

2016 年度 国際交流助成（海外渡航） 報告書

Low Dose Radiation Induced Risk and Bystander Signaling in Stem Cells

福永 久典

現所属：

Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast

申請時所属：

東北大学病院 加齢核医学科/東北大学加齢医学研究所 機能画像医学研究分野

2017 年 5 月提出

【はじめに】

低線量の放射線による健康影響は、福島における原子力災害発生直後から最も懸念され、今もなお一部地域での住民の帰還を妨げている。広島、長崎の被ばく者の疫学データから、積算される実効線量が「100mSv」以下であれば発がんによる死亡率の明確な上昇は見られないことは、ICRP はじめ国内・外の諸研究機関の共通見解であるが、低線量放射線被ばく者の健康リスクについては未だ不明な点も多い。広島、長崎の原爆被ばく者に対する疫学調査に基づいた従来の放射線発がんリスクの推定には科学的限界があり、とくに低線量域でのリスク評価は困難で、結果として住民の不安を完全に払拭するには至っていない。こと生殖幹細胞への放射線被ばく影響に至っては、1980年代における英国のSellafield原子力発電所に関する疫学的研究や動物実験の結果から次世代以降への放射線影響伝播の可能性が示唆されてきたにも関わらず、これまで科学的な検証が乏しかったという点に見逃せない問題があるといえる。

これまで申請者は、2011年東日本大震災及び福島第一原子力発電所事故後から福島県相馬市の公立相馬総合病院において被災地医療に従事し、被災地における精神科医療の問題に直面してきた。とくに原発事故による低線量放射線被ばくに伴う健康リスクに直面した患者や家族が抱える「本当に私たちは大丈夫なのか」という苦悩に接し、医療人としてその解決になんとか貢献したいと願いながら、放射線感受性の個人差に着目した放射線医科学研究に取り組んできた(Fukunaga et al. 2016; Fukunaga & Yokoya 2016)。

しかし、このような患者や家族の苦悩を解決するためには、放射線感受性の個人差を規定する遺伝的バックグラウンドに関する臨床遺伝学・疫学的アプローチだけでなく、発癌や次世代への影響につながる放射線誘導バイスタンダー効果や遺伝的不安定性など低線量放射線生物学的課題の解明も重要である。そこで、放射線研究コミュニティとして世界最大規模である Radiation Research Society で副会長を務める放射線生物学の大家 Prof. Kevin M. Prise に師事し、最先端の低線量放射線生物学研究を修めるため、申請者は2016年9月英国クイーンズ大学ベルファスト大学院医学博士課程へ進学した。Prof. Prise 率いるクイーンズ大学ベルファスト放射線生物学グループが低線量放射線被ばく影響の検討を可能とする世界屈指の放射線照射設備を有していることも重要であった。

また、共同研究者の横浜市立大学・小川毅彦教授率いる研究グループは、2011年に *in vitro* 精子形成を可能とする世界初の精巣器官培養法の確立し(Sato et al. 2011)、以降、器官培養法の改良を進めてきた。そして、申請者が希望していた「雄性生殖細胞への低線量放射線被ばくによる次世代影響の有無」を検討できる実験系「ライブ・ティッシュ・イメージング」を提供することが技術的に可能であった。それぞれの研究活動を背景として、我々が力を合わせることで「生殖細胞への低線量放射線被ばく影響の検討」が可能であると考えられ、申請者を含む Prise グループと小川グループは、現在、日英国際共同研究活動を展開するに至っている。そして、本研究はその中心課題となっている。

【研究目的】

本研究は精巣器官培養法を用いた「ライブ・ティッシュ・イメージング」によって、精子形成に影響を及ぼしうる放射線誘導バイスタンダーシグナリングの解明、並びに、低線量放射線照射による影響が生殖幹細胞のエピジェネティックな変化を介して次世代伝播機序の解明を目的とする。

【これまでの背景】

2011年福島原子力災害によって懸念される健康影響の一つとして、「次世代への放射線被ばく影響伝播の有無」は見逃せない。第二次世界大戦以降の広島、長崎のHIBAKUSHA疫学研究から、我が国では親世代の放射線被ばく影響が子孫に継承される可能性は否定されてきた(Yoshimoto et al. 1990; Izumi et al. 2003)。しかしながら、1980年から1990年代にかけて英国Sellafield原子力施設で働く親を持つ子どもの白血病などの有病率がコントロール群と比較して有意に高い疫学的結果も報告されており(Gardner et al. 1990; Draper et al. 1993)、ヒトにおける放射線被ばく影響の次世代伝播の有無は今でも議論の余地がある。

実験動物を用いた先行研究に1970年代に行われた『メガマウスプロジェクト』がある(Russell & Kelly 1982)。700万匹以上のマウスを用いて精巣への放射線照射による次世代突然変異誘発率が検討され、「約3 Gy (300 R)で突然変異誘発率が僅かに上昇する」と報告されている。この報告から、精子形成細胞へ放射線被ばく影響があったとしても次世代として実際に生まれてくるまでの過程で淘汰が厳重で、最終的に生まれてくる子孫たちは正常なゲノムを有するのではないかと永く考えられてきた。しかし、2000年に「雄親(F0世代)に0.5 Gyの放射線全身照射した後に産まれたF1世代のマウスは遺伝的不安定性を持つ可能性が有意に上昇する」という報告がNatureに掲載され(Dubrova et al. 2000)、その後他の動物研究でも生殖細胞への放射線照射による次世代影響への伝播が報告されてきた。これにはDNA配列の異常だけでなく、DNAメチル化やmicro RNAの発現スペクトル変化などのエピジェネティックな機序も関与すると考えられている(Paris et al. 2015)。

また、福島原子力災害の有する特徴の一つには「低線量放射線被ばく」が挙げられる。放射線生物学的観点において、低線量の放射線あるいは低線量率の放射線による被ばく影響の最大の特徴は「その不均一な線量分布」にある。たとえば、生涯発がんリスクを考える際の一つの目安とされている100 mGy以上の高線量域においては、照射範囲内のほとんど全ての細胞を放射線のトラックが1回以上通過する(ヒットする)と確率的にみなされるが、低線量域では放射線がヒットする細胞は全体の一部のみに留まることになる。すなわち、照射範囲内において「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」という状況が生じうる。そして、このような不均一な線量分布が生じる低線量域では、高線量域のように線量依存的に生物学的影響を推定することが出来ない。1992年Nagasawaらは、ごく少数の α 粒子を培養細胞系に照射したところ、放

射線がヒットしていないはずの細胞にまでもヒットした細胞と同様な放射線被ばく影響がみとめられることを報告した(Nagasawa & Little 1992). この現象は「放射線誘導バイスタンダー効果 (RIBE)」と今日では呼ばれるが、その効果の大小は線量依存的ではなく、むしろ照射した細胞や溶媒の種類に依存している。すなわち、RIBE は「放射線のヒットを直接受けた細胞から何らかのシグナルが周囲に放出され、そのシグナルを周囲細胞 (バイスタンダー細胞) が受け取ることで誘発される」と考えられている (Fig. 1). このことは、今日、福島現事故被災地でみられる低線量の環境放射線による生物学的影響を正確に評価することをより困難なものにしている。

2011年、前述の通り、横浜市立大学小川毅彦教授らの研究グループによって、「マウス精巣を用いた器官培養法を応用する形で、精子幹細胞から生殖能のある精子の形成まで誘導を可能とする *in vitro* 実験系が世界で初めて開発」された。そして、この *in vitro* 精子形成系を用いることによって、マウス生体内環境 (*in vivo*) を模擬した器官培養上の精巣組織 (*ex vivo*) に対して低線量あるいはマイクロビームを用いた精密かつ局所的な X 線照射を行うことによって、これまで実現不可能だった雄性生殖細胞の低線量放射線被ばく応答をリアルタイムで顕微鏡下に観察することが出来ると考えられた。

雄性生殖細胞の低線量放射線被ばく影響について、このようにリアルタイムかつ高精度に観察、検討する研究はこれまで国内外に存在しないことから、本研究は世界に先駆けて新しい知見を見出せる可能性は高いと思われる。さらに、精子形成の進行過程を蛍光標識で観察可能なことから、従来までの実験動物個体レベルでの検証よりも、理論的にはより精密かつ詳細な検討が出来ると期待される。

【方法】

マウス精巣組織を用いた器官培養法において精子幹細胞から精子産生までの完全な精子形成を誘導維持できるのが我々の実験系の長所である。

さらに、精子形成の進行を精度よく判定するために精子形成細胞特異的かつ精子形成の進展に合わせてマーカー遺伝子を発現するトランスジェニックマウス *Acr-GFP Tg* を用いる。このマウスは減数分裂中期 (パキテン期中期) から細胞質に GFP を発現する。この GFP は減数分裂終了時にはアクロソームに集

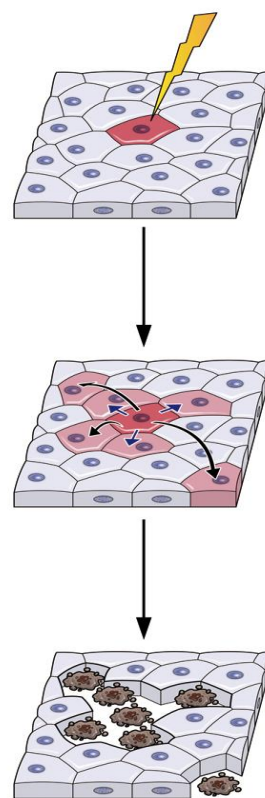


Fig. 1. Radiation induced bystander effect. (Fukunaga et al. in press)

簇し、その帽子様の形態から同定が可能となることから、円形精子細胞から伸長精子細胞に至る精子完成の過程を追うことが可能である (Fig. 2).

この実験系を用いて、申請者らは、まず、生体内の精子形成に対する既知の放射線被ばく影響を再現できるかどうかを検討した。具体的には、生殖腺に対する確定的影響として知られる一時不妊と永久不妊の再現を試みた。

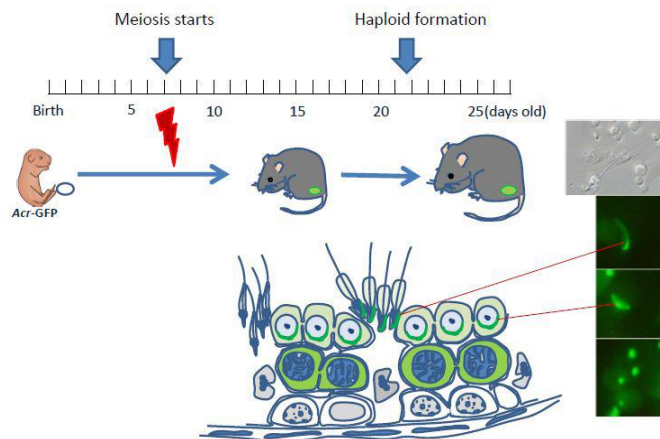


Fig. 2. *Acr-GFP Tg Mice* and study design.

【結果と考察】

Fig. 3 は、生後 5~8 日の *Acr-GFP* マウスから摘出した精巣組織片に対して 0~5 Gy の X 線を照射し、32 日間培養した後の GFP 発現の結果である。

0~1 Gy の間では、GFP 発現強度はやや低下するものの、GFP 発現部の面積は肉眼レベルでは明らかな変化を指摘できなかった。一方で、1~5 Gy においては、線量依存的に GFP 発現の面積が低下した。ここで GFP 発現が精子形成細胞の減数分裂への分化進行を示していることから、1~5 Gy では線量依存的に減数分裂まで進行する精子幹細胞の数が減少すると考えられる。このように「精子形成細胞そのものが減少する」現象は、臨床的には永久不妊と似た病態を示すものと考えられた。

また、Fig. 4 は 0 Gy (Control) と 1Gy を照射した精巣組織片のそれぞれの GFP 発現の進行過程を掲示的に追跡したものである。

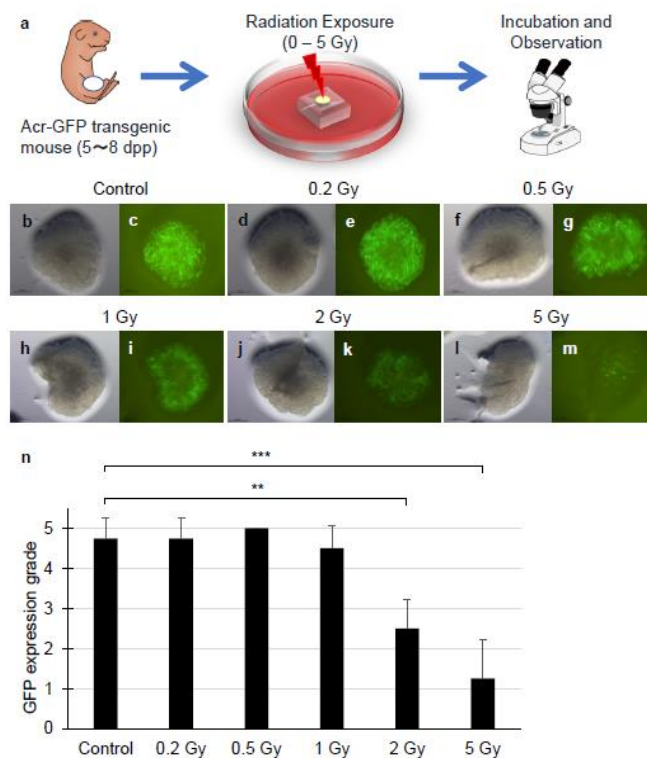


Fig. 3. GFP expressions of testis tissues after exposure to radiation and 32 days organ culture incubation. Values \pm SD (n). The Student's t-test was used to determine the significance of the differences (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Scale bars, 500 μ m.

Control 群に比べて、1 Gy 照射群では、最終的な GFP 発現部の面積は肉眼レベルでは明らかな変化を指摘できなかつたものの、GFP 発現の遅延が有意に認められた。このように「精子形成が全体的に遅延する」現象は、臨床的には一時不妊と似た病態を示すものと考えられた。

以上により、我々の実験系は、生体内の精子形成に対する既知の放射線被ばく影響を再現できるものと考えられた。さらに、顕微鏡下でこれらの生物学的変化をリアルタイムに観察できることも併せて確認することができた。

この実験系を用いることによって、将来的には低線量あるいは低線量率という特殊な放射線環境下での精子幹細胞の生物学的変化を検証できるようになるものと期待される。さらに照射後の精子 DNA 配列における変異挿入や繰り返し配列の異常を調べることによって、放射線によってどのようなジェネティック変化が生じるか、また、精子の遺伝子発現プロファイルの変化をさらに調べることによって、どのようなエピジェネティクス変化が生じるかも併せて検討できるのではないかと期待される。

【謝辞】

申請者への国際交流助成（海外渡航）を通じて、本国際共同研究をご支援いただいた中山人間科学振興財団に謹んで感謝申し上げます。

【参考文献】

- Draper GJ, Stiller CA, Cartwright RA, Craft AW, Vincent TJ. 1993. Cancer in Cumbria and in the vicinity of the Sellafield nuclear installation, 1963-90. *BMJ*. 306:89-94.
- Dubrova YE, Plumb M, Gutierrez B, Boulton E, Jeffreys AJ. 2000. Transgenerational mutation by radiation. *Nature*. 405:37.
- Fukunaga H, Yokoya A. 2016. Low-dose radiation risk and individual variation in radiation sensitivity in Fukushima. *J Radiat Res*. 57:98-100.
- Fukunaga H, Yokoya A, Taki Y. 2016. Now Is the Time to Consider Personalized Effective Dose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 96:479-80.
- Fukunaga H, Yokoya A, Taki Y, Prise KM. Radiobiological implications of Fukushima nuclear accident for personalized medical approach. *Tohoku J Exp Med*. in press.
- Gardner MJ, Snee MP, Hall AJ, Powell CA, Downes S, Terrell JD. 1990. Results of case-control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. *BMJ*. 300:423-9.

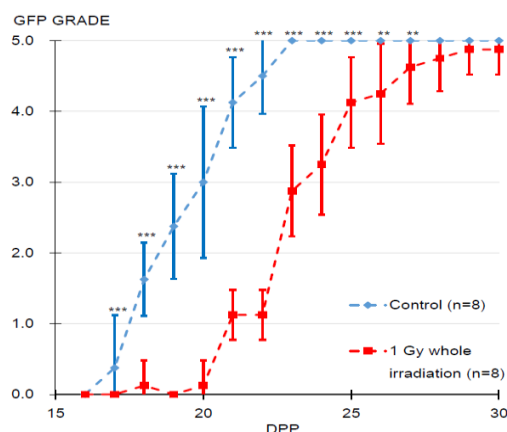


Fig. 4. GFP expression changes of testis organ cultures after exposure to radiation. The Student's t-test was used to determine the significance of the differences (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

- Izumi S, Koyama K, Soda M, Suyama A. 2003. Cancer incidence in children and young adults did not increase relative to parental exposure to atomic bombs. *Br J Cancer*. 89:1709–13.
- Nagasawa H, Little JB. 1992. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res*. 52:6394–6.
- Paris L, Giardullo P, Leonardi S, Tanno B, Meschini R, Cordelli E, Benassi B, Longobardi MG, Izzotti A, Pulliero A, et al. 2015. Transgenerational inheritance of enhanced susceptibility to radiation-induced medulloblastoma in newborn *Ptch1*^{+/-} mice after paternal irradiation. *Oncotarget*. 6:36098–112.
- Russell WL, Kelly EM. 1982. Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. [cited 2017 May 17]; 79:539–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6952205>
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. 2011. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*. 471:504–7.
- Yoshimoto Y, Neel J V, Schull WJ, Kato H, Soda M, Eto R, Mabuchi K. 1990. Malignant tumors during the first 2 decades of life in the offspring of atomic bomb survivors. *Am J Hum Genet Genet*. 46:1041–52.