

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

(放射線発がんにおけるがん微小環境の役割)

志村 勉 (国立保健医療科学院・上席主任研究官)

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故以降、放射線被ばくによる将来の発がんリスク、子や孫への継世代影響など放射線健康不安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。これまでの放射線発がん研究では、がん細胞に起こる特異的な遺伝子変異 (放射線シグナチャー) の同定を目的に進められているが機序解明に至っていない。がんは、がん細胞と様々な間質組織が相互に作用してがん微小環境を形成し、腫瘍の生着、増殖、浸潤などの発がん過程に深く関与している。間質細胞の主体は線維芽細胞で、その他に免疫細胞や内皮細胞が含まれる。本研究では、ヒト正常線維芽細胞を用いて放射線のばく露による間質細胞への影響を検討し、放射線発がんの発症機構の解明に挑戦した。放射線が、がんの微小環境を構成するがん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts: CAF)を誘発するかどうかについて、CAFの指標である平滑筋用アクチン (α -SMA) の発現を指標に解析を行った。さらに、放射線発がんにおける酸化ストレスの役割について、ミトコンドリアの酸化損傷と酸化ストレス応答に重要な Nrf2 の活性化を測定した。急性照射、分割照射、慢性照射で放射線の照射条件を変え CAF の放射線応答と酸化ストレス応答を解析し、線量・線量率効果(DDREF)について検討した。放射線発がんにおけるがん微小環境の役割という新たな切り口で発がん解析を行うことで放射線影響を高感度に検出し、放射線誘発がんの機序の一端の解明に繋がることが期待される。

キーワード： 放射線発がん、微小環境、活性酸素、がん関連線維芽細胞、Parkin、Nrf2

I. 研究目的

世界保健機構や国連科学委員会などの国際機関による福島事故被災者の線量推計とリスク評価では、福島原発事故による被ばく線量は低く、健康被害は小さいと考えられている。しかし、事故後 10 年が経過した現在においても放射線健康リスクの不安は大きく、多くの課題が残されている。ヒトの放射線影響は、広島・長崎原爆被爆者の疫学データから、被ばく量に比例して固形がん、白血病の発症率が直線、または、直線-二次曲線で上昇することが報告されている。福島原発事故で問題となる 100 mSv 未満の低線量の放射線リスクについても、検出力を高めるために複数の研究の結果を統合した解析が進められている。しかし、人の疫学調査では、放射線量の推定、解析に用いる集団の偏りや交絡などリスク評価の不確実性が課題とされている。福島原発事故では、原爆被爆のような短時間の被ばくではなく、低線量率放射線の長期間の被ばくが想定されるため、同じ累積被ばく線量でも放射線の影響は小さいと考えられている。国際放射線防護委員会 (ICRP) では、広島・長崎原爆被爆者のヒト疫学調査や動物実験の結果から、線量・線量率効果 (DDREF)=2 として、低線量・低線量率の放射線影響は高線量、急性被ばくの半分と考え放射線防護に活用している。しかし、全ての放射線発がん影響に関するヒトの疫学結果が DDREF=2 の値を支持するわけではなく、ICRP では最新の知見を考慮して数値の妥当性が検討されている。

多くの放射線影響研究者によって放射線発がんの研究が進められている。発がんは、複数の段階を経て遺伝子の変異が蓄積し、臨床で診断されるようながんを形成する。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、放射線が CAF を誘導することを報告した¹⁾。さらに、放射線による CAF の誘導には、ミトコンドリア由来の活性酸素によるトランスフォーミング増殖因子-ベータ (TGF β) シグナル経路の活性化と下流の平滑筋用アクチン (α -SMA) の発現が関与することを明らかにした¹⁾。

放射線の生物学的標的は DNA で、DNA 損傷は、放射線のエネルギーが直接吸収され生成される場合と放射線が生体中にある水の電離を引き起こして活性酸素を生成し、これが間接的に作用して生成される。活性酸素はミトコンドリアのエネルギー生産の過程でも副産物として発生する。細胞は活性酸素を除去する機構を備えているが、活性酸素制御機構の異常により細胞内に活性酸素が蓄積し、DNA、脂質、たんぱく質などの生体分子を酸化して酸化ストレスの原因となる。以上のことから、活性酸素の発生源であるミトコンドリアの放射線応答が注目されている。ミトコンドリアは 1 細胞当たり 1000 コピー存在し、機能不全のミトコンドリアは分解により排除することでミトコンドリアの質が維持されている。ユビキチン化酵素 Parkin はミトコンドリアの分解に関与することから、この抗体を用いて活性酸素によるミトコンドリア酸化損傷を検出することが可能である。Nrf2 は転写因子で、活性酸素によって安定化され細胞核に移行して酸化ストレス応答に必要な遺伝子の発現を制御している。

本研究では、放射線で誘発される CAF の照射条件や、間質細胞の酸化ストレス応答を解析し、放射線発がんの発症機構を明らかにすることを目的とする。本申請研究の成果により、放射線発がんリスク評価の根拠となる科学的知見の蓄積が期待される。

II. 研究方法

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. 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 日間おこなった。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。

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)、Tom20 (BD 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。Parkin と 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。

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、Dunnnett 法を用いて多重比較検定を行った。

(倫理面への配慮)

本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いた解析のため、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

1. 放射線による CAF の誘導

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。本研究では、ヒト正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いて、 α -SMA の発現を蛍光免疫染色法で検出し、 α -SMA 陽性細胞と CAF 誘導細胞と定義した。図 III-1 の画像より α -SMA はファイバー状の染色パターンで、 α -SMA 陽性細胞は細胞質が大きく扁形の形態の特徴を示した。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。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 になる。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。

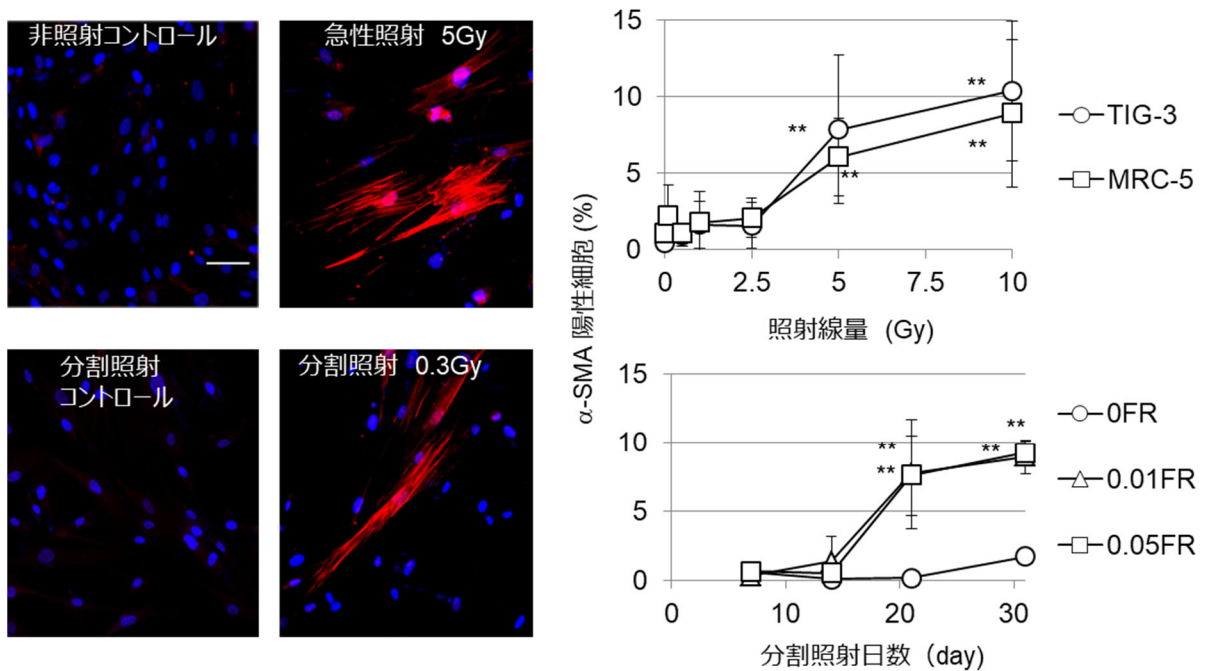


図 III-1 急性照射と分割照射による CAF の誘導

2. 急性照射と慢性照射による CAF の誘導

慢性照射と急性照射で CAF の誘導に違いがあるのかどうかを検討した。急性照射と比べて、慢性照射では α -SMA 陽性細胞の割合が高く、2.5 Gy の放射線照射でも誘導された。 α -SMA 陽性細胞は安定に存在するわけではなく、慢性照射を休止して 7 日目には、 α -SMA の染色は観察されなかった。

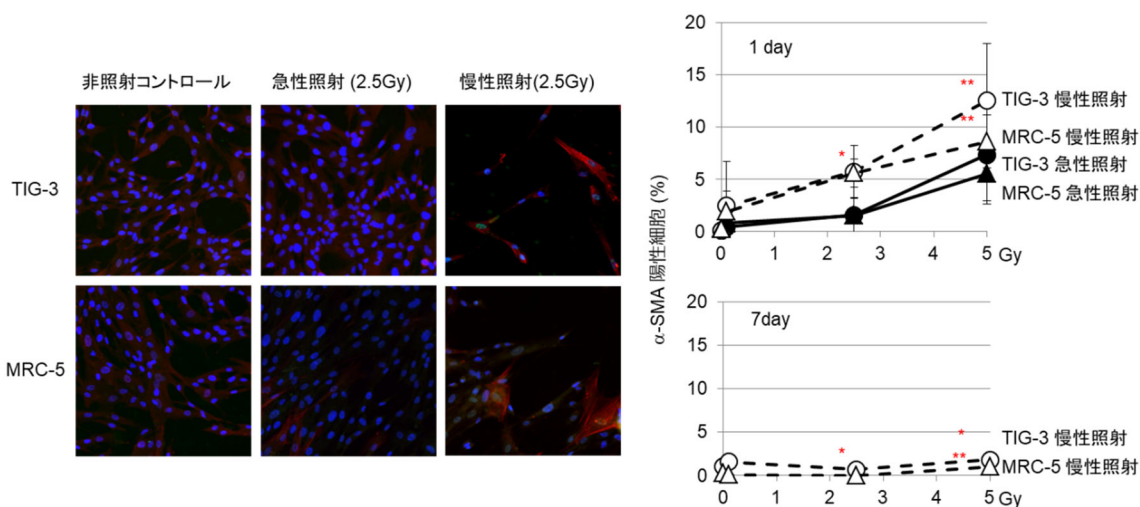


図 III-2 急性照射と慢性照射による CAF の誘導

3. ミトコンドリアの放射線応答

慢性照射の放射線応答について、活性酸素の発生源であるミトコンドリアの放射線影響を解析した。ミトコンドリアの分解に関わるユビキチン化酵素 Parkin の抗体を用いた蛍光免疫染色法によりミトコンドリア酸化損傷を検出した。また、細胞内のミトコンドリア量をミトコンドリアタンパク質 Tom20 の染色により検討し、慢性照射では、低線量の放射線でミトコンドリア量の増加とミトコンドリア損傷が誘導されることを明らかにした。

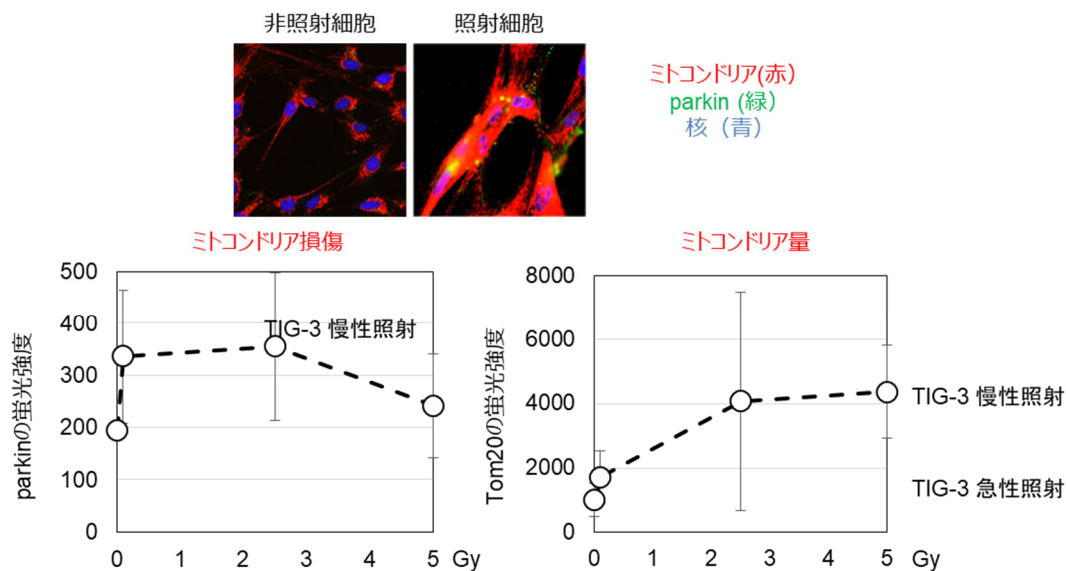


図 III-3 慢性照射によるミトコンドリアの放射線応答

4. 放射線による Nrf2 の活性化

転写因子 Nrf2 は酸化ストレス下で活性化され細胞核に移行し、酸化ストレス応答に必要な遺伝子の発現を誘導する。急性照射と比較して、慢性照射ではより低い線量で Nrf2 の酸化ストレス応答が活性化することを明らかにした。

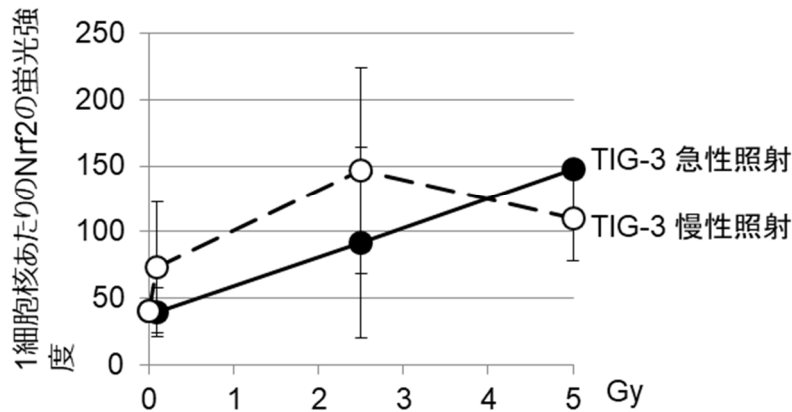


図 III-4 急性照射と慢性照射による Nrf2 の放射線応答

IV. 考察

これまでのヒト正常線維芽細胞やヌードマウスを用いたヒトがん移植片の解析から、放射線が CAF を誘導することを報告した。さらに、放射線誘発 CAF は、放射線がミトコンドリア由来の活性酸素を増加させ、TGFβシグナル経路の活性化を介することを明らかにした¹。本研究では、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。抗酸化剤は活性酸素を除去して CAF の形成を抑制し、放射線発がんを抑制することが期待される。実際に、GSH を増加させる N-アセチルシステインや、その他の抗酸化剤である茶葉に含まれるエピカテキンやアスコルビン酸は、放射線による CAF の形成を抑制することを報告した^{1,3}。また、エピカテキンは、マウスに経口投与することで X 線全身照射による血液細胞のミトコンドリア損傷を抑制し、酸化ストレスを抑えることを報告している⁴。これらの抗酸化剤は、放射線発がんの抑制効果を持つことが期待される。

表 1 放射線の照射条件の違いによる活性酸素、CAF、ミトコンドリア酸化損傷、酸化ストレス
応答の誘導

	急性照射	分割照射	慢性照射
活性酸素の増加	$\uparrow \geq 5$ Gy	\uparrow FR ≥ 0.3 Gy (21day)	no data
α -SMA陽性細胞の割合	$\uparrow \geq 5$ Gy	\uparrow FR ≥ 0.3 Gy (21day)	\uparrow at ≥ 2.5 Gy
ミトコンドリアのparkin 蛍光強度	$\uparrow \geq 1$ Gy	\uparrow FR ≥ 0.3 Gy (21day)	\uparrow at ≥ 0.1 Gy
核内Nrf2の蛍光強度	$\uparrow \geq 2.5$ Gy	no data	\uparrow at ≥ 0.1 Gy

V. 結論

本研究の成果により、放射線による活性酸素が、がん微小環境の形成に重要であることを明らかにした。急性照射、分割照射、慢性照射で、活性酸素の発生とCAFの誘導が異なることを明らかにした。抗酸化剤は放射線による酸化ストレスを抑制し、放射線防護効果が期待される。

VI. 次年度以降の計画

発がん研究では、がん細胞だけでなく、がん微小環境の形成についての解析も重要である。ミトコンドリア酸化ストレスは、がんを含む様々な疾病に関与することから、加齢に伴う疾患の発症機構の解明にもつながると考える。今後は、がん微小環境の形成におけるミトコンドリア酸化ストレスの役割を解明することが必要である。

VII. 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

イ) 学会発表等

該当なし

ウ) 書籍・総説

- 1) 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
- 2) 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

該当なし

VIII. 引用文献

- 1) 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 : MCR* 2018; 16:1676-86.
- 2) 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 lowdose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget* 2016; 7:3559-70.
- 3) 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 (Georgetown, Tex)* 2020; 19:3375-85.
- 4) Shimura T, Koyama M, Aono D, Kunugita N. Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019; 33:6867-76.

The role of cancer associated fibroblasts in radiation-induced cancer

Tsutomu Shimura

Department of Environmental Health; National Institute of Public Health • Chief Senior Researcher

Key word: radiation-induced cancer、microenvironment、ROS、Cancer Associated Fibroblasts, Parkin、Nrf2

Abstract

Stromal fibroblasts in tumor tissues, called cancer-associated fibroblasts (CAFs), are an activated form of fibroblast. CAF release various factors including growth factors, chemokines, and matrix-degrading proteases to neighboring tumor cells, and promote the development of tumors. However, the role of CAF in radiation-induced cancer is currently under investigation.

Mitochondria are a major radiation target because sites of ROS generation. The long-lasting effects of radiation are caused by persistent oxidative stress which is mediated due to delayed production of mitochondrial ROS. Deleterious ROS levels activate TGF- β signaling and induce expression of α -SMA characterizes fibroblast-to-myofibroblast differentiation. Interaction between activated fibroblast and malignant cancer cells contributes to form tumor microenvironment formation

Here, we investigated the threshold dose and the mechanisms of myofibroblast induction to assess adverse radiation effects on normal cells. 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. Alterations in stromal cells can contribute to radiation-related tumors. Thus, radiation affects malignant cancer cells directly and indirectly via the tumor stroma.