

# 被ばくによる発がんゲノム変異を定量できる 新規放射線発がん高感受性マウスを用いた 低線量・低線量率発がんリスクの解明

(受託者) 国立大学法人広島大学

(研究代表者) 笹谷めぐみ 原爆放射線医科学研究所

(再委託先) 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

(研究期間) 平成 27 年度～29 年度

## 1. 研究の背景とねらい

東京電力福島第一原子力発電所事故（福島原発事故）以降、放射線の人体に与える影響に関する社会的関心は高く、低線量・低線量率放射線を長期にわたり被ばくした場合の発がんリスク評価は緊急の課題といえる。しかしながら、ヒト放射線発がんにおける低線量域のリスクや、一般に総線量が同じ場合、線量率が下がると引き起こされる生物学的効果が減弱するという線量率効果の有無については十分に解明されておらず、疫学調査のみによるリスク解明には限界がある。そのため、動物実験で得られる低線量・低線量率発がんに関する知見を大規模疫学調査結果と統合することで、リスク評価の信頼性向上が期待される。

そこで、本研究では、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いて、低線量・低線量率放射線による発がんリスクを評価し、しきい線量の有無や線量率効果のゲノムの基盤の解明を通じて、新しい放射線防護体系の基盤確立に貢献することを目指す。

これまで我々は、放射線高発がん性モデルマウスの開発に注力してきた。中でも、ヒト大腸腺腫症（Adenomatous Polyposis Coli, APC）のモデルマウスとして開発された  $Apc^{Min/+}$  マウスは、放射線や化学物質に対し発がん感受性が高いマウスとして知られている。原爆被爆者の疫学調査でも大腸がんのリスクは高く、放射線発がん研究において  $Apc^{Min/+}$  マウスの有用性は疑う余地が無い。我々はこれまで、 $Apc^{Min/+}$  マウスにおいて低線量放射線により小腸腫瘍が高率に発生し、かつ、その腫瘍において放射線に特有の遺伝子変異（放射線の爪痕）が検出できることを明らかにしている。また、このモデルマウスでは、一匹のマウスの小腸に数十～百数十個の腫瘍が発生する。これらの腫瘍は独立して生じるため、膨大なマウスを用いることなく多数の腫瘍を用いた分子生物学的解析が可能となる（図 1）。さらに我々は、 $Apc^{Min/+}$  マウスと日本古来の MSM マウス由来の 18 番染色体を持つコンソミックマウスとの F1 マウス（ $B6/B6-Ch18^{MSM}-F1 Apc^{Min/+}$  マウス）（図 2）を

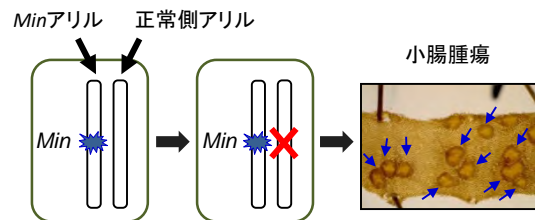


図1  $Apc^{Min/+}$ マウスの特徴

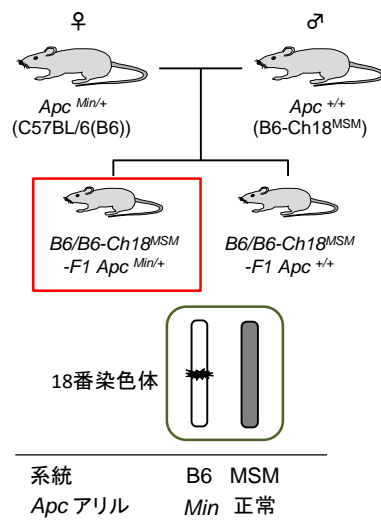


図2  $B6/B6-Ch18^{MSM}-F1 Apc^{Min/+}$ マウスの作成

用いることで、より高感度に腫瘍増加が検出できることを見出している。これらの事から、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いることにより、遺伝子変異を指標とした低線量・低線量率放射線被ばくによる発がんリスク評価が可能になるものと期待される。

さらに近年、発がん過程には、遺伝的（ジェネティック）変異に加えて、異常な DNA のメチル化や、DNA の構造変化を制御するヒストン蛋白質のメチル化、アセチル化などのエピジェネティック変異が蓄積していることが報告されている。しかしながら、放射線発がんにおけるエピジェネティック変異の関与については、未だほとんど解明されていない。そのため、次世代シーケンサーを用いて、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウス小腸腫瘍におけるエピジェネティック変異を網羅的に解析し、放射線に特有のエピジェネティック変異の有無を検索する。

## 2. これまでの研究成果

### 2.1 低線量放射線発がん実験

100 mGy 以下の被ばくにおける発がんリスク評価を行うため、C57BL/6N(B6) *Apc*<sup>Min/+</sup>メスマウスと B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup> *Apc*<sup>+/+</sup>オスマウスをかけあわせて得られる B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを用いて発がん実験を行った。生後 11 日目に、0 mGy、50 mGy、100 mGy の放射線照射を行った。その後、約 19 週齢まで飼育し、小腸を採取した。採取した小腸は、アルカリフォスファターゼ染色を行い、小腸腫瘍数を計測した。その結果、

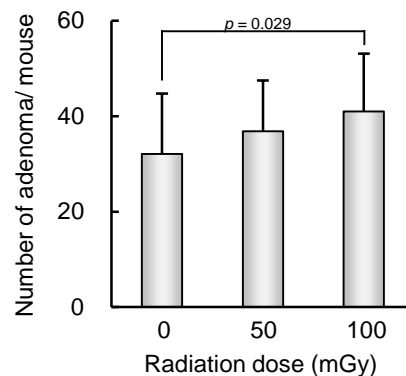


図3 低線量放射線照射によって誘発された小腸腫瘍

B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスで検出される

小腸腫瘍数は、線量依存的に増加した（図 3）。50 mGy 照射群では、非照射群と比較して、有意な増加が検出されなかったが、100 mGy 照射群は、非照射群と比較して、有意な増加が検出された。統計解析を行った結果、本線量効果関係には、直線モデルをあてはめることができると示唆された。また、統計解析ソフトウェア SAS (Statistical Analysis System) を用いて過剰相対リスク ERR (Excess Relative Risk) を算出した結果、ERR/ Gy の値は 0.9268 (95%CI: 0.7788, 1.0749) であった。また、しきい値について検討した結果、しきい値の候補としては -0.43 が挙げられたことから、しきい値の存在を示唆する結果は得られなかった。

### 2.2 低線量率放射線発がん実験

低線量放射線発がんリスクにおける線量率の影響を明らかにするため、総線量を一定にし、線量率を変えて放射線発がん実験を行った。2.1 と同様に、B6 *Apc*<sup>Min/+</sup>メスマウスと B6 B6-Ch18<sup>MSM</sup> *Apc*<sup>+/+</sup>オスマウスをかけあわせて得られる B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを実験に用いた。生後 11 日目に、総線量 500 mGy、線量率 262 Gy/day、0.05 Gy/day の放射線照射を行った。その後、約 19 週齢まで飼育し、小腸を採取した。採取した小腸は、アルカリフォスファターゼ染色を行い、小腸腫瘍数を計測した。

その結果、照射により、線量率 262 Gy/day 群、0.05 Gy/day 群ともに非照射群と比較して有意な小腸腫瘍数の増加が観察された (図 4)。また、262 Gy/day 群、0.05 Gy/day 群で検出された小腸腫瘍数に有意な差は検出されなかった。我々はこれまでに、262 Gy/day 群、4 Gy/day 群、1 Gy/day 群の間では、線量率効果が検出されなかったという結果を得ているが、今回、262 Gy/day 群と比較して 1/5,000 の線量率となる 0.05 Gy/day 群を用いて実験を行ったが、線量率効果は検出されなかった。

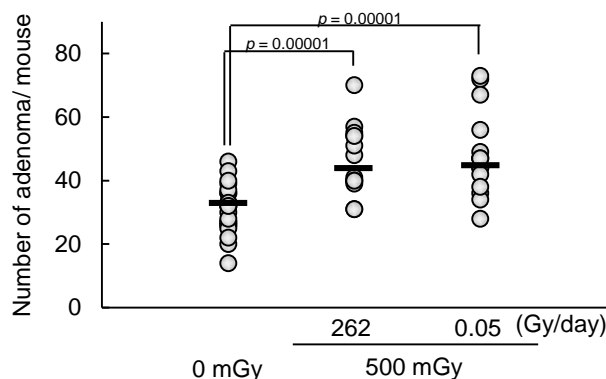
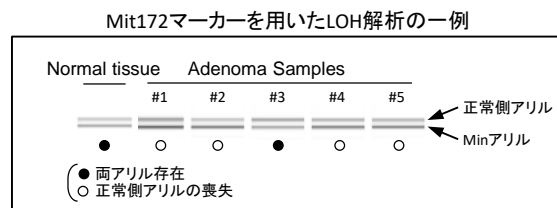


図4 低線量率放射線照射によって誘発された小腸腫瘍

### 2.3 遺伝子変異解析

我々のこれまでの研究から、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスでは、*Apc* 遺伝子領域近傍の欠失が放射線照射により誘発された腫瘍で検出されることから、このマウスを用いることにより、放射線に特有の遺伝子変異を検出することができる。

そこで、図 5 に示すようなヘテロ接合性の喪失 (LOH) 解析やゲノムのコピー数を定量できる定量 PCR (qPCR) 法を用いて、腫瘍サンプルを解析した。その結果、正常側アレルが欠損し、*Min*アレルが 2 対になった片親性ダイソミー型、正常側アレルの *Apc* 遺伝子を含む領域に欠失がみられる欠失型、そのどちらにも分類されない未知の 3 種類に分類された。*Apc* 遺伝子の mRNA 量を定量した結果、未知の腫瘍では、片親性ダイソミー型、欠失型と同程度まで *Apc* 遺伝子の発現レベルが低下していた。このことから、未知の腫瘍においては、なんらかの変異により正常側 *Apc* 遺伝子の発現が低下しているものと考えられる。



遺伝子変異の分類			
正常			
小腸腫瘍			
LOH解析	正常側アレルの全欠失	正常側アレルの一部欠失	両アレル存在
qPCR	コピー数 (2n)	コピー数 (n)	コピー数 (2n)

図5 遺伝子変異解析

### 2.4 エピジェネティック解析

がん細胞におけるがん抑制遺伝子の高メチル化や、がん遺伝子の低メチル化による発現異常などから、発がんにおけるエピジェネティック異常が重要であることが明らかにされている。多段階発がん機構の研究が進んでいる大腸がん等においても、発がん過程におけるエピジェネティック異常の関与が明らかにされている。そこで、エピジェネティック変異が放射線発がんに果たす役割を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いて、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスの小腸腫瘍における DNA

のメチル化状態を網羅的に解析した。

小腸腫瘍組織からは微量の DNA しか抽出できないため、微量 DNA からメチル化状態を解析することができる測定条件を確立した。確立した条件を用いて、*Apc<sup>Min/+</sup>* マウス小腸腫瘍における DNA メチル化状態を網羅的に解析した結果、メチル化領域数は、244,704 領域、遺伝子上流 1kb 以内では、6,357

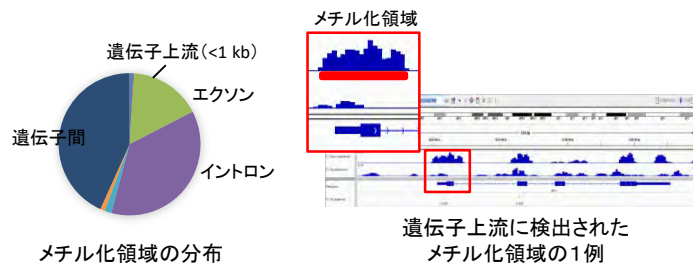


図6 エピジェネティック変異解析

遺伝子に対応する 8,493 領域に DNA のメチル化が検出された。図 6 に検出されたメチル化領域の分布と遺伝子上流に検出されたメチル化領域の 1 例を示した。

## 2.5 リスクモデルの構築

長期低線量被ばくのリスク評価には、一般的にポアソン回帰の統計モデルが用いられる。ポアソン回帰モデルでは、毎年の被ばく線量が加算され、それを累積した累積線量が解析に用いられる。このモデルでは、同じ線量の被ばくによるリスク増加は、被ばく時点によらず一定という仮定のもとで累積線量が加算されている。

しかしながら、原爆被爆者における疫学調査からは、1Gy あたりの ERR は被ばく時年齢によって大きく変化することが報告されている。そのため、被ばく時年齢によってリスク増加が変化できるようなモデルの開発・改良を行った。

## 3. 今後の展望

B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスを用いて、低線量・低線量率発がん実験を行っており、低線量発がん実験については、更に低い線量での発がん実験を遂行している。また、低線量率発がん実験については、総線量を下げた条件での発がん実験を遂行しているところである。遺伝子変異解析、エピジェネティック変異解析は、今後サンプル数を増やしていく予定である。さらに、本研究で得られた腫瘍発生数や遺伝子変異パターンと線量ならびに線量率との関係について、統計学的解析をすすめるとともに、疫学調査との比較・検討をすすめていく予定である。

## 4. 参考文献

笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 神谷研二, “放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた低線量放射線発がんリスク評価” 長崎医学会雑誌 原子爆弾後障害研究会講演集, *in press*, (2016)