

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06498・19K21560

研究課題名(和文)放射線発がん過程におけるカロリー制限による組織応答

研究課題名(英文)Tissue response by calorie restriction after radiation exposure.

研究代表者

中山 貴文(NAKAYAMA, Takafumi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：80829440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス(1週齢)に3.8 GyのX線を単回照射し、非照射群と共に7週齢から通常食で飼育する群と30%カロリー制限群に分けた。長期飼育の結果、カロリー制限によって、体重の抑制および発がん抑制効果が見られた。カロリー制限と発がんの両方に深く関係していると考えられるオートファジーに着目し、オートファジー関連タンパク質である(LC3、p62)について、カロリー制限後、継時的に変化を解析したところ、カロリー制限直後にはp62が、また、長期の制限後はLC3が増加していたが、オートファジー全体では活性化に大きな変化は認められず、カロリー制限による発がん抑制には、オートファジーは関係していない事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はカロリー制限による放射線発がんに対する抑制効果を改めて示し、長期のカロリー制限とオートファジー関連タンパク質との関係性を解析したことで、未だ完全には明らかになっていないカロリー制限による発がん抑制メカニズムを解明する一助となったと考えられる。本研究をもとにカロリー制限による発がんメカニズムの解明を進めることで、将来的にはカロリー制限を行わずともがん抑制メカニズムに働きかける薬剤の開発や、放射線治療等の医療被ばくによる二次がんを含めた発がんに対して効果的な予防法の創出に繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mice were exposed to 3.8 Gy X-rays at 1 week of age. From 7 weeks of age, both the control and X-irradiated groups were fed either a standard diet equivalent in caloric intake to ad libitum feeding or the diet with calorie limited by around 30%. It was found that calorie restriction (CR) suppressed body weight increase and the incidence of radiation-induced tumors. Since autophagy is a possible factor related to CR and carcinogenesis, I analyzed the expression of autophagy related proteins (LC3 and p62) after CR using immunofluorescence and western blotting. The results indicated that CR increased both p62 immediately after CR and LC3 after long-term restriction. But overall autophagy activity seemed to be unchanged, suggesting that autophagy is not involved in the suppression of radiation-induced carcinogenesis by CR.

研究分野：放射線生物学

キーワード：カロリー制限 放射線発がん オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、CT 検査や放射線治療が普及したことにより、医療被ばくの増加とそれによる放射線治療後の二次がん発生が懸念されている。そのため、放射線被ばく後の発がんリスクの低減方法の研究は大きな関心を集めている。特に子どもの医療被ばくに対する発がんリスク低減方法の開発は、子どもが組織での細胞分裂が活発であることや被ばく後の生存期間が長いこと、大人よりも放射線への感受性が高いことから重要である。

発がんリスクを低減させる方法としては、カロリー制限による食事療法が知られている。カロリー制限による発がん抑制効果は、自然発生、化学物質による発がんのみならず放射線によって誘発されるがんに対しても効果があることが報告されている。量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所で行われた研究でも、子ども期のマウスに放射線を照射し、成体期からカロリー制限を行った結果、肝がんや肺がんにおいてはカロリー制限による発がん抑制効果が見られたが、一方で、胸腺リンパ腫においては、発がん抑制効果が小さく、カロリー制限による発がん抑制効果には臓器特異性が存在することが明らかになった(1)。しかしながら、カロリー制限が発がんを抑制するメカニズムは未だ完全には明らかになってはいない。

本研究においてはカロリー制限による発がん抑制メカニズムを明らかにするためにオートファジーに着目をした。オートファジーは、細胞内のオルガネラやタンパク質を分解することで細胞の恒常性を維持し細胞の生存に関与することが知られている。オートファジー関連遺伝子である *Atg5* や *Atg7* を欠損させたマウスにおいて肝腫瘍がみとめられたことから、オートファジーと発がんの間には密接な関係があると考えられることができる。また、栄養状態のセンサーとして知られていて、エネルギー代謝、タンパク質合成、細胞成長などに関与する mTORC1 タンパク質の阻害剤であるラパマイシンによってオートファジーが誘導されること、腫瘍の成長が抑制されることも報告されている(2)。

2. 研究の目的

カロリー制限と発がんの両方に深く関係しているオートファジーに着目し、カロリー制限による発がん抑制効果が小さかった胸腺と大きかった肺、肝臓におけるオートファジーの誘導を比較することで、カロリー制限による発がん抑制効果に臓器特異性が生じる原因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

B6C3F1 マウス (オス) に 1 週齢時に 3.8 Gy の X 線を 1 回照射する「照射群」と「非照射群」の 2 群に分け、さらに 7 週齢から通常食 (95 kcal/week) で飼育する「非制限群」と 30% のカロリー制限 (65 kcal/week) を行う「30%カロリー制限群」に分けることで、4 つの実験群 (3.8 Gy - 95 kcal、3.8 Gy - 65 kcal、0 Gy - 95 kcal、0 Gy - 65 kcal) を設定した。

放射線被ばく後とカロリー制限後に誘発されるオートファジーの、臓器における応答の違いを継時的に解析するために、1 週齢時の X 線照射直後 (24 時間と 72 時間)、7 週齢時からのカロリー制限直後から胸腺リンパ腫発症開始前の時期 (24 時間、72 時間、8 週齢、10 週齢、14 週齢)、胸腺リンパ腫発症のピーク後から肺がん、肝がん発症開始前の時期 (28 週齢、42 週齢、57 週齢時) の複数の時点で解剖し、胸腺、肺、肝臓を採取した。採取した臓器は一部を組織切片作成のためホルマリン固定し、残りの部分はタンパク質抽出用に凍結保存した。

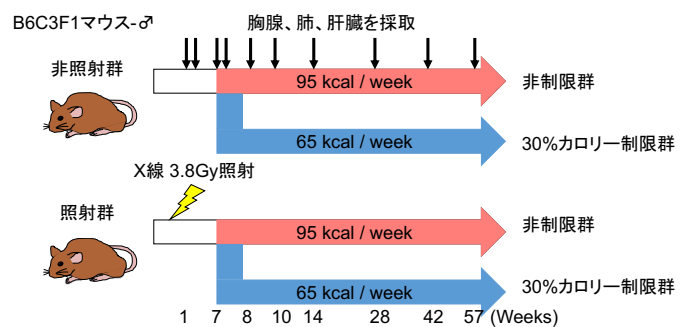


図 1. 実験概要

オートファジー関連タンパク質の解析はウエスタンブロットと蛍光免疫染色によって行った。ウエスタンブロットにおいては抗 LC3B 抗体 (CST, #2775) と抗 SQSTM1/p62 抗体 (CST, #23214) を用いた。蛍光免疫染色においては抗 LC3B 抗体 (Novus, NB100-2220) と抗 SQSTM1/p62 抗体 (CST, #23214) を用いて染色を行い、蛍光顕微鏡下で撮影した画像を Image J によって解析し蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) カロリー制限がマウスの体重に与える影響

本研究においては 7 週齢からのカロリー制限後、毎週体重の測定を行いカロリー制限による体重への影響を 4 群で比較した。その結果、図 2 に示すように 57 週齢の時点で照射群と非照射群のどちらにおいても非制限群と制限群の間で体重に有意な差がみられた (照射群: $p > 0.01$ 、非照射群: $p > 0.01$)。また、照射群と非照射群の間で比較した場合は、非制限群では有意な差が見られなかった ($p > 0.05$) が制限群においては有意な差は見られなかった。そのため、カロリー制限によってマウスの体重増加が抑制されることが示された。また、非制限群において照射群のマウスの体重が非照射群よりも有意に低く、肝臓や肺、脾臓といった臓器の重量に大きな差

いが見られないことから、照射群の方が、基礎代謝量が上昇している可能性が考えられた。

(2) がんの発生率

本研究は研究方法に示したように、がん発症前の時期の臓器を解析することが目的であるが、複数の個体においてがんの発症が確認された(表1)。3.8 Gy - 95 kcal 群で 8.6% (3/35)、3.8 Gy - 65 kcal 群で 3.2% (1/31) がリンパ腫によって死亡した。一方で非照射群においては非制限群と制限群ともにリンパ腫の発生は見られなかった。リンパ腫の発生率についてはカロリー制限の有無で有意な差はなかった。また、解剖時の各臓器を観察した結果、上記のリンパ腫を除き 42 週齢までは各群とも腫瘍は確認されなかった。しかしながら 57 週齢では、3.8 Gy - 95 kcal 群において解剖したマウス 5 匹のうち肝がんが 3 匹、肺がんが 1 匹、ハーダー腺腫瘍が 1 匹確認された。一方で他の 3 群については解剖時に腫瘍は見られなかった。そのため、先行研究と同様にカロリー制限による放射線発がんの抑制効果が示された。

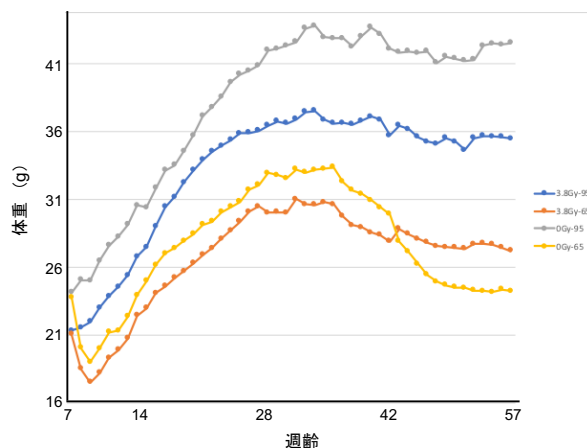


図 2. マウスの体重推移

表 1. 発生した腫瘍一覧

	リンパ腫	肝がん	肺がん	ハーダー腺腫瘍
0 Gy - 95 kcal	0	0	0	0
0 Gy - 65 kcal	0	0	0	0
3.8 Gy - 95 kcal	3	3	1	1
3.8 Gy - 65 kcal	1	0	0	0

(3) 肝臓におけるオートファジー関連タンパク質の蛍光免疫染色

肝臓においてカロリー制限による発がん抑制効果が顕著に見られたことから、肝臓におけるオートファジー関連タンパク質 (LC3, p62) のカロリー制限後の継時的な変化を、蛍光免疫染色を用いて各群におけるタンパク質の輝度の総和を比較することで解析した。LC3 においてはカロリー制限群と非制限群の間で蛍光強度を比較すると、10 週齢では殆ど差は見られなかった。しかしながら 28 週齢においては、照射群と非照射群ともにカロリー制限群の方が非制限群よりも蛍光強度が高い傾向が見られた。一方、照射群と非照射群の間で比較を行うと 10 週齢と 28 週齢ともに殆ど差は見られなかった(図 2)。LC3 はオートファジーのマーカーとして扱われるタンパク質であるため、長期間のカロリー制限は肝臓におけるオートファジーを増加させること、放射線被ばくはオートファジーに大きな影響を与えないことが示唆された。また、蛍光免疫染色を行った肝臓において少数ながら図 3 のように周囲の細胞と比べて LC3 の発現量が顕著に大きな細胞がみられた。これらの細胞は、オートファジー細胞死が生じている可能性が考えられるが、このような細胞は各群とも非常に少なく、カロリー制限や放射線被ばくの有無による差は見られなかった。

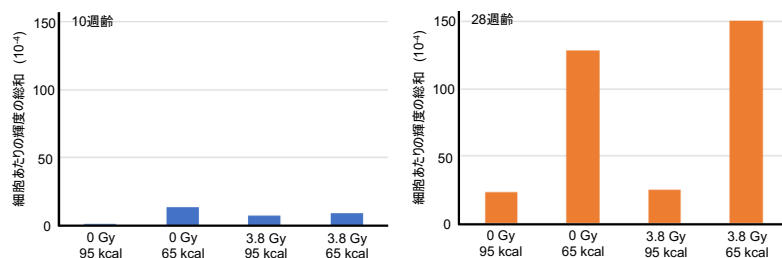


図 3. 肝臓における LC3 の蛍光強度

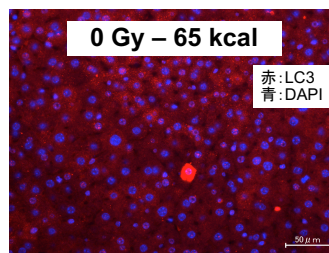


図 4. LC3 染色像

p62 においてはカロリー制限群と非制限の間で蛍光強度を比較すると、10 週齢においては照射群と非照射群ともにカロリー制限群のほうが非制限群よりも高い傾向が見られた。一方で 28 週齢においては大きな差は見られなかった。照射群と非照射群で比較を行った場合は 10 週齢と 28 週齢ともに大きな差は見られなかった(図 5)。p62 はオートファジーにおいてユビキチン化されたタンパク質の凝集体などに結合し、LC3 との相互作用によって結合したタンパク質ごとオートファジーによって分解されることが知られている。そのため、オートファジーが活性化すると LC3 の増加とともに p62 は分解され発現量が減少すると考えられる。また、10 週齢において p62 の発現量が高い傾向がみられたカロリー制限群においては、28 週齢では LC3 の発現量が大きく増加しているため、オートファジーの活性化と p62 の分解が促進されたことで非制限群と比べて p62 の発現量に差が見られなくなったのではないかと考えられる。しかしながら、何故カロリー制限によって p62 の発現量が大きく増加したのかは不明である。p62 欠損マウス

は脂肪細胞の分化促進(3)や過食よる肥満(4)を生じることも報告されている。そのため、オートファジー関連以外の部分の観点からもカロリー制限において重要なタンパク質である可能性が考えられるため、今後さらなる検討を行いたい。また、マウスを用いた蛍光免疫染色では LC3、p62 とともに個体ごとの発現量の差がかなり大きかったため、今後さらに個体数を増やして解析を行いたい。

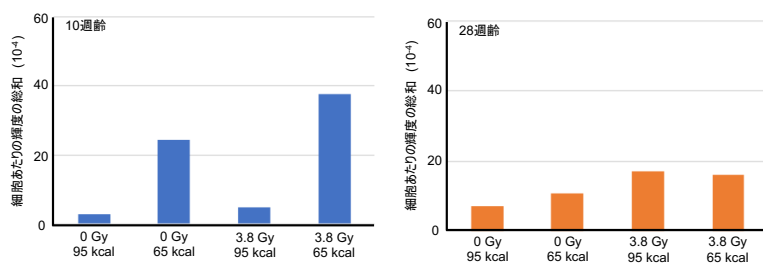


図 5. 肝臓における p62 の蛍光強度

(4)肝臓におけるオートファジー関連タンパク質のウェスタンブロット

肝臓におけるオートファジー関連タンパク質の継時的変化の解析をより充実させるため、ウェスタンブロットによるタンパク質の定量と比較を行った。凍結した肝臓からタンパク質を抽出し、BCA法によりタンパク質の濃度を測定し、βアクチンにより補正をした後に、LC3とp62ともに30 μgのタンパク質を用いてウェスタンブロットを行った。LC3においては、LC3-IとLC3-IIの2種類のバンドが検出されるが、ホスファチジルエタノールアミン(PE)を付加されオートファゴソーム膜と結合するLC3-IIがオートファジーのマーカーとして扱われている。そのため、LC3-IとLC3-IIの比率を求めることでオートファジーの活性を比較した。図6はLC3の結果を示しており、8週齢と28週齢においては各群とも殆ど差は見られなかった。一方で10週齢においては非制限群でLC3-IIの比率が高い傾向が見られた。また、継時的に比較した場合、28週齢においてわずかながらLC3-IIの比率が低い傾向が見られた。そのため、蛍光免疫染色によるLC3の解析結果とは異なる結果が得られた。蛍光免疫染色においてはLC3-IとLC3-II両方が含まれている結果のため、オートファジーの活性が低下しているのではなく、LC3-Iの発現量が大きい可能性が考えられる。

P62の結果については、図7に示した。P62については各週齢ともp62の値が高い群が異なり、一貫した傾向が見られなかった。また、10週齢の0 Gy - 65 kcal群と28週齢の0 Gy - 95 kcal群以外は概ね蛍光免疫染色と一致した傾向が見られた。継時的に比較をした場合、10週齢と28週齢ともに8週齢よりもわずかに低い傾向が見られ、10週齢と28週齢の間では大きな差は見られなかった。

28週齢においてはLC3-IIの比率が10週齢よりも低かったにも関わらず、p62の発現量については大きな差が見られないことから、28週齢においてはオートファジーの活性が低下しているのではなく、LC3-Iの発現量が大きい可能性が考えられる。

ウェスタンブロットの結果からは、カロリー制限はオートファジーの活性化には、あまり影響しないことが示唆された。しかしながら、LC3、p62ともに個体ごとの発現量の差がかなり大きかったため、今後さらに個体数を増やすとともに、残りのタイムポイントの解析を行うことでより、オートファジー関連タンパク質の継時的な変化についてより正確に解析を行いたい。

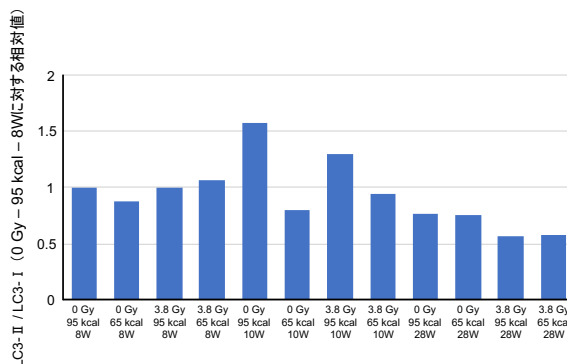


図 6. LC3 のウェスタンブロット解析結果

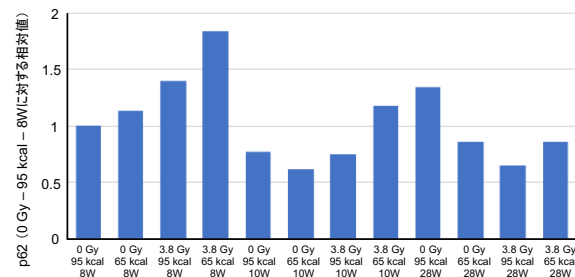


図 7. p62 のウェスタンブロット解析結果

今回の研究結果をまとめると、長期間のカロリー制限は放射線誘発がん特に肝臓の腫瘍を抑制することが明らかになった。また、蛍光免疫染色とウェスタンブロットの結果からは、カロリー制限は、制限直後はp62、長期の制限後はLC3とオートファジー関連タンパク質を増加させるものの、オートファジー自体の活性化には大きな影響を与えないことが示唆された(図8)。

しかしながら、未だ解析が十分でないタイムポイントが残っているため、今後さらに解析を行い、より正確なカロリー制限による影響を評価したい。また、p62 においては他の研究から肥満の防止に関わることが示されているので、今後更なる検討を行いたいと考えている。

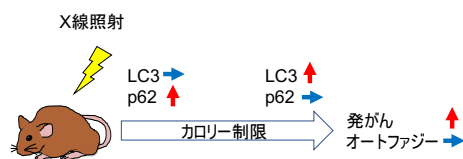


図 8. 研究結果のまとめ

参考文献

1. Shang Y, Kakinuma S, Yamauchi K, Morioka T, Kokubo T, Tani S, Takabatake T, Kataoka Y, Shimada Y. Cancer prevention by adult-onset calorie restriction after infant exposure to ionizing radiation in B6C3F1 male mice. *Int J Cancer* **2014**;135:1038-47.
2. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* **2014**;19:373-9.
3. Rodriguez A, Durán A, Selloum M, Champy MF, Diez-Guerra FJ, Flores JM, Serrano M, Auwerx J, Diaz-Meco MT, Moscat J. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab* **2006**;3:211-22.
4. Harada H, Warabi E, Matsuki T, Yanagawa T, Okada K, Uwayama J, Ikeda A, Nakaso K, Kirii K, Noguchi N, Bukawa H, Siow RC, Mann GE, Shoda J, Ishii T, Sakurai T. Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *J Neurosci* **2013**;33:14767-77.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takafumi Nakayama and Keiji Suzuki
2. 発表標題 Analysis of autophagy caused by calorie restriction in radiation exposed mice.
3. 学会等名 The Joint Workshop of QST-NIRS, CEA and IRSN (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山貴文、鈴木啓司
2. 発表標題 放射線被ばくマウスにおけるカロリー制限後の臓器特異的オートファジー誘導の解明
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Nakayama and Keiji Suzuki
2. 発表標題 Analysis of autophagy induction in liver caused by calorie restriction in radiation exposed mice.
3. 学会等名 The 4th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----