

# 子ども被ばくによる発がんリスクの低減化とその機構に関する研究

(受託者) 国立大学法人茨城大学

(研究代表者) 立花 章 理学部

(再委託先) 国立研究開発法人放射線医学総合研究所、国立大学法人長崎大学、

国立大学法人弘前大学

(研究期間) 平成 25 年度～27 年度

## 1. 研究の背景とねらい

子どもの時期における放射線被ばくによる発がんリスクは、成人期での放射線被ばくによる発がんリスクよりも高いと考えられており、東京電力福島原発事故以後、社会的関心が高いことがらである。このように、子ども期の放射線被ばくによる生体影響は学術的・社会的に極めて重要な課題であるが、子ども期の被ばく影響を科学的に評価するための基礎となるデータが不足しているのが現状である。ことに、子ども期の被ばくと成体期の被ばくとでの生体影響の違いの有無や、放射線被ばく後の細胞や組織における生体応答と発がんとの関連は明らかでない。さらに、子ども被ばく後の発がんリスク低減の可能性についてはほとんど情報がないのが現状である。

本研究課題では、子ども被ばくのリスク評価に資することを目的として、子ども期に被ばくしたマウスの細胞及び組織における種々の生体応答反応を解析して、子ども被ばくによる生物影響の特徴を明らかにすることを目指している。特に、放射線医学総合研究所において行われた研究により、子どもの時期に被ばくしたマウスに対し、成体期に達してからカロリーを制限した餌を与えると、発がん頻度が抑制されることが明らかになった<sup>(1)</sup>。このことは子ども期の被ばくリスクを低減化する方策を考える上で非常に重要な知見であるが、その機構は明らかではない。そこで、本研究課題では子ども被ばくの後、成体期にカロリー制限を行ったマウスの臓器サンプルを用いて細胞レベルや組織レベルの生体応答を解析するとともに、子ども被ばくにより誘発したがんのゲノム解析を行って、子ども被ばくによる細胞・組織応答と発がんとの関連、ならびにカロリー制限による発がん抑制効果の有効性を多面的に検証することを目指している。

具体的には、以下の点について解析を行う。

### (1) 子ども被ばくを受けたマウスの細胞・組織レベルの応答解析

放射線を被ばくした細胞或いは組織では、多数の生体応答過程を経て、最終的に発がんに至ると考えられている。子ども被ばくマウスにおける、これら生体応答について詳細に解析することにより、成体期被ばくとの相違および発がんとの関連を検討する。

### (2) 子ども被ばく誘発がんのゲノム解析

子ども被ばくによって誘発されたがんのゲノム変化を、DNA レベルおよび染色体レベルで解析することにより、子ども被ばく誘発がんの特異的なゲノム変異や遺伝子発現の特徴を明らかにする。

### (3) 細胞・組織応答およびゲノム変異に対するカロリー制限の効果

カロリー制限を行った後の、細胞・組織応答、あるいは突然変異や染色体異常などのゲノム変異を検討し、発がんまでの過程においてカロリー制限によりどのような違いが生じるかを明らかにする。

これらの解析により、カロリー制限による発がん抑制の過程を明らかにして、子ども被ばくのリスク評価と発がん抑制に関する学術的基盤を提供することを目指している。

## 2. これまでの研究成果

### (1) 実験群の設定とサンプルの採取

子ども被ばくによる細胞・組織応答の解析のため、照射マウスから肝臓、肺、胸腺、脾臓などの臓器を採取するマウス飼育を行っている。特に、生体応答を長期にわたって解析し、発がんとの関連を検討するために、生後 100 日ごとにサンプル採取を行うこととし、600 日までのマウスの長期飼育を実施している。すでにカロリー制限効果が明らかになっている発がん実験で使用したマウスと同系統の B6C3F1 マウスの雄を用いて、生後 1 週目に X 線 3.8 Gy を照射し、その後 7 週目まで通常の餌で飼育した。7 週目に 2 群に分け、一方は 95 kcal/週/マウス、他方の群は 65 kcal/週/マウスの条件で飼育し、8 週目、9 週目、11 週目、15 週目（105 日目）にサンプルを採取し、その後 100 日ごとにサンプルを採取している。

一方、被ばく直後の初期生体応答を解析するために、上記と同じ系統のマウスを用いて、生後 1 週目に X 線を照射し、その直後から様々な時間経過後にサンプルを採取した。また、成体期被ばくのサンプルを得るため、生後 7 週目のマウスに X 線を照射し、同様の時間経過後にサンプルを採取した。

### (2) 子ども被ばく後の生体内 DNA 損傷誘発初期反応

放射線によって DNA 二重鎖切断が生じると、損傷部位周辺のヒストン H2AX は速やかにリン酸化されることから、リン酸化型 H2AX ( $\gamma$ -H2AX) に特異的な抗体による蛍光染色を行うことによって、DNA 損傷部位を可視化することが可能である。子ども期のマウスに照射後 1 時間から 6 週間後まで経時的に採取された臓器について  $\gamma$ -H2AX 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、脾臓、胸腺、肝臓、肺のいずれの臓器においても、照射後 1 時間で最大レベルの  $\gamma$ -H2AX の集積（フォーカス）が検出された。その後、照射後 3 時間から  $\gamma$ -H2AX フォーカスは減少したことから、放射線誘発 DNA 損傷の修復反応が起こっていることが示された。興味深いことに、リンパ系臓器である脾臓・胸腺では、肝臓・肺に比べて  $\gamma$ -H2AX フォーカスの減少速度がやや遅延した（図 1 A）。このことは、臓器特異的な DNA 損傷修復能力の存在を示唆している。さらに、いずれの臓器にお

いても  $\gamma$ -H2AX フォーカスが照射後 24 時間で照射前のレベルまで低下したことから、放射線によって直接的に誘発された DNA 損傷の修復は 24 時間で完了すると考えられたが、照射後 6 週間の間に脾臓と胸腺では二次的な  $\gamma$ -H2AX フォーカス数の増加が検出された（図 1 B）。これまで

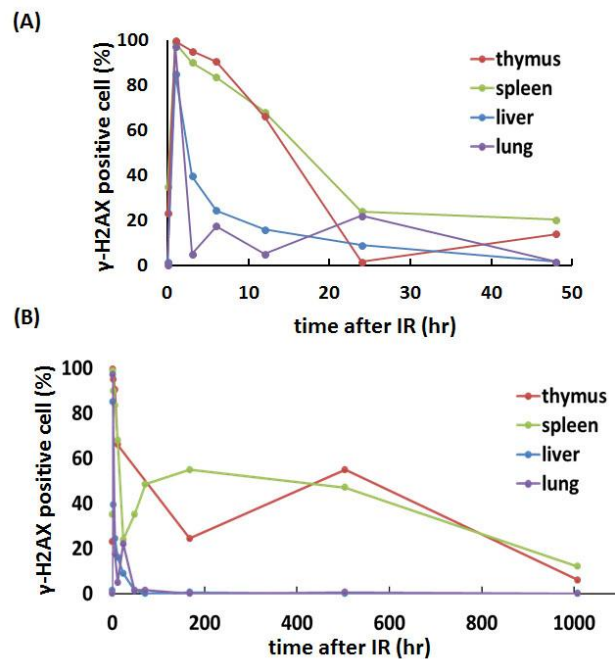


図 1  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数の変化

$\gamma$ -H2AX フォーカスを 1 つの細胞あたり 4 つ以上もつ細胞を  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞として計測した。(A) 放射線照射後 48 時間までの経時的変化。(B) 放射線照射後 6 週間までの経時的変化。

に、成体期被ばくでは胸腺において照射後比較の後期に DNA 損傷の二次的な上昇が認められることが知られているが、本研究の結果、子ども被ばくでは脾臓においても DNA 損傷の上昇が認められたことから、脾臓では子ども被ばく特異的な DNA 損傷応答がみられる可能性を示しており、発がんリスクの年齢依存性を考えるうえで重要な知見であると考えられる。

### (3) 子ども被ばく後のアポトーシス陽性細胞の出現頻度の解析

放射線照射した1週齢マウスの脾臓における細胞死の一つであるアポトーシスの誘導を検討したところ、照射後1時間で、脾臓表面側にアポトーシスのシグナルを検出し、その後照射後12時間にかけて一時的に減少した。しかし、照射後24時間から48時間にかけて大規模なアポトーシスの誘導が見られ、さらに照射後72時間以降にはアポトーシスの誘導は観察されないという二峰性を示した。次に胸腺について検討したところ、照射後3時間から、胸腺表面側にアポトーシスのシグナルを検出し、その割合は照射後12時間にかけて急激に増加し、照射後24時間から48時間にかけて急速に減少した。脾臓や胸腺に対し、肝臓や肺では、アポトーシスによる細胞死はほとんど検出できなかった。

このように、組織ごとに細胞死の出現に違いがあることが明らかになり、上記の DNA 損傷の修復過程と関連していることが推測される。

### (4) 子ども被ばく後の遺伝子突然変異誘発

放射線被ばくによる突然変異解析のため、マウス個体のすべての臓器における突然変異解析を行うために国立医薬品食品衛生研究所において開発された *gpt delta* マウスを用いて検討を行った。このマウスは全身の細胞に人工的に大腸菌の *gpt* 遺伝子を導入し、この遺伝子に突然変異が生じたものを効率よく検出するものである。B6C3F1 系統の *gpt delta* マウスに X 線を照射後、採取した肝臓と脾臓での *gpt* 遺伝子に生じる突然変異を解析した。その結果、被ばくしたマウスでは7週齢から8週齢にかけて突然変異頻度が上昇したが、カロリー制限を開始して1週間しか経過していないため、カロリー制限による明確な影響は見られなかった(図2A)。しかしながら、得られた変異体では欠失突然変異が多く見られたことから、放射線照射の影響を検出しているものと考えられる。また、脾臓ではクローン増殖している変異体が多数観察されたが、肝臓ではクローン増殖している変異体はごく少数であった(図2B)。

以上のことから、子ども被ばくによって生じる遺伝子突然変異を被ばく後6週間で検出することが可能であり、しかも放射線によって誘発

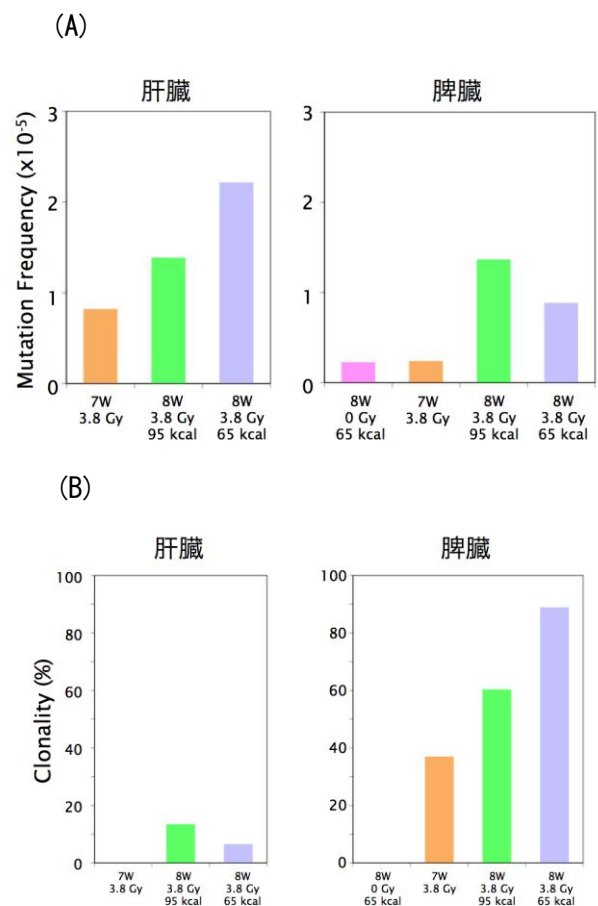


図2 *gpt delta* マウスの肝臓と脾臓での *gpt* 遺伝子突然変異解析

(A) 突然変異頻度

(B) クローン性増殖の割合

される欠失突然変異を検出可能であること、さらに変異体の増殖に関して臓器による相違があることが明らかになった。

#### (5) 子ども被ばくによる誘発がんのゲノム解析

放射線医学総合研究所で行われた発がん実験の結果、採取し保存している胸腺リンパ腫について DNA 解析を行い、腫瘍組織のゲノムに生じた変化を検討した。両親に由来する染色体のうち、片親由来の染色体の一部が失われるヘテロ接合体の消失 (LOH) を解析したところ、胸腺リンパ腫の LOH の頻度は、カロリー制限無しの群

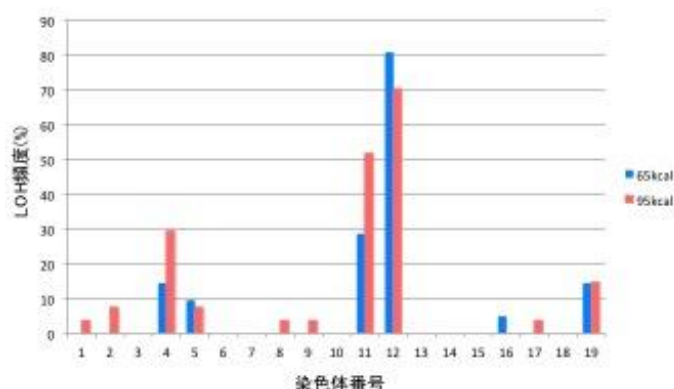


図3 胸腺リンパ腫における各染色体での LOH 頻度

(95kcal/週) に比べて、カロリー制限 (65kcal/週) 群では 4 番染色体と 11 番染色体で低くなった。また、胸腺

リンパ腫のゲノムコピー数を解析したところ、カロリー制限群ではゲノムコピー数の減少する頻度が低下することが認められた。一方、肝がんの LOH やゲノムコピー数の解析から、4 番染色体においてはカロリーの違いにかかわらず LOH が高頻度で、欠失が多く認められた。一方、12 番染色体では、カロリー制限群の肝がんでは、LOH や欠失が少なかった。胸腺リンパ腫と肝がんの分子解析の結果から、カロリー制限によってゲノムの欠失や組換えの頻度が低下する可能性が示唆された。

また、胸腺リンパ腫について染色体解析を行った結果、15 番染色体が 3 本に増加するトリソミーが高頻度に観察された。特に、カロリー制限群に生じた胸腺リンパ腫では全症例に 15 番染色体のトリソミーが観察されたことは大きな特徴である。

以上のように、DNA レベルの解析によっても、染色体レベルの解析によっても、カロリー制限によって特徴的な変化が見られたことから、放射線照射後のゲノム変異にカロリー制限が何らかの影響を及ぼしているものと考えられる。

### 3. 今後の展望

上記のように、これまでに子ども被ばく後短期間に見られる生体応答について、臓器特異性があることを示す結果を得ることができ、しかもそれらが発がん過程と関連することが示唆された。これら生体応答にカロリー制限がどのような効果を及ぼすかを今後解析して、発がん過程にカロリー制限が何らかの影響を及ぼしているかを検討する。今回の解析により、カロリー制限は放射線誘発がんにおけるゲノム変異に影響を及ぼしていることが明らかになったため、その機構を解明することが重要である。

これらの解析により、子ども被ばく後のカロリー制限による発がんリスク抑制の機構を明らかにし、子ども期の被ばくリスク低減に資することを目指す。

### 4. 参考文献

(1) Shang, Y., et al., “Cancer prevention by adult-onset calorie restriction after infant exposure to ionizing radiation in B6C3F1 male mice,” *Int. J. Cancer*, **135**, 1038-1047 (2014)