

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16194

研究課題名(和文)放射線の被ばく時年齢に依存してがんになりやすい突然変異細胞が異なるか？

研究課題名(英文)Dependence of cancer-prone mutation on age at radiation exposure.

## 研究代表者

砂押 正章(Sunaoshi, Masaaki)

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(定常)

研究者番号：70756030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線の被ばく時年齢に依存した胸腺リンパ腫の形成過程を明らかにするため、異なる年齢で放射線に被ばくしたマウスの胸腺細胞における遺伝子異常を被ばく後から発がんの時期まで経時的に解析した。その結果、新生児期放射線被ばく後では、成体期被ばく後とは異なり、発がん過程の比較的早期から遺伝子異常を持つ細胞が増加した。また、発がん過程で観察される遺伝子異常の種類にも被ばく時年齢に依存した違いがある傾向がみられた。本研究により、放射線の被ばく時年齢に依存してがんの成り立ちが異なる可能性が示唆された。将来的には、被ばく時年齢に依存した発がんリスクやそのメカニズムの推定に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the process of radiation lymphomagenesis depending on age at exposure, genetic alterations in thymocytes of mice exposed to radiation at different ages were analyzed from after irradiation until the time of carcinogenesis. As a result, after infant irradiation, unlike after adult irradiation, cells harboring genetic alterations increased in the early phase of carcinogenic process. The pattern of the genetic alterations tended to be different depending on the age at exposure. These results suggested that radiation carcinogenic process might depend on age at exposure. In the future, it is expected that this research can be applied to the estimation of carcinogenic risk and mechanism taking into account the age at radiation exposure.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発がん マウス胸腺リンパ腫 被ばく時年齢 遺伝子突然変異

1. 研究開始当初の背景

●こどもの放射線被ばくによる発がんリスクとメカニズム

小児は、大人に比べ放射線感受性が高いと考えられている。原爆被爆者では小児白血病、チェルノブイリ事故後では小児甲状腺がんの増加が観察され、特に小児甲状腺がんでは、発症年齢あるいは被ばく時年齢に依存した遺伝子異常が報告されている。これらの結果は、小児期の被ばくと成人期の被ばくでは、がんの発生率や原因遺伝子、あるいは変異メカニズムに違いがあることを示唆する。また近年では、小児に対するCT スキャンや放射線治療による被ばくの機会が増加している。小児へのCT スキャン後の発がんリスクが上昇することも報告されており、小児期の被ばくによる発がんリスクおよびメカニズムは、放射線防護の観点から明らかにすべき問題である。

●放射線誘発胸腺リンパ腫と被ばく時年齢に依存したゲノム異常

放射線誘発胸腺リンパ腫は、若齢期でリスクの高いヒト急性T細胞性白血病のモデルとして古くから研究されている。

申請者らのこれまでの研究で、異なる年齢で放射線を照射したマウスに誘発された胸腺リンパ腫の発生率には、被ばく時年齢に依存した違いはないが、新生児期照射による胸腺リンパ腫ではがん抑制遺伝子 *Pten* の突然変異が、一方、若齢成体期照射では *Ikaros* の突然変異が原因であることを報告した (図1, Sunaoshi *et al.*, Mut Res 2015)。

また、次世代シーケンズ法による全エクソンの突然変異解析から、*Pten* の突然変異を観察した胸腺リンパ腫においては、1つの腫瘍を形成しているほぼ全ての細胞において、同一の突然変異が生じている可能性を示唆するデータを得ている (Daino, Sunaoshi *et al.* 未発表)。この解析では、被ばく時年齢によって突然変異頻度が異なる可能性のある新規候補遺伝子の存在も示唆された。以上の結果は、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫では、被ばく時年齢によって発がんに関わる遺伝子異常の蓄積パターンが異なり、特に新生児期被ばく後では *Pten* に突然変異を生じた細胞ががん化しやすい可能性を示唆する。

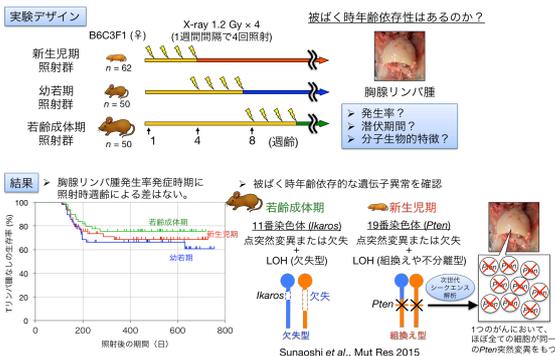


図1. これまでの実験概要

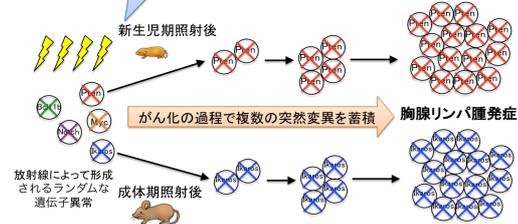
2. 研究の目的

●新生児期の放射線照射後、*Pten* の突然変異をもつ細胞ががん幹細胞となるのか?

一般的に発がんにおいては、発がん過程の初期に生じた遺伝子異常ががんの発生において重要であると考えられている。しかし、申請者らのマウス胸腺リンパ腫の研究で被ばく時年齢によって突然変異頻度に違いが観察された *Pten* および *Ikaros* の遺伝子異常は、放射線照射後のがん化の過程のうち、比較的後期に生じる可能性が示唆されている (Ohi *et al.*, 2007)。これらの結果は、①放射線照射後、*Pten* および *Ikaros* における遺伝子異常ががん化の早期に生じ、胸腺内微小環境などの違いに依存してがんの芽として選択され胸腺リンパ腫を発症する可能性 (図2(A))、あるいは②2つの遺伝子異常はがん化の後期に重要であり、遺伝子異常が生じた後のがん細胞集団の拡大しやすさが被ばく時年齢によって異なる可能性 (図2(B)) を予想させる。本研究では、被ばく時年齢の違いが特定の遺伝子異常をもつ細胞の蓄積・拡大にどのように影響するかを明らかにすることを目的とした。

(A)

仮説①: がんになる突然変異細胞は、被ばく時年齢に依存して発がんの初期に決まる。



(B)

仮説②: がんになる細胞は、放射線被ばく後、複数の突然変異を蓄積し、発がんの後期に被ばく時年齢に依存して決まる。

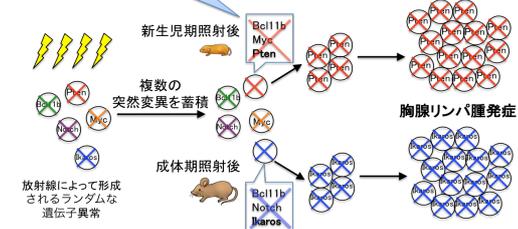


図2. 胸腺リンパ腫発症過程における突然変異蓄積パターンの仮説

3. 研究の方法

(1) 解析①

●放射線照射後の胸腺内微小環境において、突然変異細胞のがん化のしやすさが被ばく時年齢に依存するか?

解析①では、当初、遺伝子組換えマウス由来の *Pten* あるいは *Ikaros* 欠損胸腺細胞を採取し、異なる年齢で放射線照射 (X線 1.2 Gy x 4 回照射) を行った直後のマウス

胸腺内に移植することで、被ばく時年齢の異なるマウス胸腺内微小環境においてどちらの突然変異をもつ細胞が選択され、がんとして成立するのかを明らかにする計画であった。しかしながら、組換えマウス由来の細胞を移植し胸腺リンパ腫が発症するかどうかの検討に時間を要することや、予算的に実験規模を再考する必要があるなどの理由から、実験計画を変更した。

放射線照射後の胸腺に、胸腺リンパ腫由来の細胞を移植すると高頻度かつ早期に胸腺リンパ腫が発症することが明らかとなっている。そのため、変更後の計画では、放射線医学総合研究所によりすでに採取ならびに凍結保存されているマウス胸腺リンパ腫細胞を培養し、移植細胞として用いることとした(図3)。

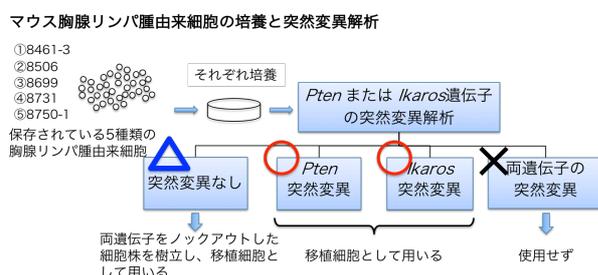


図3. 計画変更後の解析①の実験デザイン

## (2) 解析②

### ●胸腺リンパ腫の形成に関わるゲノム異常の蓄積過程は被ばく時年齢依存的に異なるか?

これまで行ってきた発がん実験と同様に、B6C3F1 雌マウスを用いて、「非照射群」および1週齢または8週齢からそれぞれ1.2 GyのX線を1週間間隔で4回全身照射する「新生児期照射群」と「若齢成体期照射群」の3群を設定した。

胸腺リンパ腫は、放射線照射後およそ20週間前後で発症する。そのため、本研究では、4回照射後6週間間隔で24週間まで経時的に解剖を行い、胸腺を摘出した。

摘出した胸腺は、左右の葉をそれぞれ最大5分割(胸腺のサイズに応じて適宜調整)してから胸腺細胞を採取し、それぞれからDNAを抽出した。胸腺を分割して採取した理由は遺伝子異常の検出力を少しでも高めるためであり、遺伝子異常をもつ細胞集団が小さい場合でも、その異常を検出できるように工夫した。

抽出したDNAを用いて胸腺リンパ腫発症に関わるがん抑制遺伝子(*Ikaros*, *Bcl11b*, *Pten*)における遺伝子異常(ヘテロ接合性の消失; LOH)の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 解析①

#### 5 種類の胸腺リンパ腫由来細胞株の培養

の条件検討を行った。培地はDMEMを用い、フィーダー細胞と共培養する方法、胸腺細胞の増殖に必要とされるIL-2や、ヒト胚性幹細胞ではアポトーシスを抑制することが知られているROCK阻害剤などを添加する方法により培養を試みた。結果として、一度は細胞株8731の培養に成功した(図4(A))。しかしながら、継代して長期的に培養することが難しく、培養を継続すると死細胞が増加した(図4(B))。その他の細胞株も長期的な培養が難しいことが明らかになったため、これら細胞株を移植する代わりに、新たに「胸腺リンパ腫を発生させる実験」を設定し、発生した胸腺リンパ腫の中から移植実験に用いる細胞を選出することとした。研究期間の進捗としては「胸腺リンパ腫を発生させる実験」を設定するまでに留まったが、移植実験の予備的な検討として、前リンパ腫細胞(胸腺リンパ腫の芽)が存在すると考えられる時期の胸腺細胞の移植実験を行った。現在、移植実験を行ったマウスを経過観察中である。将来的には、設定した実験群から得られた胸腺リンパ腫細胞を放射線照射後のマウス胸腺に移植し、当初の目的である移植細胞の細胞競合の強さや組織内微小環境の違いによるがんのなりやすさの違いを調べる予定である。

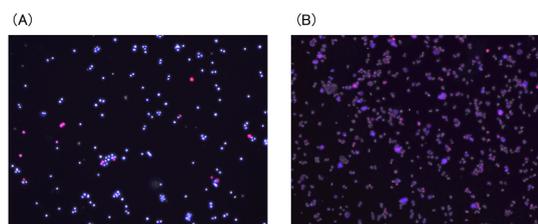


図4. 培養後の胸腺リンパ腫細胞をPI(赤)とHoechst(青)で染色した写真  
(A)継代していない8731細胞株。(B)2回継代後の8731細胞株。青色の細胞が生細胞、赤色と青色の両方が陽性の細胞が死細胞。

### (2) 解析②

放射線被ばく後の経時的な突然変異解析実験では、照射後12週間までに1週齢(新生児期)照射群のおよそ半数の個体が死亡した。死亡した個体の解剖時の所見として、四肢蒼白、肺や脳などにおける点状出血を伴っていた。また、照射後6週間の時点で個体の末梢血中の血球組成を調べると、血小板や赤血球の減少を示す個体が確認された(図5)。以上の結果から、大半の個体が造血不良により死亡したことが予想された。8週齢(若齢成体期)照射群のマウスでは、このような所見はほとんど見受けられなかった。以前の実験においては、1週齢群におけるこのような所見は観察されていないため、同系統マウス(B6C3F1)であってもマ

ウスのコロニーが異なることで放射線への感受性が異なることが明らかとなった。この感受性の相違に関しては、想定外の結果であり、胸腺リンパ腫の発生率にも影響する可能性が考えられるため、今後の研究を進める上でマウスの系統、あるいは照射する線量を変えるなど、何かしらの対策を講じる必要があると考えられる。

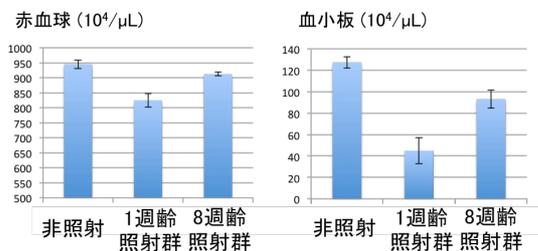


図5. 照射後6週間の時点での末梢血の組成の解析結果

一方で、発がん処理(X線1.2 Gy×4回照射)後、四肢蒼白などの所見が観察されずに生存したマウスにおいては、経時的に6~24週間までで解剖し、胸腺細胞を採取、重量を測定し、抽出したDNAを用いてLOH解析を行った。その結果、胸腺リンパ腫の発生率および発生時期には、2群間での相違はなかった。しかしながら、胸腺リンパ腫を発症しなかった胸腺(100 mg未満)に着目すると、1週齢照射群では、照射後の比較的早期(照射後~12週間)から、LOHを持つ胸腺が高頻度に確認された(図6左)。一方で、8週齢照射群では、照射後12週間までにLOHを持つ胸腺の頻度は低く、胸腺リンパ腫の発生率がピークとなる照射後12~18週間にかけてLOH頻度が増加した(図6右)。この結果は、胸腺リンパ腫の芽となる細胞が胸腺内に生じるタイミング、あるいは生じた後の発症までのプロセスが被ばく時の年齢に依存して異なる可能性を示唆する。

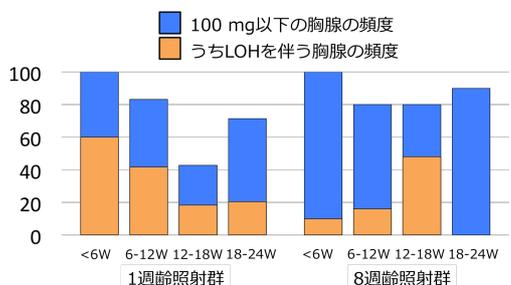


図6. 腫大していない胸腺(100 mg未満)の頻度とそのうちLOHを伴っていた胸腺の割合

LOHが観察された遺伝子の組み合わせに着目すると、同じ胸腺から採取したサンプルでも採取する部分が異なる場合、その

LOHパターンに違いのあるサンプルが複数観察された。この結果から、がん化の初期において胸腺リンパ腫の芽となる遺伝子異常を持つ細胞は、胸腺の中に複数生じ、がん化の過程で最終的にモノクローナルながんになる可能性が示唆された。また、胸腺リンパ腫の発生率がピークとなる時期(12~18週間)において、観察されるLOHパターンが被ばく時年齢に依存して異なる傾向が観察された(図7)。この結果から、発がん過程で選択される遺伝子異常の種類にも被ばく時年齢に依存した違いがある可能性が考えられた。

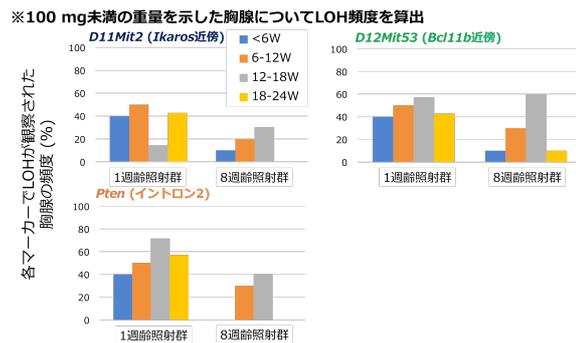


図7. 解析に用いたマイクロサテライトマーカー毎のLOH頻度

本研究により、放射線の被ばく時年齢に依存してがんの成り立ちが異なる可能性が示唆された。しかしながら、解析に用いたマウスの個体数が少ないため、今後は数を増やした解析が必要とされる。また、今回解析した遺伝子以外にも発がんに関わる遺伝子異常が存在すると思われるため、今後の研究の方針としては、本研究で得られた胸腺細胞について次世代シーケンス解析を行い、がんを観察されるDNAコピー数変化、LOH、突然変異などが前がん段階のどの段階で生じるのかを網羅的に調べる予定である。本研究が大成されることにより、将来的には、被ばく時年齢に依存した発がんリスクやそのメカニズムの推定に役立つことが期待される。

## 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0件)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 砂押 正章, 尚 奕, 臺野 和広, 鶴岡 千鶴, 石川 敦子, 島田 義也, 柿沼 志津子. 放射線誘発マウス胸腺リンパ腫発症過程における被ばく時年齢依存性. 日本放射線影響学会第60回大会. 2017-10-26

- ② Masaaki Sunaoshi, Blyth J. Benjamin, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Shinobu Sakairi, Takamitsu Morioka, Mayumi Shinagawa, Mari Ogawa, Atsuko Ishikawa, Kazuhiro Daino, Keiji Suzuki, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Shizuko Kakinuma. Age-dependent thymus regeneration after irradiation may change the initiating cells for radiation-induced lymphomagenesis. 63<sup>rd</sup> Annual Radiation Research Society Meeting. 2017-10-18
- ③ Masaaki Sunaoshi. The effect of age at exposure on radiation-induced carcinogenesis -Analysis of animal models-. The 2nd joint symposium Nagasaki University and University of Würzburg. 2017-09-28.
- ④ Masaaki Sunaoshi, Benjamin J. Blyth, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Shinobu Sakairi, Takamitsu Morioka, Mayumi Shinagawa, Mari Ogawa, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma. Age-at-exposure dependence in thymus regeneration after fractionated irradiation to mice. The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science. 2017-02-22.
- ⑤ 砂押 正章, Benjamin J. Blyth, 甘崎佳子, 坂入しのぶ, 尚 奕, 鶴岡千鶴, 品川まゆみ, 小川真里, 森岡孝満, 西村まゆみ, 島田義也, 鈴木啓司, 立花章, 柿沼志津子. 放射線被ばく後のマウス胸腺における細胞動態 -被ばく時年齢に依存した発がんメカニズムを考える-. 平成 28 年度日本放射線影響学会第 59 回大会, 2016-10-26.
- ⑥ 砂押 正章, Benjamin J. Blyth, 甘崎佳子, 坂入しのぶ, 尚 奕, 鶴岡千鶴, 品川まゆみ, 小川真里, 森岡孝満, 西村まゆみ, 島田義也, 鈴木啓司, 立花章, 柿沼志津子. マウス胸腺リンパ腫発生モデルを用いた放射線発がんメカニズムの解析 -新生児期から成体期における被ばく時年齢依存性-. 第 53 回放射線影響懇話会. 2016-07-16.

[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 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

砂押 正章 (SUNAOSHI, Masaaki)  
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: 7 0 7 5 6 0 3 0

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

尚 奕 (SHANG, Yi)  
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: 5 0 5 3 3 1 8 9

柿沼 志津子 (KAKINUMA, Shizuko)  
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・部長  
研究者番号: 2 0 3 9 2 2 1 9

鶴岡 千鶴 (TSURUOKA, Chizuru)  
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: 6 0 4 1 5 4 1 1