

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22610026

研究課題名（和文）化学発がんにおける思春期の放射線被ばくの影響

研究課題名（英文）Effects of radiation exposure of adolescents on chemical carcinogenesis

研究代表者

甘崎 佳子（AMASAKI YOSHIKO）

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・研究員

研究者番号：80435700

研究成果の概要（和文）：思春期の放射線被ばくとその後の化学発がん物質との発がんに対する複合影響について、両者のばく露のタイミング（間隔）に着目し、マウスを用いて実験を行った。その結果、ばく露間隔が 0 週および 2 週間の群では胸腺リンパ腫の発生率がほぼ 100%であったのに対し、4 週間および 8 週間の群では有意に低下した。また、がん抑制遺伝子 *Ikaros* の変異スペクトラムが各群で異なることから、同程度の発がん率であってもばく露のタイミングによって発がん機構が変動することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We clarified the combined effect of chemical carcinogen treatment with radiation exposure in adolescence, focusing on the effect of the interval between the exposures. We observed the incidence of thymic lymphoma was almost 100% when intervening interval was zero or two weeks. But it decreased significantly when the interval was four or eight weeks. The mutation spectrum of *Ikaros* (tumor suppressor gene) in the lymphomas was different between the different interval groups. These results suggested that the carcinogenic mechanism of combined exposures varies, depending on the timing of the exposures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：放射線分子生物学

科研費の分科・細目：こども学（こども環境学）

キーワード：思春期 放射線 胸腺リンパ腫 複合曝露

## 1. 研究開始当初の背景

思春期から成人期前期に発生するがんは、幼児期や成人期後期とは異なる独自のパターンを示すことが分かってきた (Bleyer, A., et al., Nature Rev Cancer, 2008, 8: 288-298.)。思春期は性成熟を促す内分泌系

が活発になるとともに、免疫系が完成されるなど体内の環境が大きく変化する時期である。胸腺は免疫系の中心をなす臓器であり、思春期以降萎縮を始める。我々はこれまでに思春期後に発生する白血病のモデルである胸腺リンパ腫を用いて、電離放射線と発がん

化学物質の複合曝露による発がんでは、曝露の順番が重要であることを明らかにしてきた。

生活環境中には、タバコや食事成分、大気汚染物質など様々な発がん要因が混在しているため (Doll, R. and R. Peto, J Natl Cancer Inst, 1981, 66(6): 1191-308)、放射線によるヒトの発がんリスクも放射線単独ではなく、それら環境因子との複合影響の結果としてとらえるべきであると考えられる。

これまでの複合曝露研究は、連続曝露や同時曝露について検討されたものが多く、これらの発がん物質の線量や用量によって複合効果が異なることが示されている (Seidel, H. J. and S. Bischof, J Cancer Res Clin Oncol, 1983, 105: 243-9)、(Seidel, H. J., Int J Radiat Biol Phys Chem Med, 1987, 51: 1041-8)。生活環境中の様々な発がん要因と放射線との複合被曝において、日常生活の中で予想される曝露の形態 (曝露のタイミング) には、連続曝露や同時曝露の他に、間隔をあけた曝露、すなわち第一の発がん因子に曝露した後一定の間隔をおいて第二の発がん因子に曝露されるケースが考えられる。しかし間隔をあけた曝露についての報告は、連続曝露で相乗効果が見られた条件でも一定期間経過してから第二の発がん剤を投与すると効果が少なくなることが Seyama らによって示されたのみである (Seyama, T., et al., Jpn J Cancer Res, 1985, 76: 20-7)。どのような曝露間隔なら発がんに影響するのか、また発がんメカニズムは変動するのかという点について十分な情報は得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、思春期における放射線被曝が、その後の化学発がん物質による発がんにどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。特に、二つの発がん因子の曝露のタイミングに焦点を当て、複合曝露の間隔を変えて、誘発されるがんの頻度と、がん関連遺伝子の変異スペクトルがどのように変化するかを個体レベル並びに分子レベルで解析した。

放射線被曝の影響がどの程度後まで残るのか明らかになれば、放射線と化学療法を併用したがん治療における二次がんのリスクの評価や、小児期の放射線被曝と成長してからの発がん化学物質曝露による発がんリスクの評価の分子生物学的機構をサポートし、さらにはリスク低減化につながる可能性もあり意義は大きいものと考えられる。

## 3. 研究の方法

本実験では、放射線はX線を、発がん化学物質は食事やたばこ中のアルキル化物質の類似成分としてデータが蓄積しているエチ

ルニトロソ尿素 (ENU) を用いた。

### (1) X線とENUによる胸腺リンパ腫の誘発

4週齢 (ヒトの思春期に相当する) B6C3F1 マウス (雌) 各群 50 匹に X 線 1Gy (0.7Gy/min) を 1 週間間隔で 4 回全身照射 (PANTAK X-ray generator) した後、0、2、4、8 週間の間隔をあけて ENU (200ppm) を 4 週間飲水投与し、胸腺リンパ腫を誘発した。

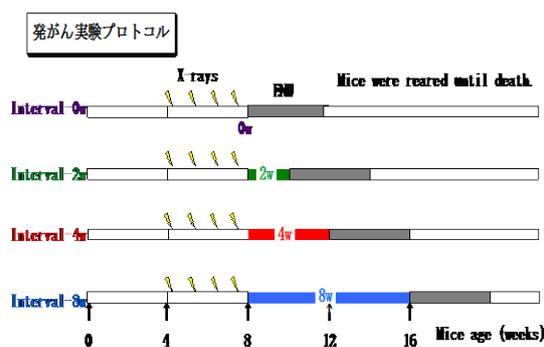


図 1. 発がん実験プロトコル

X 線照射後に ENU 投与する 0 週および 4 週間隔群と、対照となる X 線単独群、ENU 単独群についてはすでに発がん実験を終了していたため、本研究では 2 週および 8 週間隔群とそれに対応する ENU 単独群の発がん実験を追加した。

発がん処理後のマウスは毎日健康状態をチェックし、発がんの兆候を示したとき麻酔下ですみやかに解剖した。サンプルは DNA、RNA、タンパクなどの分子解析用に処理した後、凍結保存した。

全てのマウスは生涯飼育し、寿命解析を行った。

### (2) 胸腺リンパ腫のゲノム解析

複合曝露における発がんメカニズムの特徴を明らかにするためには、それぞれの発がん因子によって生じる突然変異のパターンが異なる系を用いる必要がある。

すでに我々は、X 線誘発とエチルニトロソ尿素誘発のマウス胸腺リンパ腫とでは、第 11 番染色体の異常ならびにそこにマップされているがん抑制遺伝子 *Ikaros* の変異スペクトルが異なることを見いだしている。

(Shimada, Y., et al., Radiat Res, 2000, 154(3): 293-300.; Kakinuma, S., et al., Radiat Res, 2002, 157(3): 331-40; Kakinuma, S., et al., Mutat Res, 2005, 572(1-2): 132-41.)

そこで、*Ikaros* の変異スペクトルを根拠として発がんメカニズムを議論するため、以下の解析を行った。

① LOH (ヘテロ接合性の消失) 解析

これまでの我々の研究から、X線誘発の胸腺リンパ腫では11番、12番、19番染色体に高頻度にLOHが観察されたが、12番染色体は自然誘発で、19番染色体はENU誘発でも高頻度だった。しかし、11番染色体は放射線に特有であった(図.2)。そこで、図3に示すMitマーカーを用いてLOHの解析を行った。

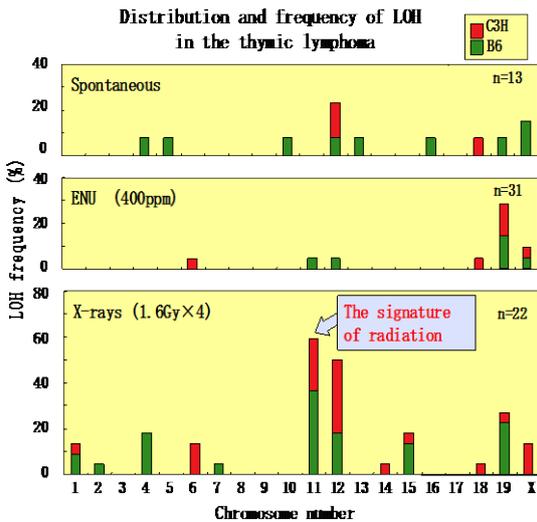


図2. 胸腺リンパ腫のLOH分布

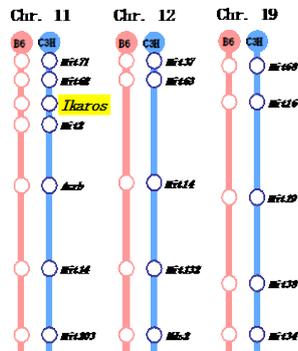


図3. LOH解析に用いたMitマーカー

② Ikaros の遺伝子解析

Ikarosは、リンパ球の分化・増殖に関するマスター転写因子であり(図.4)、胸腺リンパ腫におけるがん抑制遺伝子として知られている。我々はこれまでに、放射線誘発あるいはENU誘発の胸腺リンパ腫で、Ikarosの変異タイプが異なることを明らかにしてきた。

そこで、RT-PCR、Direct Sequence、TA cloningなどを用いてIkaros遺伝子の変異を解析した。

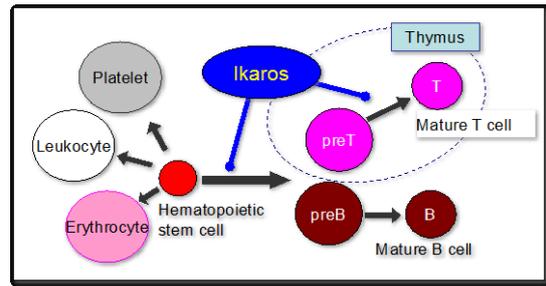


図.4 Ikarosの働き

4. 研究成果

(1) 寿命短縮および胸腺リンパ腫発生率

複合曝露群の生存曲線から、Interval-0wとInterval-2wでは、Interval-4wおよびInterval-8wよりも寿命短縮の割合が大きいことが明らかになった(図.5)。

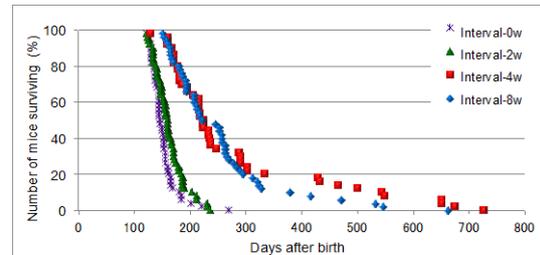


図.5 生存曲線

胸腺リンパ腫の発生率は、X線またはENU単独で誘発した場合と比較して相乗的に増加し、Interval-0wおよびInterval-2wではほぼ100%に胸腺リンパ腫が発生した。

Interval-4wおよびInterval-8wではInterval-0wまたはInterval-2wよりも有意に減少したが、8週間開けた場合でも相加的な増加レベルより高頻度であった(図.6)。

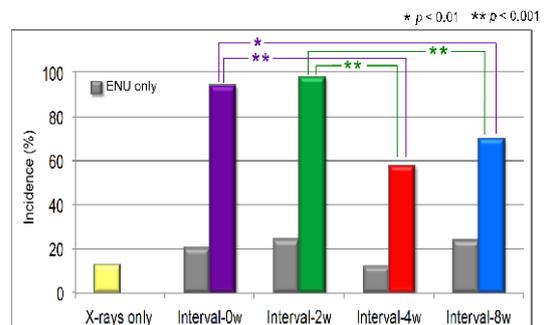


図.6 胸腺リンパ腫発生率

(2) 胸腺リンパ腫のゲノム解析

① LOH 解析

X線誘発の胸腺リンパ腫で高頻度に観察される11番染色体のLOH頻度は、インターバルが短いほど減少する傾向が見られた。特にInterval-0wでは他の群に比べて有意に低かった。

一方、12番および19番染色体では、曝露間隔の違いによるLOH頻度の変動に一定の傾向は見られなかった。(図.7)

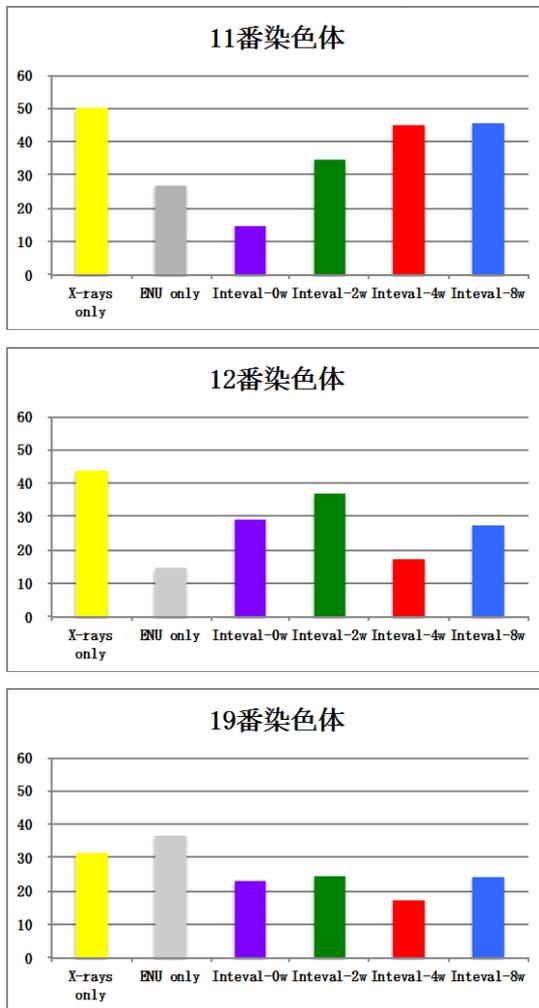


図.7 LOH 頻度

② *Ikaros* の遺伝子解析

複合曝露群では、*Ikaros* の塩基置換変異の頻度が単独曝露群より増加した(表.1)。

	塩基置換	挿入または 欠失	スプライシング 異常	発現なし	その他	異常なし
X-rays 16y	17.6	11.8	5.9	0.0	0.0	64.7
ENU only	17.5	5.0	7.5	0.0	2.5	67.5
Interval-0w	38.6	0.0	6.8	0.0	0.0	54.5
Interval-2w	36.7	4.1	6.1	2.0	3.2	51.0
Interval-4w	24.0	0.0	8.0	0.0	4.0	64.0
Interval-8w	26.5	5.9	17.6	2.9	2.9	52.9

表.1 *Ikaros* 遺伝子解析結果

特に Interval-0w および Interval-2w では 36.7~38.6%でと高く、Interval-4w および Interval-8w は 24.0~26.5%であった。曝露間隔が長いと(4週間以上)、塩基置換の頻度が減少する傾向が見られた。

また、Interval-8w(黄色のカラム)では、スプライシング異常の頻度が他の群に比べて高かった。

(3) 考察

思春期からの複合曝露において、放射線の影響は曝露間隔を開けることによって減少するが、8週間開けても残ることが示された。また、各群でLOH頻度や *Ikaros* の変異スペクトラムが異なることから、曝露の間隔によって発がん機構が変動することが示唆された。特に、曝露間隔が短くなると11番染色体のLOHの頻度は減少するが、12番、19番では変化が小さいことは、複合曝露の間隔によって標的となる遺伝子(がん抑制遺伝子)が異なることを示唆する。今後は、*Bcl11b*(12番染色体)や *Pten*(19番染色体)の詳細な解析をする予定である。

本研究の結果は複合曝露の間隔が発がんリスク要因として重要であることを示した。がんの併用療法のプロトコルの作成や、思春期の被ばくの影響がその後も残ることによるリスク表の考え方など、がんリスクの低減に還元できる成果がでたものと期待される。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① Y. Amasaki: Molecular interaction of X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea in thymic lymphomagenesis depends on the interval of two treatments, The 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2012. 07. 08, Barcelona, Spain
- ② Y. Amasaki: Effect of the interval period between exposures to ionizing radiation and N-ethyl-N-nitrosourea on the development of murine thymic lymphoma, 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, 2011. 09. 01, Warsaw, Poland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甘崎 佳子 (AMASAKI YOSHIKO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・研究員

研究者番号: 80435700

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

柿沼 志津子 (KAKINUMA SHIZUKO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射  
線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号 : 20392219