

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01790

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リンパ球性白血病の発生を低減する

研究課題名(英文) Cancer prevention effect of calorie restriction on radiation induced B-cell leukemia

研究代表者

尚 奕 (Shang, Yi)

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・研究員(任常)

研究者番号：50533189

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)：子ども期の放射線被ばく後の長期的影響として、がんの発生がよく知られて、特に白血病のリスクが高くなる。しかし、その発がん機構がまだ不明である。これまでに、我々は、子ども期に被ばくしても、成体期早期からカロリー制限を行うことによって、リンパ球性白血病の発生が有意に低減できることをマウスを用いて実験的に証明した。本研究では、同マウスモデルを用いて、子ども期の放射線被ばく誘発リンパ球性白血病のサブタイプ分類法を確立したうえで、次世代シーケンス手法を用いてゲノム変異解析を行い、変異種類及び変異頻度の特徴を見出した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that children are more susceptible to carcinogenic effects of radiation as compared with adults. So that there is a critical need to make efforts for assessing risk and developing prevention strategies for radiation-induced cancer after childhood exposure. Using mouse model, earlier we reported that adult-onset calorie restriction (CR) reduced the risk of late-occurring lymphomas but not early-onset lymphomas. To investigate the mechanism of CR, we established immunohistochemical staining method to diagnose lymphomas into 4 subtypes. Using next generation sequencing method, we analyzed whole exosome sequence of B-cell leukemia samples, found special mutations in this mouse model.

研究分野：放射線生物学

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、放射線による健康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、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。これまでに、原爆被爆者の疫学調査や、子ども期のCT検査後の追跡調査から、子ども期の放射線被ばくによってリンパ球性白血病の発症リスクの上昇が認められている (Preston et al., *Radiat Res*, 1994; Pearce, et al., *Lancet*, 2012)。我々のマウスモデルを用いた動物実験でも、子ども期にX線 3.8Gy 照射すると生涯のリンパ球性 (主にBリンパ球由来) 白血病の発症リスクが3~4倍上昇することを明らかにした (Shang, et al., *Int J Cancer*, 2014)。

一方、放射線被ばく後の生活習慣要因は放射線の影響を左右する。様々な生活習慣要因の中で、我々はカロリー制限に着目した。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 (Gross et al, *PNAS*, 1986)。当研究所の吉田らもカロリー制限は放射線誘発マウス骨髄性白血病の発生を抑制することを報告している (Yoshida et al., *PNAS*, 1997)。その後、さらに我々は成体期早期からのカロリー制限 (calorie restriction, CR) が制限しない群 (Ad libitum, AL) に比べて、子ども期被ばくによって生じるリンパ球性白血病並びに固形がんの発生を遅らせることを報告した (Shang, et al., *Int J Cancer*, 2014)。我々の研究結果から、同じ病理像を持つリンパ球性白血病でも、非照射群と照射群両方に見られた発症の遅いタイプ (遅発性) にカロリー制限による発がん抑制効果が認められたが、照射群のみに見られた発症の早いタイプ (早期発生) ではカロリー制限による有意な発がん抑制効果が認められないことが分かった。従って、早期発生と遅発性リンパ球性白血病の発がん機構に違いがあると推測し、その違いによってカロリー制限のがん低減効果も異なる可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

以上の研究背景から、免疫組織化学の手法を用いて、放射線誘発リンパ球性白血病のがん細胞表面抗原解析、遺伝子変異解析によって白血病の詳細分類を行い、被ばくまたはカロリー制限の異なる条件下で発生した白血病の特徴、特に放射線被ばくの「爪痕」を明らかにし、カロリー制限の影響を受けた遺伝子変異パターンの変化を明確にすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

B6C3F1 マウスを用いて、非照射、または生後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。B6C3F1 マウスは生涯飼育し、瀕死個体の病理解剖を行い、計 67 例の白血病組織 (骨髄、脾臓、腫大したリンパ節など) を採取し、ホルマリン固定および低温凍結保存した。本研究ではホルマリン固定サンプルを用いて病理切片を作成し、細胞表面抗原の免疫染色で白血病細胞の分類を行った。また、凍結保存したサンプルを用いて、主に次世代シーケンス法を用いて DNA 配列解析による白血病相関遺伝子群の変異を網羅的に調べ、被ばく/カロリー制限によって特異的に変化する遺伝子、発がん経路を詳細に解析した。

### 4. 研究成果

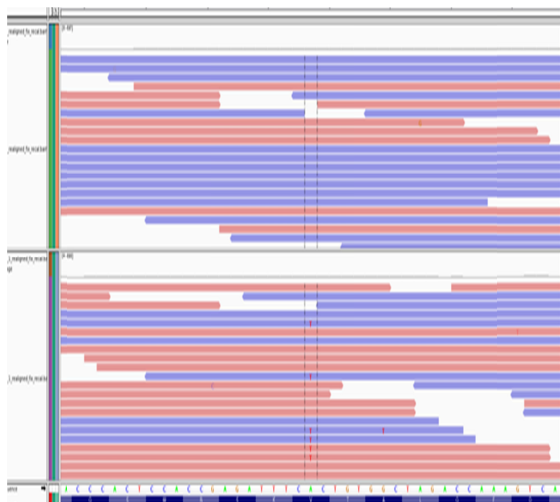
免疫組織化学手法によるリンパ球性白血病のサブタイプ分類

正常及びリンパ腫と診断された脾臓のHE染色からリンパ腫では白脾髄や赤脾髄の区別が無く無秩序に類似したヘマトキシリンに強く染まった細胞が多く見られ、また、リンパ腫の細胞は細胞核/細胞質比が高くクロマチンが粗大であるのが特徴だが、細胞の種類は区別できないため、免疫組織化学手法を用いて、Bリンパ球の分化マーカーTdT、PAX5、CD45R、Tリンパ球マーカーCD3の免疫染色を行い、リンパ球性白血病の分類をT細胞性とB細胞性を大きく分けた。さらに、B細胞の分化度によって pro-B、pre-B、mixed タイプ、pro-Bの中には early-, internal-, late- に細かく分類した。このようなサブタイプ分類によって被ばくまたはカロリー制限によってBリンパ球性白血病の発生傾向が異なることが分かった。特に、被ばく群のみ照射後1年以内に、早期に発症する例が見られ、免疫組織化学的に分化度の低いタイプが特徴的であった。

次世代シーケンス手法によるゲノム変異解析

病理及び免疫組織化学手法でサブタイプ診断した検体から、次世代シーケンス解析用サンプルを選出し、凍結腫瘍組織からゲノムDNAを抽出、精製後、Mouse All Exonライブラリーを合成させた。このライブラリーを用いて、イルミナ社 MiSeq または NextSeq キットを使用して、腫瘍の全エクソームを調べた。正常遺伝子配列は同系統マウスの耳から抽出したゲノムDNAを用いた。実験条件検討ではDNA抽出方法からAll Exonライブラリー合成効率まで確認し、実験条件の最適化に成功した。3µgの凍結組織から安定したライブラリーを合成する実験系を確立した。シーケンス実験では1検体から quality score>=30 の配列データを4ギガバイト以上獲得できた。各検体の配列データと公表されたデータベースにマッピングした後、解析パイプラインを用いて変異を検出した。各検体から5~6万個の塩基置換と短い欠失・挿入が検出された。リード数や変異頻度を考慮したうえで統計的に有意な変異のみをフィルタリングにより抽出し、アノテーションに

よって変異に注釈をつけて、遺伝子機能、アミノ酸置換タイプ、さらに遺伝子機能等を解析した。本研究は特に自然発生したBリンパ球性白血病と放射線誘発したBリンパ球性白血病に変異スペクトラムの違いに注目した。被ばく特有な変異がBリンパ球性白血病の発生に寄与することが示唆され、今後は解析サンプル数をさらに増やして、解析を行う。また、カロリー制限群と非制限群に発生したBリンパ球性白血病のサブタイプが異なるため、同サブタイプの検体数が限られて、比較が困難になった。サブタイプの違い自体がカロリー制限の影響を示していると考えら



れる一方、今後は可能な限り動物数をさらに多くして、統計的パワーの十分な実験の実施が課題となる。

図1.腫瘍組織から検出された高頻度な変異の一例(上:正常ゲノム;下:腫瘍ゲノム)

## 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 3件)

1. Y. Shang, Y. Sawa, B.J. Blyth, C. Tsuruoka, H. Nogawa, Y. Shimada, S. Kakinuma: Radiation Exposure Enhances Hepatocyte Proliferation in Neonatal Mice but not in Adult Mice, *Radiat Res.* 188(2):235-241, 2017
2. K.Ariyoshi, Y. Fujishima, T. Miura, Y. Shang, S. Kakinuma, Y. Shimada, K. Kasai, A. Nakata, A. Tachibana, MA. Yoshida. Rapid isolation of murine primary hepatocytes for chromosomal analysis. *In vitro cellular & Developmental Biology- Animal*, 53(5), 474 - 478, 2017
3. Tani S, Blyth BJ, Shang Y, Morioka T, Kakinuma S, Shimada Y.A Multi-stage

Carcinogenesis Model to Investigate Caloric Restriction as a Potential Tool for Post-irradiation Mitigation of Cancer Risk. *J Cancer Prev.* 21(2):115-20, 2016

〔学会発表〕(計 3件)

1. Cancer prevention mechanism of calorie restriction on childhood exposure to ionizing radiation in mouse model. 尚 奕, 臺野 和広, 森岡 孝満, 石川 敦子, 大寺 恵子, Ryoya Takahashi, 柿沼 志津子. Keystone Symposia Conference DNA and RNA Methylation, Keystone Symposia, 2018-01-24
2. 子ども期被ばくとカロリー制限—動物実験から分かったこと. 尚 奕, 森岡 孝満, 鶴岡 千鶴, 立花 章, 島田 義也, 柿沼 志津子. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 社団法人日本放射線影響学会, 2016-10-28
3. Effect of Calorie Restriction on the Molecular Mechanism of Radiation induced Hepatocellular Carcinoma in Mouse Model. 尚 奕, 柿沼 志津子, 臺野 和広, 森岡 孝満, 小久保 年章, 島田 義也. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), Kyoto University, 2015-05-28

〔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  
無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

尚 奕 (SHANG Yi)

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・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)

森岡 孝満 (MORIOKA Takamitsu)

柿沼 志津子 (KAKINUMA Shizuko)