

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：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550036

研究課題名(和文) 低線量放射線発がんリスク個人差解明のための遺伝的乳がん感受性ラットの開発

研究課題名(英文) Development of novel breast cancer model for understanding individual susceptibility to low dose radiation

研究代表者

今岡 達彦 (Imaoka, Tatsuhiko)

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 放射線影響研究部・チームリーダー(定常)

研究者番号：40356134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性乳がん・卵巣がん症候群(HBOC)の保因について、疫学的には、低線量放射線被ばくに関連した高い乳がんリスクがあるという報告とないという報告がある。その生物学的な妥当性を解明するために有用な動物モデルの作製を目指し、放射線誘発乳がんモデルに使われるラットに、ゲノム編集技術を用いてHBOC原因遺伝子変異を導入した。その結果、ヒトで高頻度に見られるものに対応する変異を導入したラット系統の樹立に、初めて成功した。放射線照射実験を行ったところ、線量に依存した乳がんの発生が観察されたが、研究期間終了時点において、がんの発生頻度は変異体と野生型との間で異ならず、今後注意深く検討すべきことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is a controversy about the high risk of breast cancer associating with low dose radiation exposure in female carriers of hereditary breast and ovarian cancer syndrome. The Sprague-Dawley rat is a strain which has been widely used as an animal model of radiation-induced breast carcinogenesis. The present project aims to develop a rat model of the syndrome, with which to clarify this controversy from a biological viewpoint. The project used a genome editing technique and has successfully established a strain harboring a deleterious mutation equivalent to one which is frequently found in human population. When the rats were irradiated with gamma rays and observed for palpable mammary carcinoma, there was a dose-dependent increase in its incidence. At the moment of the project termination, the incidence of mammary cancer was similar between the mutant and wild-type animals, suggesting that the animals should be followed up further.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発がん 低線量 遺伝子改変ラット

1. 研究開始当初の背景

(1) 低線量放射線の発がんリスクは、ヒト集団における線量効果関係と、その直線性を支持する生物学的メカニズムの両者に基づき、現時点で科学的に妥当と考えられる「直線しきい値なし理論」によって評価されている(文献)。しかし原爆被爆者等の古典的疫学研究において 100mGy 以下のリスクは確認されていない。

(2) 他方、放射線リスクには、特別の考慮が必要なほどの大きな個人差がある可能性がある。実際、ハイリスク集団(小児や遺伝的感受性保因者)の医療放射線被ばくに関連する大規模調査が進行しており、数十 mGy 以下の被ばくに有意ながんリスクが確認されたとする報告も出始めている(文献)。疫学には不確実な線量評価やバイアス等の限界が伴うため、この結果が生物学的に妥当であるかを実証する研究が必要とされている。

(3) その観点から注目されるハイリスク集団の一つに、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群(HBOC)保因者がある。これまで HBOC において数十 mGy 程度の医療放射線に高い乳がんリスク(4 倍程度)があるとする報告と検出できないとする報告があり、決着を見ていない(文献等)。

(4) 申請者は主にラット乳がんモデルを用いて、小児期の被ばくによる発がんのリスク評価及びメカニズム解明に取り組み、小児期の線被ばくによる乳がんリスクは成体期のそれと同等であって古典的疫学の結果が支持されること等を明らかにしてきた(文献)。一方、近年では遺伝子改変ラットの作製技術が進展し、HBOC モデルラットモデルの作製が現実的になっている。

<引用文献>

- ICRP, 2005. Low-dose Extrapolation of Radiation-related Cancer Risk. ICRP Publication 99. Ann. ICRP 35 (4).
- Pearce et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. Lancet 380: 499-505, 2012
- Mathews et al. Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. BMJ 346: f2360, 2013
- Pijpe et al. Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of BRCA1/2 mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). BMJ 345: e5660, 2012
- John et al. Diagnostic chest X-rays and

breast cancer risk before age 50 years for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 22(9): 1547-1556, 2013

Imaoka et al. Pre- and postpubertal irradiation induces mammary cancers with distinct expression of hormone receptors, ErbB ligands, and developmental genes in rats. Mol Carcinog 50: 539-552, 2011

Imaoka et al. Influence of age on the relative biological effectiveness of carbon ion radiation for induction of rat mammary carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 85: 1134-1140, 2013

2. 研究の目的

HBOC 原因遺伝子変異導入ラットを作製し、放射線に関連する表現型を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 放射線誘発乳がんモデルとして用いられている Sprague-Dawley ラットを用い、HBOC 原因遺伝子に変異を導入する。そのため、ガイド RNA 及び単鎖オリゴデオキシヌクレオチドを合成し、受精卵にインジェクションして里親の子宮内に移植する。出産されたラットにおける変異の導入を PCR とシーケンシングにより確認する。変異導入に成功した個体が確認されたら、野生型ラットと交配して個体数を増やす。

(2) 若齢期(約 7 週齢)で Cs-137 線源からの線を外部照射し、急性及び長期経過(体重、全身状態、触知可能な乳腺腫瘍発生)及び解剖時所見を調べる。腫瘍のゲノム DNA を PCR 増幅断片長によって調べることで、原因遺伝子のヘテロ接合性を検査する。

(3) ヘテロ接合体同士の交配を行い、産子の遺伝子型を判定することで、ホモ接合体が胎生致死になるかどうかを推定する。

4. 研究成果

(1) 研究代表者、研究分担者、連携研究者によって標的遺伝子の変異方式を決定した。日本人の HBOC 創始者変異の一つと報告されているものと類似の変異を導入することとした。研究分担者において CRISPR/Cas システムを用いて標的遺伝子に変異を導入したラットを作製した。PCR 産物のダイレクトシーケンシングにより、目的外のタイプの変異を含めた 3 もしくは 4 種類の変異を有する個体を 4 匹作製できたことを確認した。これらを研究代表者の施設へ導入し、衛生検査の後、野生型ラットとの繁殖を開始した。

(2) 導入した 4 匹のラットから DNA 試料を採取し、PCR によって標的遺伝子近傍を増幅して、クローニングした DNA の塩基配列解析に

よって変異配列を決定した。その結果、3種のヘテロ接合性変異体ができていることを確認した。目的外の変異についても、ヒトで見られるタイプとの類似性があること等から、当面は系統を維持することとした。これら3種の変異をPCRによって判別する簡便法を確立し(図1)野生型ラットと交配して、3系統についてF1個体を得た。これを元に野生型ラットとの交配による系統維持を継続した。1系統について凍結胚等の保存を行った。

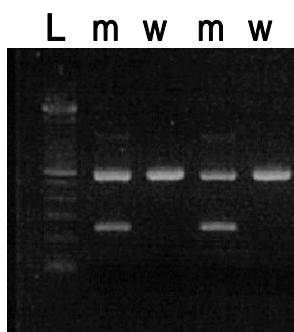


図1. PCRによる変異個体のタイピング。
L: 100塩基対ラダー
m: 変異個体
w: 野生型個体。
上のバンド: PCR反応の陽性対照
下のバンド: 変異アリル特異的な増幅産物

(3) 発がん実験に必要な変異体及び野生型個体の繁殖を行い、順次、放射線照射を行って発がん実験をセットアップした。最も低い線量の群は、使用している照射装置で線量の信頼性が確保できる0.1Gyとした。変異体、野生型ともに2Gy以下では急性の致死等の影響は見られなかった。体重、全身状態の他、皮膚上から触知できる腫瘍の記録と、生検による悪性度の診断、悪性所見の見られた個体の病理解剖を行った。0.1~2Gy照射群で、野生型、変異体ともに、放射線照射によって線量依存的に乳がんが誘発される傾向が見られている(図2)。

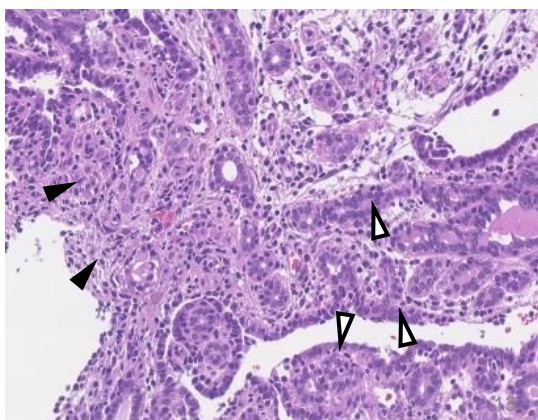


図2. 変異体に発生した乳がんの病理像の一

例。白色矢印は上皮細胞(がん細胞)、黒色矢印は間質の領域。

変異体において野生型と比較して乳がんの発生が早まる傾向は見られていない。卵巣では非腫瘍性の病的所見があった。

(4) 発がん実験の観察項目には、皮膚上から触知できる腫瘍の記録(週1回)の他に、生検による組織の悪性度の診断を追加し、当初計画よりも腫瘍の診断結果及び検体を早期に得られるよう工夫を加えた。得られた腫瘍の一部について、病理形態及び標的遺伝子の状態の解析を行ったところ、病理形態的にはがん以外の間質等の細胞の混入が相当程度見られ、そのため標的遺伝子の状態を精度良く解析できないことが判明した。

(5) がん細胞を濃縮する工夫と、標的遺伝子の変異を定量的に測定する系が必要であると判断し、まず変異DNAと野生型DNAの比を定量できるPCR制限酵素断片長法を構築した(図3)。

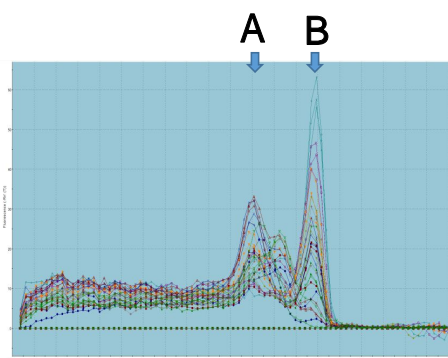


図3. PCR制限酵素断片長の構築。PCR増幅産物を制限酵素処理し、断片の融解曲線分析を行うことにより、変異アリルと野生型アリルを定量できる。

A: 変異アリル特異的な制限酵素断片。
B: 野生型アリル特異的な制限酵素断片。

一部の腫瘍検体のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本から、レーザーマイクロダイクセクション法を用いて、がん細胞のみを間質が混入しないように採取し、DNAを抽出し、標的遺伝子の状態解析(ヘテロ接合性の変化の解析)を行ったが、正常組織とがん細胞の間に相違は検出されなかった。

(6) 変異に伴う全身の異常の有無を若齢個体の病理解剖によって探索したが、異常は確認されなかった。

(7) ヘテロ接合体同士の交配による産子のタイピングを行ったところ、変異遺伝子のホモ接合体は胎生致死であることが推定され

た。

(8) 以上の結果は、HBOC 原因遺伝子にヒトで見られるタイプの変異を導入したラットモデルでは、自然の発がん、放射線誘発がんともに、野生型と変わらないことを示している。本研究では Sprague-Dawley 背景系統での 7 週齢照射によるがん発生を調べた。今後は、異なる週齢、異なる発がん処理、異なる背景系統でのがん発生を調べる必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、高畠賢、西村由希子、蒲地雄大、森山ひとみ、鶴岡千鶴、柿沼志津子、島田義也、放射線被ばくと BRCA 変異保因者の乳がんリスク、乳癌基礎研究、査読有、24 巻、2016、7-15

〔学会発表〕(計 2 件)

今岡達彦、西村まゆみ、臺野和広、西村由希子、高畠賢、森岡孝満、柿沼志津子、島田義也、遺伝子発現マイクロアレイによるラット乳がんの分類の試み、第 25 回乳癌基礎研究会、2016 年 7 月 23 日～2016 年 7 月 24 日、市立奈良病院(奈良県奈良市)

西村由希子、今岡達彦、高畠賢、臺野和広、森岡孝満、西村まゆみ、横田拓実、太田原雅美、柿沼志津子、島田義也、多様な誘発方法でのラット乳がんを用いた免疫染色によるサブタイピング法の検討、第 25 回乳癌基礎研究会、2016 年 7 月 23 日～2016 年 7 月 24 日、市立奈良病院(奈良県奈良市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今岡 達彦 (IMAOKA, Tatsuhiko)

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 放射線影響研究部・チームリーダー (定常)

研究者番号 : 4 0 3 5 6 1 3 4

(2) 研究分担者

真下 知士 (MASHIMO, Tomoji)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 8 0 3 9 7 5 5 4

(3) 連携研究者

新井 正美 (ARAI, Masami)

公益財団法人がん研究会有明病院・遺伝子診療部・部長

研究者番号 : 2 0 2 3 2 0 2 7

臺野 和広 (DAINO, Kazuhiro)

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 放射線影響研究部・主任研究員 (定常)

研究者番号 : 9 0 5 4 3 2 9 9

森岡 孝満 (MORIOKA, Takamitsu)

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 放射線影響研究部・主幹研究員 (定常)

研究者番号 : 7 0 2 5 3 9 6 1