

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18198

研究課題名(和文)放射線発がん感受性を変える組織内微小環境とは？—胸腺リンパ腫発生モデルを用いて—

研究課題名(英文)What is the tissue microenvironment that alters radiation susceptibility for carcinogenesis? -Using a thymic lymphoma development model-

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・放射線医学研究所 放射線影響研究部・研究員

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、放射線被ばく後の組織内微小環境の発がん感受性に関わる分子メカニズムを、胸腺リンパ腫好発系であるC57BL/6N系統と抵抗性であるC3H/HeN系統を用いて明らかにすることを目的とした。放射線照射後の2系統間の経時的な組織応答の違いの検出を試みたところ、胸腺は、C57BL/6N系統では、C3H/HeN系統に比べ、劇的な重量の増加を示した。脾臓は、萎縮後、C57BL/6N系統では劇的に重量が回復したのに対し、C3H/HeN系統では緩やかに回復した。これらの照射後の組織応答の違いは、がんの起源細胞を取り巻く組織内微小環境が、発がん感受性の違いと関連して大きく異なる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発がんには、遺伝子異常をもつがんの起源細胞とその細胞を取り囲む組織内微小環境の相互作用が関与すると考えられているが、その具体的な分子メカニズムに関しては情報が乏しいと言わざるを得ない。本研究により、放射線発がんリスクを変化させる組織応答の一端が明らかとなった。将来的に、さらに詳細な分子メカニズムが明らかになることにより、放射線による発がんリスクの低減に繋がる手がかりが得られると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanisms involved in the carcinogenic susceptibility of the tissue microenvironment after radiation exposure using the C57BL/6N, a strain susceptible to the induction of thymic lymphoma, and the C3H/HeN, a strain resistant to the lymphomagenesis. We assessed the differences in tissue response over time between the two strains after irradiation and revealed that the thymus recovered dramatically in the C57BL/6N compared to the C3H/HeN. The spleen weight also increased dramatically in the C57BL/6N after atrophy, whereas it recovered more slowly in the C3H/HeN. These differences in tissue response after irradiation suggest that the tissue microenvironment surrounding the cell of origin for the lymphoma may differ significantly associating with differences in carcinogenic susceptibility.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発がん 組織内微小環境 マウス胸腺リンパ腫 系統差

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線被ばくにより発がんリスクが増加することは、原爆被爆者やチェルノブイリ事故後の疫学調査においても明らかである。放射線発がんの感受性には、遺伝的背景、人種、年齢、性別など様々な要因が関与する。マウスにおいても、放射線発がんの感受性には系統に依存した違いが存在する。例えば、C57BL/6系統のマウスで高頻度に誘発される放射線誘発胸腺リンパ腫は、MSM/Ms系統のマウスでは発生率が低い(Okumoto *et al.*, 1995)(図1A)。この放射線感受性の低さには *Mtf-1* 遺伝子の遺伝的多型が関与することが示唆されている(Tamura *et al.*, 2005)。しかしながら、胸腺が胸腺リンパ腫発症の「場」として必要とされること(Qing *et al.*, 2017)などの知見からも、遺伝的要因だけで胸腺リンパ腫発症の感受性を説明するのは不十分であり、組織レベルでの微小環境(図1B)の変化など、研究の新しい切り口が求められる。

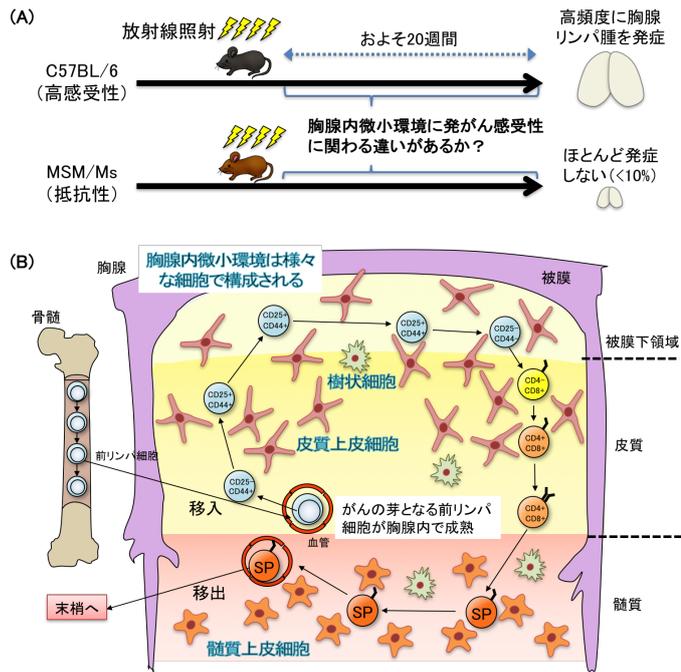


図1. マウス系統による胸腺リンパ腫発生率の違い(A)と正常胸腺内の微小環境(B)

2. 研究の目的

本研究では、胸腺内微小環境が胸腺リンパ腫発症の感受性に関与する分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

2018年度、使用予定であった動物実験施設のX線照射装置が故障した。そのため、当初の計画ではC57BL/6系統とMSM/Ms系統のマウスを用いる予定であったが、動物実験施設の変更に伴い、MSM/Msマウスを実験期間中に変更後の施設に導入するのは困難であると判断し、動物実験計画を変更した。

4週齢のC57BL/6N系統およびC3H/HeN系統マウスに1.6 Gyのγ線を1週間間隔で4回照射した。発がん実験として、照射後1年間飼育し、2系統間の胸腺リンパ腫の発生率を比較した(図2A)。初期応答解析実験として、各照射の2、4、7、14、28日および2、3、4ヶ月後にマウスを解剖し、対象臓器である胸腺、脾臓および末梢血を採取した(図2B)。また、胸腺内の細胞死や炎症、免疫に関連するサイトカインの測定を試みた。

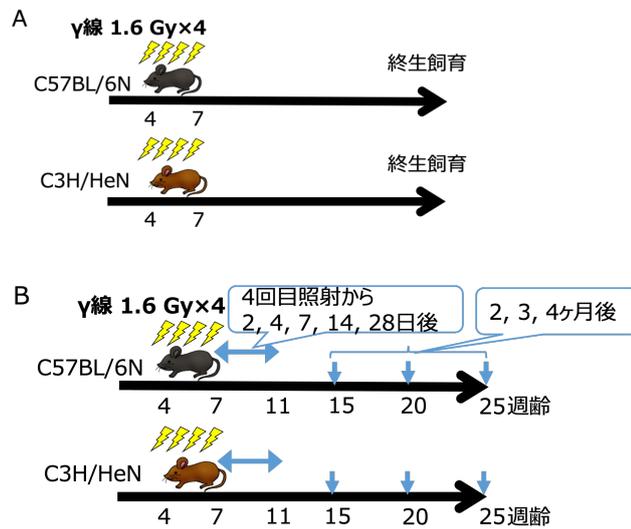


図2. 実験デザイン

4. 研究成果

(1) 発がん実験

過去の研究において、これら C57BL/6N 系統と C3H/HeN 系統のマウス2系統間では、胸腺リンパ腫の発生率が大きく異なることが分かっている (Kamisaku *et al.*, 2000)。しかしながら、ブリーダーから供給されるマウスコロニーが変更されたことにより、実験結果が大きく変わる可能性が懸念された。そのため、本研究では、胸腺リンパ腫の発生率の再現性を確認するために、発がん実験を行った (図 2A)。その結果、これまでの研究を再現する結果、具体的には、C57BL/6N ではおよそ 80%のマウスに胸腺リンパ腫が発生し、C3H/HeN 系統では、20%程度に止まった (図 3)。この結果から、本研究で用いたマウスにおいても、放射線発がん感受性に系統差がみられることが明らかとなった。また、面白いことに、腫大した胸腺と脾臓の頻度を比較すると、胸腺が腫大する頻度は、C57BL/6N 系統において有意に高かったが (図 4A) 脾臓が腫大する頻度は 2 系統間で違いがなかった (図 4B)。このことから、C57BL/6N 系統では胸腺が放射線発がんの標的となりやすいことが示唆された。

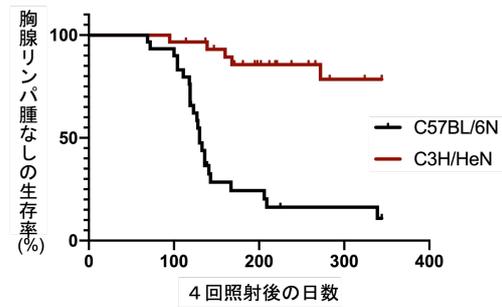


図 3.照射後の胸腺リンパ腫の発生時期の比較

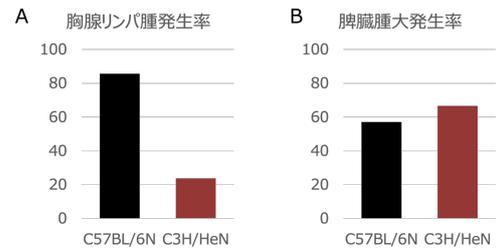


図 4.胸腺リンパ腫(A)及び脾臓リンパ腫(B)の発生率
150 mg 以上の胸腺を胸腺リンパ腫、300 mg 以上の脾臓を脾臓腫大と判定した。

(2) 初期応答解析実験

次の実験として、発がん感受性が変化するメカニズムを明らかにするために、放射線照射後の2系統間の特徴の違いについて解析を進めた。具体的には、放射線照射後、2日から5ヶ月まで経時的にマウスの解剖を行い、胸腺、大腿骨、脾臓、末梢血の血球成分データ等を採取した (図 2B)。照射後、胸腺については、両系統において萎縮が観察され、その後、C57BL/6N 系統では、C3H/HeN 系統に比べ、劇的な重量の増加を示した。脾臓については、萎縮後、C57BL/6N 系統では劇的に重量が回復したのに対し、C3H/HeN 系統では緩やかに回復した。また、末梢血成分については、血小板数の変化に系統差が見られた。これらの照射後の組織応答の違いは、がんの起源細胞を取り巻く組織微小環境が、マウス系統によって大きく異なる可能性を示唆する。そこで、照射後の胸腺重量変化の系統差と組織微小環境を紐付けるために、本研究では MILLIPLEX® MAP マウスサイトカイン/ケモカイン測定キットを用い、胸腺内で分泌されているサイトカインを測定した。このキットは、マウスの血漿や血清、培養細胞上清等の測定を目的として作られているため、本研究では組織ライセートを用いての測定方法を検討した。32 種類のサイトカイン及びケモカインの測定条件を検討した結果、組織ライセートを溶媒として Lysis バッファーを用いる場合、Lysis バッファーの種類によって、少なくとも 5 種類のサイトカインの測定値に大きなばらつきが生じることが明らかとなった (図 5A)。結論として、PBS(-)を溶媒として用いることで、安定した測定値を得る条件を確立することができた (図 5B)。本研究課題では、実験計画の変更等による予算のひっ迫により、初期応答の系統差を組織内で分泌されているサイトカインレベルで検出することはできなかったが、今後、本研究で確立された実験条件を用いて、発がん感受性や造血能と組織応答との関連を明らかにするための実験として、サイトカイン等に関する詳細な知見を得ることを考えている。

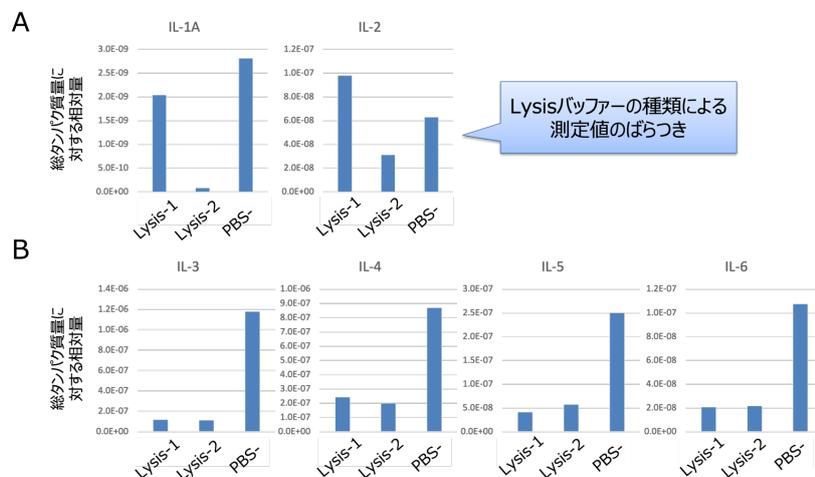


図 5.組織中に分泌されるサイトカインの測定条件検討の結果(一部)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 Masaaki Sunaoshi, Benjamin J. Blyth, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Takamitsu Morioka, Mayumi Shinagawa, Mari Ogawa, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Daisuke Iizuka, Shizuko Kakinuma | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Post-Irradiation Thymic Regeneration in B6C3F1 Mice Is Age Dependent and Modulated by Activation of the PI3K-AKT-mTOR Pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11030449 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Masaaki Sunaoshi, Benjamin J. Blyth, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Takamitsu Morioka, Mayumi Shinagawa, Mari Ogawa, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Daisuke Iizuka, Shizuko Kakinuma |
| 2. 発表標題 Age-dependent thymus regeneration by activation of PI3K-AKT-mTOR pathway in B6C3F1 mice during thymic lymphomagenesis after irradiation |
| 3. 学会等名 第18回幹細胞シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Masaaki Sunaoshi, Benjamin J. Blyth, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Takamitsu Morioka, Mayumi Shinagawa, Mari Ogawa, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Daisuke Iizuka, Shizuko Kakinuma |
| 2. 発表標題 Age-dependent thymic regeneration after irradiation in B6C3F1 mice -The role of the PI3K-AKT-mTOR pathway during the regeneration- |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Masaaki Sunaoshi, Benjamin J. Blyth, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Takamitsu Morioka, Mayumi Shinagawa, Mari Ogawa, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Daisuke Iizuka, Shizuko Kakinuma |
| 2. 発表標題 Age-dependent thymic regeneration by activation of PI3K-AKT-mTOR signaling in B6C3F1 mice after fractionated irradiation |
| 3. 学会等名 30th ANNIVERSARY International Symposium 2021 in Aomori（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Masaaki Sunaoshi, Benjamin J. Blyth, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Takamitsu Morioka, Mayumi Nishimura, Mayumi Shinagawa, Mari Ogawa, Yoshiya Shimada, Akira Tachibana, Shizuko Kakinuma |
| 2. 発表標題 Age-dependent process of thymus regeneration in mice after fractionated irradiation. |
| 3. 学会等名 64th Annual meeting of Radiation Research Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 砂押正章、Benjamin J. Blyth、甘崎佳子、坂入しのぶ、尚突、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 |
| 2. 発表標題 放射線被ばく後のマウス胸腺再生過程における年齢依存性 |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |