

放射線発がんにおける非遺伝子変異的プロセスの解明

(受託者)独立行政法人放射線医学総合研究所

(研究代表者)今岡達彦 放射線防護研究センター

(研究開発期間)平成21年度～22年度

1. 研究開発の背景とねらい

本事業は、放射線発がんの機序に関する新たな知見の取得を通して、放射線防護や放射線安全の向上に資することを目的とするものである。

放射線防護において悪性腫瘍（がん）の誘発リスクは、疫学調査で明らかな中高線量での影響を基に、しきい値のない直線モデルによって演繹的に評価されている。しかし、そのリスクが実在するか否かは明らかでない。このモデルは、放射線がDNAに発生させる最初期の異常である二重鎖切断やそれに起因する遺伝子突然変異の頻度が中高線量から低線量域まで線量に比例するという観察事実によって支持されるほか、腫瘍形成における放射線の主要な役割が遺伝情報への突然変異誘発以外にないことも前提としている。実際には、放射線発がんに関係するかもしれないその他の様々な生物学的作用（適応応答、バイスタンダー効果、ゲノム不安定性誘導など）が知られ、「エピジェネティックな影響」と総称される。しかしその多くは培養細胞レベルの実験観察に依拠しており、個体レベルの証拠が十分でない。

「エピジェネティック」とは、DNAの遺伝的情報の変異を思わせるが実際にはそれでは説明のつかない現象に用いられた言葉で、その後、DNAのメチル化という化学修飾が重要な機序であることが判明した。腫瘍細胞においてもDNAの異常なメチル化が多く見られ、その一部は腫瘍形成の積極的な原因を構成すると考えられている。腫瘍の形成過程は多段階であり、がん化した細胞の死滅や、がん化した細胞の周囲正常組織（これを「組織微小環境」と呼ぶ。）による増殖抑制、浸潤抑制等の数段階の防御機構が、遺伝子変異やDNAメチル化異常によりすべて機能しなくなると、臨床的な腫瘍が形成される。

本事業では、正常な組織微小環境が腫瘍形成を抑制する現象に着目し、この機構を放射線が阻害するかどうかを、個体レベルの実験により検討する。具体的には、腫瘍から取り出した細胞を実験的に正常な組織微小環境中に置くと腫瘍形成が抑制されるという実験モデルを用いる。ここで腫瘍細胞中の遺伝的変異はエピジェネティックに抑制されているが、これがDNAメチル化に関連するかどうかは不明であるため、これを検討する。また、放射線を照射された組織微小環境が腫瘍形成に促進的であることを示す報告はごく少数しかないので、この実験モデルを用いて同様に検討する。

2. 研究開発成果

(F344×LEW)F₁ラットの乳腺上皮組織を外科的に除去して移植部位（乳腺の組織微小環境）を作製した。同時に、LEW系統ラットに発がん剤1-メチル-1-ニトロソ尿素を投与して乳腺に悪性腫瘍（乳がん）を誘発し、単一細胞に分散して、一定数を正常な(F344×LEW)F₁ラットの組織微小環境に移植した。これを継続飼育し、約90日後に解剖して、移植部位の標本作製して実体顕微鏡で観察したところ、腫瘍細胞を移植したにもかかわらず、腫瘍ではない網目状の乳管状の組織が発生した。発生した組織の病理標本作製して光学顕微鏡で観察すると、正常組織と腫瘍組織の中間の微細形態を示した。またこの非腫瘍化された組織のDNAを解析すると、1-メチル-1-ニトロ

ソ尿素の作用に特徴的な腫瘍性の遺伝子変異が認められた。これらの結果から、正常な組織微小環境中に移植された腫瘍細胞は、遺伝子変異を有しながらも、その遺伝形質がある程度抑制されて非腫瘍化することがわかった。

次に、DNA上のメチル化の生じる部位の配列を多数（約9万プローブ）搭載したマイクロアレイを使用して、乳腺の正常組織、腫瘍組織及び非腫瘍化組織から抽出したDNAを解析した。正常組織と比較して腫瘍において高メチル化あるいは低メチル化を示したDNA領域はそれぞれ数百ずつあったが、非腫瘍化組織においても乳がんと同様の変化を保ったままのDNA領域はその一部のみであり、多くの領域は非腫瘍化組織においては正常組織に近い状態になっていた。この結果から、組織微小環境中での非腫瘍化に伴って一部のDNA領域のメチル化状態が変化することがわかった。

さらに(F344×LEW)F₁ラットを2群に分け、一方は非照射のままおき、他方にガンマ線4Gyを全身照射した後、上記と同様に腫瘍細胞を移植して、約90日後の移植部位の標本を観察した。すると、非照射群と照射群の間で非腫瘍化組織の現れる頻度に顕著な差は見られなかった。すなわち(F344×LEW)F₁ラットにおいては、ガンマ線4Gyを照射された組織微小環境は、照射されない組織微小環境と同程度の腫瘍形成抑制能を示した。

以上の結果から得られた知見を総合すると、本研究では、組織微小環境が腫瘍形成を抑制する能力を示すことを確認し、それがエピジェネティックな機構（具体的にはDNAのメチル化）によるものであることを示唆する知見を得た。また、個体レベルにおいて放射線が組織微小環境に影響して腫瘍形成を促進する少数の報告があったが、本研究の実験系においてこのような作用は観察されず、その現象は必ずしも一般的でないという知見を得た。

3. 今後の展望

組織微小環境がDNAメチル化状態の変動を伴うエピジェネティックな機構によって腫瘍形成を抑制することを示す証拠を得たことは、個体レベルで放射線のエピジェネティックな影響を探索する上での貴重な実験モデルを提供するものであり、将来の研究の発展に直結する。実際、本事業の結果を受け、別の系統で同様の実験を実施したところ、移植部位に同様の非腫瘍化が見られたほか、放射線照射した個体の組織微小環境からは触知可能な腫瘍が形成されやすいという途中結果が得られている。この系統を使用すれば、本委託業務内では見出せなかったエピジェネティックな放射線発がん機構を個体レベルで示せる可能性があり、今後はその可能性を確認することを主軸とした展開を考えている。すなわち、まず中高線量域の放射線を用いて、エピジェネティックな機構による放射線の腫瘍形成促進作用を検討し、その結果に基づいて、この作用の大きさが放射線の量に伴ってどのような変動を示すかを検討することが肝要であると考える。

現在、エピジェネティックな発がん機構が個体の放射線発がんにどの程度関わっているかについての情報は、非常に少ない。今後、この一連の研究を推進することで、放射線防護体系の精緻化・正当化に必要な情報の蓄積に貢献していきたい。