, Brisse H, Chateil J-F, Caer-Lorho S, Laurier D, Bernier M-O, *Br J Cancer*, 2015; 112(1):185-93.

Is applying a Dose and Dose Rate Effectiveness Factor = 2 a valid approach in radiation cancer risk estimation?

Megumi Sasatani¹, Tsutomu Shimura², Hidehiko Kawai³, Junya Kobayashi⁴

¹Departments of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, ³Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, ⁴Radiation Biology Center, Graduate School of Biostudies, International University of Health and Welfare

Keywords: Dose and Dose rate effectiveness factor: DDREF, radiation-induced cancer risk, low dose/low dose rate, *Apc*^{Min/+} mice

Abstract

It is a well established fact that exposure to ionizing radiation (IR) may produce deleterious consequences in humans, including cancer induction. Our knowledge regarding the relationship between absorbed radiation dose and cancer risk is mainly based on epidemiological evidence from the Life Span Study of Japanese A-bomb survivors. The traditional approach to radiation-induced cancer risk estimation is to extrapolate the risk from high and moderate doses down to low doses and low dose rates which are relevant to contemporary radiological protection. The International Commission on Radiological Protection (ICRP) recommends using the so-called Dose and Dose Rate Effective Factor (DDREF =2) to estimate the cancer risk per unit dose at low doses/low dose-rates. However, with the accumulation of new epidemiological and radiobiological data, the validity of this extrapolation has been questioned, and the ICRP has re-opened the debate on whether the DDREF should be applied. There is also a growing appreciation for the need to elucidate the molecular events governing the dose rate effect.

In this project, we are planning to contribute to the reassessment of the DDREF value by addressing the issue of dose rate effects from multiple viewpoints at the molecular, cellular and organismal levels. Using a mouse model susceptible to tumor induction, we will conduct an *in vivo* study providing direct evidence for the carcinogenic potential of radiation at different doses and dose rates. In addition, our *in vitro* experiments will allow us to explore the relationship between radiation dose-rates and biological effects, such as genomic DNA damage, mitochondria damage and the induction of cancer associated fibroblasts (CAF), and to shed light on the molecular mechanisms underlying these phenomena. Single-dose of healthy human fibroblasts *in vitro* promotes myofibroblast induction at high doses (≥ 5 Gy). In contrast, repeated low-dose of fractionated radiation and chronic radiation is at least equivalent to high-dose single radiation regarding

myofibroblast induction. Low dose rate irradiation by gamma-ray decreased some regulatory factors for mitochondria fusion. Although high dose rate irradiation increased mitophagy regulatory factor, which leads to mitophagy activation, low dose rate irradiation did not.

Furthermore, in order to explore the potential relationship between radiation-induced carcinogenesis and radiation dose-rates, we are planning to conduct siRNA screening, which we expect will allow us to identify factors distinctively associated with gene mutations induced by different dose-rates of gamma-irradiation. We could identify several candidate genes that may be involved in the loss of heterozygosity induced by either acute or chronic radiation exposure. Thus, our study is expected to produce variable datasets and analysis of the biological effectiveness of different doses/dose rates of radiation, and we believe it may be a step towards developing a new scientifically based concept of radiation risk estimation.