

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K12335

研究課題名(和文) ゲノム変異から探る～カロリー制限の放射線発がん予防機構の解明

研究課題名(英文) The preventive effect of calorie restriction on radiocarcinogenesis

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・放射線医学研究所 放射線影響研究部・主任研究員

研究者番号：50533189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：子ども期放射線被ばくは発がん影響が懸念される。カロリー制限は、古くから発がん低減効果があると知られて、我々も成体期からのカロリー制限が子ども期放射線被ばく誘発マウス肝がんの発生を遅らせることを報告した。しかし、放射線誘発肝癌発生のメカニズムと、カロリー制限の発がん抑制メカニズムの完全解明に至ってない。本研究は肝がんマウスモデルを用いて、被ばくは肝臓細胞の脂質代謝を制御する因子Ppargの特異的な増加を引き起こし、NASH様病変と肝癌発症の早期化を誘発することを見出した。また、生じた肝がんのゲノム変異が多数検出されて、特にMAPK経路の癌遺伝子の早期変異がマウス肝がんの特徴であることを見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線発がん研究は放射線影響・防護分野において最も重要な部分である。子ども期被ばくの発がんメカニズム研究及びがん予防研究は社会的需要が高い。本研究は放射線被ばくに起因するNASH病変発症の早期化が肝がんリスク上昇の原因であることを初めて発見した。さらに関連する遺伝子発現の異常も明らかにした。NASHはヒト肝がんの主因にもなりつつ、本研究の成果はヒト肝がん予防法の開発にも重要な基礎知見を提示できた。また、ゲノム変異解析の結果から、本研究に用いたマウスモデルの肝腫瘍の変異特徴を見つけた。その中にヒトと共通するdriver変異もあって、今後はヒト肝がん研究にさらなる利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Exposure to ionizing radiation is known as a risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC). Using a mouse model, we reported that early-life exposure to X-ray increases HCC risk, while calorie restriction shows a preventive effect. However, the process of radiation caused HCC development is not clear. In this study, we carry out pathological and gene expression analyses of liver tissue, elucidate that acceleration of NASH-like disorder is induced by radiation, contributes to liver tumorigenesis, and calorie restriction can effectively normalize this disorder. Whole-exome sequencing analysis revealed that mutation spectrum of radiation-induced HCC was similar with spontaneous HCC. Frequent mutations in genes encoding MAP kinase pathway were well identified. Some of these driver mutations were also well reported in human HCC. This study provides the landscape of genomic alterations in spontaneous and IR-induced HCCs, with the potential of mouse model using for human HCC study.

研究分野：放射線生物学

キーワード：カロリー制限 放射線 肝がん NASH

1. 研究開始当初の背景

医用放射線の普及や原子力の利用、特に東日本大震災・東京電力福島第一原子力発電所の事故後、放射線被ばくの長期健康影響が無視できない。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。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。例えば、喫煙は相乗的に肺癌のリスクを増大させる。医用放射線の利用や原子力事故など、被ばくが避けられない場合、重要となってくるのは、被ばくのリスクを低減させる方法を見だし、その機構を科学的に実証することである。様々な発がんリスク低減法の中で、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)。さらに我々は成体期早期からのカロリー制限が標準食摂取群に比べて、子ども期放射線被ばく誘発マウス肝癌、肺癌、リンパ球性白血病の発生を遅らせることを報告した(1)。また、先行研究では子ども期被ばく後、肝臓細胞の増殖亢進、カロリー制限による肝臓細胞の遺伝子変異蓄積速度の変化等も報告し(2及び unpublished data)、カロリー制限の動物実験結果に基づいた数理モデルを用いた解析では、肝癌発がんプロセスのステップがカロリー制限を行うことで増加することも明らかにした(3)。放射線発がん並びにカロリー制限のがん予防機構が明確になりつつある。

しかし、これまでの研究は放射線誘発肝癌発生のメカニズムと、カロリー制限の発がん抑制メカニズムの完全解明に至ってない。がんの発生、進行は機能遺伝子に生じる変異の蓄積によるものと考えられる。ヒト肝癌の遺伝子変異解析から、変異頻度とパターンが知られたが、放射線誘発マウス肝癌に関して：

- 機能遺伝子変異は発がん過程のいつ、どういう順番で生じたか？
- 自然発生した肝癌と放射線被ばく誘発した肝癌の変異に違いはあるか？
- カロリー制限が変異の発生、蓄積をどう変化させたか？

はまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は実験マウスを用いて、組織病理学スクリーニング法と次世代シーケンス解析方法を駆使し、自然発生 vs. 子ども期放射線誘発；標準食 vs. カロリー制限条件で発症したマウス肝癌のゲノム変異を比較し、発がんを制御する機能遺伝子の変異数、変異頻度を調べ、肝癌発生における放射線被ばく誘発の特殊な変異パターン (Radiation signature) の存否とカロリー制限あり・無しによる変異頻度、パターン等の相違の解明を目的とする。

3. 研究の方法

B6C3F1 雄マウスを用いて、非照射または生後 8 日齢に X 線 3.8Gy を全身照射後、49 日齢からカロリー制限を開始し、標準食 95kcal/週/匹 (非制限) または制限食 65kcal/週/匹 (約 30% のカロリー制限、Yoshida et al. PNAS, 1997) を摂取させた。終生飼育群は各 60 匹、タイムコース群は 100 日齢ごとに各群マウス 3 匹ずつ解剖し、肝癌の発症時期を検証するための肝癌と非癌組織のホルマリン固定と遺伝子変異解析のための凍結サンプルを使用した。

これらのサンプルの病理スクリーニングを実施し、発癌過程における病理学および遺伝子発現変化と発癌への寄与を検証した。具体的に、カロリー制限開始直後の56、63、70、100日齢、その後100日間隔で600日齢までの肝臓組織サンプルの組織切片を作製し、HE染色後、病理診断を行った。細胞増殖、線維化、炎症マーカー等を用いて免疫組織化学染色後、増殖活性、線維化重篤度を評価した。さらに、凍結組織からRNAを抽出、精製後、マイクロアレイ法を用いて網羅的な遺伝子発現変化を調べて、変動の大きい遺伝子は定量PCR法で確認した。

病理診断から選定した腫瘍と、レファレンスゲノム配列を取るための同個体正常肝臓組織から、レーザーマイクロダイセクション法で組織を切り出して、ゲノムDNAを精製し、次世代シーケンス法で全エクソーム配列を行った。具体的に、mouse whole exome capture probe (Agilent社 Ver.2) を用いて全エクソームライブラリーを合成して、Illumina社NextSeq次世代シーケンスシステムを用いて全エクソーム配列を取得した。その配列情報をVarscanパイプラインによって処理して、塩基置換 (SNV) , 欠失/挿入 (Indel) 等変異を抽出、遺伝子変異頻度、パターン等を求めた。また、Control-freecソフトウェアを利用し、ゲノムコピー数異常を算出した。

4. 研究成果

1) カロリー制限が発がん過程に対する影響

放射線被ばくの有無、およびカロリー制限が発癌への寄与を検証するため、本研究はまずカロリー制限開始直後の56日齢から、最大600日齢までの100日間隔で肝臓組織の病理確認を実施した。組織切片の解析では、非照射・非制限実験群では400日齢から、肝臓細胞に軽度

の脂質蓄積が見られた、照射・非制限では200日齢から瀰漫性脂質蓄積が確認された。一方、照射・制限群では脂質蓄積の開始が400日齢に戻さ

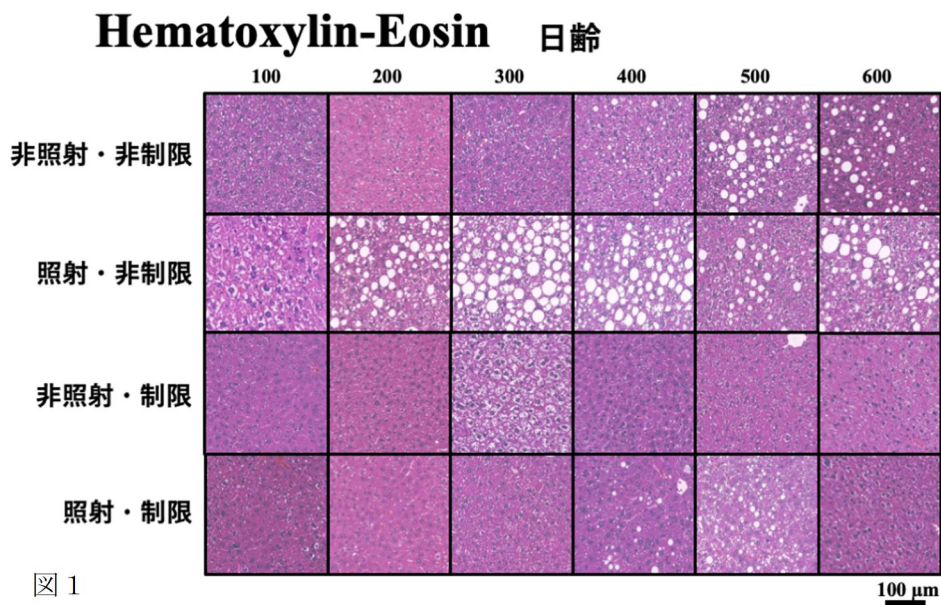


図 1

れて、非照射・制限群では600日齢までの観察期間中、肝臓細胞の脂質蓄積が全く見られなかった(図1)。次に、細胞増殖、線維化マーカーを用いた免疫組織化学染色から、照射・非制限群に生じた重度の脂質蓄積に炎症細胞浸潤、線維化、増殖亢進等、典型的な非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)様病変が伴った(図2, 3)。

α-SMA
(線維化マーカー)

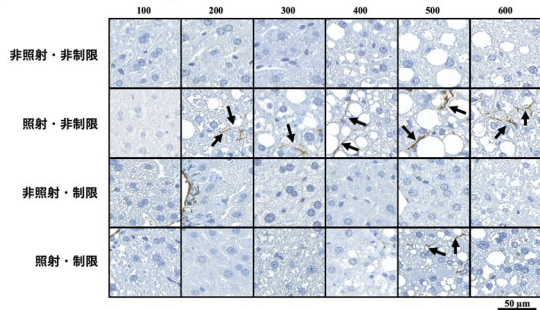


図 2

Ki-67
細胞増殖

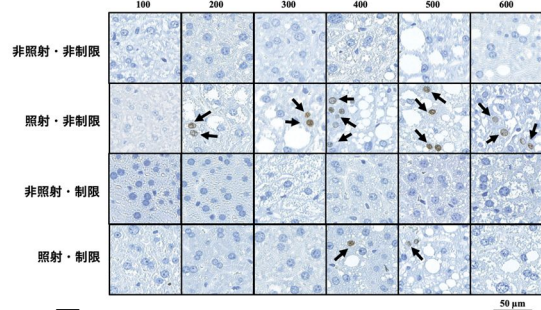
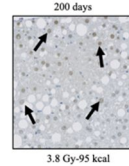
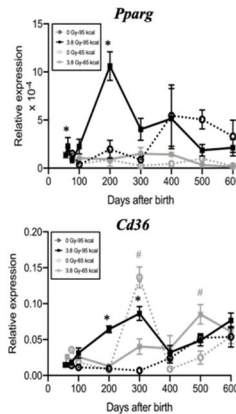


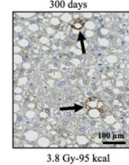
図 3

さらに、網羅的な遺伝子発現を行った結果、照射・非制限群において、病理学的な変化が

示す前に、照射に起因する脂質代謝関連遺伝子発現の変化が顕著に見られて、特に Pparg/Cd36 の発現上昇が有意であることが分かった (図 4)。カロリー制限群ではこれらの遺伝子発現が抑制されて、放射線被ばくに起因する脂質代謝異常の是正によって肝癌の発生が低減されたと考えられる。これらの成果を纏めた学术论文が専門誌に



Pparg: 肝臓細胞脂質代謝調節を担う中心的な転写因子



Cd36: 脂肪酸を細胞内に取り込む因子

図 4

掲載された (Shang et al., Int J Cancer, 2023)

2) ゲノム変異から見る照射及びカロリー制限の影響

次に照射/非照射及び異なるカロリー摂取条件下で生じた肝臓腫瘍の全エクソーム解析を実施した。肝臓組織の病理スクリーニングから、腫瘍内部に鬱血、壊死、リンパ球浸潤、腫瘍細胞の形態多様

等、非均一であることが分かって、レーザーマイクロディセクション方法を選択、顕微鏡観察しながら、均一な腫瘍組織を採取、ゲノム DNA を精製する実験系を立ち上げた。次世代シーケンズ法で全エクソーム配列を解読した後、遺伝子変異頻度等を解析した。

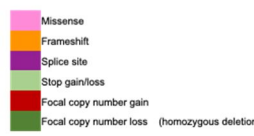
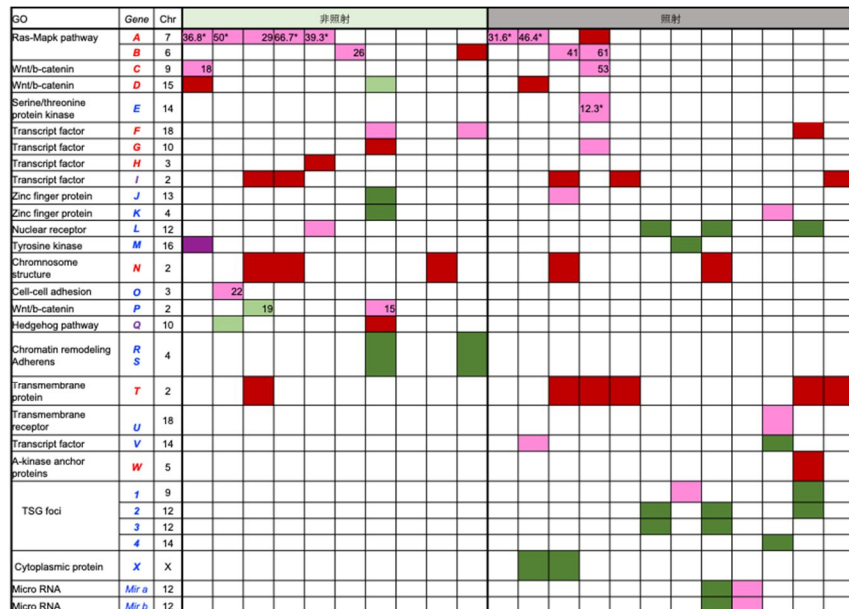


図 5

照射の有無に関し

て、非照射群 10 検体、照射群 12 検体の肝細胞癌を比較した結果、MAPK 経路の癌遺伝子変異が両群からよく検出されて、最も変異割合の高い Gene A の変異は非照射群に高く検出さ

れる傾向があった。しかし、Gene A 以外に、共通する変異の検出割合が低く、検体毎多様な変異が生じたのがマウス肝細胞癌の特徴であることが明らかとなった（図5）。ゲノムコピー数異常の解析結果も同様な傾向を示した。マウス肝細胞癌の特徴として、loss の数が少なく、gain が多く見られた。また、非照射群の癌に染色体単位の gain (aneuploidy) が多く検出された（図6）。

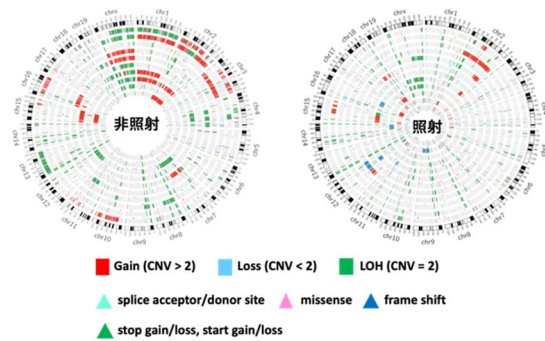


図6

また、研究項目1の結果から、カロリー制限が発がん過程に対する影響が顕著であるため、ゲノム変異の違いも早期に生じる

可能性が考えられる。今度はカロリー制限/非制限の比較を前癌病変を用いた行った。制限/非制限群に発症した肝細胞腫3検体ずつの全エクソーム解析を行った結果、一部の検体には腫瘍発生早期にも関わらず、Gene Aの変異が検出されて、この変異が肝細胞癌発生の

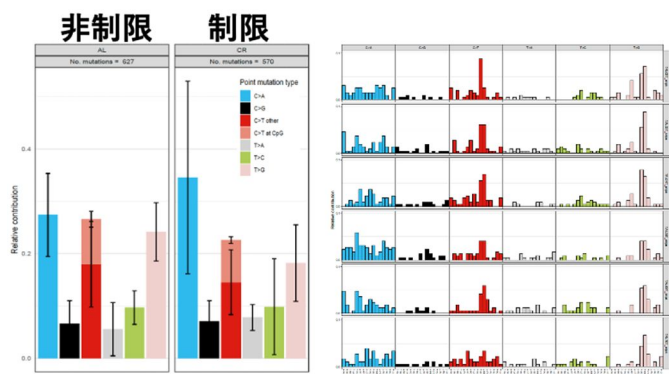


図7

早期イベントであることを発見した。一方、変異数、変異頻度、さらに変異シグネチャー解析の結果、カロリー制限の有無が明らかかなゲノム変異の違いをもたらすことを見られなかった（図7）。今後はさらに検体数を増やして解析を継続する必要がある。

<引用文献>

1. Y. Shang, S. Kakinuma, K. Yamauchi, T. Morioka, T. Kokubo, S. Tani, T. Takabatake, Y. Kataoka, Y. Shimada: Cancer prevention by adult-onset calorie restriction after infant exposure to ionizing radiation in B6C3F1 male mice, *Int J Cancer*. 135:1038-47,2014
2. 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
3. S. Tani, B.J. Blyth, Y. Shang, T. Morioka, S. Kakinuma, Y. Shimada: A Multi-stage Carcinogenesis Model to Investigate Caloric Restriction as a Potential Tool for Post-irradiation Mitigation of Cancer Risk, *J Cancer Prev*. 21:115-120, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shang Yi, Morioka Takamitsu, Daino Kazuhiro, Nakayama Takafumi, Nishimura Mayumi, Kakinuma Shizuko	4. 巻 153
2. 論文標題 Ionizing radiation promotes, whereas calorie restriction suppresses, NASH and hepatocellular carcinoma in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1529 ~ 1542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Takafumi, Sunaoshi Masaaki, Shang Yi, Takahashi Mizuki, Saito Takato, Blyth Benjamin J., Amasaki Yoshiko, Daino Kazuhiro, Shimada Yoshiya, Tachibana Akira, Kakinuma Shizuko	4. 巻 18
2. 論文標題 Calorie restriction alters the mechanisms of radiation-induced mouse thymic lymphomagenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0280560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尚 奕、森岡 孝満、柿沼 志津子
2. 発表標題 子ども期放射線被ばく誘発NASH様病変の早期発生及びカロリー制限のNASH抑制効果研究
3. 学会等名 第29回日本がん予防学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尚 奕
2. 発表標題 Effect of childhood radiation exposure and calorie restriction on NASH-like pathological disorder induction in mouse model
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尚 奕
2. 発表標題 放射線被ばく誘発マウス肝臓細胞の初期応答及びカロリー制限の寄与
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shang Yi, Morioka Takamitsu, Daino Kazuhiro, Nishimura Mayumi, Kakinuma Shizuko
2. 発表標題 Ionizing radiation promotes NASH and hepatocellular carcinoma in mice
3. 学会等名 17th International Congress for Radiation Research(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shang Yi, Morioka Takamitsu, Tsuruoka Chizuru, Sunaoshi Masaaki, Amasaki Yoshiko, Kakinuma Shizuko
2. 発表標題 Influence of adulthood diet-induced obesity (DIO) on tumorigenesis and tumor development after early life exposure to radiation
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尚 奕, 森岡 孝満, 臺野 和広, 石川 敦子, 柿沼 志津子
2. 発表標題 ゲノム変異から探るカロリー制限の発がん予防機構
3. 学会等名 第30回日本がん予防学会総会 がん予防学術大会2023金沢
4. 発表年 2023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
研究協力者	森岡 孝満 (Morioka takamitsu)		
研究協力者	石川 敦子 (Ishikawa Atsuko)		
研究協力者	柿沼 志津子 (Kakinuma Shizuko)		

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
---------	---------