

令和元年6月17日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01905

研究課題名(和文)放射線発がんリスクは被ばく時年齢によってなぜ変わる？-小脳発生過程から紐解く-

研究課題名(英文)Relationship of the age at exposure and the risk of radiation-induced tumor.

研究代表者

鶴岡 千鶴 (TSURUOKA, Chizuru)

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・研究員(任常)

研究者番号：60415411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：被ばくで発がんリスクがなぜ高くなるか、被ばく時年齢が異なると発がんリスクがなぜ異なるかを明らかにするため、生後1、4日齢で照射したPtch1遺伝子ヘテロ欠損マウスを用い、髄芽腫前がん病変を解析した。先行研究でこのマウスは、Ptch1遺伝子の消失により髄芽腫が発生すること、その消失パターンが自然発生時(組換え型)と放射線誘発時(欠失型)で異なることが明らかとなっている。その結果、照射群では組換え、欠失型の病変巣が混在した。さらに生後1日齢照射群では両型ともに体積が非照射群・生後4日齢照射群に比べ増大し、被ばく時年齢に依存して発がん過程が異なり、それにより発がんリスクが異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは、発生する臓器の発達段階に大きく依存する。そのため放射線誘発による発がん影響を考える時、臓器毎に発がんメカニズムを研究することが大切となる。本研究では、小脳に発生する髄芽腫に着目し、被ばくでなぜ発がんリスクが高くなるかを前がん病変巣の遺伝子解析から明らかにした。また、被ばく時年齢に依存した発がんリスクの違いにおいても発がんメカニズムの違いによる可能性があることを示唆した。これら臓器毎における発がん研究をさらに進展することにより、放射線被ばく時の発がんリスク評価および放射線防護の基礎データになり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the different of risk of tumor depending on age at exposure, we analyzed the preneoplastic cerebellar regions of Ptch1 heterozygous mice (Ptch1+/-) exposed to radiation at postnatal 1 (PN1) and 4 days (PN4). Ptch1+/- mouse develop medulloblastoma by loss of Ptch1 gene, and that the loss pattern of Ptch1 differ between spontaneous (mitotic recombination: recombination-type) and radiation-induced (interstitial deletion: deletion-type) tumor. As a result, all mice had multiple preneoplastic cerebellar regions and these regions in irradiated groups were mixed both recombination- and deletion- types. The volume of both types in these regions increased in PN1 irradiated group compared to that of unirradiated and PN4 irradiated groups. These results suggest that the carcinogenic process differ depending on the age at exposure, which lead to different carcinogenic risk.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発がん 被ばく時年齢依存性 Ptch1遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

【子どもの放射線被ばくによる発がんリスクとメカニズム】

一般に子どもは成人に比べ、放射線感受性であり発がんリスクが高い。そのため近年、医療や放射線災害に伴う子どもへの放射線影響、特に晩発影響（発がん）が懸念されている。放射線による発がん感受性には臓器依存性があることが明らかとなっており、我々はこれまでに、子ども期被ばくにより生じる発がんメカニズムは、そのがんが発生する臓器の発達段階に大きく依存することを骨髄および腸管について報告した（Ariyoshi et al, Radiat. Res., 2014, Mihoshi-Imamura et al, Radiat. Res., 2010）。しかし、その他の臓器については未だ説明されていない。

【放射線感受性モデルマウス：Ptc1 遺伝子ヘテロ欠損マウス】

Ptc1 遺伝子は、がん抑制遺伝子のひとつで、Sonic Hedgehog (SHH)シグナル伝達経路の受容体であり生体の形態形成や細胞増殖を制御しており、小脳の発生においても重要な働きをしている。本モデルマウスは、Ptc1 遺伝子の片側の遺伝子座に変異をもち、脳腫瘍（髄芽腫）、基底細胞がんおよび横紋筋肉腫を自然発症する（Goodrich et al, Science, 1997, Hahn et al, nat. Med., 1998）。このモデルマウスの特徴として、出生前後に被ばく

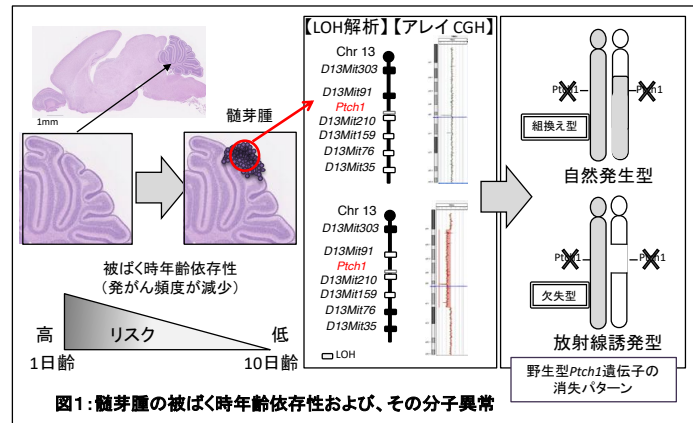


図1: 髄芽腫の被ばく時年齢依存性および、その分子異常

をすると髄芽腫が線量依存的に増加する (図 1) (Pazzaglia et al, Oncogene, 2006. Ishida et al, Carcinogenesis, 2010)。さらに髄芽腫の Ptc1 遺伝子のヘテロ接合性の消失 (LOH 解析) およびアレイ CGH 解析より、照射後に発症した髄芽腫は野生型 Ptc1 遺伝子が欠失により消失し、その頻度は線量依存的に増加する。一方、照射をせず自然に発症した髄芽腫では野生型 Ptc1 遺伝子は組換えによって消失する。また、生後 1 日齢の照射では、髄芽腫の発症が非照射に比べて有意に増加するが、生後 10 日齢では非照射に比べて同等もしくは減少する (Pazzaglia et al, Oncogene, 2006)。さらに生後 1 日齢と 10 日齢では、照射直後のアポトーシス頻度及び、前がん病変の頻度が異なるとの報告があり、放射線誘発がんの頻度の違いは、照射時のがん起源細胞の放射線感受性の違いによって決定されている可能性が考えられる。

【小脳の発生・分化の過程及び髄芽腫の発生機序】

小脳の発生と形成は、生後 21 日までに完成する (図 2)。まず、外顆粒層 (EGL) に存在する顆粒神経前駆細胞は Hedgehog シグナル伝達経路が応答することで増殖を開始する。生後 4、5 日目には、EGL は細胞分裂が盛んな outer EGL (oEGL) と分裂を停止している inner EGL (iEGL) に分かれる。その後 Hedgehog シグナル伝達経路の応答が停止、EGL の顆粒細胞は内顆粒層 (IGL) へと移動する。髄芽腫のがん起源細胞は、oEGL の顆粒神経前駆細胞であることが明らかとなっている (Wechsler-Raya et al, Annu. Rev. Neurosci., 2001)。Ptc1 遺伝子ヘテロ欠損マウスでは、野生型 Ptc1 遺伝子の消失により、Hedgehog シグナル伝達経路の応答が停止せず、顆粒神経前駆細胞の増殖が止まらなくなり髄芽腫を発症する。

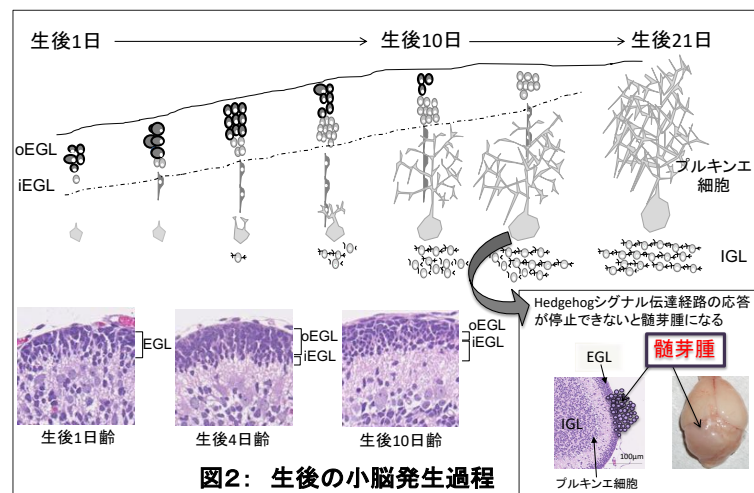


図2: 生後の小脳発生過程

2. 研究の目的

本研究では、Ptc1 遺伝子ヘテロ欠損マウスを用いて、放射線誘発型髄芽腫（野生型 Ptc1 遺伝子が欠失により消失）がいつどのように発生するかを追うことで、放射線感受性の時期である子ども期の放射線による発がん過程を解明できると着想し、1) なぜ放射線被ばくで発がん（髄芽腫発症）リスクが高くなるのか？、2) なぜ被ばく時年齢が異なると発がんリスクが変動するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

【Ptch1 遺伝子ヘテロ欠損マウスの作製及びガンマ線照射】

C57BL/6J *Ptch1*^{+/−}雄マウスと野生型 C3H/HeNcr 雌マウスを交配し、C3B6F1 マウスを作製した。出産後 PCR 法により遺伝子タイピングを行い、C3B6F1*Ptch1*^{+/−}マウスを判定した。生後 1 日齢及び生後 4 日齢の C3B6F1*Ptch1*^{+/−}マウスにガンマ線 1.0 Gy (ガンマセル、線源 ¹³⁷Cs、線量率約 0.4 Gy/min) を全身照射した。

【放射線初期応答】

照射 1、3、24 時間後に解剖を行い、脳を摘出して 10%緩衝ホルマリン液にて 24 時間固定した。固定後、パラフィン包埋し、切片を作製、 γ H2AX (purified anti-H2AX Phospho (Ser139): BioLegend) の免疫組織化学染色を行った。病理標本はスライドスキャナー (NanoZoomer-XR) を用いて電子化し、バーチャル画像を作製した。

【生後 21 日齢時における前がん病変の検出及び分子メカニズム解析方法の検討】

生後 21 日齢時に解剖を行い、脳を摘出し 10%緩衝ホルマリン液にて 24 時間固定した。固定後、パラフィン包埋した。前がん病変部は、これまでの研究により Ki-67 陽性であることが明らかとなっている (Matsuo et al., Exp. Toxicol. Pathol., 2013) ため、切片を作製し、Ki-67 (Rabbit Anti-Human Ki-67 (CloneSP6): SPRING Bioscience) 免疫組織化学染色を行った。

前がん病変部における分子メカニズム解析 (野生型 *Ptch1* 遺伝子の消失パターンの検出) は、研究当初、C57BL/6J マウスの特徴である *Nnt* 遺伝子 (C57BL/6J は *Nnt* 遺伝子の exon7-11 が欠損しているが、C3H/HeNcr は正常) を利用した免疫組織化学染色法を用いて判別する方法を試みた (図 3)。しかしながら、exon7-11 をターゲットとした *Nnt* 抗体での免疫組織化学染色では

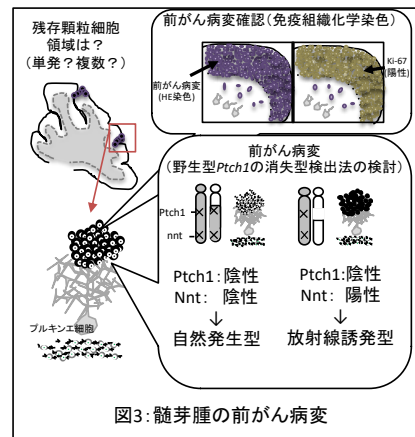
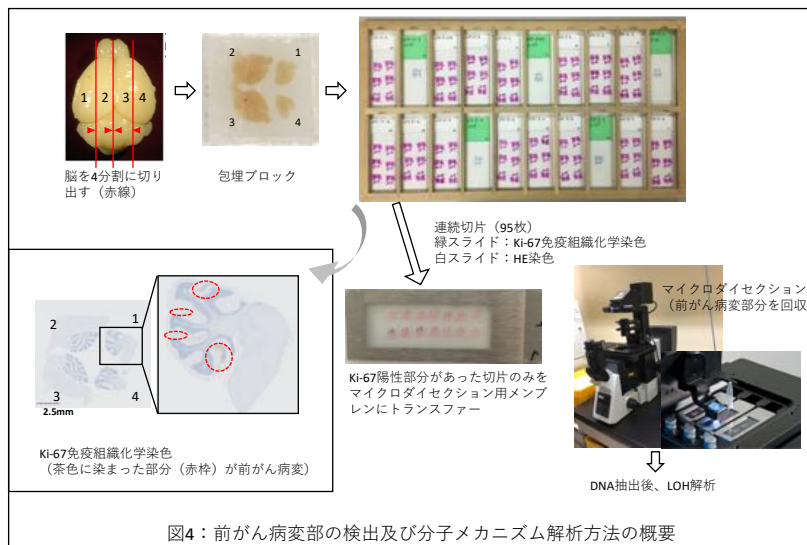


図 3 に示す仮説のような陽性反応を示さなかったことから、マイクロダイセクション法を用いた従来の LOH 解析を行う方法へと切り替えた。

方法は以下に示す通りである (図 4)。10%緩衝ホルマリン固定後、脳を 4 分割し包埋した。3 μ m の薄切切片を 95 枚作製 (約 300 μ m 厚分) した。5 枚 (18 連続切片に 1 枚) は Ki-67 免疫組織化学染色を、



残り 90 枚は HE 染色し、病理標本はスライドスキャナー (NanoZoomer-XR) を用いて電子化し、バーチャル画像を作製した。Ki-67 陽性部分 (前がん病変) があつた切片のみをレーザーマイクロダイセクション用メンブレンスライドへトランスファーし、レーザーマイクロダイセクション装置を用いて前がん病変部分を採取、DNA を抽出した。LOH 解析はこれまでの方法 (Ishida et al, Carcinogenesis, 2010、Tsuruoka et al, Radiat. Res., 2016) を用いて行った。

4. 研究成果

【放射線初期応答 (γ H2AX)】

生後 1 日齢および 4 日齢の照射後、1、3、24 時間目の小脳 (外顆粒層) における γ H2AX の免疫組織化学染色標本を用いて、DSB を観察した。その結果、どちらの被ばく時年齢時においても時間経過 (1、3、24 時間目) とともに γ H2AX 陽性フォーカスを有する顆粒神経前駆細胞の割合は減少し、被ばく時年齢による顕著な違いは認められなかった。これらのことより、生後 1 日齢と 4 日齢の被ばくでは、照射による初期応答には差が生じない可能性が示唆された。しかしながら、照射後 24 時間以降の DSB 修復能、apoptosis などの細胞致死や分裂能の変化などを検討し、初期応答を評価することが必要と考えられる

【生後 21 日齢時における前がん病変】

非照射群、生後 1 日齢群および 4 日齢照射群共にすべての小脳において Ki-67 陽性顆粒細胞の集簇を観察した。また、一個体あたり Ki-67 陽性細胞の集簇が複数カ所観察され、非照

射群で平均 2.3 カ所、生後 1 日齢群で平均 4.4 カ所、生後 4 日齢群で平均 3.6 カ所だった。また、バーチャルスライドを用いて各 Ki-67 陽性細胞の集簇巢の体積を算出した結果、非照射群：平均 0.013mm³、生後 1 日齢群：平均 0.216 mm³、生後 4 日齢群：平均 0.015 mm³であった。これらのことから、被ばくにより小脳の複数カ所から Ki-67 陽性顆粒細胞の集簇巢(ガンの目、前がん病変)が発生することがわかった。

次に Ki-67 陽性細胞の集簇巢における LOH 解析を行い、野生型 *Ptch1* 遺伝子の消失パターンより自然発症型(組み換えにより消失)及び、放射線誘発型(欠失により消失)に分類した。その結果、非照射群では消失パターンが全て自然発症型であり、放射線誘発型は検出されなかった。一方、生後 1 日齢群および 4 日齢群においては自然発症型及び放射線誘発型の両方が検出された。興味深いことにどちらの被ばく時年齢群においても一頭体内でこの両型が混在していた。そこで自然発症型および放射線誘発型と体積との関係性を検討した結果、生後 1 日齢群では、放射線誘発型前がん病変巢の方が自然発症型よりも体積が大きかった個体、自然発症型前がん病変巢の方が大きかった個体と個体毎により異なっていた。興味深いことにどの個体の自然発症型および放射線誘発型前がん病変巢の体積は、非照射群および生後 4 日齢群の前がん病変巢よりも大きかった。生後 4 日齢群においては、どちらの型でも体積はほぼ同等であり、非照射群に比べても差は認められなかった。この結果は、生後 1 日齢および 4 日齢のどちらにおいても被ばくにより野生型 *Ptch1* 遺伝子の欠失を引き起こし、がんへと進展するが、生後 1 日齢が 4 日齢に比べ進展速度が速いことを示唆している。さらに生後 1 日齢での被ばくは、自然発症型前がん病変の体積も非照射群や生後 4 日齢群の前がん病変に比べ増加させたことより、*Ptch1* 遺伝子の消失以外の要因を惹起させることで、がんへの進展を加速させている可能性が示唆される。言い換えると、*Ptch1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおける髄芽腫は、*Ptch1* 遺伝子の消失により Hedgehog シグナル伝達経路の応答が停止しなくなることにより発症するが、放射線感受性時期ではさらに別の要因が発がんの進行を加速させている可能性があることが考えられる。これら放射線誘発髄芽腫の発生メカニズムを解明するためには、今後より詳細な解析が必要となる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. 鶴岡千鶴、島田義也：放射線による髄芽腫の発生とヘッジホッグシグナル経路. 医学のあゆみ「Gorlin 症候群-発生から治療法まで」. 268(2), 136-138, 2019.
2. A. Nagayasu, S. Kakinuma, M. Nishimura, Y. Shang, M. Sunaoshi, C. Tsuruoka, H. Ishihara, Y. Shimada and Y. Kobayashi, Kinetics of cytokine mRNA and protein expression by plastic adherent cells in the thymus after split-dose irradiation. *Cytokine*, 114C, 92-970, 2019.
3. 鶴岡千鶴、柿沼志津子：低線量率被ばく後の発がん影響 -動物実験において-. *Radioisotopes*, 755(2), 2-6, 2018.
4. Y. Shang, Y. Sawa, B.J. Benjamin, C. Tsuruoka, H. Nogawa, Y. Shimada and S. Kakinuma, Radiation exposure enhances hepatocyte proliferation in neonatal mice but not in adult mice. *Radiat. Res.*, 188(5), 235-241, 2017.
5. 鶴岡千鶴、柿沼志津子：「じわじわ」被ばくの発がん影響を動物実験で明らかに. 日本原子力学会アトモス、59, 340-343, 2017.
6. 今岡達彦、高島賢、鶴岡千鶴、西村由希子、飯塚大輔、島田義也、柿沼志津子：乳腺の幹細胞系：細胞表面マーカーと細胞系譜追跡の研究から. 乳癌基礎研究、25, 15-25, 2017.
7. C. Tsuruoka, B.J. Benjamin, T. Morioka, M. Kaminishi, M. Shinagawa, Y. Shimada and S. Kakinuma, Sensitive detection of radiation-induced medulloblastomas after acute or protracted gamma ray exposures in *Ptch1* heterozygous mice using a radiation-specific molecular signature. *Radiat. Res.*, 186(4), 407-414, 2016.
8. 今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、高島賢、西村由希子、蒲地雄大、森山ひとみ、鶴岡千鶴、柿沼志津子、島田義也：放射線被ばくと BRCA 変異保因者の乳がんリスク. 乳癌基礎研究、24, 7-15, 2016.
9. 鶴岡千鶴、島田義也、柿沼志津子：放射線被ばく。脳腫瘍学 (日本臨牀)、74 卷(増刊号 7)、77-82, 2016.

[学会発表] (計 7 件)

1. 鶴岡千鶴、森岡孝満、上西睦美、品川まゆみ、柿沼志津子、放射線誘発髄芽腫の発生過程における前がん病変の解析. 日本放射線影響学会第 61 回大会. 2018.
2. 鶴岡千鶴、Blyth Benjamin J、森岡孝満、上西睦美、品川まゆみ、島田義也、柿沼志津子、*Ptch1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおける髄芽腫の発がん影響—放射線特異的変異を用いた低線量率被ばくのリスク評価—第 33 回発癌病理研究会. 2018.
3. 鶴岡千鶴、柿沼志津子、塚本智史、鬼頭靖司、小久保年章、和田彩子、島田義也、矢野幸子他、ISS 凍結受精卵から発生するマウスの宇宙放射線影響の解析 3. 日本宇宙生物科学会第 32 回大会. 2018.
4. 鶴岡千鶴、Blyth Benjamin J、森岡孝満、上西睦美、品川まゆみ、島田義也、柿沼志津子、放射線誘発変異シグネチャーを用いた低線量率被ばくによる発がんリスク評価. 日本放射

線影響学会第 60 回大会.2017.

5. 鶴岡千鶴、Blyth Benjamin J、森岡孝満、上西睦美、品川まゆみ、島田義也、柿沼志津子、
Detection of radiation signature in medulloblastoma after protracted gamma-ray in
Ptch1heterozygous mice. 63rd Annual Radiation Research Society Meeting.2017.
6. 鶴岡千鶴、上西睦美、品川まゆみ、尚奕、甘崎佳子、島田義也、柿沼志津子、中性子線及
びγ線に被ばくした Ptch1 遺伝子ヘテロ欠損マウスによる発がん影響.日本宇宙生物科学
会第 30 回大会.2016.
7. 鶴岡千鶴、上西睦美、品川まゆみ、尚奕、甘崎佳子、柿沼志津子、Tumor inductive and
suppressive effects of neutrons are dependent on the age at exposure in the
medulloblastoma development of Ptch1 heterozygous mice.第 7 回国際放射線神経生物学
会.2016.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：柿沼 志津子

ローマ字氏名：KAKINUMA Shizuko

研究協力者氏名：森岡 孝満

ローマ字氏名：MORIOKA Takamitsu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)