

平成22年5月12日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19201011
 研究課題名（和文） カロリー制限が放射線による発癌を抑制する分子メカニズムの解析
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms for a suppressive effect of calorie restriction on cancer induction by radiation
 研究代表者
 小野 哲也（ONO TETSUYA）
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00107509

研究成果の概要（和文）：実験動物ではカロリー制限が放射線による発癌効果を抑制することが分かっているが、そのメカニズムは未解明である。そこで本研究では突然変異、染色体異常、遺伝子発現変化などを指標として解析を行った。その結果、突然変異と染色体異常についてはカロリー制限による影響を見出すことはできなかったが、いくつかの遺伝子の発現の変化からは可能性のあるものがみつき、今後の解析の手がかりが得られた。

研究成果の概要（英文）：Although calorie restriction is known to reduce radiation-induced cancer, little is understood for its mechanism. We have challenged this problem by studying mutation, chromosome abnormality, genome-wide gene expression, etc. The results showed no effect on mutation and chromosome abnormality. mRNA levels, on the other hand, revealed some alterations. These would provide important clues for further analyses of the problem.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
2008年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2009年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
年度			
年度			
総計	35,800,000	10,740,000	46,540,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：カロリー制限、突然変異、染色体異常、発現制御、放射線、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

放射線による発癌リスクを考える時、癌の治療がほぼ完全にできるようにすることと被曝後の処置によって癌発生を抑制、予防する方法を開発することは放射線の発癌効果を深刻な健康影響ではなくするという意味で発想の転換であり、ひとつの未来像である。

このうち予防効果についてはカロリー制限処置が非常に有効であることがマウスとラットを用いて示されている（PNAS 83:7928 (1986), ibid 87: 6795 (1990), ibid 94: 2625 (1997)）。しかしながらそのメカニズムは未だ解明されていないので、現象の一般性やヒトへの応用を考える上での大きな阻害要因

となっている。

放射線による癌誘発のメカニズムとしては突然変異の増加やゲノム不安定性の誘導が主な要因と考えられているが、他にもエピジェネティックな変化による遺伝子発現の変化、損傷をもった細胞の除去機能（アポトーシス）の低下などがあげられているが、まだ良くはわかっていない。

他方、カロリー制限の生物効果については長い研究の歴史があり、寿命延長効果や化学発癌に対する抑制効果、遺伝的疾患の発現抑制効果などさまざまな健康増進効果が報告され、近年ではこれがヒトにも当てはまるかどうかを探るため霊長類（サル）を用いた実験も米国で進められている。さらに最近では寿命延長に関与する一群の遺伝子が発見されカロリー制限がこれらの遺伝子の発現にどう作用しているかについての解析が急速に進められている（Nature Reviews 6: 298 (2005), Nature Genetics 38: 985 (2006)）。具体的にはカロリー制限がホルモンや神経内分泌系を変え、Akt 経路の抑制などを介して Foxo 系の転写因子を活性化することにより細胞を増殖体制からストレス耐性の体制に切り替えるというモデルが考えられている。このストレス耐性の中身としては活性酸素消去系の活性化や DNA 修復能の強化、アポトーシスの増強などがあげられている。

以上の情報をあわせると、カロリー制限による放射線発がんの抑制機構としては、被曝後長期間を経て生じるゲノム不安定性が細胞のストレス耐性獲得によって抑制されるのではないかと考えられる。具体的には被曝後半年から1年を経て突然変異頻度や染色体異常頻度が上昇する（ゲノム不安定性）のが、カロリー制限による DNA 修復活性や抗酸化力あるいはアポトーシス等の活性化によって抑制されるのではないかと考えられる。そこで本研究ではカロリー制限実験に実績のある放医研のグループ（島田）と放射線の長期的影響の解析を分子レベルで解析している産業医大（法村）、東北大（小野、上原）のグループが共同研究の体制を作り、ゲノムの安定性とアポトーシス、遺伝子発現変化の3つの観点からカロリー制限による放射線発がん抑制のメカニズム解析を行った。

2. 研究の目的

突然変異解析のための lacZ 遺伝子を導入されたマウス（C57BL/6J 系に9世代戻し交配を行ったもの）とカロリー制限による放射線発がん抑制が証明されている C3H 系マウスとを交配し B6C3F1 マウスを作り、2ヶ月齢で 3.8Gy の X 線をかけた後カロリー制限を始める。その後サンプリングし発癌率、染色体異常頻度、突然変異、アポトーシス頻度、mRNA のマイクロアレイ解析を行う。これらのデー

タを総合し、カロリー制限が放射線によるがんの誘発を抑制するメカニズムをさぐる。放射線に限らず、有害物質による影響は曝露がすぐ障害に直結するという発想で捉えられがちであるが、両者の間には多くの生体反応が関与しており、その反応を人為的に変えることにより障害の発生を予防することが可能である。特に癌の誘発のように長期間を経て始めて現れる障害についてはその可能性が高い。もしこれがヒトにも当てはまることが明らかにされればリスク評価に対しても発想の転換をせまるものであり、大きな意義があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) カロリー制限による体重及び放射線発癌効果への影響

当初 C57BL/6J Jc1 系のマウスに9代まで戻し交配をした Muta マウスを使う予定であったが、このマウスの生殖力が極端に低下してしまったので、Muta マウスそのものと B6C3F1 マウスの両方を用いた。加齢に伴う体重変化を普通カロリー食（95kcal/週）で飼育し続けた群と7週齢から低カロリー食（65kcal/週;カロリー制限）に移した群に分けて体重の変化を追跡した。B6C3F1 マウスでは長期的な生存率と発癌頻度についても追跡した。

(2) 突然変異の解析

普通カロリー摂取群と低カロリー摂取群マウス（Muta マウス）に対し10週齢で3.8GyのX線（0.66Gy/min）を照射し、その後12ヶ月齢、18ヶ月齢になった所でサンプリングし、lacZ 遺伝子上での突然変異を解析した。変異体頻度は P-gal 抵抗性を指標に、また分子特性については DNA sequencing によって求めた（Mutat. Res., 447: 165 (2000)）

(3) 染色体異常頻度

照射後2週間後及び照射後12ヶ月齢と18ヶ月齢でマウス脾臓から細胞を分離し ConA 存在下で48～56時間培養（RPMI）後コルセミド処理によりM期の細胞を増やし Fish 法にて転座型の染色体異常頻度を測定した。標的としては染色体の2番、11番、12番をそれぞれ Cy3, FITC, Biotin で染色して行った。Biotin はさらに Texas Red で二重染色し、すべての染色体を確認するためには DAPI 染色を行った。異常頻度は総染色体数が 40 ± 1 のものについてだけ検索した。

(4) アポトーシス頻度

C57BL/6N マウスを用い10週齢で3Gyの放射線を照射し、その後4、6、16、24、48時間後の脾臓でのアポトーシス頻度を調べた。アポトーシスは Caspase 3/7 の活性を指標として解析した。

(5) mRNA の変化

放射線による肝腫瘍誘発効果のあること

が分かっている B6C3F1 マウスを用い放射線照射の影響とカロリー制限の影響についてマイクロアレイ解析と RT-PCR による解析を行った。照射時期については 10 週齢だけでなく、より高い肝腫瘍誘発効果が報告されている 1 週齢での照射の影響も調べ比較した。サンプリングは 3 ヶ月齢と 10 ヶ月齢、18 ヶ月齢の所で行ったが、18 ヶ月齢では明らかに肝腫瘍の発生率が増加していた。腫瘍では遺伝子発現の様子が大きく変化していることが予想されるので、18 ヶ月齢でサンプリングしたものについての mRNA 解析は行わなかった。

マイクロアレイ解析は Affimetrix 社の Mouse genome 430 2.0 を使用した。これでは 39,000 種類の oligo プローブを用いた解析が可能である。RT-PCR 解析は ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems 社) を用いて行い、 β -アクチンの mRNA を標準として解析した。

4. 研究成果

(1) カロリー制限による体重及び放射線発癌効果への影響

普通食 (95kcal/週)、カロリー制限食 (65kcal/週) での体重変化について非照射、3.8Gy 照射マウスの雄、雌ごとに 10 週齢から 39 週齢 (9 ヶ月齢) まで追跡調査した結果が図 1 である。結果は各群 12~18 匹のマウスの平均値である。ここから (a) 雄はいつも雌より体重が高いこと、(b) 普通カロリー群では加齢とともに体重の増加が見られるのに対し、低カロリー群では 20 週齢位から体重の増加が抑制されること、(c) 10 週齢での 3.8Gy X 線照射は体重変化に影響を与えないことが明らかになった。B6C3F1 マウスでも同様な結果が得られた。

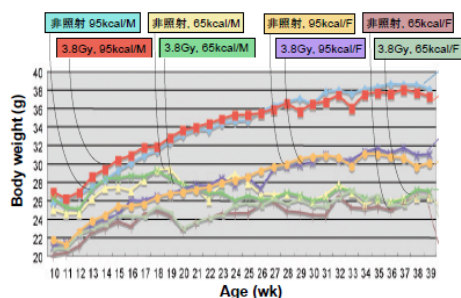


図 1. 10 週齢の Muta マウスに 3.8Gy 照射後普通食 (95kcal/週) と低カロリー食 (65kcal/週) で飼育した時の体重変化。雄でも雌でも低カロリー食によって体重の増加が抑制された。照射群と非照射群で差はみられなかった。

次に B6C3F1 マウスについて生存率と発癌

率を測定した。コントロール B6C3F1 マウスの生存率は 1 年以降ゆるやかに減少したのに対し被曝群は 1 年以降急激に生存率が低下した。カロリー制限は特に被曝群で生存率を延長した。これは、生後 1 年以降に死因となる疾病にカロリー摂取の大小が関与しているためであると推測した。

さらに B6C3F1 マウスの死因の 1 つである肝腫瘍と脾臓に発生するリンパ腫について被曝の影響、カロリー制限の効果について検討した。非照射高カロリー群の肝腫瘍は 80 週以降の死亡のマウスから観察されるが、カロリー制限では 120 週たってもほとんど発生は認められなかった。非照射高カロリー群は 60 週から肝腫瘍が観察され 120 週で肝腫瘍フリーのマウスは 50% に達する。おどろいたことにカロリー制限群では 3.8Gy 被曝したにもかかわらず、非照射の高カロリー群より発生は遅れた。すなわち、生存曲線でみる限り、カロリー制限は、高カロリーマウスの 3.8Gy 被曝の発癌効果を相殺する効果があることになる。発生は遅れるが、脾臓のリンパ腫についてもほぼ同様の結果が得られている。

(2) 突然変異の解析

① 加齢に伴う自然突然変異蓄積に対するカロリー制限の影響

加齢に伴って自然突然変異が蓄積し、しかもその増加率は臓器によって異なり、腸上皮で特に高い値を示すことが分かっている (Cancer Res., 64: 6919 (2004))。そこでカロリー制限がこの自然突然変異の増加に影響を与えないかどうかについて知るため、18 ヶ月齢 Muta マウスの小腸上皮での突然変異頻度を調べてみた。その結果、カロリー制限群では 23.25×10^{-5} (6 匹) であり、普通食群での値 33.16×10^{-5} (6 匹) より有意に低い値を示した ($p=0.0131$) (図 2)。従ってカロリー制限は自然突然変異の加齢に伴う蓄積を抑制する効果のあることが分かった。突然変異の分子特性を調べた結果ではカロリー制限による違いは認められなかった。

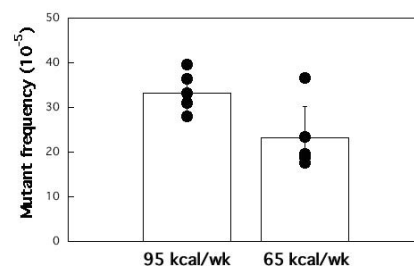


図 2. 低カロリー食の小腸上皮での自然突然変異への影響。普通食と低カロリー食で 18 ヶ月間飼育されたマウス (各群 6 匹づつ) での lacZ 上での自然突然変異頻度。低カロリー食では低い頻度になっていた。

②放射線照射の影響

次に10週齢で3.8Gy照射後12ヶ月齢になった時点での突然変異頻度について解析した結果、脾臓と肝臓では照射の影響についてもカロリー制限の影響についても明白な差は見られなかった(図3、4)。さらに18ヶ月齢になった時点での肝臓でも変化は見出せなかった。このことは、3.8Gy照射がgenomic instabilityのようなものを誘発する訳ではないことを示唆していると思われる。

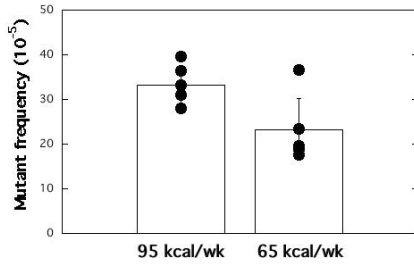


図3. 3.8Gy照射後普通食(95kcal/週)あるいは低カロリー食(65kcal/週)で10ヶ月間飼育した時の脾臓でのlacZ突然変異頻度。照射による影響、カロリー制限による影響はともに観察されなかった。

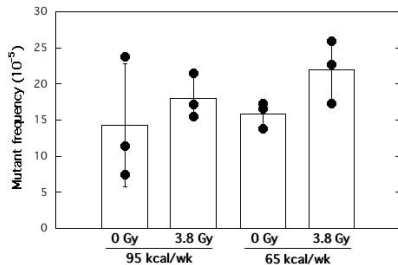


図4. 3.8Gy照射後普通食(95kcal/週)あるいは低カロリー食(65kcal/週)で10ヶ月間飼育した時の肝臓でのlacZ突然変異頻度。照射による影響、カロリー制限による影響はともに観察されなかった。

(3) 染色体異常の解析

10週齢で3.8Gy照射後通常のカロリーと低カロリーで飼育を続け2週間後および12ヶ月齢、18ヶ月齢になったマウスの脾臓に於ける染色体異常(2番、11番、12番染色体での転座頻度)を調べそれをグラフにしたものが図5である。この結果から以下の諸点が明らかとなった。

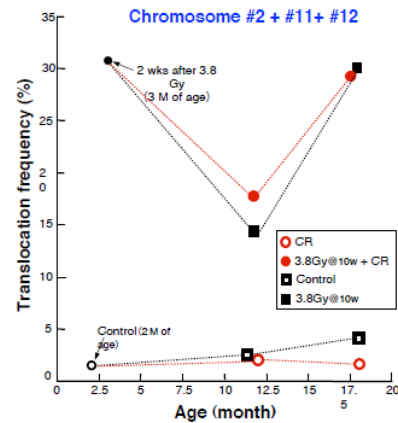


図5. 10週齢で3.8Gy照射したMutaマウスを2週間、10ヶ月あるいは16ヶ月間普通食あるいは低カロリー食(CR)で飼育した時の脾臓細胞での染色体異常頻度。異常は2、11、12番染色体の転座として検出した。照射後2週間では異常の増加がみられたが、10ヶ月では減少し、16ヶ月では再び増加した。これらの変化に対しカロリー制限(CR)は何の影響も与えなかった。非照射マウスでもカロリー制限の影響はみられなかった。

①3.8Gyの照射は脾臓細胞での染色体異常頻度を増加させる。

②その後10ヶ月を経ると染色体異常をもった細胞の割合が減少する。これは異常をもった細胞の一部が生体内で除去された結果と考えられる。

③さらに照射後16ヶ月を経て1.5年(18ヶ月)齢になると染色体異常頻度は上昇した。これは照射後長時間を経たことによるgenomic instabilityの増加を示唆していると思われる。

④上記の減少と増加はカロリー制限によって影響を受けなかった(図5)。

従って、放射線の染色体異常誘発効果に対してはカロリー制限は影響を与えないと推察される。

(4) アポトーシスの解析

C57BL/6Nマウスに3Gyの放射線を照射後脾臓でのアポトーシス頻度を調べると4～6時間後に増加することがみられるもののその後、24時間後、48時間後では非照射と同じ低いレベルに減少していた。また後述するように照射後10ヶ月を経たマウスでの網羅的mRNAの解析でもアポトーシスに関連する遺伝子の変化は見出せなかった。従ってアポトーシスは放射線の長期的影響には関与していないと考えられた。

(5) mRNAの解析

①放射線照射の長期的影響

まず放射線照射の長期的影響として mRNA

レベルでどのような変化があるかについて 10 週齢で照射後 8 ヶ月を経たマウスでの肝臓の mRNA について解析を始めた。しかし、肝臓への長期影響については生後 1 週齢で照射した方が 10 週齢で照射した時よりも高い発癌性を示すことに気付いたので、1 週齢で照射後 1 年齢になった時点での解析から開始した。具体的には非照射で 10 ヶ月齢のマウス 6 匹から全 RNA を抽出し、それを 3 匹分ずつ等量混ぜたもの 2 サンプルをコントロールとし、1 週齢で 3.8Gy 照射した後 10 ヶ月齢になったマウス 6 匹から全 RNA を抽出し、それぞれをサンプルとしてマイクロアレイ解析を行った。その結果、6 個の照射サンプルのどれでも共通に変化している遺伝子として 27 種の遺伝子が抽出された。さらにそれらの変化について統計計算をして $p < 0.05$ を満たす遺伝子として以下の 6 種類の遺伝子が抽出された。Cyp2c39、Mfsd2、Dusp6、Pfkfb3、Cd36、Ints6。これらについて RT-PCR 法を用い検討した結果、増減の程度に多少の違いのみられるものもあったが、マイクロアレイの結果はほぼ正しいことが確かめられた。これらの遺伝子の機能及び細胞内の局在性については表 1 に示した。

上記の変化が照射後より短い時点でどのようになっているかを知るため、照射後 3 ヶ月齢でサンプリングし、同様の解析を行った。その結果、3 ヶ月齢と 10 ヶ月齢で共通の変化はほとんどなく、Dusp6 と Ints6 で同様の減少傾向がみられただけであった。Pfkfb3 については 10 ヶ月齢で増加していたが、3 ヶ月齢では減少傾向がみられた。このことから照射後長期間を経た時点でみられる変化は、照射後持続して変化しているのではなく、新たに生じる変化であると考えた方がよいことが示唆された。

Gene symbol	Biological process	Molecular function	Cellular component
Cyp2c39	oxidation reduction	oxidoreductase activity	microsome, membrane
Mfsd2	transport	-	membrane
Dusp6	inactivation of MAPK activity, dephosphorylation	phosphoprotein phosphatase activity	cytoplasm
Pfkfb3	fructose 2,6-bisphosphate metabolic process	6-phosphofructose 2-kinase activity, ATP binding	-
Cd36	cell adhesion, lipoprotein process	receptor activity, lipid binding	plasma membrane cell surface
Ints6	snRNA processing	protein binding	integrator complex

表 1. 照射によって mRNA 量が増加した遺伝子の機能と細胞内局在。

②照射時期の違いによる影響

肝腫瘍は生後 1 週齢で照射した時の方が生後 10 週齢で照射した時より高い誘発率を示すことが分かっているので、この現象を mRNA の変化として把握できないかどうか検討してみた。具体的には 1 週齢照射後 10 ヶ月齢で変化していた 6 種類の mRNA について 10 週齢照射後 1 年齢での変化と RT-PCR を用いて比較してみた。その結果、Pfkfb3、Mfsd2、Cyp2c39、Cd36 の遺伝子発現変化は両群でほぼ同様であるのに対し、Dusp6、Ints6 の遺伝子の発現変化は異なっていた (図 6)。従って後者の 2 種の遺伝子については発癌の被曝時年齢依存性を説明し得る可能性を持っていると思われる。

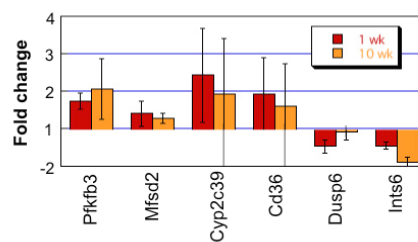


図 6. 照射時期の違いによる mRNA 変化への影響。3.8Gy の照射を 1 週齢で行なったマウスと 10 週齢で行なったマウスを 10 ヶ月齢になるまで待って肝臓での mRNA 量を RT-PCR で解析した。

③カロリー制限の影響

1 週齢で 3.8Gy 照射後 7 週齢からカロリー制限を行い 10 ヶ月齢になった所での肝臓の mRNA の変化について上記 6 種類の遺伝子産物について RT-PCR 法で調べると図 7 のような結果になった。Pfkfb3 と Dusp6 についてはカロリー制限は何も影響を与えず、Mfsd2、Cyp2c39、Cd36 の遺伝子については放射線照射の影響を増強する方向へ、また Ints6 については放射線の影響を抑制するように働いていた。従って Ints6 の発現調節がカロリー制限の影響を解くひとつの手がかりになる可能性がある。この遺伝子は癌抑制遺伝子である可能性も指摘されている。

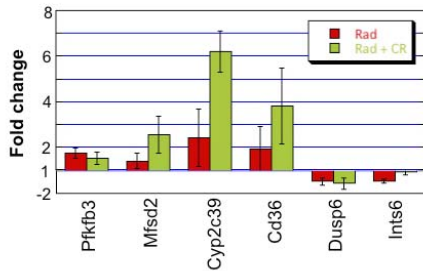


図7. カロリー制限による影響の解析。1週齢で3.8Gy照射後普通食あるいは低カロリー食(CR)で10ヶ月間飼育した時の肝臓でのmRNA変化をRT-PCRで求めた。カロリー制限によって影響を受けない遺伝子、カロリー制限が放射線の影響を増幅する遺伝子さらにカロリー制限が放射線の影響を抑制する遺伝子に分かれた。

(6) 考察

放射線による癌誘発効果がカロリー制限によって抑制されるメカニズムについて突然変異、染色体異常、遺伝子発現変化といった観点から解析を行ったが、明確な手ごかりは得られなかった。ただし加齢に伴う自然突然変異蓄積が抑制されること、また一部の遺伝子発現変化が修飾を受けることが分かったので、これらの指標が今後のさらなるチャレンジの手ごかりになると考えられる。

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 23 件)

- ① N. Okudaira, Y. Uehara, T. Ono、他 (16名中2番目、16番目)、Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of gpt delta mice. Radiation Research, 査読有, 173(3), 138-147, 2010.
- ② T. Imamura, S. Kakinuma, Y. Shimada、他 (10名中10番目)、Unique characteristics of radiation-induced apoptosis in the postnatally developing small intestine and colon of mice. Radiation Research, 査読有, 173(3), 310-318, 2010.
- ③ Y. Uehara, H. Ikehata, T. Ono、他 (16名中1番目、16番目)、Absence of Ku70 gene obliterates X-ray-induced lacZ mutagenesis of small deletions in mouse tissues. Radiation Research, 査読有, 170(2), 216-223, 2008.
- ④ Y. Igari, K. Igari, N. Kunugita, A.

Ootsuyama, T. Norimura, Prolonged increase in T-cell receptor (TCR) variant fractions of spleen T lymphocytes in pregnant mice after gamma irradiation. Radiation Research, 査読有, 168(1), 81-86, 2007.

[学会発表] (計 46 件)

[図書] (計 1 件)

- ① 小野哲也, 上原芳彦、小村潤一郎、東京大学出版会、新老年学 第3版、2010、23-29。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 哲也 (ONO TETSUYA)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00107509

(2) 研究分担者

法村 俊之 (NORIMURA TOSHIYUKI)
 産業医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20039530
 島田 義也 (SHIMADA YOSHIYA)
 放射線医学総合研究所・発達期被ばく影響研究グループ・グループリーダー
 研究者番号：10201550

(3) 連携研究者

上原 芳彦 (UEHARA YOSHIHIKO)
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：30223499