

エンリッチメント環境による Eustress（よいストレス）で 放射線リスクを低減する

（受託者）国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構

（研究代表者）島田 義也 放射線医学総合研究所

（再委託先）学校法人 東邦大学、国立大学法人 東京大学、

国立大学法人 茨城大学、学校法人 産業医科大学

（研究期間）平成27年度～29年度

1. 研究の背景とねらい

原子力発電所の事故や津波、火山の爆発などで生活スタイルが一変することによる心理的、身体的ストレスの増加によって健康の悪化が指摘されている。特に子どもは、長引く避難所や仮設住宅での生活により、友達と一緒に外で遊べない、それに伴う運動不足などの身体的ストレスや家族の離散などに伴う精神的ストレスの影響を受けやすい。それ故、生活環境の変化が子どもの心と身体に与える影響に対して適切な対処法の提供が求められている。近年、環境エンリッチメント（EE：Environmental Enrichment, 豊かで快適な「よいストレス」：Eustress）が神経、内分泌及び免疫系に作用し、脳の老化予防、メタボリック症候群の予防、さらにはがん予防にも効果的であることが実験的に実証されている。本研究は、マウスにあそびや運動、適温環境、社会的交流がある環境（エンリッチメント環境、図1）を提供することで、健康を増進することができるか、また、放射線による健康障害の予防・低減が可能かを通常環境（SE：Standard Environment、図1）と比較して多面的な指標で検証することを目的とする。具体的には、以下の点について解析を行う。

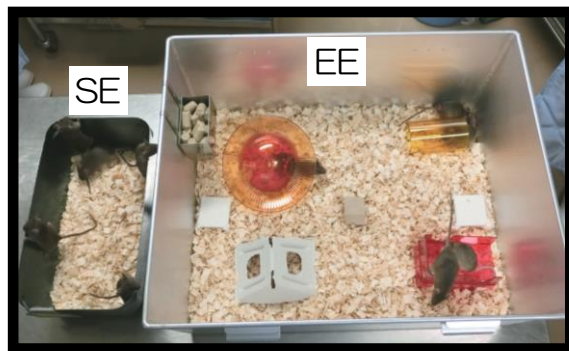


図1. エンリッチメント環境での飼育

SE：標準飼育、EE：エンリッチメント環境飼育

（1）エンリッチメント環境によるホメオスタシス増強とがん予防

① 内分泌ならびに発がんに関する研究

EEによる肥満や炎症に対する修飾効果を生化学的指標を用いて明らかにする。また、ヒト家族性大腸腺腫症モデルマウス（Apc^{min/+}-マウス）を用いてがん予防効果についても明らかにする。

② 自然免疫に関する研究

EEによる自然免疫細胞であるマクロファージなどの機能変化を明らかにする。

③ DNA修復に関する研究

EEによる細胞のDNA損傷修復力と修復能力に関与する体内因子の産生能への影響を明らかにする。

（2）放射線発がんの新たな分子機構解明とEEによる修飾効果

EEによる放射線被ばく後のDNA損傷応答やアポトーシスに関わる長鎖非コードRNAの発現への修飾効果を明らかにする。

（3）快適温度飼育環境（EE）による移植腫瘍に対する抑制効果

適温環境による免疫活性や移植腫瘍に対する抑制効果を明らかにする。

これらの解析により、放射線の健康影響を生活環境の改善で低減可能かを示すことで、災害時

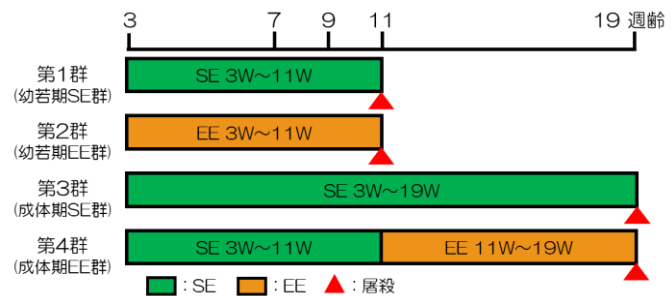
の避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復（維持）の施策に関する学術的基盤を提供することを目標とする。

2. これまでの研究成果

(1) エンリッチメント環境によるホメオスタシス増強とがん予防

① 内分泌ならびに発がんに関する研究

3 週齢 B6C3F1 雄マウスを 4 群に分け実験を行った (図 2)。第 1 群は 3 週齢から 8 週間 SE で飼育する群 (幼若期 SE 群)、第 2 群は 3 週齢から 8 週間 EE で飼育する群 (幼若期 EE 群)、第 3 群は 3 週齢から 16 週間 SE で飼育する群 (成体期 SE 群)、第 4 群は 3 週齢から 8 週間 SE で飼育後、11 週齢から 8 週間 EE で飼育する群 (成体期 EE 群)、第 1 群と 2 群は 11 週齢時に、第 3 群と第 4 群は 19 週齢時に解剖を行い、血清と各臓器 (胸腺、脾臓、肝臓、肺、白色及び褐色脂肪) を採取した。採取した血清は、インスリン、レプチン及びアディポネクチンを測定した。各臓器の一部は、病理組織検査用にホルマリン固定し、残りを DNA 修復タンパク解析と免疫組織化学染色用に冷凍保存した。また、自然免疫に関する研究のために、腹腔細胞を回収した。その結果、幼若期及び成体期の EE は、体重と白色及び褐色脂肪組織の重量を有意



に減少させた (図 3)。

また、血糖値の調節ホルモンであるインスリン、エネルギー代謝関連アディポカインであるレプチン及びアディポネクチンを有意に減少させた (図 4)。加えて、褐色脂肪の油滴サイズの著明な減少 (図 5b, 5e) と熱産生と脂質代謝促進に関与する UCP1 (脱共役タンパク質 1) の発現増加が認められた (図 5c, 5f)。今年度、新たに 2 週齢 B6C3F1 雄 $Apc^{Min/+}$ マウスに X 線 (2Gy) を照射し、EE と SE での飼育を行い EE の発がん予

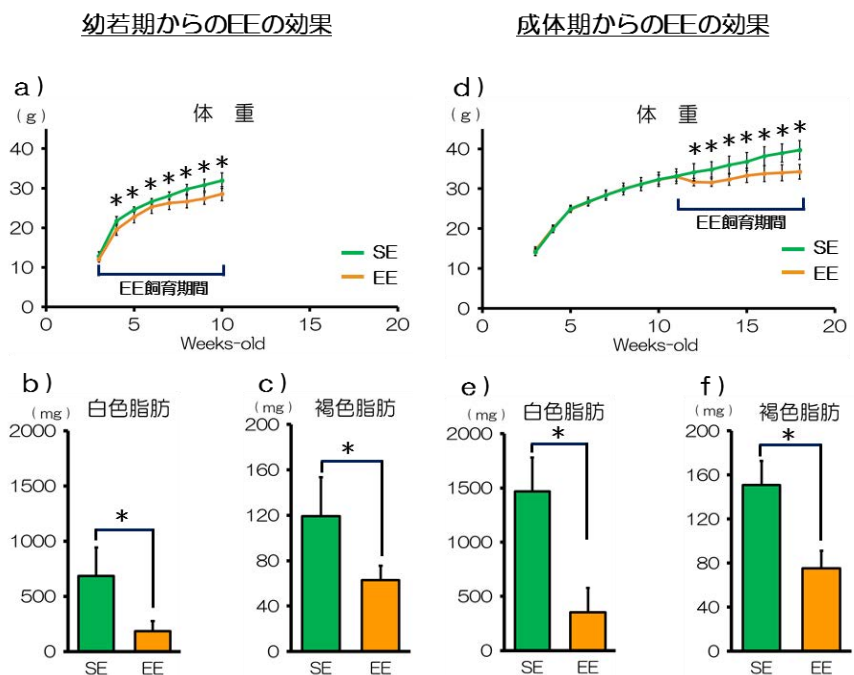


図 3. 幼若期 (a-c) 及び成体期 (d-f) からの EE が体重、白色脂肪及び褐色脂肪組織重量に与える効果

a, d) 体重の経時的変化、b, e) 白色脂肪組織重量の変化、c, f) 褐色脂肪組織重量の変化

データは、平均値±標準偏差 (n=15) を示す。

* $P < 0.01$ (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計学的に有意を示す。)

防効果の予備実験を開始した。

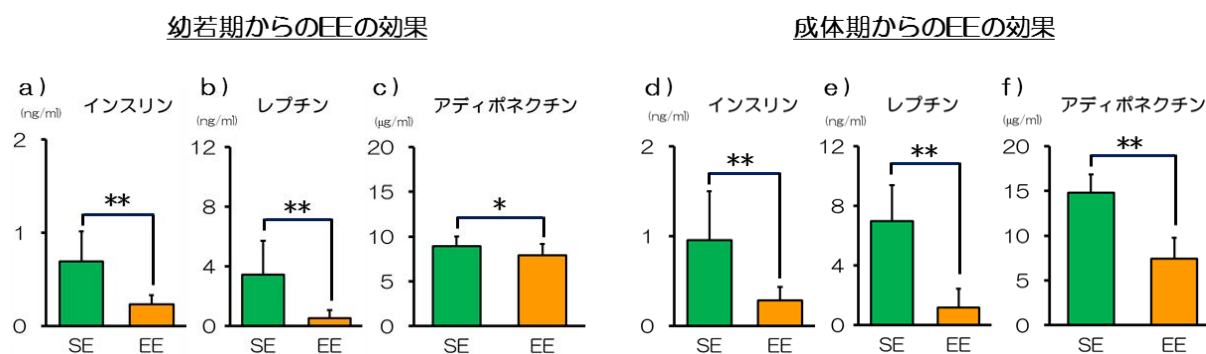


図 4. 幼若期 (a-c) 及び成体期 (d-f) からの EE によるインスリン、アディポカイン分泌に与える効果

データは、平均値±標準偏差を示す。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計学的に有意を示す。)

② 自然免疫に関する研究

幼若期 EE の自然免疫に対する効果を明らかにするため、(1) ①で回収した腹腔細胞中のマクロファージにおける貪食能を、2 次的ネクロシス好中球貪食を指標に検討した。回収した腹腔細胞の総数、プラスチック付着性細胞

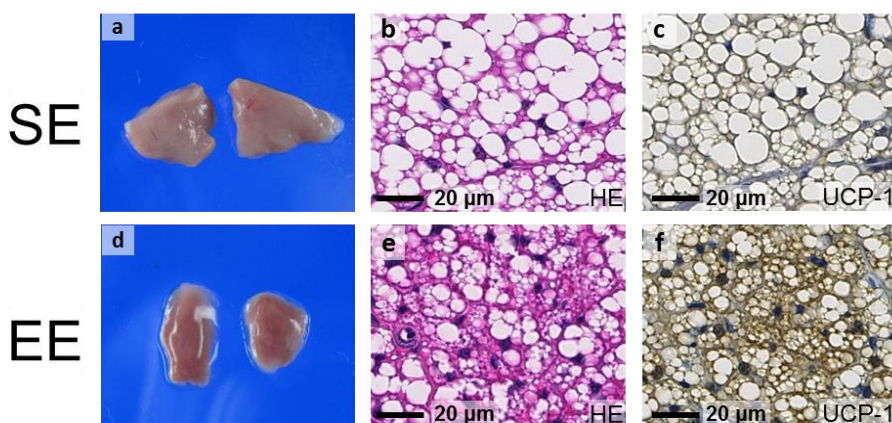


図 5. SE 及び EE 飼育後のマウス褐色脂肪組織の病理組織像と UCP1 発現の比較

a, d) 肩甲骨部褐色脂肪組織の肉眼像

b, e) 褐色脂肪組織の HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色像

c, f) UCP1 (uncoupling protein 1) の免疫組織化学的染色像

(マクロファージ) の割合を求めて、腹腔マクロファージ数を算定した。次に、蛍光色素で標識した腹腔マクロファージに別の蛍光色素で標識した 2 次的ネクロシス好中球を 1 : 2 の比率で加えて 1 時間貪食させた後に共焦点顕微鏡により貪食率を測定した。その結果、8 週間の EE は、腹腔細胞数、マクロファージ数には変化を認めなかった。また、マクロファージ貪食能に関しても明らかな違いは認められなかった。今後、上記検討項目の再現性に加え、腹腔マクロファージのアポトーシス好中球に対する貪食能を含め検討を行う予定である。

③ DNA 修復に関する研究

DNA 損傷の修復効率や修復の品質に与える EE の効果を検証するため以下の実験を実施した。放射線を 4Gy 照射したマウス胚由来細胞 (m5S 細胞) の培養液に (1) ①で凍結保存した EE を施したマウスから採取した血清を添加して、修復タンパク質 (ヒストン H2AX) のリン酸化の変化の程度を免疫染色で観察し、血清中に DNA 損傷の修復効率を変えるような成分が含まれて

いるかを調べた。その結果、血清を添加しない場合、H2AX のリン酸化は照射 1 時間後に最も高くなり、その後減少していくことが観察されたが、血清を添加した場合は、免疫染色における非特異的な結合が高くなり、放射線によるリン酸化の増加の観察が困難になった。今後、免疫染色の方法を検討する必要があることが分かった。また、(1) ①で保存した組織における放射線損傷応答タンパク質（ヒストン H2AX）のリン酸化ならびにマクロファージのマーカーである F4/80 の染色方法を確立した。

(2) 放射線発がんの新たな分子機構と EE による修飾効果

マウスを使った長鎖非コード RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 解析の条件検討を行うため以下を実施した。放射線応答や発がんに関わる lncRNA を文献から探索し、特異的に検出することが可能と考えられるプライマーを 50 種類程度作成した。全 RNA を抽出後、逆転写反応により、cDNA に変換し、定量 PCR 法によって発現解析を正確に行える条件検討を行い、実験に使用するプライマーを決定した。具体的には、マウスで発現が確認されている lncRNAの中から、アポトーシスやストレス応答に関連がありそうな Malat1 や lincRNA-p21 等とともに、機能が未知の lncRNA のプライマーを作成した。

(3) 快適温度飼育環境 (EE) による移植腫瘍に対する抑制効果

エンリッチメント環境の 1 つの要因である温度の効果を調べるため、以下を実施した。B6C3F1 雌マウス（各群 50 匹）を 3 週齢と 11 週齢から適温環境 (EE, 31℃) で 8 週間飼育後、通常環境 (SE, 25.6℃) に戻して飼育する群とそのまま EE で継続飼育する群を設定した。また、SE のみで飼育する対照群を設定した。3 週齢から EE での飼育群の一部を、EE 開始後 0, 1, 3 ヶ月目に血液と脾臓、胸腺組織を採取し免疫能の解析及び病理組織検査を開始した。残りのマウスはがん細胞移植を行い、EE のがん細胞増殖に対する効果を調べる実験群の飼育を開始した。また、11 週齢から EE での飼育群と対照群においても同様の実験を開始した。その結果、EE (31℃) で飼育したマウスでは、体重が増加し、さらに移植したがんの増殖が抑制されることが示唆された。

3. 今後の展望

今回、「遊び、運動の刺激環境」と「快適温度飼育環境」の 2 つの EE の効果として、体重と脂肪組織重量の増加の抑制、エネルギー産生や脂質代謝関連因子の活性化及び移植腫瘍の成長抑制作用が示唆された。「遊び、運動の刺激環境」の EE は、より長期間での効果が高いことが観察された。今後、EE の期間を長期に設定し、同様な解析による再現性の確認とデータの蓄積を行う。加えて、EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する予防効果をヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスを用いて検証を遂行する。また、EE の放射線被ばく後の DNA 損傷修復能に対する修飾効果や放射線誘発がん関連 lncRNA の探索を引続き検討する。

これらの解析により、EE による放射線誘発がんの予防機構を明らかにし、リスク低減化に資する学術的基盤提供を目指す。