# テーマ (2)

# 放射線による健康影響の解明及び放射線以外の 要因による健康リスクの低減を含めた 総合的な健康リスクに関する研究

- 2-1 極低線量率放射線連続被ばくマウスを用いた健康影響解析 杉原 崇 (環境科学技術研究所生物影響研究部 主任研究員)
- 2-2 小児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

鈴木 啓司(長崎大学原爆後障害医療研究所放射線災害医療学 准教授)

- 2-3 小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価——インドケララ州の高自然放射線地域住民の調査結果を中心として 秋葉 澄伯(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座疫学 予防医学 教授)
- 2-4 マウスを用いたセシウム 137の慢性的低線量内部被ばくによる成体と子孫への影響の定量的実験検証

中島 裕夫 (大阪大学大学院医学系研究科放射線基礎医学 助教)

- 2-5 低線量率放射線長期連続照射によるマウス急性骨髄性白血病の起因となる PU.1 遺伝子変異の線量率依存性の解析~放射線発がんの線量率効果の仕組みを考える~ 甲斐 倫明 (大分県立看護科学大学看護学部人間科学講座環境保健学教室 教授)
- 2-6 低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか?低線量率放射線は?放射線関連 循環器疾患の機序の解明

髙橋 規郎(放射線影響研究所副理事長室 顧問)

2-7 DNA 損傷・修復に基づく放射線・化学物質影響の統合と個人差の評価に関する研究

松本 義久 (東京工業大学原子炉工学研究所物質工学部門 准教授)

# 極低線量率放射線連続被ばくマウスを用いた健康影響解析

杉原崇 (環境科学技術研究所生物影響研究部主任研究員)

#### 研究要旨

【目的】0.05、1.1 および 21 mGy/22 時間/日の低線量率 γ 線を B6C3F1 マウスに 400 日間連続照射した研究において、肝腫瘍発生率に関して、雄のみすべての照射群で肝腫瘍発生率の増加が見られ、低線量率放射線照射による肝腫瘍発生には性差があることを 2007 年に報告した。この結果より、低線量率放射線照射による肝腫瘍発生には性ホルモンの影響が関与している可能性が示唆された。そこで、本研究では、雄 B6C3F1 マウスに 0.05 mGy/日の放射線を長期連続照射し、生物指標(体重、肝腫瘍発生率、臓器相対重量、血球数、血清成分、病理及び遺伝子発現)について解析すると共に、去勢処置した群を設定し、去勢による肝腫瘍発生への影響についても解析を行った。さらに、最終年度である今年度は低線量率放射線を 400 日間連続照射後 100 から 300 日後のマウスを解剖し、体重、肝腫瘍発生率、精巣相対重量、病理組織変化および遺伝子発現を解析した。

【結果】体重は極低線量率(0.05mGy/日:以下、極低線量率と記載)照射群では非照射群と比較し、照射開始後 100 から 400 日目の期間有意に増加し、600 日目以降は減少する傾向が見られた。解剖時の精巣相対重量は、照射開始から 200 から 500 日目の期間有意な減少が見られた。また、肝腫瘍発生率は極低線量率照射群で 300、400、600 及び 700 日目において増加傾向が見られた。一方、去勢マウス群では、照射開始から 600 日目に、非去勢群に比較して、非照射群(P<0.01)と極低線量率照射群(P=0.07)の両者共に肝腫瘍発生率の増加が見られた。非去勢マウスにおいて、血清中テストステロン量には照射による有意な変化は認められなかったが、精巣の遺伝子発現解析では、100 から 400 日の照射期間全ての時点で精巣細胞特異的遺伝子の有意な発現減少が観察され、病理標本解析により精巣内でのこの遺伝子発現部位を特定できた。

【結論】以前実施した1群約500匹を用いた寿命調査実験の極低線量率照射群マウスでは、体重の増加傾向と肝腫瘍発生率の有意な増加を報告している。一方、本実験では極低線量率照射群で有意な体重増加が見られたが、肝腫瘍発生率については増加傾向のみ見られており、本実験結果は検体数の不足により有意差がでなかった可能性が考えられる。一方、非照射群の去勢マウスにおける肝腫瘍発生率の有意な増加は、精巣機能の欠損が雄B6C3F1マウスの肝腫瘍発生に多大な影響を及ぼしていることを意味し、さらに極低線量率放射線照射群において精母細胞特異的遺伝子発現量の有意な減少が見られたことから、極低線量率照射は精巣機能に障害を誘発している可能性が考えられた。

【考察】本実験では、極低線量率放射線を連続照射したマウスの精巣における遺伝子発現の有意な減少を明らかにした。今回得られた知見から、今後、極低線量率放射線連続照射による精巣への影響と肝腫瘍発生の関連性をより詳細に検討するとともに、動物実験の結果がヒトに一般化できるのかどうかについても、今後検討する必要があると考える。一方で、極低線量率

連続照射群に見られる影響は非常にわずかなため、マウス飼育条件等の他の要因による影響で表現型(肝腫瘍増加、体重増加、精巣相対重量減少等)が出ている可能性を排除できない。そのため、これらの表現型が、極低線量率連続照射による影響であるかどうかを様々な角度から再検討する必要があると考える。

キーワード: 低線量率放射線、雄マウス、肝腫瘍、遺伝子発現、精巣、去勢

#### 研究協力者

田中聡 (環境科学技術研究所生物影響研究部主任研究員)、 田中イグナシャ (環境科学技術研究所生物影響研究部副主任研究員)

#### I 研究目的

従来行われてきた低線量放射線影響研究の多くは、高線量率の放射線を短時間照射することに より得られる低線量域での研究であったが、この高線量率放射線の単回照射により惹起された影 響の研究は、放射線治療などのリスクに関する研究には有用であるが、低線量率の長期間被ばく による健康影響リスク推定には単純に応用できない。特に、福島第一原子力発電所事故(以下「今 般の事故」という)などにより大きな関心が寄せられている低線量率放射線長期被ばくの健康影 響を明らかにするためには、低線量率放射線を照射できる施設での研究が重要となる。現在まで、 低線量率高線量放射線照射による生物への影響研究データは蓄積されつつあるものの、今般の事 故で健康影響が懸念される低線量・低線量率(総線量200 mGy 以下あるいは0.1 mGy/日以下) 被ばくによる病理・分子レベルでの影響は、未だによくわかっていない。環境研ではマウスに0.05、 1.1 および 21 mGy/22 時間/日の低線量率放射線を照射した実験(寿命試験)を実施し、その結果 の中で、最も低い線量率である 0.05 mGy/22 時間/日の 400 日間照射 (総線量 20 mGy) によって オスマウスでは有意に肝腫瘍発生率が増加することを報告した(I. B. Tanaka, III et al., Radiat Res., 167, 417-437, 2007)。また、原爆被ばく者の疫学調査結果では、1 Gy あたりの肝腫瘍発生 リスクが男性で 1.32 倍、女性では 1.28 倍であり、肝臓は放射線高感受性で、その影響には男女 差があることを報告している(D. L. Preston et al., Radiat Res., 168, 1-64, 2007)。これらの結 果は、放射線の連続被ばくがヒトになんらかの健康影響を及ぼす可能性を示唆している。そこで、 本研究では、極低線量率 (0.05 mGy/22 時間/日) 放射線の 400 日間連続照射 (総線量 20 mGy) した雄 B6C3F1 マウスを照射開始後 100 日毎に 700 日目まで経時的な剖検を行い、放射線照射に よる健康影響(肝腫瘍、血清中因子、遺伝子発現等)をモニターした。また、低線量率放射線照 射によるマウス肝腫瘍発生率には性差による違いがあること(I. B. Tanaka, III et al., Radiat Res., 167, 417-437, 2007) ことから、雄マウスを去勢することによる肝腫瘍発生率の変化と放射 線影響との関連について明らかにすることを目指した。これにより、今般の事故による低線量率 放射線長期被ばくの健康影響の有無を論じる資料となる結果の獲得を目的とする。

#### II 研究方法

低線量率放射線照射施設で雄 B6C3F1 マウスへの放射線照射を平成 26 年度に開始し、本年度 は照射開始後 400,500,600,700 日目のマウス(非照射群を 16 匹、0.05 mGy/22 時間/日の照射 群を 16 匹、20 mGy/22 時間/日の照射群を 8 匹:但し、600 日目は非照射群を 32 匹、0.05 mGy/22 時間/日の照射群 35 匹)を解剖し、マウスの健康状況(体重、肝腫瘍発生率、臓器相対重量、血球数解析、血清成分の解析、病理標本の解析、遺伝子発現解析)についてモニターした。また、去勢したマウス(非照射群を 33 匹、0.05 mGy/22 時間/日の照射群 35 匹)に関しては、照射開始後 600 日目に解剖を行い肝腫瘍の発生率をモニターした(図 1 上)。継時的に解剖したマウスは事前の摂食による影響を排除するために、解剖前日より絶食処置を行った。解剖直前に眼窩採血した血液中の血球数は CellTac α(日本光電)により測定した。解剖時に心臓採血を行い、採取した血液から血清を分離し、血清中のテストステロン量を ELISA 法(CAY 社)により測定した。また、解剖時に採取した精巣から mRNA を抽出し、cDNA に変換後、精細胞特異的遺伝子の発現について解析した。病理標本解析用サンプルとして、肝臓、脾臓、肺、精巣、ハーダー腺の病理切片を作成した。また、解剖後マウスの腎臓、心臓、精巣上体、膵臓、病変部をホルマリン保存した。さらに、精巣では in situ hybridization 法(ACD 社)により組織での遺伝子発現部位を同定した。

#### (倫理面の配慮)

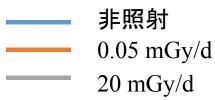
環境研内の動物実験委員会規程に基づき、申請書を提出し、動物実験委員会による審査、所内 承認を得て研究を行った。

#### III 研究結果

#### 1. 体重

400 日間極低線量率放射線照射したマウスについて照射開始後 100 日ごとに 700 日目までサンプリングし、解剖時の体重を測定した。その結果、極低線量率 (0.05 mGy/日) 照射群は 100 から 400 日目において有意に体重が増加し、600、700 日目に有意差は見られないが減少した (図 1下)。また、低線量率 (20 mGy/日) 照射群には有意な体重差は見られなかった (図 1)。以前実施した 1 群 500 匹を用いた寿命試験時では、極低線量率照射群は今回の結果とほぼ同様の体重推移が見られたが、非照射群と極低線量率照射群との間に有意差は見られなかった (図 2)。

	非去勢群					去勢群			
		非照射群	照射群			非照射群	照射群		
線量率		0 mGy/d	0.05 mGy/d		20 mGy/d		0 mGy/d	0.05 mGy/d	
飼育条件	日數	マウス匹数	総線量 (mGy)	マウス匹数	総線量 (mGy)	マウス匹数	マウス匹数	総線量 (mGy)	マウス匹数
放射線照射期間	100	16	5	16	2000	8	_	-	_
	200	16	10	16	4000	8	-	ı	-
	300	16	15	16	6000	8	-		-
	400	16	20	16	8000	8	-	ı	-
通常飼育 期間	500	16	20	16	8000	8	_	-	-
	600	32	20	35	8000	8	33	20	35
	700	16	20	16	8000	8	_	_	_



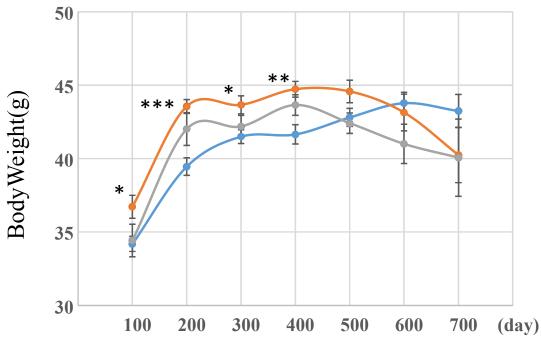


図1 上段:線量率、照射期間、照射線量および解剖したマウス数

下段:照射開始後 100-700 日間の体重推移

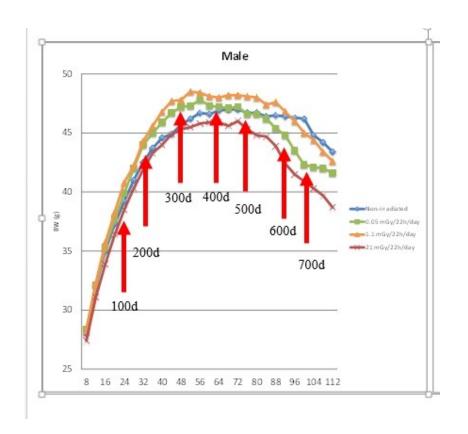


図 2 2007年に報告した 1 群 500 匹の寿命試験で得られた B6C3F1 雄マウスの体重推移。青:非照射群、緑:0.05 mGy/22 時間/日:0.05mGy /時間/日照射群、横軸は週齢。図 1 の 100 から 700 日に対応する位置を赤い矢印で示した。I. B. Tanaka, III et al. Radiat Res., 167, 417–437 (2007)

#### 2. 精巣相対重量

低線量率放射線照射開始後 100 から 600 日目に解剖を行ったマウスで臓器相対重量の変化が大きい臓器は精巣であった。マウスの精巣相対重量は低線量率(20mGy/日)照射をしている間の 100 から 400 日の期間で有意な減少が見られ、非照射群と比較し 400 日目において約 27%減少した(図 3)。一方、極低線量率(0.05 mGy/日)放射線照射マウスでは照射開始から 200 から 500 日の期間で精巣相対重量の有意な減少が見られ、非照射群と比較し 400 日目において約 5%減少した(図 3 上)。しかし、極低線量率放射線照射群の精巣の絶対重量については、有意な変化は見られず(図 3 下)、低線量率放射線照射は確実に精巣を萎縮させる影響があることを示すのに対して、極低線量率放射線照射は精巣重量への直接的な影響は見られないことを示している。

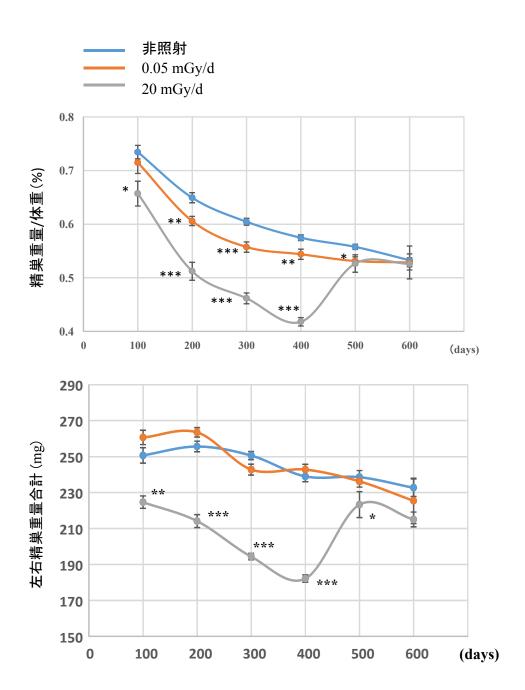


図3 上: 照射開始後 100 から 600 日目の精巣の相対重量(青: 非照射群、オレンジ: 0.05mGy/日照射群、灰色: 20 mGy/日照射群)

下: 照射開始後 100 から 600 日目の左右精巣重量(青: 非照射群、オレンジ: 0.05mGy/日照射群、灰色: 20 mGy/日照射群)

#### 3. 肝腫瘍発生率

肝腫瘍の発生数について解剖時の病理学的所見から計算した。その結果、100 および 200 日目では肝腫瘍発生は見られなかったが、300 日目には非照射群及び極低線量率照射群において、400 日目以降はすべての実験群で肝腫瘍の発生が見られた(図 4、表 1)。最終的に発生した肝腫瘍の全解剖マウス(100 から 700 日)に対する割合は非照射群で約 27.3%(35/128:肝腫瘍/解析マウス数)、極低線量率照射群では約 32.1%(41/131:肝腫瘍/解析マウス数)、低線量率照射群では約 28.6%(16/56:肝腫瘍/解析マウス数)であった(図 5)。極低線量率照射群(p=0.22)、低線量率照射群(p=0.67)共に有意差はみられなかった。

次に、去勢の影響を見る実験において、600 日目解剖時における非去勢、去勢マウスの肝腫瘍発生率を計算した。その結果、肝腫瘍発生率は非去勢非照射群で約50.0%、非去勢極低線量率照射群で約54.3%とわずかに増加した(図6)。次に6週齢時に去勢を行ったマウスの肝腫瘍発生率と比較した。その結果、去勢非照射群で約81.8%、去勢照射群で約74.3%の肝腫瘍発生率であり(図6)、非照射群では去勢による有意な(p<0.01)上昇が見られた(図6)。一方、照射群では肝腫瘍発生率の上昇はみられるが有意差(p=0.07)はなかった(図6)。これらの結果は、マウス精巣機能の欠損が雄B6C3F1マウスの肝腫瘍発生率に多大な影響を及ぼすことを示唆する。(注:肝腫瘍の診断は解剖時の肉眼所見に基づく。そのため、解剖時に肝臓になんらかの病変が診られるが、肝腫瘍と診断できない個体は解析から除いた。また、途中死亡マウスは解析数に含む。)

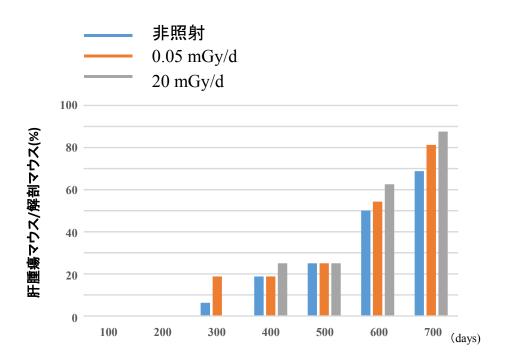


図 4 100-700 日目までの各時点での解剖時肝腫瘍発生率

	肝腫瘍発生マウス数/マウス数					
解剖予定日	非照射	0.05mGy/d	20mGy/d			
100	0/16	0/16	0/8			
200	0/16	0/16	0/8			
300	1/16	3/16	0/8			
400	3/16	3/16	2/8			
500	4/16	4/16	2/8			
600	16/32	19/35	5/8			
700	11/16	13/16	7/8			
総数	35/128	42/131	16/56			

表 1 100 から 700 日目までの各時点での解剖時肝腫瘍発生数。

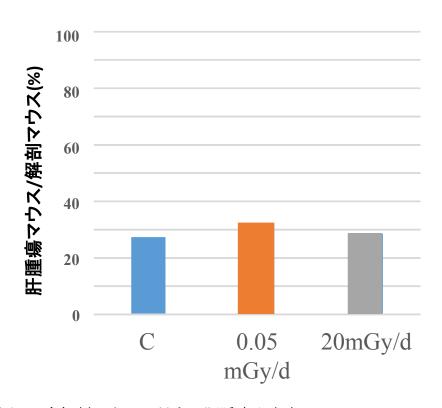


図5 全解剖マウスに対する肝腫瘍発生率

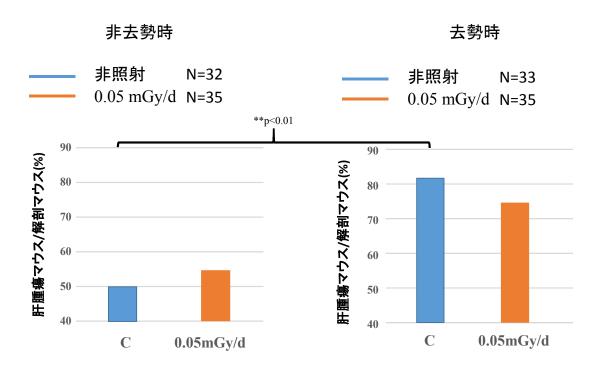


図 6 600 日時点の非去勢、去勢マウスの肝腫瘍発生率

#### 4. 血清解析

100 から 700 日目に解剖したマウスの血清中テストステロン量を測定した。その結果、20 mGy/日照射群では、 $400 \text{ 日目、}500 \text{ 日目、}700 \text{ 日目にテストステロン量の有意な減少が見られた(図 7上)。一方、極低線量率照射群では、<math>300 \text{ 日目以降減少する傾向があるが、測定によるテストステロン量のばらつきが多いため有意差は見られなかった(図 7)。$ 

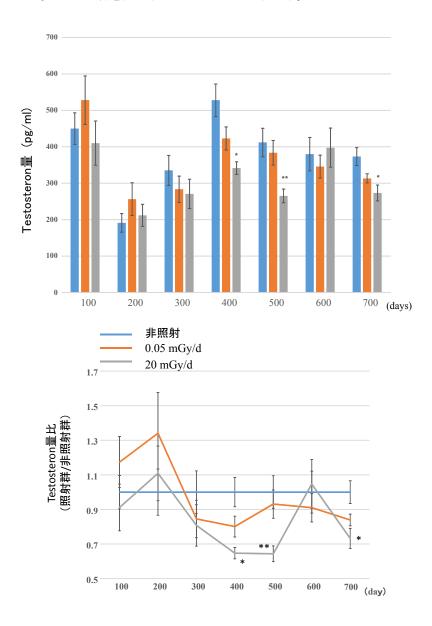


図7 100から700日目の血清中のテストステロン量。テストステロン量は100日おきに測定した。上:テストステロン量、下:テストステロン量比

青:非照射群、オレンジ:0.05 mGy/日照射群、灰色:20 mGy/日照射群

#### 5. 遺伝子発現解析

放射線照射によって精巣相対重量及びテストトステロン量比に影響が見られたため、精巣での 遺伝子発現変化(mRNA)について解析した。その結果、精巣特異的遺伝子(Tesmin/MTL5)の発 現は極低線量率 (0.05 mGy/日) 照射群で 100 から 600 日目において、低線量率 (20 mGy/日) 照射群では 100 から 500 日目及び 700 日目に有意に減少することが観察された(図 8)。また、 今回の照射実験で得られた精巣ホルマリン標本を用いて、Temin/MTL5 の発現を In situ hybridization 法により解析した結果、Tesmin/MTL5 遺伝子は精巣組織中の精母細胞の時期に発 現していることが確認できた(図9)。Temin/MTL5はメタロチオネイン様の金属結合部位を持つ タンパク質 (T. Sugihara et.al. Genomics, 57(1):130-6、1999) で、ラットの実験では精巣毒性 を持つシクロホスファミド投与により Temin/MTL5 発現細胞数が減少すること、及び、シクロホ スファミド投与ラットへの亜鉛投与により Tesmin/MTL5 の発現細胞数が回復し、亜鉛がシクロ フォスファミドによる精巣毒性に対する防護に関わることが報告されている(KP. Maremanda et.al. Biochem Biophys Res Commun., 445(3):591, 2014)。今回、精巣で Tesmin/MTL5 の遺伝 子発現が減少していることから、(極)低線量率放射線照射がシクロホスファミド類似の影響を精 巣に与えている可能性が考えられる。また、放射線被ばくマウスへの亜鉛投与は照射で減少した Tesmin/MTL5 の発現回復に寄与する可能性が考えられる。今後、(極) 低線量率照射群で引き起 こされる Tesmin/MTL5 発現減少に着目し、低線量率放射線による精巣への影響を明らかにする とともに、亜鉛投与による放射線防護の可能性についても検討する必要があると考える。

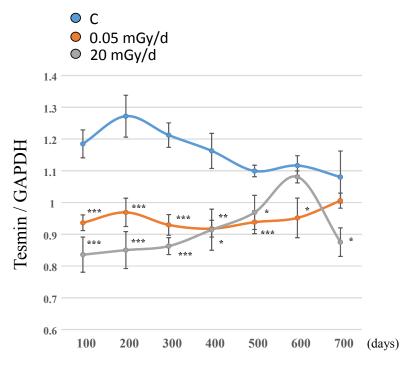


図8 100から700日目の精巣特異的遺伝子(Tesmin/MTL5)の発現変化

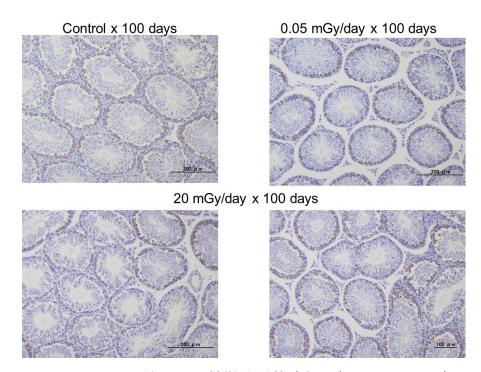


図 9 In situ hybridization 法による精巣特異的遺伝子(Tesmin/MTL5)の発現変化

#### IV 考察

本実験では極低線量率 (0.05mGy/日) 連続照射による体重の有意な増加及び精巣相対重量の有意な減少を示した。極低線量率照射による精巣相対重量の減少は、照射群の体重増加による可能性も考えられるため、再度確認実験を行う必要があると考えられる。一方、極低線量率照射群のマウス精巣における遺伝子発現解析で、有意な Tesmin/MTL5 遺伝子の発現変化を検出した。また、去勢によってマウスの肝腫瘍発生の有意な増加が見られた。これらの結果は、極低線量率 (0.05mGy/日) 連続照射によるマウス精巣への影響と肝腫瘍発生になんらかの因果関係がある可能性を示唆する。一方で、極低線量率連続照射群で見られる影響は非常にわずかなため、マウス飼育条件等の他の要因による影響で表現型(肝腫瘍増加、体重増加、精巣相対重量減少等)が現れている可能性を排除できない。

#### V結論

今回得られた結果から、極低線量率 (0.05mGy/日) 連続照射は、Tesmin/MTL5 発現細胞数減 少を誘発する化学物質と類似した影響を引き起こし、この影響が肝腫瘍発生を促進している可能 性が示唆された。しかしながら、これらの影響が本当に極低線量率連続照射による影響であるの かどうかを結論するためには、極低線量率 (0.05mGy/日) 連続照射群マウス群の変化を様々な角度から再度検討すると共に、動物実験結果がヒトに一般化できるのかどうかについても含め、慎重に検討する必要があると考える。

- この研究に関する現在までの研究状況、業績
- 1) Tanaka I.B., Komura J., Tanaka S. Pathology of serially sacrificed female B6C3F1 mice continuously exposed to very low dose-rates of γ-rays. Radiat Res. *In press*. (2017)
- 2) Sugihara T., Murano H, Nakamura M, Tanaka K. In vivo partial bystander study in a mouse model by chronic medium-dose-rate γ-ray irradiation. Radiat Res. (2013) , 179 (2) , 221-31.
- 3) Sugihara T., Murano H, Tanaka K. Increased γ-H2A.X Intensity in Response to Chronic Medium-Dose-Rate γ-Ray Irradiation. PLoS One. (2012) , 7 (9) , e45320.
- 4) Sugihara T., Murano H., Nakamura M., Ichinohe K., Tanaka K., Activation of interferon-stimulated genes by γ-ray irradiation independently of the ataxia telangiectasia mutated-p53 pathway. Mol Cancer Res. (2011) , 9 (4) , 476-484.
- 5) Sugihara T., Murano H., Nakamura M., Ichinohe K., Tanaka K., p53-mediated gene activation in mice at high doses of chronic low-dose-rate γ radiation. Radiat Res., (2011) , 175, 328–335.
- 6) Sugihara T., Murano H., Tanaka K., Oghiso Y., Inverse dose-rate-effects on the expressions of extra-cellular matrix-related genes in low-dose-rate. J. Radiat. Res. (Tokyo) (2008) , 49 (3) , 231-40.
- 7) Tsuruga, M., Taki, K., Ishii, G., Sasaki, Y., Furukawa, C., Sugihara, T., Nomura, T., Ochiai, A., and Magae, J. Amelioration of Type II Diabetes in db/db Mice by Continuous Low Dose-Rate γ-Irradiation, Radiat Res. (2007) 167, 592–599.
- Sugihara T., Magae J, Wadhwa R, Kaul SC, Kawakami Y, Matsumoto T, Tanaka K. Dose and dose-rate effects of low-dose ionizing radiation on activation of Trp53 in immortalized murine cells. Radiat Res., (2004) 162 (3):296-307

#### 総説 (和文)

- 1) 杉原 崇、田中公夫 低線量率放射線によるマウス培養細胞への影響 放射線科学 (2005) 48, 118-122
- 2) 杉原 崇 低線量率放射線照射された培養細胞の細胞応答とその分子機構 放射線生物 (2005) 40,(2) 156-167
- 3) 杉原 崇 血清成分にみられる低線量率放射線の影響 放射線生物 (2014) 49、(1) 85-97

#### 引用文献

- 1. K. Taki, B. Wang, T. Nakajima, J. Wu, T. Ono, Y. Uehara, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka and M. Nenoi, Microarray analysis of differentially expressed genes in the kidneys and testes of mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays. J. Radiat. Res. (Tokyo) (2009) 50 (3), 241–52.
- 2. Y. Uehara, Y. Ito, K. Taki, M. Nenoi, K. Ichnohe, S. Nakamura, S. Tanaka, Y. Oghiso, K. Tanaka, and T. Ono, Gene expression profile in mouse liver after long term low dose-rate irradiation with gamma-rays. Radiat. Res. (2010) 174 (5), 611-617.
- 3. S. Nakamura, I. B. Tanaka 3rd, S. Tanaka, K. Nakaya, N. Sakata and Y. Oghiso, Adiposity in female B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate gamma rays. Radiat. Res. (2010) 173 (3), 333–41.
- 4. N. Okudaira, Y. Uehara, K. Fujikawa, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K.

- Masumura and T. Ono, Radiation dose-rate effect on mutation induction in the spleen and liver of gpt delta mice. Radiat. Res. (2010) 173 (2) , 138–47.
- 5. K. Tanaka, A. Kohda, K. Satoh, T. Toyokawa, K. Ichinohe, M. Ohtaki and Y. Oghiso, Dose-rate effectiveness for unstable-type chromosome aberrations detected in mice after continuous irradiation with low-dose-rate gamma rays. Radiat. Res. (2009) 171 (3), 290–301.
- 6. K. Tanaka, A. Kohda, T. Toyokawa, K. Ichinohe and Y. Oghiso, Chromosome aberration frequencies and chromosome instability in mice after long-term exposure to low-dose-rate gamma-irradiation. (2008) Mutat. Res. 657 (1), 19–25.
- 7. T. Takabatake, K. Fujikawa, S. Tanaka, T. Hirouchi, M. Nakamura, S. Nakamura, I. Braga-Tanaka, K. Ichinohe, M. Saitou and K. Tanaka, Array-CGH analyses of murine malignant lymphomas: genomic clues to understanding the effects of chronic exposure to low-dose-rate gamma rays on lymphomagenesis. Radiat. Res. (2006) 166 (1 Pt 1), 61–72.
- 8. T. Nakajima, K. Taki, B. Wang, T. Ono, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura and M. Nenoi, Induction of rhodanese, a detoxification enzyme, in livers from mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays. J. Radiat. Res. (Tokyo) . (2008) 49 (6) , 661–6.
- 9. S. Tanaka, I. B. Tanaka 3rd, S. Sasagawa, K. Ichinohe, T. Takabatake, S. Matsushita, T. Matsumoto, H. Otsu and F. Sato, No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates. Radiat. Res. (2003) 160 (3), 376–9.
- I. B. Tanaka 3rd, S. Tanaka, K. Ichinohe, S. Matsushita, T. Matsumoto, H. Otsu, Y. Oghiso and F. Sato,
   Cause of death and neoplasia in mice continuously exposed to very low dose rates of gamma rays. (2007)
   Radiat. Res. 167 (4) , 417–37.
- 11. S. Nakamura, I. B. Tanaka 3rd, S. Tanaka, K. Nakaya, N. Sakata, Y. Oghiso, Adiposity in female B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate gamma rays. Radiat Res. (2010) 173 (3):333-41.
- 12. T. Sugihara, H. Murano, M. Nakamura, K. Ichinohe, K. Tanaka, p53-Mediated gene activation in mice at high doses of chronic low-dose-rate γ radiation. Radiat Res. (2011) 175 (3):328-35.
- 13. A. Ito, T. Takahashi, H. Watanabe, PO. Ogundigie, T. Okamoto. Significance of strain and sex differences in the development of 252Cf neutron-induced liver tumors in mice. Jpn J Cancer Res. (1992)
  83 (10):1052-6.
- 14. T. Nakatani, G. Roy, N. Fujimoto, T. Asahara, A. Ito, Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. Jpn J Cancer Res. (2001) 92 (3):249-56.
- 15. A. Marshall A, M. Lukk, C. Kutter, S. Davies, G. Alexander, DT. Odom, Global gene expression profiling reveals SPINK1 as a potential hepatocellular carcinoma marker. PLoS One. (2013) 8 (3):e59459.
  16. DL. Preston, E. Ron, S. Tokuoka, S. Funamoto, N. Nishi, M. Soda M, K. Mabuchi, K. Kodama, Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. Radiat Res. (2007) (1):1-64.
- 17. T. Sugihara, R. Wadhwa, SC. Kaul, Y. Mitsui, A novel testis-specific metallothionein-like protein, tesmin, is an early marker of male germ cell differentiation. (1999) 57(1):130-136.
- 18. KP. Maremanda, S. Khan, G. Jena, Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat:

involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. Biochem Biophys Res Commun. (2014) 445(3):591-596.

# Health effects of continuously very low-dose rate irradiation exposure in male B6C3F1 mice.

### Takashi Sugihara

Department of radiobiology, Institute for Environmental Sciences

Keywords: Low-dose-rate irradiation, male mouse. Liver tumor, Castration, Testis

#### Abstract

Currently, the effects of continuous low dose-rate (LDR) irradiation are estimated using the data obtained from HDR radiation studies, due to the limited data on LDR radiation effects. To elucidate the health effects of LDR radiation, especially on metabolism and neoplasm development in the liver, castrated and non-castrated male specific-pathogen-free (SPF) B6C3F1 mice were exposed to LDR gamma-rays (0.05 mGy/day or 20 mGy/day) for 400 days. A group of mice was sacrificed 100 days from the start of irradiation and every 100 days thereafter until 700 days. Body weights, liver neoplasm incidence, organ weights, and selected serum chemistry were measured, and pathological examination and gene expression analysis were conducted. Increased body weights with decreased testicular relative organ weights were observed in irradiated mice. Furthermore, decreased gene expression of testis specific gene was also detected in LDR-irradiated mice. Although no significant increase in incidence of liver neoplasms was observed in LDR-irradiated mice, a significant increase was observed in castrated non-irradiated control mice, which indicate that castration may influence the incidence of liver neoplasms. These results suggest that the effects of continuous LDR irradiation on the B6C3F1 mouse testes may be related to the development of liver neoplasms.

# 小児期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクに及ぼす影響と

# メカニズム解明

# 組織における DNA 障害および組織反応の解析

鈴木啓司(長崎大学原爆後障害医療研究所放射線災害医療学·准教授)

# DIO による放射線発がん影響解析

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)

# 小児期の生活習慣等による消化管幹細胞の組織動態変化と 放射線発がんリスクに及ぼす影響評価

大塚健介(一般財団法人電力中央研究所原子力技術研究所放射線安全研究センター・主任研究員)

#### 研究要旨

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、事故の被災者をはじめ、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。 事故以来4年以上がたち、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ともない、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子ども達の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過多が、放射線の発がんリスクを修飾する要因となる可能性が指摘されており、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。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が、放射線発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が、放射線発がんリスクにおよぼす影響は、体系的に調べられている例は極めて乏しい。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された事実を提示する研究が強く求められている。

このような背景から、本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性 の炎症性細胞の活性化が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより、放射線被ばくによる発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明する研究計画を立案した。特に、低線量(100mGy)の放射線被ばくを含む、放射線被ばくによる発がんの各プロセスでの DIO の影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する計画を立てた。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増加する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、肺がん、および消化管がんである。これらの解析に加え、放射線発がんの標的が組織幹細胞であることに留意し、カロリー摂取過多が消化管幹細胞ターンオーバーにおよぼす影響も解明する。

本研究では、長崎大学、放射線医学総合研究所(放医研)および電力中央研究所(電中研)

の3機関が連携した共同研究を推進し、長崎大学では、組織におけるDNA障害、細胞死、細胞老化、および炎症反応の解析を担当、放医研では、DIO動物の長期飼育、放射線照射(100mGy、1Gy および4Gy)、経時的標本採取、および発がん解析を担当している。一方、電中研では、DIO動物における消化管がん解析、およびDIOの消化管幹細胞影響の解析を担当している。

平成 28 年度は、B6C3F1 マウスの飼育を継続し、4 週齢から 8 週齢まで高カロリー餌を投与したマウスの初期発がんの有無を確認するために、継時的な組織の採取と解析を実施した。その結果、高カロリー餌の投与が終了した 8 週齢において、肝臓において PLIN2 (ペリリピン2) 陽性の微細な脂肪滴を蓄積した肝細胞が多数出現し、脂肪肝の状態になっていた。また、この時点で、脂肪組織内に、PLIN2 陽性の冠様構造を認め、マクロファージの集積が観察された。一方、遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡を可能にしたマウス (LRZ マウス) においても、高カロリー餌投与マウスの飼育を継続し、消化管幹細胞のターンオーバーに対する影響の解析に着手した。

本研究課題を推進することにより、カロリー摂取過多が、低線量放射線被ばくによる健康影響にどのような影響をおよぼすかが明らかになる。また、カロリー摂取過多による放射線発がんへの影響のメカニズムが解明され、とりわけ小児期の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を低減するための、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と期待される。

キーワード: 放射線、カロリー、低線量、炎症、組織幹細胞

#### 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、事故の被災者をはじめ、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。事故以来4年以上がたち、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ともない、「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子ども達における生活習慣等の変化が、放射線発がんの頻度を修飾する要因とな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過多は、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り、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。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が、放射線発がんリスクにおよぼす影響は、体系的に調べられている例は極めて乏しく、特に、低線量放射線被ばくによる発がんに限れば、カロリー摂取過多の影響を評価する科学的知見は皆無である。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された事実を提示する研究が強く求められている。

そこで本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化が、臓

器・組織の炎症反応を引き起こすことにより、放射線被ばくによる発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明する研究計画を立案した。特に、低線量(100mGy)の放射線被ばくを含む放射線被ばくによる発がんのプロセスを、①DNA 障害の誘発と除去、②細胞死を含む初期組織反応、③組織障害の回復、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、とに分け、各プロセスでの DIO の影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する事を目的としている。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増加する、胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、肺がん、および消化管がんである。これらの解析に加え、放射線発がんの標的が組織幹細胞であることに留意し、消化管幹細胞の動態を追跡できるように工夫した遺伝子改変マウスを用いて、カロリー摂取過多が消化管幹細胞ターンオーバーにおよぼす影響も解明する事を目標にしている。

#### II. 研究方法

本研究は、3 研究機関の連携による共同研究として計画されたもので、研究全体の概要は以下のとおりである。まず、発がん実験においては、放医研において放射線照射を行ったマウスに、小児期に相当する期間に高カロリー餌を与え、その後、長期飼育をすることによってがんの発生を解析している。具体的には、放医研において、B6C3F1 雄マウス(1 群 60 匹)に、1 週齢で放射線(γ線(0.5Gy/分)、100mGy、1Gy および 4Gy)を照射し、その後、4 週齢から 8 週齢まで高カロリー餌を与えて DIO を誘導し、その後、通常餌にもどしてから 700 日目までの長期飼育を継続している。放射線照射後は、一定期間毎に組織標本を採取して、初期発がんからの継時観察を実施している。対象とするがん腫は、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇する、脾臓および胸腺リンパ腫、肝がん、および肺がんである。また、採取した組織は、一部を長崎大学に送付し、DNA 損傷、細胞死、組織反応、および炎症反応の解析を行っている。電中研では、幹細胞系譜追跡系導入(LRZ)マウスにおいて、同様のプロトコールにより DIO を誘導し、消化管幹細胞のターンオーバーにおよぼす影響を評価すると同時に、消化管がんの発生におよぼす影響を解析している。また、採取した組織は、長崎大学にも送付し、DNA 損傷や細胞死、炎症反応の解析を行う。

DIO を誘導するための、高カロリー餌としては、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試料である。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)にくらべおおよそ 140%増加しており、多くの DIO 研究の標準試料として汎用されているものである。通常の DIO の誘導と異なるのは、小児期に相当する 4 週齢から 8 週齢までに限定して高カロリー餌を与えるところである。

#### 1. 組織における DNA 障害および組織反応の解析

DIO あるいは放射線による DNA 障害あるいは組織反応を定量的に評価するため、放医研において採取された胸腺・脾臓、肝臓および肺を、フォルマリン中で固定後にパラフィン包埋し、薄切標本(厚さ  $4\mu$  m)を作成して解析に用いた。スライドグ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、蛍光免疫染色を行うまで、冷蔵庫中で保存した。

標本の染色を行う当日に、賦活化液中で 95<sup> $\circ$ </sup>Cのウォーターバスに 30 分浸け、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、切片と 37<sup> $\circ$ </sup>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℃で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa546 標識の抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa647 標識の抗ラット IgG 抗体を用いた。標本は、1  $\mu$  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) を用いた。組織障害および回復の解析には、抗 Ki-67 抗体 (BioLegend、16A8 もしくは eBioscience、SolA15) を用いた。炎症反応は、組織におけるマクロファージの浸潤を、マクロファージに対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により解析した。脂肪滴の蓄積は、抗Perilipin (PLIN) 1/2 抗体 (Novus Biological) を用いて解析した。

#### 2. DIO による放射線発がん影響解析 (詳細は分担研究者の報告書を参照)

B6C3F1 マウスを用いて、DIO の誘導、放射線照射および発がん解析を実施した。DIO の誘導は、4週齢から 8週齢まで高カロリー餌を与えることにより行った。また、放射線照射との組合わせを行う場合には、1週齢で放射線( $\gamma$ 線(0.5Gy/分)、100mGy、1Gy および 4Gy)を照射し、4週齢から DIO を誘導した。その後、通常餌にもどしてから 700 日後までの長期飼育を行っている。放射線照射後には、一定期間毎に対象とする臓器・組織における発がんの継時観察を平成 29年度にかけて実施している。解析するがんは、脾臓および胸腺リンパ腫、肺がんおよび肝がんである。合わせて、解析のための組織標本を作成し、主任研究者と協働により研究項目 1 の解析を実施している。対象とする組織は、胸腺、脾臓、骨髄、肺および肝臓である。

#### 3. 消化管幹細胞の組織動態変化(詳細は分担研究者の報告書を参照)

遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡法を可能にしたマウス(LRZ マウス)(1 群  $5\sim10$  匹)において、幹細胞のターンオーバーに与える DIO の影響を解析した。DIO の誘導は、LRZ マウスに高カロリー餌を与えることにより行った。放射線照射との組合わせの場合には、 $1\sim2$  週齢で放射線(X線、0.5Gy/分、 $0.1\sim4$ Gy)を照射し、 $3\sim4$  週齢から DIO を誘導した。幹細胞ターンオーバーへの影響は、Lgr5 プロモーターに制御される LacZ の発現の有無により評価した。

また、大腸炎症関連がんモデルを用いて、放射線による大腸がんの誘発に対する DIO の効果 (1群  $5\sim10$  匹) を  $18\sim20$  週齢後までの期間において検証し、放射線発がんにおける組織幹細胞に対する DIO の影響を解明している。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、動物実験を行うにあたっては、国内の動物実験指針を遵守し、照射実験を行う環境 科学技術研究所の動物実験委員会等の承認を受けた上で、同所の動物実験ガイドラインを遵守し て実験を行った。

#### III. 研究結果

#### 1. 高カロリー餌による組織反応

平成 28 年度は、1 週齢で放射線照射したマウスを、非照射マウスと同時に、ヒトにおける小児期に相当するマウスの小児期の4週齢~8 週齢の間に限定して高カロリー食を与えた。その結果、高カロリー餌によって飼育を行った4週間の間に、通常餌よりも8 週齢までで約20%の体重の過

剰な増加を認めた。興味深いことに、8週齢からは通常餌に戻して飼育を継続したところ、10週齢までには、当初から通常餌で飼育した実験群とほぼ同じ体重にまで減少することが明らかになった。

つぎに、高カロリー餌の摂取にともなう組織反応を解析するために、肝臓を対象に、脂肪性肝傷害を検討した。DIO モデルマウスでは、肥満にともなう肝傷害として脂肪肝の出現がよく知られているので、脂肪肝を、その初期状態からの検出できるマーカーとして、脂肪滴に存在するペリリピン(Perilipin:PLIN)蛋白質に着目した。PLIN には、PLIN1 と PLIN2 を始めとするいくつかの相同タンパク質が存在し、PLIN ファミリーを形成している。その中で肝臓で最も高発現しているのが PLIN2 で、脂肪滴における脂肪の流入出を制御している。抗 PLIN2 抗体を用いた蛍光免疫染色法による解析の結果、高カロリー餌の投与を開始する 4 週齢までは、PLIN2 の発現はほとんど見られないことを確認した。しかしながら、4 週間の高カロリー餌摂取直後の 8 週齢では、全ての肝細胞において高度の PLIN2 陽性の脂肪滴が蓄積していることを見いだした(図 1)。

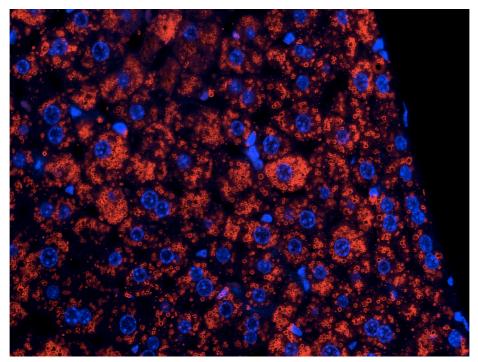


図 1 肝臓における PLIN2 陽性脂肪滴の検出 (0Gy、8 週齢)

赤色蛍光のシグナルは PLIN2 を示し、青色蛍光は核が DAPI で染色されたシグナル。核周辺の細胞質に、PLIN2 陽性の脂肪滴が蓄積しているのがわかる。

PLIN2 陽性脂肪滴を細胞質に有する肝細胞は、肝臓全体に広がり、分布に偏りは見られなかった。この時同時に、抗 F4-80 抗体を用いてマクロファージの分布を確認したが、もともと肝臓ないに散在しているマクロファージの分布は、高カロリー餌を与える前後で特に変化は認められなかった。

これら肝臓での解析と同時に、脂肪組織での組織反応を検討した結果、まず、脂肪組織では、脂肪滴に存在する PLIN の主要なタイプは、肝臓と異なり、PLIN1 であることがわかった。高カロリー餌の投与を開始する 4 週齢までは、脂肪組織を構成する脂肪滴は全てが PLIN1 陽性であっ

たが、高カロリー餌投与を終了する 8 週齢では、PLIN1 陰性のクラスター状の構造が散在していた。驚くべきことに、これら PLIN1 陰性の領域には、PLIN2 陽性、かつ F4-80 陽性のマクロファージが局在しており、いわゆる冠様構造(Crown-like structure: CLS)を形作っていた。これに対し、通常餌で飼育した実験群では、8 週齢においても CLS の出現は一切見られなかった。

#### 2. 放射線照射による組織反応の修飾

小児期の生活習慣の変化が放射線影響におよぼす影響を検証するため、1 週齢時に放射線照射したマウスに、4 週齢から 4 週間高カロリー餌を投与した。まず、放射線照射の体重への影響を調べると、0.1Gy 照射マウスでは体重の変化はほとんど見られなかったが、1 週齢で 4.0Gy を照射した場合には、体重の計測を始めた 4 週齢の段階で、非照射マウスの体重のおおよそ 20%程度まで減少していることが明らかになった。通常餌の飼育では、4 週齢時で見られた体重の減少傾向は、その後も長期間にわたって観察されることが判明した。同様の傾向は、高カロリー餌投与群でも確認され、非照射群の高カロリー餌投与群と同様に 4 週齢から 8 週齢までの期間中の体重加増加が見られた後は、非照射群よりも低い体重が継続していた。

次に、PLIN2 陽性の脂肪滴の出現を調べると、通常餌で飼育した 4Gy 照射実験群でも、8 週齢の段階で、明らかに PLIN2 発現のレベルが上昇していた。4 週齢から 8 週齢にかけて高カロリー餌を投与した実験群では、PLIN2 陽性細胞の過剰な増加が認められたが、特に 4Gy 照射群では、非照射群よりもさらに高レベルの PLIN2 の発現が観察された。

#### 3. 分担研究者の研究成果概要

#### 【柿沼志津子】

B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に 0、0.1、または 4Gy を照射後、4 週齢からカロリーの異なる餌で 4 週間飼育し、その後通常餌で生涯飼育を行う 6 群を設定した。飼育観察および体重測定を継続しながら、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解剖に供し、病理サンプルの保存および解析を継続している。

これまでに、4週齢から8週齢までの高カロリー餌投与による体重増加が、その後の通常餌に戻してからの飼育でも影響が残ることを見いだした。また、カロリー餌の投与前でも、4 Gy 照射群で20%弱の体重抑制を認めた。一方、0 Gy および0.01 Gy 照射群では、体重の変化は認められなかった。長期飼育による発がん観察では、400 日齢までの飼育により、200 日程度までにT 細胞白血病の発生を認めた。また、肝がんの発生も観察し始めた。

#### 【大塚健介】

消化管幹細胞(Lgr5 幹細胞)で、タモキシフェン(4OHT)の投与に依存して時期特異的に組換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子(LacZ)で標識させるマウス(Lgr5-EGFP-CreERT2 / ROSA26-LSL-LacZ マウス、以下 LRZ マウス)の飼育を開始した。平成 28 年度は、高脂肪食を摂取した場合に消化管幹細胞のターンオーバーにおよぼす影響を明らかにするために、LRZ マウスに離乳直後(約 3~4 週齢)から 1 か月間、高脂肪食(Research Diet 社、型番 D12492)を与えた。高脂肪食を与えている期間は、週に 2 回、餌を交換し、体重および摂餌量の測定を行った。比較のため、同じカロリーで低脂肪の対照食(Research Diet 社、型番 D12450)を与えたマウスの体重および摂餌量の測定を行った。 1 か月間の高脂肪食および対照食を与えた後、すべてのマウ

スの餌を通常食に切り替えた。その結果、高脂肪食を与えた群で、週あたりの顕著な体重増加が認められたが、成体マウス( $10\sim15$  週齢)になった時点で解剖し、幹細胞系譜追跡法 (Lineage tracing)により標識された組織単位 ( $LacZ^{\dagger}$ クリプト)の割合を測定したところ、対象食群との違いは観察されなかった。また、放射線照射による体重減少を認めたが、線量率の違いによる明らかな差は認めなかった。

#### IV. 考察

1. 高カロリー餌投与による摂取カロリーレベルについて

本研究で使用している高カロリー餌は、単位重量あたりのカロリー数が 5.24kcal/g で、通常餌の 3.85kcal/g に比べると、36%のカロリー過剰餌である。与えている試料は全て食べ尽されたとして計算すると、通常餌による摂取カロリーレベルの 95kcal/週に対して、129kcal/週程度になっていると予想される。これをヒトの小児の場合に当てはめて推定すると、年齢による違いは考慮しなければならないが、厚労省から発表されているエネルギー摂取量統計値から、1 日あたりの推定エネルギー量をおおよそ 2000kcal~2500kcal/日だとすると、2700kcal~3400kcal/日相当のカロリー摂取量になり、カロリー摂取過多ではあるが、そのレベルはエネルギー摂取量統計の、平均値+標準偏差加算分の上限内に入るレベルであることがわかる。

#### 2. 高カロリー餌投与による体重への影響および組織反応

通常餌で4週齢まで飼育したマウスを、4週齢から8週齢まで高カロリー餌によって飼育を行うと、ヒトの小児期に相当するその4週間の間に、通常餌よりも8週齢までで約20%の体重の過剰な増加を認めた。これは、高カロリー餌を投与したことによるカロリー摂取過多がもたらす影響で、学童・生徒のローレル指数をもとに換算すると、肥満ぎみから肥満に相当する増加に相当する。興味深いことに、8週齢から通常餌に戻して飼育を継続したところ、4週間後の10週齢までには、コントロールマウスとほぼ同等の体重にまで減少することが明らかになった。通常餌に戻してからの急激な体重の減少が観察された理由は不明であるが、平成29年度に計画している血清解析により、何らかの手掛かりが得られると期待される。いずれにせよ、生活習慣の改善によりカロリー摂取過多が改善されれば、速やかに体重過多が改善されることを証明した結果で、その背景にあるメカニズムの解明が重要である。

高カロリー餌による組織反応を検討するために、肝臓を対象に、PLIN2 の発現を解析した。その結果、4週間の高カロリー餌投与が終了した8週齢において、通常餌により飼育を行ったコントロール実験群ではほとんど見られない、PLIN2 陽性の微細脂肪滴を細胞質に無数に持つ肝細胞の出現を確認した。これは、ヒトの肝臓において観察される、いわゆる非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の前駆状態と同等であり、マウスにおいても、カロリー摂取過多により、肝臓において脂肪性の肝傷害が誘発されることを証明した。既に議論したように、8週齢以降、通常餌に戻してからは、体重過多の顕著な解消が見られたが、PLIN2陽性の微細脂肪滴も、8週齢以降の通常餌飼育により減少が認められ、おおよそ12週齢までには、通常餌飼育群と同等の染色像に戻ることが確認された。このことは、体重過多の解消が、細胞生物学的にも、脂肪滴の解消により通常の生理的状態に戻ったことが裏付けられた。

#### 3. 放射線照射の影響と高カロリー餌との相互作用

小児期の生活習慣の変化が放射線影響におよぼす影響を検証するため、1 週齢時に放射線照射したマウスに、4週齢から4週間高カロリー餌を投与した。本研究で用いた放射線の線量は、0.1Gy、1.0Gy、および4.0Gyであるが、4.0Gyという高い線量は、発がん研究で一般的に用いられる放射線の線量で、長期飼育により、ほとんど全てのマウスで何らかのがんの発症が観察される線量である。一方、0.1Gyおよび1.0Gyは低線量および中線量で、どの程度の発がん頻度を示すのかは、今回の検討で明らかになる。まず、1 週齢で4.0Gyを照射した場合には、通常餌の飼育において、体重の計測を始めた4 週齢の段階で、顕著な体重減少が認められた。現時点で、その原因は不明であるが、本研究で使用しているB6C3F1 雄マウスでは、4.0Gy 照射後は、骨髄機能の低下や脱毛など急性障害が観察される。したがって、同様の組織障害が、例えば脳下垂体や甲状腺などに起こり、その結果、成長の減退が生じたと考えることができる。

高カロリー餌による影響は、非照射実験群で観察された結果と同様で、一時的な体重増加が確認された。また、1 週齢で 4.0Gy を照射した実験群で当初見られた体重の減少傾向は、その後、長期間観察され、1 週齢における放射線照射の影響は、長期飼育後でも残っていることを確認した。

次に、PLIN2 陽性の微細脂肪滴を有する肝細胞の分布について、放射線照射の有無による違いを検討したが、まず、放射線照射のみでがんを誘発できる高い線量である 4.0Gy の場合、放射線単独で、PLIN2 の発現レベルが亢進していることを見いだした。そのメカニズムは不明であるが、放射線照射による脂質代謝の変化が、肝細胞における脂肪蓄積を促進した結果であると考えることができる。肝臓における脂肪性傷害は、脂肪性肝炎、線維化を経て肝がんに至る初期変化として知られることから、放射線照射による肝がんの発症につながるのか、今後の経時的変化を追跡する必要がある。また、0.1Gy あるいは 1.0Gy 照射マウスにおいて、同様の変化が認められるのかどうかを明らかにすることも必要である。

# V. 結論

平成 28 年度は、B6C3F1 マウスの飼育を継続し、4 週齢から 8 週齢まで高カロリー餌を投与したマウスの初期発がんの有無を確認するために、継時的な組織の採取を実施した。その結果、高カロリー餌の投与が終了した 8 週齢において、肝臓において PLIN2 (ペリリピン 2) 陽性の微細な脂肪滴を蓄積した肝細胞が多数出現し、脂肪肝の状態になっていた。また、この時点で、脂肪組織内に、PLIN2 陽性の冠様構造を認め、マクロファージの集積が観察された。一方、遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡を可能にしたマウス (LRZ マウス) においても、高カロリー餌投与マウスの飼育を継続し、消化管幹細胞のターンオーバーに対する影響の解析に着手した。

#### VI. 次年度以降の計画

平成 29 年度は、DIO 動物の飼育を継続して行い、対象とする臓器・組織における発がんの継時観察を行う。また、発がん実験に合わせて組織標本を作製し、DIO による DNA 損傷および細胞死の誘導、組織反応および炎症反応の解析を完了する。また、放射線照射による DNA 損傷や細胞死、初期組織反応に対する DIO の影響も解析を完了し、微小がん誘発の解析と発がん微小環境の解析結果とあわせて、放射線被ばくによる発がんに対する、小児期のカロリー摂取過多の影響に係わる知見を取りまとめる。加えて、DIO の消化管幹細胞ターンオーバーへの影響の解析を終了し、放射線被ばくによる大腸炎症関連発がんにおよぼす、小児期のカロリー摂取過多の影響

解析結果とあわせて研究成果を取りまとめる。

本研究に関する現在までの研究状況、業績 該当なし

# 引用文献

1) Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. Cancer Cell, 2014; 26, 549-564.

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

Keiji Suzuki\*1, Shizuko Kakinuma\*2, Kensuke Otsuka\*3

\*Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

\*2 Department of Radiation Effects Research

National Institute of Radiological Sciences

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

\*3 Radiation Safety Research Center, Nuclear Technology Research Laboratory, Central Research Institute of Electric Power Industry

Keywords: Radiation, Calorie, low-dose, inflammation, tissue stem cells

#### **Abstract**

After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant 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 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 particular, physical inertia may cause life-style-related complications, one of which is an excess calorie intake. Resulted obesity must be one of the health problem that should take into consideration.

Accumulating evidences so far have implicated notable relationship between obesity and multiple types of cancer. However, little is known about the effect of obesity on radiation-induced cancer. Therefore, we have intended to determine whether an excess calorie intake affects the cancer risks from low-dose ionizing radiation. Our final goal is to define the mechanisms underlying the possible interaction between an excess calorie intake and radiation exposure.

We have hypothesized that an excess calorie intake could cause systemic inflammation, resulting in alteration of tissue microenvironments to promote radiation carcinogenesis. So far, we found that high calorie diets between 4 and 8 weeks caused the initial phase of fatty liver, although there was no sign for the excess local inflammation. In contrast, adipose tissue showed crown-like structure, which recruited activated macrophages. Experiments investigating the effects of radiation exposure are underway. Also, considering that tissue stem cells are the origin of cancer, effects of an excess calorie intake on the turnover of intestinal stem cells were examined, and it became clear that high fat diet did not affect their turnover.

Our results should provide a fundamental scientific basis towards the possible countermeasures for mitigation of any possible risks from low-dose/low-dose-rate radiation exposure.

# 小児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

# DIO による放射線発がん影響解析

#### 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

本研究計画は、小児期の生活習慣等の変化が低線量放射線の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ものである。具体的には、『カロリー摂取過多が全身性の炎症を惹起することにより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小児期の高カロリー食による肥満(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す。低線量(100mGy)の放射線被ばくを含む放射線被ばくによる発がんのプロセスを、①DNA障害の誘発と除去、②細胞死を含む初期組織反応、③組織障害の回復、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、とに分け、各プロセスでのDIOの影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する。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。

本分担研究では、B6C3F1マウスを用い、幼若期での放射線照射(100mGy、1Gyおよび4Gy)とその後の高脂肪餌による DIO の誘導、および終生飼育による発がん解析を実施する。平成27年度は、DIO動物の飼育を開始し照射(100mGy及び4Gy)、およびDIOによるDNA損傷、細胞死、炎症の誘導解析のための標本作製を行った。平成28年度は、1Gy照射群を追加設定した。これまでに、子ども期(4週齢から8週齢)の高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加を示したが、8週齢から通常餌に戻すことにより高脂肪餌の影響は改善されることが明らかになった。

キーワード: 低線量、100mGy、高カロリー食、肥満(Diet-induced obesity; DIO)モデル

#### 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いている。事故後4年以上がたち、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、「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子どもにおける生活習慣等の変化が、放射線発がんの頻度を修飾する可能

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過多は、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り、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。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が放射線発がんリスクにおよぼす影響が体系的に調べられている例は極めて乏しく、特に、低線量放射線被ばくによる発がんに限れば、カロリー摂取過多の影響を評価する科学的知見は皆無である。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された真実を提示する研究が強く求められている。

そこで本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー餌による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより放射線発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明することを目的とした。

本研究課題の実施により、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期待される。また、カロリー摂取過多による放射線発がんへの影響のメカニズムが世界で初めて解明され、とりわけ小児期の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を提供できる。

#### II. 研究方法

放射線医学総合研究所は SPF レベルでのマウスの長期飼育および $\gamma$ 線照射が可能な施設を有しており、本研究ではこの施設を使用した。分担者のグループでは、これまで長期飼育実験の実績が十分ある。また、マウスの発がん実験設定から終生飼育の終了までに3年半を要するが、これまでの経験から発がんに対する影響は約2年半で明らかになると予測できることから、中間段階での発がんリスク解析を取りまとめた。なお、研究期間終了後も終生飼育を継続し、本発がん実験の最終的なリスク解析としてまとめる。

#### 1) DIO による放射線発がん影響解析

B6C3F1雄マウスの1週齢時に0、0.1、 (線量率 0.5Gy/min、 $^{137}$ Cs  $\gamma$  線源、Gammacell®40) をアクリル性照射ケー射した。その後、4週齢から脂肪含有量(10%餌、60%餌)で4週間飼育し、そ生涯飼育を行う8群(1群 60 匹、計3602、3、4、7、8)を設定した。飼育観察定を継続し、がんの発生等に伴う全身状められるマウスについて解剖し、病理サおよび解析を行った。寿命短縮や特にリん、肺がんに着目して各実験群における

表 1. 各実験群の条件とマウスの匹数 (計,940)

実験群	線量 (Gy)	餌 (カロリー)	終生飼育 (匹)	または 40 サンプリング (匹)	Jy
1	0	10%	60	40	照
2	0	60%	60	40	餌
3	0.1	10%	60	50	で
4	0.1	60%	60	50	1,
5	1.0	10%	60	70	測
6	1.0	60%	60	70	認
7	4	10%	60	70	
8	4	60%	60	70	存
				ンハ胆、肝	から

リスクの違い

を解析した。

1週齢 B6C3F1マウスの作製は妊娠後期マウスを購入し、実験を行う環境下で出産させ、母マウスあたり子マウス6匹での飼育を行い体重のばらつきを最小限にした。妊娠後期マウスは平均8匹のF1マウスを出産し、その半数が雄であることより25匹の妊娠後期マウスの購入で雄100匹を作製可能である。従って、雄F1マウス680匹の作製に、妊娠後期マウス170匹を購入した。平成28年度に、1Gy照射群を追加設定したため(実験群5、6)、当初計画に加え260匹を、妊娠後期マウス60匹を追加購入して作製した。

#### 2) DIO による放射線発がん影響のメカニズムの解析のためのサンプル供与

上記と同様に実験群を設定し、高脂肪餌による臓器の変化(4、5、8 週齢)、通常餌に戻してからの臓器の変化(9、12 週齢)、および発がん過程の変化を 100 日目から 700 日目まで 100 日毎に各群 3 匹を解剖し、病理標本を作製した(計 12 ポイント)。また、同サンプルの一部を長崎大学での免疫染色解析のために供与した。長期的には照射群や高脂肪餌群で発がん率が上昇し、サンプル採取予定時にマウスの匹数が減少することが予想される。これまでの経験から予定解剖ポイントでのマウス数の減少を考慮して、実験設定時のマウスの匹数を多めに設定した。非照射群で40 匹、0.1Gy 照射群で 50 匹、1Gy および 4Gy 照射群で 70 匹を設定した。従って、必要マウス数は上記表 1 に示すように、平成 28 年度から開始した 1Gy 照射群を合わせて、最終的に 940 匹のマウスを設定した。

①1Gy 照射群: 1 週齢で 1Gy 照射後、4 週齢から脂肪含有量の異なる餌(10%餌、60%餌)で 4 週間飼育する実験群を設定し、終生飼育を継続中である(図 1)。

②<u>追加のサンプル採取実験群の設定</u>:高脂肪餌による臓器変化(4、5、8 週齢)に加えて、追加のサンプル採取(4、5、6、7、週齢)、通常餌に戻してからの臓器の変化(9、12 週齢)に加えて、追加のサンプル採取(10、11 週齢)のための実験群を設定し、サンプル採取を終了した(図 1)。(現在病理サンプルを作製中である)

#### 図 1. 研究方法の概要(H28年度追加実験群を含む)



追加のサンプル採取実験群

 4w
 5w
 6w
 7w
 10w
 11w

 24匹
 24匹
 48匹
 48匹
 24匹
 24匹

③28 年度は、H27 年度(前年度)に設定した実験群の飼育、観察を継続し、200 日、300 日及

び 400 日齢にスケジュールで解剖し、サンプリングを予定通り実施し、順次病理標本の作製を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、動物実験を行うにあたっては、国内の動物実験指針を遵守し、照射実験を行う環境 科学技術研究所の動物実験委員会等の承認を受けた上で、同所の動物実験ガイドラインを遵守し て実験を行った。

#### III. 研究結果

#### 1. DIO による放射線発がん影響解析

#### 1-1. 体重変化

図 2 に、体重変化についてのグラフを示した。

子ども期(4週齢から8週齢)の高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加を示したが、8週齢から通常餌に戻すことにより高脂肪餌の影響は改善された。しかし、1.0Gy 照射された高脂肪餌群は通常餌群の体重に比べて常に重い傾向が認められ、他の照射群とは異なった経時的変化を示した。

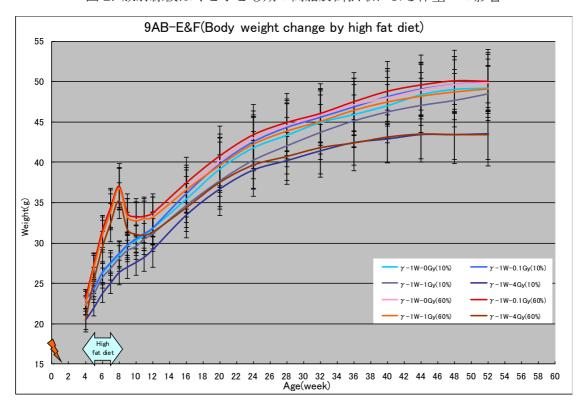
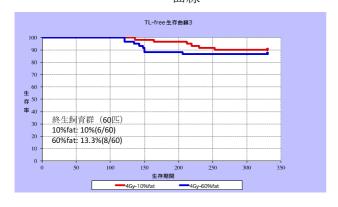


図 2. 放射線被ばくと子ども期の高脂肪餌摂取による体重への影響

#### 1-2. がんの発生

4Gy 照射群において生後 120 日から 230 日の間に T 細胞白血病(胸腺リンパ腫)の発生が認められた。その発生率は、4Gy 10%脂肪餌群では 10% (6/60)、4Gy 60%脂肪餌群では 13% (8/60)であった。高脂肪餌群の方がやや早期に発生する傾向が認められた(図 3)。

図 3. T 細胞白血病—フリーカプランマイヤー生存 曲線



その他のがんについては、400 日齢までに、 $\rm F$ がんが  $\rm 4Gy$  10%脂肪餌群では  $\rm 6$  例、 $\rm 4Gy$   $\rm 60\%$ 脂肪 餌群では  $\rm 7$  例認められた(図  $\rm 4$ )。 肺がんは  $\rm 4Gy$   $\rm 60\%$ 脂肪餌群でのみ  $\rm 1$  例見られた。

図 4.400 日齢スケジュール解剖で 観察された肝がん



淡桃色調を呈し類球状の腫瘤(点線内)が肝がん、 暗赤褐色を呈する部分は正常の肝臓。

#### IV. 考察

10%脂肪餌群では、4Gy 照射により強い体重減少が認められたが、60%脂肪餌群ではその影響は小さいことが分かった。すなわち、高脂肪食摂取では、高線量照射による体重減少効果を小さくする作用がある可能性が示唆された。また、子ども期(4週齢から8週齢)の高脂肪餌4週間投与による体重増加は、通常餌へもどすことで通常の体重に戻すことが出来る事が明らかになった。

#### V. 結論

本実験が子ども期に一定期間高脂肪摂取した後、通常餌に戻した場合の実験系として予定通り設定できていることが分かった。

#### VI. 次年度以降の計画

現在、終生飼育中の実験群が 50 週齢を超え、がんの好発時期となるため(肝がん、脾臓リンパ腫)、飼育観察を継続して行い瀕死マウスの解剖を進め臓器サンプルの保存と病理解析を行う。また、採取した血清サンプルを用いて、脂質代謝、内分泌関連因子の解析について検討する。H29年度は、500日、600日及び 700日齢のスケジュール解剖を行い主要臓器のサンプル採取を行う。

本研究に関する現在までの研究状況、業績なし

引用文献

なし

# Uncovering the interaction of lifestyle factors in children with low dose radiation-induced cancer risk and carcinogenic mechanisms

#### Shizuko Kakinuma

Department of Radiation Effects Research

National Institute of Radiological Sciences

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Keywords: Low dose, 100 mGy, high calorie diet, obesity, diet-induced obesity model

#### **Abstract**

The aim of this research is to identify the impact that lifestyle changes in children have on the risk associated with exposure to low dose radiation and the mechanisms underlying radiation-induced cancer. Specifically, the high calorie diet-induced obesity (DIO) mouse model will be used to test the hypothesis that 'systemic inflammation associated with high calorie intake in children will alter their risk of radiation-induced cancer.' Following a low dose radiation exposure (100 mGy), the interaction of a high calorie diet on (1) DNA damage and repair; (2) initial tissue reactions including cell death; (3) subsequent tissue recovery; (4) the microenvironment for early cancer development; and, (5) the development of established tumors, will be examined by investigations at the molecular, cellular and tissue levels. The cancers of interest for induction by irradiation of young animals in this model will be thymic and splenic lymphomas, as well as lung and liver cancers.

As a part of this co-operative research, B6C3F1 mice are to be irradiated as infants (100 mGy, 1Gy or 4 Gy) before initiating diet-induced obesity (DIO) by rearing on a high-fat diet. In the annual plan for fiscal year 2015, the rearing of the DIO experimental animals was to be started, with subsequent preparation of tissue samples to study the effects of DIO on DNA damage, cell death and inflammatory responses. In the annual plan for fiscal year 2016, we have already finished the remaining rearing of half of the total DIO animals, with collection of the requisite samples, which are now ongoing. We also observed the predicted body weight gain in the mice reared on the high-fat diet confirming that the project is progressing. Thereafter, we observed the weight was reversed to normal level after changing the normal diet.

小児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

小児期の生活習慣等による消化管幹細胞の組織動態変化と放射線発

# がんリスクに及ぼす影響評価

#### 大塚 健介

(一般財団法人電力中央研究所 原子力技術研究所 放射線安全研究センター・ 主任研究員)

#### 研究要旨

本研究では、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、消化管クリプトの炎症反応を引き起こし、それにより誘導される組織幹細胞の過増殖が発がん変異の蓄積に寄与する』との仮説を立てた。これを検証するために高カロリー食による肥満(Diet-induced obesity; DIO)を誘導し、消化管幹細胞ターンオーバーの変化を明らかにすることで、小児期における生活習慣の変化の影響を定量的に明らかにするための研究計画を立案した。あわせて、放射線による大腸炎症関連がんの誘発に DIO が及ぼす影響と消化管幹細胞の関与を解明する研究を実施し、発がんまでのプロセスを包含する研究計画とした。あらかじめ異なる線量の放射線を被ばくしたマウスに対し、小児期に高脂肪食、もしくは対照食(低脂肪食)を摂取させたところ、解剖時の体重は線量の増加とともに減少していたが、線量率による違いに有意な差は認められなかった。また、小児期に高脂肪食を摂取させたマウスで大腸炎症関連がんの評価が可能であることが明らかになった。

キーワード: 生活習慣、小児期、高脂肪食、消化管、組織幹細胞

#### 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(以後、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いている。「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の中間取りまとめ[1]では、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされたが、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子どもにおける生活習慣等の変化、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過多は、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り、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。カロリー制限による自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が組織幹細胞におよぼす影響は十分に解明されているとは言い難く、このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が組織幹細胞におよぼす影響を、機構論に基づいて解明する研究が強く求められている。

そこで本研究では、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と 炎症性サイトカインの分泌が、消化管クリプトの炎症反応を引き起こし、それにより誘導 される組織幹細胞の過増殖が発がん変異の蓄積に寄与する』との仮説を立て、消化管幹細 胞系譜追跡法を用いて、高脂肪食による肥満(Diet-induced obesity; DIO)を誘導する実験を 行った。加えて、生活習慣の違いと炎症に伴って生じる発がん頻度を比較することで、小 児期の生活習慣のリスクを定量的に明らかにするため、放射線による大腸炎症関連がんの 誘発に DIO が及ぼす影響と消化管幹細胞の関与を解明する研究を計画した。なお、本報告 は平成 29 年度までに行う計画のうち、平成 28 年度に実施した内容のみをまとめた中間報 告であるため、現時点では得られているデータの数に偏りがある。また、現時点では統計 学的な評価に十分な数が得られていないため、得られた予備的データの傾向から予想され ることを考察する。

#### II. 研究方法

消化管幹細胞(Lgr5 幹細胞)で、タモキシフェン(4-hydroxytamoxifen,以下、4OHT)の投与に依存して時期特異的に組換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子(LacZ)で標識させるマウス(*Lgr5-EGFP-Cre<sup>ERT2</sup> x ROSA26-LSL-LacZ*マウス,以下、LRZマウス)を用いて、高脂肪食がもたらすカロリー摂取過多による小児肥満の実験的誘導と Lgr5 幹細胞ターンオーバー攪乱への影響評価を行った。本年度は、①放射線感受性が高い授乳時期に、様々な線量の高線量率放射線を被ばくしたマウスに対して小児期のカロリー摂取過多が及ぼす影響、②授乳時期に線量率の異なる被ばくを受けたマウスにおける小児期のカロリー摂取過多の影響、および③小児期のカロリー摂取過多と大腸炎症関連がんを誘発する薬剤を暴露した場合の複合影響を評価した(図 1)。

LRZ マウス (出生後 9~13 日齢時) に 10 mg/ml の濃度でヒマワリオイルに溶解した 4OHT (Sigma-Aldrich 社, #H6278) を 3 mg/40 g 体重ずつ単一腹腔内投与を行った。マウスは 3-4 齢で離乳させ、離乳直後から 1 か月間、摂取カロリーの 6 割が脂肪由来である高ラード含有の高脂肪食(Research Diet 社, 型番 D12492)を自由摂取させた。高脂肪食を与えている期間は、週に  $1\sim2$  回、餌の交換と体重測定を行った。摂餌コントロールによる影響を比較するため、低ラード含有の対照食(Research Diet 社, 型番 D12450J)を自由摂取させた群も設けた。1 か月後に高脂肪食および対照食投与を終了し、すべての餌を通常食に切り替えた。表 1 には実験に用いた高脂肪食、対照食、通常食の餌の組成のうち、摂取カロリーに関係

する成分を抜粋したものを示す。実験に用いたマウスは、遺伝子型タイピングの結果、 Lgr5-EGFP-IRES- $Cre^{ERT2}$ 遺伝子を有する個体のみとした。成体マウス( $10\sim15$  週齢)になっ た時点で解剖し、十二指腸、回腸、および大腸組織を摘出した。これらは 10cm 程度の長さ に切り分け、長軸方向に切開して広げ、スイスロール状に成形してから中性緩衝ホルマリ ン液で固定した。大腸組織の一部は、固定後に X-gal 溶液(1gを DMSO10 ml に溶かして凍 結保存したもの)、NP-40 水溶液(200 μ1 を 10 ml の超純水に溶かしたもの)、フェリシア ン化カリウム (1.65 g を 10 ml の超純水に溶かしたもの)、フェロシアン化カリウム (2.1 g を 10 ml の超純水に溶かしたもの) を、100 ml の PBS(-)に対してそれぞれ 1%の濃度で加え た染色液を用いて、遮光・室温で一晩浸漬して LacZ 染色を行った。その後、中性緩衝ホル マリンに置換して再固定し、脱水・透徹後にパラフィン包埋ブロックとし、クリプト断面 が円形になるような切断方向で切片を作製した。エオジン染色によるカウンター染色を行 った後、LacZ 陰性クリプト(エオジン染色のみ) および LacZ 陽性クリプト(クリプト断面 が LacZ で染色された細胞で埋め尽くされたもの)を高脂肪食群と対照食群とで比較した。 大腸炎症関連がんとの複合効果を観察するために、田中らの手法 [2] に倣ってアゾキシ メタン (Azoxymethane, 以下、AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 (Dextran sodium sulfate, 以下、DSS) を利用した。あらかじめ 4OHT を投与し、高脂肪食もしくは対照食を 与えている LRZ マウスに対し、5 週齢時に AOM を 1 kg 体重あたり 10 mg ずつ腹腔内投与 した。1 週間後に DSS を 2% (v/v)に調製した飲水に切り替え、1 週間自由接摂取させた。 DSS を1週間飲ませた後、通常の飲水に切り替え、およそ18週間後に解剖した。大腸組織はLacZ 染色をする個体と、免疫染色を行う個体に振り分け、ゴム板にピンで留めて組織固定を行 った。LacZ染色用の組織については、大腸組織のLacZ染色は上述と同様に行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、当所が開催した動物実験委員会で定める「動物実験および実験動物取扱規則」 に基づき動物愛護の観点から審査が行われ、研究計画の承認をもって実施した。

#### III. 研究結果

#### 1. 小児期のカロリー摂取過多による体重変化と高線量率放射線の線量影響

図 2 は 30 Gy/h の高線量率放射線を 0.1, 1 もしくは 4 Gy 照射したメスマウスについて、離乳時からの個体ごとの体重変化を示す。小児期に高脂肪食を摂取したマウスが 0.1 Gy を被ばくした場合に 60 日齢以降で 20 g以上の体重を示したのに対し、線量の増加に伴い、同じ週齢での体重が減少する傾向が見て取れた。しかし、群によって離乳時の体重が異なったことから、図 3 には 1 Gy あるいは 4 Gy を照射したマウスについて、離乳日からの経過週ごとの体重増分(離乳日を起算とする)に対して、高脂肪食もしくは対照食を与えた場合の統計学的な有意差を比較した結果を示す。その結果、1 Gy あるいは 4 Gy を照射したマウスどちらの群においても、高脂肪食を与えたマウスは、摂餌コントロール期間中の増加が

認められたが、通常食に切り替えた後の増分に変化は認められなかった。

図4には30 Gy/hの高線量率放射線を0.1,1 もしくは4 Gy 照射したオスマウスについて、離乳時からの個体ごとの体重変化を示す。メスマウスと同様に、小児期に高脂肪食を摂取したマウスの体重は授乳期の被ばく線量の増加に伴い、同じ週齢における体重が減少する傾向が見て取れた。図5には1 Gy あるいは4 Gy を照射したマウスについて、離乳日からの経過週ごとの体重増分(離乳日を起算とする)に対して、高脂肪食もしくは対照食を与えた場合の統計学的な有意差を比較した結果を示す。その結果、メスマウスと同様、1 Gy あるいは4 Gy を照射したマウスどちらの群においても、高脂肪食を与えたマウスは、摂餌コントロール期間中の増加が認められたが、通常食に切り替えた後の増分に変化は認められなかった。離乳時の体重差を考慮するため、0.1,1 および4 Gy の各群で複数個体が得られているオスマウスについて、測定開始時の体重を1 とし、その後の高脂肪食摂取による体重増加比を図6に示した。摂餌コントロール期間中の体重増加は、授乳時の線量が増えるほど、増加が抑えられる結果が観察された。通常食に戻した後も、体重増加比が低い傾向を示した。各週において、非照射群の体重に対する統計学的有意差をWilliamsの多重比較検定を適用したところ、多くの週で4 Gy の体重増加が抑えられる結果を示した。

表 2 には、授乳時期に高線量率 X線(30 Gy/h)でさまざまな線量を照射し、小児期に高脂肪食もしくは対照食を与えたマウスについて、解剖後の大腸組織における LacZ 陽性クリプトの頻度を測定した結果を示す。1 Gy もしくは 4 Gy を照射したときの高脂肪食群と対照食群の LacZ 陽性クリプトは高脂肪食群の方が低い傾向が認められたが、両側 t-検定の有意差検定では有意差は認められなかった(1 Gy で p=0.43, 4 Gy で p=0.81)。0.1 Gy を照射したマウスは、LacZ 陽性クリプトが高い傾向が認められたが、これは組織サンプル中に LacZ 陽性クリプトが局在したことよるものであった。

#### 2. 小児期の高脂肪食摂取による体重変化に対する線量率の影響

図7には低線量率放射線(3 mGy/h)を授乳期間中に1 Gy まで連続照射したメスマウスの離乳後からの体重変化を示す。図7Aは個別の体重推移を、図7Bは体重増分の離乳からの経過日数の平均値と標準偏差を示す。高線量率の結果(図3)と比較すると、低線量率放射線被ばくの場合は、高脂肪摂取時期における体重増分が小さい傾向が見て取れた。図8には低線量率放射線(3 mGy/h)を授乳期間中に1 Gy まで連続照射したオスマウスの離乳後からの体重変化を示す。図8Aは個別の体重推移を、図8Bは体重増分の離乳からの経過日数の平均値と標準偏差を示す。現在進行中の実験であるため、予備的なデータの比較ではあるが、オスマウスについて同じ集積線量(1 Gy)を与えたマウスで線量率の違いを比較したものを図9に示す。授乳時期に低線量率(3 mGy/h)で約2週間照射した場合、高脂肪食摂取による体重増加は、授乳時期に高線量率(30 Gy/h)を照射したマウスに比べて抑えられる傾向が認められたが、t-検定では、統計学的な有意差は認められなかった(5%有意水準)。

#### 3. 小児期に高脂肪食を摂取したマウスの体重変化に及ぼす AOM、DSS 投与の影響

図 10 には 5 週齢で AOM を投与し、1 週間後に 2% DSS を 1 週間飲ませたメスマウスの離乳後からの体重変化(図 10A)および離乳日を起算日とした体重増分(図 10B)を示す。現時点では、実験が終了している個体数が高脂肪食を摂取したマウスのみ(n=1)であるため、統計学的な処理はできないが、DSS 摂取時期には体重が減少したため、高脂肪食摂取時に行った DSS 投与の影響によると推察された。1 週間の DSS 投与期間が終了し、通常の飲水になってからは体重増加に転じた。図 11 には 5 週齢で AOM を投与し、1 週間後に2% DSS を 1 週間飲ませたオスマウスの離乳後からの体重変化(図 11A)および離乳日を起算日とした体重増分(図 11B)を示す。DSS 摂取時期には体重増加は停止したため、高脂肪食摂取時に行った DSS 投与の影響によると推察された。1 週間の DSS 投与期間が終了し、通常の飲水になってからは体重の増加が認められた。オスの個体数は高脂肪食群および対照食群が n=3 であったため、t-検定により高脂肪食群と対照食群の週ごとの体重増分の有意差を検定したところ、高脂肪食を摂取させたマウス(離乳後 8~17 週の間)で統計学的に有意な体重の低下が認められた。図 10 は解剖後に LacZ 染色を行ったマウスの大腸染色像を示す。AOM と DSS の効果によって出現する LacZ クラスターがどちらの大腸でも観察された。また、それぞれに小さな腫瘍が複数個観察された。

#### IV. 考察

本研究においては、個体あたりの正確な摂取カロリーを算定することが難しいため、高脂肪食摂餌においてはカロリー摂取過多になると仮定して実験を進めてきた。昨年度の成果では、放射線を被ばくしていないマウスにおいて、摂餌コントロール期間中の高脂肪食の摂取が対照食群(高スクロース)と比較して高い体重増加を示したが、本年度の低スクロース食においても同様の結果が認められたことから、高脂肪食摂取はカロリー摂取過多をもたらしたと考えられる。本研究が目指す生活習慣と放射線被ばくの因果関係の解明という観点からヒトの被ばくを考えた場合には、放射線による被ばくへの不安などがその後の生活習慣を変えるきっかけとなると考えられる。小児期における高脂肪摂取も生活習慣の変化の一因と考えれば、被ばくを放射線感受性の高い授乳期に行い、その後、高脂肪食を摂取するという本研究のデザインは、ヒトにおける被ばく状況を考慮する上で重要である。

高脂肪食摂取が腸管幹細胞の維持に及ぼす影響は、近年、高い関心を集めている。高脂肪食を与えたマウスで腸管幹細胞の増殖活性が高まることが報告されている [3]。興味深いことに、幹細胞を維持するニッチ細胞として知られているパネート細胞 [4]は、カロリー摂取過多によりその数が減少していた [3]。逆にカロリー制限をすることで、パネート細胞は幹細胞の維持能が高まり、分化よりも幹細胞プールを維持する力が働いた [5]。これらのことを総合的に捉えると、カロリー摂取過多になると、ニッチが幹細胞を維持できなくなり、

幹細胞の増殖が誘導されて分化に働き、幹細胞プールの減少をもたらすことで、上位幹細胞の補充が誘導されるという仮説が成り立つ。本研究では、放射線照射が腸管幹細胞プールにおよぼす影響を評価したが、授乳時期に高線量率放射線を照射した場合に、小児期のカロリー摂取過多が幹細胞プールに及ぼす影響は線量に依存しており、同じ集積線量ではカロリー摂取過多によって幹細胞プールのターンオーバー攪乱がさらに誘発されることが予想された。しかしながら、予備的なデータから、線量率が異なる場合には、高脂肪食摂取による体重増加を抑える傾向が認められた。この違いは、授乳期間中の被ばく時間の長さが異なることに起因すると考えられるが、子の被ばくが原因なのか、それとも母乳を介した影響が原因なのかを区別することはできなかった。外部被ばくを受け続けた母体の母乳を介する影響については知見がなく、今後、実験データを積み重ねつつ、幹細胞プールのターンオーバー攪乱に対する影響と比較することで、小児期におけるカロリー摂取過多の影響を複合的に評価することが重要であると考えられた。

ヒトの小児期にあたる時期では、マウスの腸管では成長に伴って幹細胞の数を増やす時期にあり [6]、この時期に幹細胞のプールを維持する能力が保たれていなければ、増殖の激しい細胞が幹細胞として機能することで、必然的に変異が蓄積しやすいことになる。放射線を被ばくした後に小児期に高脂肪食を摂取した場合の発がんのリスクを調べるために、本年度はAOM+DSSによる炎症関連がんの誘導をLacZ陽性クラスターや腫瘍の解析から評価する実験の成立性を検討し、高脂肪食と対照食のいずれにもLacZ陽性クラスターや腫瘍が観察された。LacZ陽性クラスターはクリプト単位の過増殖の痕跡を示すものであり [7]、発がんの前がん状態を理解する上で重要な指標となりうる。また、高線量率放射線 0.1 Gyの照射を行った個体において、LacZの局在分布が観察されたため、今後も 0.1 Gyの線量に着目することは重要であろう。一方で、局在分布とクラスターとの相関性や、その炎症との関係、さらには線量率によって頻度やパターンに差が認められるかについては今後の課題である。

#### V. 結論

小児期に高脂肪食を摂取したマウスにおいて、異なる線量・線量率を照射したマウスにおける体重変化や幹細胞ターンオーバーへの影響が観察される条件が判明した。また、炎症関連がんの実験系が成立することが判明した。

#### VI. 次年度の計画

小児期の高脂肪摂取時期に炎症関連がん刺激を与えたマウスにおいて、異なる線量・線量率の放射線を照射することで、幹細胞ターンオーバーの攪乱が観察されるかどうかを確かめる。これらによって得た成果から、高脂肪食摂取と放射線が複合的に作用することで発がんリスクを高めるかについての知見をまとめる。

#### 本研究に関する現在までの研究状況、業績

- Otsuka K and Suzuki K. Differences in Radiation Dose Response between Small and Large Intestinal Crypts. Radia Res 2016; 186:302-314.
- 2. Otsuka K and Iwasakit T. Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing. J Radiat Res 2015; 56:615-622.
- Yamauchi M, Otsuka K, Kondo H, et al. A novel in vitro survival assay of small intestinal stem cells after exposure to ionizing radiation. J Radiat Res 2014; 55:381-390.
- 4. Otsuka K Hamada N Magae J, et al. Ionizing radiation leads to the replacement and de novo production of colonic Lgr5<sup>+</sup> stem cells, Radiat Res 2013; 179: 637-646.

#### 引用文献

- 1. http://www.env.go.jp/chemi/rhm/conf/tyuukanntorimatomeseigohyouhannei.pdf
- 2. T. Tanaka et al. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Science, 2003; 94: 965-973.
- A. T. Mah, L. Van Landeghem, H. E. Gavin, S. T. Magness and P. K. Lund, Impact of diet-induced obesity on intestinal stem cells: hyperproliferation but impaired intrinsic function that requires insulin/IGF1. Endocrinology, 2014; 155: 3302-3314.
- T. Sato, J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N. F. Shroyer, M. van de Wetering and H. Clevers, Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. Nature, 2011; 469: 415-418.
- O. H. Yilmaz, P. Katajisto, D. W. Lamming, Y. Gultekin, K. E. Bauer-Rowe, S. Sengupta, K. Birsoy, A. Dursun, V. O. Yilmaz, et al., mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. Nature, 2012; 486: 490-495.
- J. J. Dehmer, A. P. Garrison, K. E. Speck, C. M. Dekaney, L. Van Landeghem, X. Sun, S. J. Henning and M. A. Helmrath, Expansion of intestinal epithelial stem cells during murine development. PLoS One, 2011; 6: e27070.
- 7. 大塚ら. 放射線被ばくに対する組織反応 ~腸管~. 放射線生物研究, 2014; 49 巻: 211-226.





### 図1 本年度行った実験の条件

- (A) 授乳中のLRZマウスが1週齢(9-13日齢)の時にタモキシフェン(4OHT)投与を行った。タモキシフェン投与後翌日に放射線を照射した。高線量率放射線は30 Gy/h の条件で、X線照射装置にて行った。低線量率放射線は3 mGy/h の条件で電力中央研究所が保有するガンマ線照射施設にて連続照射を行った。3~4週齢時に離乳し、ジェノタイピングを行った。タイピング前後から高脂肪食もしくは比較のために対照食を1か月(4週間)自由摂取させた。その後、通常食に切り替えて、成体マウス(10-15週齢)になった時点で解剖した。
- (B) 化学発がん剤との複合効果を確認するために、アゾキシメタン(AOM)とデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の投与を行った。(A) と同様に離乳させ、ジェノタイピング前後から高脂肪食もしくは比較のために対照食を1か月(4週間)自由摂取させた。摂餌コントロール期間中、5週齢時に AOM を単一腹腔内投与し、1週間後に2% DSS を飲水で1週間、自由摂取させた。DSS の投与が終了後、約18週が経過した成体マウスの時期に解剖した。

表1 本実験で使用した餌の主成分

単位:重量%

摂餌種別	高脂肪食	対照食	通常食	
販売元	Research Diet社	Research Diet社	株)フナバシファーム	
型番	D12492 D12450J		MBR-1	
タンパク質	26 (20 kcal%)	19.2 (20 kcal%)	24.2	
脂質	35 (60 kcal%)	4.3 (10 kcal%)	4.4	
内 ラード	31.7	1.9	データなし	
炭水化物	26 (20 kcal%)	67.3 (70 kcal%)	54.4 (可溶無窒素物)	
内 スクロース 7%		7%	データなし	

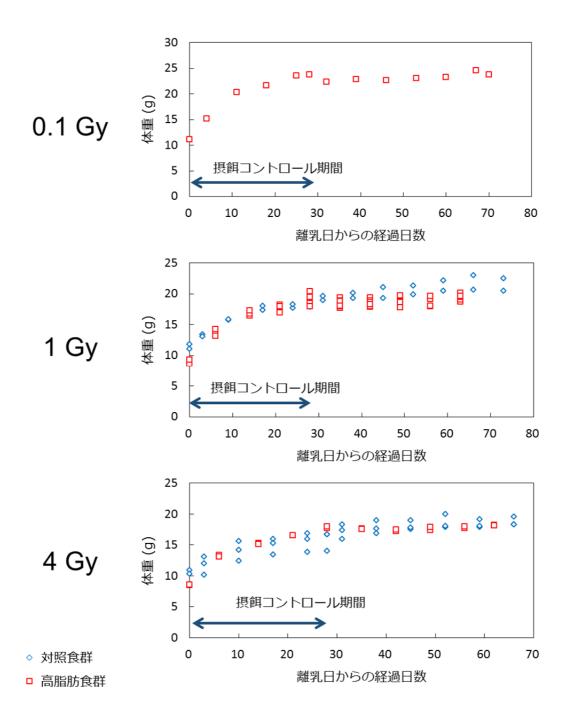


図 2 離乳直後から高脂肪食および対照食を 1 カ月間与えたメスマウスの個別体重推移

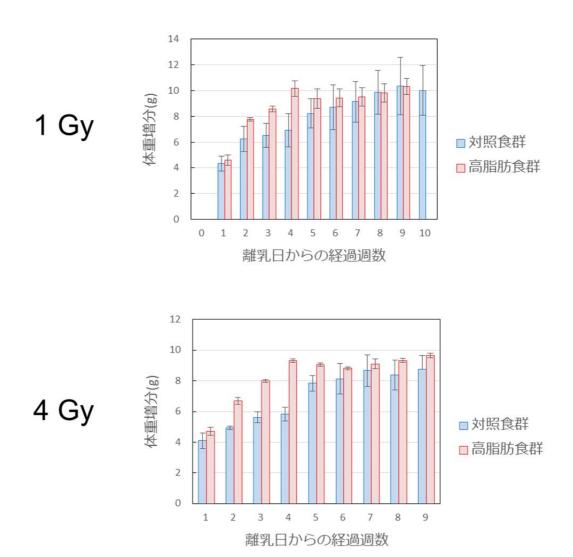


図3 離乳直後から高脂肪食および対照食を1カ月間与えたメスマウスの週齢あたりの平均体重増分

上段:1 Gy、下段:4 Gy

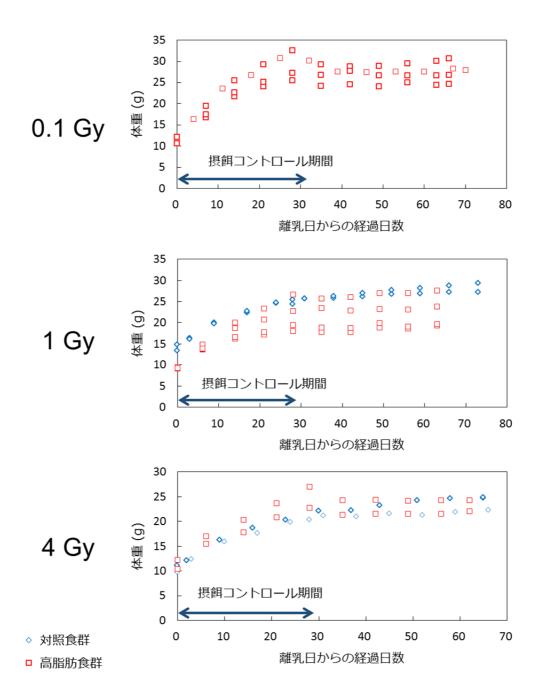
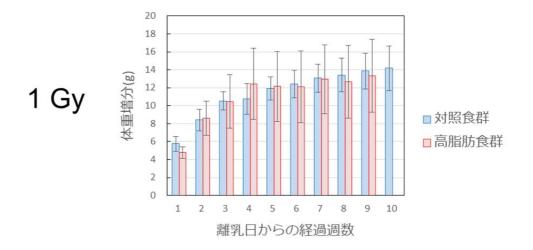


図4 離乳直後から高脂肪食および対照食を1カ月間与えたオスマウスの個別体重推移



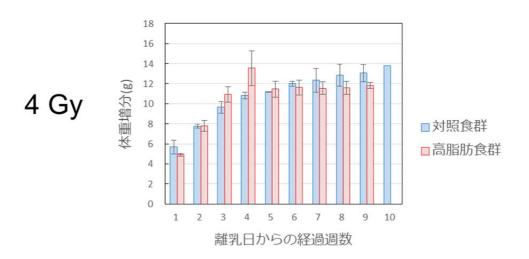


図 5 離乳直後から高脂肪食および対照食を 1 カ月間与えたオスマウスの週齢あたりの平均体重増分

上段:1 Gy、下段:4 Gy

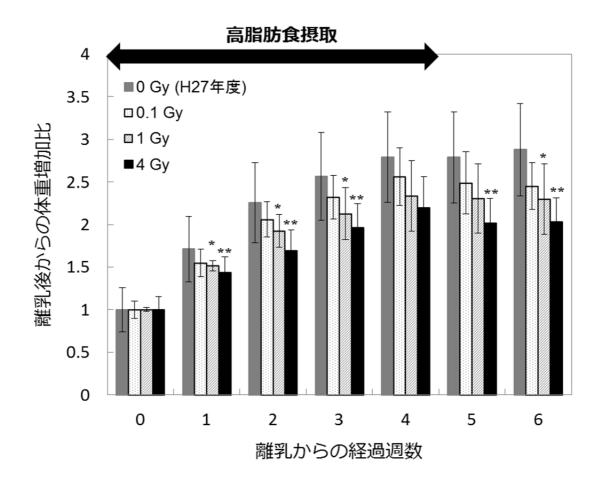
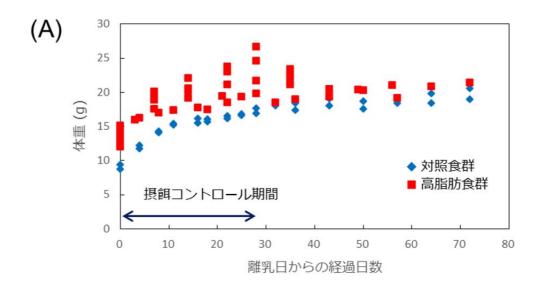


図 6 授乳時期に照射を行い、離乳直後から高脂肪食を 1 カ月間与えたマウスの週当たりの体重増加比

Williams の多重比較検定により非照射(昨年度データ)との間で有意差を比較。 \*p < 0.05, \*\*p < 0.01



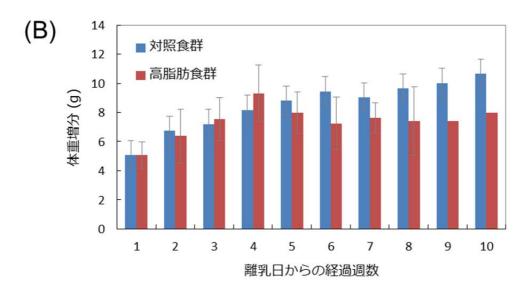
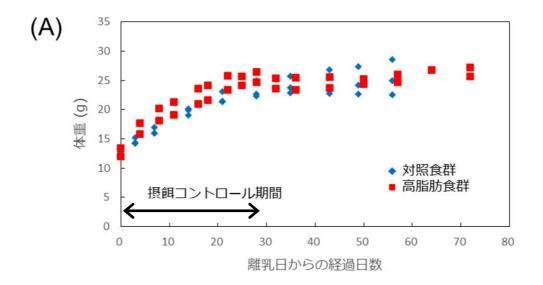


図 7 授乳中に低線量率放射線を照射し、小児期に高脂肪食および対照食を 1 カ月間与えた メスマウスの体重推移と増分

- (A) 個別の体重推移
- (B) 離乳日を起算とする週ごとの体重増分



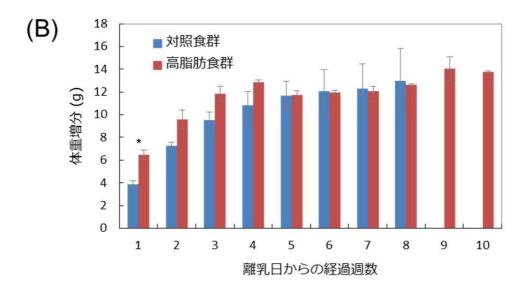


図 8 授乳中に低線量率放射線を照射し、小児期に高脂肪食および対照食を 1 カ月間与えた オスマウスの体重推移と増分

- (A) 個別の体重推移
- (B) 離乳日を起算とする週ごとの体重増分

t-検定(両側)による有意差検定を行った。\*p<0.05

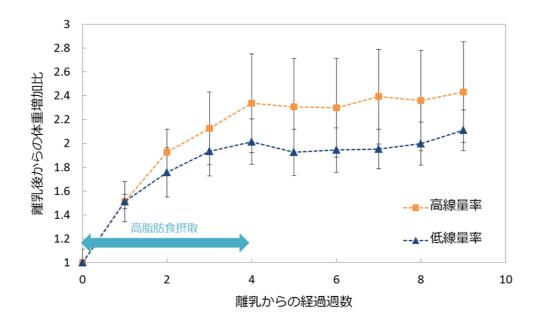


図 9 授乳中に高線量率もしくは低線量率放射線を照射し、小児期に高脂肪食および対照食  $^{1}$  カ月間与えたオスマウスの離乳後からの平均体重増加比



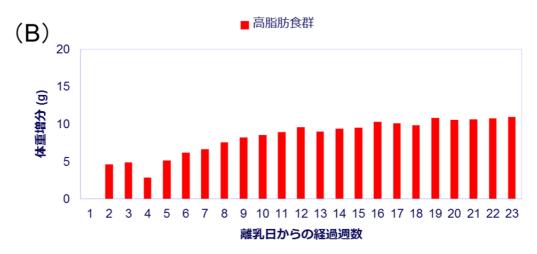


図 10 大腸炎症関連がんを誘導する処置を行ったメスマウスの体重変化

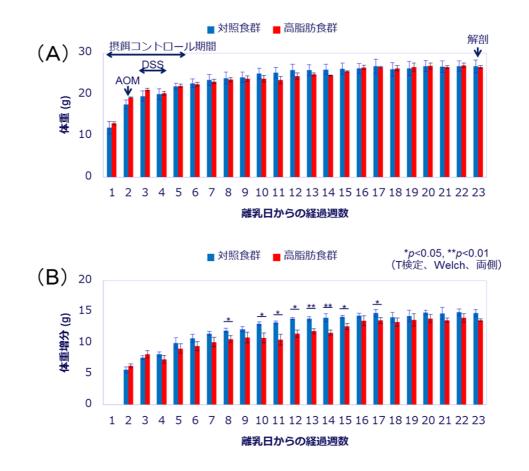


図 11 大腸炎症関連がんを誘導する処置を行ったオスマウスの体重変化

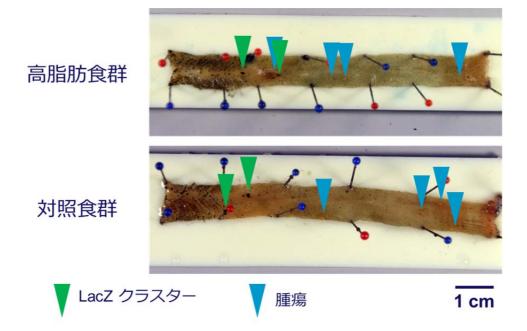


図 12 大腸炎症関連がん誘発処置をしたマウス大腸の LacZ 染色像

表 2 授乳時期に高線量率 X 線を照射し小児期に高脂肪食もしくは 対照食を与えた後の大腸組織における LacZ クリプト数への影響

マウス	線量率 (Gy/h)	線量 (Gy)	摂餌群	LacZ 陰性	LacZ 陽性	% LacZ 陽性	平均値 (Mean±SD)
388			対照食群	2575	41	1.57	2.12 ± 0.79
391				726	20	2.68	
558		0.1	高脂肪食群	968	26	2.62	3.32 ± 0.90
560				2144	47	2.15	
573				415	16	3.71	
574				716	32	4.28	
575				1630	65	3.83	
168			対照食群	4056	47	1.15	1.05 ± 0.23
474				898	12	1.32	
476				1682	14	0.83	
483				1807	21	1.15	
486				1885	15	0.79	
155		1	高脂肪食群	4218	9	0.21	0.81 ± 0.61
156	30			1564	5	0.32	
158				435	4	0.91	
159				1559	6	0.38	
160				1300	26	1.96	
161				4014	47	1.16	
166				1575	11	0.69	
586	4		対照食群	3002	11	0.37	0.72 ± 0.38
587				1512	12	0.79	
588			**************************************	1000	5	0.50	
590		4	4	1786	22	1.22	
145		Ī	高脂肪食群	1961	10	0.51	0.64 ± 0.41
151				4041	13	0.32	
152				1081	12	1.10	

Effects of life-style in childhood on radiation-induced

carcinogenesis and cellular turnover of intestinal stem cells

Yuko Hoshi, Yuki Fujimichi, Kensuke Otsuka\*1

 $^{st J}$ Radiation Safety Research Center, Nuclear Technology Research Laboratory, Central Research Institute

of Electric Power Industry

Keywords: Life-style; Childhood; High fat diet; Intestine; Tissue stem cells

Abstract

In this study, we established a hypothesis that an excess calorie intake could cause systemic

inflammation, resulting in alteration of tissue microenvironments in intestinal crypts to promote

radiation carcinogenesis. To this end, we applied the diet-induced obesity (DIO) mouse model,

which is widely used to study the effects of obesity, and evaluated the effects of life-style in

childhood by feeding a high-fat diet (HFD) or a low-fat diet as control (CFD).

First of all, Lgr5-EGFP-Cre<sup>ERT2</sup>x ROSA26-LSL-LacZ (LRZ) mice were irradiated with 0.1, 1, or 4

Gy of X-rays (30 Gy/h) at 1 week-old, then HFD or LFD were given during childhood (from 3 to 7

week-old). We found that the body-weight in HFD group significantly increased, but growing ratio

of 4 Gy irradiated mice were significantly lower than that of non-irradiated mice.

Next, we quantified the rate of LacZ-positive colonic crypts to detect the effects of HFD or CFD

on cellular turnover of intestinal stem cells. We found that the rate of LacZ-positive crypts did not

show significant difference between HFD and LFD group when the mice irradiated with 1 Gy

radiation.

We also addressed the issue that a chemically-induced colonic inflammation and cancer could be

affected by radiation exposure and childhood HFD. We confirmed that colitis-associated colonic

tumors and cluster of LacZ positive crypts could be found in both HFD and CFD treated mice by

AOM and DSS administration. By this, it is possible to evaluate whether radiation effects and HFD

during childhood could affect the process of chemically-induced cancer progression.

118

小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価— --インドケララ州の高自然放射線地域住民の調査結果を中心として

#### 秋葉澄伯

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座疫学・予防医学・教授)

#### 研究要旨

福島の原子力事故で被ばくした住民における健康影響が懸念されている。特に懸念されるのが悪性腫瘍リスクであるが、小児期に被ばくした場合、悪性腫瘍の線量あたりの過剰相対リスクは、成人と比べ2-3倍高い場合もあると考えられており、福島事故でも、小児・青年期の被ばくによるがんリスク増加を懸念する住民が少なくないようである。

本研究では、ケララ州カルナガパリ地域(高自然放射線地域)のがん罹患データを用いて、 小児・青年期の放射線被ばくによるがんリスクを推定し、原爆被爆者など高線量被ばくを受け た集団の疫学調査結果などと比較することなどを目的とする。

1990-97年にインドのケララ州カルナガパリ地域住民全体を対象にベースライン調査が行われ、コホートが設立された(カルナガパリコホート)。現在、2010年までのがん罹患調査データが収集され、データベース化されている。これまで主任研究者は、インド側の研究者と連携して、この調査で得られたデータを用いて自然放射線への累積被ばく線量と悪性腫瘍などのリスクに関して、検討を行ってきた。

今年度は平成 28 年 7 月 8 日から 20 日までの期間と平成 29 年 1 月 16 日から 26 日までの期間にインドを訪問し、カルナガパリ地域の腫瘍登録の担当者と面談して、白血病や甲状腺がんなどの悪性腫瘍症例に関して地域がん登録で収集された症例の診断の正確性や症例の把握漏れに関して口頭で情報を収集するとともに、登録事務所が管理している詳細な診断情報の検討を行った。白血病に関しては全例が血液学的診断を受けていることを確認した。固形がんに関しては、部位により異なるものと約 80%が病理学的診断(細胞診を含む)を受けていた。また、放射線被ばくによる悪性腫瘍リスクの予備的解析を行った。統計解析では、データを性、年齢、観察期間、累積線量などで層別し、層別データを用いてポアソン回帰分析を行った。2010 年までのカルナガパリコホートの追跡調査で、到達年齢が 30 歳未満の対象者は約 10 万人である。これまでの解析では追跡期間中に約 200 例のがん症例が確認された。解析では、14 歳までの累積線量を屋内外線量と居住係数などから推定し、この累積線量と 30 歳までのがんリスクの関連を検討した予備的な結果であるので、本報告書に具体的な結果を記載していない。平成 29 年 1 月 30 日から 2 月 7 日まで米国を訪問し、放射線疫学・生物統計の分野で著名な研究者である David Hoel 博士と面談し、解析結果などをもとに意見交換を行い、今後の解析方針などを検討した。

弘前大学医学部、福島県立医科大学などを訪問し、床次真司教授ら(弘前大学医学部)、安村誠司教授ら(福島医科大学)と面談し、インドでの調査に関して助言などを得るとともに、研究成果の福島県などの住民にどのように還元するのが良いか探った。

キーワード:高自然放射線、ケララ、小児、青年、がんリスク

#### I 研究目的

#### 研究の背景

福島の原子力事故で被ばくした住民における健康影響が懸念されている。最近の国連の原子力放射線の影響に関する科学委員会(UNSCEAR)報告書によると、悪性腫瘍の線量あたりの過剰相対リスクは、小児期に被ばくした場合に成人と比べ2-3倍高い場合もあると考えられており、福島事故でも、小児・青年期の被ばくによるがんリスク増加を懸念する住民が少なくないようである」)。

放射線被ばくによるがんリスクの定量的評価において、最も重要な役割を果たしているのは広島・長崎の原爆被爆生存者の追跡調査の結果である。しかし、これは高線量率の放射線被ばくである。一方、福島の原子力事故による放射線被ばくは低線量率の被ばくである。低線量率の被ばくによる健康影響は不明確な点が多く、定量的なリスク評価に関するデータは不十分である。低線量率のがんリスクを検討することは、福島事故で被ばくした住民などの健康管理を実施する上で、また、放射線リスクに関する国民の理解を深めるうえでも重要と考える。

小児期の放射線被ばくによるがんリスクに関して、最近、幾つかの重要な研究結果が報告された。例えば、イギリス、オーストラリア、台湾などから報告された研究では、小児のCT検査による放射線被ばくが白血病や固形がんを増加させる可能性が示唆された  $^{2-5)}$ 。しかし、これは比較的高線量率での被ばくと考えられる。低線量率の放射線被ばくとしては注目されているのは自然放射線への被ばくである。最近、欧州各国から自然放射線レベルと小児白血病リスクとの関連の検討結果が報告されている  $^{6-9)}$ 。その中のイギリスでの調査では、自然放射線被ばくにより小児の白血病が増加し、その線量あたりの過剰相対リスクが高線量率被ばくでの推定値と変わらないことが報告されている  $^{6}$ 。この研究では、ラドン被ばくと小児がんとの関連も検討されたが、明確な関連は認められなかった。なお、この研究では、個人線量が推定されているが、地域ごとの平均線量を基に得られた値であり、線量推定は正確とは言えない。同様の研究がスイスでも行われ、自然放射線の累積被ばく線量と小児の白血病や脳腫瘍などのリスクが関連していることが示された  $^{8}$ 。

インド・中国などの高自然放射線地域住民の放射線被ばくは低線量率での被ばくである。これまでのインド・中国の疫学調査から、成人の固形がんに関しては、低線量率での放射線被ばくが高線量率での被ばくに比べ、線量あたりの過剰相対リスクが低くなることが強く示唆されている<sup>10,11)</sup>。しかし、小児・青年期の被ばくによる白血病や固形がんに関しては、不明確な点が多い。

目的:本研究の目的は、ケララ州カルナガパリ地域(高自然放射線地域)のがん罹患データの正確性などを検討したうえで、がんリスクとの関連が特に強いと考えられている小児・青年期の放射線被ばくによるがんリスクを推定するとともに、その線量あたりのリスクを成人期の被ばくによるものと比較する。仮に、小児期・青年期の被ばくでリスクが増加しているがんの部位があれば、成人期の被ばくの場合と比べて、リスクの大きさがどの程度異なりうるかを検討する。さらに、本研究で得られた低線量率被ばくによる線量あたりのリスクが、他の研究で得られた中・高線量率の被ばくを含む、様々な線量率で得られたリスク推定値と異ならないか(どの程度異なる

か)を検討する。この目的を達成するには、がん登録で得られたがん症例の診断の信頼性の確認、 症例の把握漏れなどの検討、小児期の被ばく線量に焦点を当てたリスク解析など総合的な検討が 必要である。

#### Ⅱ 研究方法

#### 対象と方法

主任研究者秋葉澄伯は、公益財団法人(以下、公財と略)体質研究会がインド・中国の研究者と共同で行ってきた高自然放射線地域の住民の疫学調査に協力してきている。調査方法の詳細は、平成 23-25 年度に原子力災害影響調査等事業(放射線の健康影響に係る研究調査事業)として実施された「低線量率放射線被ばくの健康影響——インド・中国の高自然放射線被ばく地域住民の調査結果を中心として(主任研究者:秋葉澄伯)の報告書でも記述したので、以下には簡単に記述する。

1990-97年にインドのケララ州カルナガパリ地域住民全体を対象にベースライン調査が行われ、コホートが設立された。この調査には、それ以降にカルナガパリ地域で生まれた住民、または移住してきた住民は含まれていない。このコホートをカルナガパリコホートと呼ぶこととする。2009年の Nair らの報告では、このコホートの半分(放射線コホート)を対象に 2005年までの成人のがん罹患率が検討された  $^{8}$  。その後、カルナガパリコホート全体のデータベースが完成し、また、追跡期間は 5年間延長され 2010年までとなった(平成 28年度末までに、追跡期間は 2013年末までとなる予定である)。

これまで主任研究者は、インド側の研究者と連携して、この調査で得られたデータを用いて自然放射線への累積被ばく線量と悪性腫瘍などのリスクに関して、検討を行ってきた。今年度は地域がん登録で収集された悪性腫瘍症例の診断の正確性や症例の把握漏れに関して口頭で情報を収集するとともに、登録事務所が管理している詳細な診断情報の検討を行った。さらに、放射線被ばくによる悪性腫瘍リスクの予備的解析を行った。統計解析では、データを性、年齢、観察期間、累積線量などで層別し、層別データを用いてポアソン回帰分析を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究で得られるがん罹患率、死亡率のデータは、インドの研究者が(公財)体質研究会との共同研究で得たものであり、調査の実施に当たっては 倫理委員会の承認を得ている。データの供与に関しては、(公財)体質研究会の許可、インドの研究者の同意を既に得ている。また、平成24年2月に 鹿児島大学医歯学総合研究科疫学研究等倫理委員会から疫学調査で得られたデータの使用に関する承認を得た。しかし、平成27年3月末で、承認を受けた研究期間が終了したので、あらためて倫理委員会に申請を行い、平成28年4月に承認を得た。

#### Ⅲ 研究結果

今年度は平成28年7月8日から20日までの期間と平成29年1月16日から26日までの期間にインドを訪問し、カルナガパリ地域の腫瘍登録の担当者と面談して、白血病や甲状腺がんなどの悪性腫瘍症例に関して地域がん登録で収集された症例の診断の正確性や症例の把握漏れに関して口頭で情報を収集するとともに、登録事務所が管理している詳細な診断情報の検討を行った。

面談では、症例収集のために、カルナガパリ及び周辺の主要な病院・診療所・検査施設を訪問している点、カルナガパリ地域を含むケララ州南部の主要都市(コーチン、トリバンドラム)のがん登録からも情報を収集している点を確認した。

2010年末までの悪性腫瘍罹患例は186例であった。このうち、150例が病理組織診断・細胞診に基づくものであった。死亡診断書のみに基づく登録症例と考えられる症例は無いようであった。白血病(35例)に関しては一例を除き全例が血液学的診断を受けていることを確認した。白血病の亜型に関しては、コホートメンバー以外の症例も含めて検討したが、急性リンパ性白血病との診断が半数以上(54%)を占め、また、約20%が急性骨髄性白血病と診断されていた。診断年齢は正確に計算できないが、0歳が1例、1-4歳未満が3例、5-9歳が4例、10-14歳が4例であった。小児白血病では3-5歳にピークがあることが多いのが、このデータでは明確でなかった。甲状腺がん(23例)に関しては病理組織診断・細胞診に基づくものであった。15歳未満で診断された症例は無かった。

放射線被ばくによる悪性腫瘍リスクの予備的解析を行った。統計解析では、データを性、年齢、観察期間、累積線量などで層別し、層別データを用いてポアソン回帰分析を行った。2010年までのカルナガパリコホートの追跡調査で、到達年齢が30歳未満の対象者は約10万人である。追跡期間中に186人の悪性腫瘍症例が確認された。解析では、14歳までの累積線量を屋内外線量と居住係数などから推定し、この累積線量と30歳までのがんリスクの関連を検討した予備的な結果であるので、本報告書に具体的な結果を記載していない。

また、2000 年以降、欧州各国で自然放射線レベルと小児白血病リスクの検討が行われている。 本年度はチェルノブイリ事故後の研究結果 <sup>12)</sup>も含めてメタ解析を行い、被ばく線量当たりの白血 病リスクを推定した。得られた値は、原爆被爆者で得られた結果と矛盾しないように思われたが さらに、検討が必要である。

#### IV 考察

本研究では、診断の正確性、悪性腫瘍症例の把握漏れなどの可能性を検討した。客観的な評価を行うための調査は行われていないが、病理診断などを持つ症例の全症例の中での割合、死亡診断書のみによる登録の割合、情報を収集するために訪れている病院・診療所・検査施設の網羅の程度などから、大きな問題があるとは思われない。

予備的検討を行い、小児がんリスクと自然放射線被ばくの関連を検討した。小児がんのなかで 甲状腺がんと白血病は放射線との関連が強いと考えられるが、これらのがんを含め、小児がんと 累積線量に統計学的に有意な関連は認められなかった。統計学的検出力は計算していないが、線 量当たりの過剰相対リスク推定値の95%信頼区間は非常に広く、この研究単独で線量当たりのリ スクを十分に評価できる可能性は低い。

小児期・青年期の放射線被ばくは、成人期での被ばくに比べて、線量あたりのがんリスクが高くなる可能性が高い。また、被ばく線量が同じでも、線量率が異なると健康影響は異なる可能性がある。in vitro や動物実験では、線量当たりの生物影響は、低線量・低線量率のほうが高線量・高線量率より小さい可能性が示されているが、ヒトでは十分な証拠は得られていない。最近、欧州各国から自然放射線レベルと小児白血病リスクとの関連の検討結果が報告されている 6-9)。本研究では、2000 年以降に欧州各国で行われた自然放射線レベルと小児白血病リスクの研究とチェル

ノブイリ事故後の研究で得られた線量当たりのリスク推定値を用いてメタ解析を行い、被ばく線量当たりの白血病リスクを推定した。得られた値は、原爆被爆者で得られた結果と矛盾しないように思われたが、さらに検討が必要である。

平成 29 年 1 月 30 日から 2 月 7 日まで米国を訪問し、放射線疫学・生物統計の分野で著名な研究者である David Hoel 博士と面談し、解析結果などをもとに意見交換を行い、今後の解析方針などを検討した。

#### V 結論

本研究では、診断の正確性、悪性腫瘍症例の把握漏れなどの可能性を検討したが、他の同様の調査と比べて大きな問題はないと考えられる。また、予備的検討で、小児がんリスクと自然放射線被ばくの関連を検討したが、小児がんと累積線量に統計学的に有意な関連は認められなかった。統計学的検出力は計算していないが、線量当たりの過剰相対リスク推定値の95%信頼区間は非常に広く、この研究単独で線量当たりのリスクを十分に評価できる可能性は低い。本研究では、2000年以降に欧州各国で行われた自然放射線レベルと小児白血病リスクの研究とチェルノブイリ事故後の研究で得られた線量当たりのリスク推定値を用いてメタ解析を行い、被ばく線量当たりの白血病リスクを推定した。得られた値は、原爆被爆者で得られた結果と矛盾しないように思われたが、さらに検討が必要である。

#### VI 次年度以降の計画

小児・青年期の自然放射線被ばくと白血病・悪性腫瘍リスクに関する総合的な検討を行い、線量あたりのリスクの大きさを評価する。また、その線量あたりのリスクをすでに検討・報告した成人期の被ばくによるものと比較する(比較のために、観察期間を変更したり、対象を限定したり、リスクモデルを変更したりするなどが必要と判断された場合、リスクを推定しなおす)。さらに、カルナガパリの近隣の地域のデータを利用したり、原爆被ばく者の追跡調査結果や、他の調査結果も参照しながら、線量当たりの白血病・悪性腫瘍リスクが線量率で異なるか否かを明らかにする。そのうえで、昨年度に引き続き、米国で南カロライナ医科大学教授ホーエル博士とデータの国際比較などに関して意見交換を行うとともに、データ解析の詳細について、助言を受けたい。また、弘前大学、福島県立医科大学などを訪問し、インドでの調査に関して助言などを得るとともに、研究成果の福島県などの住民にどのように還元するのが良いか探る。

1) 本研究に関する現在までの研究状況、業績なし

#### 引用文献

1) UNSCEAR. UNSCEAR 2013 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Volume II, Scientific Annex B: Effects of radiation exposure of children. United Nations, New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation; 2003.

2) Pearce MS, Salotti J, Little M et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk

- of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. Lancet 2012; 6736(12):1-7
- 3) Mathews JD, Forsythe AV, Brady Z et al. Cancer risk in 680 000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. BMJ 2013; 346:f2360
- 4) Huang WY, Muo CH, Lin CY et al. Paediatric head CT scan and subsequent risk of malignancy and benign brain tumour: a nation-wide population based cohort study. BJC 2014;110(9):2354–2360
- 5) Krille L, Dreger S, Schindel R et al. Risk of cancer incidence before the age of 15 years after exposure to ionising radiation from computed tomography: results from a German cohort study. Radiation Environment and Biophysics. 2015;54(1):1-12.
- 6) Axelson, O., M. Fredrikson, G. Akerblom et al. Leukemia in childhood and adolescence and exposure to ionizing radiation in homes built from uranium-containing alum shale concrete. Epidemiology 13(2): 146-150 (2002).
- 7) Kendall GM, Little MP, Wakeford R et al. A record-based case-control study of natural background radiation and the incidence of childhood leukaemia and other cancers in Great Britain during 1980-2006. Leukemia. 2013;27(1):3-9.
- 8) Spycher BD, Lupatsch JE, Zwahlen M et al. Swiss Pediatric Oncology Group; Swiss National Cohort Study Group. Background ionizing radiation and the risk of childhood cancer: a census-based nationwide cohort study. Environmental Health Perspectives. 2015;123(6):622-8.
- 9)Nikkilä A, Erme S, Arvela H, Holmgren O, Raitanen J, Lohi O, Auvinen A. Background radiation and childhood leukemia: A nationwide register-based case-control study. Int J Cancer. 2016 Jul 12. doi: 10.1002/ijc.30264.
- 10) Nair RR, Rajan B, Akiba S et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. Health Physics. 2009;96(1):55-66.
- 11) Tao Z, Akiba S, Zha Y et al. Cancer and non-cancer mortality among Inhabitants in the high background radiation area of Yangjiang, China (1979-1998). Health Physics. 2012;102(2):173-81.
- 12) International Consortium for Research on the Health Effects of Radiation Writing Committee and Study Team. Childhood leukaemia in Belarus, Russia, and Ukraine following the Chernobyl power station accident: results from an international collaborative population-based case-control study. Int J Epidemiol. 2006 Apr;35(2):386-96.

Cancer risk associated with childhood exposure to low-dose-rate ionizing radiation – risk evaluation mainly based on epidemiological studies of residents in high natural background radiation areas in

### Kerala, India

#### Suminori Akiba

\*1 Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Kagoshima University graduate School of Medical and Dental Sciences.

Keywords: high natural background radiation; Kerala; children, young peoplecancer risk

#### **Abstract**

Health effects of Fukushima residents after the nuclear accident in March 2011 is of concern. Particularly concerned is cancer risk after exposure among children and young people since the excess relative risk of cancer risk is considered to be a few times higher when compared to adulthood exposure. In Fukushima, residents are concerned about the childhood exposure and its cancer risk.

In this study, cancer risk associated with radiation exposure in the childhood and in young adulthood will be estimated, using the Karunagappally cohort data, and the estimates will be compared to those obtained from other studies, including the LSS of atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki.

The Karunagappally cohort was established after the baseline survey conducted in Karunagappally in Kerala, India during the period 1990-97, when the baseline survey was conducted. To date, the follow-up was completed until the end of 2010. Akiba, the principle investigator of the present study, has been helping Indian scientists to analyze cancer and other disease risks in relation to cumulative radiation dose.

We did not find any serious problems regarding the completeness of case ascertainment and accuracy of diagnosis of cancer cases registered to the Karunagappally Cancer Registry. In preliminary analysis of cancer risk, which was conducted to examine the risk associated with exposure during ages 0-14 among those aged under 30 years, no significant risk increase was observed. In addition, meta-analysis was conducted to estimate an excess relative risk (ERR) per dose, using those reported from recent European studies and a Chernobyl study on childhood leukemia. A statistically significant association between radiation exposure and leukemia risk among children was found. However, uncertainties regarding dose estimation cannot be ignored and potential confounding is also concerned in those studies.

# マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる 成体と子孫への影響の定量的実験検証

多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫における ゲノム変異検出とそのスペクトル解析

中島裕夫 (大阪大学大学院医学系研究科放射線基礎医学・助教)

Msh2 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん 並びに継世代影響の解析

續 輝久 (九州大学大学院医学研究院生体制御学講座基礎放射線医学分野・教授)

Msh2 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証 石原 弘(放射線医学総合研究所緊急被ばく医療研究センター被ばく医療研究プログラム 体内除染研究チーム・研究チームリーダー)

#### 研究要旨

東日本大震災に伴って発生した福島原発事故直後よりクローズアップされ社会問題となった 低線量放射線内部被ばくの懸念は究極的には被ばく世代における発がんと次世代への遺伝影響 の存否に集約される。

本研究では、低線量の内部被ばくによる発がんとゲノム突然変異への影響についてマウス個体を用いて実験的に、そして、定量的に検証するものである。

研究期間内にセシウム 137 に対する低線量・低線量率内部被ばく影響を、酸化ストレス誘発消化管がんを高感度に検出できる Msh2 遺伝子改変マウス系統を用いて、被ばく世代における体細胞突然変異と発がん影響を調べ、また、継世代影響についても調べる。さらに、多世代(15世代以上)にわたりセシウム 137 を飲み続けたマウスの塩基配列変異を全ゲノム解析法により同腹仔由来の対照群と比較して、子孫でのゲノムにおける塩基変異の特徴について調べる。最終的に内部被ばく線量と外部被ばく線量の同等性について検証する。さらに、統計学的手法に活路を見出しにくい低線量影響のような領域に対して、新たな視点から長期低線量被ばく影響を予測するための革新的な数理モデル構築が可能か試みる。

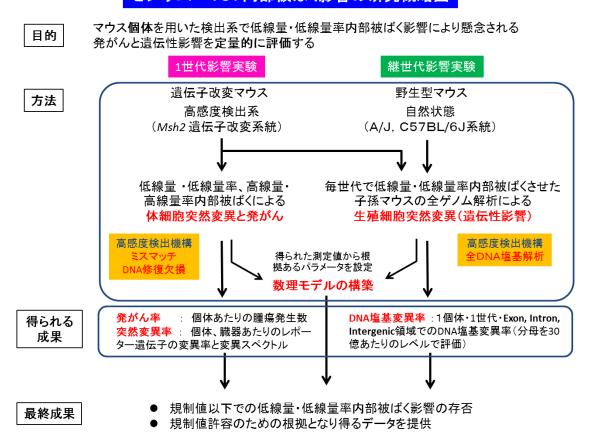
平成 28 年度では、多世代内部被ばくによる子孫への影響を調べるための A/J マウス系統実験で前年度までに 25 世代以上の交配に成功したので、第 0、20、22、23 代目の雄マウスにおける全ゲノムシーケンス解析を行い世代間のバイオインフォマティクス解析を始めた(中島)。また、大阪大学の RI 実験施設内で Msh2 遺伝子ホモ欠損 / rpsL-Tg マウス および野生型 / rpsL-Tg+マウス おにセシウム 137 水(2500 Bq/ml)を 4 か月飲水投与し、臓器を剥出し、凍結後、九州大学の RI 施設へ輸送して保存した(中島)。同時に、阪大へ送った群と同じ群のマウスを用いて酸化剤である 0.15%の KBrO<sub>3</sub>を投与する酸化ストレス実験を行った。本実験系の陽性対照となる酸化剤によるこの予備実験で、Msh2 遺伝子ホモ欠損 / rpsL-Tg マウスおよび野生型 / rpsL-Tg マウスの小腸で、突然変異頻度はそれぞれ 42.97×10-5、2.28×10-5 であった(續、大野)。

さらに Msh2(-/-)個体の in vitro 生産方法を決定し、予備的に少数の Msh2(-/-)マウスに放射線照射して小腸がんを検出した。また、血液細胞 RNA をバイオドジメトリー指標として、血液細胞へのセシウム 137 の投入量と  $\gamma$  線連続照射量の関連の解析にも着手した(石原)。

キーワード: 低線量放射線、セシウム 137、内部被ばく、遺伝性影響、発がん、福島原発事故

研究協力者:鬼頭靖司(放射線医学総合研究所・主任研究員),山内一己(環境科学技術研究所・研究員),坂東昌子(大阪大学核物理研究センター・共同研究員、NPO知的人材ネットワークあいんしゅたいん・理事長),和田隆宏(関西大学システム理工学部・教授),真鍋勇一郎(大阪大学大学院工学(系)研究科・助教),福津久美子(量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所・主任研究員)

### セシウムー137内部被ばく影響の研究概略図



#### I 研究目的

福島原発事故による低線量被ばくが人々への発がんや遺伝影響の不安を招く要因のひとつになっている。そこで、ヒトへの影響としてどの程度の内部被ばくまではそれほど心配しなくて良いのか等の判断材料を実験研究結果としてこれまでの疫学研究結果に加えて提供することが本研究の目的である。

本研究は、実験動物を用いた研究ではあるが、低線量・低線量率放射線被ばくの影響を定量的に評価する新たな実験システムを開発しようとするものであり、3年間で高感度検出系として *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いて、また、野生型マウスでは、被ばくさせる世代数を多くして全ゲ

ノムの中から変異の検出を試みる。この研究成果は、ICRP 勧告や国内法の設定した線量の妥当性を検証する実験結果を与えるだけでなく、放射性セシウムによる内部被ばく影響の視点から検証することにもなるため、現在の設定された預託線量に基づく規制値の是非を実験的に検証・認知することを可能にし、今後の規準値の安心度を担保するための参考資料として福島復興に資することが期待できると考えている。

また、欧米の MELODI などのような低線量被ばくに関する長期におよぶ基礎研究体制を福島原発事故に直面している日本においても構築する必要があると考えられ、得られた成果がその体制づくりの礎となるよう期待したい。

#### Ⅱ 研究方法

#### 【平成 28 年度の計画】

平成27年度に続き、大阪大学、九州大学、放医研それぞれの機関における施設の条件、確立している技術の特徴を生かして連携を密にして最も効率よく速やかに研究が遂行できる体制を取りながら、セシウム137に対する慢性的低線量内部被ばく実験を行った。

## 1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

近交系マウス A/J 系統の同腹子から 2 組のつがいを交配させ、1 つがいを原発事故後の放射性物質高濃度飛散地域調査結果を基に濃度設定した 100 Bq/ml の  $^{137}CsCl$  水溶液を自由に摂取させて、もう 1 つがいを対照群としてそれぞれ兄妹交配を行い、前年度までに 25 世代以上の交配に成功しているので、そのまま同じ条件で兄妹交配を継続した。そして、それぞれの群のそれぞれの代における動物から尾部、肝臓を剥出して凍結保存した。

今年度は、第 0、20、22、23 代目の雄マウスにおける凍結肝臓組織より DNA を抽出し、特に非コーディング領域に蓄積すると考えられる変異の検出を試みるためにイルミナ社のプロトコールに準じて Hiseq X HD regebt kit を使用し、リード長 150bp以上のペアードエンドにて次世代 DNA シーケンサー(Hiseq X)による全ゲノムシーケンス解析を行った。さらに得られたリード配列を用いてバイオインフォマティクス解析を行いコーディング領域(Exon)ならびに非コーディング領域(Intron、Intergenic)の塩基配列変異を調べて、2 群間での塩基変異率の差、変異座位の特徴を各群で比較を行っている。また、同時に各群における解析対象領域の塩基変異発生率をもとめ低線量放射線の変異率促進効果を調べて低線量影響の存在性とその定量化を試みている(中島)。

同時に他系統での再現性を確認するために C57BL/6J マウス系統を用いて A/J マウス系統での実験と同様の条件で世代交代させる実験を開始した。

#### 2. Msh2 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析

ヒトを含む放射線の生物影響のうち、発がんと遺伝性影響(継世代影響)は放射線防護の視点から閾値が無い確率的影響に分類されているが、低線量・低線量率の放射線被ばくによる生物影響については、様々な生体内での反応機構を踏まえた科学的議論が必要であり、そのための実証研究が不可欠である。

X線や γ 線等の低 LET 放射線による生物作用の多くは水の放射線分解に伴う活性酸素種による

ものの寄与が大きいと言われている (Huma Radiation Injury, Chapter 1, Dennis C. Shrieve, Jay Loeffler, Lippincott Williams & Wilkins, 2012)。これまでに種々の DNA 修復系の遺伝子改変マウスを用いることで、野生型マウスでは検出が困難であった突然変異・発がんへの影響を、感受性を上げた状態で酸化 DNA 損傷に起因する事象に注目して解析できることを明らかにした。

本研究では、酸化 DNA 損傷の修復にも関与するミスマッチ修復系の Msh2 遺伝子欠損マウスを用いて、R I 施設(大阪大学・中島、放射線医学総合研究所・石原)において <sup>137</sup>Cs を投与する内部被ばく実験に取組み、突然変異、発がん、および継世代影響を調べた。被ばくマウス個体から回収された組織より DNA を抽出し、主として突然変異のスペクトラムの特徴について、酸化 DNA 損傷の起因性との関わりを解析した(九大・續、中津、大野)。

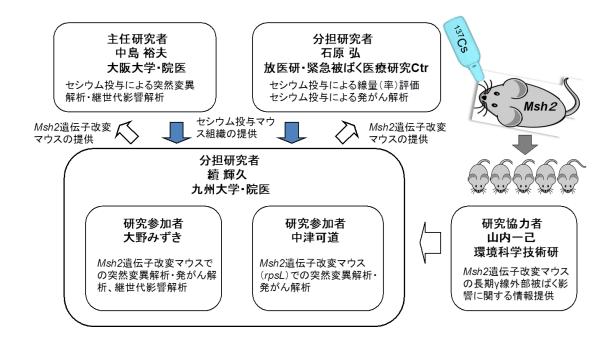
#### 遺伝子改変マウスの作出と供給及び系統の維持

大阪大学で行う短期(1か月)のセシウム 137 水 (2500Bq/ml) 飲水投与による内部被ばく実験のための Msh2 遺伝子欠損マウスと Msh2 遺伝子欠損マウスに rpsL レポーター遺伝子を持たせた体細胞突然変異解析用のマウスを維持・繁殖した。該当する遺伝子型のマウスが得られた時に、前述の年次計画の概略図(下図)に示したように、4週齢の時点で内部被ばく実験が可能な大阪大学に輸送した。放射線医学総合研究所では独自の繁殖システムを開発する計画なので、成体マウスの他に、当該遺伝子型のマウスの卵子、精子、受精卵を提供した。投与実験が終了し、サンプル数がそろった時点で、体細胞突然変異の解析用の DNA サンプルを九州大学に返送した。

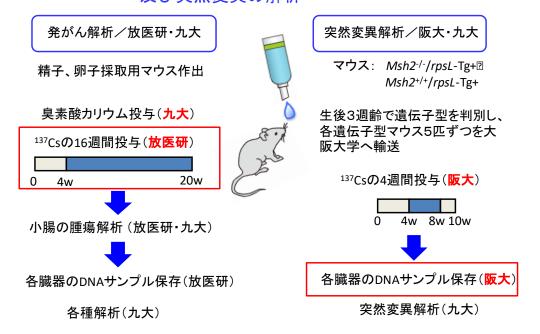
#### Msh2遺伝子改変マウスを利用した一世代低線量内部被ばくによる体細胞突然変異検出

実験の対象群としてセシウム 137 非投与マウス(レポーター遺伝子が導入されている野生型 (*Msh2+*/+•rpsL-Tg)と *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス(*Msh2-*/-•rpsL-Tg)、および酸化剤である臭素酸カリウム(KBrO<sub>3</sub>)の投与マウスから DNA を調製して、突然変異の解析を行った(續・中津・大野)。さらに、大阪大学でのセシウム 137 投与実験が終了した後に九州大学に返送された DNA サンプルを用いて体細胞突然変異の解析を行っている。また、突然変異頻度、突然変異のスペクトルを、対照群及び、KBrO<sub>3</sub>の投与によって誘発される変異解析の結果と比較する。

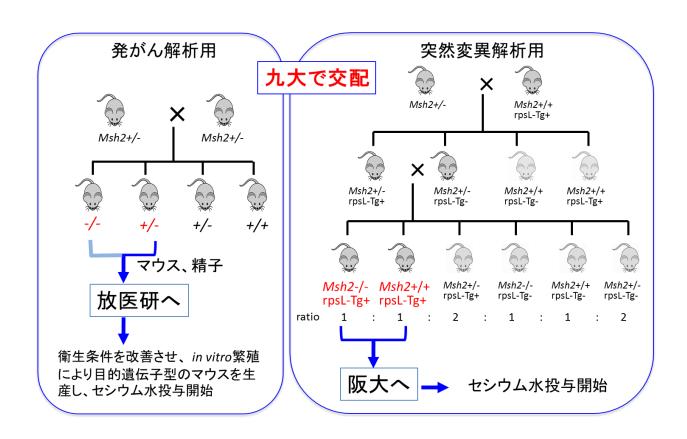
セシウム 137 投与(放射線医学総合研究所にて投与する)または KBrO<sub>3</sub>の長期投与により Msh2 遺伝子欠損マウスに腫瘍が発生した場合、腫瘍組織での体細胞突然変異をゲノムワイドに検出するために、1)腫瘍組織よりゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるエクソーム解析(各サンプルから精製されたゲノム DNAを用いて全エクソーム配列の解析(50Mb)を行い、バックグランド系統である C57BL/6J のゲノム配列と比較することで変異を同定する。)[受託]、2)染色体レベルの変異が疑われる場合には、アレイ CGH 解析(特定の配列のコピー数の変化や挿入/欠失および染色体構造変異の検出)[受託]を行う。また、これらの投与実験に対する対照群として、通常飼育下にて Msh2 遺伝子欠損マウスに自然発症する腫瘍を対象にゲノム解析を行い体細胞突然変異の検出を行い、投与群と比較する。



### Msh2 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がん 及び突然変異の解析



セシウム 137 または KBrO<sub>3</sub> の投与後の突然変異解析では、投与後のマウスの消化管を含む各臓器から ゲノム DNA を抽出し、精製したゲノム DNA から回収したレポーター遺伝子を用いて、大腸菌を形質 転換行った。このレポーター遺伝子が持つカナマイシン耐性遺伝子の発現の結果、カナマイシン存在下で育成してきた耐性コロニー数を指標に形質転換効率を算出し、同時に、変異解析用のレポーター遺伝子領域に生じた変異に起因するストレプトマイシン耐性コロニーをカウントすることで体細胞突然変 異頻度を算出した。



#### 3. Msh2 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所には精密に空間線量率を計測した放射線照射装置群や、セシウム 137 の内部被ばく実験 <sup>1)</sup>および吸収線量を検証するために必要な機材に加え、齧歯類長期飼育観察に耐える衛生状態を確保した動物生産ラインが整備されている。この実験環境で Msh2(-/-)マウスにおける外部被ばくおよびセシウム 137 内部被ばくによる小腸発がん等の影響を定量的に対比する実験を遂行するために、平成 27 年度に九州大学から搬入した Msh2(+/-)由来の受精卵を代理母で胎児としたのちに、帝王切開による出産および里親飼養による清浄化を行い、 Msh(-/-)マウスの in vitro 生産系の構築に着手した。平成 28 年度は Msh(-/-)個体の多数生産に最適な in vitro 受精に使用する精子と卵子の組合せを検証するために、 Msh2(-/-)および Msh2(+/-)の マ卵子を採取して、その 4 種類の組合せで受精率および出生率を比較した。その過程で生産した Msh2 遺伝子欠損マウスは放射線外部被ばくおよびセシウム 137 内部被ばくによる小腸発がんの予備実験に使用した。また、次述の白血球 RNA を指標としたバイオドジメトリー技術開発に使用した。

上記検討で誕生した 18 匹の Msh2(-/-)  $\wedge$ マウスを使用して小腸発がん予備実験に着手した。当該マウスを群あたり 2~4 匹として 7 群に分け、非処理対照のほか、九州大学で確立した小腸がん頻発条件である 0.15% 臭素酸カリウム飲水投与 16 週間の処理を行った。当研究チームでは麻酔マウスの下半身に X 線を照射した後における、小腸粘膜組織の推移と線量の相関について研究してきた  $^{2,3)}$ 。 平成 29 年度に予定している放射線セシウム 137 のマウス投与量を見積もるために、この小腸外部被ばくモデルを使用して、全腸管の総線量が 4,32 または 64Gy となるように分割して下半身を X 線で外部被ばくさせ、小腸がんの発生を検討した。

また、平成 27 年度に量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所の核燃料使用施設が政令 41 号非該当事業所として許可されたことを受け、平成 28 年度は動物および細胞を用いた放射性 セシウムの内部被ばく実験施設を整備し、以下の実験を行った。

平成 28 年度は放射線照射を定量的に反映するバイオドジメトリー指標となる、DNA 損傷により誘導される(DDI) mRNA および lncRNA を使用した。することで、セシウム 137 のベクレル数と  $\gamma$ 線水吸収線量の関連を求めた。実験方法は、概日リズム影響を回避するために試験管内で保温した血液を使用して、これにセシウム 137 を投入または、 $\gamma$  線連続照射して 8hr 後における DDI-RNA 量比を精密定量した。この RNA 比をバイオドジメトリー指標として、セシウム放射能量と  $\gamma$  線空間線量率の対比に着手した。なお、当該バイオドジメトリー法はマウスの循環白血球 および組織滞留白血球中の myc 発現細胞集団において、放射線被ばく量に比例して増加すること 4.50を利用し、新規バイオドジメトリーとして平成 27 年度までに確立した技術である 6.7。

#### (倫理面への配慮)

本研究では共同研究するいずれの研究機関においてもヒトの個人情報、サンプル等を研究対象としていない。

本実験の動物実験に関して、大阪大学においては、大阪大学動物実験規程のもと、動物実験委員会の承認を得た(動物実験計画書:福島原発事故シミュレーションとしての多世代微量放射線内部被曝によるマウス子孫での遺伝的、生理的影響の検討、承認番号:第 動医 26-067-000 号、有効期限:2020/03/31)。なお、放射性同位元素利用施設内での動物飼育については、大阪大学医学系研究科飼養保管施設等設置の承認を受けた(承認番号 飼医 19-01-0 号)。放射性同位元素利用施設内での実験操作に関しては、大阪大学ラジオアイソトープ総合センター放射線障害予防規定を遵守して行った。

九州大学における遺伝子組換え実験に関しては、「DNA 傷害の防止並びに修復に関する分子機構の解明」(承認番号:26-53、有効期限:2019/08/31)で、また動物実験計画に関しては、「突然変異と発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究」(承認番号:A26-121-0、有効期限:2016/03/31)で機関の承認を得た。

放射線医学総合研究所においては、マウスへのセシウム 137 投与による内部被ばく実験に関して、非密封放射性同位元素使用計画(非-被-26-8)および動物実験計画(10-1026-1)として、また、カルタヘナ法に基づく拡散防止については遺伝子組換え生物等実験計画(H25-6)として、いずれも実験計画および使用施設に関して機関内で承認を得た。

#### Ⅲ 研究結果

## 1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

A/J マウス系統において前年度までに 25 世代以上の交配に成功していたので、そのまま同じ条件で兄妹交配を継続してこれまでに 30 世代までの交配に成功した。

平成 27 年度に行ったセシウム 137 投与群と対照群の 15 代目 の A/J 雄マウスの全ゲノム解析の 結果、セシウム 137 投与群の 1 塩基多型 (SNV) の数が Exon では 2、Intron では 6,095、Intergenic では 19,539 と対照群より多く認められ、また、挿入欠失変異 (InDel) においても同様に、Exon

では 0、Intron では 802、 Intergenic では 1,833 と Exon 以外の領域でセシウム 137 投与群の方が対 照群より多く認められた。このことより生存に影響を与えない Intron と Intergenic 領域での DNA 塩基配列変異が対照群よりセシウム 137 投与群で多く認められることが示唆されたために、今年 度は、詳細な解析を行うために第0、20、22、23代目の雄マウスにおける全ゲノムシーケンス解 析を行った。この DNA 配列解析データを得たことで共通の元親(第0代)から15代目ならびに 20 代目まで、15 代目から 20 代目までの 5 世代間、22 代目から 23 代目の 1 世代間での異なった 世代間の DNA 配列変異の状況を把握することができる。現在、得られたリード配列を用いて世代

#### A/Jマウス家系図と動物番号(阪大) Control (0Bq/ml) 137Cs (100Bq/ml) F0 F2 F3 F5 F6 F7 F8 F9 F12 H27年度 F14 全DNAシー F15 H28年度 137Cs→ 0Bq水に変更 全DNAシーケンス F<sub>20</sub> H28年度 新近交系の確立 F<sub>20</sub>< F21 F1(F21) 全DNAシーケンスにより F22 F2(F22) F23 F3(F23) 1世代間の変異率を比較 F4(F24) F24 F5(F25) F26 F6(F26) F27 F7(F27) F28 F29

間のバイオインフォマティクス解析を行っている。

上図は、マウス番号で表した本実験の直系家系図である。兄妹交配によって F20 に達したので、 新たな近交系樹立と考え、F21の同腹仔をセシウム 137 投与群と対照群の2群に分けて交配を開始 した。これにより、今までセシウム 137 投与群であった家系から外れて真水を飲む新たな対照群 の家系ができたことになる。この対照群がセシウム 137 投与群より DNA 塩基配列の変異率が下が るかどうかを確認できるとともに、よりバックグランドの近い系を用いて変異の精密な検討をす ることができると考えられる。

#### C57BL/6Jマウス家系図と動物番号(阪大) Control (0Bq/ml) 137Cs (100Bq/ml) 232 236 $\delta$ 우 우 g H29年度 270 267 F0 268 269 全DNAシーケンスにより F1 294 298 1世代間の変異率を比較 F2 16 19 308 311 F3 29 30 336 338 F4 374 377

ンスによる解析を行う予定である。

F5

## 2. *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析 遺伝子改変マウスの作出と供給及び系統維持

406

409

Msh2 遺伝子へテロ欠損/rpsL-Tg マウスの雌雄の交配によって短期内部被ばくと体細胞突然変異の解析用 Msh2 遺伝子ホモ欠損/rpsL-Tg マウスおよび野生型/rpsL-Tg+マウスを得たので、該当遺伝子型マウスを大阪大学へ搬送した。さらに対象実験用マウスの作出のための維持繁殖を行った。

大阪大学へ搬送した Msh2 遺伝子ホモ欠損/rpsL-Tgマウス♂2匹(動物番号2183、2201)、♀3匹(動物番号2184、2187、2222) および野生型/rpsL-Tg+マウス♂2匹(動物番号2191、2212)、♀(3匹(動物番号2163、2204、2206)については、大阪大学のRI実験施設内で、生後4週目より4週間セシウム137水(2500 Bq/ml)を飲水投与し、その後、通常の水に変更し、さらに2週間通常飼育を行った後に解剖し、臓器(上部小腸、中部小腸、下部小腸、精巣、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、脾臓)を剥出し、凍結保存した(中島担当)。その後、凍結保存した臓器サンプルを大阪大学から九州大学のRI施設へ輸送して保存した。

前述の大阪大学で行うセシウム 137 内部被曝実験群に対して、酸化剤である  $KBrO_3$  投与群、通常飼育によるコントロール群を準備するために、搬送したマウスと同時期に同条件で交配を行い、各遺伝子型マウスを作出した。突然変異解析用に 0.15%  $KBrO_3$  を生後 4 週目より 4 週間投与し、その後は水に変更してさらに 2 週間の通常飼育を行ったマウス群と、通常の水を与え同じ期間飼育したマウス群の臓器をサンプリングし凍結保存した。一部のサンプル(動物番号 375、1291)を用いて rpsL レポーター遺伝子を用いた体細胞突然変異の解析を行った。

0.15%の KBrO $_3$ を投与した  $\mathit{Msh2}$ 遺伝子ホモ欠損 $/\mathit{rpsL-Tg}$ マウスおよび野生型 $/\mathit{rpsL-Tg}$ マウスの小腸では、突然変異頻度はそれぞれ  $42.97\times10^{-5}$ , $2.28\times10^{-5}$  であった。  $\mathit{Msh2}$ 遺伝子ホモ欠損マ

Msh2 genotype	mouse ID#	mouse	${ m Km}^{ m r}$ clones $({ m x}~10^5)$	Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> clones	Mutation frequency (x 10 <sup>-5</sup> )
-/-	375	male	1.61	69	42. 97
+/+	1291	male	4.82	11	2. 28

ウスの小腸では KBrO<sub>3</sub> 投与により、同様の処 理を行った野生型マウ スの小腸に比較して 18.8倍高い突然変異頻 度が観察された。これ らの値は、以前に当研 究室で行ったパイロッ ト実験の結果とほぼ等

しく、本実験のプロトコールにより再現性よく突然変異頻度の解析が可能であることが確認できた。今後、受け取ったセシウム 137 投与マウス群の臓器から DNA を調製して突然変異解析を行い、KBrO<sub>3</sub> 投与群、コントロール群との比較を行い、変異の頻度や特徴の解析を行う予定である。

#### Msh2遺伝子改変マウスを利用した一世代低線量内部被ばくによる体細胞突然変異検出

昨年度までに Msh2 遺伝子ホモ欠損マウス由来の受精卵を採取し、放射線医学総合研究所へ輸送 し、分担研究者の石原らにより繁殖を開始し、セシウム投与による消化管発がんの解析研究が進 行中である。そこで本年度は対象実験用コントロール群として、通常飼育された Msh2 遺伝子ホモ 欠損マウスに自然発生した消化管腫瘍を用いて、腫瘍特異的に生じた体細胞変異の検出を行った。 マウス個体が元々持つ配列多型(SNVs)と新たに生じた体細胞突然変異を区別する目的で、同一 個体の小腸腫瘍、小腸正常組織、心臓、尾部よりゲノム DNA を精製し、次世代シーケンサーを用 いて全エクソン解析を行った(受託)。全エクソン解析の対象領域は約 50Mb で、24306 遺伝子, 221784 エクソンが含まれる。4 サンプル全てでマップ可能リードは 99%以上、対象領域カバレッ ジは 93%以上、平均 depth は 60 以上と良好な条件でシーケンス解析が行われたことを示す結果が 得られた。BWA ソフトウエアにて 100bp ペアエンドのシーケンスリードをマウス mm10 リファレン ス配列にマップし、SAMTOOLS にて SNVs, indel(挿入・欠失)などを検索した結果、各サンプル でそれぞれ 2000 サイト以上がコールされた。全ての臓器サンプルで共通にコールされたのは 884 サイトで、これは解析に用いたマウス個体が元々有する SNVs であると考えられる。884 サイト中 677 サイトは一塩基置換型変異であり G→A, A→G 変異が全体の約 65%を占め、野生型マウスの SNP 多型のパターンと似ていた。腫瘍形成過程で生じた体細胞変異を検出する目的で、腫瘍サンプル SNVs データから心臓/小腸正常組織/尾部の SNVs データを差し引いたところ、1314 サイトが腫 瘍特異的な変異として抽出された。1314 サイト中 508 サイトは indel とマイクロサテライト配列 のリピート長の数ユニットの増減であり、これはミスマッチ修復機構が欠損した場合の特徴的な 所見であることから、今回行ったサンプリング方法及びシーケンス解析結果の信頼性が確認され た。残りの 806 サイトは一塩基置換型変異で、G→T 変異が全体の 46%を占め、次いで G→A,A→G 両変異で約40%となっており、これは個体が元々有するSNVsのパターンとは大きく異なり、腫瘍 特異的な体細胞変異の発生機構が示唆された。

#### 3. Msh2 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

平成 28 年度の *in vitro* 受精および代理母による Msh2(-/-)マウス生産の集計成績は左表のとおりである。排卵誘発剤を投与した Msh2(+/-)♀28 匹、Msh2(-/-)♀12 匹から卵を採取した。平均の卵生産率は Msh(+/-)♀が母体あたり平均 25 卵であることに対し、Msh(-/-)♀は母体あたり平均 3.4 卵であり、後者は卵の確保が容易でないだけでなく、Msh2(+/-)○精子または Msh2(-/-)○精子を使用しても卵の受精率が平均 0.23 と著しく低かった。Msh2(+/-)♀由来の卵を Msh2(+/-)○由来精子で受精させたところ、受精成功率は 0.83 であり、代理母子宮移植後の個体出生率は 0.34 であった。この組合せでは 25%の出生個体が Msh2(-/-)であるため卵あたりの Msh2(-/-)個体生産率は 0.071 であった。一方 Msh2(+/-)♀由来の卵を Msh2(-/-)○由来精子で受精させると受精成功率は 0.65 であり、出生率は 0.44 であった。この組合せでは 50%の確率で Msh2(-/-)個体が得られるので、卵あたりの Msh2(-/-)個体生産率は 0.14 と上記の約 2 倍であった。これらの msh2(-/-)0個体と自然交配で誕生した msh2(-/-)0個体の間に生育速度や寿命等に特段の相違は見られなかった。

	(+/-)精子	(-/-)精子
(+/-)卵 <i>25/母</i>	生産率:0.25 受精率:0.83 出生率:0.34 寿命*: 0.7	生産率:0.50 受精率:0.65 出生率:0.44 寿命*: 0.75
(-/-)卵 <i>3.4 /母</i>	生産率: 0.50 受精率: 0.23 出生率: n.d.	生産率: 1.00 受精率: 0.23 出生率:n.d.

\*: 20 週令到達率

上記実験で得られた Msh2(-/-) マウス 18 匹を使用した小腸発がんの予備実験の結果、処理中に 8 匹が主にリンパ腫瘍で死亡し、10 匹のみが 16 週間の臭素酸カリウムまたは放射線照射後も生存した。非処理対照マウス 3 匹には小腸がんが認められなかったが、臭素酸カリウムを投与した 3 匹では多数の小腸がんが観察された。4Gy を 8 回照射したマウス 2 匹(総線量 32Gy)と 4Gy を 16 回照射したマウス 1 匹(総線量 64Gy)では小腸がんが全く見出されなかったが、8Gy を 4 回照射したマウス 1 匹(総線量 32Gy)に少数の小腸がんが見出された。0.5Gy を 8 回照射したマウス(総線量 4Gy)は途中で死滅したため小腸発がんの観察ができなかった。

セシウム 137 のベクレル数と空間線量の相関については、異なる生産バッチのマウスに由来する血液を使用して、統計的に処理する必要がある。現在のところ 1 匹のマウスから採取した血液を使用した実験データしか得られていないが、血液 0.5 mL にセシウム 137 を 18 kBq 投入して 8 時間保温した後の 34 -lncRNA/c-myc mRNA 比の値は、血液を空間線量率(水吸収線量)3.75 mGy/hr 環境下で 8 時間保温した後の値に近似していた(石原)。

#### IV 考察

1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

同腹仔から開始した A/J マウス系統の 15 世代目のセシウム 137 投与群の方が同じ 15 代目の対照群に比べて DNA 塩基変異が多く認められたことから、セシウム 137 による各世代での内部被ば

くの影響は生存に必要のない非コード領域で継世代的に蓄積されていることがわかり、全ゲノム解析による非コード領域における DNA 塩基変異を低線量影響の指標として充分に使える可能性が示唆されたことで、引き続き、詳細な解析のために第 0、20、22、23 代目の雄マウスにおける全ゲノムシーケンス解析を行った。

今後、15世代目で得られた同腹仔由来の対照群に対するセシウム 137 投与群の Exon、Intron、Intergenic 領域の塩基配列数当たりの SNV 発生率 3.10x10<sup>-8</sup>、6.53x10<sup>-6</sup>、1.16x10<sup>-6</sup>を基に、上記で得られたデータから 1 世代あたりの変異率や 1 世代あたりの自然突然変異率を求めて、全 DNA 塩基配列上で均等な確率で塩基変異が発生しているのではなく、生存に必要なコード領域では非コード領域より変異率が低く、次世代影響の検出効率が領域によって異なることを定量的に確認し考察したい。このことが確認できると親世代での放射線被ばくによる遺伝性影響が次世代へ受け継がれるのを防御する選択圧の存在を示唆でき、低線量の次世代影響に対する危惧を今より和らげられる可能性が考えられる。

セシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる発がんへの影響については、本研究とは別に第 10 世代目マウスにおける自然発生がんおよび化学物質 (ウレタン) 誘発発がん実験を行っており、セシウム 137 投与群と対照群との間で肺腫瘍の発生率に有意差は認められていない。また、肺腫瘍増殖速度の比較では、10 か月齢の Urethane 誘発平均腫瘍体積では、セシウム 137 水給水群  $(3.6 \text{mm}^3)$  の方が対照群 $(5.5 \text{mm}^3)$ に比して有意(p=0.0056)に小さいことが認められていることから、本実験条件下でのセシウム 137 の放射線が、発がん促進に働いているということは考え難く、DNA の非コード領域における SNV の蓄積が、そのまま発がんにつながるものではないと考えている (論文作成中)。さらに第 1 世代目から第 18 世代目までにおける 1 回の平均出産仔数、性比においても両群間で差は認められていない  $(Nakajima\ et\ al.,\ J.\ Radiat.\ Res.,\ 2015)$ 。

今後、さらに非コード領域の変異率を詳細に調べ、全塩基配列当たり世代あたりの一塩基変異の自然発生率と比較することで放射線線量推計の定量性の精度をどれくらいまで高められるかを検討したい。

#### 2. Msh2 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析

Msh2 遺伝子ホモ欠損マウスでは、酸化剤である臭素酸カリウムの飲水投与により小腸での突然変異頻度が野生型の約 18.8 倍となっていた。大阪大学で実施した同マウスへのセシウム 137 による小腸での突然変異頻度の解析は、現在進行中で、臭素酸カリウムと同様に突然変異頻度やスペクトルの結果の相互比較を行う予定である。

また、Msh2 遺伝子ホモ欠損マウス同士の通常飼育下での自然交配により生まれた仔マウスでは、約50Mb の全エクソーム解析でも検出可能な程度の新規生殖細胞突然変異が発生していることが示された。これに対して、野生型マウスの自然突然変異率は5.4×10<sup>-9</sup>/bp/世代と報告されており(Uchimura et al., Genome Res. 2015)、今回と同様の全エクソーム解析を行った場合、通常飼育下での自然交配により得られる親と仔のトリオサンプルでは、新規生殖細胞突然変異のカウント数は1以下になることから、検出限界以下と推定される。従って今回の突然変異解析の結果より、Msh2 遺伝子ホモ欠損マウスを使用する本実験系の有効性が示唆された。今回の変異頻度や変異スペクトルの結果を基準として、今後実施する酸化剤投与群、セシウム137 投与群における新規生殖細胞突然変異の結果を比較検討可能であると考えられた。さらに今後は放射線医学総合研究所で行われているセシウム投与後のサンプルのデータ収集を行い、比較解析を実施する予定である。

#### 3. Msh2 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

Msh2(-/-)個体の多数生産を目途とした  $in\ vitro$  生産系の比較の結果、上述のように Msh2(+/-) 早由来の卵を Msh2(+/-) 引由来の精子で受精されれば卵あたり 0.071 の Msh2(-/-) 個体生産が期待され、Msh2(-/-) 引由来の精子で受精させれば卵あたり 0.14 の Msh2(-/-) 個体生産の期待されることが示された。当施設における  $in\ vitro$  動物生産体制では  $1\ 2$  ール 100 卵処理が標準であるため、前者の組合せでは  $1\ 2$  ール 1 匹の 1 工の 1 匹の 1 工の 1 匹の 1 工の 1 工の

予備的な小腸発がん実験の結果、約半数の個体が小腸がんの発生する前にリンパ腫などで死亡することから、統計処理の可能な発がん実験では1群6匹程度の Msh2(-/-)マウスを使用する必要のあることが示された。小腸粘膜組織に全く影響の現れない4Gyを反復照射しても小腸がんは現れず、照射後4日間の一過性摂食低下と体重減少の見られる線量である8Gyの反復照射で少数の小腸がんが得られたことから、軽度な小腸粘膜障害の蓄積が小腸がんに必須である可能性が示された。小腸絨毛細胞の前駆細胞はcrypt内の1gr5+細胞と考えられており、8Gyの照射では1gr5+細胞集団の修復が完了するまで増殖が阻害され、絨毛形成が一過性に低下して摂食障害を招くことが予想される。1gr5+細胞の修復ごとに修復エラーが蓄積することにより発がん率の高まる可能性があるので、その検証が今後必要である。セシウム137の影響の検証のためには0.5Gy以下の線量での高頻度反復被ばくの検討が必要である。

血液細胞に対するセシウム 137 の  $\beta$  線によるエネルギー付与を D(t)=E x C0 x t  $\eta$  から計算すると、セシウム 137 の  $\beta$  線の平均エネルギーは 188. 4keV から 3.0 x 10 (-14) J/崩壊となる。1 匹のマウス血液を使用した上記実験では投入セシウム 137 (C0) は 36MBq/kg であり、時間(t) は 28800 秒(8 時間) であることから D(8hr)=0.031 J/kg=31mGy になり、 $\gamma$  線 30mGy/8hr の連続照射による外部被ばく実験結果と大きな矛盾はなかった。ただし、放射線応答性 RNA 発現は血液を採取したマウス個体や生理的条件で変動することがあり得るので、多数の個体を使用してその変動範囲を把握する必要がある(石原)。

#### V 結論

平成 28 年度は、平成 27 年度の研究である「DNA 修復系の欠損動物を用いた微量変異の蓄積性を高めたがんと遺伝影響の高感度検出系」、そして、「全 DNA 塩基配列解析による継世代的に蓄積された塩基変異の高感度検出系」の研究によって得られた成果を根拠としてさらに詳細なデータを得るための実験に着手でき、順次結果を得ているので、今後、充分に低線量放射線被ばく影響の定量的結果の報告ができると考えられる。

以上のことから、当初計画したマウス動物個体 (in vivo) を用いることによるセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくの成体と子孫への影響の定量的実験検証の今後の研究計画の実現性をより現実的にすることができた。

#### VI 次年度以降の計画

#### 本研究の人間生活への外挿と環境行政への貢献

長期の低線量・低線量率内部被ばくによる人間への影響では、遺伝性影響と発がん性の存否が 危惧される。LNT仮説に則れば確率論的に存在することになるが、実際にはどれくらいの影響 力であるかの定量は線量の低さから非常に難しい。そこで、検出感度を高くした検出系を用いて 低線量・低線量率被ばく領域における個体への影響の定量を試みるのがこの研究である。

その上で、A/JやC57BL/6Jマウス系統を用いた継世代的影響実験は、DNA修復能が正常である自然状態でセシウム 137 の低線量・低線量率内部被ばくし続けて世代交代した場合の全DNA塩基対(約 30 億塩基対)の変異を指標に継世代的影響を高感度に定量するものである。これは、マウスの1世代自然突然変異率が人間と同じである点(Drost JB, 1995)を考慮すると自然状態においての人間での継世代的影響をシミュレートするに値する。すなわち、低線量・低線量率内部被ばくを続けながら人間が世代交代を繰り返した場合の子孫におけるDNA塩基対への影響がどれくらいであるのか、また、その変異する場所は、確率的に均等な分布(次世代影響は、LNT仮説に則る)なのか、それとも重要な部位には起こりにくい(次世代影響はLNT仮説より低い)のかなどを全塩基数に対する変異塩基数として定量するものである。

本実験条件では、マウスの筋肉 1g あたり約 160 Bq(内臓では約 80 Bq)の慢性被ばく条件であるが、ヒトでは 1 kg あたりの Bq 数で評価されるので、ヒトでの被ばく線量として換算すると筋肉 1 kg あたり 160000Bq に相当する。このような線量でもマウス子孫において産仔数や性比に影響は出ていない(Nakajima H. et al., 2015)。なお、2011 年から 2012 年の間で福島県民のホールボディーカウンタにより測定された内部被ばく線量としては、32811 人中で最高値が 183. 7Bq/kg (74歳)、2番目が 111. 6Bq/kg (70歳) であり、全身当たりの線量は、それぞれ、6177Bq、2547Bq (Hayano R S. et al. 2013)で、1963 年当時の日本人平均全身セシウム 137量(約 650Bq、Uchiyama M, et al. 1996)の約 10 倍量であった。また、6 歳から15歳の子供の 95%に当たる 1383 人の測定では、すべてが検出限界以下(全身量が 300Bq 以下)であった。

従って、本研究における高感度検出法によってマウス子孫での生存に不要である DNA 領域の塩基に変異を検出できたとしても、福島で測定された最高内部被ばく線量が、本実験条件のさらに低い約870分の1の線量であることから、福島でのヒトへの影響は極めて低と考えられるが、本研究は動物実験であり、すべての結果をヒトにすぐ当てはめられるものではないことも考慮しなければならない。ただ、現在の化学物質等の基準値設定おいては、種差の感受性のちがいを10倍、個体差による感受性のちがいを10倍と見積り、それらの積である100をもとに動物実験の最大無作用量の100分の1を基準値としていることから、約870分の1量は100分の1よりさらに小さい除数ではある。

一方、Msh2遺伝子改変マウスを用いた実験系では、低線量・低線量率内部被ばくで寄与率が高いことが予想される酸化ストレスによるDNA障害の修復能を欠損した検出系で低線量による低発生率の影響を蓄積させて1世代での突然変異率、発がん率を高感度に定量するものである。Msh2遺伝子改変マウスは、人間において放射線感受性の高い群と考えることができる。

自然状態とDNA修復欠損による高感受性群の人間を想定しての低線量内部被ばく影響を調べることで自然状態では検出限界以下でも高感受性群では検出できる限界点を見つけることが出来る、さらに、高感受性群でも低線量被ばく影響が検出できないレベルの存在も見つけることができると考えており、このような実験結果が、人間社会における放射線の基準値設定に係る根拠と

して役立てられるのではないかと考えている。

### 1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

次世代影響の検出実験:生殖細胞突然変異

平成 28 年度に行った多世代低線量内部被ばくした A/J マウス系統の 20、22、23 代目と同腹仔由来の対照群の 20、22、23 代目ならびに同腹仔の最初の親(いずれも♂)における肝臓組織から抽出した DNA の全ゲノムシーケンスデータを基にセシウム 137 投与群と対照群の間で比較を行うとともに、雄のみに継承される Y 染色体上の塩基配列変異などの塩基配列変異数の差についても比較する。これにより、セシウム 137 投与群の 1 世代間(22 世代目と 23 世代目間)、元親からの20 世代間の塩基変異の蓄積性や変異率が解析できるとともに、対照群の 1 世代間、20 世代間の自然塩基変異率も解析できる。マウスの 1 世代自然突然変異率が人間と同じである点を考慮すると自然状態においての人間での継世代的影響をシミュレートするに値する。すなわち、低線量・低線量率内部被ばくを続けながら人間が世代交代を繰り返した場合の子孫における DNA 塩基対への影響がどれくらいであるのか、また、その変異する場所は、確率的に均等な分布(次世代影響は、LNT仮説に則る)なのか、それとも重要な部位には起こりにくい(次世代影響はLNT仮説より低い)のかなどを全塩基数(約 30 億塩基対)に対する変異塩基数として定量できる(中島)。

また、同時に A/J 系統マウスによる多世代低線量内部被ばく影響実験の別系統での再現性を調べるために C57BL/6J 系統マウスにセシウム 137 を飲ませて世代交代を開始させ、A/J と同様の解析を試みる。

最終的には、外部照射によるデータと本研究における内部被ばくのデータとの比較検討が行えるように実験計画を立て次年度以降へつなげたい。

#### 数理モデル構築

予備的に検討されつつあった低線量放射線影響の数理モデル(Wak-Mol モデル)<sup>8,9</sup>を構築する準備のため平成 28 年度においてショウジョウバエやマウスを用いた過去の突然変異研究論文のデータを基に低線量放射線影響の数理モデル(Wak-Mol モデル)構築を検討した。今後、さらに本研究におけるデータを基に低線量率長期被ばくによる突然変異や発がんの数理モデルを構築できるか検討する。そして統計学的手法の代替法として低線量放射線影響の閾値や低線量率放射線の長期被ばくによる線量依存的影響について予測することが可能かを試みる。(研究協力者:真鍋、和田、坂東)。

#### 2. Msh2 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析 1世代影響の検出実験: 体細胞突然変異・発がん

H28 年度において大阪大学にてセシウム 137(2500Bq/ml)の短期(4 週間)飲水投与を行った野生型( $Msh2+/+ \cdot rpsL-Tg$ )と Msh2 遺伝子ホモ欠損マウス( $Msh2-/- \cdot rpsL-Tg$ )、およびそのコントロールとしての野生型( $Msh2+/+ \cdot rpsL-Tg$ )と Msh2 遺伝子ホモ欠損マウス( $Msh2-/- \cdot rpsL-Tg$ )の水投与群、KBrO3 投与群の H28 年度までに凍結保存した臓器サンプルを用いて、突然変異の頻度、種類に関する解析を行う(續、大野)。また、マウスの維持・繁殖・供給を引き続き行う。

腫瘍組織での体細胞突然変異をゲノムワイドに検出するために、腫瘍組織より抽出したゲノム

DNA を用いて、次世代シーケンサーによるエクソーム解析(各サンプルから精製されたゲノム DNA を用いて全エクソーム配列の解析(50Mb)を引き続き行い、バックグランド系統である C57BL/6J のゲノム配列と比較することで変異を同定する(續、大野)。

#### 3. Msh2 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

#### セシウム 137 内部被ばく線量と小腸発がん率の量的検証

平成 29 年度はこれまでの Msh2(-/-)マウスの in vitro 生産および発がん予備実験結果に基づき、 Msh2(-/-)マウスを生産したのちに 1 群 6 匹以上を使用して小腸発がん頻度を有意に亢進する高線量被ばく条件と、低線量被ばく条件を決定し、セシウム 137 投与による影響の有無を確認する。 高線量側では現在のところ 8Gy を 4 回照射して総線量 32Gy に達した個体から小腸がんが検出されているが、8Gy 単回照射後の発がんの検討が必要である。ただし、このような大線量に相当するセシウム 137 投与実験は当施設の許可量を大きく超えて遂行不能であるため、低線量の連続照射に近似させた外部被ばくモデルを使用した小腸発がんを検証し、セシウム 137 投与による小腸発がんの有無を検証する予定である(石原)。

#### 外部被ばくと内部被ばくの同等性の検証

実験マウスの内部被ばく線量評価は、本実験の信頼性と質を左右する最も重要な点である。この線量評価のために以下の方法を用いて本実験マウスの線量評価を試みる。

#### 4. 本研究にて開発したバイオドジメトリーシステムによる線量評価

平成 29 年度は複数の異なる生産バッチのマウスを使用して、血液細胞の DDI-mRNA および DDI-lncRNA をバイオドジメトリー指標とした分析を進め、セシウム 137 投与量と  $\gamma$  線空間線量率の相関や変動範囲を求める。平成 28 年度に行ったマウスから採取した血液を使用する in vitro 培養実験にデータを追加するだけでなく、マウスにセシウム 137 を投与または  $\gamma$  線連続照射した後に採取した血液を分析する個体実験を行う。

#### 5. EGS5 コードシステムによる線量評価

電子光子輸送モンテカルロ計算コード EGS5 (Electron Gamma Shower 5) は数 keV から数 100 GeV のエネルギー範囲での電子・光子輸送をシミュレートする汎用 Monte Carlo 計算コードであり、最新版である EGS5 はスタンフォード線形加速器センター、高エネルギー研究所、ミシガン大学の協力で開発され、2006 年に公開された。今までに、高エネルギー物理・原子力・医療・アイソトープ・宇宙などの様々な分野で利用されてきており、この方法を使うことでこれまでに測定されたセシウム 137 を長期投与された A/J マウスの臓器別セシウム 137 の Bq 数からマウスの 1世代におけるセシウム 137 による内部被ばく線量を求める。そして、これまでに概算で求めた被ばく線量(26m Gy/世代)や本研究で確立してきているバイオドジメトーターと合わせてより正確なそして信頼性を担保できる被ばく線量を求める。特に EGS5 コードシステムでは精巣における線量も求められるので継世代的影響における生殖腺の線量評価も期待できる。

#### 6. 全ゲノムシーケンスによる線量評価

「多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそ

のスペクトル解析」の結果より、セシウム 137 水(100Bq/ml)投与群(各臓器のセシウム 137 のBq 数は測定済み)における全ゲノムシーケンスによる 1 世代間の塩基変率が求められると、対照 群マウスに対してセシウム線源による外部照射実験を行うことで、同じ塩基変異率を示す外部照射線量求めることができるので外部被ばくと内部被ばくの同等性の検証を行える可能性が期待できる。

#### この研究に関する現在までの研究状況・業績

- 1) Tanaka I Ishihara H Yakumaru H et al. Comparison of absorbents and drugs for internal decorporation of radiocesium: Advances of polyvinyl alcohol hydrogel microsphere preparations containing magnetite and Prussian Blue, Biological and Pharmaceutical Bulletin 2016; 39(3): 353-360.
- 2) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H et al. Quantification of damage due to low-dose radiation exposure in mice: construction and application of a biodosimetric model using mRNA indicators in circulating white blood cells, Journal of Radiation Research 2016; 57: 25-34.

#### 引用文献

- 1) Tanaka I Ishihara H Yakumaru H et al. Comparison of absorbents and drugs for internal decorporation of radiocesium: Advances of polyvinyl alcohol hydrogel microsphere preparations containing magnetite and Prussian Blue, Biological and Pharmaceutical Bulletin 2016; 39: 353-360.
- 2) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H et al. Acceleration of regeneration of mucosa in small intestine damaged by ionizing radiation using anabolic steroids. Radiation Research 2011; 175: 367-374.
- 3) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H et al. Pharmaceutical drugs supporting regeneration of small-intestinal mucosa severely damaged by ionizing radiation in mice. Journal of Radiation Research 2013; 54: 1057-1064.
- 4) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H et al. Circadian transitions in radiation dose-dependent augmentation of mRNA levels for dna damage-induced genes elicited by accurate real-time RT-PCR quantification, Journal of Radiation Research 2010; 51: 265-274.
- 5) 石原弘. 概日リズムと放射線感受性. ファルマシア. 2011; 47: 648-653.
- 6) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H et al. Quantification of damage due to low-dose radiation exposure in mice: construction and application of a biodosimetric model using mRNA indicators in circulating white blood cells, Journal of Radiation Research 2016; 57: 25-34.
- 7) 石原弘. 低線量被ばくによる生体影響を利用したバイオドジメトリー. 放射線生物研究. 2016; 51: 241-254.
- 8) Manabe Y Wada T Tsunoyama Y et al. Whack-A-Mole Model: Towards a Unified Description of Biological Effects Caused by Radiation Exposure. J. Phys. Soc. Jpn. 2015; 84: 044002.
- 9) 真鍋勇一郎, 中村一成, 中島裕夫, 他. LNT 再考 放射線の生体影響を考える. 日本原子力学 会誌. 2014; 56(11): 705-708.

# Quantitative assessment for the effects of chronic low-dose internal Cesium-137 radiation exposure on genomic, carcinogenic and hereditary effects in mice.

Hiroo Nakajima\*1, Teruhisa Tsuzuki\*2, Hiroshi Ishihara\*3

\*Department of Radiation Biology and Medical Genetics, Graduate School of Medicine Osaka University

\*Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University

\*Research Center for Radiation Emergency Medicine, National Institute of Radiological Sciences

*Key words*: Low-dose radiation; Cesium-137; Internal exposure; Hereditary effects; Carcinogenesis; Fukushima nuclear power plant accident

#### **Abstract**

Even 30 years after the Chernobyl catastrophe of 1986, people have been suffering from the concern that the southern districts of Belarus and Chernobyl are still highly radiocontaminated. Similarly, the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident, caused by the tsunami of the Great East Japan Earthquake of 2011, has led to environmental changes. It is predicted that radionuclides in the contaminated areas are taken into living organisms, and they irradiate organisms for long periods externally and internally. The health effects of radiation exposure, especially low dose and low dose-rates irradiation, on residents of contaminated areas, such as Chernobyl and Fukushima, have to be estimated based on the scientific data.

To investigate the genomic, carcinogenic and hereditary effects of chronic low dose-rate internal radiation exposure after the nuclear power plant accident, we are trying to develop new systems for quantitative assessment for the low-dose radiation effects.

- 1. Every generations of A/J mice were maintained in the radioisotope facility with free access to drinking water containing Cesium-137 (100 Bq/ml). And then, we performed all mouse genome sequences of the mouse (0, 15, 20, 22, 23rd generation) to detect accumulated genomic mutations. Because small genomic mutations could occur, be inherited, and accumulate in each successive generation in non-coding genomic regions and have no effect on survival, we compared levels of accumulated base mutations between the offspring exposed to continuous low-dose radiation and control mice of the same generation that started from a littermate mouse.
- 2. Since the indirect effect of low LET radiation, such as gamma ray, is known to result from oxidative stress. We attempt to evaluate the effect of internal exposure of Cesium-137 (2500 Bq/ml by P.O.) and the treatment of oxidizing agent (0.15% KBrO<sub>3</sub> water by P.O.) on the somatic mutations, tumor incidence and germline mutations by using DNA repair-deficient mice (*Msh2* -/-•rpsL-Tg).
- 3. To quantify the damage due to low-dose radiation exposure in mice, we constructed a biodosimetric

model using mRNA indicators (the relative levels of RNA for DNA damage-induced (DDI) genes, such as *Bax*, *Bbc3* and *Cdkn1a*) in circulating white blood cells. And we quantified RNA from a small amount of blood isolated from mice following low-dose body irradiation (<0.5 Gy) aimed at developing biodosimetric tools for situations that are difficult to compare of external and internal radiation exposure.

## 低線量率放射線長期連続照射によるマウス急性骨髄性白血病の起因となる Sfpil 遺伝子変異の線量率依存性の解析

#### ~放射線発がんの線量率効果の仕組みを考える~

甲斐倫明 (大分県立看護科学大学看護学部 教授)

#### 研究要旨

福島原発事故以来、関心の高い低線量率放射線の長期連続被ばくによる健康リスクを科学 的に理解するためには、正常な細胞からがん細胞が発生するまでの種々の生物学的プロセスに 対する放射線の影響を線量率および集積線量の違いによって明らかにしていかなくてはならな い。我々はこれまでに C3H 系マウスの造血系細胞における細胞動態実験とその細胞動態の数理 モデルによって rAML (放射線誘発急性骨髄性白血病) 発症までの生物学的プロセスを考察し てきた。その結果、rAMLの起源となる細胞(HSC、MPP、CMEP、CMLP)が白血病幹細胞に 変化するには、放射線によってこれらの細胞群の全体的な細胞動態の変化(細胞増殖、細胞死、 細胞分化)が関与している可能性が示唆された。そこで本研究はこの可能性に基づき、rAMLの 起源となる細胞を対象に、低・中・高線量率で放射線を照射後、1)細胞数、2)2番染色体 上の Sfpil 遺伝子領域に欠失が生じている細胞の割合、3) 対立する Sfpil 遺伝子に点突然変異 が生じている細胞の割合を検討し、低線量率放射線による発がんリスクの科学的評価を行うこ とを目標としている。昨年度の高線量率(1 Gy/min)による実験に引き続き、本年度は中線量 率 (200 mGy/day) で C3H 系マウスに 3 Gy の  $\gamma$  線を全身に照射した。そして、照射開始日から 数えて 250 日間における 1) 末梢血レベル (WBC、RBC、PLT) および造血系レベル (HSC、 ST-HSC、LT-HSC、MPP、CMEP、CMLP) の細胞数の変化、2) Sfpil 遺伝子領域に欠失が生 じている HSC の割合、3) 対立する Sfpil 遺伝子の点突然変異により生じる PU.1 の機能異常 が起きている HSC の割合をそれぞれ解析した。今後は低線量率での実験も開始し、rAML に繋 がる変異が線量率依存的に生じるのか明らかにする予定である。

キーワード:放射線、細胞動態、2番染色体異常、Sfpil 遺伝子、PU.1の発現、rAML

研究協力者:廣内篤久(環境科学技術研究所)、有吉健太郎(弘前大学)

#### I. 研究目的

二動原体染色体は 1960 年代から放射線影響のエンドポイントとして最も調べられてきた。我々は本研究に先立ち、二動原体染色体発生頻度と集積線量、ならびに線量率の関係に着目して文献調査を行った。 文献調査の対象は in vitro での人の抹消血リンパ球に X 線または y 線を照射した実験である。二動原体染色体発生頻度と線量率の関係においては、集積線量が 1000 mGy 未満での線量率効果(同じ線量でも線量率の低い方の影響が小さい現象)は観察されないことが分かった。10%、調査対象の文献での最小線量率は 0.5 mGy/min 以上で低線量率によるものはなかった。

しかしin vivoでは、最近マウスに  $0.0007\sim0.14$  mGy/min の低線量率  $\gamma$  線を集積線量  $100\sim8,000$  mGy まで照射し、脾細胞の二動原体染色体発生頻度に関する報告があった。この中で使用された最も低い線量率は自然放射線レベルの約 400 倍、現在の福島県内の立入制限区域の約 10 倍程度に相当する。この報告では、集積線量 250 mGy で、0.0007mGy/min と 0.014 mGy/min の低線量率で線量率効果が観察されている 100。従って、in vivo での極めて低い線量率領域での線量率効果を発がんなどの疾患で解析することが重要であると考えられた。

放射線発がんの代表例として急性骨髄性白血病がある。これまでの研究で、放射線誘発急性骨 髄性白血病(rAML、radiation-induced acute myeloid leukemia)を発症したマウスの骨髄細胞には2 番染色体上の Sfpil 遺伝子領域を含む欠失型異常と、対立する2番染色体上の Sfpil 遺伝子に点突 然変異が生じていることが分かってきた <sup>2-9)</sup>。しかし、これらの異常が放射線照射後、いつ、どの ようにして生じるのか未だ明らかではない。そこで、我々はrAMLの発症機構として下記の仮説 を立てた。「放射線の照射により抹消血球細胞数が減少し、これを補うために造血幹細胞(HSC、 hematopoietic stem cell) が平常時に比べて過剰に増殖する。また、放射線は同時に HSC の 2 番染 色体上の Sfpil 遺伝子領域の片側を欠失させる。その後、HSC の過剰増殖により DNA 複製ストレ スや早期老化が生じ、残存するもう一方の Sfpil 遺伝子座に点突然変異を誘発する。これによっ て Sfpil 遺伝子の転写因子である PU.1 の機能が抑制され HSC は白血病幹細胞に変異する。」こ の仮説のように放射線の間接的な細胞動態の変化によるがん化の促進は、甲状腺がんや胸腺リン パ腫等でも提言されている <sup>10,11)</sup>。そこで、我々は前回の環境省の事業(研究課題名:細胞動態 のシステマティックレビューと実験データ解析による低線量・低線量率における放射線発がんリ スクの描写、研究期間: 2012 年 4 月~2015 年 3 月) で低線量率(20 mGy/day)、中線量率(200 mGy/day)および高線量率(1 Gy/min)のγ線を C3H 系マウスに 3 Gy まで照射し、HSC の細胞 数の変化を調べた。 その結果、中線量率と高線量率のγ線では短期的な HSC の細胞数減少が観察 されたが、低線量率γ線では細胞数の変化は認められなかった。しかし、分裂した HSC は分化と 自己複製という2種類の細胞動態を示すが、前回事業ではこの HSC の非対称的な細胞動態を勘案 しておらず、過剰増殖による影響の評価が一部十分ではなかった。

また、2010年に Bondar らは 1Gy の放射線を照射した C57BL/6 マウスと非照射の C57BL/6 マウスの骨髄細胞を混合し、致死線量を照射した C57BL/6 マウスに移植する実験を行い、1Gy を照射したマウス由来の HSPC (Hematopoietic cells and progenitor cells)は、移植後、骨髄再建に寄与する割合が非照射マウス由来の HSPC に比べて低いことを報告した  $^{12)}$ 。この結果は、放射線によって、DNA 損傷を受けた HSPC は、細胞競合の結果、排除されてしまうことを意味している。この現象が一般的に生じるならば、放射線が HSC に 2 番染色体の欠失型異常を誘発したとしても、細胞集団の中で当該細胞の増殖・分化は抑制され、rAML の白血病幹細胞には発展しにくいことになる。この現象は rAML の線量率効果を考える上では非常に重要である。

そこで本研究では高・中・低線量率で集積線量が 3 Gy になるまで  $\gamma$  線を C3H 系マウスに照射し、照射開始日から数えて250日間における末梢血レベル(WBC、RBC、PLT)の細胞数、rAMLの起源となりうる造血系細胞(長期造血幹細胞(LT-HSC)、短期造血幹細胞(ST-HSC)、多能性前駆細胞(MPP)、骨髄系/リンパ球系共通前駆細胞(CMLP)、骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞(CMEP)))を対象にして、 1)細胞数、 2)2番染色体上のSfpil遺伝子領域に欠失が生じている HSC の割合、3)対立する Sfpil遺伝子の点突然変異により PU.1 に機能異常が生じて

いる HSC の割合をそれぞれ解析し、低線量率放射線による rAML 発症リスクを評価することを 目標とする。昨年度の高線量率での実験に引き続き、本年度は中線量率での実験を開始した。

#### II. 方法

#### <マウス>

本研究では 8 週齢のふの C3H/HeNJcl マウスを用いた。マウスは最大 4 匹ずつケージに収容し、温度、湿度、室内照明の明暗サイクルが管理された SPF 環境下の飼育室中で飼育した。固形飼料と水は自由に摂取させた。

#### <γ線の照射>

 $\gamma$  線照射は環境科学技術研究所に設置してある Cs-137 低線量率  $\gamma$  線照射装置を用いて行った。マウスをコントロール群 (0 Gy)、中線量率群 (200 mGy/day) および高線量率群 (1 Gy/min) の 3 群に分け、集積線量が 3 Gy (rAML が好発する線量) になるまで  $\gamma$  線を全身に連続照射した(中線量率群は 15 日間の照射)。本研究では 1 群 5 匹のマウスを使用した。照射終了後も飼育を続け、照射開始日から数えて 250 日間飼育した。

#### <血球数の測定>

マウスをイソフルランで麻酔後に眼窩採血を行なった。その後コールターカウンターを用いて、 末梢血中の白血球 (WBC)、赤血球 (RBC)、血小板 (PLT) の数を計測した。

<フローサイトセルソーターによる造血幹/前駆細胞の単離>

イソフルラン処理により屠殺したマウスの両側の大腿骨から骨髄細胞を摘出した。各分化段階の造血系細胞では細胞膜表面タンパク質の発現パターンが異なっていることが分かっている。その特性を利用してそれぞれのタンパク質の抗体処理を骨髄細胞に行ない、フローサイトセルソーターにて造血幹細胞(HSC)\*1、長期造血幹細胞(LT-HSC)\*2、短期造血幹細胞(ST-HSC)\*3、多能性前駆細胞(MPP)\*4、骨髄系/リンパ球系共通前駆細胞(CMLP)\*5、骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞(CMEP)\*6をそれぞれ単離した<sup>13,14,15,16)</sup>。骨髄中の造血系細胞の増殖・分化模式図を図1に示す。この操作は全て環境科学技術研究所にて実施した。

\*<sup>1</sup>HSC : CD150 陽性、CD48 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

\*<sup>2</sup>LT-HSC: CD34 陰性、CD150 陽性、CD48 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

\*3ST-HSC: CD34 陽性、CD150 陽性、CD48 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

\*<sup>4</sup>MPP : CD150 陽/陰性、CD48 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

\*5CMEP : CD34 陽性、CD48 陽性、Lin 陰性、sca1 陰性、c-kit 陽性

\*6CMLP : CD34 陽性、CD48 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陰性

#### <Sfpil 遺伝子領域の欠失の解析>

2 番染色体上にある Sfpil 遺伝子領域の欠失を調べるために Sfpil 遺伝子の BAC クローンを用いて蛍光染色体プローブを作成した(弘前大学で実施)。この Sfpil 遺伝子領域の蛍光染色体プローブを用いて染色体 FISH(Fluorescence in situ hybridization) を行い、蛍光顕微鏡下で、Sfpil 遺伝子の蛍光が 1 個しか観察されない細胞を Sfpil 遺伝子領域に欠失が生じている HSC として評価した。本研究では 150 日目および 250 日目における間期の HSC を観察対象として、1 匹あたり 50 個以上の細胞を観察した。

<PU.1 の機能異常の解析>

Sfpil 遺伝子の転写因子である PU.1 は、GM-CSF(顆粒球単球コロニー刺激因子)のレセプター  $\alpha$  に結合して HSC の分化を調節している  $^{17,18)}$ 。 rAML に必須な Sfpil 遺伝子のコドン 235 に点突然変異が生じると、転写された PU.1 は GM-CSF のレセプター  $\alpha$  と結合できなくなる。これにより分化異常が起きると考えられている。そこで、本研究では PU.1 と GM-CSF の免疫蛍光抗体染色を行い、Tali イメージベースサイトメーター(自動細胞計測装置)を用いて、PU.1 しか発現していない細胞を Sfpil 遺伝子の点突然変異により PU.1 の機能異常が生じている HSC として評価した。

#### (倫理面への配慮)

公益財団法人環境科学技術研究所動物実験委員会に実験計画書を提出し、苦痛の軽減、代替法の活用および動物数などの倫理面および計画の妥当性等の審査を受け、承認を得た(承認番号 27-26 号)。

#### III. 結果

<末梢血中の血球数の継時的変化>

WBC 数の継時的変化を図 2 に示す。高線量率群では 3 Gy で WBC 数がコントロール群の 0.25 倍となった。その後は増加傾向を示し、150 日目以降はコントロール群と差は見られなくなった。これに対して 中線量率群では照射開始から緩やかな減少を示し、3 Gy になるとコントロール群の 0.58 倍となった。その後は緩やかな増加傾向を示し、250 日目にコントロール群と差は見られなくなった。

RBC 数の継時的変化を図3に示す。高線量率群では3GyでRBC数がコントロール群の0.9倍となった。その後はほぼ変化はなく、250日目であってもコントロール群の0.9倍のままであった。中線量率群に関しては照射開始から緩やかな減少傾向を示し、250日目にコントロール群の0.8倍となった。

PLT 数の継時的変化を図 4 に示す。WBC や RBC と異なり PLT 数はコントロール群でも 250 日間大きく変動をしていることがわかった。このため、高線量率群と中線量率群ともに観察したポイントにおいてはコントロール群と有意差が見られたりしたが、全体的に両群ともほぼ一定であり変化は見られなかった。中線量率群で 3 Gy 時に顕著な減少が見られたが、この理由に関しては再実験も含めて現在検討中である。

<骨髄細胞中における造血幹/前駆細胞数の割合の継時的変化>

HSC の継時的変化を図 5 に示す。高線量率群では 3 Gy でコントロール群の 0.2 倍となった。その後は増加傾向を示し、150 日目以降はコントロール群と差が見られなくなった。これに対して 中線量率群では照射開始から緩やかな減少を示し、3 Gy になるとコントロール群の 0.58 倍となった。150 日目では一旦コントロール群と同様のレベルとなったが、250 日目にはコントロール群の 0.4 倍となった。

LT-HSC および ST-HSC の継時的変化を図 6 および図 7 にそれぞれ示す。高線量率群では両細胞ともに 150 日目にコントロール群の 4.5 倍(LT-HSC)、3 倍(ST-HSC)となった。中線量率群は 250 日目に ST-HSC がコントロール群の 0.5 倍となったが、LT-HSC はコントロール群と同様の変化を示した。

MPP の継時的変化を図 8 に示す。高線量率群では 3 Gy でコントロール群の 0.3 倍となった。

その後は増加傾向を示し、150 日目以降はコントロール群と差が見られなくなった。これに対して中線量率群では3 Gy でコントロール群の0.4 倍となった。その後は増加傾向を示し、150 日目ではコントロール群の1.6 倍に増加したが、250 日目ではコントロール群の0.4 倍に再び減少した。

CMEP の継時的変化を図 9 に示す。高線量率群では 3 Gy でコントロール群の 0.07 倍、150 日目では 0.3 倍となった。250 日目でコントロール群と同様のレベルとなった。これに対して 中線量率群では照射開始から減少傾向を示し、3 Gy になるとコントロール群の 0.4 倍となった。150 日目でコントロール群と同様のレベルとなったが、その後、急激な増加傾向を示し、250 日目にコントロール群の 3 倍となった。

CMLP の継時的変化を図 10 に示す。高線量率群では 3 Gy でコントロール群の 0.4 倍、150 日目で 0.6 倍となった。250 日目ではコントロール群と差は見られなくなった。これに対して 中線量率群では照射開始からコントロール群と同様の変化を示していたが、150 日になるとコントロール群の 2 倍に増加した。250 日目でも同様であった。

<片側 Sfpil 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の頻度>

図 11 に片側 *Sfpil* 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の頻度を示す。中線量率群では 250 日目 (コントロール群の 1.8 倍) に、高線量率群では 150 日目 (コントロール群の 2.5 倍) にコントロール群と比較して有意な増加が観察された。

<PU.1 に機能異常が生じている HSC の頻度>

PU.1 に機能異常が起きている HSC の頻度を図 12 に示す。5 匹の平均値で比較すると 中線量率群も 高線量率群もコントロール群と有意な差は見られなかった。しかし、1 匹ごとで見ると 150 日目では高線量率群の 1 匹のマウスに PU.1 の機能異常を持つ HSC が 7 % 観察された。250 日目になると高線量率群では 2 匹のマウスに  $10\sim20$  %、中線量率群では 1 匹のマウスに 18 % 観察された。

#### IV. 考察

本研究では rAML につながる生物学的変化の線量率依存性を明らかにすることで、低線量率放射線による発がんリスクを科学的に評価することを目標としている。昨年度の高線量率による実験に引き続き、本年度は中線量率による実験を行った。その結果、中線量率群と高線量率群を集積線量が 3 Gy の時点で比較すると末梢血レベルの細胞では WBC(図 2)および RBC(図 3)が、造血系レベルの細胞では HSC(図 5)、MPP(図 8)、CMEP(図 9)および CMLP(図 10)が線量率に依存して減少していることが分かった。本研究では照射開始から数えて 250 日目までの継時的変化も調べている。すると、高線量率群の WBC、HSC、MPPは 150 日目に、CMEP および CMLP は 250 日目にコントロール群と同様のレベルまで回復していることが分かった。これに対して中線量率群では高線量率群とは様相が異なり、HSC および MPP は 250 日目でもコントロール群よりも有意に減少していた。しかし、CMEP は 250日目に、CMLP は150日目にコントロール群よりも有意に増加していた。この詳細なメカニズムについては現在検討中であるが、3 Gy 照射後の末梢血レベルおよび造血系レベルの細胞は高線量率では短時間に、そして中線量率では長い時間をかけてゆっくり回復している可能性が考えられた。もしこの可能性が正しいならば、高線量率群では早い段階で HSC に過剰な DNA 複製ストレスがかかっていたと考えられる。

rAML に必須な異常の一つに SfpiI 遺伝子の点突然変異がある。これまで放射線による突然変異研究は、HPRT遺伝子を指標として数多く行なわれており、放射線は点突然変異よりも欠失型の

変異を有意に誘発することが明らかにされている  $^{19}$ 。確かに本研究でも図  $^{10}$ に示すように $^{Spil}$  遺伝子領域に欠失を持った  $^{15}$  田区 の有意な増加が高線量率群では  $^{15}$  日目に見られている。そこで放射線が間接的に対立  $^{15}$  別間 遺伝子に点突然変異を生じるメカニズムを改めて考えてみる。 我々は当初放射線が  $^{15}$  HSC に過剰な  $^{15}$  DNA 複製ストレスを引き起こすことで早期老化が生じ、これにより蓄積した活性酸素種  $^{15}$  (ROS) が対立する  $^{15}$  が対立する  $^{15}$  が以上  $^{15}$  の  $^{15$ 

Sfpil 遺伝子の転写因子である PU.1 は、GM-CSF(顆粒球単球コロニー刺激因子)のレセプター  $\alpha$  に結合して HSC の分化を調節している  $^{17,18}$ 。 rAML に必須な Sfpil遺伝子のコドン 235 に点突然変異が生じると、転写された PU.1 は GM-CSF のレセプター  $\alpha$  と結合できなくなるため、分化異常が起こり rAML につながると考えられている。そこで本研究では PU.1 と GM-CSF の免疫蛍光交代染色を行い、PU.1 のみを発現している細胞を Sfpil遺伝子に点突然変異が生じ PU.1 の機能異常が起きている HSC として解析した。その結果、図 12 より、150 日目に高線量率群の 1 匹のマウスに PU.1 の機能異常を持つ HSC が 7 %観察された。この結果は高線量率群では 150 日目までの間に Sfpil遺伝子に点突然変異が生じていた可能性を示している。よって、高線量率群では早い段階での過剰な DNA 複製ストレスが Sfpil遺伝子の点突然変異生成に寄与しているのかもしれない。これに対して、中線量率群は長い時間をかけてゆっくり DNA 複製ストレスがかかっていくため 250 日目経って Sfpil遺伝子に点突然変異が生じているのではと考えられる。今後、低線量率での実験も開始し、線量率の違いによる末梢血レベルおよび造血系レベルの細胞の動態、Sfpil遺伝子領域の欠失を持つ HSC の割合、Sfpil の機能異常を持つ HSC の割合を解析し、rAML に繋がる変異の線量率依存性を明らかにする予定である。

#### V. 結論

現時点において、中・高線量率では末梢血レベルおよび造血系レベルの細胞の動態変化のパターンが線量率によって異なることが分かった。また、*Sfpil* 遺伝子に欠失を持つ HSC の割合および PU.1 の機能異常を持つ HSC の割合も線量率に依存して増加していることが分かった。この変化が rAML にどのように結びつくのか、また低線量率ではどのようなパターンを示すのか今後の検討が必要である。

#### VI. 次年度以降の計画

昨年度に引き続き環境科学技術研究所に設置してある低線量率γ線照射装置を用いて、20 mGy/day (低線量率) での実験も開始する。観察項目は下記の通しである。

1) HSC における細胞競合の実態を明らかにするために、DNA 損傷を Sfpil 遺伝子の欠失を指標

として捉え、DNA 損傷を持つ HSC 数の経時的変化を調べる。この実験に関しては高線量率 および中線量率でも行う。具体的には 3 Gy を照射してから 14 日目までにおける変化を調べる予定である。

- 2) HSC は自己複製能力を持つ最も未熟な造血細胞で、LT-HSC (休止期の造血幹細胞)と ST-HSC (早く細胞分裂して MPP へ分化する HSC) に分類される。そこで、放射線による HSC の細胞動態を細胞死、分裂、分化を考慮して再考するために、LT-HSC と ST-HSC の細胞死の頻度ならびに細胞数の経時的変化を解析する。
- 3) rAML を発現した造血系細胞では PU.1 の機能異常が生じていることが報告されている。そこで、PU.1 と GM-CSF の蛍光抗体染色を行ない、PU.1 のみを発現している HSC の割合を解析する。
- 4) rAMLに必須な2番染色体にある Sfpil 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の割合を調べるために、 昨年度作成した Sfpil 遺伝子の蛍光染色体プローブを用いた染色体 FISH を行い、蛍光顕微 鏡下で Sfpil 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の割合を解析する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

小嶋光明, 廣内篤久. 急性骨髄性白血病につながる造血細胞および造血組織の放射線応答. 放射線生物研究. 2016, 51, 34-56.

#### 引用文献

- 1. 小嶋 光明, 甲斐 倫明. 低線量域における線量率効果. 放射線生物研究. 2012; 47: 347-360.
- 2. Azumi J Sachs L. Chromosome mapping of the genes that control differentiation and malignancy in myeloid leukemic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 77: 253-257.
- 3. Hayata I, Seki M, Yoshida K et al. Chromosome aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. Cancer Res. 1983; 43: 367-373.
- 4. Trakhtenbrot L, Krauthgamer R, Resnitzky P et al. Deletion of chromosome 2 is an early event in the development of radiation-induced myeloid leukemia in SJL/J mice. Leukemia. 1988; 2: 545-550.
- 5. Rithidech KN, Bond VP, Cronkite EP et al. A specific chromosomal deletion in murine leukemic cells induced by radiation with different qualities. Exp Hematol. 1993; 21: 427-431.
- 6. 伴信彦.マウスの急性骨髄性白血病と2番染色体の異常.放射線生物研究.2000;35:115-126.
- 7. Cook WD, McCaw BJ, Herring C et al. PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. Blood. 2004; 104: 3437–3444.
- 8. Suraweera N, Meijne E, Moody J et al. Mutations of the PU.1 Ets domain are specifically associated with murine radiation-induced, but not human therapy-related, acute myeloid leukemia. Oncogene. 2005; 24: 3678 –3683.
- 9. Hirouchi T, Takabatake T, Yoshida K et al. Upregulation of c-myc gene accompanied by PU.1 deficiency in radiation-induced acute myeloid leukemia in mice. ExpHematol. 2008; 36: 871–885.
- 10. Kominami R, Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. Cancer Sci. 2006; 97: 575-581.
- 11. Suzuki K, Yamashita S. Low-dose radiation exposure and carcinogenesis. Jpn J Clin Oncol. 2012; 42: 563-568.

- 12. Bondar T, Medzhitov R. p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. Cell Stem Cell. 2010; 6: 309-322.
- 13. Hirouchi T, Akabane M, Tanaka S et al. Cell surface marker phenotypes and gene expression profiles of murine radiation-induced acute myeloid leukemia stem cells are similar to those of common myeloid progenitors. Radiat Res. 2011; 176: 311-322.
- 14. Shao L, Wang Y, Chang J et al. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury. Transl Cancer Res. 2013; 2: 397-411.
- 15. Ban, N, Kai, M. Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. Br. J. Cancer. 2009; 101: 363-371.
- 16. Kawamoto H, Ikawa T, Masuda K, Wada H, Katsura Y. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. Immunol Rev. 2010; 238: 23-36.
- 17. Silver A, Moody J, Dunford R, Clark D, Ganz S, Bulman R, Bouffler S, Finnon P, Meijne E, Huiskamp R, Cox R. Molecular mapping of chromosome 2 deletions in murine radiation-induced AML localizes a putative tumor suppressor gene to a 1.0 cM region homologous to human chromosome segment 11p11-12. Genes Chromosomes Cancer. 1999; 24: 95-104.
- Verbiest T, Bouffler S, Nutt SL, Badie C. PU.1 downregulation in murine radiation-induced acute myeloid leukaemia (AML); from molecular mechanism to human AML. Carcinogenesis. 2015; 36: 413-419.
- Nagasawa H, Little JB. Personal communication. Harvard University School of Public Health. 1993.
- 20. Ohno M, Sakumi K, Fukumura R, Furuichi M, Iwasaki Y, Hokama M, Ikemura T, Tsuzuki T, Gondo Y, Nakabeppu Y. 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. Sci Rep. 2014; 4: 4689.
- 21. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. Nat Rev Genet. 2014; 15: 585-598.
- 22. 小嶋光明, 廣内篤久. 急性骨髄性白血病につながる造血細胞および造血組織の放射線応答. 放射線生物研究. 2016; 51: 34-56.

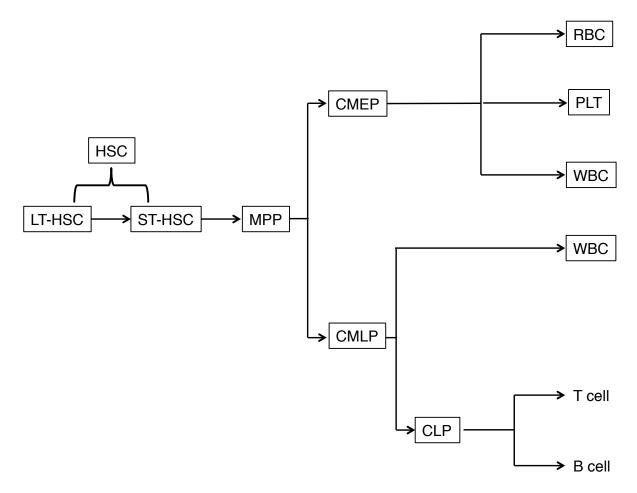


図 1. 骨髄中の造血系細胞の増殖・分化模式図

造血幹細胞(HSC, hematopoietic stem cell)とは長期造血幹細胞(LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell)と短期造血幹細胞(ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell)を表す。LT-HSC には長期の自己複製能と分化能が維持されている。ST-HSC は短期で自己複製と分化を繰り返し、自己複製能を失った多能性前駆細胞(MPP, multipotent progenitor)を生産する。その後、MPP は骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞(CMEP, common myeloid-erythroid progenitor)と骨髄球系/リンパ球系共通前駆細胞(CMLP, common myelo-lymphoid progenitor)に分かれ、CMEP は赤血球(erythrocyte)とマクロファージ(macrophage)に分化する。CMLP はマクロファージへの分化とリンパ球系共通前駆細胞(CLP, common lymphoid progenitor)に分かれ、CLP は T 細胞(T cell)と B 細胞(B cell)に分化する。

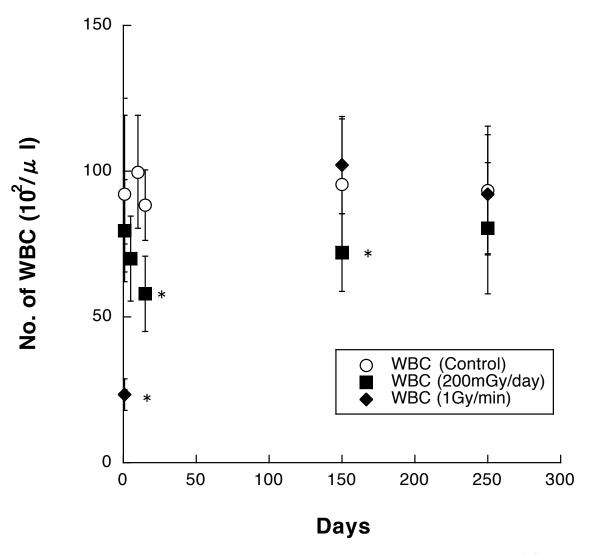


図 2. WBC (白血球) 数の継時的変化

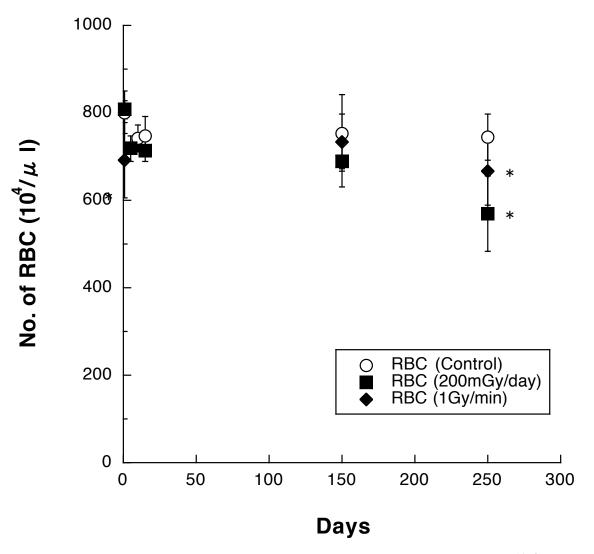


図 3. RBC (赤血球) 数の継時的変化

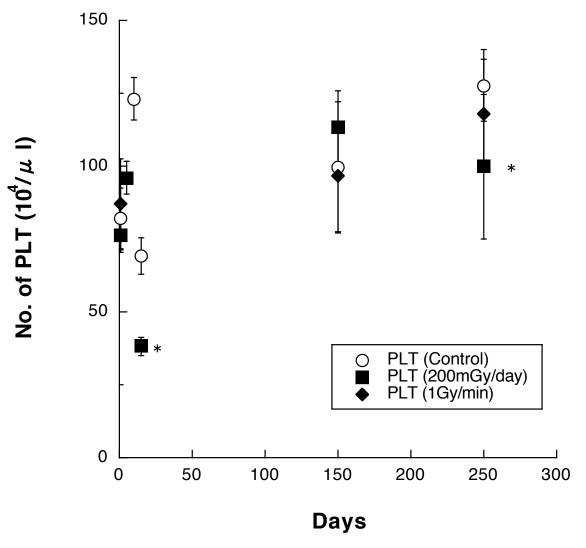


図 4. PLT (血小板) 数の継時的変化

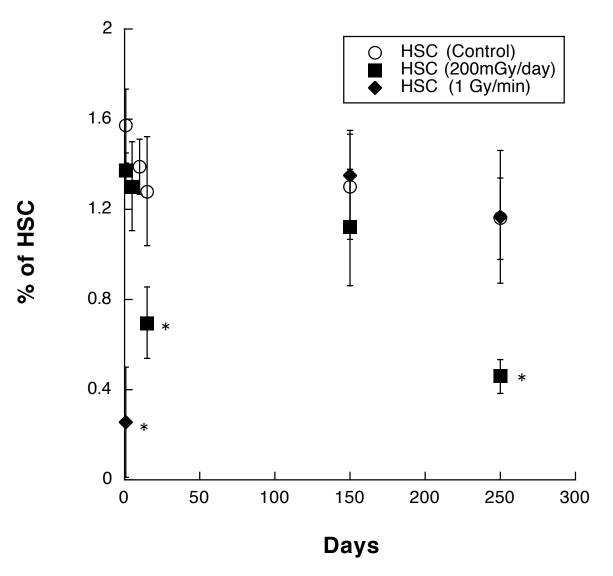


図 5. HSC (造血幹細胞) の継時的変化

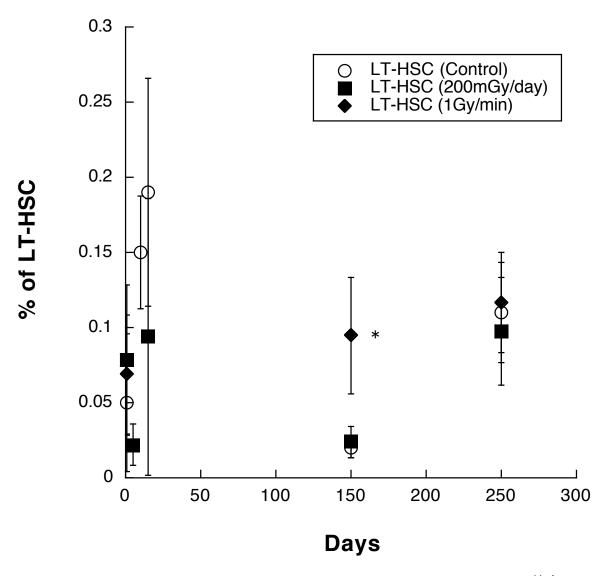


図 6. LT-HSC(長期造血幹細胞)の継時的変化

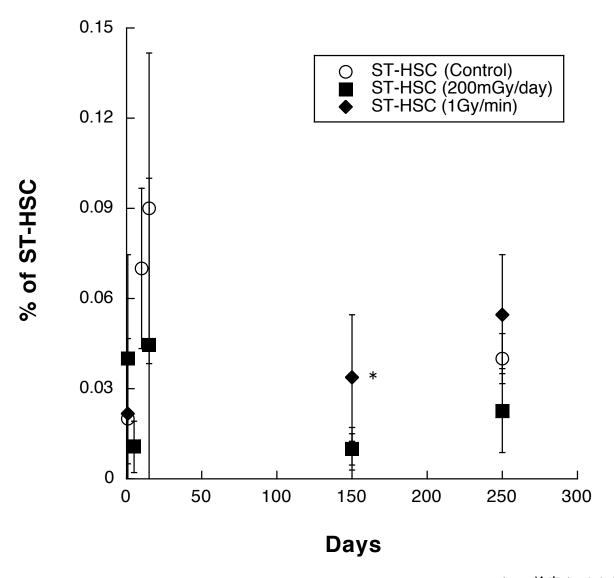


図 7. ST-HSC (短期造血幹細胞) の継時的変化

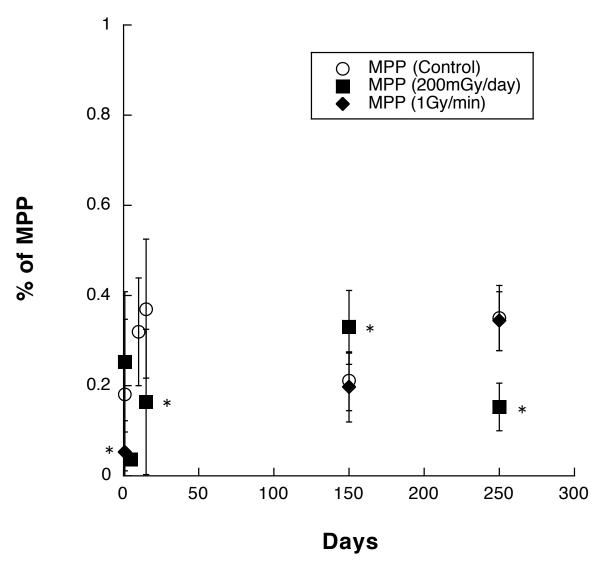


図 8. MPP (多能性前駆細胞) の継時的変化

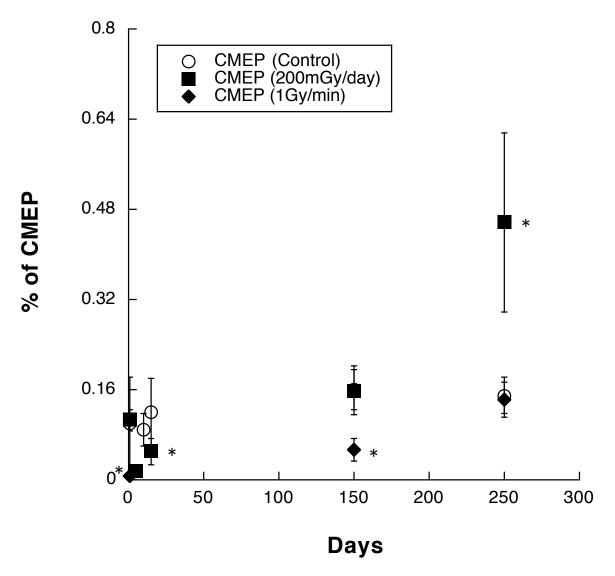


図 9. CMEP (骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞) の継時的変化

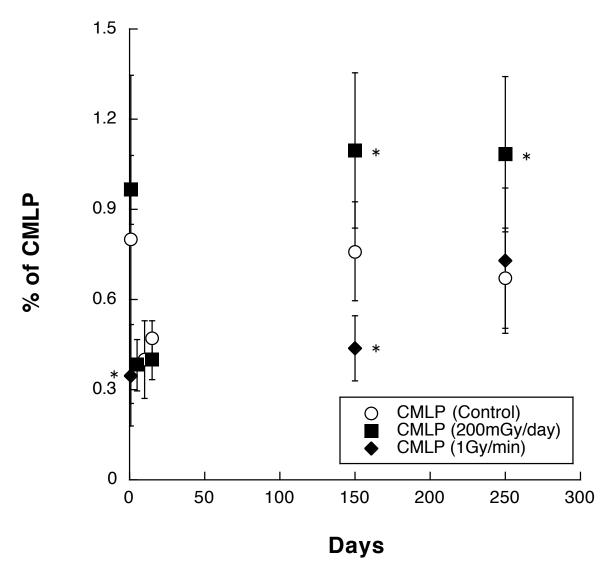
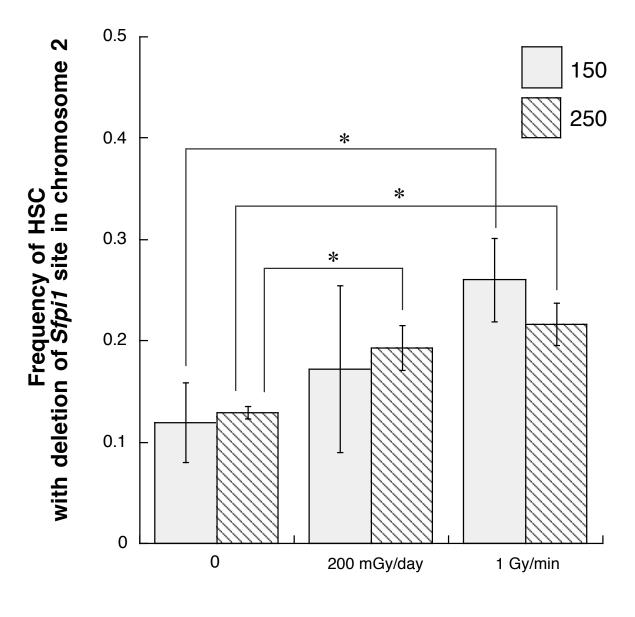


図 10. CMLP (骨髄系/リンパ球系共通前駆細胞) の継時的変化



**Dose-rates** 

図 11. 片側 Sfpi1 遺伝子領域の欠失を持つ HSC の頻度

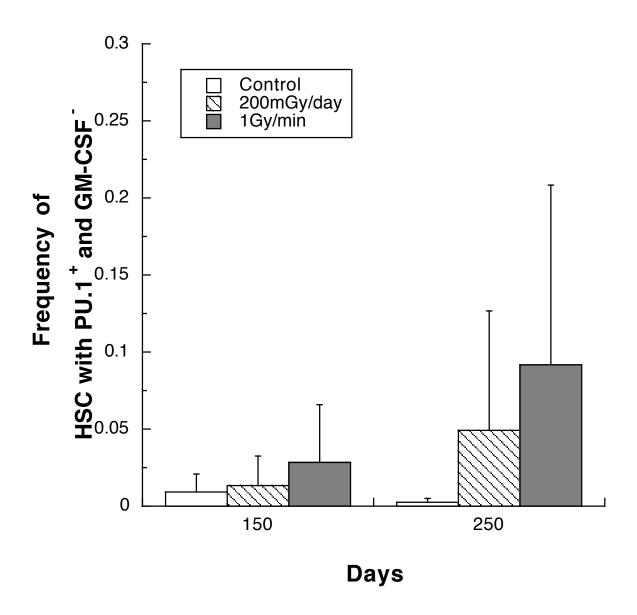


図 12. PU.1 の機能異常が起きている HSC の頻度

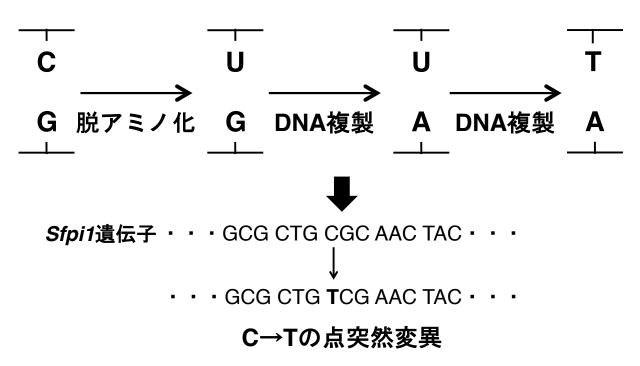


図 13. C から T への点突然変異が生じるメカニズム

## A dose-rate effect on chromosome 2 aberrations and *Sfpi1/PU.1* loss leading to radiation-induced murine acute myeloid leukemia

- Aiming at clarifying radiation cancer risk at low doses and dose rates

Michiaki Kai\*1, Kentaro Ariyoshi\*2, Atsuhisa Hirouch\*3

\*1Oita University of Nursing and Health Sciences

2\*Hirosaki University, Institute of Radiation Emergency Medicine

\*3Institute for Environmental Sciences

*Keywords*: radiation, dose-rate, C3H mice, chromosome 2, *Sfpi1*/PU.1, rAML (radiation-induced acute myeloid leukemia)

#### **Abstract**

The dose-rate effect (DRE) is a critical phenomenon that should be considered to estimate the low-dose radiation cancer risk for human health. However, the DRE has so far been reported in the high-dose region. As a pilot study, we reviewed the DRE on radiation-induced dicentrics in the recent reports and found that DRE would exist in the low dose-rate region in vivo system. Therefore, it is very important to analyze the DRE at low-dose rates by experimental study on radiation cancer in vivo system. It is well known that exposure to radiation leads to rAML (radiation-induced acute myeloid leukemia) in C3H mice after an incubation period of 1 to 2 years. In murine studies, it has been reported that dysfunction of PU.1, encoded by the murine Sfpi1 gene, expression in hematopoietic progenitors (ST-HSC: short term hematopoietic stem cell, LT-HSC: Long term hematopoietic stem cell, MPP: Multipotent progenitor, CMEP: Common myeloid-erythroid progenitor, CMLP: Common myeloid-lymphoid progenitor) by radiation-induced Sfpi1 gene site deletions in chromosome 2 and subsequent Sfpi1 point mutation in the remaining allele, leads to rAML. In our previous study, we observed that cell turnover of hematopoietic progenitors was activated depending on dose rates, and hypothesized that DNA replicative stress through radiation-induced cell turnover can induce rAML-related mutations. To clarify our hypothesis in this study, we examine the dose-rate response of cell turnover, Sfpi1 gene site deletions in chromosome 2, and PU.1 loss in hematopoietic progenitors of  $\gamma$ -irradiated C3H mice, and aim at clarifying DRE of radiation cancer. The preliminary results suggested that pattern of cell turnover in HSC was different from between 200 mGy/day and 1 Gy/min. We also found that the frequencies of HSC with deletion of Sfpi1 gene site in chromosome 2 and HSC with dysfunction of PU.1 increased depending on a dose rate. In the next year, we will start the experiment of the 20 mGy/day, and will construct a risk model for murine rAML based on dose rates.

低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか?低線量率放射線は?放射線関連循環器疾患の機序の解明

放射線と脳卒中発症時期の相関検索、バイオマーカーおよびメタボロー ム解析による発症機序の解明

主任研究者; 高橋規郎(公益財団法人·放射線影響研究所·顧問)

放射線被曝後の DNA 損傷応答、炎症反応および細胞老化が循環器疾患発生に与える影響の明確化

分担研究者:中村麻子(国立大学法人・茨城大学・理学部・准教授)

#### 研究要旨

原爆被爆者に代表される高線量放射線に被曝した集団では、放射線被曝が循環器疾患の発症リスクの上昇と相関すると報告されている。我々は循環器疾患のリスクが被曝線量に相関して上昇するか否かを動物実験にて調べている。本研究では、低線量・低線量率放射線被曝と循環器疾患の関係およびその機序の解明に主眼を置く。モデル動物として、放射線のような外的要因が循環器疾患におよぼす影響を見る際に広く使われている、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用いる。先行実験では、0.1Gy 照射群においても非照射群に比べて脳卒中症状の発症時期の早期化が見られた。このように、本実験系では極めて高感度で放射線の循環器疾患への影響を調べることが可能である。そこで、0.05Gy の放射線を一括照射した SHRSP ラットを用いて発症時期の変化を調べる実験を行っているところである。更に、血液や臓器切片などを解析し放射線の作用機序を解明するとともに、高感度で低線量の影響を検出できるマーカーを同定する計画である。これに先立ち、その際の用いる技法であるメタボローム解析、サイトカイン測定、DNA 損傷検出などについて、その測定条件を決定するための予備実験を、先行研究で得た試料で行い、良好な結果を得た。平成28年度期末から、本格的解析を開始したところである。これらを利用して、より低線量・低線量率放射線の影響を検討する。更に、リスクの低減化法も考案する。

キーワード;動物モデル、循環器疾患リスク、放射線影響、放射線被曝、低線量・低線量率放射線

研究協力者;津山尚宏(公立大学法人・福島医科大学・准教授),大石 和佳(公益財団法人・放射線影響研究所・部長),三角 宗近(公益財団法人・放射線影響研究所・研究員),村上 秀子(公益財団法人・放射線影響研究所 来所研究員)、水野初(静岡県立大学・助教)

#### I. 研究目的

放射線被曝が循環器疾患と関係することは、放射線影響研究所(放影研)で実施されている、原爆被爆者集団などの疫学データから得られている。<sup>1,2,3</sup> しかし、核関連施設の作業者などから得た低線量域での結果には矛盾も含まれる。<sup>4,5,6,7</sup> 更に、被爆等の精神的ストレスでも循環

器疾患のリスクは上がるなど、交絡因子の存在が問題を複雑にしている。そのため、ICRP<sup>8</sup> などの機関は、動物実験により得られる低線量被曝と循環器疾患リスクの相関についての知見を求めている。本研究では、この事象を動物実験で検証する。更に、放射線により循環器疾患がいかなる機序で生じるかを新しい方法を導入して検証する。その過程で得られた新規マーカーを用い、より低線量域・低線量率の放射線と循環器疾患の相関を明らかにする。得られた機序から循環器疾患リスクを低減化する方法論を得る。

#### II. 研究方法

本研究で使用する SHRSP を用いた先行実験(0、0.1、0.25、0.5、0.75、1Gy 照射)で、脳卒中発症時期を調べたところ、0.1Gy 照射群でも発症時期の有意な早期化が認められた。0.05Gy の放射線被曝と、脳卒中発症時期の相関は、先行実験で確立した方法を用いて次のように行う。4週齢のオスラットを疾患モデル研究センターより購入する。γ線照射はガンマセルを用い行い、血圧測定はテイルカフ法により週一回測定する。これらは広島大学・原爆放射線医科学研究所にて行う。死亡した個体を剖検し、得た試料の主要臓器に関しての病理診断を環境科学技術研究所にて行うことにより、主な死因の推定および臓器障害の重篤度の観察を行う。

種々の測定に用いる実験条件を確立するために、予備実験を行う。その方法は下記の通りである。

血液バイオマーカー(LDL、IL-6、TNF-α、CRP など)の測定は、先行実験で得た SHR の血清を用いる。バイオラド社の測定キット(24 プレックス)を用い、同社の推奨するプロコールに従い行う。

▶ メタボローム解析は液体クロマトグラフィー- 質量分析計(LC-MS)を用い行う。

図1は方法論の概説を示している。予備実験では、先行実験で得た SHR の血清および血漿試料を用いる。まず、試料をメタノールにより除タンパクした後、液体クロマトグラフィーによる分離、続いて質量分析計による分析を行う。得られた定量値をまず多変量解析を行い、分析自身の良否および各ピークの大体の傾向を観察する。続いて、各ピークの値を線量群ごとに平均して、その変化の線量依存性を見る。 t-検定により、線量依存的に有意に変化しているピークを選択する。既存のデータベースより、そのピークに含まれる化合物名およびその構造を推定する。推定された化合物を購入して、線量に伴い量比が変わっているものを、MS-MS法により最終確認する。

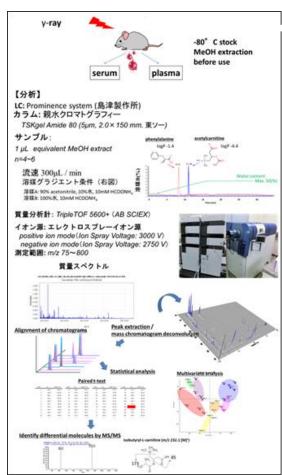


図 1

● DNA 損傷、老化レベル、炎症反応の解析の方法は次に示す。この実験は分担研究である中村 麻子が茨城大学にて行う。

主任研究者より冷凍宅配便にて送付された OCT コンパウンド包埋凍結臓器サンプルについて、薄切組織切片を作製する。作製された薄切組織切片は DNA 二本鎖切断のマーカーである  $\gamma$ H2AX の免疫染色および細胞老化の指標である SA- $\beta$ -gal 染色を行い、組織レベルでの応答反応の評価を行う。 DNA 損傷の発生は放射線照射後比較的初期段階で起こる一方で、細胞老化反応は放射線照射後、時間経過とともに活性化されていくなど、組織応答活性時期が異なるため、平成 28 年度度は放射線照射後、長期間経過したサンプルとして、照射 10 週間後、20 週間後のサンプルについて検討する。さらに先行実験で SHR(0, 0.5, 1, 2Gy 照射)より得られた血清サンプルを用いた炎症性サイトカインの測定はエライザ法を用いる。炎症性サイトカインのエライザ法を用いた測定実験を実施する際のサンプル量や、送付条件などについて適当であるかの検討を行う。

● 統計解析は次のようにして行う。

放射線量と発症時期、バイオマーカー、組織形態学的変化といった指標との関連を統計的に解析する。例えば、バイオマーカー値の線形回帰モデルにより、線量の違いがその値にどのように影響するのかを明らかにする。循環器疾患への放射線の影響を調べるため、異なる線量区分間の Kaplan-Meier 曲線の推定値を比較する。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、ヒトを研究対象として行うものではない。動物実験に関しては、広島大学動物実験指針を遵守するとともに、「動物の愛護及び管理に関する法律」並びに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に則って計画を作成し、広島大学動物実験委員会より承認を受けて行っている。実施する動物実験等は通常の実験範囲のものであり、特段、倫理的に問題のあるものとは思われない。

#### III. 研究結果

#### ● 低線量放射線の影響

先行研究で、0.1Gy 照射したラットに於いて、ラットが脳卒中症状を示す時期が非照射対照群に比べて早期化している兆候が認められた。そこで、この結果をラットの匹数を増やして検証したところ、有意に早期化していた。この結果を基に、0.05Gy を一回照射したラットを用いた研究を開始した。照射群 60 匹、対照群 60 匹を対象とした実験を現在継続中である。尚、使用するラットの匹数は 0.1Gy の結果に基づき行った解析決定力検定により決定した。

 ● 血液バイオマーカー(サイトカインなど)の測定条件の決定 1 および 2Gy を照射した群(各 10 匹)および対照群として非照射群(10 匹)から得た試料を用い、 条件を決定するための実験を行った。尚、使用した血液は照射後 1 週間目に得たものである。 測定には、血清を用いる方が血漿を用いるより、高いシグナルを得ることができた。従って高い感度で各サイトカインの発現量の測定ができることが判った。結果の一例を下に示す。(図 2)

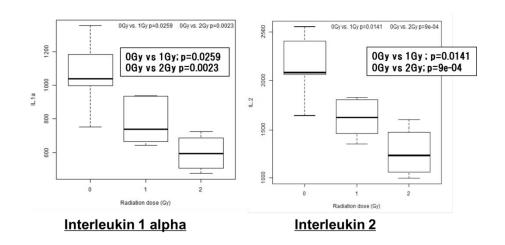
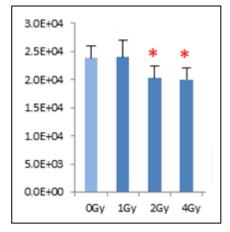


図 2

このように、我々の系を用いると照射線量に伴う変化が高感度で検出できることが判明したので、現在、この条件で照射後 10 週目、20 週目、30 週目に得た血清を用いて、照射後の期間が、その値にどのような変化をもたらすかを検証している。照射後 1 週目のラットより採取した血清では、多くの種類のサイトカインにおいて、線量の増加にともない、その量は減少していた。照射後の期間が長くなった場合に、各々のサイトカイン発現量が照射後の期間に伴ってどのように変遷するかは、興味のあるところである。

#### ● メタボローム解析の条件決定

LC-MS の解析結果は、今回用いた実験条件が本格研究で使用可能なレベルであることを示した。また、種々の化合物で線量に伴う増減が観察されたことは、この方法は放射線がどのような機序で循環器疾患のリスク上昇をもたらすかを検討するのに有効な情報を与えてくれる可能性を有していることを示している。条件検討に使用された試料は、放射線照射後30週目のSHRから得られたと言う極めて限定的なものではあるが、得られた結果の1例を示す。図3はタウリンに認められた



ものである。この結果が示すように、タウリン量は高線量群

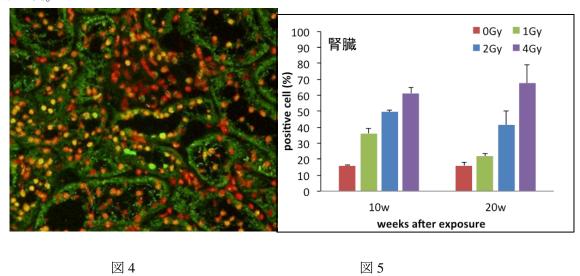
図 3

(2 および 4Gy)において有意に減少している。タウリンには「からだ、細胞を正常状態で保つ作用 (ホメオスタシス)」があることが知られている。たとえば、血圧上昇に対する下降作用などがこれに該当する。

#### ● DNA 損傷、老化レベルの解析の最適条件確定

OCT コンパウンド包埋凍結臓器サンプルについて、薄切組織切片の作製を行い、送付条件、コンパウンド包埋条件、切片の厚さなど、最適な条件を確定した。作製された薄切組織切片における  $\gamma$ H2AX の免疫染色では、照射後 10 週および 20 週の腎臓、照射後 10 週の心臓、そして照射後 20 週の大動脈で  $\gamma$ -H2AX の陽性反応が確認された(図 4)とくに腎臓では線量依存的な DNA 損傷レベルが認められた(図 5)。フィッシャーの正確検定による有意差検定の結果、すべての照射群が非照射群に対して有意に  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の割合が高かった。SA- $\beta$ -gal 染色を行なった結果、いずれのサンプリング時期においても全ての臓器で陽性反応は認められな

かった。



また、ELISA解析を行うために十分量の血清サンプルが問題なく主任研究者より送付されたので、今後 CCL2 の ELISA解析を行う予定である。

# IV. 考察

# ■ 低線量放射線の影響

低線量域の結果を得るためには、多数の実験動物を用いる必要があるため、最終結果は得られていない。0.05Gy 照射したラットで 0.1Gy と同様に放射線にともなう影響が認められるか否かは、今後の興味ある課題である。平成 29 度の早い時期に結論が得られる予定である。もしも影響が観察された場合は、更に低い線量の放射線を照射したラットで実験を実施する必要が出てくる。もし有意な影響が認められない場合は、放射線と相関した循環器疾患には、ある線量以下では影響が認められない、即ち『しきい値』の存在が想定される。

# ■ 血液バイオマーカー(サイトカインなど)の測定条件の決定

この実験条件検討の過程で、我々の用いた系では、血清試料の方が血漿試料に比べ高いシグナルが検出されるために、より良い結果を得られることが判明した。そこで、今後の実験では血清を用いることとした。この方法では、通常使用したプレートのロット間差、同じロットのプレートでもプレート間差が生じるために多検体(一枚のプレートに載るサンプル数以上)から得られた結果を比較することは困難であると考えられていた。我々は、同一ロットのプレートを多数購入するとともに、多数個体から採取し、プルーした後分注し、冷凍保存した血清試料を内部標準として用い、その値でプレート間の誤差を補正すると言う工夫により、この方法の持つ弱点を克服できた。今後は、異なる時期(照射後)に得た多数の試料のサイトカインを測定し、その変遷を見ることにより、放射線被曝がどのような機序で循環器疾患と相関するかを解明するための重要な示唆が得られるものと期待している。

#### ■ メタボローム解析の条件決定

LC-MS 法を用いたメタボローム解析条件を検討し、我々の目的に適合した実験条件を確立した。前述した、高線量群における、タウリンの血中濃度の減少は、放射線被曝と循環器疾患の相関に関係する機序を考える際に興味深いものである。即ち、タウリンは循環器疾患発症

に寄与していることは良く知られている。前述の『血圧上昇に対する下降作用』などに加えて、タウリンの生合成系を持たないネコがタウリンの欠乏を起こすと拡張型心筋症を起こすなど、循環器疾患発症の機序に係っている。このように、代謝産物(メタボライト)が循環器疾患を含め、種々の疾患の発症の原因となっていることは、最近の解析技術の発展と呼応して良く知られるようになった。

# ■ DNA 損傷、老化レベルの解析の最適条件確定

薄切組織切片における  $\gamma$  H2AX の免疫染色では、放射線による直接的な DNA 損傷はほぼ修復されていると考えられる照射後 10 週および 20 週の臓器で  $\gamma$  -H2AX の陽性反応が確認された。このことから、放射線照射による二次的な DNA 損傷応答が複数の臓器で誘導されていることが示唆された。とくに腎臓では線量依存的な  $\gamma$  H2AX が尿細管単位で検出されたことから、水の再吸収をはじめとした腎機能障害の可能性が示唆された。今回検出された二次的な DNA 損傷の誘発が循環器疾患を誘引する原因であるかはいまだ不明であるが、放射線によって誘導される晩発影響として非常に興味深い知見といえる。今回、細胞老化の指標である SA- $\beta$ -gal はいずれの臓器においても検出されなかった。SA- $\beta$ -gal 染色はその感度が比較的低いため、細胞老化応答が放射線によって誘導されているかどうかについては、老化関連サイトカインの検討など、より詳細な解析が必要だと思われる。

# V. 結論

この実験計画で用いているモデル動物は、我々の先行実験でも示されている通り、極めて高感度で放射線と循環器疾患の発症リスクとの関係を観察することができる。そこでこの系を用いて低線量・低線量率放射線の影響を調査すること、更に、得られた表現型(症状など)を基にその発生機序を考案することは、大変有意義であると考えられる。現在までの研究で有意な影響が観察されたのは 0.1Gy 以上である。この線量自体は福島第一原子力発電所事故で一般住民が被曝したと推定されている線量に比べて相当に高いものである。今後、どの程度低い線量まで影響が認められるかは興味深いところである。一方、本研究で使用したモデル動物は高血圧、脳卒中を発症するモデルであり、この成果が直ちに、ヒトにおける放射線による循環器疾患のリスク上昇に結び付くものではないことを指摘しておきたい。しかし、その過程で『放射線がいかなる機序で循環器疾患のリスクを上げているか?』などの情報が得られれば、それを基にリスクを低減化する方法論のヒントが得られる可能性があるものと考えている。

#### VI. 次年度以降の計画

平成 28 年度の成果報告会における委員各位のご意見に基づき 29 年度には、①28 年度に開始した低線量(0.05Gy)一括照射した SHRSP ラットの脳卒中発症時期が非照射群に比べて早期化しているか否かの結論を得る。②照射後 1 週目、3 週目、5 週目で得た試料を用いて、バイオマーカー測定およびメタボローム解析を、また組織の病理検索、DNA 損傷、老化レベル、炎症反応などを観察する。この結果と先行研究において SHR ラットで同じ指標を調べた結果とを比較して、放射線がいかにして循環器疾患のリスクを上昇させるかの機序に関する仮設を構築する。一例として挙げるならば、SHRSPでは極めて低い線量で脳卒中の発症が認められたのに対して SHR では 4Gy 照射しても発症しない。この違いをもたらしている可能性のあ

る指標を見つけ、『いかにして放射線が循環器疾患のリスクの増加に相関するか』という機序に関する仮設を構築する。③並行して、低線量率放射線と循環器疾患リスクの上昇との相関を検討する。この結果より循環器疾患に対する線量率効果が初めて実験的に推定できる。平成 30 年度においては、29 年度に構築した機序に関する仮設を、種々の線量を照射した SHR および SHRSP を用いるとともに、照射後の期間を変えた実験を行い検証する。場合によっては動物の数を増やすことにより確認する。機序の解明により、放射線被曝を原因とする循環器疾患の発症率を低減することが可能と成るかもしれない。このように、低減方法を考える際には、機序の特定は不可欠と思われる。また、低線量率放射線に被曝したラットで循環器疾患の発症率が低いと言う結果が得られた場合、福島第一原子力発電所事故による放射線の健康影響に不安を持っている方、現存被曝状況下での健康不安を持っている方の不安を軽減するための一助となるかもしれない。

この研究に関する現在までの研究状況、業績なし

#### 引用文献

- 1. Shimizu Y, et al. Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950–2003. BMJ 340:b5349, 2010
- 2. Preston DL et. al. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. Radiat Res 160(4):381-407, 2003
- 3. Sasaki H et. al. The effects of aging and radiation exposure on blood pressure levels of atomic bomb survivors. J Clin Epidemiol 55:974-81, 2002
- 4. McGeoghegan D et.al. The non-cancer mortality experience of male workers at British Nuclear Fuels plc, 1946-2005. Int J Epidemiol 37(3):506-18, 2008
- 5. Ashmore JP et.al. First analysis of mortality and occupational radiation exposure based on the National Dose Registry of Canada. Am J Epidemiol 148(6):564-74, 1998
- 6. Muirhead CR et.al. Studies of occupational radiation exposure and health: experience from the UK National Registry for Radiation Workers. Radiat Biol Radioecol 48(2):212-7, 2008
- 7. Kreuzer M et.al. Motality from cardiovascular diseases in the German uranium miners cohort study, 1946-1998. Radiat Environ Biophys 45(3):159-66, 2006
- 8. Hendry JH. Threshold doses and circulatory diseases risks. Ann ICRP;44(1 Suppl):69-75, 2015.

Can low-dose radiation exposure increase the risk of circulatory diseases? How about low-dose rate radiation? Inferring potential mechanisms underlying the radiation associated circulatory diseases.

Norio Takahashi (Principal Investigator) \*1, Asako Nakamura (Contributory Investigator) \*2
\*1Radiation Effects Research Foundation (RERF), Hiroshima, \*2Faculty of Science Ibaraki University

*Keywords*: Model animal, Risk of circulatory disease, Radiation effects, Radiation exposure, Low dose-low dose rate radiation

#### **Abstract**

# [Introduction]

Previous epidemiological findings including the LSS and the AHS indicated that radiation may be associated with increased risk of circulatory diseases (CD). These issues received keen attention from the research scientists in the field of radiation protection, radiation biology and cardiology, as well as international organizations, such as UNSCEAR and IAEA. On the other hand, inconsistencies have been observed among various studies. Given the uncertainties, a study using irradiated model animals is being conducted to assess whether or not risk of CD is elevated with increasing radiation dose.

We have been assessing the issues as above, and obtaining information about biological mechanisms through the animal model studies. Irradiated stroke-prone spontaneous hypertensive rats (SHRSP), even at 0.1Gy, showed stroke symptom significantly earlier than unirradiated rats.

Based on the result, we started the study for the rats irradiated with 0.05Gy. On the other hand, in order to provide novel ways to seek possible mechanisms of CD, we tried to introduce analysis systems. We are currently conducting the preliminary studies for establishing the experimental conditions for those analyses and also evaluating the applicability and the feasibility of those systems employed for the future studies.

[Methods]

We assess the onset time of stroke symptom of the SHRSP rats irradiated with 0.05Gy. We are currently examining 60 irradiated SHRSP and 60 controls. A liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used for metabolome analyses. Immune staining of  $\gamma$ H2AX and SA- $\beta$ -gal stain were used for detecting the DNA-damaged cells and cell senescence, respectively.

#### [Results]

The onset time of symptoms related to stroke in SHRSP irradiated with 0.05Gy is examining, and the results could be obtained in early next financial year. Metabolome analyses demonstrated that the levels of some metabolites were altered with doses and those were closely related with cause of CD. DNA damages identified by  $\gamma$ H2AX staining were found around renal tubules, and the ratio of the number of damaged

cells to the whole cells was increasing with increasing doses.

# [Discussions]

Our animal model studies using SHRSP rats demonstrated that we expect to obtain somewhat clear evidence indicating radiation truly related to CD. As our previous studies demonstrated that the rat systems have high sensitivity for accessing the relation between radiation and CD, we are expanding our studies where we examine the rats irradiated with low dose and low dose rate radiation. The introduction of various assay systems may provide novel information to seek possible mechanisms of CD at lower-dose radiation exposure and long-tern effects after irradiation.

# DNA 損傷・修復に基づく放射線・化学物質影響の統合と 個人差の評価に関する研究

松本 義久(東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所)

# 研究要旨

放射線影響は一般的には単独で現れるわけではなく、環境や生活習慣に起因する内因・外因性の物質との複合曝露の結果として現れると考えられる。また、遺伝的要因による個人差も放射線の影響を大きく左右すると考えられる。本研究は、DNA 損傷の生成と修復に注目することにより、放射線影響と化学物質影響の統合、個人差の評価を行うことを目的として行った。方法としては、ヒト培養細胞を放射線(高線量率、低線量率)、化学物質(N-ethyl-n-nitrosourea (ENU)、ホルムアルデヒド)にそれぞれ単独および組合せで曝露後、(1)リン酸化ヒストン H2AX(γ-H2AX)等を指標として DNA 損傷の生成、修復過程を解析する。(2)損傷認識に関わるタンパク質リン酸化酵素 DNA-PK(DNA-dependent protein kinase)、ATM (Ataxia telangiectasia mutated)、ATR (ATM and Rad3-related)の応答を解析する。(3)細胞生存率および染色体異常、突然変異の頻度を計測する。平成 28 年度は、正常な DNA 修復機能を有するヒト細胞を用いて、DNA 損傷とその修復、細胞生存率、細胞死や突然変異の頻度等を指標として、放射線と化学物質の影響の量的等価関係、加算性を解析した。

キーワード: DNA 損傷、DNA 修復、タンパク質リン酸化、DNA-PK、ATM

#### I 研究目的

放射線影響は一般的には単独で現れる わけではなく、環境や生活習慣に起因す る内因・外因性の物質との複合曝露の結 果として現れると考えられる。また、遺 伝的要因による個人差も放射線の影響を 大きく左右すると考えられる。本研究は、 DNA損傷の生成と修復に注目することに より、放射線影響と化学物質影響の統合、 個人差の評価を行うことを目的とする。

放射線と化学物質の複合曝露影響の重要性は広く認識され、疫学研究、動物実験が行われているが、ほとんどは定量的解析結果の記述を主としており、放射線と化学物質の影響を統合するための原理

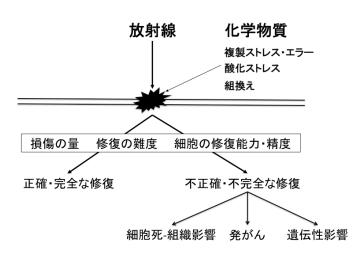


図 1 放射線および化学物質の影響と DNA 損傷の 関わり

の探索が目的ではない。本研究で目指す統合とは、共通の「横軸」をもって、放射線影響と化学物質影響を比較したり、その複合影響を評価したりすることである。これまでは、主に、放射線については線量、化学物質については濃度および処理時間を横軸の変数として、生物学的効果(たとえば、細胞生存率、突然変異頻度など)の比較や複合曝露影響の評価が行われてきた。しかしながら、長期連続曝露状況を考える場合においては、放射線については線量率、化学物質については濃度が横軸の変数として適切であると考えた。これらはいずれも時間あたりの DNA 損傷の生成量に比例すると考えられるからである。ただし、さまざまな DNA 損傷の種類やそれぞれの割合は、放射線と化学物質の間で、また、それぞれの種類によって異なると考えられる。培養細胞を用いた実験は生体内の環境や異種細胞との相互作用などを反映するものではないが、一方で、基本原理を明らかにする上では適していると考えられる。将来的には、時間あたりの DNA 損傷生成能を指標として、さまざまな種類の放射線、化学物質の換算係数を求めて、データベース化して行くことにより、放射線、化学物質影響を統一的に評価でき、複合曝露影響も個々の要素の加算として評価できるようになることが期待される。

放射線感受性の個人差もまた広く認識され、cDNA アレイによる遺伝子発現解析などが行われている。本研究は、リンパ球は一部の組織の DNA 修復特性、ゲノム安定性、ひいてはがんリスクを反映するものと捉えている。本研究では予算、期間の観点から約 40 種類の解析を計画しているが、理研細胞銀行には日本人由来の不死化リンパ球細胞 500 種類とさまざまな人種に由来する不死化リンパ球細胞 159 種類(園田・田島コレクション)が保有されていることから、本研究が契機となって、年齢や人種による違いなども含めたより大規模な研究に発展する可能性がある。

本研究では、ヒト培養細胞を放射線(高線量率、低線量率)、化学物質(ENU、ホルムアルデヒド) にそれぞれ単独および組合せで曝露後、 $(1)\gamma$ -H2AX 等を指標として DNA 損傷の生成、修復過程を解析する。(2)損傷認識に関わるタンパク質リン酸化酵素 DNA-PK、ATM、ATR の応答を解析する。(3)細胞生存率および染色体異常、突然変異の頻度を計測する。

まず、正常な DNA 修復機能を有するヒト線維芽細胞、リンパ球細胞を用いて、放射線と化学物質の影響の量的等価関係、加算性を明らかにする。次に、ヒト DNA 修復欠損細胞を用いて同様の

解析を行い、正常細胞で得られた結果と比較検討することにより、損傷の種類や修復の難度を明らかにする。さらに、理研細胞銀行から健常者あるいはがん患者由来のヒトリンパ球細胞を 40 種類程度入手し、上記と同様の解析を行うことにより、個人差、がん罹患性との関連を明らかにする。

平成 28 年度は、正常な DNA 修復機能を有するヒト細胞を用いた放射線と化学物質影響の量的 関係の解析を行った。

#### Ⅱ 研究方法

# 1)細胞

細胞は正常ヒト線維芽細胞 HF19、NB1RGB、1BR3 を使用した。このうち、HF19、NB1RGB は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンターから分与を受けた。また、1BR3 は英国・サセックス大学の Penny A. Jeggo 博士から頂いた。培地は、DMEM 液体培地(4.5 g/l グルコース、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム含有)を用い、牛胎児血清(FBS)を 20%容(HF19、1BR3 の場合)または 10%容(NB1RGB の場合)添加した。また、1%容のペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液(各 10,000 U/ml、10,000  $\mu$  g/ml)、1%の非必須アミノ酸溶液を添加した。培養は 37℃、5% CO2濃度、湿度 95%以上の条件で行った。継代の際には、ディッシュまたはフラスコから培地を除去した後、ハンクス平衡塩溶液で洗浄し、2.5 g/L-トリプシン/1 mM EDTA 溶液で 37℃、2~3 分処理し、培地で 15 ml 遠心管に回収した。これを適当な濃度に希釈して、新しいディッシュまたはフラスコに播種した。継代は 3~7 日に一度行った。FBS は HyClone 社から、それ以外の試薬はナカライテスク社から購入した。

#### 2) 抗体

ウェスタン・ブロッティング、蛍光免疫染色に用いた一次抗体およびその入手元は以下の通り である。Anti-DNA-PKcs: ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製 1); Anti-DNA-PKcs (Ab-4):マウスモノクローナル抗体、Neomarkers; Anti-Ku86:ウサギポリクローナル抗体、当研 究室にて作製 <sup>2)</sup>; Anti-Ku70:ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製 <sup>2)</sup>、Anti-XRCC4: ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製 $^3$ ; Anti-ATM (NB100-104): ウサギポリクローナ ル抗体、Novus Biochemicals; Anti-ATR (ab184137): ウサギポリクローナル抗体、Abcam; Anti-ATR (ab4471):マウスモノクローナル抗体、Abcam; Anti-Nbs1 (NB100-143):ウサギポリク ローナル抗体、Novus Biochemicals; Anti-Mre11 (NB100-142): ウサギポリクローナル抗体、Novus Biochemicals; Anti-p53 (DO-1):マウスモノクローナル抗体、Neomarkers; Anti-53BP1 (A300-272A): ウサギポリクローナル抗体、Bethyl Laboratories; Anti-RPA32 (ab2175): マウスモ ノクローナル抗体、Abcam; Anti-PCNA (sc-7907): ウサギポリクローナル抗体、Santa Cruz; Anti-phospho-XRCC4-S320 : ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製 4); Anti-phospho-XRCC4-S320(M):マウスモノクローナル抗体、本研究にて作製(下記); Anti-phospho-p53-S15 : ウサギポリクローナル抗体、当研究室にて作製 5); Anti-phospho-DNA-PKcs-S2056 (ab18192) : ウサギポリクローナル抗体、Abcam ; Anti-phospho-DNA-PKcs-T2609 (ab18356) : ウサギポリクローナル抗体、 Abcam ; Anti-phospho-ATM-S1981 (ab81292): ウサギポリクローナル抗体、Abcam; Anti-phospho-ATR-S428 (2853S): ウサギポリクローナル抗体、Cell Signaling; Anti-phospho-ATR-T1989 (GTX128145): ウ サギポリクローナル抗体、GeneTex; Anti-phospho-Histone H2A.X-S139 (JBW301):マウスモノク ローナル抗体、Millipore; Anti-phospho-KAP1-S824 (A300-767A): ウサギポリクローナル抗体、 Bethyl Laboratories; Anti-phospho-RPA-S4/S8 (A300-245A): ウサギポリクローナル抗体、Bethyl Laboratories; Anti-phospho-Nbs1-S343 (ab109453): ウサギポリクローナル抗体、Abcam; Anti-phospho-Chk1-S317 (NBP2-37703): ウサギポリクローナル抗体、Novus Biologicals。

ウェスタン・ブロット法においては、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グ

ロブリンブタポリクローナル抗体(P0399、Dako)、同抗マウス免疫グロブリンヤギポリクローナル 抗体(P0447、Dako)を用いた。また、蛍光免疫染色法においては、二次抗体として、Alexa Flour 488 標識抗ウサギ IgG(H+L)ヤギポリクローナル抗体(A-11034、Invitrogen)、Alexa Fluor594 標識抗マウスウサギ IgG(H+L)ヤギポリクローナル抗体(A-11032、Invitrogen)を用いた。

なお、Anti-phospho-XRCC4-S320(M)は、株式会社蛋白精製工業に委託して作製した。抗体作製手順の概略は以下の通りである。まず、抗原として、ヒト XRCC4 タンパク質の 314 番目から 326 番目と同じ配列 (Ile-Ser-Ala-Glu-Asn-Met-Ser-Leu-Glu-Thr-Leu-Arg-Asn)の C 末端にシステイン(Cys)を 1 個付加し、320 番目のセリン(Ser)をリン酸化したペプチドを合成した。合わせて、このセリンをリン酸化していないペプチドも合成した。続いて、リン酸化型のペプチドをキャリアータンパク質であるカラスガイヘモシアニンと共有結合させ、3 匹のマウスに接種した。抗体価を ELISA 法にてモニターし、上昇したところで、脾臓を採取し、ミエローマ細胞と融合し、HAT 培地による選択とクローン化を行った。各クローンが産生する抗体が分泌されていると考えられる培養上清を採取し、リン酸化型ペプチドおよび非リン酸化型ペプチドに対する反応性を ELISA 法にて測定し、差が大きいものを選択した。

#### 3) 放射線照射

高線量率での照射は、東京工業大学コバルト照射実験施設において行った。また、低線量率照射のために、東京工業大学放射線総合センター大岡山放射線実験施設に新たに放射線源を導入した。導入した線源は、 $^{60}$ Co 放射能標準  $\gamma$  線源 (日本アイソトープ協会、CO401CE、1 MBq、表示付認証機器)4 個である。この線源と細胞を大岡山放射線実験施設内の  $CO_2$ インキュベータ内に置いて培養を行った(図 2)。線源は 4 個を格子状に互いに接するように、棚板の中心に配置した。細胞は直径 10cm の培養皿に播種し、その上下の棚板に正六角形状に配置した。棚板の間隔は 9.3 cm である。 $^{60}$ Co の実効線量率定数は 0.305  $\mu$  Sv·h $^{-1}$ ・MBq $^{-1}$  であるから、線量率は平均(培養皿の中央)で 65  $\mu$  Sv/h、最大(培養皿のうち、最も中央に近い位置)で 109  $\mu$  Sv/h、最小(培養皿のうち、最も中央

# 4) 化学物質処理

本研究では、化学物質の代表として、ホルムアルデヒドと N-エチル-N-ニトロソ尿素(N-ethyl-n-nitrosourea、

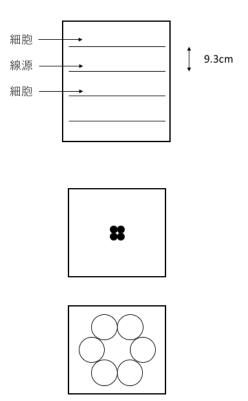


図 2 低線量率照射における線源 と細胞の配置

ENU)を用いた。ホルムアルデヒド(濃度 36-38%)はナカライテスク社から購入し、室温で保存した。 使用の際には、まず Ca, Mg 不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(以下、PBS)で希釈して 1 mol/L 溶液とし、さらに PBS で希釈して、培地 10 ml に対して  $10 \mu 1$  ml たると目的濃度となるようにした。 ENU は粉末状のものを Sigma-Aldrich 社から購入した。 これに PBS を適量加えて 10 mg/ml とし、-20 C で凍結状態にて保存した。 使用の際には、これを解凍して適宜希釈して、培地 10 ml に対し

て117 μ1加えると目的濃度となるようにした。

# 5) コロニー形成法による生存率測定

直径 10 cm の組織培養ディッシュに 300-500 個の細胞を播種し、放射線照射または化学物質処理を行った。2~3 週間培養した後、形成されたコロニーを数えた。具体的には、まず、培地を除去し、99.5%エタノールで固定した後、クリスタルバイオレットで染色した。50 個以上の細胞を含むコロニーの数を数え、以下の計算でプレーティング効率(P.E.)および生存率(S.F.)を求めた。

P.E. = (形成されたコロニーの数)/(播種した細胞の数)×100(%)、

S.F. = (放射線照射または化学物質処理を行った場合の P.E.)/(対照の P.E.)。

6) ウェスタン・ブロット法による DNA 損傷応答関連タンパク質の発現量および翻訳後修飾状態の解析

放射線照射または化学物質処理を行った細胞は、1)の継代の場合と同様に、回収した。次に、室温で 290 g、5 分の遠心を行った。上清を取り除いた後、沈殿している細胞を PBS に懸濁し、再び室温にて 290 g、5 分の遠心を行った。上清を取り除いた後、1 ml の PBS に懸濁し、1.5 ml チューブに移した。室温で 1,000 g、5 分の遠心を行い、上清を取り除き、試料とした。試料をすぐに用いない場合は、-85℃で保存した。

細胞 106個あたり 100 μl の抽出バッファ(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 にプロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤を添加したもの)に懸濁し、氷上に30分間静置 した。次に、4 $^{\circ}$ Cで 20,000 g、10 分間の遠心を行い、上清を採取し、細胞抽出液とした。この細胞 抽出液のタンパク質濃度を BCA Protein Assay Kit (TAKARA)を用いて測定し、濃度を揃えた後、等 量の 2XSDS-PAGE サンプルバッファを添加し、100℃で 10 分間加熱した。これを撹拌して均一に した後、SDS-PAGE 用のゲルにアプライした。なお、DNA-PKcs、ATM、ATR の発現量およびその 翻訳後修飾状態を解析する場合にはアクリルアミド濃度 6%の分離ゲルを、それ以外のタンパク質 の発現量およびその翻訳後修飾状態を解析する場合にはアクリルアミド濃度 10%の分離ゲルを用 いた。電気泳動終了後、ゲル内に分子量に従って分離されたタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon P、 Millipore 社製)に転写した。転写の際、DNA-PKcs、ATM、ATR の発現量およびその翻訳後修飾状 態を解析する場合には、SDS 含有転写バッファ(100 mM Tris、192 mM Glycine、5% Methanol、0.1% w/v SDS)を用いて、2 mA/cmの定電流で90分間の通電を行った。それ以外のタンパク質の発現量 およびその翻訳後修飾状態を解析する場合には、標準の転写バッファ(100 mM Tris、192 mM Glycine、5% Methanol) を用いて、2 mA/cmの定電流で 60 分間の通電を行った。ブロッキングは、 1%または2%のスキムミルクを含む Tween 20 含有 TBS (以下、TBST、20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、 150 mM NaCl、0.05% v/v Tween 20)を用いて、室温で 1~2 時間行った。 1 次抗体反応は、抗体を ブロッキングで用いた溶液に適当な濃度になるように加え、4℃で一晩行った。2 次抗体反応は、 同様に室温で 1~2 時間行った。抗体反応の検出には、ECL キット (Pierce 社製 Western Blotting Substrate Plus あるいは PerkinElmer 社製 Western Lightning) を用いて発光させ、光を X 線フィルム (GE Healthcare 社製 Hyperfilm MP) で検出した。

7) 蛍光免疫染色法による DNA 損傷応答関連タンパク質の局在およびその変化の解析 細胞はスライドガラス上に播種し、このスライドガラスを直径 10cm の培養皿に入れ、1) と同 様の培地中で培養し、放射線照射または化学物質処理を行った。染色にあたっては、まず、スライドグラスをコプリンジャーに入れて、PBSで2回洗浄後、4%パラホルムアルデヒドを含む PBSに10分浸漬し、細胞を固定した。次に、PBSで2回洗浄後、0.5% Triton X-100を含む PBSに10分浸漬し、細胞膜に穿孔した。続いて、PBSで2回洗浄後、1%牛血清アルブミンを含む PBS(以下、1% BSA-PBS)に30分~1時間浸漬し、ブロッキングを行った。次に、スライドを湿潤箱に置き、1% BSA-PBSで適当な濃度に希釈した一次抗体と室温で1時間反応させた。0.05% Tween 20を含む PBS(以下、PBST)で5分間、3回の洗浄後、1% BSA-PBSで適当な濃度に希釈した二次抗体と湿潤箱中で室温で1時間反応させた。PBSTで5分間、5回の洗浄後、4\*,6\*-diamidino-2-phenylindole diydrochloride (DAPI)を1/100容添加したFluorescent Mounting Medium (S3023、Dako)を滴下し、カバーガラスで封入した。蛍光顕微鏡観察は倒立型蛍光顕微鏡 IX71(オリンパス)を用いて行った。

# (倫理面への配慮)

放射線源の導入や取扱いは放射線障害防止法および関連法令を遵守して行った。CRISPR/Cas9システムを用いたDNA二重鎖切断修復遺伝子欠損細胞作製については研究開始時点で本学にて承認が得られており、ガイドラインを遵守して行った。

#### Ⅲ 研究結果

#### 1) XRCC4 Ser320 リン酸化状態に対するマウスモノクローナル抗体の作製

ELISA 試験により、3匹のマウスのいずれにおいても抗体値の上昇が認められた(図3)。抗体値は1番目と3番目のマウスにおいて、2番目のマウスより高かった。そこで、まず1番目、次に3番目のマウスを用いて、脾臓細胞の採取、ミエローマ細胞との融合を行うこととした。

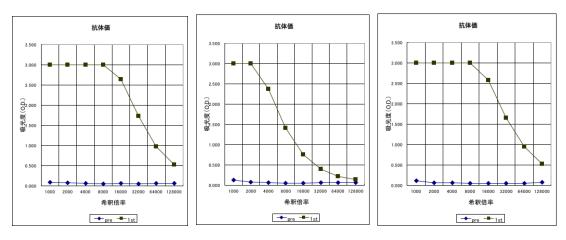


図3 XRCC4 Ser320 リン酸化状態特異的抗体作製マウス血清の免疫開始後第1回採血時の抗体価左:マウス1、中:マウス2、右:マウス3。

マウス 1 からは XRCC4 Ser320 リン酸化型ペプチドに対して高い反応性を示し、非リン酸化型ペプチドに対する反応性が低い抗体を産生するクローンとして、2A、2B の 2 つのクローンを得ることができたことが ELISA 試験によって確認された(図 4)。ただし、陽性コントロールとして用いたウサギポリクローナル抗体に比べると、抗体濃度は  $10\sim100$  倍くらい低いと考えられた。 さらに、同様にしてマウス 2 から 18A、18B の 2 つのクローンが得られた。

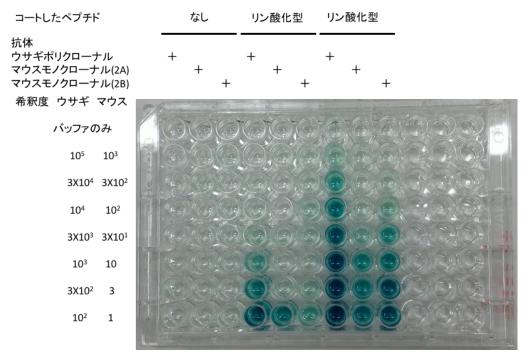


図4 抗体産生クローンの培養上清の ELISA 試験

# 2) 放射線および化学物質が細胞の増殖能力、生存率に与える影響の解析

ホルムアルデヒドについては、1BR3 細胞を 1 mM の濃度で 24 時間処理を行った場合、顕著な細胞形態変化 (萎縮) が見られた (図 5 )。0.1 mM の濃度ではこの変化は視認できなかった。また、 ENU の場合、1 mM までの処理でこのような変化は視認できなかった。

これを踏まえ、低線量率放射線との複合曝露実験においては、ホルムアルデヒド濃度および ENU 濃度を単独の影響が出ない濃度、すなわちそれぞれ 0.1~mM、1~mM とした。 1BR3 細胞および NB1RGB 細胞を低線量率放射線場( $39-109~\mu$  Sv/h)中、ホルムアルデヒドあるいは ENU 存在、非存在下で  $1\sim6$  日培養後、コールターカウンターを用いた計数、位相差顕微鏡観察を行ったところ、いずれも非処理群(低線量率照射も薬剤処理も行わなかった群)との違いは認められなかった。

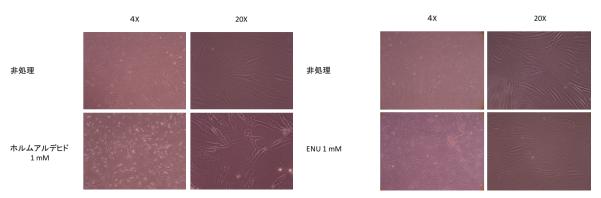


図 5 ホルムアルデヒドあるいは ENU 処理を行った 1BR3 細胞の位相差顕微鏡像

# 3) 放射線および化学物質によって生じる DNA 損傷とその修復、細胞応答の解析

まず、低線量率放射線場(39-109  $\mu$  Sv/h)中、ホルムアルデヒドあるいは ENU 存在、非存在下で 6 日培養後、ウェスタン・ブロット法により、種々の DNA 損傷応答・修復関連タンパク質の発現量や翻訳後修飾状態を解析した。 DNA 二重鎖切断の非相同末端結合修復に関わる DNA-PKcs、Ku86、Ku70、XRCC4 の発現量に変化は見られなかった(図 6)。また、DNA-PKcs による DNA-PKcs 自身の Ser2056 のリン酸化、XRCC4 の Ser320 のリン酸化はいずれの群においても検出されなかった。これらのリン酸化は 2-5 Gy 以上の照射後、30 分~1 時間後では検出されている。 DNA 二重鎖切断の相同組換えによる修復および細胞周期チェックポイントに関わる ATM、Nbs1 についても発現量に変化は見られなかった(図 6)。また、ATM による ATM 自身の Ser1981 のリン酸化、Nbs1 の Ser343 のリン酸化はいずれの群においても検出されなかった。 さらに、細胞周期チェックポイントおよびアポトーシスを制御する転写因子であり、放射線などによる DNA 損傷に応答して蓄積する p53 についても、その量に変化は認められなかった(図 6)。その他、DNA-PK、ATM による RPA Ser4 および Ser8 のリン酸化もいずれの群においても検出されなかった。

上記の中で、p53 以外のタンパク質の発現量が変化しなかったのは、これまでの当研究室での検討や他グループの報告の多くと一致している。一方、DNA-PKcs、XRCC4、ATM、Nbs1、RPAの上記部位におけるリン酸化や p53 の蓄積は 1 Gy 以上の放射線照射後に検出されているが、本条件では検出されなかった。DNA 損傷の総量が少ないために、これらの分子応答が視認できるまでには至らなかったこと、あるいは、時間あたりの生成量が少なく、その都度修復が行われ、蓄積に至らなかったことなどが考えられる。

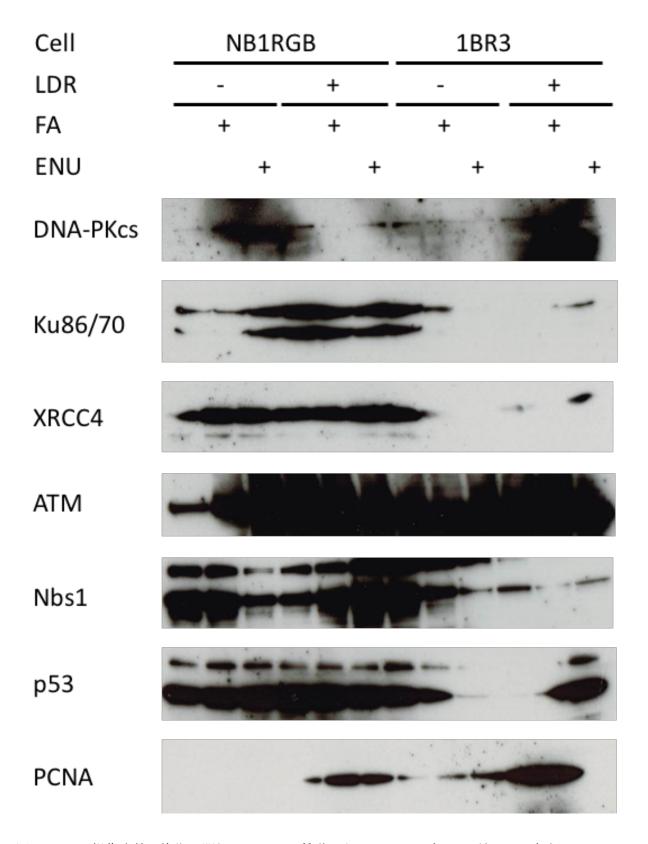


図 6 DNA 損傷応答・修復に関わるタンパク質群のウェスタン・ブロット法による解析 LDR は 低線量率放射線照射(39-109  $\mu$  Sv/h)、FA はホルムアルデヒド(0.1 mM)処理、ENU は N-エチル -N-ニトロソ尿素(1 mM)処理を 6 日間行った。

次に、1BR 細胞について、3日間の低線量率放射線照射(39-109  $\mu$  Sv/h)、ホルムアルデヒド処理(0.1 mM)、ENU 処理(1 mM)後、あるいは高線量率での 5 Gy、10 Gy 照射の 30 分後に固定し、 $\gamma$ -H2AX と53BP1の蛍光免疫染色を行った。未処理の場合には、 $\gamma$ -H2AX の染色はほとんど見られず、53BP1 は核全体に薄く広がった像が観察された(図 7)。5 Gy、10 Gy 照射後は、 $\gamma$ -H2AX と53BP1の蛍光量が増加し、フォーカス(点状の集積)が認められた。5 Gy 照射に比べ、10 Gy 照射の場合にフォーカスは顕著であった。低線量率照射の場合、 $\gamma$ -H2AX、53BP1のいずれも未処理の場合と違いが見られなかった。ホルムアルデヒド処理、ENU 処理の場合には、5 Gy、10 Gy 照射の場合ほど顕著ではないが、未処理の場合と比べて、 $\gamma$ -H2AX、53BP1の蛍光量の増加とフォーカス形成が認められた。 $\gamma$ -H2AX、53BP1のフォーカス形成は DNA 二重鎖切断によって誘導され、その修復が完了すると消失するとされている。このことから、本実験の連続的な薬剤曝露状況において、DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断が少量ながら常に存在すると考えられた。また、本実験での連続的な低線量率放射線照射状況で存在する DNA 二重鎖切断はこれより少ないと考えられた。

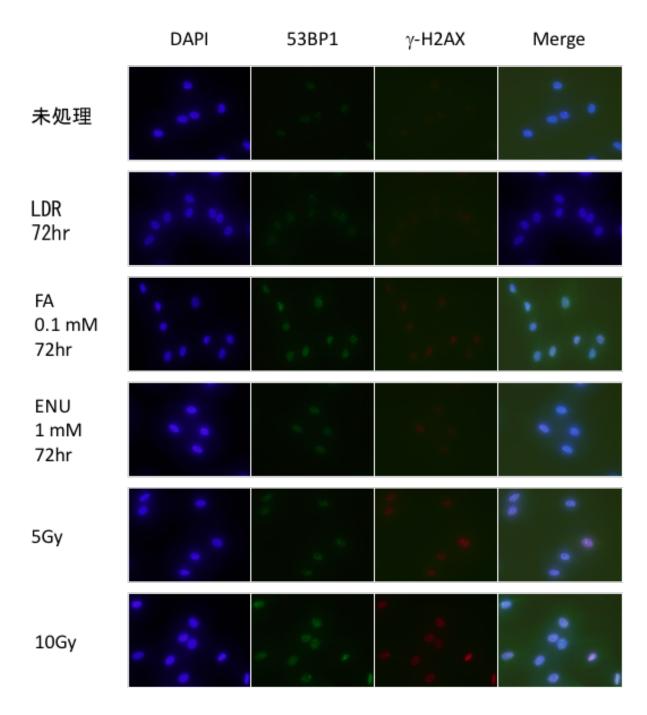


図 7 1BR3 での  $\gamma$  -H2AX、53BP1 局在の蛍光免疫染色法による解析 LDR は低線量率放射線照射 (39-109  $\mu$  Sv/h)、FA はホルムアルデヒド (0.1 mM) 処理、ENU は N-エチル-N-ニトロソ尿素(1 mM)処理を 3 日間行った。また、5 Gy、10 Gy 照射 30 分後に細胞を固定した。

#### IV 考察

正常ヒト線維芽細胞について、低線量率放射線照射(39-109  $\mu$  Sv/h)、ホルムアルデヒド処理(0.1 mM)、ENU 処理(1 mM)を 1~6 日行い、細胞生存、増殖、DNA 損傷、修復タンパク質の応答などを解析した。低線量率放射線照射(39-109  $\mu$  Sv/h)の場合、いずれも未処理の場合と違いが認められなかった。ホルムアルデヒド、ENU 処理については、細胞生存、増殖は未処理の場合と違いが認められず、また、ウェスタン・ブロット法では DNA 損傷応答・修復関連タンパク質の発現量や翻訳後修飾状態の変化は認められなかったが、 $\gamma$ -H2AX、53BP1 のフォーカス形成が認められた。

本研究の低線量率放射線照射の線量率は、これまでの研究で最もよく用いられてきた 1 Gy/min 程度の線量率と比べ 100 万倍程度の違いがある。この間のどこかに、今回用いたホルムアルデヒド (0.1 mM)、ENU (1 mM) と同等の作用を示す線量率があると考えられる。他の国内外の低線量率照射設備での線量率はこの中間である。たとえば、京都大学放射線生物研究センターでは 1 mGy/min 程度の照射が可能である。そこで、同センターの小林純也准教授と基礎的検討と討議を行った。この線量率で 1~2 日の照射を行った場合、総線量はそれぞれ 1.5 Gy、3 Gy になるが、正常な DNA 修復機能を有する細胞では生存率がわずかしか低下しないのに対し、非相同末端結合修復に異常を持つ細胞では顕著な生存率低下が認められることが分かった。この線量率域で薬剤処理影響と比較するのは一つの方向であるが、次年度計画している DNA 修復欠損細胞を用いることにより、今回見られなかった低線量率放射線照射の影響が見られる可能性も考えられた。

#### V 結論

正常ヒト線維芽細胞を低線量率放射線場(39-109  $\mu$  Sv/h)中に置いた場合、細胞生存、増殖、DNA 損傷、修復タンパク質の応答などの変化は認められなかった。一方で、 $0.1\,\mathrm{mM}$  ホルムアルデヒドあるいは  $1\,\mathrm{mM}$  N-エチル-N-ニトロソ尿素存在下に置いた場合には DNA 損傷修復タンパク質の応答が見られたことから、上記の線量率の放射線の影響は、上記の濃度のホルムアルデヒドおよび N-エチル-N-ニトロソ尿素の影響より小さいと考えられた。

# VI 次年度以降の計画

本年度の結果を踏まえ、平成 29 年度は、ヒト DNA 修復欠損細胞に対する放射線・化学物質の単独及び複合曝露影響の解析を行う。細胞としては、現在作製中の XRCC4 をはじめとする数種類の遺伝子の DNA 二重鎖切断修復欠損細胞(CRISPR/Cas9 法による)や、既に入手している DNA 二重鎖切断修復遺伝子欠損患者細胞(DNA-PKcs、XRCC4、XLF、NBS1、ATM 等)を用い、本年度と同様の解析を行う。結果を比較検討することにより、放射線と化学物質によって生じる損傷の修復の経路や難度を明らかにする。

さらに、平成 29 年度から 30 年度にかけて、ヒトリンパ球パネルに対する放射線・化学物質の単独及び複合曝露影響の解析を行う。平成 29 年度には、理化学研究所バイオリソースセンターの日本人由来不死化細胞株(EBV でトランスフォームしたリンパ球細胞)コレクション 500 種類の中から、健常人由来のもの、がん患者(乳がん、子宮頸がん)由来のもの約 20 種類ずつ、計約 40 種類を入手する。平成 30 年度に行う解析に備え、ウェスタン・ブロッティングなどにより、DNA 修復タンパク質群の発現量、分子量等を調べる。平成 30 年度には、これらの細胞を用いて、本年度と同様の解析を行い、健常人間での個人差や、健常人とがん患者間での違いなどを検討する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績 現時点では、論文、学会発表などはなし。

# 引用文献

- 1) Matsumoto Y, Suzuki N, Namba N, Umeda N, Ma X-J, Morita A, Tomita M, Enomoto A, Serizawa S, Hirano K, Sakai K, Yasuda H, Hosoi Y. Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett*. 2000; **478**: 67-71.
- 2) Sakata K, Matsumoto Y, Tauchi H, Satoh M, Oouchi A, Nagakura H, Koito K, Hosoi Y, Suzuki N, Komatsu K, Hareyama M. Expression of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in normal and tumor tissues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001; 49: 161-167.
- 3) Kamdar RP, Matsumoto Y. Radiation-induced XRCC4 Association with Chromatin DNA Analyzed by Biochemical Fractionation. *J.Radiat.Res.* 2010; **51**: 303-313.
- 4) Sharma MK, Imamichi S, Fukuchi M, Samarth RM, Tomita M, Matsumoto Y. *In cellulo* phosphorylation of XRCC4 Ser320 by DNA-PK induced by DNA damage. *J. Radiat. Res.* 2016; **57**: 115-120.
- 5) Komiyama S, Taniguchi S, Matsumoto Y, Tsunoda E, Ohto T, Suzuki Y, Yin H-L, Tomita M, Enomoto A, Morita A, Suzuki T, Ohtomo K, Hosoi Y, Suzuki N. Potentiality of DNA-dependent protein kinase to phosphorylate Ser46 of human p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; **323**: 816-822.

Unification of effects of radiation and chemical substance and evaluation of personal variance in sensitivity

Yoshihisa Matsumoto

Laboratory for Advanced Nuclear Energy, Institute of Innovative Research,

Tokyo Institute of Technology

Keywords: DNA damage; DNA repair; protein phosphorylation; DNA-PK; ATM; ATR

Abstract

Effects of radiation, in general, appears not by itself but as the consequence of combined exposure to

endogenous and exogenous substances arising from environment and life style. In addition, personal

variance in genetic factors is thought to modify the effects of radiation considerably. This study aimed to

develop a method to unify the effects of radiation and chemical substance and evaluate the variance in

sensitivity among individuals, based on the induction and repair of DNA damages. Cultured human cells

were exposed to radiation of high dose rate and low dose rate and/or chemical substances, i.e., ENU and

formaldehyde. The kinetics of induction and repair of DNA damage was analyzed by using γ-H2AX as the

indicator. Responses of the protein kinases involved in the recognition of DNA damage, i.e., DNA-PK,

ATM and ATR are analyzed by western blotting, monitoring the phosphorylation status of themselves and

their substrates, such as XRCC4, Nbs1 and Chk1. Cellular sensitivity to radiation and chemical substance

in terms of cell survival/death and mutation were also evaluated. In FY2016, cultured human cells with

normal DNA repair capability were examined for DNA damage, cell viability, cell death and mutation to

find the quantitative relationship between radiation and chemical substance.

190