

動物モデルと数理モデルを用いた

放射線発がん線量率効果が生じるメカニズムの解明

主任研究者：今岡達彦（量子科学技術研究開発機構・グループリーダー）

分担研究者：服部佑哉（国立大学法人東京工業大学・助教）

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故の後に生活環境の放射線の線量率が増加したことは、健康不安の一因となっている。このような低線量率の放射線被ばくによるがんのリスクが、原爆被爆時のような高線量率のリスクと比べて低いのかどうか（これを「線量率効果」と呼ぶ。）については、両者を調査できるような適切な人間の集団がないため、十分な科学的知見がない。一方、実験動物の発がんでは、線量率効果をはっきりと見られる。動物実験で得られた知見を人間にあてはめられるかどうかを知るには、動物で線量率効果のメカニズムを理解し、それが人間でも起こりえる性質のことかどうかを検討する必要がある。そこで本研究は、ラットの実験で見られる乳腺の発がんの線量率効果がどのようなメカニズムで現れるかを解明する。本研究は、低線量率被ばくのリスクが不明確であるという課題の解決に貢献し、放射線不安に対応する情報を提供する。その目的のために、動物モデルを用いた実験を行い、実験で得られた数値を使って発がんリスクを数理的に予測するモデルを構築している。初年度である平成 31（令和元）年度は、乳腺内に複数の種類の細胞があることから、放射線による細胞死の影響を細胞種ごとに求め、数理モデルの構築に必要な数値を得た。また、次年度に向けた実験条件の検討と、ラットの乳腺を模擬した数理モデルの基本型の構築を行った。令和 2 年度は、放射線被ばく後のラットの乳腺における損傷修復、細胞周期の変化を評価し、数理モデル化に必要な数値を得た。また、発がんがどの細胞から生じるかを解明するための実験と、放射線に被ばくした細胞が除去される「細胞競合」と呼ばれる過程を解明するための実験の設定を完了した。また、放射線による細胞死と線量率の関係を記述する数理モデル、発がんの過程を記述する数理モデルの基本型を構築した。数理モデルの挙動を解析したところ、低線量率でがんリスクが低くなる条件を整理できた。予定通りの成果が得られたことから、最終年度となる令和 3 年度は、引き続き幹細胞動態データを取得し、がん起源細胞の推定と細胞競合の評価を完了して、数理モデルにおいて線量率効果のメカニズムを特定する。

キーワード：放射線発がん、低線量率放射線、線量率効果、動物モデル、数理モデル、幹細胞

研究協力者

渡邊立子（量子科学技術研究開発機構・上席研究員）、横谷明徳（量子科学技術研究開発機構・統括グループリーダー）

若手研究者

永田健斗（量子科学技術研究開発機構・博士研究員）

I. 研究目的

1. 本研究課題の背景

東京電力福島第一原子力発電所事故では、放出された放射性物質により、生活環境において線量率が増加した時期があった。このことは、その後の住民の健康不安につながっている。現在も、線量率が増加した地域は帰還困難区域等に残っている。このような低線量率の放射線被ばくによるがんのリスクが、原爆被爆時のような十分解析された高線量率のリスクと比べてどれくらい低いと考えるべきか、国際機関の間でも見解が一致していない。低線量率における生体への影響が高線量率と比べて低くなることを「線量率効果」と呼ぶが、実際、同事故のリスク評価で線量率効果を考慮するかどうかは、機関によって異なっていた¹⁻³⁾。

低線量率被ばくした人間集団を対象とした疫学の精度は十分でない。そのため、人間集団においてがんのリスクに線量率効果があるのかどうかは、十分な証拠がない。一方、動物実験では、発がんの線量率効果が存在することがよく知られている。動物実験で得られた知見を人間にあてはめて良いかどうかを考えるには、動物で線量率効果のメカニズムを十分に理解し、それが人間でも起こりえる性質のことかどうかを検討し、そのメカニズムが人間に働いた場合にどれくらいリスクになるかを定量的に予測する必要がある。実際に国際機関等でもそのような研究を行う必要性が提言されている^{4,5)}。しかし、動物では、線量率効果のメカニズムが十分に定量的には理解されていないのが現状である。

放射線による発がんは、組織幹細胞やそれに近い細胞から発生すると推測されている。主任研究者らは、本事業が開始される前に、ラットを用いた発がん実験によって、低線量率(0.1 mGy/分)では高線量率(0.5 Gy/分)と比べて、乳がんの発生率が1/8倍程度と大幅に低くなることを見いだした⁶⁾。また、そのメカニズムを解析するため、ラットの乳腺にある各種細胞の増減や放射線への反応を定量的に評価する種々の実験系を確立した。さらに、東工大との共同研究で、ラットの乳腺幹細胞系の細胞数を定量的に記述する数理モデルのプロトタイプを開発した⁷⁾。

2. 研究期間全体を通じての目的

以上の背景に基づき、本事業では、動物実験で見られるような線量率効果が人間集団にも起こりえることかどうかの検証につなげるため、動物実験で見られる線量率効果のメカニズムを定量的に解明することを目的とする。

得られる成果は、冒頭に述べた原子力事故等による低線量率被ばくのリスク評価の課題解決に貢献する。さらに、同じ量の放射線であってもゆっくりと被ばくすればがんリスクがそれほど高まらない理由を解明することで、住民の放射線不安に対応する情報を提供する。また、その過程で若手研究者を育成し、国内で減少している放射線リスクの専門家を輩出する。以上を通して、本研究課題は環境行政の課題の解決に貢献する。

3. 前年度の実施内容の概略

本研究課題では、生物学的な機序を解明するための研究項目 1（「実験モデルにおける幹細胞解析」、担当：主任研究者）と、得られた結果を定量的に解釈して発がんリスクの予測につなげるための研究項目 2（「幹細胞動態数理モデルの構築」、担当：分担研究者）を実施している。

平成 31（令和元）年度は、乳腺の幹細胞動態の数理モデル化に必要な、乳腺の幹細胞系を構成する細胞種ごとの前駆細胞活性、細胞死、細胞増殖のデータを得た。また、がんの起源細胞を推定する実験系及び照射された細胞が非照射細胞の中に少数存在する場合の細胞間の競合を測定する実験系の改良を行った。さらに、数理モデルの一部である乳腺幹細胞系モデル（terminal end bud モデル、以下「TEB モデル」）を、開発済みのプロトタイプ（細胞集団の平均値を計算するモデル）から、個々の細胞の挙動を計算するモデルへと拡張させた。

4. 本年度の目的

令和 2 年度の研究項目 1 においては、放射線被ばく後の乳腺幹細胞系における損傷修復、細胞周期等の動態を解明することで、数理モデル化に必要なパラメータを前年度に続いて取得すること、また、発がんの起源細胞を解明するための実験と、放射線に被ばくした細胞が除去される細胞競合と呼ばれる過程の解明のための実験の設定を完了することを目的とする。特に、幹細胞系の動態の解明では若手研究者の専門的能力である病理組織学的技術を活用する。研究項目 2 においては、数理モデルの一部として、放射線による幹細胞系の細胞死と回復を記述するモデル（以下、「ダメージ修復モデル」）と、発がんの過程を記述するモデル（以下、「発がん過程モデル」）を構築し、その挙動を解析して、線量率が低いときにがんリスクが低くなる条件を検討する。

本報告では研究項目 1、分担研究者の報告において研究項目 2 について報告する。

II. 研究方法

1. 幹細胞動態の実験データ取得

① 放射線照射

発情期のラット（Jcl:SD 系統、日本クレア株式会社）を対象に、 γ セル照射装置（Nordion 社、線量率 30 Gy/時）による高線量率照射、あるいは連続 γ 線照射装置（ポニー工業株式会社。線量率 6 mGy/時となる条件を使用。）による低線量率照射を行った。照射の週齢と線量は研究結果の項目に記載した。

② 細胞周期標識物質の投与

細胞周期が S 期にある細胞を標識するため、生理食塩水（大塚生食注 10 mL、大塚製薬）に 5-エチニル-2'-デオキシウリジン（EdU、Thermo Fisher Scientific 社）あるいは 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU、Thermo Fisher）を溶解して 5 mg/mL とし、50 mg/kg 体重あたりとなる量を腹腔内投与した。発情期の動物を用いて、組織採取の 4 時間前に EdU を投与し、さらに 2 時間後に BrdU を投与して、解剖後に乳腺を 10%リン酸緩衝ホルマリン中で固定した。

③ 蛍光染色

ラットから採取してホルマリン固定パラフィン包埋を行った組織を 3 μ m 厚に薄切し、パラフィン除去後に 0.01 M トリス塩酸緩衝液（pH 9.0）中 95°C40 分で抗原賦活化処理を行い、10%ブロッ

キング液（Dako 社）を含む 0.5% Tween-20 含有トリス緩衝生理食塩水（TBS-T）に希釈した一次抗体（抗 53BP1 抗体、抗 BrdU 抗体、抗サイトケラチン 14 抗体、抗サイトケラチン 8+18 抗体を使用）と 37°C で 2 時間反応させ、TBS-T で洗浄後、同様に希釈した蛍光標識二次抗体を 37°C で 1 時間反応させ、TBS-T で洗浄した。EdU の染色には Click-iT EdU Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher) を使用した。その後、4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール（DAPI）を含む封入剤（Vector 社）で封入した。

④ 画像データ取得及び解析

画像データ取得にはディスク走査型共焦点顕微鏡システム（DSU-IX81、オリンパス株式会社）及びオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X800、株式会社キーエンス）を、画像解析ソフトウェアとしては ImageJ（米国国立衛生研究所）を、それぞれ使用した。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

① 乳腺細胞の単離

野生型（LEW/CrlCrlj 系統、日本チャールスリバー株式会社）もしくはオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子導入ラット（京都大学ナショナルバイオリソースプロジェクト・ラットより供与された系統を自家繁殖）より乳腺を摘出し細切した後、0.1% III 型コラゲナーゼ含有ハックス平衡食塩水（HBSS）で 37°C 3 時間消化し、2% ウシ胎仔血清（FBS）含有 HBSS、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄したのち、20 μ m 孔径メッシュを抜けなかった組織小片を回収、0.25% トリプシン含有エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液、5mg/mL ディスパーゼ溶液で順に消化し、40 μ m 孔径及び 10 μ m 孔径メッシュを順次通して、通過した単離細胞を 1% FBS 含有 HBSS に懸濁し、細胞数を血球計算板で計測した。これを細胞凍結保存液セルバンカー（日本全薬工業株式会社）に懸濁して -80°C で保存した。使用時には 37°C 温浴によって解凍し、2% FBS 含有 HBSS で洗浄して、生存率と細胞数をトリパンブルー染色（死細胞を検出する。）及び血球計算板によって計測し、50% マトリゲル溶液（BD 社）を含む HBSS で目的の濃度（野生型と GFP ラット由来細胞が共に 5,000 個/ μ L）に調整し、細胞が沈殿しないように回転させながら 37°C でマトリゲルをゲル化させた。

② 細胞移植

野生型 Jcl:SD ラットと GFP ラットの自然交配によって雑種第一代を作製した。これらをレシピエントとする移植手術を以下のように実施した。3~4 週齢においてイソフルランで全身麻酔を行い、切開予定部位の周辺を動物用バリカンで剃毛したのち、手術部位にマジックによるマーキング及びヒビテン消毒液による消毒をして、保温しながら、乳腺組織を含む皮下脂肪組織を、電気メスを用いて摘出した。続けて、残存している、乳腺組織を含まない皮下脂肪組織に細胞懸濁ゲルを注入した。切開部を外科用クリップで閉創し、ヒビテン消毒液によって消毒したのち、保温しながら覚醒させ、飼育ケージで飼育した。

③ 放射線照射

一部の個体については 7 週齢時に「1.①」の方法で高線量率照射を行い、飼育を継続して、触診による腫瘍発生の観察を開始した。

④ 免疫染色

一部の個体については解剖を行い、移植した皮下脂肪組織を摘出して、「1.③」と同様に GFP 抗

体（MBL 社）による免疫染色を実施し、3,3'-ジアミノベンジジン染色キット（Vector 社）により GFP 局在を可視化して、BX53-DP73（オリンパス社）により画像を取得した。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

① 放射線照射

「1.①」の方法で、雌の 7 週齢 GFP ラットを合計 4 Gy となるように高線量率ならびに低線量率で照射した。また、非照射の GFP ラットならびに造礁サンゴ由来赤色蛍光タンパク質（RFP）遺伝子導入ラットを用意した。

② 乳腺細胞の単離と移植

低線量率照射の終了から 3 ヶ月後に「2.①」の方法で、照射及び非照射の GFP ラット及び非照射の RFP ラットから乳腺細胞を単離し、凍結保存前の細胞を使って、GFP 細胞と RFP 細胞の比率が 1:99 かつ合計の細胞濃度が 10,000 個/ μ L となるように混合して、「2.②」の方法で、GFP ラットと RFP ラットの雑種第一代の雌ラットに移植し、3 ヶ月後の解剖に備えて長期の飼育を開始した。

（倫理面への配慮）

動物実験及び遺伝子組換え実験については、量子科学技術研究開発機構でのみ実施し、同機構の動物実験委員会及び遺伝子組換え実験委員会の承認を得て行った。人を対象とする研究には該当しない。

III. 研究結果

1. 幹細胞動態の実験データ取得

本項目は、若手研究者が主体となって実施した項目である。

① DNA 修復動態の解明

本項目は、構築しようとする数理モデルの一部である「ダメージ修復モデル」において、ラット乳腺の各種細胞の細胞死をモデル化するため、重篤な DNA 損傷修復速度を表すパラメータを取得するために実施した。修復過程を定量化するためには、検出可能な量の DNA 損傷を短時間に誘導する必要があるため、高線量率（30 Gy/時）1 Gy の照射を用いた。また、DNA 二重鎖切断マーカーである 53BP1 タンパク質の核内集合体（フォーカス）を、照射後 3, 6, 12, 24 時間後に採取した 7 週齢ラットの乳腺の標本上で、細胞種ごとに免疫染色によって可視化して定量した。この時、細胞種を判別するために、基底細胞マーカーであるサイトケラチン 14、全内腔細胞のマーカーであるサイトケラチン 8、成熟した内腔細胞のマーカーであるサイトケラチン 18 を同時に染色した。細胞マーカー解析結果を図 III-1 に示す。内腔成熟細胞の割合は TEB から離れるに従って増加し、それに伴って内腔前駆細胞の割合には減少傾向が見られた。

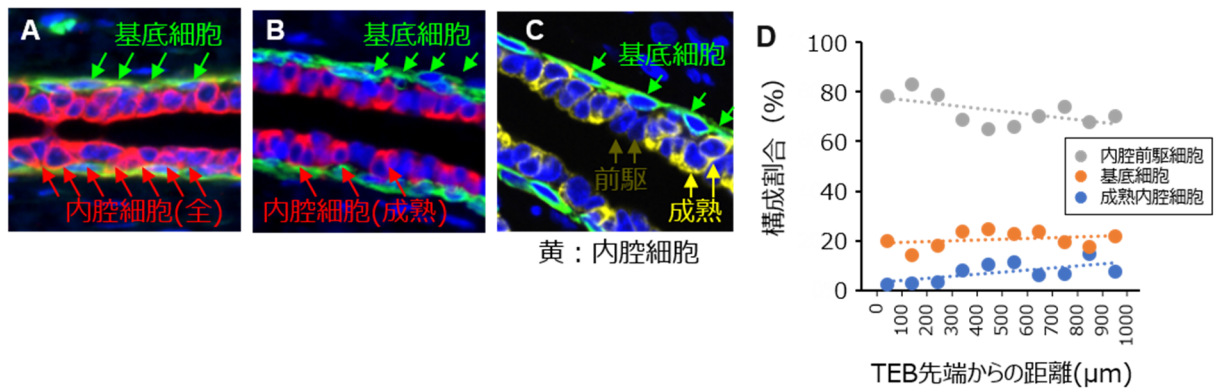


図 III-1 乳腺上皮の各種細胞。A. 基底細胞のマーカであるサイトケラチン 14 (緑) とすべての内腔細胞のマーカであるサイトケラチン 8 (赤) の局在。B. 基底細胞のマーカであるサイトケラチン 14 (緑) と成熟した内腔細胞のマーカであるサイトケラチン 18 (赤) の局在。C. 基底細胞のマーカであるサイトケラチン 14 (緑) とサイトケラチン 8 及び 18 の両者を認識する抗体によるシグナル (黄) の局在。後者に関して、内腔成熟細胞は強陽性、内腔前駆細胞は弱陽性となる。D. 非照射群乳腺の 100 μm ごとの基底細胞、内腔細胞の構成割合。

DNA 二重鎖切断マーカの定量の結果が図 III-2 である。DNA 二重鎖切断マーカのフォーカスは基底細胞及び内腔細胞に見られた (図 III-2A)。内腔細胞はさらに前駆細胞と成熟細胞に分けられた (図 III-2B)。TEB 先端から計 1 mm の領域に含まれる各種細胞の 53BP1 フォーカス数を放射線照射の 3 時間後に比較すると、内腔前駆細胞におけるフォーカス数が他の細胞種よりも有意に多いことが判明した (図 III-2C)。また、照射 3~24 時間後のフォーカス数の減少の動態は、細胞種によって顕著に異ならなかった (図 III-2D)。

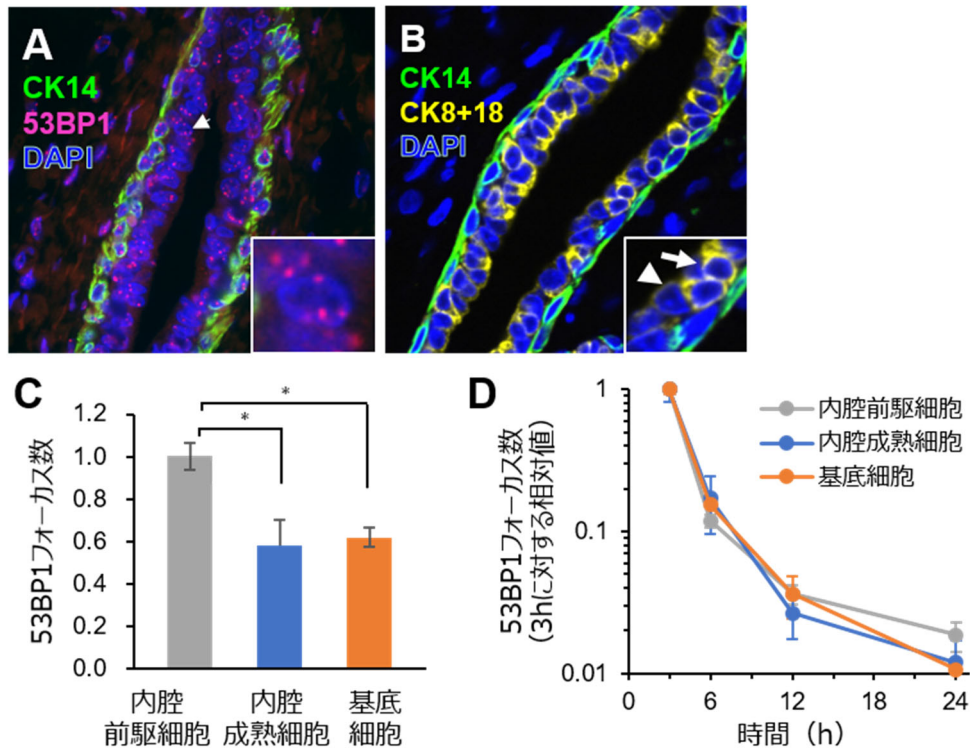


図 III-2 放射線照射後の乳腺上皮の各種細胞における DNA 二重鎖切断マーカ（53BP1 フォーカス）。A. 代表的な基底細胞マーカ（サイトケラチン 14、CK14）及び 53BP1 の染色像。枠内は 53BP1 フォーカスの拡大図。B. 代表的な基底細胞マーカ（CK14）、内腔細胞マーカ（サイトケラチン 8 及び 18、CK8+18）の染色像。枠内は CK8+18 弱陽性の内腔前駆細胞（▲）と CK8+18 強陽性の内腔成熟細胞（↑）の拡大図。C. 各種細胞における 53BP1 フォーカス数の比較。照射 3 時間後、TEB 先端から 1 mm までの領域を解析。D. 各種細胞における 53BP1 フォーカスの減少曲線（照射 3 時間後を基準とした相対値）。TEB 先端から 1 mm の領域を解析。

② 細胞周期動態の解明

本項目は、構築しようとする数理モデルの一部である「TEB モデル」において、高線量率及び低線量率で照射後の乳腺組織における各細胞の細胞周期の変化の情報を用いるため、実施した。細胞周期長の測定法としては、S 期（DNA 合成期）を標識する EdU 及び BrdU を、時間差を設けて投与する時間差二重標識法⁸⁾を用いた。本法では、EdU と BrdU の投与時刻の差 (T_i) と、EdU 陽性細胞割合 (P_{E+})、EdU 陽性/BrdU 陰性細胞割合 (P_{E+B-})、細胞周期が回転している細胞（増殖マーカ Ki67 に陽性の細胞）の割合 (P_{Ki67}) の情報から、S 期の長さ (T_S) と細胞周期長 (T_C) を求めることができる（図 III-3）。

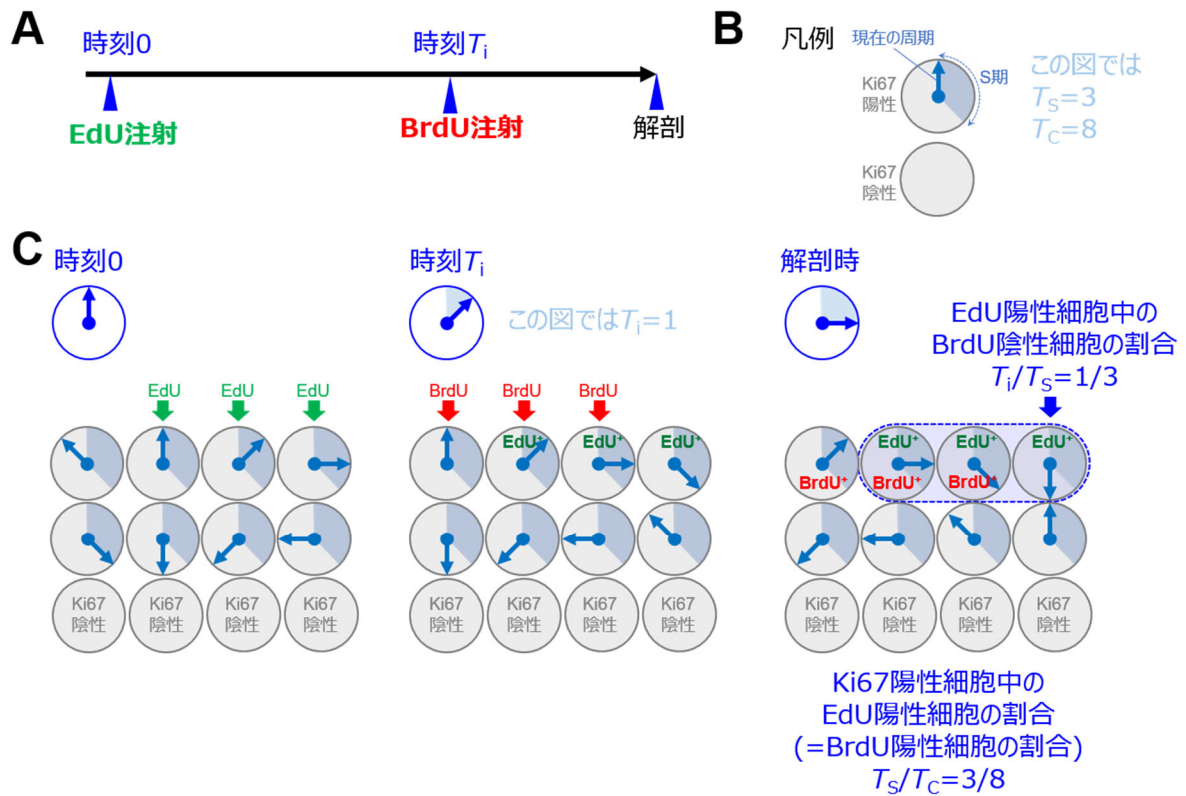


図 III-3 時間差二重標識法による細胞周期長の測定の原理。A. 投与計画。時刻0でEdUを投与し、時刻 T_i でBrdUを投与する。B. 凡例。S期の長さを T_S 、細胞周期が1周する時間を T_C とする（ただし $T_C > T_S \geq T_i$ ）。C. 解剖時に、EdUを持つ細胞集団の中でBrdUを持たない細胞の割合は T_i に比例し、 T_i/T_S で表される（ $T_i=0$ の場合0%で、 $T_i=T_S$ の場合100%）。つまり、EdUを持つ細胞の割合を P_{E+} 、EdUを持ちBrdUを持たない細胞の割合を P_{E+B-} とすると、 $T_i/T_S = P_{E+B-}/P_{E+}$ である。細胞周期が回転している細胞（Ki67陽性細胞）においてEdUを持つ細胞の割合は T_S に比例し、 T_S/T_C で表される（ $T_S=0$ の場合0%で、 $T_S=T_C$ の場合100%）。つまり、Ki67陽性細胞の割合を P_{Ki67+} とすると、 $T_S/T_C = P_{E+}/P_{Ki67+}$ である。

本実験における代表的な染色像と、非照射、高線量率2 Gy 照射（5週齢時）、低線量率2 Gy 照射（3～5週齢時）の処置を行ったラットの乳腺の各種細胞で細胞周期S期の長さを試算した結果を次の図に示す。染色像の観察の結果、時間差二重標識法により、EdU単独陽性細胞、BrdU単独陽性細胞、両者に陽性の細胞、両者に陰性の細胞が確認された。各細胞の陽性率を元に、図III-3に示した方法によって、各群の内腔前駆細胞と基底細胞の細胞周期の長さを試算した（図III-4）。その結果、非照射群においてS期はそれぞれ約3.1時間、約6.4時間であった。細胞周期全体の長さは、内腔細胞では約9.4時間であった。文献¹¹⁾において、同じ7週齢Sprague-Dawley系統雌ラットのTEBでのS期は7.2時間、細胞周期全体は11.7時間との報告があるが、本研究のように細胞の種類を分けておらず、主に内腔細胞（前駆細胞及び成熟細胞）のものと思われるため、今回の結果にはやや小さめの数値があり検討の余地はあるが、大きな乖離はないと考えられた。また、

内腔前駆細胞の S 期は基底細胞よりも短い傾向が一貫して見られた。さらに、いずれの線量率の放射線照射によっても S 期の長さは著明には変化しない傾向が確認された。

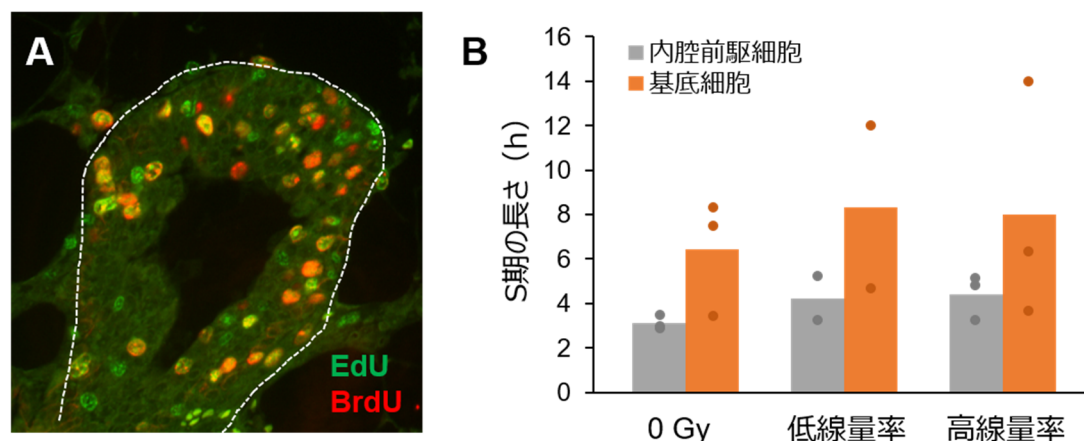


図 III-4 時間差二重標識法による S 期長及び細胞周期長の測定結果。A. EdU 及び BrdU の二重染色像の代表例。7 週齢ラットの TEB 領域。B. 無処理 (0Gy) 及び低線量率・高線量率で 2 Gy 照射後の S 期長の測定結果。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

発がんの初期には内腔細胞が多層化し、基底細胞は単層のままであるため、内腔細胞ががんの起源細胞であると予想されるが、直接的な証明はない。そこで、放射線発がんの起源は内腔細胞であり、基底細胞は追隨的に増殖しているという仮説を検証する。そのため、蛍光タンパク質によって識別可能な 2 種の細胞からなるモザイク組織を移植実験によって作製し、これを照射して乳がんを発生させ、できた乳がんの基底細胞、内腔細胞が単クローンとなるかどうかを評価する計画である。令和 2 年度は実験群の設定、モザイク組織の確認を実施した。

① 実験群の設定の完了

令和 2 年度は、GFP ラット及び野生型ラットから採取した乳腺細胞を同数ずつ混合し、51 匹のレシピエントに移植した。そのうち 31 匹に発がん線量である γ 線 4 Gy を照射し、16 匹を非照射群とした。これらの個体は、週 1 回の触診によって腫瘍発生を確認し、移植部位以外の腫瘍を外科的に除去しながら長期飼育しており、令和 3 年度に解析する予定である (図 III-5A, B)。

② 正常組織におけるモザイクの存在の確認

照射時点の乳腺の状態を確認するために、レシピエント 4 匹を解剖し、GFP 陽性細胞の局在パターンを免疫染色によって確認した (図 III-5C)。なお、予備的検討において凍結切片を作製して GFP の蛍光を直接的に画像化したが、GFP 蛍光量が少ない細胞が見られたことから、免疫染色によって GFP の局在を示すシグナルを増強して画像化する方法を採用した。その結果、移植された正常組織には GFP 陽性細胞と陰性細胞のモザイクから成る部分が存在していることを確認した。非モザイクの部分も存在していたが、マウス乳腺を用いた過去の文献⁹⁾の報告内容から予想され

る範囲内であった。

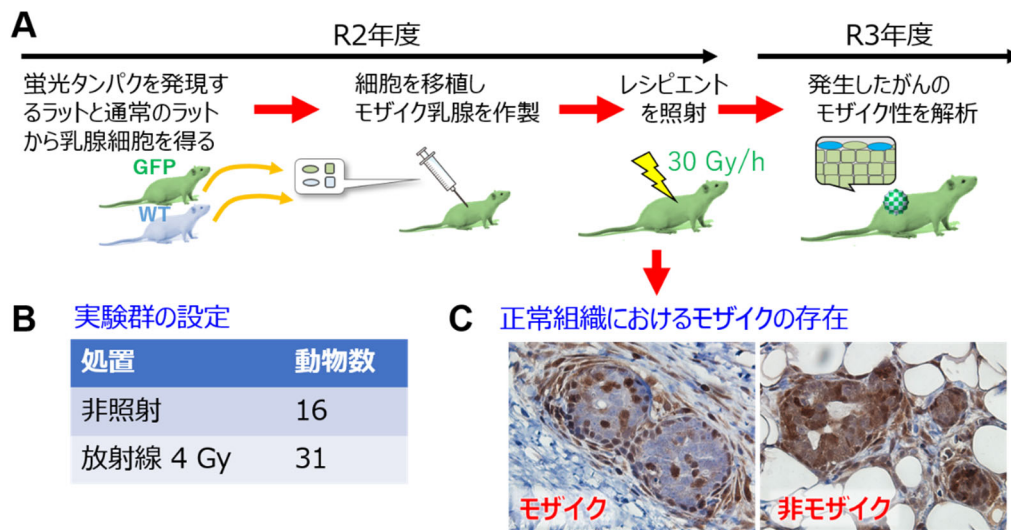


図 III-5 放射線誘発乳がんの起源細胞推定に関する実験経過。A. 令和（R）2年度における実験の進捗と令和3年度の予定の全体を示す模式図。B. 設定した実験群の動物数。C. 正常組織におけるモザイク性（左）及び非モザイク性（右）を示す部位の顕微鏡写真（抗GFP抗体を用いた免疫染色）。茶色はGFPラット由来の細胞であり、茶色に染まらない（青色の）細胞は野生型ラット由来の細胞である。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

本実験は、「DNA修復履歴のある細胞は履歴のない細胞よりも組織内での細胞競合により排除されやすく、低線量率ではこのような細胞競合が起こりやすい」という仮説を検証するためのものである。実際には、高線量率あるいは低線量率で照射した、もしくは非照射のラットから採取した細胞（GFPを有する）と、非照射のラットから採った細胞（RFPを有する）を混合して、自身の乳腺をあらかじめ除去した第三のラットに移植し、乳腺組織を形成させる。仮説の通りであれば、高線量率では一度すべての緑色細胞にDNA損傷が生じるため、混合後は非照射細胞（RFPを有する）との競合によって排除されるが、低線量率では損傷細胞が細胞競合によってすでに除去されているため、GFP細胞は排除されないと予想される。細胞競合の程度は、GFP細胞が全体に占める割合を対照群と比較して評価する。令和2年度は、照射・非照射のラットから細胞を採取し、第三のラットに移植する工程までを実施した（図III-6）。

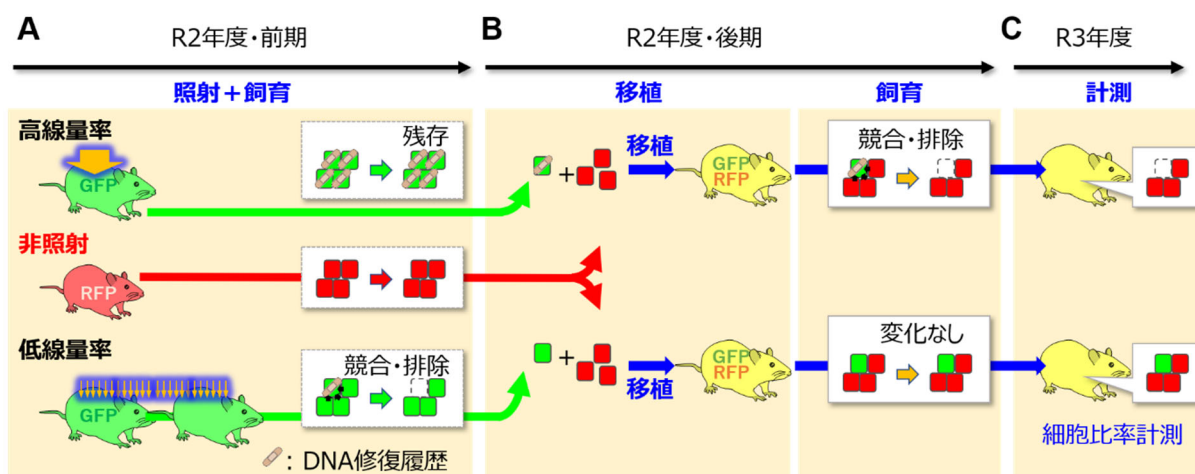


図 III-6 放射線照射された細胞と非照射の細胞の間の細胞競合と線量率の関係を示すための実験概要及びその経過。A. 令和（R）2 年度前期にはラットを照射し、3 ヶ月飼育した。高線量率群では全細胞が一度に照射される。低線量率では一度に照射される細胞はごく一部であるため、この照射・飼育の間に細胞競合が起こる可能性を考えている。B. 令和 2 年度後期には、照射したラットから採取した細胞と非照射の細胞を混合して、第三のラットに移植し、引き続き 3 ヶ月飼育した。この間に、C. 令和 3 年度には、ラットから細胞を採取して、混合比を測定する予定である。

① 高線量率および低線量率照射の実施

7 週齢時において高線量率（30 Gy/分）で 4 Gy 照射した GFP ラット、7～11 週齢において低線量率（6 mGy/時）で 4 Gy 照射した GFP ラット、非照射の GFP ラット及び RFP ラットを用意し、これらを 3 ヶ月間飼育した。

② 移植実験

上記処置の 3 ヶ月後のラットから乳腺細胞を採取し、同時に第三のラット（19 個体）の乳腺組織を郭清した乳腺のない脂肪組織を作製しておいて、ここに競合を評価したい細胞を混合して移植した。個体差があることを考慮し、すべての個体において、右半身の脂肪組織には非照射 RFP 細胞と非照射 GFP 細胞（混合比 99:1）を移植し、左半身の脂肪組織には非照射 RFP 細胞と各種処理を行った GFP 細胞（混合比 99:1）を移植して、右半身の結果を基準として左半身を評価できるようにした。用意した実験群の匹数は以下の通りである。

表 III-1 設定した実験群

番号	左半身		右半身		匹数
	GFP 細胞 (割合 1%)	RFP 細胞 (割合 99%)	GFP 細胞 (割合 1%)	RFP 細胞 (割合 99%)	
1	高線量率	非照射	非照射	非照射	12
2	低線量率	非照射	非照射	非照射	7

IV. 考察

1. 幹細胞動態の実験データ取得

本研究課題で構築しようとする数理モデルはいくつかの部分で構成される。令和 2 年度の本項目の成果は、これらの数理モデルで用いるパラメータの決定に寄与するものである。以下に、その成果の意義と今後の利用法を説明する。

① DNA 修復動態の解明

1) 成果の概要とその意義

「ダメージ修復モデル」は、数理モデル全体のうちで、被ばく直後の細胞死をモデル化する部分である。令和 2 年度の本項目の成果は、放射線による DNA 損傷のうち最も中心的な役割を果たす DNA 二重鎖切断の修復過程をモデル化するパラメータを取得したことである。このパラメータは、線量率が細胞死に及ぼす影響を予測するために必要である。すなわち、高線量率では細胞の生存に関わる複数の重要遺伝子が DNA 二重鎖切断によって同時にダメージを受けることで細胞死が効率よく起こるが、低線量率ではダメージが修復されながら照射を受けるため複数の遺伝子が一度にダメージを受けることは比較的まれである。この違いは修復過程に起因するため、修復の速度を表すパラメータが必要である。乳腺を構成する複数種の細胞における DNA 二重鎖切断修復速度の知見はこれまでになく、本項目では若手研究者の力により、それを求めることができた。

2) 成果の利用法

高線量率（30 Gy/時）における細胞死誘導の線量効果関係の実験データは、平成 31（令和元）年度にコロニー形成解析によって、基底細胞・内腔細胞それぞれの前駆細胞についてすでに取得してある。コロニー形成解析実験では細胞を体外で照射するが、本研究で扱う低線量率（6 mGy/時）で意味のある線量を照射するには数週間を要し、細胞を体外で維持できない。また、体内で照射すると、失われた細胞が他の細胞によって補われることから、細胞死を評価できない。そこで、ダメージ修復モデル、今回得られたパラメータ、すでに得ている高線量率での線量効果関係の 3 つを組み合わせることで、低線量率における細胞死を予測するモデルを完成する。

② 細胞周期動態の解明

1) 成果の概要とその意義

「TEB モデル」は、数理モデル全体のうちで、被ばく後の中長期における細胞の動態をモデル化する部分である。令和 2 年度の本項目では、高線量率及び低線量率の放射線に被ばくしたラット個体の乳腺組織における細胞周期の測定系を、若手研究者が主体となって提案・構築し、実際に測定を行った。さらなるデータの蓄積が必要ではあるが、非照射群において内腔前駆細胞の S 期長が基底細胞よりも短いことは合理的であり、内腔細胞の細胞数を効率よく増やす手段であると考えられる。実際、TEB においては内腔細胞の数が基底細胞よりも多い。細胞周期長が過去の文献¹¹⁾よりもやや小さい数値となっている原因として、データ数の不足のほか、EdU と BrdU が体内で同等に速やかに消失するという仮定の再考の余地も挙げられる。EdU 単独陽性細胞数と

BrdU 単独陽性細胞数の比を用いて補正する方法が考えられ、次年度の課題とする。

2) 成果の利用法

平成 31（令和元）年度に構築した TEB モデルは、細胞ひとつひとつに増殖、移動、分化、死に関する定数を与え、実際の乳腺幹細胞系（TEB）の細胞数、増殖率、形態、伸長速度を再現したモデルである。放射線照射直後の細胞死の誘導については、前項で説明したダメージ修復モデルで記述する。このほかに、放射線照射後の中長期の細胞動態に現れる影響については、今回得られた検討課題を解決した後に、求める細胞周期長の変化に関する定数を使って、モデル化する。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

平成 31（令和元）年度の検討により、移植実験において GFP が外来抗原として移植組織の拒絶の原因となり得ることが確認された。そこで GFP を発現する系統をレシピエントとし、GFP を発現する LEW 系統の乳腺細胞及び GFP を発現しない LEW 系統の乳腺細胞を用いてモザイク組織を作製するのが適切であると考えられた。乳がん発生の可能性を高めるために、レシピエントには乳がん高感受性系統である Jcl:SD 系統と GFP ラットの F1 ラットを用いることとした。

引き続き令和 2 年度は、実際にこのレシピエントを用意して、移植によりモザイク組織を作製し、放射線照射による発がん刺激を与えて、長期飼育を開始した。照射時のタイミングで解剖した個体では、免疫的な拒絶の証拠は確認されず、GFP 細胞と野生型細胞のモザイクからなる乳腺組織が観察され、予定した実験系が成立していることが確認できた。

今後は、照射した個体において、移植部位以外に発生した腫瘍を摘出しつつ、移植部位の腫瘍における GFP 細胞と野生型細胞のモザイク性を解析する予定である。基底細胞と内腔細胞のどちらにおいてモザイク性が保持され、どちらにおいてそれが失われているかを判断することで、腫瘍の起源の推定を行う。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

平成 31（令和元）年度は GFP 細胞と RFP 細胞の計測法を検討した。引き続き令和 2 年度は、ラットの照射及び細胞移植を行い、細胞競合を示すための実験群の設定を完了した。照射から移植までには 3 ヶ月の期間において、細胞競合が生じることを期待した。ここで期間を 3 ヶ月とした理由は 2 つある。1 つは、11 週齢から 3 ヶ月後（すなわち 23 週齢）は、過去の実験⁹⁾の高線量率照射群で発がんが見られ始める時期であり、両線量率群の間で発がんを起こしうる細胞の数にすでに違いが生じていると考えられる時期であることによる。もう 1 つは、主任研究者らが以前行った実験¹⁰⁾において、ラット乳腺内の増殖細胞を標識して追跡すると 10 週間程度で大部分が排出されたことから、この程度の期間をおくことで組織内の細胞が入れ替わると予想されることによる。

今後は、移植から 3 ヶ月後に移植した細胞から形成された乳腺組織を摘出し、GFP 細胞数と RFP 細胞数の比率を計測する。非照射群、高線量率照射群、低線量率照射群の比較を行って、図 III-6 の概念図において予想される結果が得られるかどうかを評価する。

4. 数理モデル解析で考察すべき線量率について

図 IV-1 は、福島第一原発事故を始め、様々な疫学やラット乳がん実験に関する線量・線量率をまとめたものである。この図を元に、乳がん実験の線量率から原発事故に関わる線量率までをカバーする解析を行うべきと考えられる。

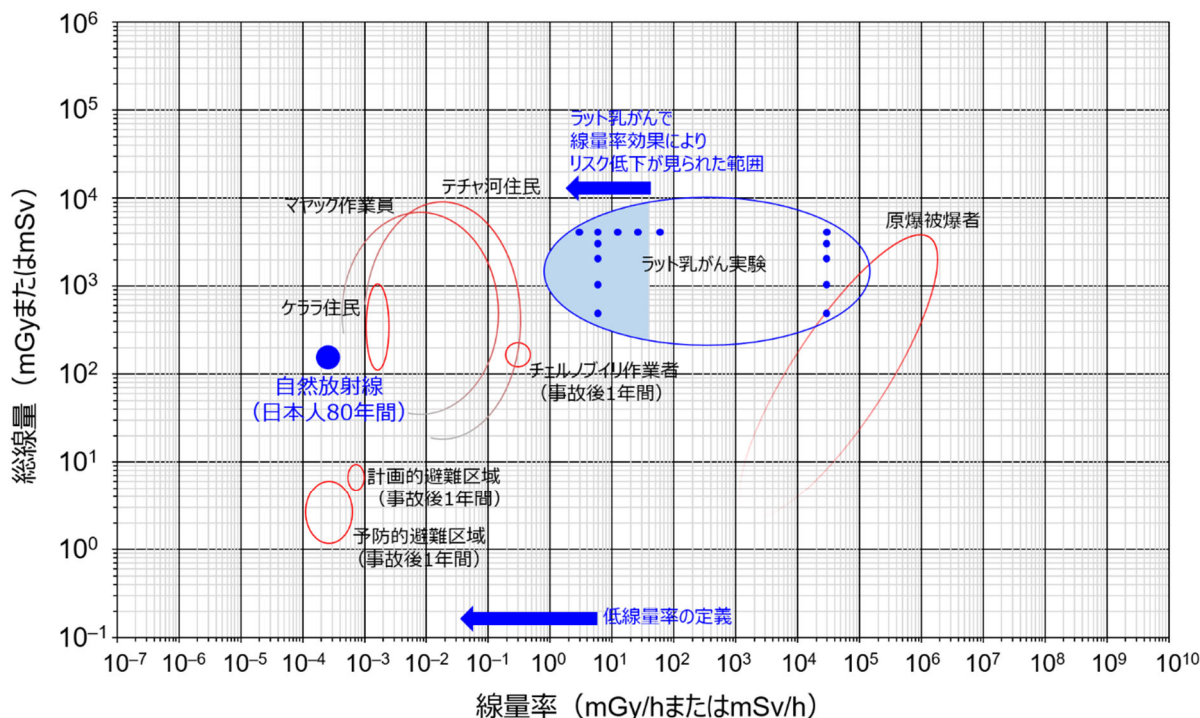


図 IV-1 様々な線量率と線量。自然放射線と福島第一原発事故由来の線量については文献^{4,12)}、ケララ住民については文献¹³⁾、その他は文献¹⁴⁾を参照した。

V. 結論

ラット乳腺において放射線による細胞動態変化から発がんまでを記述する数理モデルの構築に必要な幹細胞動態の情報として、乳腺における基底細胞と内腔細胞の DNA 二重鎖切断修復及び細胞周期の動態データを得た。また、次年度以降に解析するための、乳がん起源細胞を解明する実験及び細胞競合を評価する実験の設定を完了した。これらは、数理モデルの構築を通して、ラットの乳腺における発がんの線量率効果のメカニズムを解明することに寄与する成果である。

VI. 次年度以降の計画

令和2年度の計画は順調に進行し、計画書に示したマイルストーンを達成した。これを受けて、最終年度となる令和3年度も計画通りに実施する。すなわち、乳腺幹細胞系の動態のデータをさらに追加するとともに、がんの起源細胞、細胞競合の実験的エビデンスを確定するとともに、実験で得られた知見を取り入れたシミュレーションを行って、線量率効果が発生する要因を推定す

る。また、若手研究者の成長に資するために、研究内容の論文化を行う。さらには、環境行政への貢献に資するため、研究内容を大学等の講義に活用して、放射線影響の理解の普及に努める。

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) Kudo KI, Takabatake M, Nagata K, Nishimura Y, Daino K, Iizuka D, Nishimura M, Suzuki K, Kakinuma S, Imaoka T. Flow Cytometry Definition of Rat Mammary Epithelial Cell Populations and Their Distinct Radiation Responses, *Radiat Res* 2020; 194: 22-37.

イ) 学会発表等

- 1) 工藤健一,高島賢,西村由希子,臺野和広,飯塚大輔,西村まゆみ,鈴木啓司,柿沼志津子,今岡達彦. Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands. 第 19 回日本再生医療学会総会, 2020 年 5 月, オンライン (国内), ポスター発表.
- 2) Kudo KI, Takabatake M, Nishimura Y, Daino K, Nishimura M, Iizuka D, Kakinuma S, Imaoka T. Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2020 Virtual Annual Meeting, 2020 年 6 月, オンライン (海外), ポスター発表.
- 3) Imaoka T, Kudo KI, Suzuki K, Nishimura M, Daino K, Kakinuma S. Effect of radiation on the balance of normal epithelial cell populations in the rat model of mammary carcinogenesis. 第 79 回日本癌学会学術総会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), 口頭発表
- 4) Kudo KI, Nishimura Y, Suzuki K, Nagata K, Nishimura M, Daino K, Kakinuma S, Imaoka T. Imbalance between cell populations in normal mammary epithelium after radiation exposure in a rat model of breast cancer. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), ポスター発表.
- 5) Nagata K, Nishimura Y, Hattori Y, Watanabe R, Suzuki K, Kakinuma S, Imaoka T. Dynamics of DNA double-strand break repair in progenitor and mature cells of the rat mammary gland. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), ポスター発表
- 6) Kudo KI, Takabatake M, Nagata K, Nishimura Y, Daino K, Nishimura M, Iizuka D, Suzuki K, Kakinuma S, Imaoka T. Distinct Difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), ポスター発表.

ウ) 書籍・総説

該当なし。

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) 世界保健機関（World Health Organization）. Health risk assessment from the nuclear accident after the 2011 Great East Japan earthquake and tsunami, based on a preliminary dose estimation, WHO Press, Geneva, 2013.
- 2) 原子放射線の影響に関する国際連合科学委員会（United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation）. Sources, effects and risks of ionizing radiation, UNSCEAR 2013 Report to the General Assembly with Scientific Annexes, United Nations, New York, 2014.
- 3) 国際原子力機関（International Atomic Energy Agency）. The Fukushima Daiichi Accident. Technical Volume 4/5, Radiological Consequences, IAEA, Vienna, 2015.
- 4) 経済協力開発機構・原子力機関（Organization for Economic Co-operation and Development, Nuclear Energy Agency）. 2019 NEA Annual Report. OECD/NEA Publishing, Paris, 2019.
- 5) 米国放射線防護測定審議会（National Council on Radiation Protection and Measurements）. Approaches for Integrating Information from Radiation Biology and Epidemiology to Enhance Low-Dose Health Risk Assessment. National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, 2020.
- 6) Imaoka T, Nishimura M, Daino K, Hosoki A, Takabatake M, Nishimura Y, Kokubo T, Morioka T, Doi K, Shimada Y, Kakinuma S. Prominent dose-rate effect and its age dependence of rat mammary carcinogenesis induced by continuous gamma-ray exposure. *Radiat Res* 2019; 191: 245–254.
- 7) 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構. 「平成 30 年度文部科学省国家課題対応型研究開発推進事業英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業 幹細胞のキネティクスから発がんの線量率効果を紐解く 成果報告書」, 2019.
- 8) Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol* 2005; 283: 113–127.
- 9) Kisseberth WC, Sandgren EP. Polyclonal development of mouse mammary preneoplastic nodules. *Cancer Res* 2004; 64: 857–863.
- 10) Imaoka T, Hisatsune H, Sakanishi Y, Nishimura Y, Nishimura M, Shimada Y. Progesterone stimulates proliferation of a long-lived epithelial cell population in rat mammary gland. *J Endocrinol Invest* 2012; 35: 828–834.
- 11) Russo J, Russo IH. Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res* 1980; 40: 2677–2687.

- 12) 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（令和元年度版）」, 2019.
- 13) 量子科学技術研究開発機構. 「放射線リスク・防護研究基盤準備委員会報告書」, 2017.
(<https://www.qst.go.jp/uploaded/attachment/2910.pdf>)
- 14) Rühm W, Azizova T, Bouffler S, Cullings HM, Grosche B, Little MP, Shore RS, Walsh L, Woloschak GE. Typical doses and dose rates in studies pertinent to radiation risk inference at low doses and low dose rates. *J Radiat Res* 2018; 59: ii1–ii10.

Deciphering the mechanism underlying the dose rate effect of radiation carcinogenesis using animal and mathematical models

Tatsuhiko Imaoka¹, Yuya Hattori²

¹ *National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology*

² *Tokyo Institute of Technology*

Key word: radiation carcinogenesis, low dose rate radiation, dose rate effect, animal model, mathematical model, stem cell

Abstract

The persisting health concerns after the TEPCO Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident result from the temporal increase in the environmental radiation dose rate. There have been only insufficient insights from human studies into the dose rate effect of radiation-associated cancer risk (i.e., whether or not the effect at low dose rates is reduced from that of high dose rates as in the atomic bomb survivor study). On the other hand, the dose rate effect has been eminent in animal carcinogenesis experiments. The purpose of this project is to elucidate the mechanism underlying the dose rate effect of breast cancer risk in rat experiments. The goal is to address the issue of risk assessment of low-dose-rate radiation and to produce information as a potential countermeasure for health anxiety. To this end, this project conducts joint biological and mathematical researches to obtain new experimental data, quantitatively interpret them and elucidate the mechanism underlying the dose rate effect. In the first year of 2019, the inactivating effect of radiation for individual breast cell type was investigated, the experimental details for the following years were determined, and a mathematical model simulating the breast was constructed. In this second year of 2020, we clarified the damage repair and cell cycle changes in the breast after radiation exposure, and acquired related parameters necessary for mathematical modeling. We have also completed the setup of an experiment to elucidate the cell type from which radiation-induced breast carcinogenesis originates and another experiment to elucidate a process called cell competition in which radiation-affected cells are removed from the tissue. We also constructed a mathematical model that describes the relationship between radiation-induced cell inactivation and dose rate, and another model that describes the process of carcinogenesis, and analyzed their behavior. As a result, we clarified the conditions under which the dose rate effect appears. Since all of the results were as planned, in the final year of 2021, we will continue to acquire tissue dynamics data, completed estimation of the cellular origin of radiogenic cancer and evaluation of cell competition, and identify the mechanism of the dose rate effect on the finalized mathematical model. We will further use the research information for lectures of universities to facilitate understanding on radiation health effects.