

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340041

研究課題名(和文)放射線適応応答のメカニズムに関する研究

研究課題名(英文)Research on the mechanisms for radioadaptive response

研究代表者

根井 充(Nenoi, Mitsuru)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 人材育成センター・センター長(定常)

研究者番号：10164659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ICR 系統やC57BL系統の妊娠マウスを予め低線量放射線を照射しておくことにより、その後の高線量放射線によって生ずる胎児の発生異常の頻度は低下する。このいわゆる放射線適応応答の機構解明を目的として、放射線適応応答を発現する系統のマウス(ICR やC57BL)の人工受精卵を、発現しない系統(C3H)のメスの子宮に移植することによって得られる胎児、およびその逆の組み合わせで得られる胎児における放射線適応応答を調べ、マウス系統に依存した放射線適応応答因子の同定を試みた。その結果、系統に依存した放射線適応応答因子は母体に存在していること、特にEGFとbFGFが関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：When the pregnant mice of ICR strain and C57BL strain are exposed to low dose radiation, the fetuses transiently acquire a resistance against the following high dose radiation in regards to the frequency of malformation occurrence. In order to reveal the mechanisms for this so-called radioadaptive response (RAR), in vitro-fertilized eggs from donors of RAR-proficient mouse strains (ICR or C57BL) were transplanted into the recipient (surrogate) mothers of RAR-deficient strain (C3H), and induction of RAR in the fetuses was tested. Induction of RAR in the fetuses obtained from the reversed strain combination of the donor and the recipient was also tested. As a result, we revealed that the strain-dependent RAR factor existed in the body of the recipient mother mice, and that EGF and bFGF are the components of responsible maternal factors for the strain-dependent RAR.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線適応応答 マウス胎児 発生異常 系統差 受精卵移植 母体内因子

1. 研究開始当初の背景

放射線適応応答は、予め低線量放射線（前照射）を照射しておくことで、その後の中高線量放射線（本照射）に対する抵抗性を獲得する生体の防衛的反応であり、染色体異常、遺伝子突然変異、アポトーシス、細胞増殖、小核形成あるいは発がんや胎児における奇形発生等を指標にした実験系で観察されている。前照射の線量域が低線量に限られていることから低線量放射線に特有な生体応答現象であり、低線量放射線のリスク評価において重要な生体応答現象である。そのため各国で研究が進められており、特に機構研究においては日本が世界をリードしている。

我々はマウス胎児の死亡と四肢の奇形発生を指標とした放射線適応応答を発見し、その特徴を解析するとともに、p53 依存性を明らかにしてきた。平成 21 年～23 年度に実施した科学研究費補助金研究(基盤研究(C))「放射線適応応答の分子機構に関する研究」において、我々は前照射の処理後、マウス胎児において発現が変動している遺伝子を cDNA マイクロアレイによって解析し、特に細胞間・細胞内情報伝達および遺伝子転写応答に係わる遺伝子が有意に多く変動していることを明らかにした。また、我々はマウス胎児の放射線適応応答には系統差があり(表1) 系統間の交配で得られる雑種の放射線適応応答の性質は母マウスの系統によく似ていることを観察している(表2)。これらの結果から、マウス胎児の放射線適応応答は、母体由来の因子に依存している可能性を示唆している。

表1 同系統マウスの自然交配で得られた胎児における放射線(3.5Gy)誘発奇形頻度。3.5Gy本照射に先立って0.3Gyの前照射処理を施すことにより奇形発生頻度が低下している場合(印)、放射線適応応答が発現していると考えられる。

マウス系統	コントロール	本照射(3.5Gy)のみ	前照射(0.3Gy)+本照射(3.5Gy)
C57BL X C57BL	0%	28.8%	9.8% ()
C3H X C3H	0%	38.8%	41.8%
ICR X ICR	0%	25.4%	11.8% ()

表2 異系統マウスの自然交配で得られた胎児における放射線(3.5Gy)誘発奇形頻度(メス系統 X オス系統)。3.5Gy本照射に先立って0.3Gyの前照射処理を施すことにより奇形発生頻度が低下している場合(印)、放射線適応応答が発現していると考えられる。

マウス系統	コントロール	本照射(3.5Gy)のみ	前照射(0.3Gy)+本照射(3.5Gy)
C57BL X C3H	0%	41.0%	22.5% ()
C3H X C57BL	0%	46.0%	50.3%

2. 研究の目的

本研究は、マウス胎児の放射線適応応答における母体環境因子の関与を明らかにすることを目的として、マウス胎児の放射線適応応答を発現する系統(ICR および C57BL)の受精卵を発現しない系統(C3H)の雌の子宮に移植することによって得られる胎児、およびその逆の組み合わせで得られる胎児における放射線適応応答を調べる。

3. 研究の方法

放射線適応応答の見られないC3H 系統オスマウス 10 匹から精子、メスマウス 100 匹から卵子を採取し、試験管内で受精させる。受精卵を同じC3H 系統受容体および放射線適応応答の見られる ICR (または C57BL) 系統受容体へ移植し(受精卵 12 個/匹)、仮腹で胎児を発生させる。発生した胎児における放射線適応応答を評価し(n>20)、ICR (または C57BL) 系統マウスの母体由来因子の影響を調べる。(図1)。

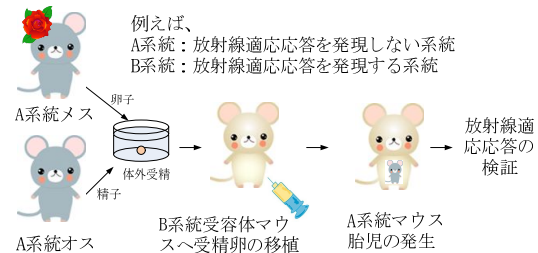


図1. 研究方法の概要。放射線適応応答を発現するA系統のマウスから人工授精で作製した受精卵を、放射線適応応答を発現しないB系統メスマウスに移植して胎児を得て、その胎児における放射線適応応答の発現性を評価する。

一方、コントロールとしてC3H 系統マウスの受精卵を同じC3H 系統受容体へ移植し、同様に胎児における放射線適応応答を評価する。更に逆の組み合わせ、即ち ICR (または C57BL) 系統マウスの受精卵を C3H 系統受容体に移植し、胎児の放射線適応応答を評価するとともに、コントロールとして ICR (または C57BL) 系統マウスの受精卵を同系統受容体へ移植し、胎児における放射線適応応答を評価する。

以上の実験の結果、マウス胎児の放射線適応応答における母体由来因子の関与が明らかとなった場合には、既に構築している胎児マウス指趾原基細胞培養系(Wang, et al., Radiat. Res., 161, 9-16, 2004.)を用い、インビトロで母体由来血清成分の放射線適応応答修飾作用を調べ、放射線適応応答に機能する因子を明らかにする。

4. 研究成果

放射線適応応答を発現する ICR および C57BL 系統マウスの受精卵を、放射線適応応答を発現しないC3H 系統マウスの受容体(仮腹)の子宮に移植することにより得られた胎児、およびその逆の組み合わせで得られた胎児における放射線適応応答の応答性を調べた結果、人工授精で得られたC3H 系統マウス受精卵を同じC3H 系統マウス受容体を仮腹とした場合には放射線適応応答が誘導されなかった一方、ICR 系統受容体を仮腹とした場合には放射線適応応答が認められた。そして人工授精で得られた ICR 系統マウス受精卵を

同じ ICR 系統マウス受容体を仮腹とした場合には、ICR マウスの自然交配で発生させた場合と同様に放射線適応応答が誘導された一方、C3H 系統受容体を仮腹とした場合には放射線適応応答が認められなかった(表3)。

表3 人工授精で作製された受精卵をメス受容体(仮腹)に移植することによって得られた胎児における放射線(3.5Gy)誘発奇形頻度(受精卵由来系統メスマウス系統)。3.5Gy本照射に先立って0.3Gyの前照射処理を施すことにより奇形発生頻度が低下している場合(印)、放射線適応応答が発現していると考えられる。

マウス系統		コントロール	本照射(3.5Gy)のみ	前照射(0.3Gy)+本照射(3.5Gy)
ICR	ICR	0%	48.1%	19.4% ()
C3H	C3H	0%	95.6%	100%
C3H	ICR	10.8%	91.7%	67.0% ()
C57BL	C3H	0%	83.1%	93.1%

以上の結果から、胎児マウスにおける放射線適応応答は、受容体マウス(母体)の系統の性質を引き継いでいることが明らかとなった。

放射線適応応答の系統差を司る母体内因子を探索するため血清成分を解析した結果、増殖因子のEGFとbFGFの活性が放射線適応応答が有するC57BL系統においては放射線適応応答が有しないC3H系統より著しく高いことを見出した。

これら増殖因子の放射線適応応答への関与を、これまで我々が開発してきた胎児マウス指趾原基細胞培養系を用いてインビトロで調べた。その結果、C57BL由来の指趾原基細胞をC3H由来血清存在下で培養した時には適応応答が観察されなかった一方、C3H由来の指趾原基細胞をC57BL由来血清存在下で培養した時には適応応答が観察された。そして更に、C3H由来指趾原基細胞培養にEGFもしくはbFGFを添加することによって、放射線適応応答が観察された。以上の結果から、EGFとbFGFは放射線適応応答に機能する母体内因子であることを明らかにした。

すなわちマウス胎児の放射線適応応答には母体由来のエピジェネティックな因子が機能的に関与していると結論された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Nenoi M, Wang B, Vares G. *In vivo* radioadaptive response: a review of studies relevant to radiation-induced cancer risk. *Human and Experimental Toxicology*(査読有). 34, 272-83 (2015) doi: 10.1177/0960327114537537

Wang B(1番目)、Nenoi M(16番目)、他. Total body 100-mGy X-irradiation does not induce Alzheimer's disease-like pathogenesis and memory impairment in mice. *Journal of Radiation Research* (査読有). 55, 84-96 (2014) doi: 10.1093/jrr/rrt096. Wang B(1番目)、Nenoi M(15番目)

他. Low-Dose Total Body Carbon-Ion Irradiations Induce Early Transcriptional Alteration without Late Alzheimer's Disease-Like Pathogenesis and Memory Impairment in Mice. *Journal of Neuroscience Research* (査読有). 92, 915-926 (2014). doi: 10.1002/jnr.23363

二宮康晴、王冰、根井充. 活性酸素種と抗酸化能の観点からの放射線適応応答の考察. *放射線生物研究*(査読有), 49, 396-409 (2014)

[学会発表](計8件)

Wang B、他. Reduction of High-dose-radiation-induced Delayed Genotoxic Effects by Radioadaptive Response and Mild Diet Restriction in Mice. *International Congress of Radiation Research, Kyoto, 2015.5.* Tanaka K、他. Study on Heavy-ion-irradiation-induced Adaptive Response in Mice. *International Congress of Radiation Research, Kyoto, 2015.5.*

根井充、他. 低線量率放射線長期被ばく下での放射線抵抗性獲得に関する考察. *日本放射線影響学会第57回大会*. 鹿児島、2014.10.

田中薫、他. 重粒子線誘発マウス適応応答の機構研究(予備的研究). *日本放射線影響学会第57回大会*. 鹿児島、2014.10.

Nenoi M、他. Transcription factors potentially involved in gene regulation after long-term, low dose-rate irradiation. *The 3rd Asian Congress of Radiation Research, Beijing, 2013.5.*

Wang B、他. Failed verification of Alzheimer's disease-like alterations in mouse brain after exposure to low dose radiation. *The 3rd Asian Congress of Radiation Research, Beijing, 2013.5.*

Tanaka K、他. Induction of adaptive response (Yonezawa Effect) by combination of irradiations with different LET values in mice. *The 3rd Asian Congress of Radiation Research, Beijing, 2013.5.*

田中薫、他. 胎児・成体マウスにおける放射線誘発適応応答は重粒子線にも当て嵌まるか? VI. 成体マウスを用いた実験結果のまとめ(PartII). *日本放射線影響学会第56回大会*、青森、2013.10.

[図書](計0件)

[産業財産権] 出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

根井 充 (NENOI Mitsuru)

量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所人材育成センター・センター長

研究者番号：10164659

(2)研究分担者

王冰 (WANG Bing)

量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所放射線影響研究部・チームリーダー

研究者番号：10300914

塚本智史 (TSUKAMOTO Satoshi)

量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所技術安全部・主任研究員

研究者番号：80510693