

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いるが、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。

本研究課題では、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、子どもの時期に被ばくしたマウスに対して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⁽¹⁾が、その機構は明らかではない。そこで本研究課題では、子ども被ばくののち成体期にカロリー制限を行ったマウスにおける細胞レベルや組織レベルの生体応答の解析と、子ども被ばくにより誘発したがんのゲノム解析とを行って、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の機構を解明することを目標としている。

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た。特に本研究では、生体応答を長期にわたって解析するために、最長 600 日までのマウスの長期飼育を実施した。カロリー制限 (CR) を行った発がん実験と同様の実験を行うため、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、生後 7 週目まで通常の餌で飼育した。生後 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、生後 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た。さらに、被ばく直後の初期生体応答を解析するために、生後 1 週目に X 線を照射し、照射 1 時間後から 6 週間 (生後 7 週目) まで様々な時間経過後にサンプルを採取した。

(2) 放射線誘発がんのゲノム解析

胸腺リンパ腫 48 サンプル (照射非制限群 27 サンプル、照射 CR 群 21 サンプル) について、ヘテロ接合性の消失 (LOH) 解析を行った。その結果、非制限群に比べて CR 群では LOH 頻度がやや低い傾向が見られたが、有意差はなく同程度であった (図 1)。

さらに 4 番染色体と 11 番染色体について、ゲノム CGH 解析を行ってゲノムコピー数変化を詳細に調べたところ、CR 群では小さな欠失が多い傾向が認められた。LOH の生成メカニズムとしては、ゲノムコピー数が減少する欠失タイプと、ゲノムコピー数が変化しない組換えあるいは染色体不分離を介するタイプがある。4 番染色体と 11 番染色体ではともに、ゲノムコピー数が変化しないタイプの LOH 頻度が CR 群の方が非制限群よりも低い傾向が認められた (図 1)。したがって、CR 群ではがん抑制遺伝子座での微小な欠失が多く、非制限群では染色体全体の LOH やが

ん抑制遺伝子座の周辺を含んだ欠失や組換えが多いことが明らかとなった。このことから、カロリー制限が発がんメカニズムを変化させている可能性が示唆された。

一方、胸腺リンパ腫の染色体異常を解析したところ、染色体数の増減の異常が多く、また CR 群と非制限群との間に大きな相違は認められなかった。

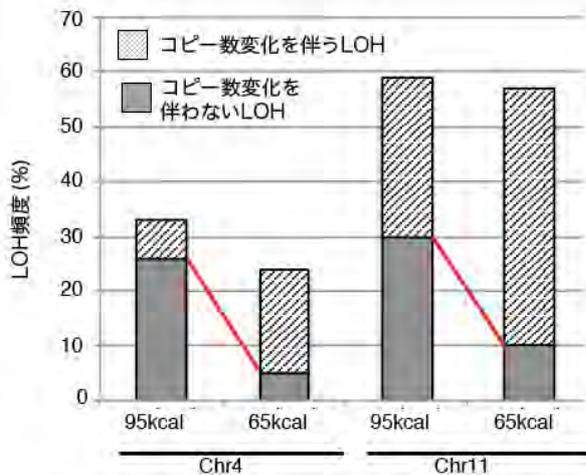


図 1 胸腺リンパ腫の LOH 解析結果

マウス 4 番染色体と 11 番染色体の LOH 頻度と、LOH 生成機構の違いによる内訳

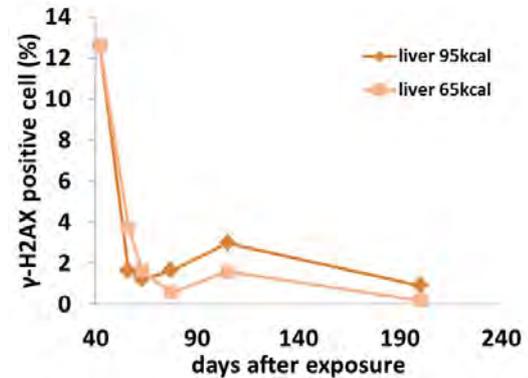


図 2 肝臓での二次的 γ -H2AX フォーカス形成に対する CR の影響

(3) 子ども被ばく後の生体内 DNA 損傷誘発反応

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 (γ -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 γ -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 γ -H2AX の集積 (フォーカス) が検出され、照射後 3 時間から γ -H2AX フォーカスは減少したが、リンパ系臓器である脾臓・胸腺では、肝臓・肺に比べて γ -H2AX フォーカスの減少速度がやや遅延した。さらに、いずれの臓器においても γ -H2AX フォーカスは照射後 24 時間で照射前のレベルまで低下したが、子ども被ばくの場合には、その後二次的な γ -H2AX フォーカス数の増加が検出された。この二次的な γ -H2AX フォーカスは、CR 群の方がやや低い傾向が見られ (図 2)、CR によって DNA 損傷の生成あるいは修復が何らかの影響を受けることを示唆している。

(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、*gpt delta* マウスを用いて検討を行った。B6C3F1 系統の *gpt delta* マウスに X 線 3.8 Gy 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。短期 CR を行ったサンプルについて検討した結果、肝臓では CR の影響はほとんど見られなかったが、脾臓では変異頻度がやや低下する傾向が見られた (図 3)。得られた変異体の塩基配列を解析した結果、CR 群では非制限群に比べて欠失突然変異がやや低い傾向にあり、また照射 CR 群では G:C→T:A 変異が減少する傾向が見られた。欠失突然変異は放射線によって高頻度に誘発されることが知られており、G:C→T:A 変異は酸化ストレスによって生成する 8-オキシ

グアニンが原因で生じるとされている。従って、CR は放射線被ばくに起因すると考えられる遺伝子突然変異を抑制することが示唆される。

(5) 子ども被ばく後の生体内炎症反応の検討

放射線被ばく後の生体内炎症反応をモニタリングするために、炎症性サイトカインの一つである CCL2 をマーカーとして解析を行った⁽²⁾。その結果、CCL2 レベルが低い傾向が認められた(図 4)。このことは、臓器レベルでの炎症反応が CR によって抑制されていることを示唆しており、CR による発がん抑制効果に関係するものと考えられる。

放射線照射後、長期間飼育したマウスより採取した臓器・組織を観察したところ、放射線照射 200 日後付近から、非制限群の肝臓において脂肪の蓄積が確認できた。非制限群でも放射線を照射していない場合には見られないことから、この脂肪の蓄積は放射線照射によって促進されたものと考えられる。一方、放射線照射したマウスに CR を行った場合には脂肪の蓄積は見られなかった(図 5)。すなわち、放射線によって促進される脂肪肝誘発が CR によって抑制されることが示唆された。この脂肪肝誘発抑制が、CR による発がん抑制につながるものと考えられる。

(6) 長期 CR による肝臓での脂肪蓄積の抑制

放射線照射後、長期間飼育したマウスより採取した臓器・組織を観察したところ、放射線照射 200 日後付近から、非制限群の肝臓において脂肪の蓄積が確認できた。非制限群でも放射線を照射していない場合には見られないことから、この脂肪の蓄積は放射線照射によって促進されたものと考えられる。一方、放射線照射したマウスに CR を行った場合には脂肪の蓄積は見られなかった(図 5)。すなわち、放射線によって促進される脂肪肝誘発が CR によって抑制されることが示唆された。この脂肪肝誘発抑制が、CR による発がん抑制につながるものと考えられる。

(7) まとめ(図 6)

本研究の結果、CR は発がんメカニズムを変化させていることが示唆された。初期応答解析により、CR は二次的に生成する DNA 損傷レベルを抑制することや、遺伝子突然変異生成に影響を及ぼしていることが示唆されたことか

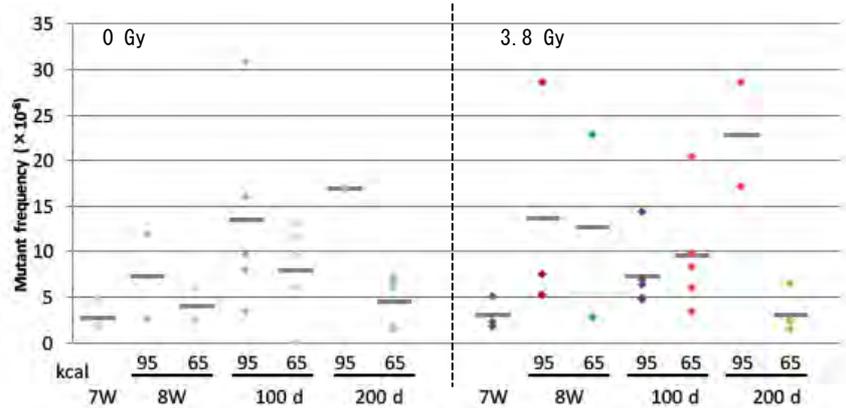


図 3. *gpt-delta* マウス脾臓での *gpt* 遺伝子突然変異の変異体頻度。CCL2 レベルに対する放射線被ばくの影響は見られなかったが、解析した各個体の変異体頻度を点で表し、各群の平均値を横棒で示す。

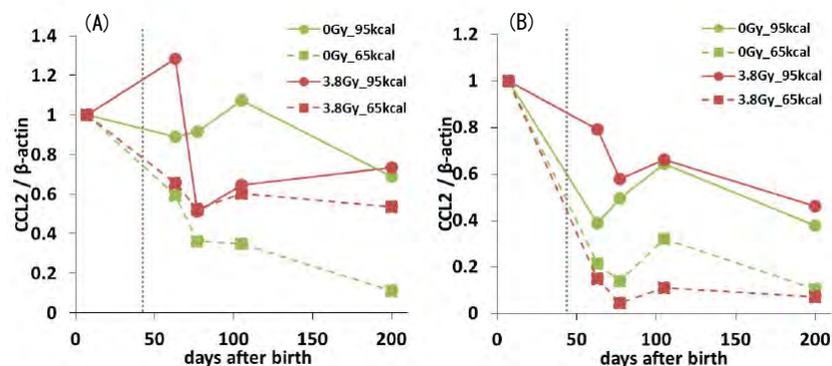


図 4. マウス個体内の CCL2 発現レベル。放射線照射 200 日後付近から、非制限群の肝臓において脂肪の蓄積が確認できた。非制限群でも放射線を照射していない場合には見られないことから、この脂肪の蓄積は放射線照射によって促進されたものと考えられる。一方、放射線照射したマウスに CR を行った場合には脂肪の蓄積は見られなかった(図 5)。すなわち、放射線によって促進される脂肪肝誘発が CR によって抑制されることが示唆された。この脂肪肝誘発抑制が、CR による発がん抑制につながるものと考えられる。

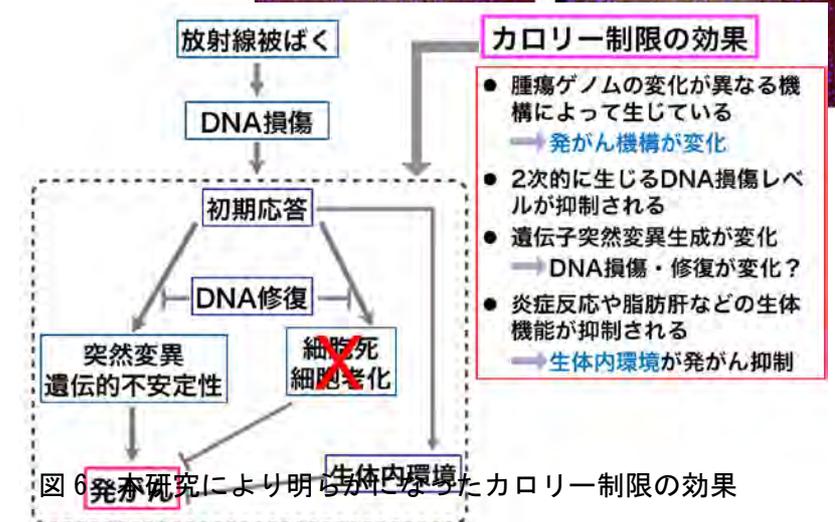
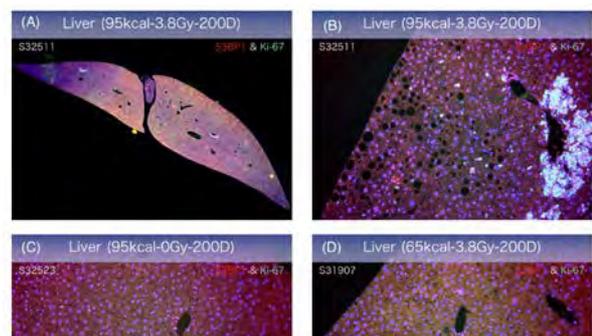


図 6 本研究により明らかになったカロリー制限の効果

ら、CR によって DNA 損傷の生成あるいは修復が何らかの影響を受けたのではないかと考えられる。このことが発がんメカニズムの変化につながるものと推測される。さらに、炎症反応や脂肪肝などの生体機能が CR によって抑制されることが示唆された。従って、CR は生体内環境に作用して、発がんを抑制する方向に作用しているものと考えられることができる。

3. 今後の展望

本研究の結果、CR によって発がんメカニズムが変化することが明らかになった。今後発がん過程をより詳細に検討し、CR がどの発がん過程に作用しているのかを明らかにする必要がある。特に、DNA 損傷の生成や修復に CR が影響を及ぼすことが示唆されたことから、これらの過程に関する詳細な検討が重要である。また、CR は遺伝子発現に影響を及ぼしていることが推定されるため、今後詳細なエピジェネティクス解析が必要である。また本研究では、CR が炎症反応や脂肪肝等の生体内環境に影響を及ぼすことを明らかにしたが、さらに多様な生体内環境について、CR の影響を検討することにより、CR がどのように生体内環境を変化させ、発がん抑制につながるのかを明らかにすることが重要である。

これらの解析により、CR による発がん抑制に関わる因子や過程を解明することによって、将来的にはヒトにおける発がん抑制に効果的な方策の開発につながるものと考えられる。

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)
- (2) Redon, C.E., et al., “Tumors induce complex DNA damage in proliferative tissues in vivo,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 17992-17997 (2010)