

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340032

研究課題名(和文) 白血病モデルマウスを用いた放射線発がんの分子機構解明と年齢依存性の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of radiation induced-leukemia using the animal model

研究代表者

笹谷 めぐみ(豊島めぐみ)(Sasatani, Megumi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：80423052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線被ばくは白血病のリスクを増加させるが、その詳しい分子機構は解明されていない。近年、放射線誘発白血病発症メカニズムの一因として、放射線が直接転座を誘発するのではなく、生体内に既に存在する転座をもつ細胞集団が放射線の標的細胞であり、放射線は転座の次に必要な変異を誘発するのではないかという仮説が提唱されている。そこで、我々は、白血病モデルマウスを用いた放射線発がん実験を試み、白血病モデルマウスが野生型マウスと比較して放射線発がんに高感受性であることを明らかにした。また、若年期での放射線被ばくにより発がんリスクが増加することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiation increases the risks of leukemia and certain types of solid tumors. The relative risk of radiation-induced leukemia is much higher than those of solid tumors. Recently, Dr. Nakamura has hypothesized about the mechanism of radiation induced leukemia where the radiation-related acute lymphoid leukemia (ALL) risk for a population is almost entirely attributable to a small number of predisposed individuals in whom relatively large numbers of translocation-carrying pre-ALL cells have accumulated. To prove this hypothesis, we focused on BCR/ABL fusion gene which is a one of common chromosomal translocations known as Philadelphia chromosome and explored radiation induced tumorigenesis study by using BCR/ABL transgenic mice (BCR/ABL^{Tg/-} mice). Our data showed that BCR/ABL^{Tg/-} mice are susceptible to radiation-induced thymic lymphoma development.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ゲノム障害 ゲノム修復 放射線 発がん 白血病 突然変異

1. 研究開始当初の背景

広島、長崎の原爆被爆者の疫学調査において、白血病ならびに一部の固形がんの発症率が高いことが知られている。白血病は固形がんと比較して、放射線単位線量あたりの発症リスクが極めて高いという特徴があるが、その詳しい機構は未だ解明されていない。また、白血病や甲状腺がんなどは、被爆時年齢が若いほど発がんリスクが高いこと(年齢依存性)が報告されている。白血病では、それぞれ固有の染色体転座が検出されるという特徴があるため、放射線照射による染色体転座の誘発が白血病発症に関与すると考えられていた。しかしながら、放射線の転座誘発効率や健康な新生児で検出される転座頻度の高さ、白血病の発症頻度を考えた場合、放射線による白血病発症リスクの増加を転座の誘発で説明することは難しい。

近年、公益財団法人放射線影響研究所の中村らは、放射線誘発白血病発症メカニズムの一因として、放射線が直接転座を誘発するのではなく、生体内に既に存在する転座をもつ細胞集団が放射線の標的細胞であり、放射線は転座の次に必要な変異を誘発するのではないかという仮説を提唱している(Radiat. Res., 2005)。そこで、我々は、BCR/ABL 転座に着目をした。BCR/ABL 融合遺伝子は、フィラデルフィア染色体として知られており、9番染色体および22番染色体での転座により形成される遺伝子で、慢性骨髄性白血病(CML)の大半と急性リンパ芽球性白血病(ALL)の患者の一部に認められる。

我々は、中村らの仮説とこれまでの我々の知見をもとに「放射線が、BCR/ABL 転座を持つ細胞に新たな変異を誘発させることが放射線誘発白血病発症の一因である」という仮説を提唱した。この仮説が正しいのであれば、BCR/ABL 転座を持つ白血病モデルマウス(BCR/ABL^{Tg/-}マウス)は、放射線被ばくにより発がん高感受性を示すと考えられる。さらに、このマウスを用いて、放射線発がんの年齢依存性について解析を行う。

2. 研究の目的

本研究では、原爆被爆者の疫学研究や臨床研究から得られた知見と我々のこれまでの放射線発がん研究から明らかにした知見をもとに、白血病モデルマウス(BCR/ABL トランスジェニックマウス(BCR/ABL^{Tg/-}マウス))を用いた放射線誘発白血病の新規分子機構を提唱し、その解明を試みる。さらには、この白血病モデルマウスを用いることにより、放射線発がん研究で重要課題とされている年齢依存性の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 放射線発がん実験

BCR/ABL^{Tg/-}マウスを用いた放射線発がん実験を行うため、週齢の異なる BCR/ABL^{Tg/-}マウスに 3Gy のガンマ線照射を行った。照射後、マウスは餌、水を自由摂取させ、終生飼育した。また、腫瘍の一部を採取し、遺伝子変異解析のため凍結した。

動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等に従い、広島大学に実験計画を申請し、承認を得て実施した。動物の取り扱いに関しては、広島大学実験動物取り扱い指針に従い、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行った。

(2) ガンマ線照射

前述のマウスを滅菌済みの照射用容器に入れ、原爆放射線医科学研究所附属放射線先端医学実験施設放射線実験系施設に設置されているガンマ線照射装置ガンマセル(Gammacell 40 Exactor, Best Theratronics 社)を用いて約 0.9 Gy/min の線量率で照射を行った。

(3) 遺伝子変異解析

得られた腫瘍を用いて、DNA 抽出を行った。得られた DNA を用いて *Ikaros* 遺伝子における変異解析を行った。

(4) 微小核頻度

BCR/ABL^{Tg/-}マウス及び野生型マウスにガンマ線照射を行った。その後、経時的にマウス末梢血を採取し、末梢血中の網状赤血球における微小核の頻度をフローサイトメーターにて計測した。

4. 研究成果

我々は、原爆被爆者の疫学研究から得られた知見と我々のこれまでの放射線発がん研究から明らかにした知見をもとに、「放射線が、BCR/ABL 転座を持つ細胞に新たな変異を誘発させることが放射線誘発白血病発症の一因である」という仮説を提唱し、その解明を試みる。この仮説が正しいのであれば、BCR/ABL 転座を持つ白血病モデルマウス(BCR/ABL^{Tg/-}マウス)は、放射線被ばくにより発がん高感受性を示すと考えられる。実際に我々は、放射線分割照射(1Gy × 4)による発がん研究から BCR/ABL^{Tg/-}マウスは野生型マウスと比較して放射線発がんを高感受性であることを明らかにした。週齢の異なる BCR/ABL^{Tg/-}マウスを用いて放射線発がん実験を実施した。その結果、2 週齢でガンマ線照射を行った BCR/ABL^{Tg/-}マウスは非照射 BCR/ABL^{Tg/-}マウスと比較して高頻度に胸腺リンパ腫を発症した。一方、8 週齢でガンマ線照射を行った BCR/ABL^{Tg/-}マウスは非照射 BCR/ABL^{Tg/-}マウス

と差が検出されなかった。次に得られた腫瘍を用いて解析した結果、*Ikaros* 遺伝子のスプライシング異常が検出された。若年期の *BCR/ABL^{Tg/-}* マウスは放射線発がんに高感受性であり、その原因として、*Ikaros* 遺伝子のスプライシング異常によると考えられる。次に、野生型マウスと *BCR/ABL^{Tg/-}* マウスにガンマ線照射し、網状赤血球中の微小核頻度の検出を行った。その結果、両群ともに、照射後1日で微小核頻度が最も高くなり、その後減少した。また、各時点における微小核頻度は、両群とも同程度であり、有意差は検出されなかった。

本研究結果から、BCR/ABL 転座を持つ若年期は放射線に対して発がんリスクが高くなる可能性があることを示唆するといえる。

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 12 件)

1. Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N: A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle*, 査読有, 2017, 19;16(6):565-573. doi: 10.1080/15384101.2017.1284716.
2. Iizuka D, Sasatani M, Barcellos-Hoff MH, Kamiya K: Hydrogen Peroxide Enhances TGF β -mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Mammary Epithelial MCF-10A Cells. *Anticancer Res*, 査読有 2017, 37(3):987-995, <http://ar.iiarjournals.org/content/37/3/987.full.pdf+html>
3. Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Yuji, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva K E, and Kamiya K: Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level, *Carcinogenesis*, 査読有, *in press*.
4. 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 神谷研二: 放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた低線量放射線発がんリスク評価. *長崎医学雑誌*, 査読無, *in press*.
5. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 河合秀彦, 飯塚大輔, 神谷研二: 放射線による DNA 損傷

シグナル活性化における RAD18 の寄与. *広島医学*, 査読無, 2016, 69(4), 284-286

6. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺への影響とそのメカニズムについて, 査読無, 2016, 69(4), 302-304
7. Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L, Tateishi S, Shimura T, Li J, Iizuka D, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Kamiya K: RAD18 activates the G2/M checkpoint through DNA damage signaling to maintain genome integrity after ionizing radiation exposure. *PLoS One*, 査読有 10: e0117845, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0117845.
8. Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N: Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low dose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget*, 査読有 2015. doi: 10.18632/oncotarget.6518.
9. Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L, Tateishi S, Shimura T, Li J, Iizuka D, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Kamiya K: RAD18 activates the G2/M checkpoint through DNA damage signaling to maintain genome integrity after ionizing radiation exposure. *PLoS One*, 査読有, 2015, 10: e0117845,
10. 徐 衍賓, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 飯塚大輔, 神谷研二: E3 ユビキチンライゲース RAD18 が放射線損傷応答におよぼす寄与. *長崎医学雑誌*, 査読無, 2014, 89(特集号): 303-305
11. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二: 白血病モデルマウス (Bcr-Abl トランスジェニックマウス) を用いた放射線発がん高感受性マウスの開発. *広島医学*, 査読無, 2014, 67: 340-342
12. Shimura T, Hamada N, Sasatani M, Kamiya K, Kunugita N: Nuclear accumulation of cyclin D1 following long-term fractionated exposures to low-dose ionizing radiation in normal human diploid cells. *Cell cycle*, 査読有, 2014, 13: 1248-1255

[学会発表] (計 35 件)

1. Iizuka D, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K: Mammary microenvironment is important for the increase of stem cell frequency by radiation exposure,

- The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2017.2.21, Hiroshima
2. 笹谷めぐみ: *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がんの分子機構解明: 四国5大学連携女性研究者活躍推進シンポジウム 2016.11.18, 徳島
 3. 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 河合秀彦, 神谷研二: *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果, 日本放射線影響学会第59回大会, 2016.10.26, 広島
 4. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 神谷研二: 低線量被ばくによる乳腺幹細胞頻度の増加に關与する遺伝子群の同定, 日本放射線影響学会第59回大会, 2016.10.26, 広島
 5. 笹谷めぐみ, 神谷研二: *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がんにおける突然変異の解析, 第75回日本癌学会学術総会, 2016.10.8, 横浜
 6. 笹谷めぐみ: 化学発がんと放射線発がんにおける突然変異誘発機構, 変異機構研究会・第29回夏の学校, 2016.9.10, 京都
 7. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 神谷研二: 過酸化水素によるTGF- β を介した上皮間葉転換促進メカニズム, 第159回日本獣医学会, 2016.9.7, 藤沢
 8. 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 河合秀彦, 神谷研二: 遺伝的背景の異なる *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果, 第41回中国地区放射線影響研究会, 2016.7.26, 広島
 9. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 神谷研二: 放射線被ばくによる乳腺幹細胞への影響解析 低線量被ばくでの乳腺幹細胞頻度の増加には系統差が見られる, 第41回中国地区放射線影響研究会, 2016.7.26, 広島
 10. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺微小環境への影響を通じた放射線誘発乳がん研究, 第25回乳癌基礎研究会, 2016.7.23, 奈良
 11. 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 神谷研二: 放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた低線量放射線発がんリスク評価, 第57回原子爆弾後障害研究会, 2016.6.5, 長崎
 12. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 過酸化水素による TGF- β を介した EMT 促進現象とそのメカニズムについて. 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会(BMB2015), 2015.12.1, 神戸
 13. Sasatani M, Honda H, Masuda Y, Kamiya K: Chemical and radiation induced tumorigenesis using the high sensitive mice for tumorigenesis. 日本環境変異原学会第44回大会, 2015.11.27, 福岡
 14. 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 神谷研二: *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果. 第1回放射線ワークショップ「未来に繋ぐ放射線研究」, 2015.10.16, 富山
 15. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量被ばくで増加する乳腺幹細胞頻度の系統差とそのメカニズム. 第1回放射線ワークショップ「未来に繋ぐ放射線研究」, 2015.10.16, 富山
 16. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 放射線を受けた乳腺における幹細胞の動態は系統により異なる. 第158回日本獣医学会, 2015.9.7, 十和田
 17. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺幹細胞頻度増加の系統差. 第24回乳癌基礎研究会, 2015.9.5, いわき
 18. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺幹細胞頻度への影響解析. 第40回中国地区放射線影響研究会, 2015.7.17, 東広島
 19. 笹谷めぐみ, 李建祥, 徐衍賓, 飯塚大輔, 神谷研二: *Apc^{Min/+}*マウスにおける放射線誘発がんの機構解明. 第40回中国地区放射線影響研究会, 2015.7.17, 東広島
 20. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺への影響とそのメカニズムについて. 第56回原子爆弾後障害研究会, 2015.6.7, 広島
 21. 笹谷めぐみ, 徐衍賓, 河合秀彦, 飯塚大輔, 神谷研二: 放射線によるDNA損傷シグナル活性化におけるRAD18の寄与. 第56回原子爆弾後障害研究会, 2015.6.7, 広島
 22. Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L, Tateishi S, Li J, Iizuka D, Kamiya K: RAD18 Activates The G2/M Checkpoint Through DNA Damage Signaling to Maintain Genome Integrity By Ionizing Radiation. 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.26, Kyoto
 23. Sasatani M, Li J, Xu Y, Iizuka D, Kamiya K: The effect of dose rate on γ -radiationinduced tumor incidence in *Apc^{Min/+}* mice. The 5th International Symposium of RIRBM -Biological Effects of Low Dose Radiation, 2015.3.2, Hiroshima

24. Iizuka D, Sasatani M, Kamiya K: Radiation-induced upregulation of mammary stem cell frequency in BALB/c mice. The 5th International Symposium of RIRBM -Biological Effects of Low Dose Radiation, 2015.3.2, Hiroshima
25. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 神谷研二: BCR-ABL トランスジェニックマウスを用いた放射線発がんの分子機構解明. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 2014.10.1, 鹿児島
26. Xu Y, Sasatani M, Kawai H, Cao L, Iizuka D, Kamiya K: RAD 18 mediates DNA damage signaling to activate G2/M checkpoint for maintaining genome integrity after ionizing radiation exposure. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 2014.10.1, 鹿児島
27. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺幹細胞における低線量放射線被ばく影響解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 2014.10.1, 鹿児島
28. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, Barcellos-Hoff, M.H., 神谷研二: Radiation exposure increases mammary stem cell self-renewal in Balb/c mice. 60th Annual International Meeting Radiation Research Society, 2014.9.22, ラスベガス, アメリカ
29. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺幹細胞頻度から見た乳がんリスク評価の試み. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014.9.10, 札幌
30. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺幹細胞を用いた放射線誘発乳がんリスク評価の試み. 第 39 回中国地区放射線影響研究会, 2014.7.18, 広島
31. 徐 衍賓, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 飯塚大輔, 神谷研二: E3 ユビキチンライゲース RAD18 が放射線損傷応答におよぼす寄与. 第 55 回原子爆弾後障害研究会, 2014.6.1, 長崎
32. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 神谷研二: 白血病モデルマウスを用いた放射線発がんの分子機構解明. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013.10.19, 青森
33. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二: Bcr-Abl トランスジェニックマウスは、放射線誘発胸腺リンパ腫発症を促進させる. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013.10.5, 横浜
34. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 李建祥, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二: BCR-ABL トランスジェニックマウス

を用いた放射線発がん高感受性マウスの開発. 第 38 回中国地区放射線影響研究会, 2013.7.26, 広島

35. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二: 白血病モデルマウス (Bcr-Abl トランスジェニックマウス) を用いた放射線発がん高感受性マウスの開発. 第 54 回原子爆弾後障害研究会, 2013.6.2, 広島

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/bunshi12/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹谷 めぐみ (SASATANI MEGUMI)
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
 研究者番号: 80423052

(2) 研究分担者

飯塚 大輔 (IIZUKA DAISUKE)
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
 研究者番号: 00455388

(3) 研究分担者

神谷 研二 (KAMIYA KENJI)
 広島大学・医療政策室・特任教授
 研究者番号: 60116564
 (H25~H27 研究分担者)