

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870440

研究課題名(和文) 甲状腺における放射線誘導性発癌モデル作製及び抗酸化剤のDNA損傷抑制効果の解明

研究課題名(英文) The establishment of the model of radiation-induced thyroid cancer and analysis of the inhibitory effect of an antioxidant on DNA damage in thyroid.

研究代表者

蔵重 智美 (KURASHIGE, Tomomi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60568955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘発DNA損傷応答解析のための外・内照射モデルの確立のため、DNA二重鎖切断(DSB)をDNA損傷の指標とし、ラット正常甲状腺細胞株を用いてX線外照射、¹³¹I添加による内照射を行い中性コメットアッセイでDSBを定量・解析した。また、今回確立された系を用いて抗酸化剤によるDNA損傷抑制効果の検討を行った。内照射群では¹³¹I添加後の抗酸化剤投与でDSBを抑制した。このモデルはin vivoでは確立できず、遺伝子改変マウスによる甲状腺発癌モデルは外・内照射群の両方で組織変化が無く確立できなかった。

研究成果の概要(英文)：To establish the in vitro model of the external irradiation with X-ray or internal irradiation with ¹³¹I for analysis of radiation-induced DNA damage response, DNA double strand breaks (DSBs), as an index for DNA damages, were quantified following external or internal irradiation using the neutral comet assay in a normal rat thyroid cell line PCCL3. Then by using this new model established, the inhibitory effect of an anti-oxidant NAC on DNA damages was evaluated. In internal irradiation, administration of NAC even after addition of ¹³¹I was effective at suppressing DSBs. However, this type of in vivo model was failed to be established, and mouse model of radiation-induced thyroid cancer using genetically modified mice showed no histological alterations.

研究分野：内分泌学

キーワード：DNA二重鎖切断 抗酸化剤 comet assay 放射線 内部被ばく

1. 研究開始当初の背景

甲状腺は放射線感受性の高い臓器のひとつである。広島長崎原爆被爆者においては瞬時的な外部被ばくにより甲状腺癌の罹患率が増加した。放射線誘導性の発癌には、ひとつには放射線により切断された染色体の転座や逆位などによる遺伝子再配列によって産生された融合タンパクが、持続的な細胞増殖を誘導した結果によるものであることが考えられ、このような再配列には RET/PTC が知られている。以前から原爆被爆者の甲状腺組織は RET/PTC 遺伝子再配列が指摘されており、近年ではさらに RET とは別の受容体型チロシンキナーゼである anaplastic lymphoma kinase (ALK) の遺伝子再配列が線量依存的に増加することが明らかになった (Hamatani K, et al., Thyroid. 2012)。また、チェルノブイリでは原発事故後、放射線高感受性期である小児の甲状腺において ¹³¹I による内部被ばくによって RET/PTC 遺伝子再配列が起こり、短期間で甲状腺癌が発症した。このように、甲状腺の放射線感受性は外部被ばくのみならず ¹³¹I による内部被ばくでも顕著であることが示されている。しかし 2011 年に福島で発生した原発事故では、¹³¹I の放出により汚染された地域の住民は低線量の ¹³¹I による内部被ばくに加え、低線量慢性外部被ばくという複雑な被ばく様式を呈しているため、このような場合の甲状腺への影響は未知である。

放射線誘発性の発癌は、前述の遺伝子再配列、あるいは DNA 損傷修復のエラーによる遺伝子異常によって惹き起こされるとされているが、その詳細は未だ十分には解明されていない。特に遺伝子再配列の機序は甲状腺癌発症のメカニズム解明に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、放射線による外部被ばく及び内部被ばくにより惹起される DNA 損傷を定量化するための方法として、DNA は放射線に曝露されると二重鎖切断 DNA double strand breaks (DSBs) を起こすことに着目し、基礎検討にて DSBs を定量化するいくつかの方法を検討した。

本研究ではこれらの DSBs 定量法を用いて、甲状腺における放射線誘発 DNA 損傷応答解析のための *in vitro* 細胞培養系と *in vivo* 動物モデル、また癌発症メカニズム解析のための発癌動物モデルを確立する。さらにこの系を用いて、臨床検体では難しい放射線誘発 DNA 損傷後の経時的な観察や、DNA 損傷を抑制する可能性のある抗酸化剤の腫瘍形成抑制効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は放射線による外部被ばく及び内部

被ばくにより惹起される DNA 損傷を定量化するための方法として、DNA は放射線に曝露されると二重鎖切断 DNA double strand breaks (DSBs) を起こすことに着目した。*in vitro* では正常甲状腺細胞株である PCCL3、*in vivo* では野生型の C57BL/6 マウスを用いて、以下の検討を行った。X 線外照射後の DSBs の定量化を行った基礎検討の結果より 53BP1/γH2AX の核内フォーカス数の定量、及び中性コメットアッセイを採用した。X 線外照射による基礎検討では非照射群と比較して 5Gy 照射群による DSBs が特異的に増加することが示された。

in vitro 及び *in vivo* における ¹³¹I 内照射及び X 線外照射誘導性 DNA DSBs の線量依存的または時間経過による変化の解析

内照射実験の方法検討のために PCCL3 細胞の ¹³¹I の取り込みを確認した。使用線量は、これまでの報告 (Jerome M, et al., endocrinology. 2011) から 370KBq (10μCi) とした。また ¹³¹I 投与前に無機ヨウ素剤 (NaI) と過塩素酸塩 (NaClO₄) 処理により、PCCL3 細胞の ¹³¹I 取り込みの特異性を確認した。本研究では、この条件で実験を進めることとした。さらに、無処理群と比較すると ¹³¹I の添加による DNA DSBs が特異的に増加することも確認された。

上記の基礎検討の結果を元に、下記の 4 つの系を作製した。

- ・ *in vitro* 線量依存性
- ・ *in vitro* 時間経過
- ・ *in vivo* 線量依存性
- ・ *in vivo* 時間経過

¹³¹I 内照射及び X 線外照射誘導性 DNA DSBs 発生における活性酸素種 (ROS) の関与及び抗酸化剤による DNA DSBs 抑制効果の解析

放射線照射後の DNA DSBs 発生の原因として、放射線が DNA を直接電離あるいは励起し切断する直接作用と、放射線が細胞質内の水分子に作用して活性酸素種 (ROS) が生じ、この ROS が DNA を切断する間接作用が知られている。しかし、どちらの作用が主 DNA DSBs 発生の原因となっているかはわかっていない。これを明らかにするために、まず放射線照射後、ROS を測定、あるいは DNA 酸化マーカーを定量し、ROS の増加の程度を検討する。また、放射線照射の前、あるいは後に抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を投与し ROS を消去することで DNA DSBs の発生が抑制されるかを検討した。

マウスにおける ¹³¹I 内照射及び X 線外照射誘導性の染色体転座及び遺伝子再配列の解析

放射線照射後 24 時間で、fluorescence in situ hybridization (FISH) により被ばくに特異的な転座・欠失がみられるかを解析した。

腫瘍抑制遺伝子である PTEN、p16、TGFβ に異常を有する遺伝子改変マウスを用いた ¹³¹I 内照射及び X 線外照射誘導性発癌モデルの作製と検証

過去の論文から野生型マウスでの癌の発症は非常に低いことがわかっているため、放射線被曝により癌を高率に発生させるために下記の 3 種類の遺伝子改変マウスを用いた。p16 と PTEN は腫瘍抑制遺伝子、TGFβ は細胞増殖抑制に関与すると考えられている。

マウスに ¹³¹I 内照射、または X 線外照射を行い一定期間後、屠殺・固定を行った。屠殺後血液と甲状腺を採取した。これらの組織を用いて病理学的変化や FISH により染色体の転座、欠失等の解析を行った。

4. 研究成果

① in vitro 及び in vivo における ¹³¹I 内照射及び X 線外照射誘導性 DNA DSBs の線量依存のまたは時間経過による変化の解析

1) in vitro における検討

外照射実験：PCCL3 細胞に 1~5Gy の X 線照射 30 分後に行った実験系では DSBs の定量法である 53BP1/γH2AX 核内 focus 及び中性コメットアッセイによる tail moment 値は線量依存的に上昇し、24 時間後には基礎値と同程度に低下した。これらの結果より放射線外照射誘導性 DSB のモデルとして確立した。

内照射実験：PCCL3 細胞に 92.5~370KBq (2.5~10μCi) の ¹³¹I の添加を行った実験系では DSBs が線量依存的に上昇した。また 370KBq の ¹³¹I を添加し、取り込み率の経時変化を観察した実験系では添加後 30 分が取り込みのピークで 24 時間後まで持続的であったことから DSBs も持続すると考えられ、放射線内照射誘導性 DSBs のモデルとして確立した。

2) in vivo における検討

In vitro と同様の実験系で外照射・内照射ともに 53BP1/γH2AX 核内 focus は線量依存的に上昇した。外照射では 24 時間後には基礎値と同程度に低下したが、内照射では持続した。一方、in vivo では中性コメットアッセイは実施できなかった。

in vitro 及び in vivo における ¹³¹I 内照射及び X 線外照射誘導性 DNA DSBs 発生における活性酸素種 (ROS) の関与及び抗酸化剤による DNA DSBs 抑制効果の解析

1) in vitro における X 線 外照射誘導性 DSBs 定量及び DSBs 抑制効果の検討

抗酸化剤 NAC 20mM の照射前投与の検討では X 線誘導性の活性酸素種 (ROS) の上昇 (2.1 倍) を抑制したが、53BP1/γH2AX 核内 focus は抑制しなかった。そこで中性コメットアッセイで同様の検討した結果、tail moment 値は NAC により抑制され、前者とは異なる結果を示した。我々はこの原因を究明するため NAC の使用濃度を 4mM に、あるいは観察時間を照射後 24 時間に変更して同検討を行ったが、解明には至らなかった。53BP1/γH2AX 核内 focus は DNA 損傷において生物学的な反応に関する過程を示したものである一方、中性コメットアッセイは DSBs を物理的に直接示すものである。NAC の生物学的な反応に対して影響を及ぼす可能性のある 53BP1/γH2AX focus を DSBs の指標とすることは本実験系には不適であると考え、本研究における DSBs に対する NAC の抑制効果の検討には中性コメットアッセイを採用した。

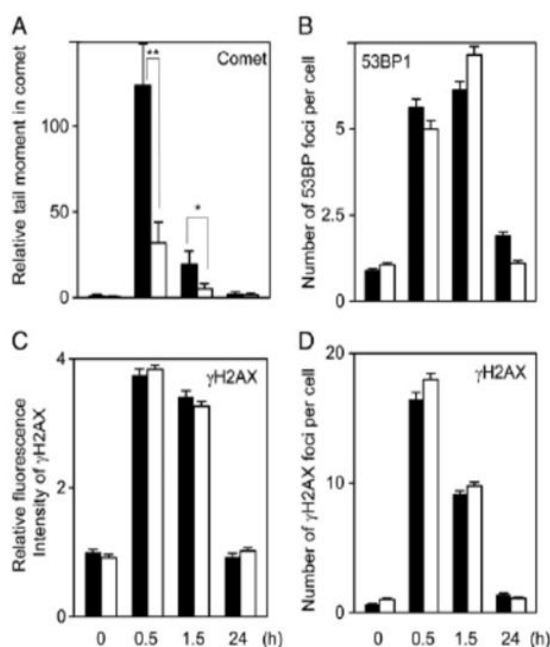


Fig. 2. The temporal effects of 20 mM NAC on IR-induced DSBs. DSBs were determined by the neutral comet assay (A), 53BP1 foci (B), γH2AX foci (C) and γH2AX fluorescent intensity (D) from 0.5 to 24 h after 2 Gy irradiation. The open and solid bars indicate the data obtained with/without NAC, respectively. *P < 0.05; **P < 0.01.

中性コメットアッセイにより、X 線 1~5Gy の照射において線量依存的に上昇した DSBs を NAC の照射前投与により抑制することが明らかとなった。さらに NAC の照射前投与は DSBs が未修復のまま細胞分裂が起こると発生する染色体異常の一種である微小核形成も抑制できることがわかった。

2) in vitro における ¹³¹I 内照射誘導性 DSBs

定量及び DSBs 抑制効果の検討

PCCL3 に対し 370KBq の ^{131}I を添加後、30 分で ROS の上昇 (1.7 倍) を確認し、NAC 照射前投与の検討ではこの ROS の上昇を抑制した。また同様の検討において、DSBs 及び微小核形成を抑制することができた。さらに、基礎検討より ^{131}I 取り込みによる細胞内への放射線曝露が持続的であることから NAC の照射後投与による抑制効果を検討した。その結果、照射後に生じた ROS、DSBs、微小核形成において抑制効果が認められた。

これらの結果から、 ^{131}I 内照射誘導性の ROS 産生、DSBs 及び微小核形成は照射前投与、照射後投与の両方で抑制できることがわかった。

3) in vivo における X 線外照射・ ^{131}I 内照射誘導性 DSBs の定量及び抑制効果の検討

in vivo では中性コメットアッセイによる解析が難しく NAC の DSBs 抑制効果の検討が困難となった。依然として NAC を用いる本実験系における in vivo での DSBs 定量のためのモデルの作製に至っておらず、今後の検討課題となった。

マウスにおける ^{131}I 内照射及び X 線外照射誘導性の染色体転座及び遺伝子再配列の解析

甲状腺への放射線照射後に発生する DSBs 後の染色体の転座・欠失を定量するモデルを作製するため検討を行った。8 週齢の wistar rat に X 線を 8Gy 照射し、24 時間後に初代培養を行った。コルセミド処理、低調処理等を行い FISH にて中期核の染色体像を観察したが、転座、欠失において照射群と非照射群に差が認められず、定量は困難であった。

腫瘍抑制遺伝子である PTEN、p16、TGF β に異常を有する遺伝子改変マウスを用いた ^{131}I 内照射及び X 線外照射誘導性発癌モデルの作製と検証

1) ^{131}I 内照射モデル

出生時からヨード制限食を与えた 3~4 週齢の 3 種類の遺伝子改変マウスに 166.5~832.5KBq の ^{131}I を腹腔内投与した。

- ・TGF β flox/flox/TPO Cre マウスは ^{131}I 投与後生後 12 ヶ月で sacrifice を行ったが組織変化はなかった。
- ・P16 $^{-/-}$ マウスは ^{131}I 投与後、生後 6~8 ヶ月で sacrifice を行ったが組織変化はなかった。
- ・PTEN $^{+/-}$ マウスは ^{131}I 投与後、生後 6 ヶ月で数匹に組織変化を認めたが同月齢の非照射群にも組織変化を認めた。

2) 外照射モデル

3~4 週齢の 3 種類の遺伝子改変マウスに X 線 8Gy を照射した。

- ・TGF β flox/flox/TPO Cre マウスは X 線照射後、生後 12 ヶ月で sacrifice を行ったが組織変化はなかった。
- ・P16 $^{-/-}$ マウスは、X 線照射後、生後 6~8 ヶ月で sacrifice を行ったが組織変化はなかった。
- ・PTEN $^{+/-}$ マウスは X 線照射後、生後 6 ヶ月で 1 匹に組織変化を認めたが同月齢の非照射群にも組織変化を認めた。

内照射に関しては当初の投与量である 166.5KBq では組織変化が見られなかったため 5 倍量の 832.5KBq に増量して投与を行ったが、いずれの種類のマウスにおいても本実験系では内照射群・外照射群ともに組織変化における非照射群との差異がみられなかった。投与の方法や量、投与回数、加齢などの条件を変更するなど、今後も検討の余地はあると考える。

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 8 件)

1. Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y. Differences in quantification of DNA double-strand breaks assessed by 53BP1/ γ H2AX focus formation assays and the comet assay in mammalian cells treated with irradiation and N-acetyl-L-cysteine. J Radiat Res. 2016. (in press) (査読有)
2. Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Okaichi K, Kurashige T, Kondo H, Miura S, Nakashima M. Effect of age on the sensitivity of the rat thyroid gland to ionizing radiation. J. Radiat. Res. 2015. 56(3):493-501. (査読有)
3. Kurashige T, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuse M, Nakashima M, Minami S, Eguchi S, Nagayama Y. Studies on expression of aldehyde dehydrogenase in normal and cancerous tissues of thyroids. Horm Metab Res. 2015. 47(3):194-9. (査読有)
4. Miura S, Akazawa Y, Kurashige T, Tsukazaki K, Kondo H, Yokota K, Mine M, Miyazaki Y, Sekine I, Nakashima M. Importance of the Nagasaki Atomic Bomb Survivors' Tumor Tissue Bank.

Lancet. 2015. 386(10005):1738. (査読有)

5. Yasui J, Nakahara M, Shimamura M, Kurashige T, Yasui K, Abiru N, Kawakami A, Nagayama Y. Minor contribution of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and programmed cell death 1 ligand 1 in immune tolerance against mouse thyrotropin receptor in mice. Acta Med Nagasaki. 2014. 59(1):13-17. (査読有)
6. Shimamura M, Nakahara M, Kurashige T, Yasui K, Nakashima M, Nagayama Y. Endocr J. Disruption of transforming growth factor- β signaling in thyroid follicular epithelial cells or intrathyroidal fibroblasts does not promote thyroid carcinogenesis. 2014. 61(3):297-302. (査読有)
7. Mussazhanova Z, Miura S, Stanojevic B, Rougounovitch T, Saenko V, Shiraishi T, Kurashige T, Shichijo K, Kaneko K, Takahashi H, Ito M, Nakashima M. Radiation-associated small cell neuroendocrine carcinoma of the thyroid: a case report with molecular analyses. Thyroid. 2014. 24(3):593-8. (査読有)
8. Orim F, Bychkov A, Shimamura M, Nakashima M, Ito M, Matsuse M, Kurashige T, Suzuki K, Saenko V, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Thyrotropin signaling confers more aggressive features with higher genomic instability on BRAF(V600E)-induced thyroid tumors in a mouse model. Thyroid. 2014. 24(3):502-10. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 永山雄二・蔵重智美. 甲状腺細胞における放射線誘導性 DNA 損傷に対する抗酸化剤の抑制効果の検討. 第 11 回広島大学・長崎大学連携研究カンファレンス. 於: 広島大学広仁会館、広島県広島市. 6/7, 2015.
2. 永山雄二・蔵重智美. 甲状腺細胞における放射線外照射・内照射誘発 DNA 二重鎖切断と抗酸化剤の効果の検討. 日本放射線影響学会 第 57 回大会. 於: かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市. 10/1-3, 2014.
3. 蔵重智美・永山雄二. 甲状腺細胞における放射線誘導性発癌モデルの作製及び抗酸化剤の DNA 損傷抑制効果の検討. 第

10 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス. 於: 長崎大学良順会館、長崎県長崎市. 5/31, 2014.

〔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

長崎大学
原爆後障害医療研究所ホームページ
http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/abdi/index_j.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

蔵重 智美 (KURASHIGE, Tomomi)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号: 60568955