

令和元年5月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00548

研究課題名(和文)放射線内部被ばくによる甲状腺がんの発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenic mechanism of internal radiation-induced thyroid cancer

研究代表者

葦重 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘発性甲状腺発がんとの関連性を調べるため甲状腺に持続的により多くのROSを産生する可能性がある動物を検討し甲状腺特異的オートファジー不全マウス (Atg5-f/f;TPO-Cre) を用いた。

このマウスは胎生期から甲状腺特異的にオートファジー不全となり、対照群との比較では生後12ヶ月で濾胞細胞内に変性タンパクの蓄積がみられた。さらに分解されないまま残った不良ミトコンドリアからのROSによると考えられるDNAの酸化損傷(8-OHdG)および二重鎖切断(53BP1 foci)も増加した。これらの結果から生体内でのROSの持続的な産生とDNA損傷との関連を証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は以前、甲状腺外部被ばくの際には被ばく時だけでなく被ばく後にも持続的で高いROS産生が起こり、この被ばく後のROSによりDNA損傷が誘発され一部が修復されず染色体の異常として残ることを明らかにした。

オートファジーの不全はROS産生を恒常的に亢進させDNA損傷を増加させることから、がんの形成や進展を加速させる可能性がある。今後、甲状腺特異的にオートファジー不全を起こしたマウスに放射線照射を行い甲状腺を経時的に解析することで細胞内のROS産生の増加が甲状腺の発がんに関与するかを解明することができる。さらにROSの関与が明らかになれば抗酸化剤の投与により放射線発がんを予防できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the relationship between radiation-induced thyroid carcinogenesis and ROS, thyroid-specific autophagy deficient mice (Atg5-f/f;TPO-Cre mice), which were thought to sustainably produce much more ROS in the thyroid, were used. Atg5-f/f;TPO-Cre mice lack autophagy in a thyroid-specific manner from the embryonic stage. In the 12-months of age, accumulation of denatured protein was observed in the thyroid follicular epithelial cells of Atg5-f/f;TPO-Cre mice as compared with the control. In addition, oxidative damage (8-OHdG) and DNA double strand breaks (53BP1 foci) were also increased, which are thought to be caused by ROS from remaining undegraded defective mitochondria. These results demonstrated the relationship between sustained production of ROS and DNA damage in vivo.

研究分野：内分泌学

キーワード：放射線 甲状腺 ROS 発がん オートファジー DNA損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺は放射線被ばくによる発がん感受性の高い臓器の1つである。長崎・広島原爆被ばく者やチェルノブイリ原発事故後に甲状腺がんの増加が認められており、福島原発事故でも増加が懸念されている。放射線被ばくによる甲状腺がんの発症機構として、染色体転座によるRET/PTC融合遺伝子の誘発が報告されているが、発がん機構における内部被ばくの役割は未だに不明である。

2. 研究の目的

本研究では、「放射線内部被ばくにより発生する活性酸素(ROS)が、被ばくによって誘発されたRET/PTC融合蛋白質をレドックス制御することにより、RET/PTC融合蛋白質間の架橋形成による二量体化を促進し、キナーゼ活性の増強を介して発がん過程の加速を招く」との仮説を提唱し、これを証明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)「内照射により甲状腺細胞にRET/PTCが生じる」か否かをラット甲状腺細胞PCCL3を用いて5'-RACEとRT-PCRを組み合わせてin vitroで検討する。

(2)「放射線被ばくで生じたRET/PTCは内部被ばくの場合、継続的な被ばくによりROS産生・レドックス反応が持続し、RET/PTCがさらに持続的に活性化される」という仮説をRET/PTC1トランスフェクトPCCL3細胞の内照射モデルで証明する。

(3)「RET/PTC発現単独に比較して、内照射併用で発がん頻度が上がる」という仮説をRET/PTC1発現コンディショナルトランスジェニックマウスを用いたin vivo動物モデルで証明する。

4. 研究成果

研究の方法(2)について証明するために以下の検討を行った。

(1) CHO/RET/PTC1細胞の作製

本研究で用いる予定であったPCCL3細胞(ラット正常甲状腺細胞)よりも増殖が早く実験の効率がよいCHO(Chinese Hamster Ovary)細胞にレンチウイルスを用いてRET/PTC1遺伝子導入を試みたがよい結果が得られず、その後レトロウイルスに切り替えクローニング方法もIn-fusion法に変更した。この方法で遺伝子導入した細胞をG418(ネオマイシン)でセレクトを行い、ウエスタンブロットにてV5 tagの発現を確認できたことからRET/PTC1遺伝子導入完了とみなし、これをCHO/RET/PTC1細胞とした。

(2) 放射線照射によるRET/PTC1の異常活性化の確認

以前の報告でRET/PTC1の活性化を誘導した紫外線(UV)200J/cm²照射またはX線10Gy照射でCHO/RET/PTC1細胞が異常活性化を起こすか否かを下流のMAPKの発現により確認した。基礎検討の結果としてCHO細胞へのUVあるいはX線照射60分後、p-ERKの発現の増加を認めたもののp-p38、p-JNKについては抗体の反応性の問題から検出が不可能であったためCHO細胞を用いた検討を断念し、H-Tori(ヒト正常甲状腺)細胞を用いることにしたがRET/PTC1の異常活性化は確認されず、この実験系を終了した。

放射線被ばくと持続的なROS産生による発がんについての研究を継続するために別の角度から検討を重ねることとした。我々は以前にin vitroのモデルを構築し、甲状腺の被ばくの際には被ばく時だけでなく被ばく後にも持続的で高いROS産生が起こり、この被ばく後のROSにより生じたDNA損傷や修復されずに残った染色体の異常が示された。この値はむしろ被ばく時の放射線自体の直接作用や瞬間的に生じたROSによる間接作用よりも高く、この結果から持続的なROS産生とゲノム不安定性につながる染色体異常との関連性が示唆された。しかしin vivoにおいて、がん抑制遺伝子をKOしたマウスに外部・内部被ばくさせた実験では、被ばくによるがんは発症しなかった。我々は、発がんにはさらに高く持続的なROS産生が必要と考え、生体内で通常起こっているオートファジーに着目した。オートファジーは生命の維持に必要なタンパクの再構成のため、あるいは不要なタンパクを分解するために働くが、不良なミトコンドリアの分解処理も担っている。オートファジーを不全にすることで不良ミトコンドリアが細胞内に増加しROSが過剰に産生されると考えられる。このROSの過剰産生はDNAの損傷を起こし、ひいては放射線誘発性のがん形成を早期に惹き起こす可能性がある。本研究では、胎生期から、あるいは生後から甲状腺特異的にオートファジー不全を起こしたマウスに放射線外・内照射を

行い、甲状腺を経時的に解析することで細胞内の ROS 産生の増加が甲状腺の発がんに関与するかを解明することができる。さらに ROS の関与が明らかになれば、抗酸化剤などによる放射線発がんに対する予防が可能となる可能性があると考え、以下の方法を用いて検討を行った。

まずオートファジーの不全が甲状腺に与える影響についての検討として、

(3)胎生期から甲状腺特異的にオートファジーが不全となった Atg5TPO-KO マウスあるいは Atg5flox/+;TPO-Cre マウス(Control)を生後 4~12 ヶ月で血清、甲状腺組織を採取し以下のことを調べた。

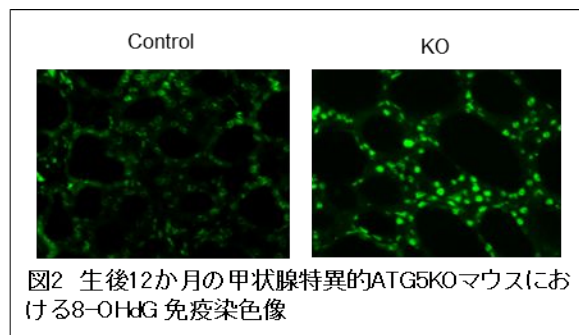
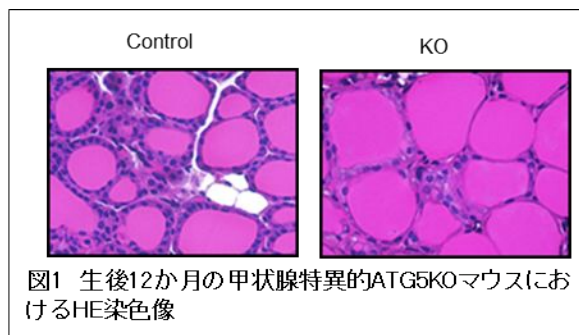
甲状腺機能 (甲状腺重量/体重比、Free T4 値、TSH 値の測定)

組織による検討 (HE 染色、免疫染色による異常タンパクの蓄積・DNA 二重鎖切断・酸化ストレスマーカー、TUNEL 法によるアポトーシスの定量)

以上の検討の結果として胎生期から甲状腺特異的にオートファジーが不全となった Atg5TPO-KO マウス (以下 KO) では、全実験期間を通して Control との甲状腺機能 (Free T4 値、TSH 値) の有意差はなかったものの、形態学的には KO において濾胞細胞が減少し、少ない細胞数で濾胞を維持するため濾胞細胞の丈が短くなるという変化がみられた (図 1)。また免疫蛍光染色により変性タンパクの蓄積や TUNEL 法によりアポトーシスの増加もみられた。さらに、分解されないまま残った不良ミトコンドリアからの活性酸素種 (ROS) によると考えられる、8-OHdG をマーカーとした DNA の酸化損傷 (図 2) および二重鎖切断も増加した。これらの結果から、オートファジーの不全により甲状腺での形態学的な変化および ROS の持続的な産生と DNA 損傷との関連を証明することができた。

今後の展望としてオートファジー不全マウスにより多くの DNA 損傷や変性タンパクの蓄積を促すため放射線外・内照射し、甲状腺機能や形態学的変化 (発がん頻度)

を観察する。さらに放射線照射により ROS の発生源となるミトコンドリアの機能低下や染色体の異常がどの程度増加するかの検討が必要であると考えられる。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Shimamura M, Yamamoto K, Kurashige T, Nagayama Y. Intracellular redox status controls spherogenicity, an in vitro cancer stem cell marker, in thyroid cancer cell lines. *Experimental cell research*. 2018. 370(2) 699-707. DOI: 10.1016 / J. yexcr. 2018. 07. 036. (査読有)

Shimamura M, Shibusawa N, Kurashige T, Mussazhanova Z, Matsuzaki H, Nakashima M, Yamada M, Nagayama Y. Mouse models of sporadic thyroid cancer derived from BRAFV600E alone or in combination with PTEN haploinsufficiency under physiologic TSH levels. *PloS one*. 2018. 13(8) e0201365. DOI:10.1371/journal.pone.0201365. (査読有)

Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y. N-Acetyl-L-cysteine protects thyroid cells against DNA damage induced by external and internal irradiation. *Radiation and environmental biophysics*. 2018. 56(4) 405-412. DOI:10.1007/s00411-017-0711-8. (査読有)

Shimamura M, Kurashige T, Mitsutake N, Nagayama Y. Aldehyde dehydrogenase activity plays no functional role in stem cell-like properties in anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocrine*. 2017. 55(3) 934-943. DOI: 10.1007/s12020-016-1224-y. (査読有)

Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y. Differences in quantification of DNA

double-strand breaks assessed by 53BP1/γH2AX focus formation assays and the comet assay in mammalian cells treated with irradiation and N-acetyl-L-cysteine. Journal of radiation research. 2016. 57(3) 312-317. DOI:10.1093/jrr/rrw001. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

Yuji Nagayama, Tomomi Kurashige, Mika Shimamura, Mutsumi Matsuyama, Masahiro Nakashima. Basal Autophagy Deficiency Causes Thyroid Follicular Epithelial cell Death in Mice. 第3回放射線災害・医科学拠点国際シンポジウム. 於：ザ・セレクトン福島、福島県福島市. 1/13-14、2019.

蔵重 智美、松山 睦美、中島 正洋、嶋村 美加、永山 雄二. マウス甲状腺におけるオートファジーの役割. 第3回放射線災害医科学拠点カンファランス. 於：長崎大学 熱帯医学研究所 グローバルヘルス棟 1F、長崎県長崎市. 6/2、2018.

蔵重 智美、嶋村 美加、永山 雄二. 甲状腺細胞における放射線誘導性 DNA 二重鎖切断 (DSBs) に対する抗酸化剤の効果. 第1回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス. 於：長崎大学良順会館、長崎県長崎市. 6/4、2016.

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名：永山 雄二

ローマ字氏名：NAGAYAMA, Yuji

所属研究機関名：長崎大学

部局名：原爆後障害医療研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：30274632

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：嶋村 美加

ローマ字氏名：SHIMAMURA, Mika

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。