

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24600030

研究課題名(和文) カロリー制限が子ども期放射線被ばく誘発肝がんの発生を低減する

研究課題名(英文) Cancer prevention effect of calorie restriction on radiation-induced hepatocellular carcinoma in B63F1 mouse model

研究代表者

尚 奕 (Shang, Yi)

独立行政法人放射線医学総合研究所・福島復興支援本部・研究員

研究者番号：50533189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： カロリー制限は、がんの発生を予防する方策として注目されている。しかし、成長期であるこどもの場合、カロリー制限をすることはできない。我々は、こども期に被ばくしても、成体期からカロリー制限を行うことによって、肝がん発生が有意に低減することをマウスを用いて実験的に証明した。

本研究では、カロリー制限による放射線発がんの抑制メカニズムを解明することを目的とし、突然変異検出マウス(gptトランスジェニックマウス)を用いて、被ばく後の突然変異の蓄積を解析した。発生した肝がんにおけるゲノムや遺伝子発現解析により、カロリー制限で抑制される発がん経路の同定を行った。

研究成果の概要(英文)： Children are especially sensitive to radiation, limiting their cancer risk is of great public concern. Earlier we reported in mouse model exposed to childhood radiation, adult-onset CR effectively suppressed liver tumor development. In this study, mutation frequencies of hepatocytes using gpt delta transgenic mouse were analyzed to investigate if CR contributes to decrease mutation accumulation. Hepatocellular carcinoma (HCC) samples were investigated for loss of heterozygosity (LOH), genomic copy number aberration and gene expression profiling. Even irradiated hepatocytes showed higher mutation frequency, there was no significant difference detected between standard and CR groups. CR groups showed lower frequencies of LOH and genomic copy number aberration. Differences in gene expression between standard and CR were also observed. These results suggested that CR might be related to the conservation of genomic stability, contributing to the suppression of HCC development.

研究分野：放射線発がん

キーワード：カロリー制限

1. 研究開始当初の背景

医用放射線応用の普及や原子力の利用に伴って、放射線の人体影響が無視でき無くなってきた。特に、子ども期の放射線被ばくは、被ばく後の生存期間が長く、長期発がん影響が懸念されることから、社会的関心が高まっている。カロリー制限は、古くから発がん低減効果があることが知られている。しかし、カロリー制限の発がん抑制分子メカニズム研究は、この数年盛んに進められているが、放射線発がんに関する報告はまだ少ない。

これまで、成長期の子どもにカロリー制限はできないため、研究対象は大人に留まることが現状である。一方、発がん過程にはいくつものプロセスがあって、その長期性を考えると、大人になってからでも一部の抑制効果が期待できる。しかし、今まで、それを検討した報告は一例もない。

以上の現状にふまえて、我々は放射線誘発マウス肝がん発生モデルを用いて、子ども期の放射線被ばくで誘発される肝がんの発生頻度が成体期からのカロリー制限によって低減され、発がん時期も遅延することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、カロリー制限による放射線発がんの抑制メカニズムを解明することを目的とする。即ち、突然変異検出マウス(*gpt*トランスジェニックマウス)を用いて、被ばく後の突然変異の蓄積を解析し、カロリー制限によるグローバルな突然変異の蓄積速度が緩やかになることを検証した。発生した肝がんにおけるゲノム(ならびにエピゲノム)や遺伝子発現解析により、抗酸化経路やDNA修復系、炎症応答に注目し、遺伝子発現のグローバルな変化及びカロリー制限で抑制される発がん経路の同定を試みた。

3. 研究の方法

B6C3F1 及び変異検出系 B6C3F1^{gpt+/-}マウスを用いて、生後1週齢にX線3.8Gyを全身照射後、7週齢からカロリー制限を開始し、餌95Kcal/週/匹(AL)または65Kcal/週/匹(CR)(当研究所吉田らにより確立されたカロリー制限法(Yoshida, et al. PNAS, 1997))を摂取させた。

1) **変異検出実験**: B6C3F1^{gpt+/-}マウスは照射群/非照射群ともに7週齢(カロリー制限前)10週齢(カロリー制限直後)40週齢(肝がん発生期)72週齢(肝がん進行期)に1タイムポイント9~12匹解剖し、肝臓組織を採取、凍結保存済みである。H24年度に病理標本作製すると同時に、ゲノムDNAを抽出し、*gpt* assayを用いて、蓄積した突然変異の頻度及び変異スペクトラムの経時的

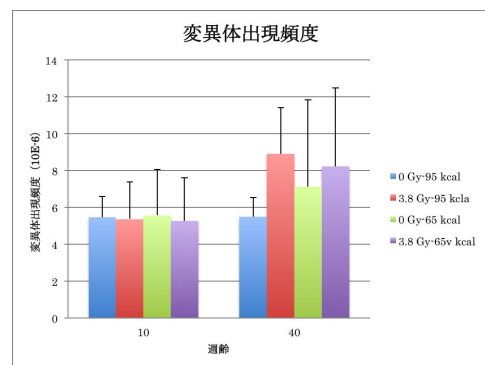
変化を調べた。また、変異検出実験と同じ凍結サンプルを使用し、遺伝子発現アレイ法を用いて、被ばく後肝臓細胞の遺伝子発現がカロリー制限の有無による違いを経時的に調べた。

2) **発がん実験**: B6C3F1マウスは生涯飼育し、瀕死個体の病理解剖を行い、肝がん組織を採取するとともに肝がんの発生頻度、病理分類を集計した。また、採取した肝がん組織を用いて、アレイCGH及び遺伝子発現アレイを行い、カロリー制限によって変化するがん関連遺伝子群を網羅的に調べた後、特異的に変化する遺伝子、発がん経路をさらに詳しく解析した。

4. 研究成果

変異検出実験: B6C3F1^{gpt+/-}マウス肝臓組織を用いて *gpt* assay を行った結果、照射直後(10週齢)に比べて、40週齢時に変異体検出頻度の上昇が認められたが、95kcal群と65kcal群の間に統計的有意な差が見られなかった。変異スペクトラムを解析した結果、10週齢時に1塩基欠失が多かったに対して、40週齢時には1塩基欠失が減少し、塩基置換の割合の増加傾向が見られた。

これまでの結果から、カロリー制限が炎症反応を抑制し、酸化ストレスを軽減することによって、照射後の変異蓄積を減速させることを期待したが、解析した結果ではその仮説を支持する根拠を提示できなかった。*gpt* assay はグローバルな突然変異を検出する有用な実験系であるが、変異頻度が低い時には、統計的有意な計算を行うために、変異コロニーの数を増やさなければいけない。よって、DNA抽出やアッセイする時の形質転換にもっと大量なサンプルが必要とな

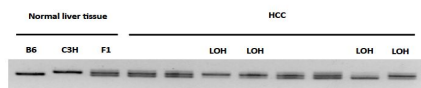


る。先行研究では各実験群では1タイムポイントに9~12匹マウスのサンプルを保存済みであったが、解析できたのが1タイムポイント3~5匹分しかなかった。今後72週齢のサンプルを含めて解

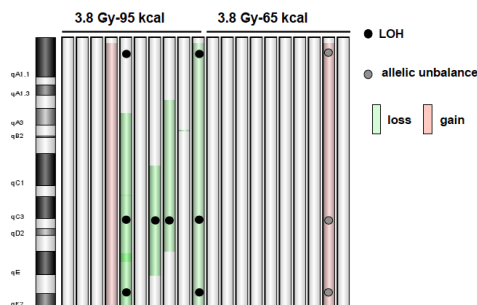
析サンプルを増やして、仮説を検証することが課題となる。

また、同じサンプルの遺伝子発現アレイ解析で、カロリー制限が開始直後から40週齢まで調べた結果、制限しないサンプルに比べて、制限群の肝臓細胞における概日リズムを制御する遺伝子の発現が長期にわたって有意に変動した。このパスウェーの発がんへの寄与に今後注目すべきである。

発がん実験：B6C3F1 マウスは生涯飼育し、得られた肝がんサンプルを病理診断によって腫瘍タイプ、悪性度を確定した。最も発生頻度の高い肝細胞がん (hepatocellular carcinoma, HCC) の非照射群の95 kcalと65kcal 2群から各4例、照射群2群から各10例、計28例を用いて、全染色体の loss of heterozygosity (LOH) 解析、array-based comparative genomic hybridization(アレイ CGH) 解析、遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。全染色体の LOH 結果では、各実験群から4番染色体の LOH が高頻度(25~60%)に検出された。HCC の発生に必須となるがん抑制遺伝子が4番染色体に位置することが示唆された。

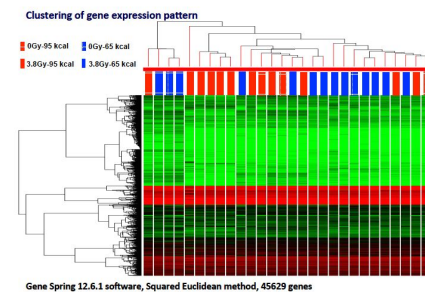


同じ HCC サンプルを用いたアレイ CGH 解析でもゲノムコピー数の異常が確認された。非照射群に比べて、照射群のゲノム欠失や増幅の頻度が高く、ゲノムコピー数が変化しないサンプルの一部には、mitotic recombination を介した LOH を示すサンプルも見られた。このようなゲノム変化は、照射群の中では、カロリー制限群に比べて非制限群で頻繁に観察された。



さらに、HCC サンプルの遺伝子発現マイクロアレイ解析では、カロリー制限の

有無によって、発生した HCC の遺伝子発現パターンが異なることが分かった。パスウェー解析から、カロリー制限による細胞増殖の抑制、細胞周期の停止、炎症反応の低減が示唆された。



以上の結果から、カロリー制限による肝がん発生の抑制効果の分子機構として、ゲノム不安定性の低減、炎症反応と細胞周期の制御が深く関与することが示唆された。ヒトの場合、肝炎ウイルスの感染、脂肪性肝炎の進行が肝がん発症の重要過程であることが良く知られている。マウスを用いた本研究においてカロリー制限による炎症抑制、細胞増殖制御が確認されたことによって、ヒトの肝がん予防にも有望な方策を提示できたと考えられる。これらの結果を論文に纏めて、投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Masaaki Sunaoshi, Yoshiko Amasaki, Shinobu Hirano-Sakairi, Benjamin J Blyth, Takamitsu Morioka, Mutsumi Kaminishi, Yi Shang, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Shizuko Kakinuma. The effect of age at exposure on the inactivating mechanisms and relative contributions of key tumor suppressor genes in radiation-induced mouse T-cell lymphomas. *Mutation Research*, in press. 査読有

Benjamin J. Blyth, Shizuko Kakinuma, Masaaki Sunaoshi, Yoshiko Amasaki, Shinobu Hirano-Sakairi, Kanae Ogawa, Ayana Shirakami, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada. Genetic Analysis of T Cell Lymphomas in Carbon Ion-Irradiated Mice Reveals Frequent Interstitial Chromosome Deletions: Implications for Second Cancer Induction in Normal Tissues During Carbon Ion Radiotherapy. *Plos one*, in press. 査

読有

Yi Shang, Shizuko Kakinuma, Kazumi Yamauchi, Takamitsu Morioka, Shusuke Tani, Takashi Takabatake, Yasushi Kataoka, Yoshiya Shimada. Cancer prevention by adult-onset calorie restriction after infant exposure to ionizing radiation in B6C3F1 male mice. International journal of cancer. Journal international du cancer, 135(5), 1038 - 1047, 2014-09, 査読有

DOI:10.1002/ijc.28751

尚 奕, 柿沼 志津子, 島田 義也. カロリー制限による放射線発がんリスクの低減. 放射線生物研究, 49(3), 293 - 302, 2014-09, 査読有

森岡 孝満, 柿沼 志津子, 西村 まゆみ, 砂押 正章, 尚 奕, 鶴岡 千鶴, 今岡 達彦, 山田 裕, 吉見 直己, 島田 義也. フィトケミカルによるがんの化学予防 フィトケミカルの放射線誘発がんに対する予防剤としての期待 放射線生物研究, 48(2), 164 - 180, 2013-06, 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

尚 奕, 柿沼 志津子, 臺野 和広, 森岡 孝満, 小久保 年章, 島田 義也. Effect of Calorie Restriction on the Molecular Mechanism of Radiation-induced Hepatocellular Carcinoma in Mouse Model. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), Kyoto University, 2015-05-28

尚 奕, 柿沼 志津子, 山内 一巳, 森岡 孝満, 小久保 年章, 島田 義也

Cancer prevention by calorie restriction after early life exposure to X-rays irradiation in mice 放射線防護研究センター(WHO 協力)シンポジウム「こどもの放射線被ばくを考える」(8,9 日)にて発表のため, NIRS, 2014-12-09

尚 奕, 柿沼 志津子, 森岡 孝満, 小久保 年章, 島田 義也.

Cancer prevention by calorie restriction after exposure to ionizing radiation in mice 第 73 回日本癌学会学術総会, 日本癌学会, 2014-09-27

尚 奕, 柿沼 志津子, 臺野 和広, 森岡 孝満, 小久保 年章, 島田 義也

カロリー制限による放射線誘発マウス肝がんにおける遺伝子発現の違い。第 71 回日本癌学会学術総会, 日本癌学会, 2012-09-21

〔図書〕(計 1 件)

島田 義也, 西村 まゆみ, 今岡 達彦, 臺野 和広, 山田 裕, 武田 志乃, 甘崎 佳子, 尚 奕, 柿沼 志津子. 低線量被ばく KEY BOOK 胎児・こどもに対する放射線の影響. 低線量被ばく KEY BOOK : 正しい知識で深く理解する! 91 - 99, 2012-11

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尚 奕 (SHANG Yi)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・福島復興支援本部・研究員

研究者番号: 50533189

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

臺野 和広 (DAINO Kazuhiro)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号: 90543299

森岡 孝満 (MORIOKA Takamitsu)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・放射
線防護研究センター・主任研究員
研究者番号： 70253961

柿沼 志津子 (KAKINUMA Shizuko)
独立行政法人 放射線医学総合研究所・放射
線防護研究センター・チームリーダー
研究者番号： 20392219