

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340026

研究課題名(和文) ラット放射線誘発甲状腺腫瘍の年齢影響

研究課題名(英文) Age-dependent effects on radiation-induced carcinogenesis in rat thyroid

研究代表者

松山 睦美(松鶴睦美)(MATSUYAMA, Mutsumi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：00274639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘発甲状腺がんの年齢影響を明らかにするため、未熟4週齢(4W)、成熟4ヵ月齢(4M)、7ヵ月齢(7M)ラットに8GyX線を照射し、甲状腺腫瘍の発症率、DNA損傷応答の変化、オートファジー関連分子について調べた。腫瘍発生率は、非照射群では4W、4M、7Mそれぞれ0、14.3、16.7%に対し、照射群は61.9、63.6、33.3%で、若齢被曝では様々な種類の癌が多発性に発生した。若齢では1ヵ月で53BP1核内focus、細胞死、増殖細胞数が非照射よりも高値で、12ヵ月には両週齢共低下した。若齢低分化癌のLC3とp62と、髄様癌のAtg5とAtg4bの発現低下が見られた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the age-dependent effects to radiation-induced thyroid carcinogenesis, we examined the incidence of radiation-induced thyroid tumor, the change of DNA damage response, the expression of autophagy-related molecule of tumor tissue of immature 4-week old (4W), adult 4-month (4M), and 7 month (7M) rats after 8 Gy X-ray irradiation. The incidence of thyroid tumor was 0, 14.3 and 16.7 % in non-irradiated, and 61.9, 63.6 and 33.3 % in irradiated 4W, 4M and 7M rats respectively. It has been found that the various types of thyroid tumor were occurred multiple in young irradiated rats. At 1 month, the number of 53BP1 foci, cell death and proliferating cells of irradiated group in young rats were higher than non-irradiated rats, and at 12 month these value was decreased to control level in both group. The expression of LC3 and p62 in the poorly differentiated carcinoma and the gene expression of Atg5 and Atg4b in medullary carcinoma of young irradiated rats were decreased.

研究分野：放射線生物学

キーワード：甲状腺濾胞上皮細胞 ラット 放射線 発がん オートファジー DNA損傷応答

1. 研究開始当初の背景

チェルノブイリ原発事故や原爆被爆者の疫学調査から小児期の放射線被ばくは甲状腺癌の危険因子であることが知られているが、年齢影響が何に起因するのかは実はよく解っていない。放射線による DNA の損傷は、細胞周期停止、DNA 修復、アポトーシス、細胞老化など様々なゲノム損傷応答(DNA damage response,DDR)を誘導する。発癌は、この DDR の機能低下により起きると考えられている。私たちはこれまでに、高線量 8Gy を未熟(4 週齢)及び成熟(8 カ月齢)ラットに全身照射し、急性期での甲状腺濾胞上皮細胞の DDR を比較解析した。結果として、未熟、成熟両群共 DDR 分子の核内フォーカス数、すなわち DNA 二重鎖切断は増加するものの、アポトーシスは誘導されず、未熟群では増殖細胞の低下、細胞質空胞変性、オートファジー関連分子の増加が観察されることが判明した(Matsuu-Matsuyama M et al., J Rad Res, 2015, 56: 493-501)。細胞内タンパク質分解系の一つで、恒常性維持やプログラム細胞死に關与するオートファジーが、癌においては抗腫瘍作用と腫瘍促進作用と相反する役割を持つことが報告されている(Long JS et al.,Oncogene 2012, 31(49): 5045-60)。私たちはこれまでに 7 週齢ラットに放射線局所照射後 18 カ月で腫瘍が形成されること、その形成過程で 53BP1 核内フォーカスや FISH シグナルの異常が見られ、ゲノム不安定性が惹起されることを報告している(蔵重智美ら 日本病理学会会誌 2012、101:424)。

2. 研究の目的

本研究は、放射線誘発甲状腺癌の年齢影響を分子病理学的手法で明らかにすることを目的とする。この研究では、未熟と成熟ラットで放射線誘発甲状腺腫瘍の発症率の違いを明らかにした上で、発がんに至るまでの各タイムポイントの甲状腺組織から、分子病理学的解析により DDR 分子、DNA 損傷、細胞老化、細胞死、増殖細胞、オートファジーの変化を中心に調べ、放射線誘発甲状腺癌の分子メカニズムについて探る。

3. 研究の方法

(1) 未熟 4 週齢ラット(4W)33 匹、4 カ月齢ラット(4M)13 匹、7 カ月齢ラット(7M)12 匹に X 線 8 Gy を麻酔下で前頸部に局所照射し、約 18 カ月後の甲状腺を一部 RNA 抽出用に供し、残りを組織標本作成のためホルマリン固定を行った。HE 染色、カルシトニン染色、サイログロブリン染色、Ki67 染色を行い、組織解析から腫瘍の発症率、種類、面積、増殖細胞率、個数を調べた。非照射のラットは 4W 24 匹、4M 14 匹、7M 13 匹を約 18 カ月まで飼育し、腫瘍発症率を調べた。

(2)未熟 4 週齢ラットと成熟 7 カ月齢ラットに前頸部 8 Gy X 線局所照射し、1、6、12 カ月後(それぞれ n=4-6)の甲状腺を摘出し、一

部 Western blot (WB)に供し残りをホルマリン固定し組織標本作製した。同じ週齢の非照射のラットも同じタイムポイントで甲状腺の組織を採取した(n=4-6)。組織標本では、53BP1 蛍光免疫染色(DNA 損傷応答)、TUNEL 染色(細胞死)、Ki67 免疫染色(増殖細胞)を行った。WB ではセリン 15 リン酸化 p53, p16, LC3, p62 の発現を調べた。照射後 6 カ月及び 12 カ月のラット血清を採取し TSH 値を測定した。(3)腫瘍を誘発した甲状腺組織のうち、4 W の放射線誘発低分化癌、髓様癌、7M の自然発症髓様癌、放射線誘発髓様癌の腫瘍組織でのオートファジー関連タンパク LC3 と p62 の蛍光免疫染色を行った。組織の一部から RNA を抽出し、オートファジー関連遺伝子の PCR Array(QIAGEN)を行った。その中から有意に変化があった 7 遺伝子について RT-PCR による発現解析を行った。

4. 研究成果

(1)放射線誘発甲状腺腫瘍の発症の年齢影響について、表 1 にまとめた。腫瘍発生率は、4 週齢ラットの非照射群で 0/16 (0%)に対し照射群で 13/21 (61.9%)だった。4 カ月齢ラットは非照射で 1/7 (14.3%)に対し照射群では 7/11 (63.6%)だった。7 カ月齢ラットは非照射で 1/6 (16.7%)に対し、照射群は 2/6 (33.3%)だった。悪性腫瘍に関しては、4 週齢ラットの非照射で 0/16 (0%)に対し照射群で 10/21 (47.6%)だった。4 カ月ラットは非照射で 1/7 (14.3%)に対し照射群では 5/11 (45.5%)だった。7 カ月ラットは非照射で 1/6 (16.7%)に対し、照射群は 1/6 (16.7%)だった。

表 1 . 4 週齢、4 カ月齢、7 カ月齢の放射線照射後の腫瘍発症率と腫瘍のタイプとサイズ

Age at irradiation	Number (Body Weight at Exposure)	Incidence of Thyroid Tumor (%), number of tumor, Incidence of malignant tumor	Tumor Type (Number)	Tumor Area (mm2)
0 Gy				
4 Weeks	24 (100-140g)	0/16 (0%), 0 0/16 (0%)		0
4 Months	14 (510-600g)	1/7 (14.3%), 1 1/7 (14.3%)	Medullary carcinoma (MC)	1.6 (n=1)
7 Months	13 (580-615g)	1/6 (16.7%), 2 1/6 (16.7%)	MC	5.5 (n=1)
8 Gy				
4 Weeks	33 (100-135g)	13/21 (61.9%), 28 10/21 (47.6%)	Adenoma (2), MC (4), Poorly differentiated carcinoma (PDC)+MC(1), MC+Epithelial tumor (ET) (3), Epithelial tumor, multifocal (2), Well differentiated carcinoma (WDC) on both sides (1)	5.7±2.1 (n=13)
4 Months	13 (505-595g)	7/11 (63.6%), 9 5/11 (45.5%)	Adenoma (2) MC (2) WDC (2) WDC+ET (1)	4.5±1.2 (n=7)
7 Months	12 (595-615g)	2/6 (33.3%), 2 1/6 (16.7%)	MC (2)	0.16±0.06 (n=2)

腫瘍のタイプは、4 週齢ラットで良性腫瘍(Adenoma) 2 例、髓様癌(Medullary carcinoma)4 例、両葉低分化癌(Poorly differentiated carcinoma)と髓様癌が 1 例、両葉髓様癌と上皮性腫瘍(Epithelial tumor)が 3 例、multifocal な上皮腫瘍 2 例、両葉高分化癌 1 例だった。4 カ月齢は、Adenoma 2 例、髓様癌 2 例、高分化癌(Well differentiated carcinoma) 2 例、高分化癌と上皮性腫瘍が 1 例だった。7 カ月齢では髓

様癌が2例であった。

放射線誘発甲状腺腫瘍の個数をカウントした結果、4週齢ラットでは28個、4ヵ月齢ラットは9個、7ヵ月齢は2個で、1つの症例に2個以上の腫瘍を持つ数が非照射に比べ4週齢では有意に高く(カイニ乗検定)他の週齢では差がなかった(図1)。腫瘍の発生率は、4週齢と4ヵ月齢で差はないが、若週齢被曝では、様々なタイプの甲状腺腫瘍が多発性に発生することが明らかになった。

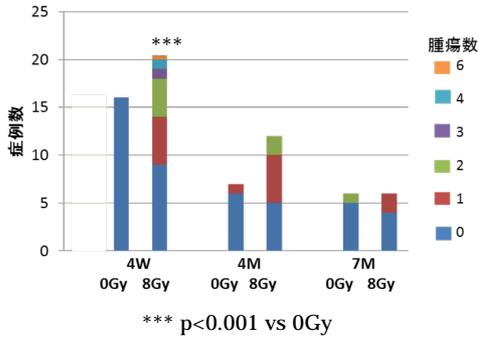


図1. 照射時週齢による放射線誘発甲状腺腫瘍の個数の比較

放射線誘発腫瘍組織の増殖細胞率は、非照射に比べて有意に高く、若週齢の腫瘍組織の増殖細胞率が高週齢に比べて高値だった(図2)。

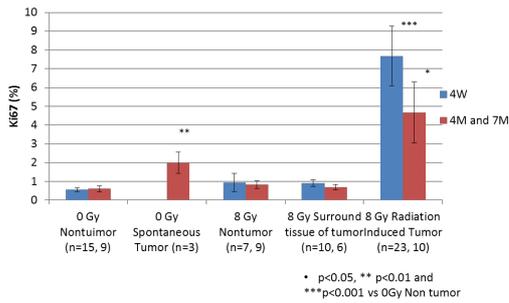


図2. 放射線誘発甲状腺腫瘍と非腫瘍部でのKi67陽性細胞率

(2)照射後12ヵ月までのDNA損傷応答の変化を(53BP1核内フォーカス数、TUNEL陽性細胞率、Ki67陽性細胞率)を図3に示した。4週齢ラットでは照射後1ヵ月でいずれの値も非照射に比べて有意に高値だったが、12ヵ月後には非照射と同レベルに低下した。一方7週齢ラットは、1,6ヵ月後53BP1核内フォーカス数が非照射よりも有意に高く、12ヵ月後に低下した。TUNEL陽性細胞には変化が見られず、Ki67陽性細胞率は1,12ヵ月後非照射よりも有意に高値であったが、4週齢よりも低値だった。

図4では、DNA損傷応答マーカーのSer15リン酸化p53とp16、オートファジーのマーカーであるLC3-II/LC3-Iとp62の発現変化を示した。4週齢ラットではSer15リン酸化p53は照射後1ヵ月で非照射よりも有意に増加しており、TUNEL陽性細胞率の結果と一致し

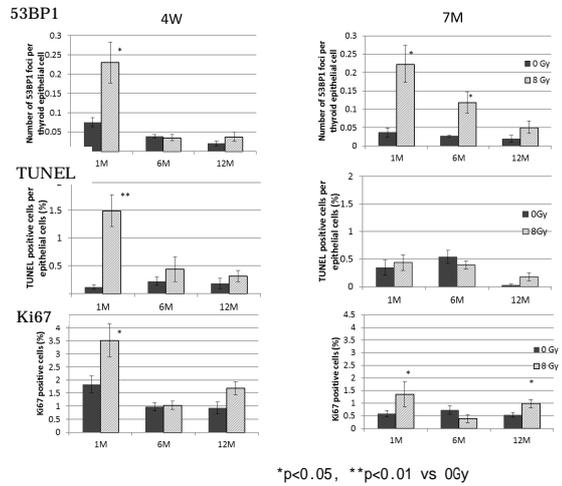


図3. 照射後12ヵ月までの甲状腺濾胞上皮のDNA損傷応答の変化

た。p16は、12ヵ月後わずかに非照射よりも高値だったが、有意差はなかった。7ヵ月齢ラットのSer15リン酸化p53とp16の変化は見られなかった。両週齢共LC3-II/LC3-Iとp62は、12ヵ月まで発現変化は見られなかった。

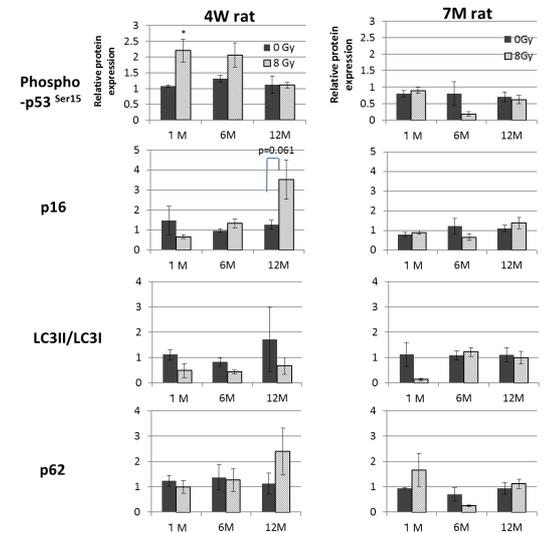


図4. 照射後12ヵ月までのWestern blotによる、phospho-p53(Ser15), p16, LC3II/LC3I, p62の発現

若週齢被曝では照射後の体重増加が抑制された。照射後6,12ヵ月の血清TSH値を測定した結果、6ヵ月では4週齢の非照射では $0.97 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$ 、照射群では、 $1.27 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$ ($p=0.0578$)、7ヵ月齢では非照射で 1.22 ± 0.28 、照射群は $2.32 \pm 0.94 \text{ ng/ml}$ (それぞれ $n=6$ ずつ)だった。12ヵ月では4週齢の非照射で $1.85 \pm 0.43 \text{ ng/ml}$ ($n=5$)、照射群で $1.34 \pm 0.35 \text{ ng/ml}$ ($n=7$)、7ヵ月齢は非照射で $2.19 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$ ($n=5$)、照射群で $2.1 \pm 0.15 \text{ ng/ml}$ ($n=4$)だった。両週齢共有意な変化は認められなかった。

(3)4週齢の低分化がん(PDC)と7ヵ月齢の髄様癌(MC)のLC3とp62の蛍光免疫染色の結果を図5に示した。4週齢の低分化癌の腫瘍部では、オートファジーの指標である

LC3 と p62 の細胞質の顆粒状発現が見られず、7 ヶ月齢の腫瘍部では発現が見られた。

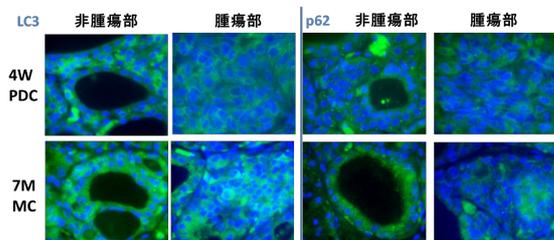


図 5. 若齢及び高齢ラットの放射線誘発甲状腺癌のオートファジー関連分子 LC3, p62 の発現
4 週齢の放射線誘発低分化癌、髄様癌、7 ヶ月齢の自然発症髄様癌、放射線誘発髄様癌の 4 例の PCR Array の結果を表 2 に示した。放射線誘発甲状腺癌では、オートファジー調節遺伝子 *Cdkn2a*, *Ctss*, *Cxcr4* などが共通して上昇しているのに対し、自然発症腫瘍では *Mapk8* の上昇のみ見られた。4 週齢低分化癌では、*Tgfb1*, *Tnf*, *TP53* の発現増加も見られ、*Eif2ak3*, *Mapt*, *Pim2* は減少した。自然発症腫瘍では *Dapk1*, *Eif4g1*, *Htt* の減少は 7 ヶ月齢の放射線誘発髄様癌と同じであった。4 週齢の放射線誘発髄様癌では、オートファジー構成因子である *Atg4b*, *Atg5*, *Gabarapl2*, *Rab24* の発現減少が見られた。

表 2. 放射線誘発性および自然発症甲状腺癌の PCR-Array 解析

	4W IR-induced non-cancer region (PDC)		4W IR-induced non-cancer region (MC)		7M IR-induced non-cancer region (MC)		7M Spontaneous cancer (MC)	
	Fold change	P-value	Fold change	P-value	Fold change	P-value	Fold change	P-value
Bnip3					2.22	0.0484		
Cdkn2a	5.579	0.0117	1.786	0.0318				
Ctss	1.526	0.0075			2.27	0.000334		
Cxcr4	3.539	0.025	2	0.0151	2.46	0.0699		
Igf1					2.23	0.0399		
Tgfb1	2.052	0.0055						
Tnf	2.514	0.020			2.54	0.0260		
TP53	1.663	0.01668						
Mapk8							2.43	0.0354
Dapk1			0.504	0.02	0.4	0.00137	0.2	0.0014
Eif2ak3	0.457	0.0219	0.435	0.0121				
Eif4g1					0.5	0.0155	0.46	0.0102
Htt					0.41	0.00962	0.4	0.0127
Hgs							0.48	0.0213
Mapt	0.233	0.00353	0.398	0.00813				
NFkB1							0.47	0.0035
Pim2	0.317	0.0148	0.375	0.0147				
Atg4b			0.488	0.0360				
Atg5			0.491	0.0472				
Gabarapl2			0.382	0.0273				
Rab24			0.477	0.0213				

PCR-Array の結果から、4 週齢非照射 1 例、照射非腫瘍 3 例、放射線誘発癌 3 例、7 週齢非照射 1 例、自然発症癌 1 例、放射線誘発癌 2 例で *Cdkn2a*, *Ctss*, *Cxcr4*, *Tgf-beta1*, *Tnf*, *Atg4b*, *Atg5* の RT-PCR による遺伝子発現を調べた。放射線誘発癌、自然発症癌共に *Cxcr4*, *Cdkn2a*, *Tnf* の発現増加が見られ、*Cxcr4*, *Cdkn2a* の mRNA レベルは自然発症より放射線誘発癌の方が高値だった。*Ctss* と *Tgf-beta1* は両週齢の放射線誘発癌で増加していた。4 週齢の髄様癌で *Atg4b* と *Atg5* の発現低下と、低分化癌で *Atg5* の低下が見られた。若週齢の放射線誘発甲状腺癌では、オートファジー

関連分子の低下が起きていることが示唆された。

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 6 件)

- 1) 松山睦美, 川副靖晃, 七條和子, 松田勝也, 三浦史郎, 中島正洋. ラット放射線誘発甲状腺がんの年齢影響とオートファジー関連遺伝子の発現解析 長崎医学会雑誌 査読無, 91(特別号), 2016, 271-274
- 2) 松山睦美, 入船理, 七條和子, 松田勝也, 三浦史郎, 関根一郎, 中島正洋. ラット放射線誘発甲状腺がんの年齢影響 広島医学 査読無, 69(4), 2016, 307-310
- 3) Nakashima M, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuu-Matsuyama M, Matsuda K, Nagayama Y. Cancer Stem cell theory and intratumor heterogeneity in thyroid carcinogenesis (Review). Journal of Basic and Clinical Medicine. 4, 査読無, 2015, 8-12.
- 4) Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Okaichi K, Kuradhige T, Kondo H, Miura S, Nakashima M Effect of age on the sensitivity of the rat thyroid gland to ionizing radiation. Journal of Radiation Research. 56 (3), 査読有, 2015, 493-501. DOI: 10.1093/jrr/rrv003
- 5) 松山睦美, 徳永瑛子, 蔵重智美, 七條和子, 松田勝也, 三浦史郎, 関根一郎, 中島正洋: ラット甲状腺濾胞上皮の放射線誘発腫瘍に対する年齢影響とオートファジーの関与. 広島医学 査読無, 67(4), 2014, 593-598
- 6) 松山睦美, 七條和子, 松田勝也, 赤澤祐子, 三浦史郎, 関根一郎, 中島正洋: ラット甲状腺濾胞上皮の放射線腫瘍に対する年齢影響とオートファジーの関与(第 2 報). 長崎医学会雑誌 査読無, 89(特集号): 2014, 306-309

[学会発表](計 10 件)

1. 松山睦美, 七條和子, 松田勝也, 三浦史郎, 中島正洋: 若齢及び高齢ラット放射線誘発甲状腺がんのオートファジー関連遺伝子の発現解析. 第 59 回日本放射線影響学会. 2016.10.26-28 JMS アステールプラザ(広島県広島市)
2. 松山睦美, 川副靖晃, 七條和子, 松田勝也, 三浦史郎, 中島正洋: ラット放射線誘発甲状腺がんの年齢影響とオートファジー関連遺伝子の発現解析. 第 57 回原子爆弾後障害研究会. 2016.6.5 長崎原爆資料

- 館(長崎県長崎市)
3. 松山睦美、七條和子、松田勝也、三浦史郎、中島正洋:放射線誘発甲状腺発がんリスク亢進への年齢影響解析. 第105回日本病理学会総会. 2016.5.12-14 仙台国際センター(宮城県仙台市)
 4. Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Matsuda K, Okaichi K, Miura S, Nakashima M: Age-dependent effects on radiation-induced thyroid carcinogenesis in rats. One Health Conference in Nagasaki. Nov 6-7, 2015. Nagasaki, 長崎大学良順会館(長崎県長崎市)
 5. 中島正洋、松山睦美、松田勝也: ラット放射線誘発甲状腺癌の分子病理. 第19回日本内分泌病理学会学術総会 2015. 10.24-25 アバンセ(佐賀県佐賀市)
 6. Nakashima M: Age-dependent effects on radiation-induced carcinogenesis in rat thyroid. International Conference "Ecology, Radiation, and Health". Aug 28-29, 2015. Semey, Kazakhstan
 7. 松山睦美、入船 理、七條和子、松田勝也、三浦史郎、関根一郎、中島正洋: ラット放射線誘発甲状腺がん年齢影響 第56回原子爆弾後障害研究会 2015.6.7 広島国際会議場(広島県広島市)
 8. Matsuyama M, Shichijo K, Matsuda K, Okaichi K, Kurashige T, Miura S, Nakashima M: Age-dependent effects on radiation-induced carcinogenesis in rat thyroid. The 15th International Congress of Radiation Research. May 25-29, 2015. Kyoto 京都国際会議場(京都府京都市)
 9. 松山睦美、七條和子、岡市協生、蔵重智美、三浦史郎、関根一郎、中島正洋: ラット甲状腺の急性期の放射線応答に対する年齢影響. 第104回日本病理学会総会 2015.4.30-5.2 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

10. 松山睦美、七條和子、松田勝也、赤澤裕子、三浦史郎、関根一郎、中島正洋: ラット甲状腺濾胞上皮の放射線腫瘍に対する年齢影響とオートファジーの関与(第2報). 第55回原子爆弾後障害研究会 2014.6.1 長崎原爆資料館(長崎県長崎市)

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 中島正洋: 南江堂 内分泌系 岩田隆子監修 わかりやすい病理学(改訂第6版), 2016年, 216-235
- 2) 中島正洋: 医療科学社 新版 放射線医学科 生命と放射線・電磁波・超音波, 2016年, 61-63
- 3) 中島正洋: 文光堂 放射線障害の病理【人体における放射線発がん】原爆被爆者腫瘍病理. 病理と臨床 33(1), 2015年, 17-22

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
長崎大学原爆後障害医療研究所 腫瘍・診断病理学研究分野(原研病理)
<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/pathology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松山 睦美(MATSUYAMA, Mutsumi)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号: 00274639

(2)研究分担者

中島 正洋(NAKASHIMA, Masahiro)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号: 50284683