

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H02824

研究課題名(和文)放射線発がん過程を可視化するラットモデルの開発

研究課題名(英文) Development of rat models as a component technology for visualizing the process of radiation-induced carcinogenesis

研究代表者

今岡 達彦 (Imaoka, Tatsuhiko)

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・グループリーダー(定常)

研究者番号：40356134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線は、低線量であっても線量に比例した数の変異細胞を直接に作り、線量に比例したがんリスクにつながると考えられている。このような仮説を直接的に証明するには、発がんの原因となる変異を持つ細胞を可視化することが有用であり、そのような技術を確認するためには、発がん原因遺伝子変異が生じるゲノム内の場所を予想可能な、遺伝子ノックアウトのような放射線発がん動物モデルが必要である。本研究では、放射線を照射した後にがんが誘発されやすい新たな遺伝子ノックアウトラット乳がんモデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療、職業、環境等に由来する低線量放射線のリスクを正確に評価するに当たっては、放射線が作る変異細胞の数が線量に比例し、その比例性が保たれたままがんリスクにつながるという仮定が正しいかどうかを証明するところにボトルネックがある。本研究で開発した動物モデルは、この仮定を証明するための要素技術になる。また、開発したモデルは、家族性腫瘍症候群の動物モデルとして、診断・治療・予防の研究開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiation is considered to produce mutant somatic cells, the number of which is proportional to the radiation dose, resulting in cancer risk that is proportional to the dose. A direct proof of this hypothesis would be facilitated by visualization of somatic cells harboring cancer-causing mutations. Establishment of such technology will be dependent on the development of animal carcinogenesis models where the cancer-causing mutation is locatable in the genome of somatic cells, like genetic knockout models. To this end, the current project succeeded in establishing a novel knockout rat model with increased cancer susceptibility after exposure to ionizing radiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線影響 発がん 変異 遺伝子改変ラット

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

様々な動物モデルを用いた実験で、放射線が誘発したがんには欠失変異が共通することが知られる。このような変異を持つ細胞は、放射線被ばく後の比較的早期から存在し、その中の一部が実際にがんに進展すると考えられているが、それを直接示すことは血液系腫瘍を除いては困難であった。生命科学では、動物体内における様々なイメージング技術が進展しているが、放射線発がんに関連する変異のイメージングには取り入れられていない。申請者は、血液系腫瘍以外のモデルであるラット乳がんモデルに関して知見を積み重ねてきた実績がある。従って、このモデルにおける発がん関連変異の可視化に向けた技術開発が、急務である。

2. 研究の目的

放射線が作ったがん関連変異を持つ細胞を可視化することを目指し、重要な要素技術となるラット乳がんモデルを開発する。

3. 研究の方法

すべての動物実験及び遺伝子組換え実験は、実施者の所属研究機関の承認を得て、動物福祉、生命倫理、環境保全への配慮の下に行った。

(1) 既存発がんモデルの評価

① 遺伝的背景の変更

乳がんを高い頻度で発症する **Sprague-Dawley** 系統を遺伝的背景に持つ **Bra1** 遺伝子変異ラットを使用した。乳がんをほとんど発症しない **Copenhagen** 系統との雑種第一代の作製は、購入した **Copenhagen** 系統雄ラットとの自然交配により実施した。乳がんを低い頻度で発症する **Lewis** 系統へのコンジェニック系統の作製は、外部購入した **LEW** 系統雌雄動物との 12 世代以上の自然交配によって実施した。変異ラットの一部について、保存のために凍結胚及び凍結精子を作製した。

② 発がん処理

ラットに **Cs-137 γ** 線 (0.1~2Gy) を全身照射、あるいは発がん化学物質である 1-メチル-1-ニトロ尿素 (MNU) を腹腔内投与 (25 あるいは 50mg/kg)、あるいは無処置とした。

③ 発がん評価

ラットの乳腺腫瘍の触診を週に 1 回の頻度で実施した。触知された病変の長径が約 2cm を超えた時点で生検試料を採取し、病理学的評価を行った。乳がんと診断された個体及び倫理的観点に基づいて設定した人道的エンドポイントに到達した個体を解剖して、すべての病変を採取し、凍結保存及び乳腺腫瘍の最終的な病理学的評価を行った。触診及び病理学的評価の結果を Kaplan-Meier 法によって可視化し、ログランク検定及びコックス回帰分析を行って、触知可能な乳がんの発生を評価した。

④ 腫瘍の遺伝子変異解析

ホルマリン固定パラフィン包埋検体及び凍結検体から薄切試料を作製し、レーザーマイクロダイセクション法によって採取した腫瘍細胞から DNA を抽出した。リアルタイム PCR 法によって野生型 **Bra1** DNA と変異体 DNA を定量した。標準検体としては、野生型 DNA 及び変異体 DNA と同一の配列を持つ合成 DNA を購入して、様々な比率で混合して用いた。腫瘍検体における野生型 DNA の比率の減少をヘテロ接合性消失と定義して、その状態を解析した。

(2) 新規発がんモデルの作製

ノックインに使用する蛍光タンパク質の DNA コンストラクトは、外部から購入した。ラット **Tp53** 遺伝子配列に対するガイド RNA 及び単鎖オリゴデオキシヌクレオチドは、合成されたものを購入した。これらをインジェクション法もしくはエレクトロポレーション法によって受精卵に導入した後、発生の進行した胚を里親の子宮内へ移植した。出産されたラットにおける変異の導入は、PCR 及びサンガーシーケンシングにより確認した。

4. 研究成果

研究開始に当たって、欠失変異が起こる領域に転写抑制因子遺伝子を導入して、別途用意する蛍光タンパク質遺伝子の発現をシスに調節させることにより、蛍光タンパク質発現が欠失変異によって増加する仕組みの使用可能性を調査した。その結果、文献上では培養細胞を用いた実験でそのような成功例が報告されているものの、当該文献の報告者に聴取を行ったところ、動物個体に同一の仕組みを適用する過程で研究遂行上の障害が生じていることがわかった。そこで、より実施可能性が高い方式である、蛍光タンパク質発現が欠失変異によって減少する仕組みの確立に向けた技術開発を実施し、以下の成果を得た。

(1) 既存発がんモデルの評価

放射線誘発がんにおいて欠失変異が一定の領域に生じるためには、がん抑制遺伝子の変異を

ヘテロ接合性に有するモデルを用いるとよいことが、髄芽腫、腸管腫瘍等の例で知られている。そこで、乳がんに関連するがん抑制遺伝子である *Brca1* の変異を有するヘテロ接合体ラットを使用して、以下のように、放射線発がん感受性及び誘発腫瘍における欠失変異を示唆する証拠（ヘテロ接合性の消失）を解析した。

① 放射線照射週齢の検討

幼若期または成体期に放射線を照射した後、乳がん発生率は、ヘテロ接合体ラットにおいて野生型ラットより高い傾向が見られたが、観察期間全体のデータを解析すると、その差は有意ではなかった。両ラットの発生率の差は観察期間の中盤で拡大する傾向があったため、40~80週齢の両年齢の照射群のデータを、統計モデルを用いたコックス回帰分析によって解析したところ、両ラットの発生率の間には、約3倍の有意なリスクの違いが見られた。週齢間の差異は非有意であった。

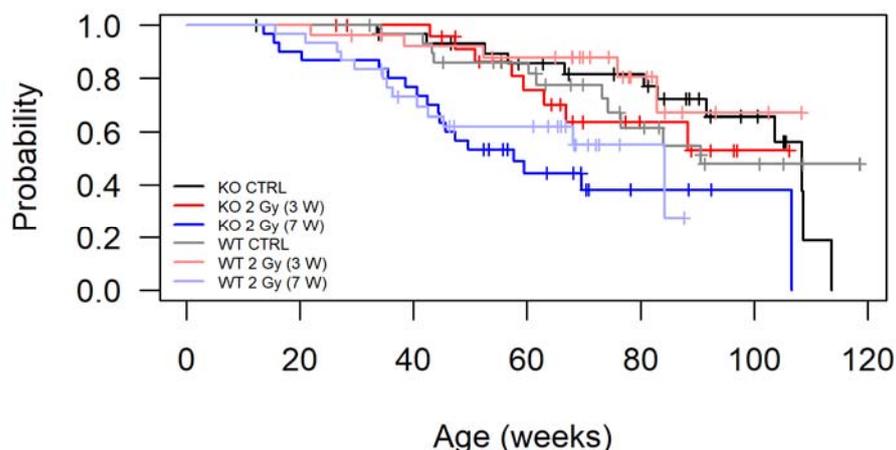


図1 ヘテロ接合体 (KO) 及び野生型 (WT) ラットに、無処置 (CTRL) もしくは幼若期 (3W) あるいは成体期 (7W) に 2Gy の γ 線を照射した後の、触知乳がんの発生。

② 発がん処理の検討

成体期に MNU を投与した後、乳がん発生率は、ヘテロ接合体ラットにおいて野生型ラットより高いという一貫した傾向は見られなかった。

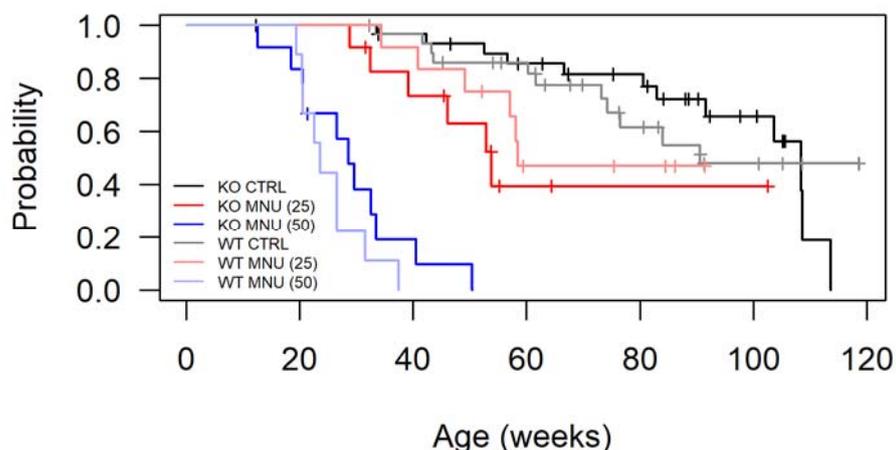


図2 ヘテロ接合体 (KO) 及び野生型 (WT) ラットに、無処置 (CTRL) もしくは成体期に MNU を 25 もしくは 50 mg/kg 投与した後の、触知乳がんの発生。

③ 遺伝的背景の検討

Sprague-Dawley 系統と Copenhagen 系統の雑種第一代の成体期に放射線を照射した後、乳がん発生率は、ヘテロ接合体ラットにおいて野生型ラットより高いという一貫した傾向は見られなかった。LEW 系統へのコンジェニック系統の成体期に放射線を照射した後、乳がん発生率は、ヘテロ接合体において野生型より高い傾向が見られるが、現在までのところその差は有意ではない。

④ 誘発腫瘍におけるヘテロ接合性

上記①において、ヘテロ接合体と野生型で発生率の差が有意に大きい期間に注目して、この期間に発生した腫瘍におけるがん抑制遺伝子 (改変遺伝子の正常な対立遺伝子) の状態を解析したところ、腫瘍において正常遺伝子が欠失している証拠は得られなかった。そのため、このモデルを元に変異細胞を可視化するためには、欠失する領域に蛍光タンパク質レポーター遺伝子をノ

ックインするという単純な方法ではなく、下流のシグナル伝達系を利用する等の別の方式が必要となることがわかった。

(2) 新規発がんモデルの作製

① ノックインデザイン

がん抑制遺伝子である **Tp53** 遺伝子の変異をヘテロ接合性を持つ発がんモデル動物を基本に、2種類の蛍光タンパクを野生型アリル及び変異アリルの近傍にノックインして、野生型アリルが欠失し変異アリルが保持された細胞を蛍光の変化に基づいて検出するシステムの設計を考案した。

② ノックイン実験

蛍光タンパク質遺伝子をノックインする標的領域として、目的遺伝子のエクソン 2 内部を切断し、(i)切断部位への蛍光タンパク質ノックイン、(ii)エクソン 2 への点変異導入によるノックアウトが得られることを想定した実験を行った。その結果、ノックイン個体を得ることができた(図4)。しかし、この個体は生殖可能に至る前に腫瘍を発症して死亡するという表現型を有していた。その原因として、ゲノム編集の効率が予想以上に高く、両アリルがノックインもしくはノックアウトされたホモ欠損個体が作製されていることが考えられた。

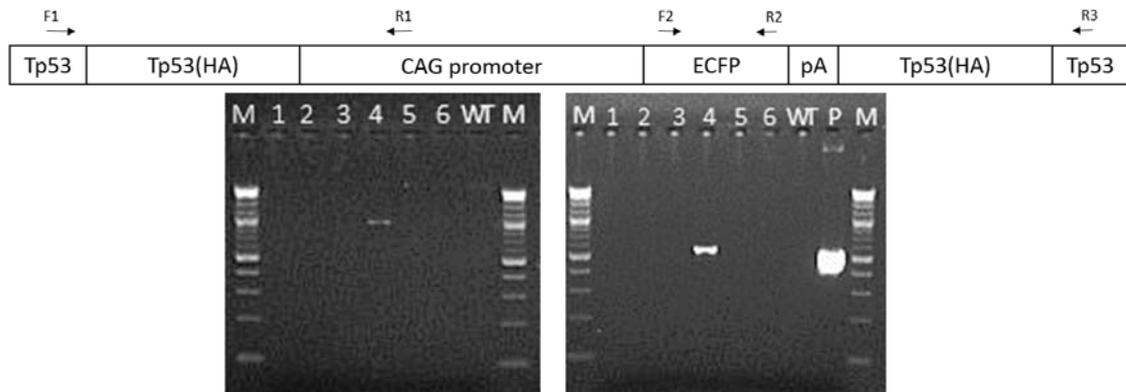


図4 ノックイン後配列及び PCR プライマーの位置 (上段)、プライマー F1 と R1 (下段左、1630bp)、F2 と R2 (下段右、523bp) による確認結果。4 がノックインに成功した個体。M は分子量マーカー、WT は野生型個体、P は陽性対照 (ノックインに用いた DNA)。

そこで、エクソン 3 を挟むイントロンを2カ所切断することによって、ノックインに成功しなかったアリルで機能欠損が起こらないようにデザインを変更して実験を行った。その結果、ノックイン個体を複数得ることに成功した。

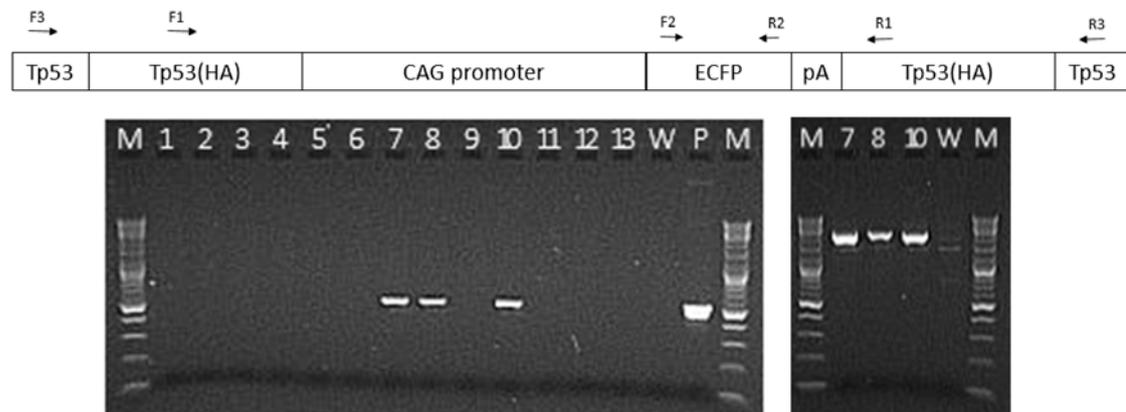


図5 ノックイン後配列及び PCR プライマーの位置 (上段)、プライマー F2 と R2 (下段左、523bp)、F2 と R3 (下段右、1990bp) による確認結果。7, 8, 10 がノックインに成功した個体。M は分子量マーカー、W は野生型個体、P は陽性対照 (ノックインに用いた DNA)。

(3) まとめ

以上のように、1系統のラットについて、放射線ががん化させた細胞の可視化に使用できる性質を持つかどうかを評価し終えた。加えて、同様の研究開発に使用できる可能性を持つ新たなラットを作製することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Imaoka Tatsuhiko, Nishimura Mayumi, Daino Kazuhiro, Shimada Yoshiya, Kakinuma Shizuko	4. 巻 68
2. 論文標題 8.2.8 Effect of carbon ions on carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RADIOISOTOPES	6. 最初と最後の頁 741 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3769/radioisotopes.68.741	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 Imaoka Tatsuhiko, Nishimura Mayumi, Daino Kazuhiro, Takabatake Masaru, Moriyama Hitomi, Nishimura Yukiko, Morioka Takamitsu, Shimada Yoshiya, Kakinuma Shizuko	4. 巻 95
2. 論文標題 Risk of second cancer after ion beam radiotherapy: insights from animal carcinogenesis studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1431 ~ 1440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2018.1547848	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 Imaoka Tatsuhiko, Nishimura Mayumi, Daino Kazuhiro, Hosoki Ayaka, Takabatake Masaru, Nishimura Yukiko, Kokubo Toshiaki, Morioka Takamitsu, Doi Kazutaka, Shimada Yoshiya, Kakinuma Shizuko	4. 巻 191
2. 論文標題 Prominent Dose-Rate Effect and Its Age Dependence of Rat Mammary Carcinogenesis Induced by Continuous Gamma-Ray Exposure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 245 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RR15094.1	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 今岡達彦, 高畠賢, 鶴岡千鶴, 西村由希子, 飯塚大輔, 島田義也, 柿沼志津子	4. 巻 25
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 乳癌基礎研究	6. 最初と最後の頁 15-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 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	4. 巻 24
2. 論文標題 放射線被ばくとBRCA変異保因者の乳がんリスク	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 乳癌基礎研究	6. 最初と最後の頁 7-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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14件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 久保田丈、今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、宮坂佳樹、真下知士、井上一雅、福士政広、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 乳がんモデルラットにおいてBrca1遺伝子変異が放射線誘発乳がんリスクに及ぼす影響
3. 学会等名 令和元年度若手放射線生物学研究会専門研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田丈、今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、井上一雅、福士政広、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 Brca1変異導入ラットにおける放射線誘発乳がんの解析
3. 学会等名 第73回放射線技術学会東京支部春期学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田丈、今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、宮坂佳樹、真下知士、井上一雅、福士政広、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 Brca1遺伝子改変動物モデルにおける放射線誘発乳がんの解析
3. 学会等名 2019年度関東甲信越診療放射線技師学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田丈, 今岡達彦, 西村まゆみ, 臺野和広, 宮坂佳樹, 真下知士, 井上一雅, 福士政広, 島田義也, 柿沼志津子
2. 発表標題 Brca1遺伝子改変ラットにおける放射線誘発乳がんの解析
3. 学会等名 第13回日本診療放射線学教育学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuhiko Imaoka , Mayumi Nishimura , Kazuhiro Daino , Toshiaki Kokubo , Takamitsu Morioka , Yoshiya Shimada , Shizuko Kakinuma
2. 発表標題 Effect of low dose rate Cs-137 gamma rays on rat mammary carcinogenesis
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今岡 達彦, 西村 まゆみ, 臺野 和広, 細木 彩夏, 高畠 賢, 西村 由希子, 小久保 年章, 森岡 孝満, 島田 義也, 柿沼 志津子
2. 発表標題 ラット乳がん誘発の線量率効果は年齢依存的でありしきい値がある
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatsuhiko Imaoka , Mayumi Nishimura , Kazuhiro Daino , Ayaka Hosoki , Masaru Takabatake , Yukiko Nishimura , Toshiaki Kokubo , Takamitsu Morioka , Yoshiya Shimada , Shizuko Kakinuma
2. 発表標題 Dose Rate Dependence of Rat Mammary Carcinogenesis Following Protracted Ray Exposure
3. 学会等名 43rd Annual Meeting of the European Radiation Research Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名	Tatsuhiko Imaoka , Takamitsu Morioka , Yukiko Nishimura , Mutsumi Kaminishi , Masaru Takabatake , Daisuke Iizuka , Ken-ichi Kudo , Kazuhiro Daino , Mayumi Nishimura , Akinari Yokoya , Koichi Yamakawa , Makoto Aoyama , Hiroyuki Takuwa , Makoto Higuchi , Shizuko Kakinuma
2. 発表標題	Illuminating Radiation Carcinogenesis with the Light of Quantum Technology
3. 学会等名	1st QST International Symposium (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Tatsuhiko Imaoka , Mayumi Nishimura , Kazuhiro Daino , Masaru Takabatake , Yukiko Nishimura , Hitomi Moriyama , Takamitsu Morioka , Yoshiya Shimada , Shizuko Kakinuma
2. 発表標題	Experimental evaluation of the carcinogenic effect of carbon ions and neutrons in children
3. 学会等名	International Workshop on the Biological Effects of Radiation 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、西村由希子、高畠賢、森岡孝満、柿沼志津子、島田義也
2. 発表標題	遺伝子発現マイクロアレイによるラット乳がんの分類の試み
3. 学会等名	第25回乳癌基礎研究会
4. 発表年	2016年

1. 発表者名	西村由希子、今岡達彦、高畠賢、臺野和広、森岡孝満、西村まゆみ、横田拓実、太田原雅美、柿沼志津子、島田義也
2. 発表標題	多様な誘発方法でのラット乳がんを用いた免疫染色によるサブタイピング法の検討
3. 学会等名	第25回乳癌基礎研究会
4. 発表年	2016年

1. 発表者名 今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、高畠賢、西村由希子、細木彩夏、蒲地雄大、森山ひとみ、飯塚大輔、鶴岡千鶴、柿沼志津子、島田義也
2. 発表標題 幹細胞研究における放射線影響の解析
3. 学会等名 平成28年度医療放射線防護連絡協議会年次大会（第27回高橋信次記念講演・古賀佑彦記念シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今岡達彦、臺野和広、鶴岡千鶴、高畠賢、西村まゆみ、西村由希子、細木彩夏、小川真里、山田裕、森岡孝満、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 がん起源細胞と放射線シグネチャ Stand at the crossroad and look
3. 学会等名 日本放射線影響学会第59回大会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今岡達彦、細木彩夏、西村まゆみ、臺野和広、西村由希子、高畠賢、ショウラー恵、小川真里、谷修祐、川口勇生、柿沼志津子、山田裕、島田義也
2. 発表標題 放射線発がんから幹細胞へ：個人的展望
3. 学会等名 幹細胞研究から見た低線量（率）放射線リスクに関するワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2016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
研究分担者	真下 知士 (Mashimo Tomoji) (80397554)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	臺野 和広 (Daino Kazuhiro) (90543299)	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・研究統括 (82502)	
連携研究者	西村 まゆみ (Nishimura Mayumi) (70218204)	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・専門業務員 (82502)	