

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18197

研究課題名（和文）放射線変異シグネチャーによる消化管発がんの低線量・低線量率被ばく影響の評価

研究課題名（英文）An evaluation of the effects of low-dose and low-dose-rate exposure on intestinal tumors by radiation mutation signatures

研究代表者

柳原 啓見 (YANAGIHARA, Hiromi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線影響研究部・研究員

研究者番号：50719474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：低線量・低線量率放射線被ばくによる発がんリスクは未解明である。本研究では、発がんモデル動物を用いて、ゲノム変異パターンにより、発生した腫瘍を放射線誘発型と自然発症型に区別する方法を確立した。その結果、放射線誘発腫瘍の正確な発生頻度の算出が可能となった。この方法は、低線量・低線量率放射線の生体影響、特に発がんリスクの評価への貢献が期待できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低線量・低線量率放射線による影響は、急照射被ばくと比較して小さいことから正確なリスク評価が困難であるため、その影響評価法の構築が求められている。本研究では、放射線被ばくに起因する腫瘍を高精度に定量化可能な評価法を構築した。これにより、正確な低線量・低線量率放射線の影響と防護の対策の理解につながる科学的に新しい情報を提供することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Carcinogenic risk of low-dose and low-dose-rate radiation exposure is unclear. In this study, we constructed the method to distinguish between radiation-induced and spontaneous tumors using genomic mutation patterns in a mouse model of intestinal carcinogenesis. As a result, it was possible to calculate the accurate frequency of radiation-induced tumors. This method is expected to contribute to the evaluation of accurate biological effects of low-dose and low-dose-rate radiation, especially carcinogenic risk.

研究分野：放射線生物学

キーワード：低線量率放射線 放射線発がん Apc Minマウス 放射線変異シグネチャー LMD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 低線量・低線量率放射線影響研究への分子学的アプローチ

放射線災害や医療被ばくの増加に伴い低線量・低線量率放射線被ばくによる健康影響についての関心が高まる一方で、その影響についての統一見解を示せていない。これは、放射線分野の大きな課題である。特に低線量放射線で問題となることは発がんと遺伝的影響である。しかし、腫瘍の形状や病理組織解析では、放射線に起因して発生した腫瘍なのかを判断することは困難であるため、従来のがん発生率だけで行われてきたリスク評価法では正確性に限界があった。この問題を克服するため、放射線変異シグネチャーによる放射線誘発がんと自然発がんとの識別法を開発し、発がんに至る放射線影響の実体を分子レベルで捉えることは重要である。

(2) 低線量・低線量率放射線誘発がんの識別法と問題点

先行研究において、髄芽腫モデルマウスや腎癌モデルラットを用いて、LOH解析とコピー数解析により放射線誘発がんと自然発生がんの識別法を確立し、放射線による発がんリスク評価系の構築が行われてきた (Ishida *et al.* Carcinogenesis 2010, Tsuruoka *et al.* Radiation Research 2016, Tsuruoka *et al.* Radiation Research 2021, Inoue *et al.* Cancer science 2020)。しかし、これらの動物モデルでは一頭あたりの腫瘍発生数が1~数個と非常に少なく、リスク評価には多くの実験動物が必要となる問題点があった。

2. 研究の目的

本課題では髄芽腫モデルマウスや腎癌モデルラットで確立したリスク評価法を他のモデルマウスへ適応可能かを判断する。より汎用性を持たせるため、放射線感受性臓器の1つである消化管に応用し、消化管発がんモデルマウスを用いて放射線誘発がん細胞が有する特異的ゲノム変異(放射線変異シグネチャー)を捉える方法を確立することを目的とした。この手法を用いて低線量・低線量率放射線の影響評価への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス

ヒト家族性大腸腺腫症のモデルである C57BL/6 *Apc*^{Min/+}マウスは、片側アリルの変異を有し、消化管腫瘍を多発する。C3H/HeJ 野生型マウスと交配した F1 マウス (C3B6F1 *Apc*^{Min/+}マウス) に生じた消化管腫瘍のアーカイブサンプルを用いた。

(2) 照射条件

線源として ¹³⁷Cs 線を用い、照射線量率は高線量率 0.5 Gy/min、低線量率 0.005~0.1 mGy/min で総線量 0, 0.1, 0.5, 2.0 Gy を生後 2 週齢のマウスに照射した。

(3) 発がん率の算出

C3B6F1 *Apc*^{Min/+}マウスを 30 週齢時に解剖を行い、小腸と大腸を採取しホルマリン固定後、実顕微鏡下で腫瘍の大きさを計測、照射群および対照群において発生した消化管腫瘍を計数した。2 mm 以上の腫瘍をパラフィン包埋し、パラフィン組織切片を HE 染色し組織学的解析により浸潤の有無を診断した。

(4) 小腸腫瘍を用いたゲノム解析

腫瘍組織のみを抽出した高品質な解析を遂行するために、APC 欠損による カテニンの蓄積を指標に用いた。カテニン抗体を用いた免疫組織化学染色を行った組織標本から、レーザーマイクロダイセクション (LMD) システムを用いて、カテニン高蓄積部位の消化管腫瘍組織を単離

した。抽出した DNA を用いて、Apc 遺伝子を含む 18 番染色体のヘテロ接合性消失 (LOH) 解析と全ゲノム増幅後のアレイ CGH 解析を行い、微細な欠失やコピー数変化を捉えた。

4. 研究成果

(1) C3B6F1Apc^{Min/+}マウスは放射線影響評価モデルとして有用である

放射線照射による腫瘍形成への関与を調べるために、2 週齢の Min マウスに 2 Gy 照射を行い、30 週齢で剖検した。その結果、非照射群と比較し放射線照射群において小腸腫瘍の数と浸潤を伴う腺癌の発生率が優位に増加した (表 1)。これは雌雄ともにみられた特徴である。これらの結果から、C3B6F1Apc^{Min/+}マウスは放射線影響評価モデルとして有用であるといえる。

表 1 C3B6F1 Apc^{Min/+} マウスにおける小腸腫瘍の発生頻度

性別	照射	腫瘍数 (個) / マウス	腺癌の割合 (%)
オス	0 Gy	15.4 ± 2.5	14/63 (22)
	2 Gy	26.2 ± 9.1*	29/87 (33)*
メス	0 Gy	13.6 ± 3.8	9/58 (16)
	2 Gy	24.4 ± 4.1**	22/73 (30)

*P < 0.05, **P < 0.005 vs. 0 Gy.

(2) C3B6F1Apc^{Min/+}マウスの腫瘍モザイク状を考慮したゲノム解析による放射線誘発がんの識別法を確立した

発がんに関わる カテニン (細胞内シグナル伝達因子) は大腸がん、乳がん、肝がん等の腫瘍組織において過剰蓄積することが知られている。β-カテニンの核内または細胞質内蓄積は正常型 Apc 遺伝子消失の特徴であるが、今回、特に進行した腺癌の β-カテニン染色像は腫瘍内モザイク性を示し、Apc 変異腫瘍細胞が消化管腫瘍内に不均一に存在することが明らかとなった (図 1)。免疫誘導レーザー・マイクロダイセクション法により β-カテニン過剰発現細胞のみを組織切片から分取し、ゲノム解析を行なった。LOH および DNA コピー数解析から、Apc+対立遺伝子の消失パターンは nondisjunction/mitotic-recombination 型と interstitial deletion 型に分類された。注目すべきは、後者が放射線照射群の腫瘍でのみ観察されたことである。この結果は、このマウスモデルで発生した消化管腫瘍において自然誘発と被ばくに起因した腫瘍を識別することが可能であること、また放射線被ばく後発生した腫瘍の頻度を算出可能であることを示唆している。

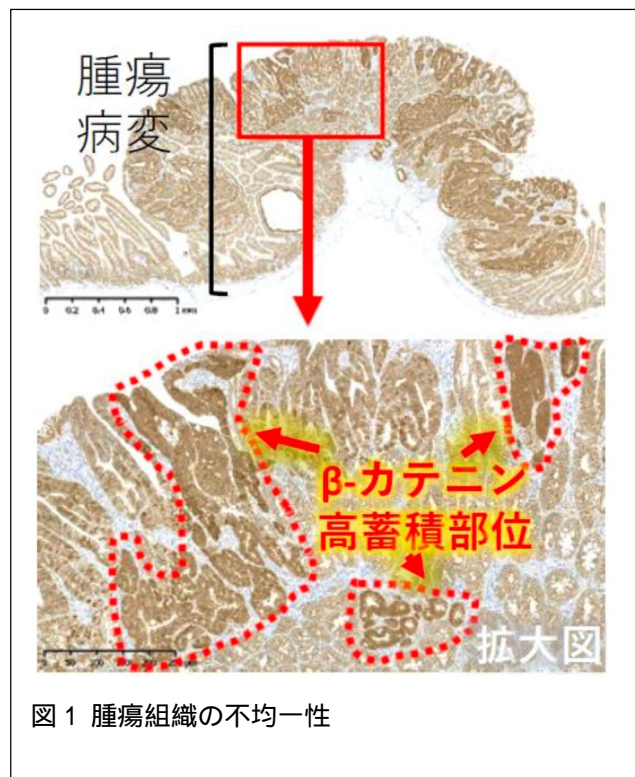


図 1 腫瘍組織の不均一性

(3) 今後の展望

本研究では、放射線被ばくに起因する腫瘍誘発効果を高精度に定量化することが可能となった。この方法は、C3B6F1Apc^{Min/+}マウスを用いた放射線の発がんリスクを評価するのに有用であると考えられる。このような評価法は、正確な低線量・低線量率放射線の影響と防護の対策の理解につながる科学的に新しい情報を提供することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 MORIOKA TAKAMITSU, YAMAZAKI SHUNSUKE, YANAGIHARA HIROMI, SUNAOSHI MASAAKI, KAMINISHI MUTSUMI, KAKINUMA SHIZUKO	4. 巻 41
2. 論文標題 Calorie Restriction Suppresses the Progression of Radiation-Induced Intestinal Tumours in C3B6F1 ApcMin/+ Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1365 ~ 1375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Tatsuya, Kokubo Toshiaki, Daino Kazuhiro, Yanagihara Hiromi, Watanabe Fumiko, Tsuruoka Chizuru, Amasaki Yoshiko, Morioka Takamitsu, Homma Takeda Shino, Kobayashi Toshiyuki, Hino Okio, Shimada Yoshiya, Kakinuma Shizuko	4. 巻 111
2. 論文標題 Interstitial chromosomal deletion of the tuberous sclerosis complex 2 locus is a signature for radiation associated renal tumors in Eker rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 840 ~ 848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柳原啓見, 山崎隼輔, 山田裕, 森岡孝満, 鶴岡千鶴, 甘崎佳子, 上西睦美, 遠坂歌子, 島田義也, 柿沼志津子
2. 発表標題 放射線被ばくに起因する消化管腫瘍の評価法の確立
3. 学会等名 第56回アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳原啓見, 山崎隼輔, 山田裕, 森岡孝満, 鶴岡千鶴, 甘崎佳子, 上西睦美, 遠坂歌子, 西村まゆみ, 島田義也, 柿沼志津子
2. 発表標題 消化管腫瘍モデルマウスを用いた放射線の被ばくに起因した腫瘍の評価
3. 学会等名 第34回発癌病理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanagihara H, Yamazaki S, Yamada Y, Morioka T, Tsuruoka C, Amasaki Y, Kaminishi M, Enzaka U, Shimada Y, Kakinuma S
2. 発表標題 Development of a method for distinguishing radiation-induced and spontaneous intestinal tumors of C3B6F1 ApcMin/+ mice
3. 学会等名 65th Annual Radiation Research Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Yanagihara, Shunsuke Yamazaki, Yutaka Yamada, Takamitsu Morioka, Chizuru Tsuruoka, Yoshiko Amasaki, Mutsumi Kaminishi, Utako Enzaka, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma
2. 発表標題 Estimation of radiation-related cancer risk based on signature mutation using a murine model of intestinal neoplasia
3. 学会等名 the 64th Annual Radiation Research Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関