

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

幹細胞動態数理モデルの構築

服部佑哉（国立大学法人東京工業大学・助教）

研究要旨

低線量率放射線によるがんリスク評価のためには、生物学的メカニズムの知見に基づいてモデル化することで数理的に評価するアプローチが必要である。本研究では、幹細胞の動態を元に発がんを記述する数理モデルを構築し、実験的知見を加味して、線量率効果を説明する要因を示すことを目的とする。発がん過程のモデル化の対象には、発がんの線量率効果が明確なラット乳がんモデルを使用する。初年度である平成 31 年度（令和元年度）は、数理モデルに必要なパラメータの推定に資するラット乳腺の幹細胞動態データの一部を実験によって取得した。数理モデルについては、1 細胞の状態変化追跡の仕様を満たすモデルとするために、乳腺と対象とした組織モデルの拡張と、発がん過程モデルと線量率モデルの構築を実施した。令和 2 年度は、ラットの乳腺における損傷修復動態、細胞周期の変化を評価し、数理モデルに反映させた。これにより、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にエビデンスを追加することができた。さらに、数理モデルの線量率依存性の挙動を解析し、条件検討を行った結果、低線量率でがんリスクが低くなる線量率効果を説明し得ることが示せた。最終年度である令和 3 年度は、数理モデルを用いて発がんの線量率効果のメカニズムの特定を目指す。

キーワード：末梢芽状突起、数理モデル、線量率効果、発がん、幹細胞

研究協力者

渡辺立子（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）

I. 研究目的

低線量率被ばくのがんリスクが高線量率のリスクより低いかどうかは、放射線リスク評価を大きく左右する。現状では低線量率被ばくの疫学データの精度が高くないことから、低線量率放射線によるがんリスク評価には、作用機序の生物学的メカニズムの知見に基づいてモデル化することで数理的に評価するアプローチが必要である。

我々は、これまでの研究でラット乳腺の細胞動態を解析するために、プロトタイプモデルを構築してきた。本研究の目的は、ラットの乳腺を対象として、数理モデルの構築と実験データの解

析を行うことで、線量率効果の因子を明らかにすることである。

ラット乳腺の幹細胞系（末梢芽状突起、TEB）の細胞動態数理モデルのプロトタイプ（状態遷移モデル）を作成した実績の上、初年度である平成 31 年度（令和元年度）は、このプロトタイプのモデルを、空間構造を持つモデルや発がんの過程を表現する数理モデルに関連づけること、主任研究者の実験で得られた情報を取り込むことによって精緻化し、モデルを構成する様々な要素のうち線量率効果を説明するために重要なものを見つけ出すことを目的とした。本研究が考える解析・予測モデルは、TEB モデル、ダメージ修復モデル、発がん過程モデル、線量率モデルの 4 つのモデルから構成される。昨年度は、数理モデルについては、TEB モデルの拡張と、発がん過程モデルと線量率モデルの構築を実施した。これにより、解析に必要な 1 細胞の状態変化追跡の仕様を満たすモデルが構築できた。そこで、本年度は、本数理モデルの主軸となる、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（ダメージ修復モデル）と、発がんの過程を記述するモデル（発がん過程モデル）に実験的エビデンスを追加することによって発展させ、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線量率効果があらわれる条件を具体的に検討する。

II. 研究方法

本年度は、昨年度までに構築した TEB における発がん過程を記述する数理モデルについて、パラメータの決定と挙動解析を実施した。図 II-1 には、モデルの概要を示す。

1. ダメージ修復モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

① 修復率の推定

図 II-1 で示した放射線発がん過程の一連のモデルのうち、まず、細胞の増殖・分化・細胞死に関するパラメータ値を決定した。TEB を構成する個々の細胞の状態は、ダメージ修復モデルによって決定される。ダメージ修復モデルは、細胞における放射線により生じるダメージの蓄積レベルと修復過程・細胞死を計算するモデルである。このモデルでは、細胞の運命を決定づけるダメージは、その実態を限定しなくても成立するように汎用性をもたせてデザインした。しかし、本研究プロジェクトでは、ダメージの実態として DNA 二重鎖切断マーカーで検出できる DNA 二本鎖切断を想定し、ラットの TEB 細胞実験データから損傷の修復率を決定することとした。

② 線量率による生存率への影響解析

上記の DNA 損傷の修復動態の実験データを用いて決定した、ダメージ修復モデルの修復率等のパラメータを用いて線量率を変えて細胞生存率を計算し、ダメージ修復モデルの細胞生存率の線量率依存性を解析した。

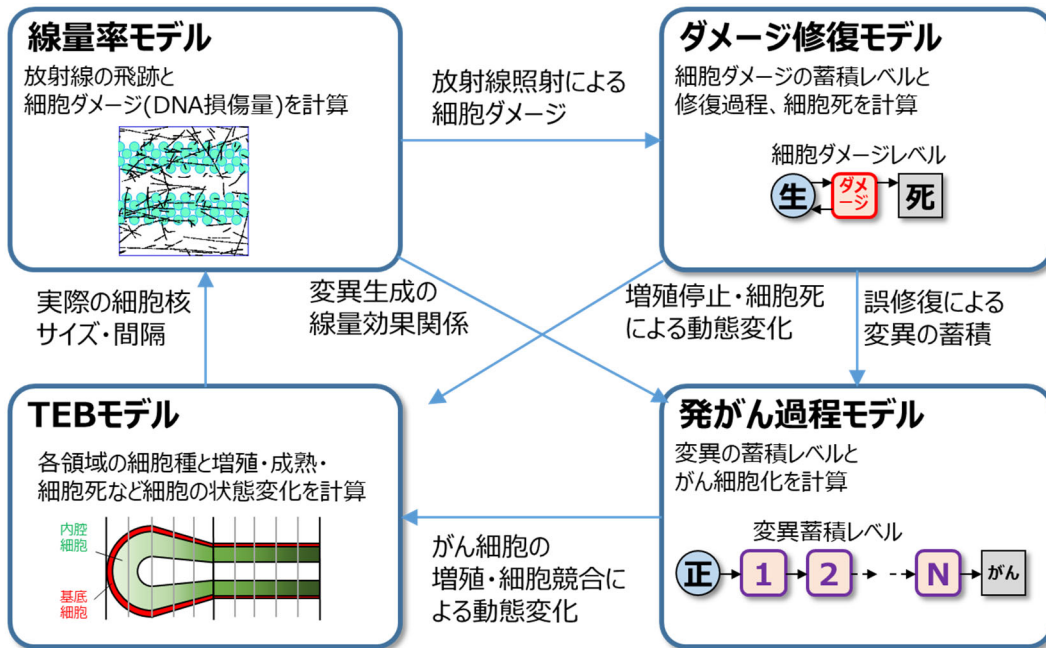


図 II-1 構築した TEB における発がん過程を記述する数理モデルの構成

2. 発がん過程モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

① 発がん過程モデルのパラメータ値の決定

主任研究者らによって実施された乳がんデータの解析によって決定したパラメータである変異蓄積の段階数に加え、今年度は細胞の変異の蓄積による発がん過程のモデルを用いて非照射の乳がんの発生率の時間経過の実験データを再現することにより、非照射の細胞における変異率を求めた。

② 発がん過程モデル（単独モデル）による線量率依存性の解析

発がん過程モデルに重要なパラメータである変異率に着目し、放射線照射によって生じる変異率と線量率の関係により、線量率の違いががんリスクに与える影響を解析した。

③ ダメージ修復モデルを取り込んだ発がん過程モデル（複合モデル）の挙動解析

次に、発がん過程モデルにおいてダメージ修復モデルを取り込む複合モデルを作成した。これを用いて、線量依存性の挙動解析を行った。

この複合モデルは、発がん過程の各変異レベルで、独立した生存率モデルを用いて放射線照射による生死の判定を行う。この結果、各段階において一定数の致死が生じる。一方、組織が維持されることを前提に系全体の細胞数は一定であるとしたため、放射線による致死によって減少した分の細胞数は、生細胞が分裂して補充されると仮定した。この仮定の下で、修復率、変異率と線量率の関係、死細胞を補う細胞腫の種類を変数として、②と同様の解析を行った。

（倫理面への配慮）

人を対象とした研究は行わない。動物実験、遺伝子組換え実験は行わない。研究に参加する者は、研究機関が実施する、研究倫理に関する教育訓練を受講する。

III. 研究結果

1. ダメージ修復モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

① 修復率の推定

本研究で構築・使用する、細胞の状態を判定するためのダメージ修復モデルの概要を図 III-1 に示す。このモデルは、放射線により生じるダメージの蓄積レベルと修復動態を考慮して細胞生存率を計算することができる¹⁾。

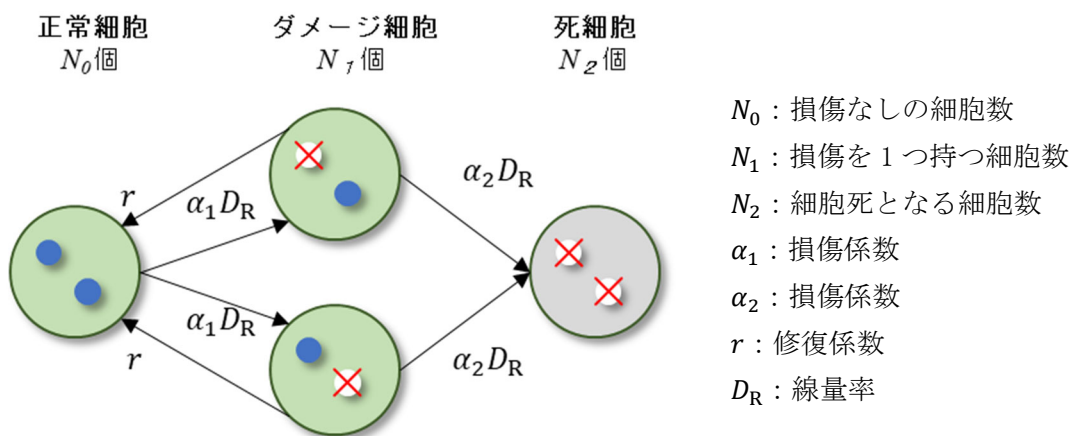


図 III-1 ダメージ修復モデルの概要とパラメータ

正常細胞、ダメージ細胞、死細胞それぞれの細胞数は、上図に示したパラメータを用いて下記のような微分方程式で表すことができる。

$$\begin{aligned} \frac{dN_0(t)}{dt} &= -2\alpha_1 D_R N_0(t) + 2r N_1(t) \\ \frac{dN_1(t)}{dt} &= 2\alpha_1 D_R N_0(t) - (2\alpha_2 D_R + 2r) N_1(t) \\ \frac{dN_2(t)}{dt} &= 2\alpha_2 D_R N_1(t) \end{aligned}$$

また、時間 t における細胞生存率 $S(t)$ は、上記の各状態の細胞数から、下記の式で求めることがで

きる。

$$S(t) = \frac{N_0(t) + N_1(t)}{N_0(t) + N_1(t) + N_2(t)}$$

モデルのパラメータのうち、損傷係数と修復率を決定する必要がある。まず、損傷係数、 α_1 、 α_2 は、主任研究者らのグループが取得した高線量域（0.5 Gy/min）での生存率曲線¹⁾を再現する条件により決定した。さらに、主任研究者らのグループが取得した、ラット乳腺における 53BP1 の免疫染色による foci の係数による DNA 二本鎖切断収率の修復動態の結果をもとに、修復率 r を決定した。具体的には、内腔前駆細胞 DNA 損傷修復動態のデータ（本報告書研究項目 I の研究結果：図 III-2-D 参照）に対して、この修復動態は、早い修復と遅い修復の二成分から成ると仮定し、さらに、細胞の致死にかかわる重篤な損傷に対応するのが遅い修復という仮定のもとに、遅い成分への近似式： $y = Ae^{-rt}$ により、修復率 r を決定した。図 III-2 には、内腔前駆細胞の修復動態の実験データと遅い修復成分への近似曲線を示した。この解析の結果、得られたパラメータの値は、 $\alpha_1 = 0.3846$ (1/Gy)、 $\alpha_2 = 0.1923$ (1/Gy)、 $r = 0.001302$ (1/min)となった。

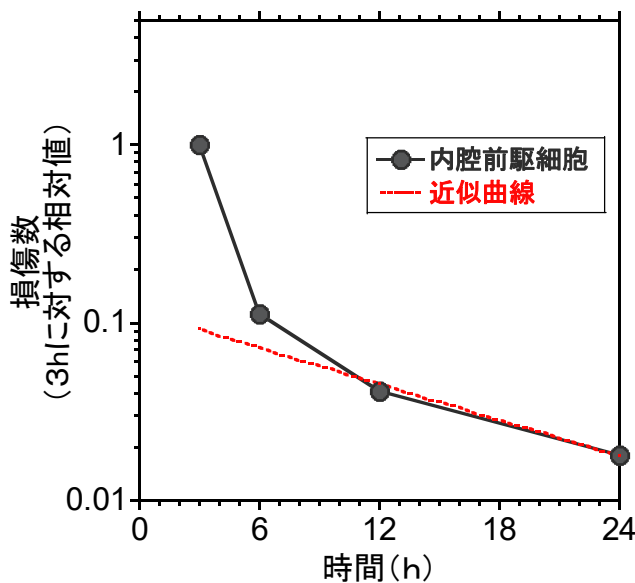


図 III-2 内腔前駆細胞の修復動態の実験データと近似曲線

② 線量率による生存率への影響解析

次に、上記のように決定したパラメータを用いて、線量率のみを変えて生存率を計算した結果を、図 III-3 に示す。計算条件は、累積線量が 0～4 Gy のときの、高線量率（0.5 Gy/min）、低線量率 1（0.01 Gy/min）、低線量率 2（0.001 Gy/min）とした。

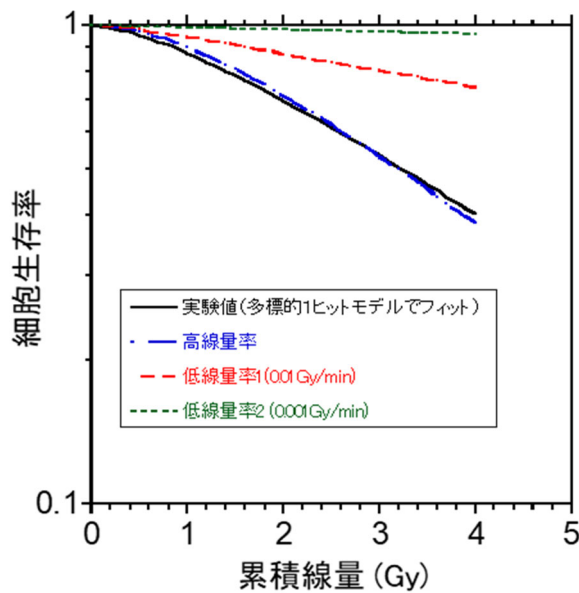


図 III-3 ダメージ修復モデルを用いて計算した細胞生存率の線量率依存性
 計算に用いたパラメータの値は、 $\alpha_1 = 0.3846$, $\alpha_2 = 0.1923$, $r = 0.001302$
 図中の多標的 1 ヒットモデルは、実験データ¹⁾への回帰曲線に相当

この結果、主任研究者らの実験値である高線量率（0.5 Gy/min）の生存率データ¹⁾をよく再現した多標的 1 ヒットモデル（黒実線）と同程度の再現性を得られた。さらに、線量・線量率が低くなるほど生存率が高くなるという挙動を示した。以上から、本研究で構築したダメージ修復モデルは実験値を表現できており、さらに線量率の影響を反映していることを示すことができた。

2. 発がん過程モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

発がん過程モデルの概要とパラメータを図 III-4 に示す。発がん過程は、正常細胞に、誤修復による変異イベントが起きて、変異レベルの状態が段階的に蓄積状態に変化し、最終的にがん化の状態を示す、いわゆる多段階変異モデル（Armitage-Doll モデル）²⁾で記述した。

本プロジェクトの研究対象であるラットの乳がんの発がんに至るまでの変異蓄積の段階数は、昨年度、ラット乳がんの罹患率のデータ³⁾を、この発がん過程モデルにより解析した結果、約 3 段階であると決定されている。

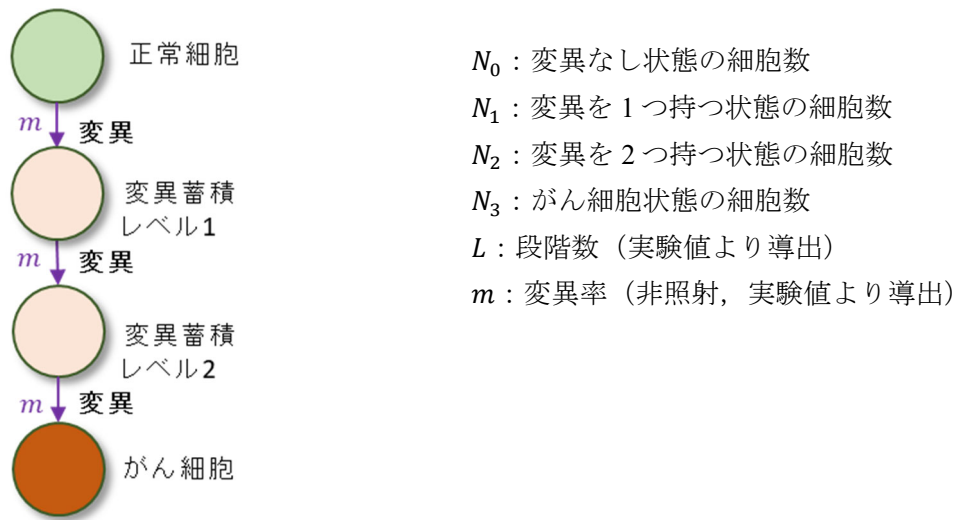


図 III-4 発がん過程モデルの概要

図 III-4 で示した各変異レベルの状態の細胞数は、下記のような微分方程式で表すことができる。

$$\begin{aligned} \frac{dN_0(t)}{dt} &= 0 \\ \frac{dN_1(t)}{dt} &= mN_0(t) - mN_1(t) \\ \frac{dN_2(t)}{dt} &= mN_1(t) - mN_2(t) \\ \frac{dN_3(t)}{dt} &= mN_2(t) \end{aligned}$$

また、時間 t におけるがん細胞数の割合 $S(t)$ は、上記の各変異レベルの状態の細胞数から、下記の式で求めることができる。

$$S(t) = \frac{N_3(t)}{N_0(t) + N_1(t) + N_2(t) + N_3(t)}$$

① パラメータ値の決定

先に述べたように、がんに至るまでの変異蓄積の段階数 $L \sim 3$ は、昨年度に実施された解析によって決定済みである。今年度は、図 III-5 に示すように、発がん過程のモデルを用いて、さらに高い精度で非照射の乳がんの実験データを再現することにより、非照射の細胞における変異率を、 $m_0 = 9.92 \times 10^{-7}$ と決定した。

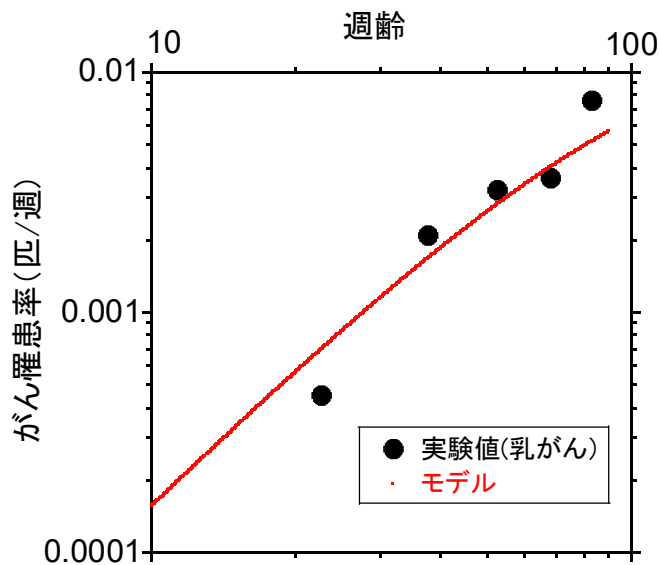


図 III-5 非照射細胞の乳がん罹患率データ³⁾と発がん過程モデル

② 発がん過程モデル (単独) による線量率依存性の解析

まず、図 III-4 に示した、発がん過程モデルを単独で用いて、変異率を変数とする解析を行った。具体的には、放射線照射によって生じる変異率が、線量率に対してどのような関係で増加するかに着目して、線量率の違いががんリスクに与える影響を解析した。このために、放射線照射による変異率 m を、次のように、線量率 D_R に対する二次関数であらわした。

$$m = m_2 D_R^2 + m_1 D_R + m_0$$

$$m_0 = 9.92 \times 10^{-7}$$

上の式において、線量率 D_R の一次の項、二次の項、それぞれの係数であるパラメータ m_1 と m_2 について、それぞれ 0~0.5 の間の 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 の 5 点の数値を選んで、25 通りの組み合わせを作り、それぞれの条件下で、がんリスクに対する線量率の影響の現れ方を調べた。

図 III-6 には、この 25 通りの組み合わせの中で代表的な変異率の線量に対する関係式、累積線量に対するがんリスクの相対値を、線量率を変えて計算した結果を示す。

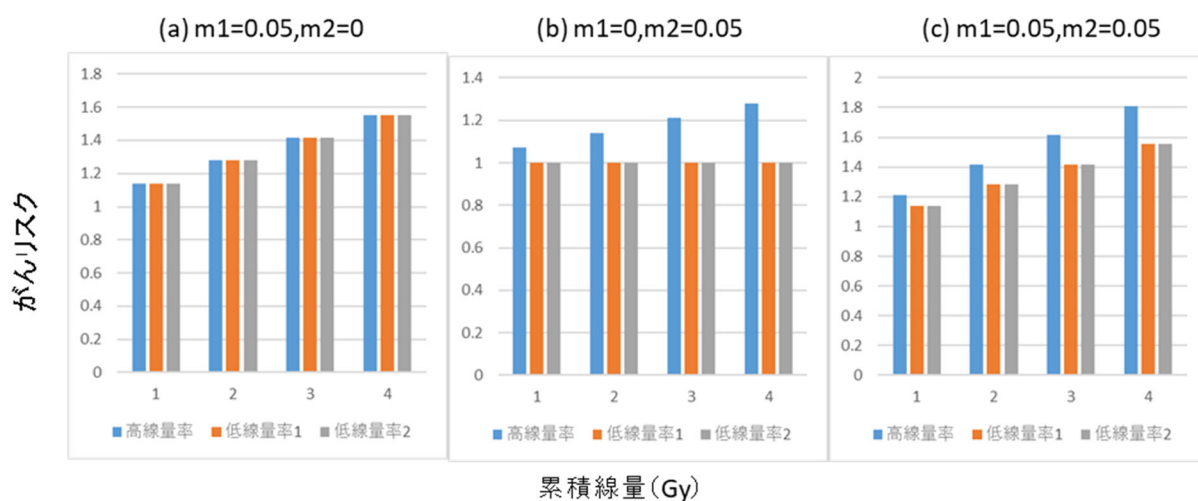


図 III-6 発がん過程モデル単独による線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率 1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率 2 (0.001 Gy/min)

図 III-6 の3つのグラフは、それぞれ、変異率が線量率に対して、(a)線形、(b)二次、(c)線形二次の関係で増加する場合に対応している。図からわかるように、(a)の線形の関係式の場合には、いずれの線量率の場合も、がんリスクは累積線量とともに増加するのみで線量率による違いが全くみられなかった。(b)の二次式の場合には、高線量のがんリスクが高く、低線量率では累積線量の増加に対してもがんリスクは増加しないという結果になった。(c)の場合には、高線量でがんリスクは高くなるが、低線量でも累積線量とともにがんリスクは増加するという結果を示した。この結果から、変異率と線量率の関係が、線量率効果の現れ方に大きく影響する重要な因子であることがわかった。

③ ダメージ修復モデルを取り込んだ発がん過程モデル（複合）の挙動解析

次に、発がん過程モデルにおいてダメージ修復モデルを取り込んだ複合モデルを作成した。この複合モデルは、発がん過程の各変異レベル内に、独立した生存率モデルを統合したものになり、各変異レベルの細胞の放射線照射によるダメージのレベルと生死の判定を行うことができる。これにより、放射線照射に伴う各変異段階における致死細胞の数を計算することができる。一方、組織が維持されることを前提に系全体の細胞数は一定であるとしたため、放射線による致死によって減少した分の細胞数は補充されなければならない。そこで、生細胞が分裂して補充されると仮定した。この仮定の下で、②と同様の変異率と線量率の関係の条件を変え、さらに、放射線による致死によって減少した分の細胞数を補する細胞の種類によって、次の3つのパターンに分けた。

- 1) 致死細胞が正常細胞によって補われると仮定した場合（図III-7）
- 2) 致死細胞が同じ変異段階の細胞によって補われると仮定した場合（図III-8）

3) 致死細胞が、一段階変異の進んだ細胞によって補われると仮定した場合 (図III-9)

1)~3)のそれぞれのモデルの概要と、解析の結果を、図III-7~9 に示した。モデル概要の図の中の緑の線は、死細胞に対する補充の経路を示した。補充細胞の種類が異なる3つのモデルの計算結果のいずれも、(a)のグラフは、 $m_1=0, m_2=0$ の条件であり、細胞の変異率 $m=m_0$ という条件を示している。この場合、放射線による変異は起こらず、細胞死のみ起こるので、その分の生細胞による補充によって、線量率効果が現れるということになる。なお、現時点では、ダメージ修復モデルで考えるヒット数や損傷数は細胞死の決定に使われるが、細胞の変異率には関係しないとしている。他は、変異率と線量率の関係が、(b)は線形 (c)は二次、(d)は線形二次である。

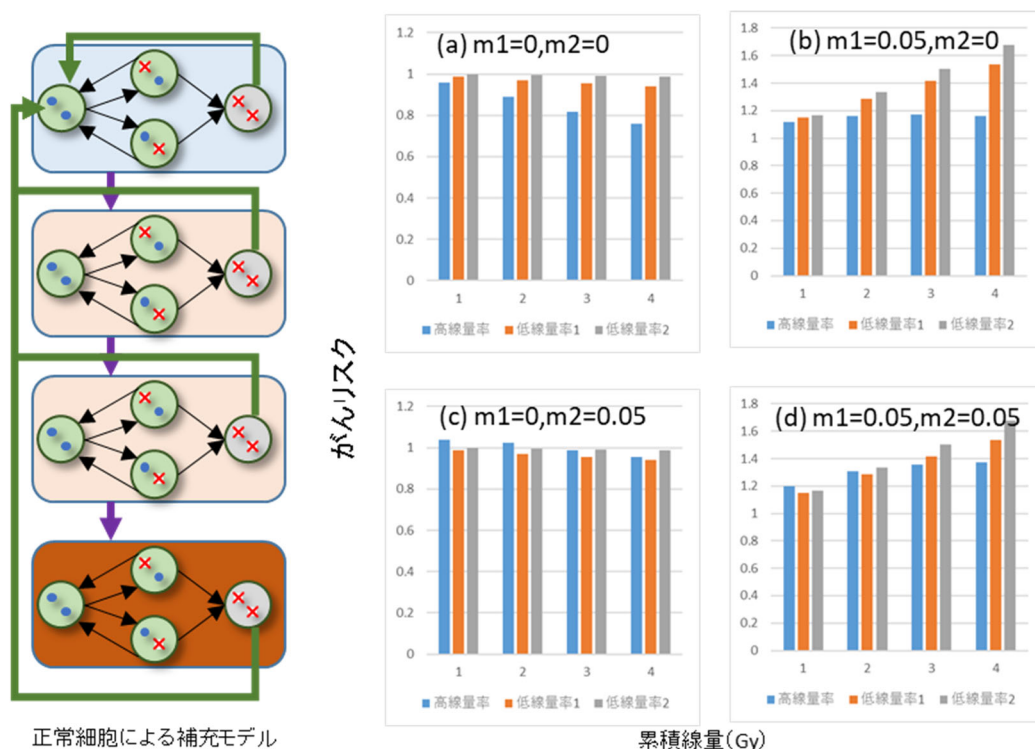


図 III-7 致死細胞が正常細胞に補われる場合の線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率 1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率 2 (0.001 Gy/min)

1)の場合 (図III-7) には、(a)の照射による変異がない場合も、(c)の場合も、高線量率照射ではがんリスクの低下がみられた。これは、細胞死が増えるほど、組織内は正常な細胞が増殖するためである。(b)(d)の場合には、低線量率は線量とともにリスクは増加し、高線量率は増加後に減少した。この結果から、致死細胞が正常細胞に置き換わるモデルでは、照射による細胞死よりも、照射による変異が早い条件を設定しない限り、線量率効果はあらわれないことがわかった。

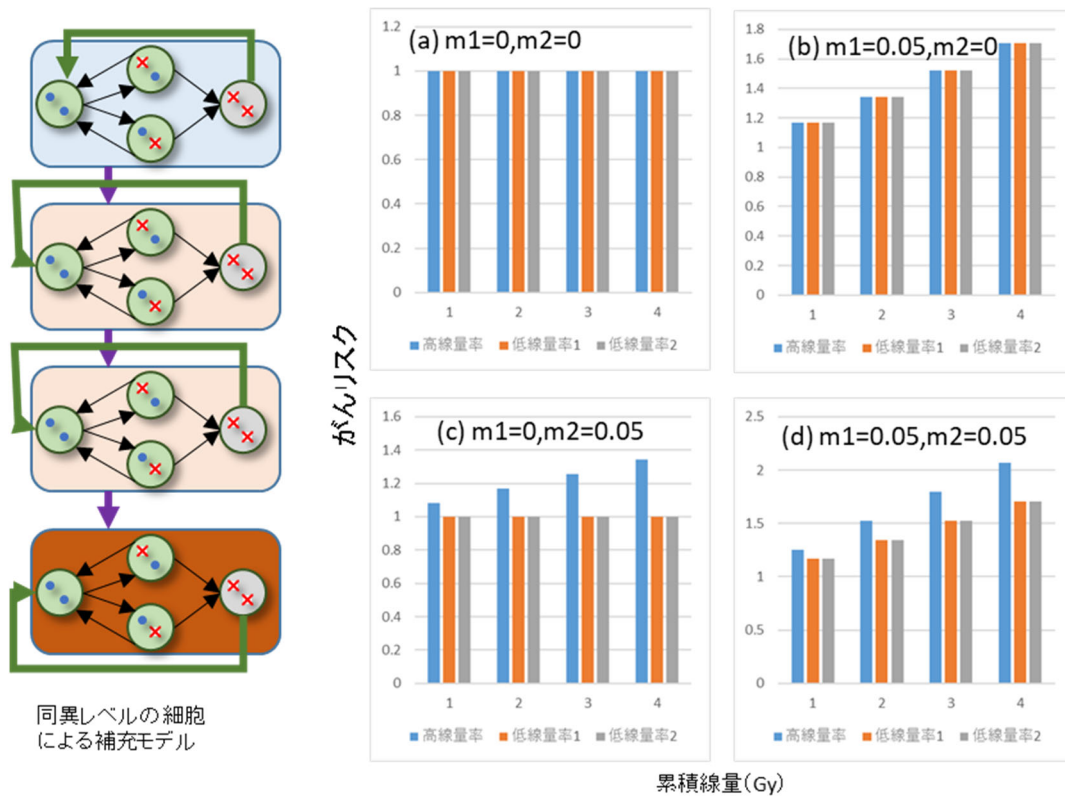


図 III-8 致死細胞が同変異レベルの細胞に補われる場合の線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率2 (0.001 Gy/min)

2)の場合(図III-8)には、(a)の照射による変異がない場合は、すべての線量率でがんリスクは変化しなかった。このモデルでは、同レベルの細胞内で細胞の補充が行われるだけなので、細胞死が起きて、またもとの状態に戻るといった現象が起きるため、照射による細胞死は変異の進み方に影響を与えない。結果的に、ダメージ修復モデルの効果があらわれず、②で解析を行った、発がん過程モデルの単独モデルの場合と同じ結果となることがわかった。

最後に、3)の場合(図III-9)には、すべての変異率で、どの線量率でも線量とともにリスクが増加した。致死細胞数は線量率が高いほど増加するため、線量率が高いほどがんリスクは大きく増加という線量率効果はみられるが、低線量率のがんリスクも、累積線量に対して増加するという傾向を示すことがわかった。

以上の解析を通して、変異の蓄積に基づく発がん過程モデルでは、変異率と線量率の関係が一次式、あるいは線形二次式であらわされるという仮定の下では、低線量率でがんリスクが低くなる線量率効果を説明するのは難しく、変異率が線量に対して二次式の関係で増加すると考えると、線量率効果が現れ得ることが分かった。さらに、細胞死が起きた場合に、変異の進んだ細胞が増殖して補うと仮定すると、線量率効果が現れることも示された。

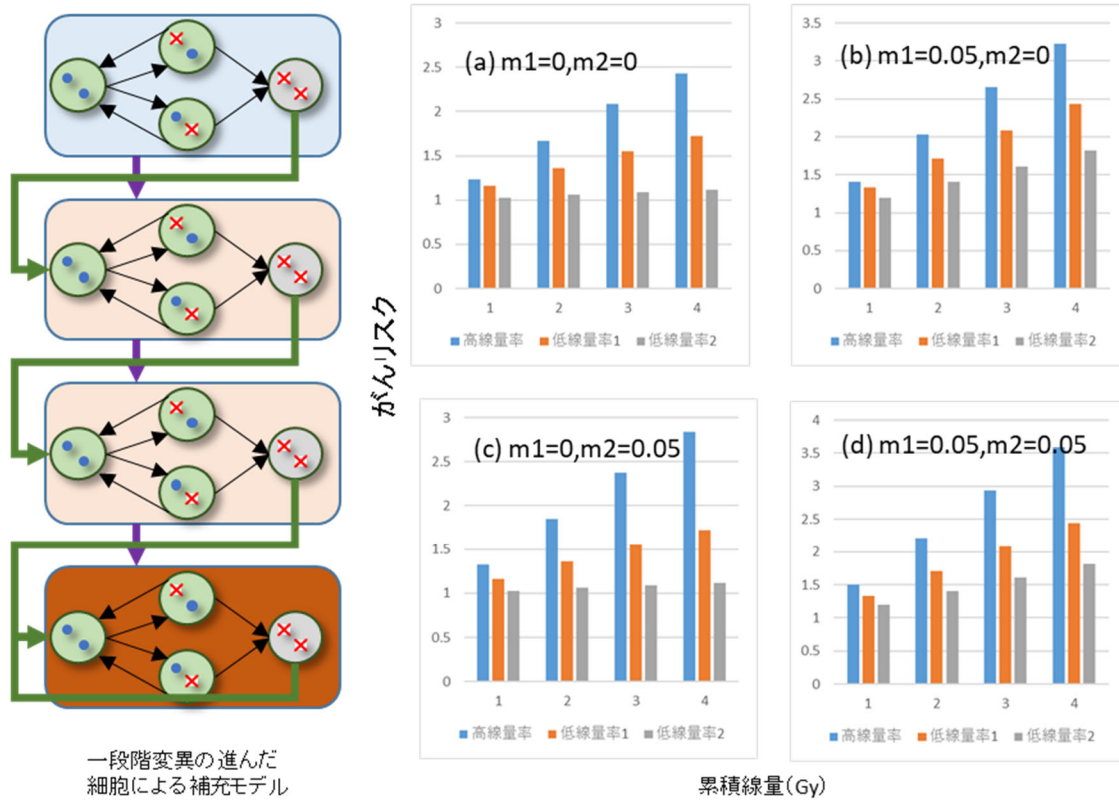


図 III-9 致死細胞が一段階変異が進んだ細胞に補われる場合の線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率 1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率 2 (0.001 Gy/min)

IV. 考察

本分担研究では、ラットの TEB を対象とし、がんリスクの線量率効果の因子を明らかにするために、細胞の照射影響の時間変化を追跡可能な数理モデルを構築する。本年度は、解析・予測の数理モデルを構成する昨年度までに構築した数理モデルについて、主任研究者らのグループによる実験データを反映してパラメータを決定し、これをもとにモデルの挙動解析を行った。この中で、ダメージ修復と変異と細胞死の各々の挙動から、がんリスクに関する線量率効果の条件についての手がかりを得ることができた。特に、変異率と線量率の関係、組織内での細胞動態の重要性が示されたことにより、今後の研究の方向性と発展性が明確になった。次年度は、さらに具体的にラットの TEB における細胞動態を通して発がん過程に対する線量率効果の要因に迫る。

V. 結論

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。

VI. 次年度以降の計画

今年度は、実験とモデルとの連携を通して、数理モデルにエビデンスに基づいたパラメータを導入することができた。また、発がん過程と線量率との関係を具体的に検討するための予備計算を行うことができ、本研究の目的に大きく前進することができた。今後、構築・精緻化した数理モデルを用いて、線量率効果への影響が大きいパラメータや状態を調べる。個々のパラメータ値や個々の状態内の細胞数を変えた時の線量率効果を網羅的に解析し、線量率効果に大きく寄与する要因を特定する。そして、LNT モデルに追加すべき要因として提案する。

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

該当なし

イ) 学会発表等

- 1) 渡辺立子、服部佑哉、横谷明德. Simulation of dose-rate effect on DNA damage and cellular responses. 日本放射線影響学会第 63 回大会（オンライン）2020 年 10 月

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) 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.
- 2) Armitage P, Doll R. The Age Distribution of Cancer and a Multi-stage Theory of Carcinogenesis. *Br J Cancer* 1954; 8: 1–12.
- 3) Imaoka T, Nishimura M, Daino K, Hosoki A, Takabatake M, Kokubo T, Doi K, Showler K, Nishimura Y, Moriyama H, Morioka T, Shimada Y, Kakinuma S. Age Modifies the Effect of 2-MeV Fast Neutrons on Rat Mammary Carcinogenesis. *Radiat Res* 2017; 188: 419–425.

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

Development of a stem cell dynamics model

Yuya Hattori

Tokyo Institute of Technology

Key words: terminal end bud, mathematical model, dose rate effect, carcinogenesis, stem cell

Abstract

A mechanism-based approach is needed to clarify whether the cancer risk of low dose rate exposure is lower than the risk of high dose rate exposure. The purpose of this study is to elucidate the factors contributing to the dose rate effect by using a mathematical model. We have previously built a prototype of a mathematical model describing the dynamics of the rat mammary gland structure containing the stem cells (i.e., terminal end bud; TEB). In this project, we developed the model to deal with the carcinogenesis process of rat mammary gland. Our analytical and prediction models to be constructed consist of four models: a TEB model, a damage repair model, a carcinogenic process model, and a dose rate model. In the first year of the project, the TEB model was refined to include the spatial structure based on the observed data. Also, the carcinogenesis process model and the dose rate model were constructed. For each model, the single-cell state-change tracking was made available. In this year, we introduced some lines of experimental evidence into the mathematical models. The DNA damage repair kinetics in the mammary gland after irradiation were experimentally clarified and introduced as the parameters of the damage repair model. The mutation probability of carcinogenesis process was determined from the data of rat mammary cancer. Using these mathematical models with the determined parameters, the dose-rate effect on the carcinogenesis was simulated. The simulation showed that the dose-rate effect could be reproduced under some conditions. In the next year, we aim to identify the critical factors in the dose rate effect on the carcinogenesis by using the developed mathematical model.