

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700956

研究課題名(和文) 中性子線誘発髄芽腫における被ばく時年齢依存性

研究課題名(英文) Age dependence of neutron-induced medulloblastoma in Ptch1 heterozygous mice

研究代表者

鶴岡 千鶴 (Tsuruoka, Chizuru)

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・博士研究員

研究者番号：60415411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：小児期中性子線被ばくによる発がんリスクの基礎データは十分になく、また線質の違いによる発がんリスクへの影響はほぼ皆無である。そのため、Ptch1遺伝子ヘテロ欠損マウスを用い、ガンマ線・中性子線被ばくによる発がんリスクの被ばく時年齢依存性を明らかにすることを目的とした。

ガンマ線および中性子線共に、胎生17日及び生後1日齢時の被ばくで発がん率が最も上昇した。また線質の違いによる発がんリスクは、生後10日齢被ばくを除くすべての被ばく時年齢においてガンマ線よりも中性子線で高かった。

研究成果の概要(英文)：The available data on the carcinogenic mechanisms of neutron exposure in children are still limited. We examined the effects of neutron irradiation using Ptch1 heterozygous mice, which are prone to spontaneous and radiogenic medulloblastoma (MB), comparing with the effects of gamma-rays.

We found that the effects of gamma-rays and neutron radiation on MB induction were dependent on the age at exposure. The MB incidence was significantly higher for neutron irradiation compared with gamma-irradiation during the prenatal and early postnatal period. Irradiation with either gamma-rays or neutrons at postnatal day 10 resulted in MB incidence lower than spontaneous MB. These results indicate opposing effects of radiation, clearly inducing MB during the prenatal and early postnatal periods while seemingly suppressing MB below the spontaneous levels in these sensitive mutant mice. Neutrons appear to be more effective than gamma rays at the same for both inducing and suppressing MB.

研究分野：放射線生物学

キーワード：中性子線 発がん 被ばく時年齢依存性

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に CT 検査が普及し、小児の頭部被ばくが増えている。また、国内における小児がんは、白血病（主に急性リンパ性白血病）と脳腫瘍がほぼ半数を占めており、この白血病および脳腫瘍の治療法のひとつとして頭部への放射線治療が行われている。また、さまざまな放射線治療法が普及し、がん組織に線量を集中させるために高エネルギー電磁波放射線を複雑な照射野で複数門より照射を行う強度変調放射線治療 (IMRT) や、ビームの特性を利用した陽子線治療・重粒子線治療などが利用されている。このような治療法で問題となるのが、低線量の二次放射線（中性子線など）や陽子線・重粒子線による腫瘍周辺部正常組織への影響である。

中性子線や重粒子線は高 LET 放射線であり、電磁波放射線などの低 LET 放射線に比べ生物効果が高い。また細胞レベルにおいては、放射線誘発突然変異細胞の標的遺伝子の欠損の大きさが低 LET 放射線と高 LET 放射線において異なることが報告されている（引用文献 1,2）。実験動物においては APC^{min/+} マウスの成体期（35 日齢）における X 線および核分裂中性子線誘発腸腫瘍の遺伝子の欠損パターンが X 線誘発と中性子線誘発では異なることが報告されている（引用文献 3）。

しかしこれまでの研究では、小児期の中性子線被ばくによる発がんリスクにおける線量効果関係や被ばく時年齢依存性は十分に蓄積されておらず、また線質の違いによる発がんリスクの基礎データはほぼ皆無である。

Ptch1 遺伝子ヘテロ欠損マウスは、がん抑制遺伝子である *Ptch1* 遺伝子の片方のアレルが変異している Gorlin 症候群のモデルマウスである。このマウスは、髄芽腫、基底細胞がん等を発症する。また、生後 1 日齢に全身照射（X 線 3 Gy）すると髄芽腫が有意に発生するが、生後 10 日齢では照射による誘発頻度の上昇は認められず、明らかな被ばく時年齢依存性を示す（引用文献 4）。また、髄芽腫の 13 番染色体の Loss of Heterozygosity (LOH) 解析および、Array CGH 法によりゲノムコピー数を解析することによって、生後 1 日齢照射により誘発された髄芽腫では野生型 *Ptch1* 遺伝子が中間欠損により消失し、自然発生した髄芽腫では組換えにより野生型 *Ptch1* 遺伝子が消失していることも報告されている（引用文献 4,5）。このようにこのモデルマウスは、発生した腫瘍の分子解析を行うことによって、自然発生腫瘍と放射線誘発腫瘍に区別することができる（図 1）。

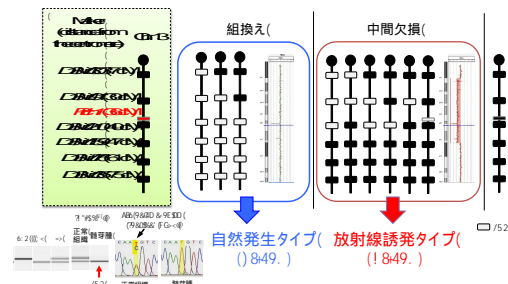


図 1. 髄芽腫の発生タイプ

2. 研究の目的

放射線感受性である *Ptch1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスを用い、ガンマ線および中性子線被ばくによる発がんリスクの被ばく時年齢依存性の基礎データを蓄積することを目的とした。また、ガンマ線および中性子線により誘発された髄芽腫の誘発機構に違いがあるのか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

：動物及び照射方法

マウスは、C3B6F1 バックグラウンドの *Ptch1*^{+/-} マウスを用い、飼育・照射はすべて SPF 環境下で行った。ガンマ線はガンマセル照射装置（¹³⁷Cs）、中性子線は平均 2.3 MeV の速中性子線を用いた。各被ばく時年齢の照射線量及び照射匹数を表 1 に示す。また、非照射マウスは 58 匹使用した。

表 1：各被ばく時年齢の照射線量及び匹数

線量 (Gy)	ガンマ線					中性子線				
	E14	E17	PN1	PN4	PN10	E14	E17	PN1	PN4	PN10
0.1	69	47	61	66	47	52	69	43	53	58
0.5	53	50	56	51	47	54	40	37	39	52

（E14:胎生 14 日、E17:胎生 17 日、PN1:生後 1 日齢、PN4:生後 4 日齢、PN10:生後 10 日齢）

：ガンマ線および中性子線被ばくによる髄芽腫の発生頻度

照射後、終生飼育を行った。飼育中は 1 日 1 回目視にて健康状態を観察した。体温の低下・行動異常・頭部突出・呼吸異常等の健康状態の悪化が見られた際、麻酔下で腋下瀉血により安楽死させ、解剖を行い、脳及びその他の異常臓器をホルマリンにより固定した。

解剖時目視にて髄芽腫を確認した場合、髄芽腫組織の一部と耳（正常）を分子解析用に凍結保存した。病理解析後、髄芽腫発生頻度をそれぞれの実験群毎に算出し、各被ばく時年齢の線量効果関係を調べた。

：髄芽腫の分子解析

解剖時に採取した髄芽腫と耳（正常）の凍

結サンプルより DNA を抽出し、13 番染色体に存在する *Ptch1* 遺伝子の前後 6 カ所のマイクロサテライトマーカー (*D13Mit303*、*D13Mit91*、*D13Mit210*、*D13Mit159*、*D13Mit76*、*D13Mit35*) を用いた PCR、*Ptch1* 遺伝子座の 4016 (T/C 多形型) を含む exon23 のシーケンスにより LOH 解析を行った。また、一部のサンプルにおいては Array CGH 法によりゲノムコピー数を確認した。LOH および array CGH の解析結果より、*Ptch1* 遺伝子及びその周辺のみが LOH になり、LOH の領域のゲノムコピー数が減少している(すなわち野生型 *Ptch1* アレルが中間欠損により消失している)タイプを放射線誘発型髄芽腫 (R-type)、*Ptch1* 遺伝子を含む領域からテロメア側まですべてが LOH になっているがゲノムコピー数に変化がない(すなわち野生型 *Ptch1* アレルが組換えにより消失している)タイプを自然発生型 (S-type) と分類した(図 1)。

4. 研究成果

：髄芽腫の発生頻度

すべての実験群において髄芽腫は生後 80 日前後より発生し、生後 400 日以降には発生が認められなかった。各実験群の発生率および生存期間を表 2 に示す。

被ばく時 年齢及び 線量 (Gy)	非照射		ガンマ線		中性子線	
	発生率 (%)	生存 期間 (日)	発生率 (%)	生存 期間 (日)	発生率 (%)	生存 期間 (日)
非照射	54	179±6				
E14 0.1			42	176±8	83**	127±6***
E14 0.5			53	155±6	85***	95±6***
E17 0.1			45	163±7	96***	119±5***
E17 0.5			70	172±8	98***	91±2***
PN1 0.1			52	184±7	77**	136±6***
PN1 0.5			66	163±8	100***	96±1***
PN4 0.1			49	184±8	51	184±8
PN4 0.5			41	179±6	74**	162±5
PN10 0.1					40	188±6
PN10 0.5			36	200±10	25**	153±5

表 2：髄芽腫の発生率及び生存期間

黒字：非照射と比較 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

赤字：同線量ガンマ線と比較 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

非照射時における髄芽腫の発症率は 54% であった。各被ばく時年齢における発がんリスクは、中性子線・ガンマ線被ばくどちらにおいても、E17 および P1 実験群で最も高かった。

放射線の線質の違いによる発がんリスクは、E14、E17、PN1 の 0.1 Gy および 0.5 Gy 実験群では、ガンマ線被ばくに比べ中性子線被ばくにおいて髄芽腫発生率が有意に高く、

さらには生存期間も有意に短くなった。PN4 0.5 Gy 照射群の髄芽腫発生率は、上記被ばく時年齢実験群と同様に、ガンマ線被ばくに比べ中性子線被ばく時の方が高かったが、生存期間に有意な差は認められなかった。一方、PN10 実験群はこれまでの報告 (X線、3 Gy) (引用文献 4) と同様に、両放射線共に髄芽腫発生率は非照射群に比べ減少し、特に中性子線 0.5 Gy 照射群は有意に減少した。

：髄芽腫の分子解析 (LOH 解析)

非照射、PN1、PN4、PN10 実験群の髄芽腫 331 サンプル (非照射: 31、PN1 ガンマ線 () 0.1 Gy: 31、PN1 0.5 Gy: 37、PN4 0.1 Gy: 32、PN4 0.5 Gy: 21、PN10 0.5 Gy: 17、PN1 中性子線 (N) 0.1 Gy: 33、PN1 N 0.5 Gy: 37、PN4 N 0.1 Gy: 27、PN4 N 0.5 Gy: 29、PN10 N 0.1 Gy: 23、PN10 N 0.5 Gy: 13) のうち 330 サンプルの LOH 解析を行った。1 サンプルは、解剖時に死亡していたため凍結サンプルを採取することができなかった。

LOH 解析の結果より、図 1 のように S-type および R-type に分類した。また、すべてのサテライトマーカー及び *Ptch1* (exon23) に LOH が認められなかったサンプルについては、N (Non-LOH) とした。図 2 にそれぞれの実験群の R-type の発生率と生存期間を示した。

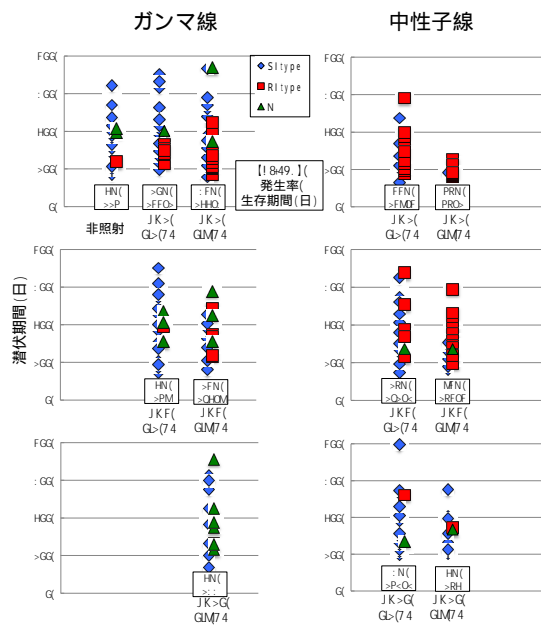


図 2. ガンマ線・中性子線誘発髄芽腫の LOH 解析

R-type 髄芽腫発生率は、PN1 実験群ではガンマ線・中性子線共に線量依存的に有意に増加し、生存期間も有意に短縮した。PN4 実験群は、PN1 実験群同様に線量依存的に有意に増加していたが、生存期間では減少傾向はあるものの有意な差は認められなかった。一方、PN10 実験群では、ガンマ線・中性子線

共に2-3%で自然発症のR-type 髄芽腫頻度と変わらなかった。

しかし、PN10 中性子線誘発すべてのR-type 髄芽腫(3サンプル)は、*Ptch1* 領域とテロメア側2カ所で欠損が生じる multiple なタイプであった。また同様のタイプは、PN4 0.5Gy 中性子線照射群でも1サンプル観察された。この multiple な LOH パターンは、ガンマ線被ばく時には見られなかったため、今後さらなる検討は必要ではあるが、中性子線被ばくによって生じる髄芽腫の特徴である可能性がある。

以上の結果より、ガンマ線および中性子線共に、出生前後に被ばくした時に発がん率が最も上昇した。また、線質の違いによる髄芽腫の発がんリスクは、PN10 を除くすべての被ばく時年齢においてガンマ線よりも中性子線で高かった。

引用文献

- 1, Kinashi *et al. Radiat.Res.*, **154**: 2000, 313-318.
- 2, Tsuruoka *et al. Biol.Sci.in Space*, **23**: 2009, 55-60.
- 3, Ellender *et.al. Int.J.Radiat.Biol.*, **87**: 2011, 385-399.
- 4, Pazzaglia *et al. Oncogene*, **25**: 2006, 5575-5580.
- 5, Ishida *et al., Carcinogenesis*, **31**: 2010, 1694-1701.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

鶴岡千鶴、柿沼志津子、島田義也、小児期の放射線被ばくと脳腫瘍、放射線生物研究、No.48、2013、123-136、<http://rbrc.kenkyuukai.jp/special/?id=10532>

森岡孝満、柿沼志津子、西村まゆみ、砂押正章、尚奕、鶴岡千鶴、今岡達彦、山田裕、吉見直己、島田義也、フィットケミカルによるがんの化学予防-フィットケミカル放射線誘発がんに対する予防剤としての期待-、放射線生物研究、No.48、2013、164-180、<http://rbrc.kenkyuukai.jp/special/?id=10532>

M. Aoki, Y. Furusawa, A. Uzawa, Y. Matsumoto, R. Hirayama, C. Tsuruoka, et al., Relative biological effectiveness of therapeutic proton beams for HSG cells at Japanese proton therapy facilities. *Journal of Radiation Research*, 55, 2014, 812-815. DOI:10.1093/jrr/rru003

B. Blyth, S. Kakinuma, M. Sunaoshi, Y. Amasaki, S. Sakairi, K. Ogawa, A. Shirakami, Y. Shang, C. Tsuruoka, M. Nishimura and Y. Shimada, Genetic analysis of T cell lymphomas in carbon ion-irradiated mice reveals frequent interstitial chromosome deletions: Implications for second cancer induction in normal tissue during carbon ion radiotherapy. *PLOS ONE*, 2015, in press.

〔学会発表〕(計 5 件)

鶴岡千鶴、尚奕、坂入しのぶ、甘崎佳子、上西睦美、品川まゆみ、島田義也、柿沼志津子、中性子線誘発髄芽腫における被ばく時年齢依存性、日本宇宙生物科学会第 27 回大会、2013.9 (つくば市)

鶴岡千鶴、尚奕、森岡孝満、上西睦美、島田義也、柿沼志津子、Effect of low-dose-rate radiation on medulloblastoma development in *Ptch1* heterozygous mice、日本癌学会、2013.10 (横浜市)

鶴岡千鶴、尚奕、坂入しのぶ、甘崎佳子、上西睦美、品川まゆみ、島田義也、柿沼志津子、中性子線被ばくによる髄芽腫発生の被ばく時年齢依存性、日本宇宙生物科学会第 28 回大会、2014.9 (大阪市)

鶴岡千鶴、尚奕、上西睦美、森岡孝満、柿沼志津子、島田義也、乳幼児期 *Ptch1* ヘテロマウスの低線量率被ばく誘発髄芽腫について、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014.10 (鹿児島市)

鶴岡千鶴、柿沼志津子、尚奕、上西睦美、森岡孝満、島田義也、Loss of heterozygosity in medulloblastoma of *Ptch1* heterozygous mice after non-carcinogenesis protracted gamma-radiation exposure、15th International Congress of Radiation Research、2015.5 (京都市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鶴岡 千鶴 (TSURUOKA Chizuru)
放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・博士研究員
研究者番号：60415411