

平成 29 年度

文部科学省 国家課題対応型研究開発推進事業  
英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

被ばくによる発がんゲノム変異を定量できる  
新規放射線発がん高感受性マウスを用いた低  
線量・低線量率発がんリスクの解明

成果報告書

平成 30 年 3 月  
国立大学法人 広島大学

本報告書は、文部科学省の英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業による委託業務として、国立大学法人 広島大学が実施した平成 27-29 年度「被ばくによる発がんゲノム変異を定量できる新規放射線発がん高感受性マウスを用いた低線量・低線量率発がんリスクの解明」の成果を取りまとめたものです。

# 目次

概略	ix
1. はじめに	1
2. 業務計画	
2.1 全体計画	4
3. 業務の実施内容及び成果	
3.1 放射線発がん実験 (H27-H29)	5
3.1.1 低線量放射線発がん実験 (H27-H29)	5
(1) 目的	5
(2) 試験方法	5
① マウスの繁殖	5
② マウスの放射線照射	6
③ マウスの飼育と組織採取	6
(3) 試験結果及び考察	6
(4) まとめ	7
3.1.2 低線量率放射線発がん実験 (H27-H29)	7
(1) 目的	7
(2) 試験方法	8
① マウスの繁殖	8
② マウスの放射線照射	8
③ マウスの飼育と組織採取	9
(3) 試験結果及び考察	9
(4) まとめ	11
3.2 放射線発がん高感受性モデルマウスの開発 (H27-H29)	11
3.2.1 目的	11
3.2.2 放射線発がん高感受性モデルマウス作製のためのプラスミドベクター作成 (H27、28)	11
3.2.3 <i>Villin-mEzh2</i> 過剰発現マウス ( <i>Villin-mEzh2</i> Tg マウス) 作製 (H28、H29)	12
3.2.4 まとめ	13
3.3 遺伝子変異解析 (H27-H29)	13
3.3.1 目的	13
3.3.2 試験方法	14
(1) DNA 抽出	14
(2) LOH 解析	14

(3) 定量的 PCR 解析	14
3.3.3 試験結果及び考察	15
3.3.4 まとめ	16
3.4 エピジェネティック変異解析（再委託先：量子科学技術研究開発機構）（H27-H29）	16
3.4.1 目的	16
3.4.2 試験方法	17
(1) マウス <i>Apc</i> 遺伝子プロモーター領域の配列解析と DNA メチル化状態解析	17
① 文献によるマウス <i>Apc</i> 遺伝子 CpG アイランド探索	17
② 配列情報の取得と PCR プライマーの設計	17
③ DNA 抽出	17
④ バイサルファイトシーケンス	17
(2) 次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析	18
① DNA の精製	18
② 微量 DNA サンプルを用いたメチル化 DNA の濃縮	18
③ 次世代シーケンサーによる DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析	18
3.4.3 試験結果及び考察	19
3.4.4 まとめ	25
3.5 リスクモデルの構築および発がんリスク評価	
（再委託先：量子科学技術研究開発機構）（H27-H29）	25
3.5.1 目的	25
3.5.2 原爆被爆者を対象とした寿命調査と Preston ら 2007 の統計解析モデル（H27、H28）	26
3.5.3 統計解析モデルのパラメータ推定方法と統計パッケージによるモデル適用（H27、H28）	28
3.5.4 原爆被爆者を対象とした寿命調査と Grant ら 2017 の統計解析モデルの適用（H27、H28）	32
3.5.5 核兵器施設における女性作業従事者の 12 コホートの死亡率データ（H27、H28）	34
3.5.6 結腸がんの発症リスクに関する疫学研究の文献による調査（H27、H28）	35
3.5.7 マウスでの発がん実験データの解析（H28、29）	36
3.5.8 マウスの実験データとヒトの疫学データの比較と放射線防護政策への提言（H29）	39
3.5.9 謝辞	40
3.6 研究推進	40
4. 結言	40

表一覧	項
表 1	ヒト疫学研究と実験動物を用いた研究との相違 . . . . . 1
表 2	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量放射線発がん実験 . . . . . 7
表 3	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-1 . . . . . 9
表 4	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-2 . . . . . 9
表 5	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-3 . . . . . 10
表 6	次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、 及び検出された DNA メチル化領域の数（自然発症腫瘍サンプル1~5） . . . . . 22
表 7	次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、 及び検出された DNA メチル化領域の数（自然発症腫瘍サンプル6~8） . . . . . 22
表 8	次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、 及び検出された DNA メチル化領域の数（放射線誘発腫瘍サンプル1~5） . . . . . 23
表 9	次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、 及び検出された DNA メチル化領域の数（放射線誘発腫瘍サンプル6~9） . . . . . 23
表 10	放射線誘発腫瘍でのみ検出された DNA メチル化領域 . . . . . 24
表 11	自然発症腫瘍でのみ検出された DNA メチル化領域 . . . . . 24
表 12	R の “epifit” パッケージと Epicure の AMFIT 関数による結腸がん罹患率推定値 . . . . . 30
表 13	Preston らのモデルで被ばく時年齢、到達年齢を変化させた際の 結腸がん罹患率の過剰相対リスク推定値 . . . . . 30
表 14	Grant らのモデルで被ばく時年齢、到達年齢を変化させた際の 男女別消化管がん罹患率推定値 . . . . . 33
表 15	結腸がんの発症リスクに関する疫学研究の文献からのリスク推定値 . . . . . 35
表 16	ノンパラメトリックモデルの各線量におけるリスク推定値 (B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス) . . . . . 37
表 17	線形閾値モデルにおける閾値と AIC の値 (B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス) . . . 37
表 18	ノンパラメトリックモデルの各線量におけるリスク推定値 (B6/B6-F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス) . . . . . 37
表 19	線形閾値モデルにおける閾値と AIC の値 (B6/B6-F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス) . . . . . 37

図一覧	項
図 1	<i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスの小腸腫瘍発症メカニズム . . . . . 1
図 2	エピジェネティック変異 . . . . . 2
図 3	研究構想 . . . . . 3
図 4	全体計画図 . . . . . 4
図 5	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウス作成の概要 . . . . . 5
図 6	γ線照射装置ガンマセルと鉛製遮蔽体 . . . . . 6
図 7	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量放射線発がん実験 . . . . . 7
図 8	低線量率 γ線照射装置と照射方法 . . . . . 8

図 9	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-1	10
図 10	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-2	10
図 11	PRC2 複合体	12
図 12	<i>Villin-mEzh2</i> プラスミドベクター	12
図 13	トランスジェニックマウス作製の概要	12
図 14	Genotyping 結果	13
図 15	LOH 解析の概要	14
図 16	qPCR 法の概要	14
図 17	<i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスで検出された遺伝子変異の概要	15
図 18	B6/B6-Ch18 <sup>MSM</sup> -F1 <i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた発がん実験における 各遺伝子変異頻度の線量効果反応	15
図 19	メチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) 蛋白質を用いたメチル化 DNA の濃縮と解析	18
図 20	次世代シーケンサーによる DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析	19
図 21	バイサルファイトシーケンスによる <i>Apc</i> 遺伝子エピジェネティック変異結果-1	20
図 22	バイサルファイトシーケンスによる <i>Apc</i> 遺伝子エピジェネティック変異結果-2	20
図 23	バイサルファイトシーケンスによる <i>Apc</i> 遺伝子エピジェネティック変異結果-3	21
図 24	<i>Apc</i> 遺伝子発現量解析結果	21
図 25	自然発症腫瘍、及び放射線誘発腫瘍において検出された DNA メチル化領域の分布	24
図 26	<i>Apc</i> <sup>Min/+</sup> マウスを用いた発がん実験における線量と ERR の関係	38
図 27	低線量域におけるヒト疫学研究結果および我々の研究結果の比較	40

#### 略語一覧

Apc	: adenomatous polyposis coli
B6	: C57BL/6N
CT	: Computed Tomography (コンピューター断層撮影)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (デオキシリボ核酸)
EAR	: Excess Absolute Risk (過剰絶対リスク)
ERR	: Excess Relative Risk (過剰相対リスク)
ICRP	: International Commission on Radiological Protection (国際放射線防護委員会)
LOH	: Loss of Heterozygosity (ヘテロ接合性の消失)
LNT	: Linear No-Threshold (直線しきい値なし)
MBD	: Methyl-CpG-binding Domain (メチル化 CpG 結合ドメイン)
MDS	: myelodysplastic syndromes (骨髄異型性症候群)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
RNA	: Ribonucleic Acid (リボ核酸)
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
Tg	: transgenic (トランスジェニック)
UCSC	: University of California, Santa Cruz (米国カリフォルニア大学サンタクルーズ校)

## 用語一覧

### アノテーション

あるデータに対して関連する情報（メタデータ）を注釈として付与すること。

### アライメント

異なる配列を比較する手法の1つで、類似した配列を特定できるよう並べること。ゲノム DNA の構造解析など、複数の配列データを結合する際に利用する。

### イントロン

ゲノム DNA から転写される産物からスプライシング反応によって除かれる塩基配列。

### エクソン

ゲノム DNA から転写される産物からスプライシング反応によって除去されず、タンパクに翻訳される塩基配列。

### エピジェネティクス

DNA 塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現を制御、伝達するシステムの総称。代表的なシステムとして、DNA のメチル化や、ヒストンタンパク質のメチル化、アセチル化が知られている。

### 交絡

原因（放射線被ばくなど）と結果（がん罹患など）の間に介在する要因により、結果に対する原因の曝露効果が歪められてしまうこと。例えば、低線量被ばく群と高線量被ばく群を比べた際に、もし低線量被ばく群の方の平均年齢が高かった場合、この2群のがん罹患による差は、放射線被ばくだけでなく年齢による影響も受けている。その2群の差を放射線被ばくの影響として解釈しようとする際に、年齢が交絡因子としてその影響を歪めている。

### コホート研究

特定の要因に曝露した集団と曝露していない集団を一定期間追跡し、研究対象となる疾病の発生率を比較することで、要因と疾病発生の関連を調べる観察的研究のこと。

### コンソミックマウス

2つの系統が1つの染色体全領域について異なった由来をもち、それ以外の遺伝的背景が共通である場合、これらの2つの系統は互いにコンソミックな状態にあるといい、これらの系統をコンソミック系統と呼ぶ。

例) B6-Ch18<sup>MSM</sup>: 18番染色体が2本とも MSM (MSM/Ms) 系統、18番以外の全染色体が B6 (C53BL/6) 系統からなるマウス

### 細胞老化

細胞が分裂を停止し、増殖できなくなった状態が不可逆的に引き起こされること。細胞が

ん化することを抑制する防御反応であると考えられている。

### シーケンシング

シーケンシングとは、アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) からなる DNA の塩基配列を決定すること。従来のシーケンシングは、遺伝子の領域のみに留まるなど、解析の範囲が限られていたが、次世代シーケンサーの登場により、全ゲノムのシーケンシングも可能になった。

### 次世代シーケンス

ランダムに切断された数千万の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に決定することができ、1回の解析で数十億といった全ゲノムレベルの塩基配列を解読出来る。メチル化 CpG 結合ドメイン等によりメチル化した DNA 断片を濃縮し、その配列を決定することで、DNA メチル化によるエピジェネティック情報の網羅的解析が可能となる。また、転写産物の配列を決定することで、遺伝子発現の網羅的解析にも応用出来る。

### スプライシング部位

ゲノム DNA から転写される産物からイントロンが除去され、エクソンがつなぎ合わされる部位を指す。

### 電気泳動

DNA は水溶液中でマイナスに帯電する。そのため、DNA は電圧をかけたときにマイナスからプラスに移動する性質がある。電気泳動は、この移動距離の違いによって分離を試みる方法である。DNA を流すゲルは細かい網目構造になっており、分子量の小さなものは素早くその網目を縫って移動することができる一方、分子量の大きなものは移動に時間がかかる。電気泳動により、様々な大きさの DNA 断片をその大きさによって分離できる。

### バイサルファイトシーケンシング

ゲノム DNA にバイサルファイト処理を行なうとメチル化シトシンは変換されず、非メチル化シトシンのみがウラシルに変換される。シーケンシングにより、ウラシルはチミンとして表現されるため、バイサルファイト処理前後で生じるシトシンとチミン(ウラシル)の差異を配列データとして得ることで、メチル化シトシンの存在を明らかに出来る。

### ハウスキーピング遺伝子

多くの組織や細胞中に共通して一定量発現する遺伝子のこと。

### プロモーター

DNA から RNA の合成 (転写) 開始に関与する遺伝子上流領域を指す。プロモーターに転写因子が結合することで RNA の転写が始まる。



### メチル化 CpG 結合ドメイン

メチル化 CpG に結合する蛋白質上の機能領域（ドメイン）を指す。メチル化 CpG 結合ドメインを持つ蛋白質をメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質と呼び、遺伝子の発現制御に重要な役割を果たすことが知られている。

### メタアナリシス

過去に行われた複数の独立な研究結果を系統的な文献検索によって集め、その結果を併合すること。サンプルサイズが小さく、リスク推定値が不安定な個々の結果をまとめることで、安定した結果を得ることができる。一般には文献に掲載されているリスク推定値だけでなく、個人レベルのデータを個々の研究から取得して再解析を行うこともメタアナリシスの一部に含まれるが、放射線疫学分野では特にこのような解析をプール解析と読んで区別している。

### 3' 非翻訳領域

mRNA の下流に存在するタンパク質に翻訳されない領域を差し、mRNA の安定性やタンパク質の翻訳を調節する。

### 5' 非翻訳領域

mRNA の上流に存在するタンパク質に翻訳されない領域を差し、タンパク質の翻訳を調節する。

### Cox 回帰モデル

ある基準の時刻からある目的の反応が起きるまでの時間を対象とした解析を生存時間解析と呼ぶが、そのうちで比例ハザード性を仮定することでベースラインリスクの詳細なモデル化を避けて複数の変数の影響を調べられるモデルを指す。

### CpG アイランド

シトシンの次にグアニンが現れるタイプの 2 塩基配列である CpG の出現頻度が、ゲノム中で他と比べ高い領域を指す。CpG の「p」の文字は、シトシン (C) とグアニン (G) の間のホスホジエステル結合を示している。遺伝子のプロモーター領域、もしくはその近傍において高頻度に存在し、このシトシンにメチル基が付加されると、プロモーターは不活性となり転写が抑制される。

### DNA メチル化

DNA を構成するシトシン塩基にメチル基が付加される変化を指す。遺伝子の発現を制御することで、胚発生における細胞の運命決定や分化状態の維持に重要な役割を果たしている。がん細胞では、DNA メチル化パターンの異常がみられ、その結果、遺伝子の発現異常が引き起こされている。

### EAR

被ばくのない集団に比べた被ばくのある集団のリスク（罹患率や死亡率）の増分であり、被ばくのある人のリスクから被ばくのない人のリスクを引くことで求められる。

## ERR

EAR を被ばくのない集団のリスク（罹患率や死亡率）で割った指標で、EAR よりも解釈が容易である。

## F1 マウス

動物実験に用いられているマウスには、近交系（純系）と、交雑種に分類される。F は filial (交雑種世代の、子の)の頭文字であり、近交系同士の交配の世代を示すために用いる。すなわち、F1 マウスとは近交系のマウス同志をかけあわせて得られた、交雑第1世代のマウスをいう。

例) B6C3F1: 母親を B6 (C57BL/6) 系統、父親を C3 (C3H) 系統にして得られた仔マウス

## Genotyping

ある個体の DNA 配列を DNA シークエンシングなどによって識別し、ほかの個体の DNA 配列や基準となる DNA 配列と比較することによって遺伝子型の違いを検出する方法である。

## Tg マウス

マウス初期胚に人為的に外来遺伝子を導入し、発現させるようにしたマウスのこと。

## UCSC ゲノムデータベース

米国カリフォルニア大学サンタクルーズ校(UCSC)が 開発、維持しているゲノム情報等の閲覧システムのこと。

## 概略

近年問題となっている医療の高度化に伴う医療被ばく、放射線の産業利用や原子力発電に伴う職業被ばくでは、低線量での被ばくが想定される。さらに、東京電力福島第一原子力発電所事故（福島原発事故）以降、人々の放射線影響に対する社会的関心は高く、低線量・低線量率の放射線を長期にわたり被ばくした場合にどのような健康影響が生じるのか、その解明が求められている。

現在、ヒトにおける放射線の発がんリスク評価は、広島、長崎原爆被爆者の疫学調査から得られた情報とその基礎になっている。しかしながら、100 mSv 以下の低線量域での発がんリスクについての十分な情報が得られておらず、低線量域のリスク評価は、しきい値なし直線モデル (Linear No-threshold, LNT) モデルをもとに推定された値が用いられているのが現状である。一方、コンピューター断層撮影 (Computed Tomography, CT 検査) による医療被ばくでの大規模疫学調査では、蓄積線量 100 mSv 以下に於いても白血病と脳腫瘍発症のリスク増加が認められ、その線量効果関係は、原爆被爆者のデータと矛盾していないことが報告された (1)。この結果は、原爆被爆者のデータにおける 100 mSv 以下のリスク解明を補うものと期待されたが、CT 検査を受けた小児は、ダウン症等のがんの遺伝的素因を持つ患者が多数含まれており、それを除くと発がんリスクの増加が認められなかったことから、この調査結果も結論には至っていない (2)。一方、低線量率長期被ばくに関するインド・ケララ地方、中国・広東省陽江市の高自然放射線地域住民の疫学調査では、積算線量が数百 mSv になっても、がんの相対リスクが増加しないことが報告されている (3)。この調査では、相対リスクの信頼限界の幅が大きく、かつ、観察期間が短いことから、最終的な結論には至っていないが、原爆被爆者の急性被ばくよりも、慢性被ばくの発がんリスクが小さい可能性を示唆している。このように、ヒト放射線発がんにおける低線量域のリスクや線量率効果については十分に解明されておらず、疫学調査のみによるリスク解明には限界がある。また、ヒトの疫学研究においては、低線量の被ばくを受けた対象者と、高線量の被ばくを受けた対象者の、被ばく線量以外の要因が均等である保証はなく、統計解析モデルによって調整は行われているが、様々な交絡因子によってリスク推定値が歪められている可能性は完全に否定できない。一方、動物実験のデータはそのようなヒトを対象とした疫学研究の限界を補うことができ、遺伝的要因が均一と思われる集団に対して照射という介入を行っており、疫学研究では行えないランダム化比較試験に相当する。そのため、動物実験で得られる知見を大規模疫学調査結果と統合することで、リスク評価の信頼性向上が期待される。

これまで我々は、放射線発がん研究におけるモデルマウスの開発に注力してきた。その中でも、ヒト大腸腺腫症 (Adenomatous Polyposis Coli, APC) のモデルマウスとして開発された  $Apc^{Min/+}$  マウスは、放射線や化学物質に対しがんになりやすいマウス (発がん高感受性マウス) である。原爆被ばく者の疫学調査でも大腸がんのリスクは高く、放射線発がん研究において  $Apc^{Min/+}$  マウスの有用性は疑う余地が無い。我々はこれまで、 $Apc^{Min/+}$  マウスが高感度に放射線誘発小腸腫瘍を発症し、かつ、その腫瘍において放射線に特有の遺伝子変異 (放射線の爪痕) が検出できることを明らかにしている。また、このモデルマウスでは、一匹のマウスの小腸に数十~百数十個の腫瘍が発生する。これらの腫瘍は独立して生じるため、膨大なマウスを用いることなく多数の腫瘍を用いた分子生物学的解析が可能となる。さらに我々は、 $Apc^{Min/+}$  マウスと日本古来の MSM マウス由

来の 18 番染色体を持つコンソミックマウスとの F1 マウス (B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウス) を用いることで、より高感度に腫瘍発生が検出できることを見出している。これらの事から、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1-*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いることにより、遺伝子変異を指標とした低線量・低線量率放射線被ばくによる発がんリスク評価が可能になるものと期待される。

さらに近年、発がん過程には、遺伝的 (ジェネティック) 変異に加えて、異常な DNA のメチル化や、DNA の構造変化を制御するヒストン蛋白質のメチル化、アセチル化といったエピジェネティック変異と呼ばれる変異が蓄積していることが報告されている。発がん機構の研究が進んでいる大腸がん等において、発がん過程におけるエピジェネティック異常の関与が明らかにされており、がんにおけるゲノム網羅的な遺伝子解析によりエピジェネティック制御遺伝子の変異が次々と同定され、エピジェネティクス機構の発がんへの重要性が示唆されている (4)。しかしながら、放射線発がんにおけるエピジェネティック変異の関与については、未だほとんど解明されていない。

そこで、本研究では、上述の B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1-*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを用いて、低線量・低線量率放射線発がん実験を実施し、放射線被ばくに起因する遺伝子変異やエピジェネティック変異頻度と線量、線量率との関係を明らかにする。さらに、得られたゲノムレベルでの情報をもとに統計学的モデル解析を行う。それを基に低線量・低線量率放射線発がんリスクを評価し、しきい値の有無や線量率効果のゲノム的基盤の解明を通じて、新しい放射線防護体系の基盤確立に貢献することを目指す。

B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1-*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを用いて、0、0.02、0.05、0.1、0.5 Gy 被ばくによる低線量放射線発がん実験を行った。その結果、線量依存的な腫瘍数の増加が観察され、0.1 Gy の低線量被ばくにおいても有意な腫瘍数の増加が検出できた。次に、低線量率放射線発がん実験を行った結果、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1-*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスでは、総線量 0.5 Gy において、線量率に約 26,000 倍の違いがあるにも関わらず明らかな線量率効果は見られないという結果を得た。また、総線量 0.1 Gy の低線量域においても本研究で用いた線量率において、線量率効果は観察されなかった。また、本研究と、我々のこれまでの研究結果を比較した結果、低線量率被ばくによる発がんリスクには、遺伝的背景や被爆時年齢が影響することを明らかにした。

また、本放射線発がん実験から得られた腫瘍を用いて、遺伝子変異解析、エピジェネティック変異解析を実施した。遺伝子変異解析では、LOH 解析と qPCR 解析を組み合わせることにより、得られた腫瘍を S-type、R-type、N-type の 3 種類の遺伝子変異に分類することに成功した。次に、線量の異なる照射群から得られた腫瘍を用いて遺伝子変異解析を行った結果、放射線特有の遺伝子変異として R-type (欠失) が検出され、R-type 遺伝子変異頻度は、線量依存的に増加することを明らかにした。また、本研究で行った線量、線量率においては、総線量が一定であれば、R-type 遺伝子変異頻度は、線量率に依存しないことを明らかにした。

また、遺伝子変異解析から N-type に分類された腫瘍における *Apc* 遺伝子発現が低下していることを明らかにした。そこで、N-type 腫瘍におけるエピジェネティック変異の関与を調べるため、*Apc* 遺伝子のプロモーター領域のメチル解析を行ったが有意なメチル化の変化は検出されなかった。次に、マウス全ゲノムにおけるエピジェネティック変異を検出するため、マウス腫瘍を用いて、微量サンプルを用いたメチル化 DNA 濃縮法の条件検討を行い、次世代シーケンサーによる

DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析を行った。その結果、微量 DNA サンプル (100 ng) からメチル化 DNA を濃縮出来る条件を決定した。次に、放射線誘発腫瘍、自然発生腫瘍、正常組織における DNA メチル化領域を比較し、放射線誘発腫瘍に特徴的なメチル化異常を示すゲノム領域を多数検出した。また自然発症腫瘍に比べ、放射線誘発腫瘍では、共通してメチル化されている領域が多く存在することから、分子生物学的特徴が似た腫瘍が多く発症していると考えられる。

動物実験で得られた低線量・低線量率発がんに関する知見をヒトで得られた大規模疫学調査結果と統合するためには、動物実験から得られたデータと疫学研究結果から得られたデータを同じ手法を用いて、統計解析をする必要があるといえる。そのため、原爆被爆者の疫学研究データを入手し、“epifit”を用いた統計解析を行い、過剰相対リスク (Excess Relative risk: ERR) を算出した。その結果、消化管がんでは、線形モデルよりも線形二次モデルの方があてはまりがよかったが、有意とはいえないという結果を得た。次に、本研究で得られた B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1-*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスによる発がん実験データおよび、我々のこれまでの研究から得られている B6/B6-F1-*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスによる発がん実験データを用いて、“epifit”による解析を行い、ERR を算出した。その結果、両マウスデータともに、ヒト消化管がんデータと同様、線形モデル、線形二次モデルのあてはまりに有意な違いは検出されなかった。線形閾値モデルの推定を試みた結果、両モデルマウスともに閾値の存在は見られないという結果が得られた。各種の線量限度などを勧告している国際放射線防護委員会 (ICRP) では、「閾値なしモデル」を採用しているが、本研究は、それを指示する結果といえる。また、0.5 Gy 以下における原爆被爆者による疫学研究結果と、本研究で行った動物実験結果の比較を行った。ヒト疫学研究結果では、0.5 Gy 以下においては、ばらつきが大きくはっきりとしたことがいえないが、我々の動物実験結果では、低線量域でも発がんリスクは閾値がなく、線量依存的な発がんリスクの増加が観測された。本研究結果は、低線量域における発がんリスクの線量効果反応を示した重要な科学的知見といえる。また、遺伝子変異解析から、低線量域においても放射線特有の遺伝子変異として検出される R-type が線量依存的に増加することを明らかにした。本研究で行った、低線量、低線量率放射線発がん実験の結果から、R-type 遺伝子変異頻度は、線量率効果を示さないことから、R-type 遺伝子変異を誘発すると考えられる損傷は、修復されにくく、放射線の線量率非依存的に、かつ放射線の線量依存的に誘発されると考える。本研究結果から、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1-*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスでは、放射線の線量依存的に R-type 遺伝子変異が誘発され、それが発がんリスク増加に関与することを明らかにした。

本研究は、これまでヒト疫学研究結果からは明らかにされていなかった低線量、低線量率放射線被ばくによる発がんリスクに関する極めて重要な科学的知見を提供することに成功したといえる。本研究結果は、ICRP が採用している「閾値なし直線モデル (Linear Non-threshold: LNT 仮説)」を指示する結果といえる。さらに、遺伝子変異解析から、放射線に特有の爪痕といえる欠失を同定することに成功しており、欠失の誘発頻度も「LNT 仮説」を指示する結果といえる。しかしながら、我々が用いたマウスモデルは、*Apc* 遺伝子が正常に機能する正常側アリルと変異をもつ *Min* アリルを有し、正常側アリルに生じた 1 ヒット (変異) で、がんが誘発される特異的な系であるため、本研究結果をヒト疫学研究結果に直接比較することは困難である。

我々は、さらに研究を進展させることにより、低線量・低線量率放射線発がんリスクに関する科学的知見を蓄積させ、社会不安の低減と解消に寄与する科学的根拠の提供を続ける所存である。

## 1. はじめに

ヒトが放射線に被ばくすると、さまざまな障害が引き起こされる。その中でも発がんは人々が最も危惧する障害である。広島・長崎の原爆被爆者の疫学調査からも、有意な発がんリスクの増加が観察されているが、100 mSv 以下の低線量域での発がんリスクは十分には解明されていない

(1)。さらに、福島原発事故により、多くの人々が低線量放射線による長期被ばく、すなわち低線量・低線量率放射線被ばくによる健康影響を危惧している。このように、人々の低線量・低線量率放射線被ばくによる人体影響、特に、発がんリスクに関する社会的関心は高く、その解明が求められている。しかしながら、現時点では、ヒト放射線発がんにおける低線量域のリスクや低線量率長期被ばくのリスクは十分には解明されていない。また、ヒトの疫学研究においては、

**表1. ヒト疫学研究と実験動物を用いた研究との相違**

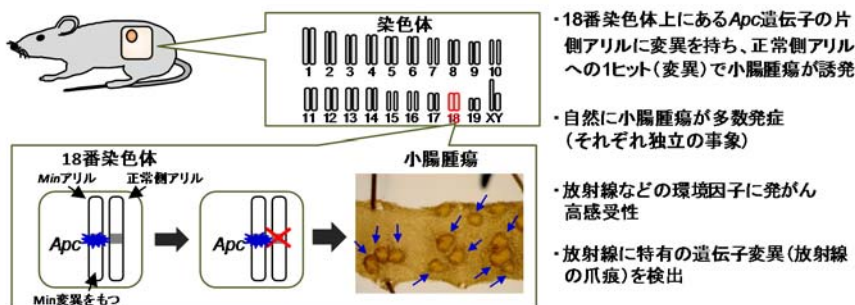
ヒトの疫学研究		実験動物を用いた研究
低線量放射線発がんリスク評価	低線量(率)の発がんリスク評価は現状では難しい	100 mGy以下の発がんリスク評価ができる可能性がある
交絡因子の影響	非常に多くの交絡因子の影響あり 内的要因(遺伝、年齢など) 外的要因(生活環境、食生活など)	交絡因子の影響を少なくすることができる
分子機構の解明	複雑・困難 (今までほとんど見つからない)	放射線発がんの分子機構の一端を明らかにできる可能性がある

低線量の被ばくを受けた対象者と、高線量の被ばくを受けた対象者が被ばく線量以外の要因が均等である保証はなく、統計解析モデルによって調整は行われているが、さまざまな交絡因子によってリスク推定値が歪められている可能性は完全に否定できない。

ヒト疫学研究と実験動物モデルを用いた研究の相違を表1に示した。表1に示すように、実験動物を用いた研究においては、照射線量、生活環境、食生活といった交絡因子の影響を少なくすることが可能であり、ヒトを対象とした疫学研究の限界を補うことができる。また実験動物を用いた研究は、遺伝要因が均一と思われる集団に対して照射という介入を行っており、疫学研究では行えないランダム化比較試験に相当する。従って、動物実験データに対して同じ統計解析モデルによる解析を行い、比較を行うことは疫学研究の結果を補う意味で重要であり、リスク評価の信頼性向上が期待される。そのため、動物実験を用いた研究から得られる詳細な知見と発がんメカニズムの解明は、これまでのヒトの大規模疫学調査結果を補完することが期待できる。

我々はこれまでの研究から、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスが放射線発がんを高感受性であることを明らかにし

**図1. *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスの小腸腫瘍発症メカニズム**

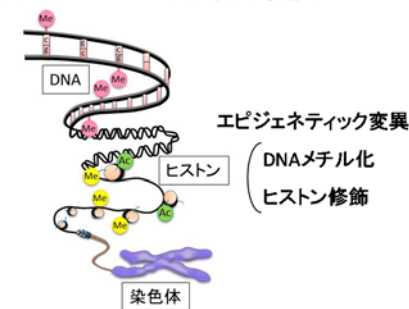


ている。*Apc* 遺伝子はがん抑制遺伝子として知られており、*Apc*(*APC*) 遺伝子の変異は、ヒト大腸腫瘍の初期イベントとして知られている。*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスは、*Apc* 遺伝子が正常に機能する正常側アレルと変異をもつ

*Min* アレルを有し、正常側アレルに生じた1ヒット(変異)で、がんが誘発される(図1)。

そのため、*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスを用いたより簡略化した系を用いて放射線発がん実験を行うことにより

## 図2. エピジェネティック変異



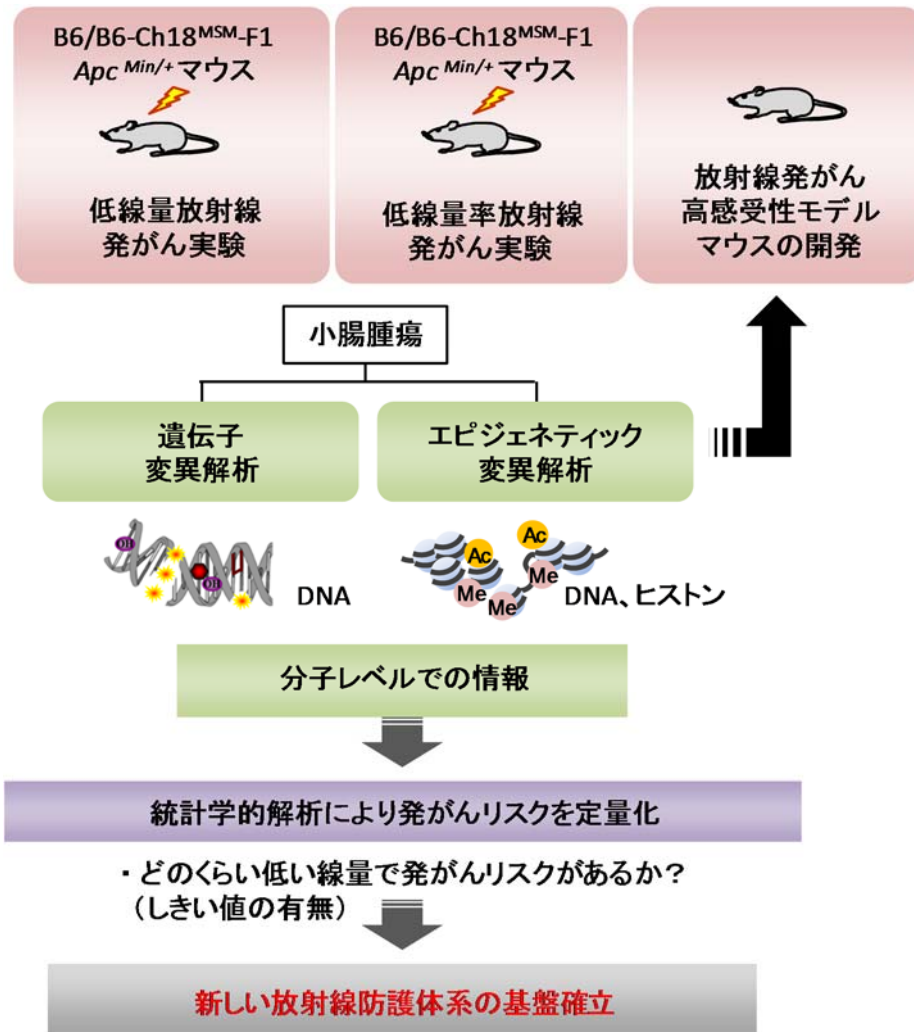
DNA塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現を制御、伝達するシステムの総称である。代表的なシステムとして、DNAのメチル化やヒストン蛋白質のメチル化、アセチル化が知られている。

これまでに明らかにされていない低線量および低線量率放射線発がんリスク評価が可能になることが期待される。また、*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスの正常側アリルに生じた遺伝子変異解析を行うことにより、遺伝子変異頻度を指標にした低線量・低線量率放射線発がんリスク評価を試みる。

近年、発がんには、遺伝子以外の変異、即ちエピジェネティック変異の関与が報告されている。エピジェネティック変異とは、図2に示すようにDNA塩基配列の変化を伴わず遺伝子の発現を制御、伝達するシステムの総称であり、その代表的なシステムとして、DNAのメチル化

や、DNAの構造変化を制御するヒストン蛋白質のメチル化、アセチル化が知られている。しかしながら、エピジェネティックな影響の放射線発がんへの関与は十分理解されていない。そのため、本研究では、遺伝子変異のみならず、エピジェネティック変異の定量を試みる。このように、我々は放射線発がんに関与する遺伝子変異のみならず、エピジェネティック変異の網羅的解析を目指しており、低線量・低線量率放射線発がんにおける放射線の爪痕が同定できると期待される。このように、*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスにおける低線量・低線量率放射線発がん実験から得られた発がん頻度やゲノムレベルでの情報をもとに、放射線疫学研究と比較可能なリスク推定値が得られるよう統計学的モデルを用いて低線量・低線量率放射線発がんリスクを評価する。しきい値の有無や線量率効果のゲノムの基盤の解明を通じて、新しい放射線防護体系の基盤確立に貢献することを目指す。

図3. 研究構想



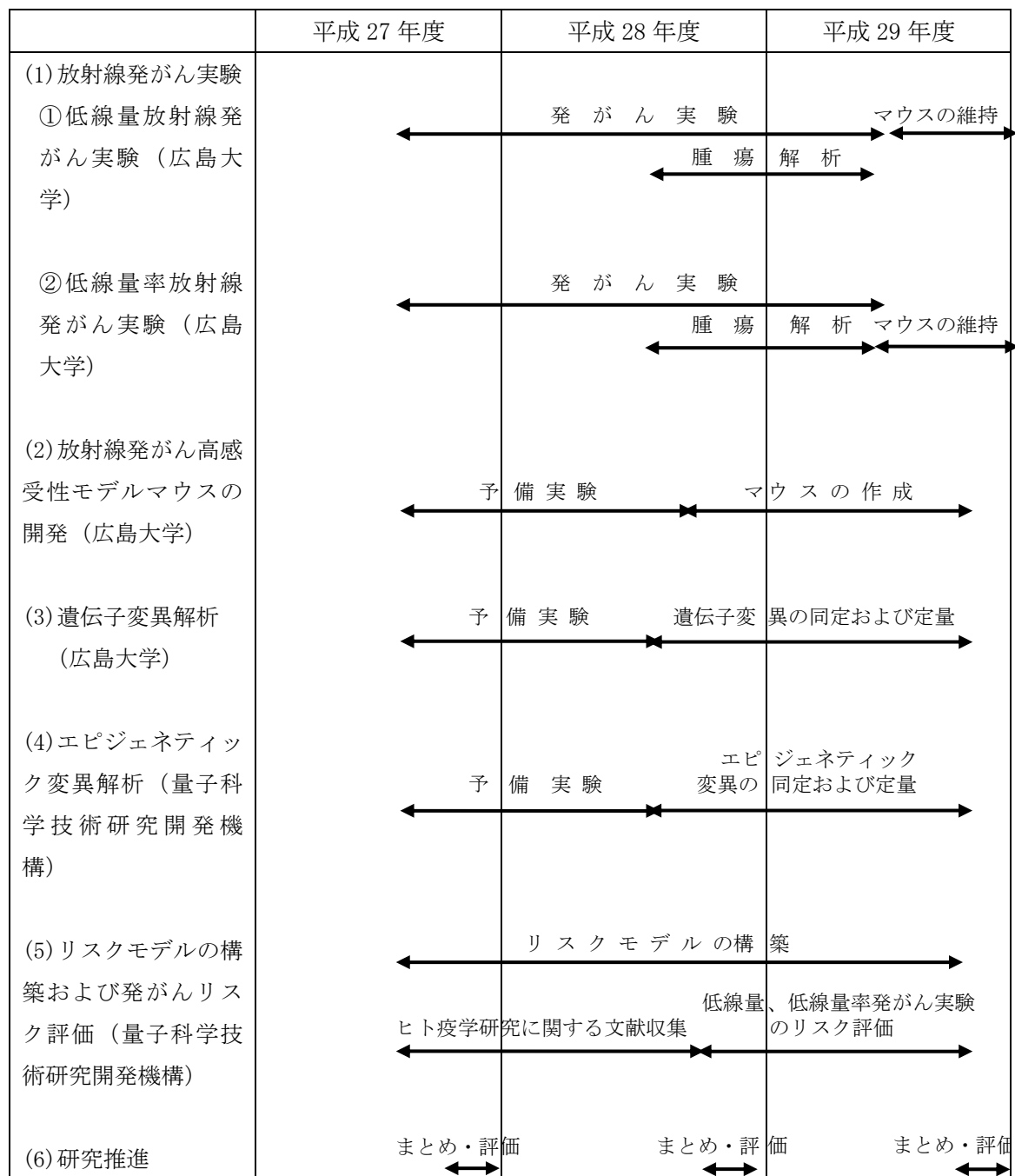


## 2. 業務計画

### 2.1 全体計画

本業務の全体計画図を図4に示す。

図4. 全体計画



### 3. 業務の実施内容及び成果

#### 3.1 放射線発がん実験 (H27-H29)

##### 3.1.1 低線量放射線発がん実験 (H27-H29)

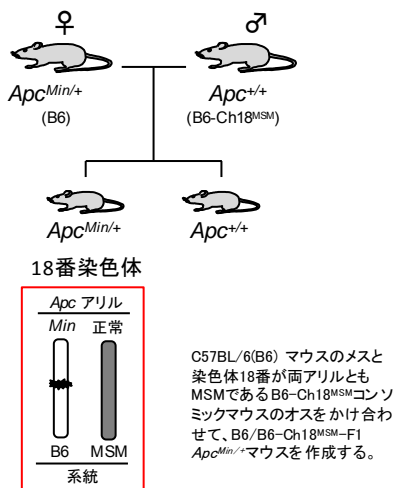
###### (1) 目的

前述の通り、ヒトにおける放射線発がんリスクは、広島・長崎の原爆被爆者の疫学調査結果を中心に考察がなされ、有意差の見られない 100 mSv 以下の発がんリスクは LNT モデルをあてはめ、防護基準としている。古くから野生型のマウスやラットを用いた放射線発がん研究が行われており、白血病、卵巣、肺、乳腺、甲状腺などさまざまな臓器において発がんリスクが高まることが報告されている (5-8)。しかしながら、多くの腫瘍では、数 Gy という高線量被ばくでのみ、統計学的に有意な腫瘍の発生が検出されていることから、これらのモデルを低線量発がん研究に用いるのは適当ではないと考えられる。この問題にアプローチするために、我々は放射線高発がん性モデルマウスの開発を行い、 $Apc^{Min/+}$ マウスが放射線に高発がん性であるという知見を得ている。一般に、これまで行われた多くの臓器の放射線発がん研究では、発生する腫瘍が 1 個から数個という場合が多い。一方で、 $Apc^{Min/+}$ マウスでは、1 個体あたり、数十から百数十個の腫瘍が発生し、それぞれの腫瘍が独立の事象で誘発される。そのため、膨大な数のマウスを用いることなく、低線量でも有意に小腸腫瘍の発生の増加を検出することに成功している。さらに、 $Apc^{Min/+}$ マウスと日本古来の MSM マウス由来の 18 番染色体を持つコンソミックマウスとの F1 マウス (B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1  $Apc^{Min/+}$  マウス) を用いることで、より高感度に小腸腫瘍の発生が検出できることを見出した。これらの結果から、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1- $Apc^{Min/+}$  マウスを低線量発がんリスクの解明に使える可能性が示唆された。そこで、本研究では、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1- $Apc^{Min/+}$  マウスを用いて低い線量域における放射線発がん実験を行った。

###### (2) 試験方法

動物実験は広島大学原爆放射線医科学研究所放射線動物実験施設にて実施した。また、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、

図5. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1  $Apc^{Min/+}$ マウス作成の概要



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。

###### ① マウスの繁殖

図5に示すように、繁殖に適した8週齢以上の  $Apc^{Min/+}$ メスマウス (B6) と  $Apc^{+/+}$ オスマウス (B6-Ch18<sup>MSM</sup>) を準備し、かけあ

わせを行った。妊娠したメスマウスを別ケージに移動させ、毎日観察することにより出産日を記録した。得られた仔マウスは、生後 11 日目に、②に示す方法で放射線照射を行った。

## ② マウスの放射線照射

図6.  $\gamma$ 線照射装置ガンマセルと鉛製遮蔽体



鉛製遮蔽体を用いて、262 Gy/dayの線量率で照射を行った。

前述のマウスを照射容器に入れ、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 $\gamma$ 線照射装置ガンマセル (Gammacell 40 Exactor、Best Theratronics 社) を用いて照射を行った (図 6)。これらの照射には付属の鉛製遮蔽体を用い、180 mGy/分 (262 Gy/日) の線量率で照射を行った。照

射後、動物実験施設に再搬入し、飼育を続けた。

## ③ マウスの飼育と組織採取

マウスの飼育は原爆放射線医科学研究所動物実験計施設内の動物飼育スペースにて行った。餌と水はそれぞれ NMF (オリエンタル酵母工業株式会社、東京) ならびに水道水を自由摂取させた。マウスは 1 ケージあたり 4、5 匹で飼育し、週 1 回のケージ交換ならびに、週 2 回の給水瓶の交換を行った。約 4 週齢時に、マウスの尻尾から DNA を抽出し、genotyping により  $Apc^{Min/+}$ マウス、 $Apc^{+/+}$ マウスの判定を行った。定期的にマウスの様子を確認し、マウスが衰弱した場合には、屠殺し、解剖を行い、小腸を採取した。採取した小腸は、その後、アルカリフォスファターゼ染色を行った。また、一部の腫瘍は実体顕微鏡下でピンセットを用い、1 つずつ採取を行い、凍結保存した。

## (3) 試験結果及び考察

業務 1、2 年目に、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1  $Apc^{Min/+}$  マウスを準備し、生後 11 日目に、0、0.02、0.05、0.1、0.5 Gy の照射を行った。その後、約 24 週齢でマウスを解剖し、小腸を採取した。採取した小腸は、その後、アルカリフォスファターゼ染色を行った。また、一部の腫瘍は実体顕微鏡下でピンセットを用い、1 つずつ採取を行い、凍結保存した。

アルカリフォスファターゼ染色を行った小腸については、実体顕微鏡を用いて、腫瘍を計測した。業務 3 年目は、0.02 Gy 照射を行ったマウスを屠殺し、小腸腫瘍の計測を行った。

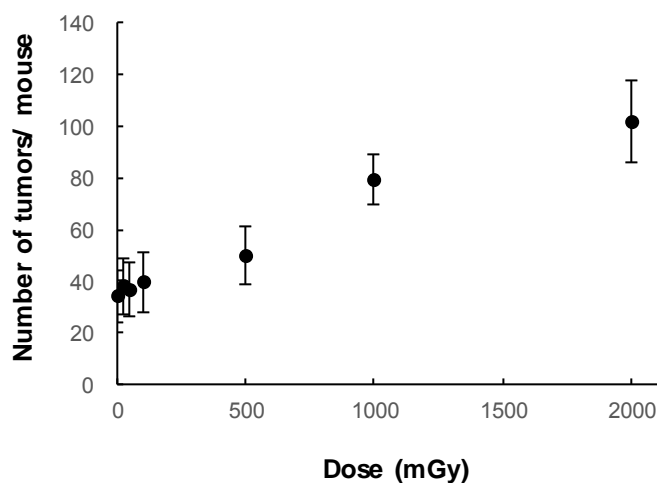
その結果を図 7 に示した。非照射群では、マウス一匹あたりの腫瘍数が約  $35.1 \pm 12.3$  だったが、0.02 Gy、0.05 Gy、0.1 Gy、0.5 Gy 照射により  $34.1 \pm 10.0$ 、

38.1±10.7、36.8±10.7、39.6±11.3、50.0±11.2となり、線量増加に依存して、有意に腫瘍数の増加が観察された。統計解析を行った結果、0.1 Gy、0.5 Gy 照射群において、非照射群と比較して、有意な腫瘍の増加が観察された。0.02 Gy、0.05 Gy 照射群では、非照射群と比較して、腫瘍数の増加が観察されたが、有意差は検出されなかった。

表2. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量放射線発がん実験

Dose	Dose rate	No. of mice	No. of intestinal adenoma/ mouse	p-value (vs. 0 Gy)
0 Gy	-	112	34.1±10.0	-
0.02 Gy	262 Gy/ day	32	38.1±10.7	0.054
0.05 Gy	262 Gy/ day	24	36.8±10.7	0.239
0.1 Gy	262 Gy/ day	19	39.6±11.3	0.032
0.5 Gy	262 Gy/ day	26	50.0±11.2	<0.01

図7. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量放射線発がん実験



#### (4) まとめ

B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いて、低線量放射線発がん実験を行った。その結果、マウス 1 匹当たりの腫瘍の数は、線量依存的に増加することを明らかにした。また、0.1 Gy といった低線量被曝においても有意な腫瘍の増加を検出することに成功した。B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスにおいて、放射線の被曝線量と腫瘍の増加数に関する詳細な解析およびヒト疫学研究結果との比較については、3.5.7、3.5.8 で後述する。

### 3.1.2 低線量率放射線発がん実験 (H27-H29)

#### (1) 目的

福島原発事故で露呈した、低線量放射線長期被ばくの影響は、未解明の部分が多く残されている。一般に総線量が同一の場合、単位時間当たりの放射線量として定義される線量率が低くなると、引き起こされる生物学的効果は減弱することが知られている(9)。これを線量率効果と呼ぶ。インド・ケララ地方(3)や中国・広東省陽江市などの高自然放射線地域での疫学調査は、原爆被爆者のものに比べると、総線量あたりのリスクの増加が見られず、発がんについても線量率効果が見られることが知られている。しかしながら、これまでの実験動物を用いた発がん研究では、肺、卵巣がんなどで線量率効果が見られる一方で、ハーダー腺、乳腺の一部では線量率効果がないか、ほとんどみられないことが報告されている(10)。このように、同一の系統でも、臓器ごとに発がんの線量率効果の有無が見られるため、最終的な結論には至っていない。同様に、放射線誘発白血病では観察される線量率効果の程度は、系統によって異なることがいくつかの同様の報告から推測されている(10, 11)。

このように、線量率を下げることで、発がんリスクの低下が多くの系統・臓器で観察されることから、低線量放射線発がんリスクにおける線量率の影響を明らかにするためには、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いることが必要となる。前述の通り、我々は放射線高発がん性モデルマウスの開発を行い、*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスを用いることで低線量発がんリスクの解明が行える可能性が示された。本研究の目的は低線量放射線による発がんリスクにおける線量率効果をとらえるために、放射線高発がん性モデルマウスを用い、発がん実験を行うことである。

## (2) 試験方法

動物実験は国立大学法人広島大学動物実験委員会により安全面および倫理面の審査を受け、承認された方法によって実施した。また、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したがい、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行った。

### ① マウスの繁殖

図3に示すように、繁殖に適した8週齢以上の *Apc<sup>Min/+</sup>*メスマウス (C57BL/6N(B6)) と *Apc<sup>+/+</sup>*オスマウス (B6-Ch18<sup>MSM</sup>) を準備し、かけあわせを行った。妊娠したメスマウスを別ケージに移動させ、毎日観察することにより出産日を記録した。得られた仔マウスは、生後11日目に、②に示す方法で放射線照射を行った。

図8. 低線量率γ線照射装置と照射方法



ウスは、生後11日目に、②に示す方法で放射線照射を行った。

### ② マウスの放射線照射

前述のマウスを原爆放射線医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低線量率γ線照射装置 (PSCT-3003HS、ポニー工業株式

会社)で照射を行った(図8)。あらかじめ飼育ケージごとに線量評価を行い、総線量 0.1 Gy (線量率 0.2、262 Gy/day)、0.5 Gy (線量率 0.01、0.05、1、4、262 Gy/day)、2 Gy (線量率 0.2、262 Gy/day)となるよう照射を行った。

### ③ マウスの飼育と組織採取

マウスの飼育は原爆放射線医科学研究所動物実験計施設内の動物飼育スペースにて行った。餌と水はそれぞれ NMF (オリエンタル酵母工業株式会社、東京)ならびに水道水を自由摂取させた。マウスは1ケージあたり4、5匹で飼育し、週1回のケージ交換ならびに、週2回の給水瓶の交換を行った。約4週齢時に、マウスの尻尾からDNAを抽出し、genotypingにより *Apc<sup>Min/+</sup>*マウス、*Apc<sup>+/+</sup>*マウスの判定を行った。定期的にマウスの様子を確認し、マウスが衰弱した場合には、屠殺し、解剖を行い、小腸を採取した。採取した小腸は、その後、アルカリフォスファターゼ染色を行った。また、一部の腫瘍は実体顕微鏡下でピンセットを用い、1つずつ採取を行い、凍結保存した。

### (3) 試験結果及び考察

業務1、2年目に、低線量率発がん実験を実施した。発がんから得られた小腸は、その後、アルカリフォスファターゼ染色を行い、実体顕微鏡を用いて腫瘍を計測した。業務3年目は、前年度開始した低線量率発がん実験、総線量 0.1 Gy、2 Gy のマウスを屠殺し、小腸腫瘍数を計測した。

表3. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-1

Dose	Dose rate	Exposure time	No. of mice	No. of intestinal adenoma/mouse	p-value (vs. 0 Gy)
0 Gy	-	-	76	32.8±10.9	-
0.1 Gy	0.2 Gy/ day	12 hrs	32	41.3±10.6	<0.01
0.1 Gy	262 Gy/ day	36 sec	19	39.6±11.0	0.02

表4. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-2

Dose	Dose rate	Exposure time	No. of mice	No. of intestinal adenoma/mouse	p-value (vs. 0 Gy)
0 Gy	-	-	76	32.8±10.9	-
0.5 Gy	0.01 Gy/ day	50 days	32	47.4±14.2	<0.01
0.5 Gy	0.05 Gy/ day	10 days	15	48.3±13.0	<0.01
0.5 Gy	1 Gy/ day	12 hrs	6	57.8± 6.4	<0.01
0.5 Gy	4 Gy/ day	3 hrs	6	53.0±16.0	<0.01
0.5 Gy	262 Gy/ day	3 min	20	47.6±10.0	<0.01

表5. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-3

Dose	Dose rate	Exposure time	No. of mice	No. of intestinal adenoma/mouse	p-value (vs. 0 Gy)
0 Gy	-	-	76	32.8±10.9	-
2 Gy	0.2 Gy/ day	10 days	32	98.8±20.1	<0.01
2 Gy	262 Gy/ day	11 min	15	97.0± 9.1	<0.01

図9. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-1

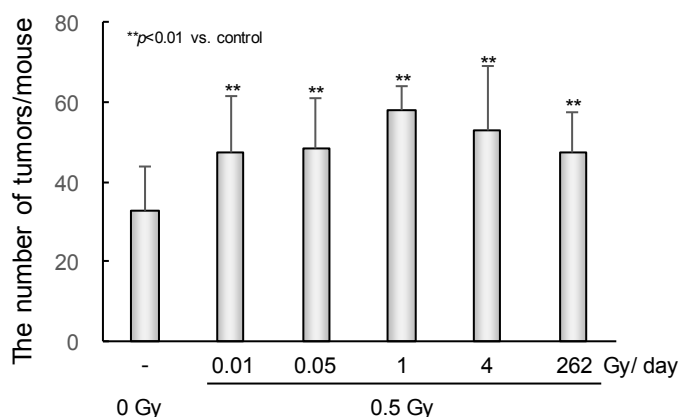
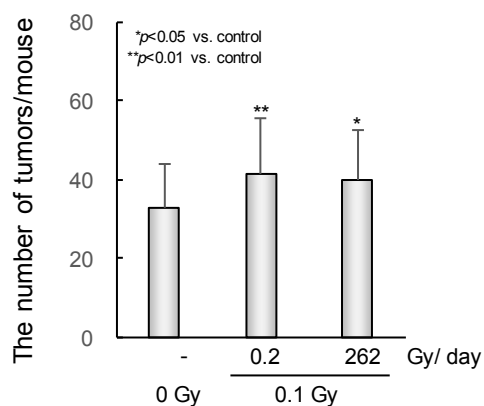


図10. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験-2



その結果を表3~5、図9、10に示した。非照射群では、マウス一匹あたりの腫瘍数が約32.8±10.9だったが、0.5 Gy照射により、線量率の異なる全ての照射群において、非照射群と比較して有意な腫瘍の増加が観察された。また、線量率（0.01 Gy/day～262 Gy/day）の違いによる腫瘍発症頻度への影響を調べた結果、線量率の違いによる腫瘍数の差は検出されなかった。また、我々のこれまでの研究から、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスにおいては、放射線被ばく時の年齢により、放射線発がん感受性が変化することを明らかにしている。そのため、長期放射線被ばくにおいては、被ばく時年齢が発がんリスクに影響を与えるといえる。

また、総線量を 0.1 Gy、2 Gy と変化させた場合においても、本研究で用いた線量率の範囲において、線量率効果は観察されなかった (図 9、10)。図 9 から明らかなように、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスにおいては、総線量 0.5 Gy、線量率 0.01 Gy/day から 262 Gy/day の範囲においては、線量率に最大約 26,000 倍の違いがあるにも関わらず、明らかな線量率効果はみられないといえる。これまでに我々は、遺伝的背景の異なる B6/B6-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いて、総線量 0.5 Gy (線量率 1 Gy/day~262 Gy/day) の範囲において線量率効果が観察されたことから、放射線発がんにおける線量率効果には、遺伝的背景が大きく関与することが示唆された。

#### (4) まとめ

B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いて、総線量 0.1 Gy、0.5 Gy、2 Gy、線量率 0.01 Gy/day~262 Gy/day の範囲において、低線量率放射線発がんを行った。その結果、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスにおいては、今回用いた線量、線量率の放射線被ばくによる腫瘍誘発には、線量率効果がみられなかった。一方、これまでの我々の研究で、B6/B6-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを用いた低線量率放射線発がん実験では、線量率効果が観察されることから、*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの放射線発がんにおける線量率効果には遺伝的背景が大きく影響することが明らかにされた。

### 3.2 放射線発がん高感受性モデルマウスの開発 (H27-H29)

#### 3.2.1 目的

本研究では、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを用いることにより、低線量・低線量率放射線被ばくによる遺伝子変異を高感度に検出することを試みている。近年の研究から、がん細胞には遺伝的変異に加えて、様々なエピジェネティック変異が蓄積していることが報告されている(12)。エピジェネティック変異は、大腸がんを含む様々な組織のがんの形成機構に関与することが知られている。特に、骨髄異型性症候群 myelodysplastic syndromes (MDS) では、ゲノムワイドの遺伝子解析によりエピジェネティック制御遺伝子の変異が次々と同定され、エピジェネティクス機構の発がんへの重要性が示唆されている (13)。また、固形がんにおいても、エピジェネティクス機構に関与する遺伝子の変異や過剰発現が報告されている。

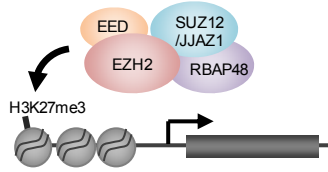
そこで、本研究では、エピジェネティック制御に関する遺伝子に着目をし、放射線発がんを高感受性を示すマウスの開発に取り組むことを目的とする。

#### 3.2.2 放射線発がん高感受性モデルマウス作製のためのプラスミドベクター作成 (H27、H28)

業務 1 年目は、ベクター構築のための情報収集を行い、*Villin* 遺伝子のプロモーターには、主に消化器や泌尿器系の上皮細胞で発現していることが知られている *Villin* を用いることとした。また目的遺伝子として、図 11 に示す PRC2 とよばれるポリコーム群の構成因子である *mEzh2* 遺伝子を用いることとした。

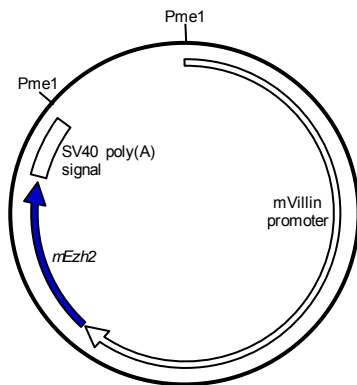


図11. PRC2複合体



PRC2 (Polycomb Repressive Complex2)  
 ポリコム抑制複合体  
 H3ヒストンLys27(H3K27)をトリメチル化する  
 4つのサブユニットからなる

図12. *Villin-mEzh2*プラスミドベクター

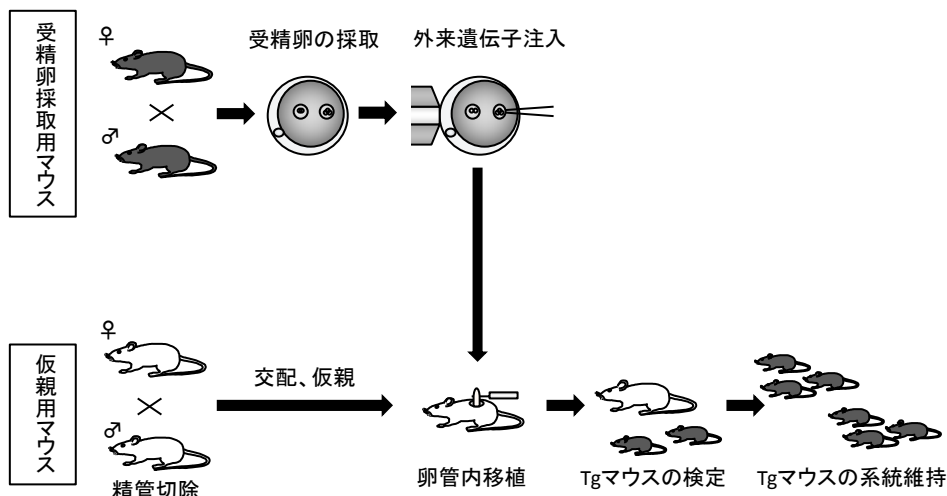


そこで、業務2年目に、*Villin*プロモーターの下流に *mEzh2* をつないだプラスミドベクターの設計を行い、primerを設計した。*mEzh2* の挿入されたプラスミドを鋳型とし、設計したプライマーを用いてPCRを行った。一方 *Villin*の挿入されたプラスミドを制限酵素 (Xho1)で切断し、増幅したPCR産物 Gibson Assembly システムを用いて、*Villin*プロモーター、*mEzh2* 遺伝子がそれぞれ入ったDNA断片のつなぎ合わせを行った。その後、大腸菌に transformation 行い、得られコロニーからプラスミドを精製した。

PCRにて増幅を行ったDNA配列については、シーケンサーを用いて、PCRで増幅した *mEzh2* の塩基配列に変異が入っていないことを確認した。作成したプラスミドを図12に示す。

### 3.2.3 *Villin-mEzh2* 過剰発現マウス (*Villin-mEzh2* Tgマウス) 作製 (H28、H29)

図13. トランスジェニックマウス作製の概要



#### 図14. Genotyping結果



メス6匹、オス7匹が生まれ、genotypingの結果、2匹のマウスにtransgeneが挿入されていることを確認し、それぞれ、R1-3、R1-11と名付けた。

Tg マウス作成の概要を図13に示した。まず、精管切除マウスを作成し、それを用いて、偽妊娠

マウスを作成した。業務3年目に、受精卵を採取し、3.1.2で作成した精製済みプラスミドを受精卵前核に顕微注入し、偽妊娠マウスに移植した。その結果、メス6匹、オス7匹の計13匹が出産した。生後4週齢で、genotypingを行った結果、13匹中2匹にtransgeneが挿入されており、それぞれ、R1-3、R1-11と命名した(図14)。その後、R1-3、R1-11マウスの2ラインはそれぞれ、野生型マウスと掛け合わせを行い、transgeneが次世代に伝達されていることを確認した。

#### 3.2.4 まとめ

放射線発がん高感受性モデルマウスの開発を目指し、エピジェネティック制御に関与する遺伝子に着目し、エピジェネティック制御に関する遺伝子を改変したマウス *Villin-mEzh2* Tg マウス(R1-3)、*Villin-mEzh2* Tg マウス(R1-11)の2ラインを作成することに成功した。今後、このマウスを増やし、放射線発がん実験や、*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスと掛け合わせることで、新たな放射線発がん高感受性マウスの樹立並びに、放射線発がんにおけるエピジェネティック変異の関与について明らかにされることが期待できるといえる。

### 3.3 遺伝子変異解析 (H27-H29)

#### 3.3.1 目的

原爆被爆者の疫学調査では、胃、肺、結腸、乳腺、肝臓、卵巣がんなど様々な臓器で発がんリスクが高まることが報告されている(14)。しかしながら、非被爆者にも同様のがんの発生は観察されるため、被爆者に発生したがんが真に原爆被爆に起因するのか、明らかにすることはできない。これまで分子生物学的な解析などを通し、放射線の爪痕を見いだす努力が多く研究者によって払われてきた。しかしながら、特に固形腫瘍ではその分子機構はほとんど明らかにされていないのが現状である。放射線発がんリスク、特に低線量や低線量率長期被ばくによるリスクを解明するためには、発がん頻度を見るだけではなく、その分子メカニズムも明らかにする必要がある。

我々が本研究で用いる *Apc<sup>Min/+</sup>*マウスは、ヒト大腸腺腫症(Adenomatous Polyposis Coli, APC)のモデルマウスとして知られており、放射線や化学物質に対し発がん感受性が高いマウスである。原爆被爆者の疫学調査でも大腸がんのリスクは高く、放射線発がん研究において *Apc<sup>Min/+</sup>*マウスの有用性は疑う余地が無い。

*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスは、*Apc* がん抑制遺伝子が正常に機能する正常側アリルと変異をもつ *Min* アリルを有し、正常側アリルに生じた1ヒット(変異)で、がんが誘発される。そのため、この正常アリルに生じた変異を調べることで、放射線の爪痕を探すことが可能になる。このような *Min* アリルに変異がない対側の正常アリルに新たに変異が入ることで引き起こされる現象をヘテロ接合性の消失(Loss of Heterozygosity, LOH)と呼び、その解析をLOH解析と

呼ぶ。さらに、*Apc*<sup>Min/+</sup>マウスは、放射線に特有の遺伝子変異（放射線の爪痕）を検出することができるという利点を持つ。

そこで、本研究の目的は *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを用いた低線量・低線量率放射線被ばくによって誘発された腫瘍を用いて、遺伝子変異解析を行うことにより、放射線誘発小腸腫瘍の分子メカニズム解析を通して、低線量や低線量率長期被ばくによるリスクを明らかにすることである。

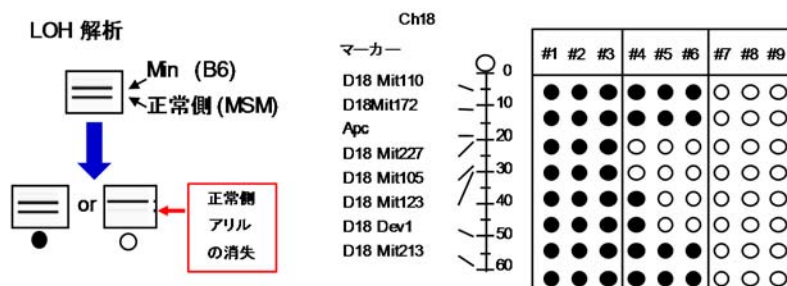
### 3.3.2 試験方法

#### (1) DNA 抽出

これまでの B6/B6-Ch18 MSM-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスの放射線発がん実験から得られた腫瘍を用いて、QIAamp DNA micro Kit(QIAGEN)により DNA の抽出を行った。得られた DNA は微量分光光度計(Nanodrop ND-1000、Thermo Scientific 社)にて DNA の濃度測定を行い、最終濃度を 1  $\mu$ g/ml に調製した。

#### (2) LOH 解析

図 15. LOH解析の概要

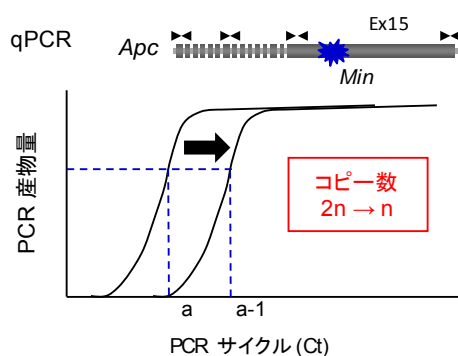


腫瘍から抽出した DNA を用いて、図 10 に示すように 18 番染色体上に存在するマイクロサテライト (Mit) マ

ーカーと呼ばれる領域にプライマーを設計し、PCR を行った。その後、Experion™ 電気泳動ステーションを用いて、増幅された PCR 産物の定量を行い LOH の判定を行った (図 15)。

#### (3) 定量的 PCR 解析

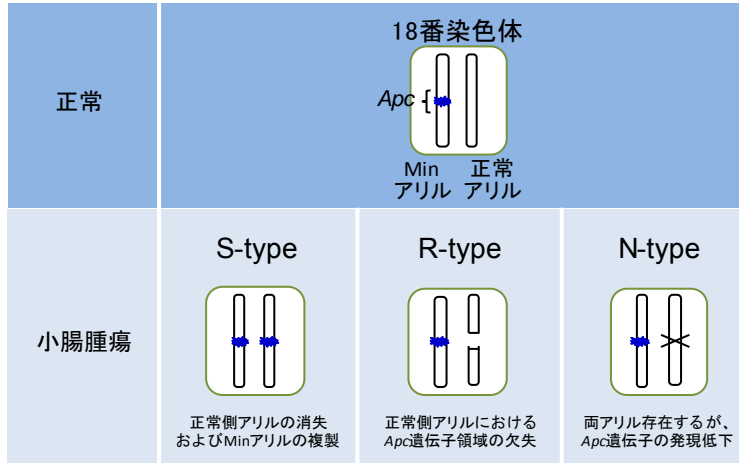
図 16 qPCR法の概要



定量的 PCR 法の概略を図 16 に示した。得られた DNA を用いて、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンスライフテクノロジーズジャパン株式会社、日本)にて定量的 PCR を行った。鋳型 DNA の補正には、ハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -actin を用いた。

### 3.3.3 試験結果及び考察

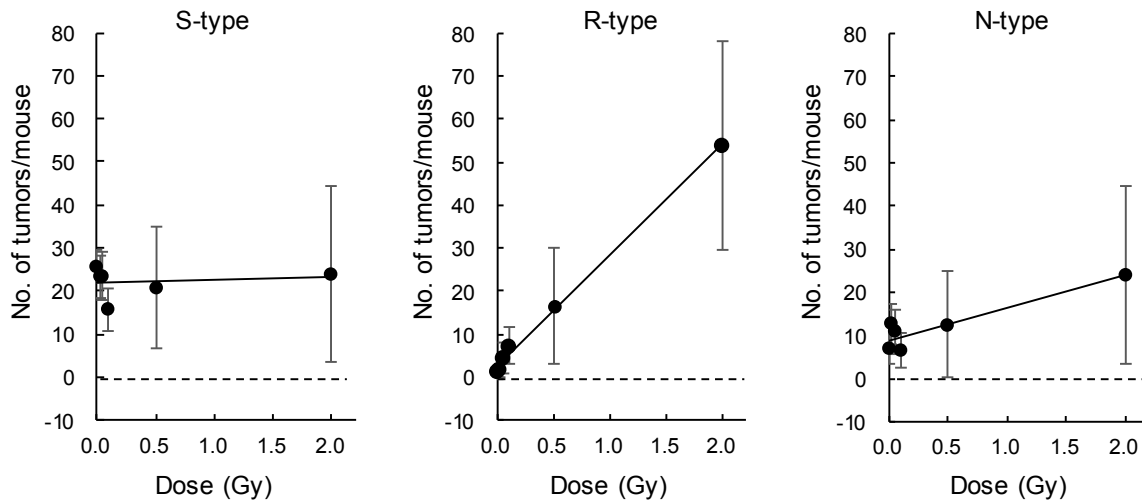
図17.  $Apc^{Min/+}$ マウスで検出された遺伝子変異の概要



業務1、2年目は、LOH解析や定量的PCR解析を行うことにより、 $Apc^{Min/+}$ マウスの小腸腫瘍で検出される変異スペクトラムの同定を行い、遺伝子変異を図17のように分類することに成功した。中でも、欠失型は放射線誘発腫瘍に特有の遺伝子変異であることを明らかにした。

そこで、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1  $Apc^{Min/+}$  マウスを用いた放射線発がん実験から得られた腫瘍を用いて遺伝子変異解析を行った。検出された遺伝子変異のうち、R-type 腫瘍は放射線誘発腫瘍に特有であった。業務1、2年目は、0.5、2 Gy 照射により得られた腫瘍を用いて、遺伝子変異解析を行った。業務3年目は、0.02、0.05、0.1 Gy 照射により得られた腫瘍を用いて、遺伝子変異解析を行った。検出された各遺伝子変異の割合をマウス1匹あたりの腫瘍数に推定した結果を図18に示した。マウス1匹あたりのR-type 腫瘍の数は、線量依存的に増加した。次に、B6/B6-F1  $Apc^{Min/+}$  マウスを用いた放射線発がん実験から得られた

図18. B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1  $Apc^{Min/+}$ マウスを用いた発がん実験における各遺伝子変異頻度の線量効果反応



腫瘍を用いて遺伝子変異解析を行った。その結果、B6/B6-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスにおいても、マウス一匹あたりの R-type 腫瘍数が、線量依存的に増加した。B6/B6-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウス、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスにおける、単位線量当たりのマウス一匹あたりの R-type 腫瘍数は、ほぼ同程度であった。このことから、両マウスとも、欠失型を起こす機構が同じであると推測される。

### 3.3.4 まとめ

B6/B6-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウス、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスを用いた放射線発がん実験から得られた腫瘍を用いて遺伝子変異解析を行い、3 種類の遺伝子変異を検出し、変異スペクトラムの同定に成功した。得られた遺伝子変異の割合をマウス 1 匹あたりの腫瘍の数に、放射線誘発腫瘍に特有に検出された R-type 腫瘍の割合をマウス一匹あたりの腫瘍の数の推定を行った。その結果、B6/B6-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウス、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスともに、マウス一匹あたりの R-type 腫瘍の数は、線量依存的に直線的に増加することを明らかにした。

## 3.4 エピジェネティック変異解析（再委託先：量子科学技術研究開発機構）（H27-H29）

### 3.4.1 目的

放射線防護において、発がんリスクはしきい値なし直線仮説により評価されている。この仮説は、放射線によって生じる DNA の二本鎖切断や、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結果に支持されるほか、発がんにおける放射線の主要な作用が遺伝情報の変化以外にないことを前提としている。実際には、放射線発がんに関与し得るその他の生物学的作用が知られ、エピジェネティックな影響と呼ばれている。エピジェネティックとは、DMA 塩基配列の変化を伴わず遺伝子の発現を制御、伝達するシステムの総称であり、その代表的なシステムとして、DNA のメチル化や、DNA の構造変化を制御するヒストン蛋白質のメチル化、アセチル化が知られている。しかしながら、エピジェネティックな影響の放射線発がんへの関与は十分理解されていない。

発がんにおけるエピジェネティック異常の重要性は、がん細胞におけるがん抑制遺伝子の高メチル化や、がん遺伝子の低メチル化による発現異常以外にも、メラノーマ腫瘍ゲノムが核移植により正常にリプログラミングされる現象 (30) や、DNA メチル基転移酵素の発現を低下させたマウスが、ゲノム DNA 低メチル化の誘導により、がんを発症する (31) といった研究等により示されてきた。多段階発がん機構の研究が進んでいる大腸がん等において、発がん過程におけるエピジェネティック異常の関与が明らかにされており、近年では、ヒト腫瘍におけるゲノム網羅的な配列解析から、様々な腫瘍においてエピジェネティック制御に機能する多くの遺伝子に異常がみられることが報告されている (4)。

そこで、低線量・低線量率被ばくにより発生したマウス腸腫瘍における放射線の爪痕となるエピジェネティック変異の検出、定量を行うため、昨年度までに放射線誘発腫瘍、自然発生腫瘍、正常組織における *Apc* 遺伝子転写開始点近傍における候補領域のバイサルファイトシーケンスの条件を決定した。今年度は実際に放射線誘発腫瘍における *Apc* 遺伝子プロモーター領域のバイサルファイトシーケンスを行った。さらに微量 DNA サンプルを用いたメチ

ル化 DNA の濃縮を行い、次世代シーケンサーを用いて、DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析を行った。

### 3.4.2 試験方法

#### (1) マウス *Apc* 遺伝子プロモーター領域の配列解析と DNA メチル化状態解析

##### ① 文献によるマウス *Apc* 遺伝子 CpG アイランド探索

昨年度に見出したマウス *Apc* 遺伝子プロモーター領域での CpG アイランドに加え、ヒト *APC* 遺伝子で報告のある CpG アイランドについて、マウスでも類似の配列が存在するか検討した。ヒト *APC* 遺伝子では 1A ならびに 1B と呼ばれる二つのプロモーターからの転写物の知られており、特に 1A の異常なメチル化がヒト腫瘍では報告されている (17)。UCSC ゲノムデータベース (<https://genome.ucsc.edu/>) を用いて、ヒト 5 番染色体上に存在する *APC* 遺伝子の 1A 領域のゲノム配列情報を検索した。また、ヒトと比較して、マウスで 1A 領域から始まる転写物の転写開始点上流の配列情報を検索した。

##### ② 配列情報の取得と PCR プライマーの設計

上述の取得した配列情報をもとに、ウェブ設計ツール MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) を用いて、バイサルファイトシーケンシング法に用いる PCR プライマーを設計した。

##### ③ DNA 抽出

冷凍保存した組織試料から、フェノール・クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿によりゲノム DNA を抽出した。すなわち、剪刀により細切した組織片を、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、及びプロテナーゼ K を含む緩衝溶液中で膜成分の変性と蛋白質の消化を行い、RNA 分解酵素によって RNA を除去した。この細胞溶解液からフェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、及びクロロホルム抽出によって蛋白質を変性、除去して、エタノール沈殿により DNA を析出させ、緩衝液に溶解した。抽出した DNA 溶液の濃度、及び純度を、微量分光光度計 (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific 社) によって測定した波長 260nm 及び 280nm の吸光度に基づいて計算した。

##### ④ バィサルファイトシーケンス

③で抽出した最大 300ng の DNA を用い、バイサルファイトシーケンスを行った。バイサルファイト処理は CpGenome Turbo Bisulfite Modification Kit (Merck Millipore 社) を用い、プロトコールは本キット付属のものに従った。処理した DNA について、前年度に確立した各領域のプライマーセットを用い、PCR 反応を行った。その後、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。その PCR 産物を用い、TA cloning (TOPO TA Cloning Kits, Thermo Fisher Scientific 社) を行った。PCR 産物が挿入されたプラスミドを持つ大腸菌コロニーについて、illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE ヘルスケア・ジャパン) によりプラスミド DNA を増幅し、サ

イクルシーケンスを行い、配列を決定した。

## (2) 次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析

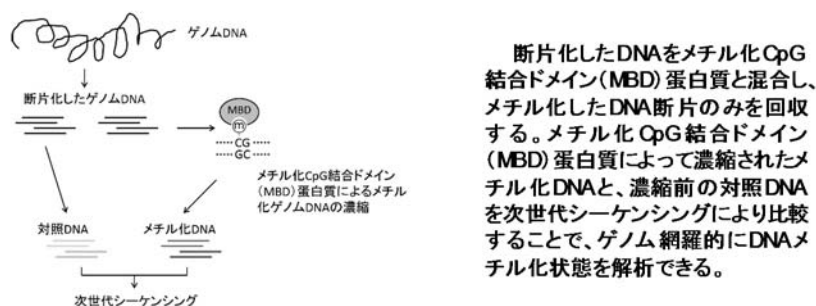
### ① DNA の精製

放射線誘発マウス小腸腫瘍、自然発生マウス小腸腫瘍、正常組織から抽出された DNA サンプルから RNA を完全に除くため、RNA 分解酵素によって RNA を除去した。精製した DNA 溶液の濃度、及び純度を、微量分光光度計 (NanoDrop ND-1000、Thermo Scientific 社) と蛍光光度計 (Qubit、Thermo Scientific 社) によって測定した。

### ② 微量 DNA サンプルを用いたメチル化 DNA の濃縮

DNA 断片化装置 (Covaris、エムエス機器社) を用いて、腫瘍から抽出されたゲノム DNA を 200~600 塩基対の長さになるよう断片化した。100 ng の断片化 DNA に対し、0.35 · g のメチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) -ビオチン融合蛋白質結合磁気ビーズを加え、室温で 1 時間保温することにより、メチル化した DNA 断片をメチル化 CpG 結合ドメインに結合させた。洗浄用緩衝液を加えた後、磁気を利用し、磁気ビーズを反応チューブの側面に固定、洗浄用緩衝液を除くことで、メチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) に結合しなかった非メチル化 DNA 断片を除去した。高濃度塩溶液 (2000 mM NaCl) を用いて、メチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) に結合したメチル化 DNA 断片を溶出し、エタノール沈殿によりメチル化 DNA 断片を抽出、及び精製した (図 19)。

図 19. メチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) 蛋白質を用いたメチル化 DNA の濃縮と解析



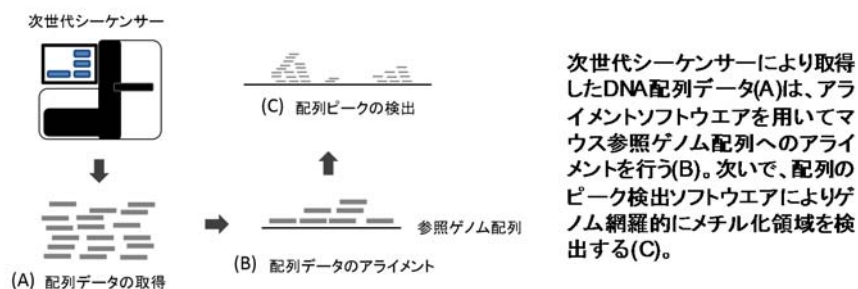
### ③ 次世代シーケンサーによる DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析

サンプルの調整には、メチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) タンパク質により回収したメチル化 DNA と対照 DNA 各 5 ng を用いた。断片化 DNA の末端修復、DNA 末端へのシーケンシング用アダプター配列の付加を行った。放射線誘発マウス腸腫瘍、自然発生マウス腸腫瘍に由来する DNA から調整したサンプルを用いて、次世代シーケンサー (NextSeq 500、イルミナ社) による DNA 配列データの取得を行った。取得した DNA 配列データは、アライメントソフトウェア (Bowtie) によるマウス参照ゲノム配列へのアライメントを行い、配列ピーク検出ソフトウェア (MACS) によるメチル化領域の検



出を行った（図 20）。その後、検出されたメチル化領域について、アノテーションソフトウェア（Snpeff）によるゲノム情報の付与を行った。腫瘍に共通して検出されるメチル化領域の同定は、解析ソフトウェア（BEDtools）を用いて行った。

図 20. 次世代シーケンサーによるDNAメチル化状態のゲノム網羅的解析



### 3.4.3 試験結果および考察

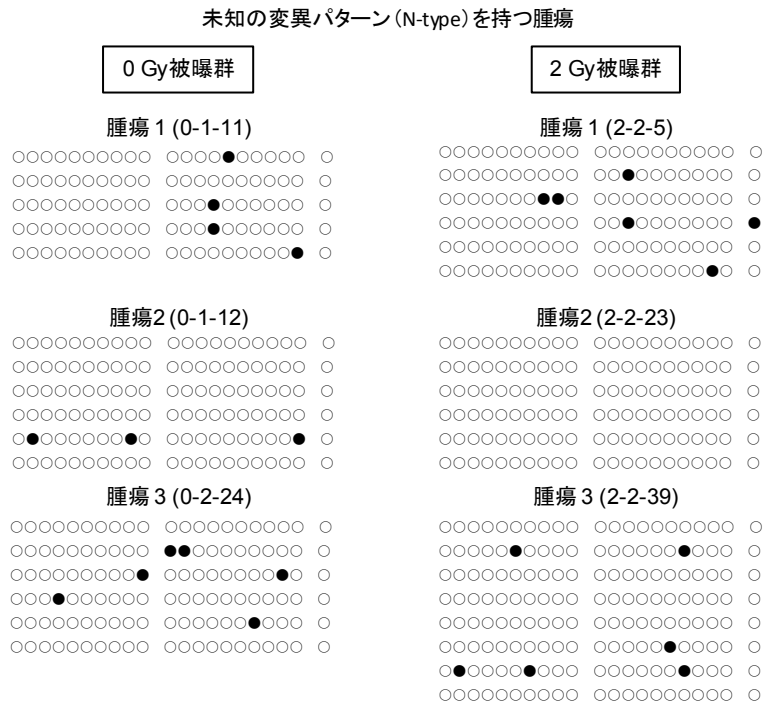
マウス *Apc* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態解析では、業務 1、2 年目で、マウス *Apc* 遺伝子の転写開始点近傍に存在する CpG アイランド（mm10、CpG 登録番号 95）について、バイサルファイトシーケンシングの条件を決定した。CpG アイランドが比較的長いことから、2つの領域に分け、前半を 296 bp（CpG 数：29）、後半を 529 bp（CpG 数：64）として解析を行った（図 21、22）。同様にヒト APC 遺伝子の異常なメチル化が知られている 1A 領域についても、バイサルファイトシーケンスの条件を決定した（図 23）。3.3 での遺伝子型解析により、得られた腫瘍を S-type、R-type、N-type に分類した。業務 3 年目では、そのうち、本解析の目的である、N-type のタイプの腫瘍について、本年度前述の実験条件で解析を行ったところ、有意なメチル化の変化を見出すことはできなかった。遺伝子発現は減少していたことから、*Apc* 遺伝子の現象はプロモーター領域メチル化では説明できないことが明らかとなった（図 24）。

次にメチル化 CpG 結合ドメイン（MBD）タンパク質を用いてメチル化 DNA を回収し、次世代シーケンサーによる DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析を行った。業務 1、2 年目は、次世代シーケンサーを用いた条件検討を行った。業務 3 年目には、腫瘍サンプル数を増加し、次世代シーケンサーにより各サンプル約 20~40 億塩基の配列データを取得した。取得した配列のマウス参照ゲノム配列へのアライメント率は、対照 DNA サンプルは平均 90%、メチル化 DNA を濃縮した DNA サンプルは平均 70%であった（表 6~9）。濃縮 DNA 配列には、CpG アイランドといった C や G 塩基に偏りのある配列が多いと予測されることから、一部の配列については、参照ゲノム配列へのアライメントが困難であった可能性が考えられた。対照 DNA サンプルに対し、濃縮 DNA サンプルにおいてメチル化 DNA が濃縮されている領域を検出した結果、自然発症腫瘍、放射線誘発腫瘍共に、ゲノム上約 3 千~3 万箇所においてメチル化領域が検出された（表 6~9）。業務 3 年目は、自然発症腫瘍と放射線誘発腫瘍のゲノム全体における DNA メチル化領域の分布を解析したところ、染色体レベルでは、DNA メチル化領域を解析したところ、染色体レベルでは、DNA メチル化領域の割合は大きく変わらないこ



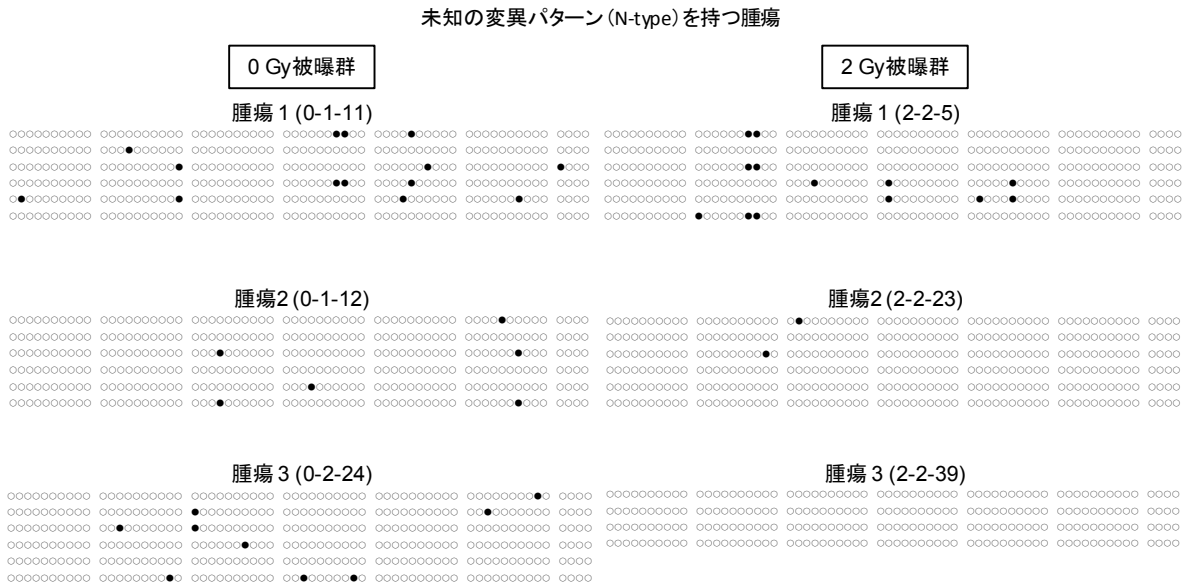
とが分かった (図 25)。

図 21. パイサルファイトシーケンスによる *Apc* 遺伝子エピジェネティック変異結果-1



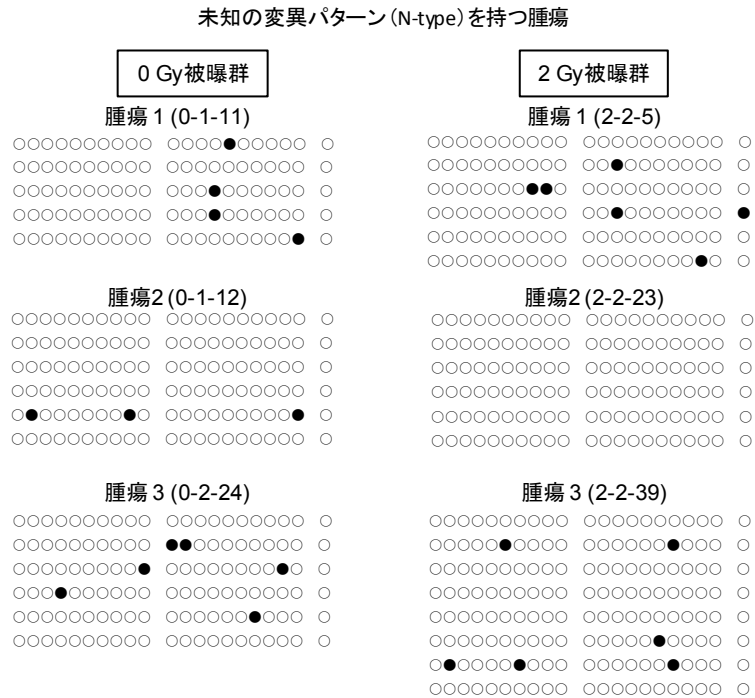
*Apc* 遺伝子の転写開始点近傍に存在する CpG アイランド (mm10、CpG 登録番号 95) のうち、前半部分 (296 bp、CpG 数: 29) の解析結果。丸が各 CpG に対応し、白丸が非メチル化、黒丸がメチル化状態を示す。サンプルあたり 5~8 クローンのメチル化状態を解析して示している。

図 22. パイサルファイトシーケンスによる *Apc* 遺伝子エピジェネティック変異結果-2



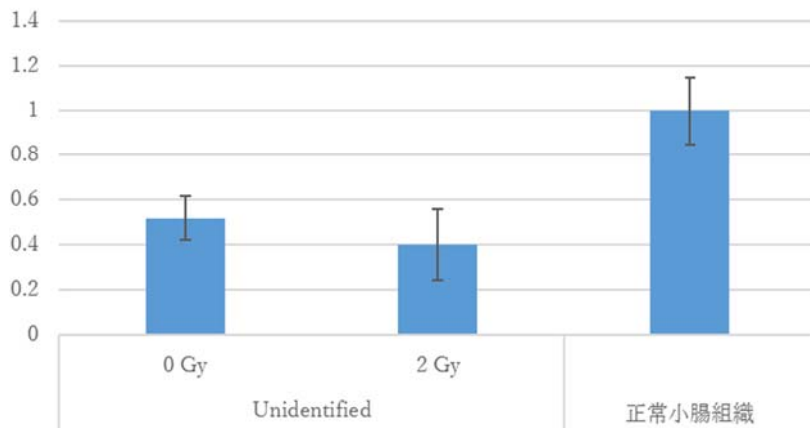
*Apc* 遺伝子の転写開始点近傍に存在する CpG アイランド (mm10、CpG 登録番号 95) のうち、後半部分 (529 bp、CpG 数: 64) の解析結果。丸が各 CpG に対応し、白丸が非メチル化、黒丸がメチル化状態を示す。サンプルあたり 4~6 クローンのメチル化状態を解析して示している。

図23. バイサルファイトシーケンスによる*Apc*遺伝子エピジェネティック変異結果-3



ヒト*APC*遺伝子プロモーター領域1Aに相当するマウスCpG領域 (459 bp, CpG数: 21) の解析結果。丸が各CpGに対応し、白丸が非メチル化、黒丸がメチル化状態を示す。サンプルあたり4~6クローンのメチル化状態を解析して示している。

図24. *Apc*遺伝子発現量解析結果



**表6. 次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、及び検出された DNA メチル化領域の数(自然発症腫瘍サンプル1～5)**

サンプル	腫瘍 1	腫瘍 2	腫瘍 3	腫瘍 4	腫瘍 5
検体番号	0-1-1	0-1-2	0-1-16	0-1-17	0-2-8
配列を取得した対 照 DNA の塩基数	3,664,379,932 塩基	2,988,262,162 塩基	2,166,578,391 塩基	2,345,254,779 塩基	2,666,679,967 塩基
配列を取得した濃 縮 DNA の塩基数	3,624,011,890 塩基	3,083,274,743 塩基	2,597,123,481 塩基	2,554,904,708 塩基	2,431,035,300 塩基
対照 DNA 配列のア ライメント率(%)	93.15	91.04	89.90	89.17	87.98
濃縮 DNA 配列のア ライメント率(%)	72.35	73.57	68.97	69.57	69.85
検出されたメチル 化領域の数	27,026	12,672	7,716	4,166	3,478

**表7. 次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、及び検出された DNA メチル化領域の数(自然発症腫瘍サンプル6～8)**

サンプル	腫瘍 6	腫瘍 7	腫瘍 8
検体番号	0-2-9	0-2-15	0-2-19
配列を取得した対照 DNA の塩基数	4,054,532,539 塩基	2,877,453,795 塩基	2,680,767,058 塩基
配列を取得した濃縮 DNA の塩基数	3,477,249,371 塩基	3,305,029,069 塩基	2,671,555,976 塩基
対照 DNA 配列のアライ メント率(%)	91.75	89.70	88.66
濃縮 DNA 配列のアライ メント率(%)	68.23	67.61	66.41
検出されたメチル化領 域の数	8,666	7,795	4,205

表8. 次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、及び検出された DNA メチル化領域の数(放射線誘発腫瘍サンプル1~5)

サンプル	腫瘍 1	腫瘍 2	腫瘍 3	腫瘍 4	腫瘍 5
検体番号	2-2-10	2-2-15	2-2-17	2-2-19	2-2-22
配列を取得した対 照 DNA の塩基数	3,370,356,755 塩基	3,352,133,400 塩基	2,770,610,625 塩基	2,386,788,356 塩基	3,580,518,279 塩基
配列を取得した 濃縮 DNA の塩基 数	4,485,990,4 67 塩基	3,438,089,9 50 塩基	27,11,041,7 11 塩基	3,120,952,6 01 塩基	2,989,833,8 45 塩基
対照 DNA 配列の アライメント率 (%)	92.84	92.42	90.81	88.68	87.21
濃縮 DNA 配列の アライメント率 (%)	73.45	73.19	70.73	70.19	68.42
検出されたメチ ル化領域の数	21,824	12,924	12,168	11,484	3,413

表9. 次世代シーケンシングにより取得した配列、参照ゲノム配列へのアライメント率、及び検出された DNA メチル化領域の数(放射線誘発腫瘍サンプル6~9)

サンプル	腫瘍 6	腫瘍 7	腫瘍 8	腫瘍 9
検体番号	2-2-29	2-2-32	2-2-44	2-2-51
配列を取得した対照 DNA の塩基数	4,697,130,229 塩 基	2,855,155,794 塩 基	2,711,747,070 塩 基	3,193,295,267 塩 基
配列を取得した濃縮 DNA の塩基数	3,539,970,307 塩 基	3,359,663,440 塩 基	2,668,068,270 塩 基	2,466,334,991 塩 基
対照 DNA 配列のアライ メント率(%)	93.15	91.02	89.58	87.12
濃縮 DNA 配列のアライ メント率(%)	70.73	70.00	68.58	67.22
検出されたメチル化領 域の数	16,628	9,637	4,954	3,828

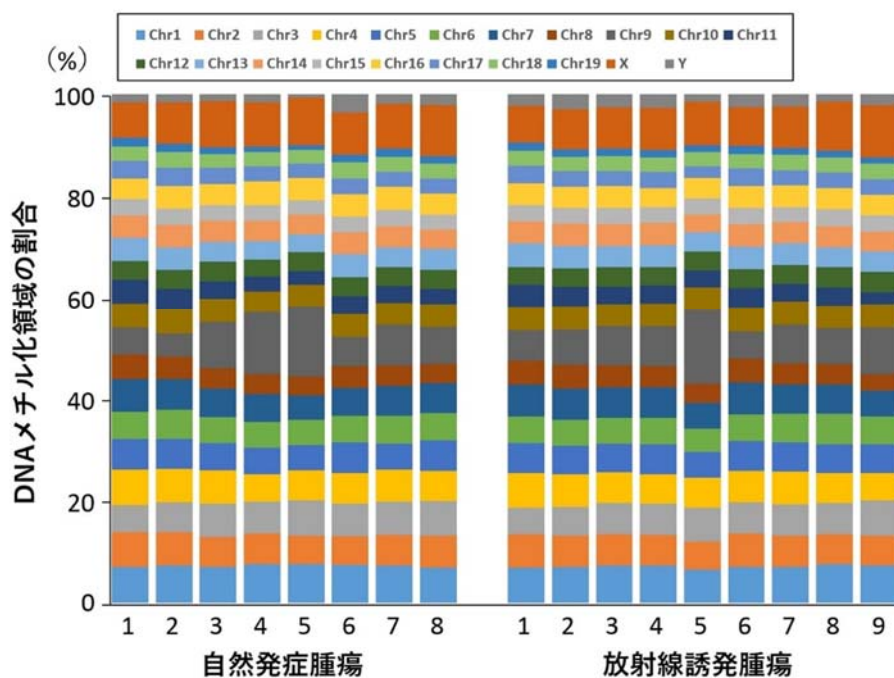
表10. 放射線誘発腫瘍でのみ検出された DNA メチル化領域

検出頻度	DNA メチル化領域の数
87.5% (7/9 検体)	1
66.7% (6/9 検体)	7
55.6% (5/9 検体)	13
44.4% (4/9 検体)	61
33.3% (3/9 検体)	282

表11. 自然発症腫瘍でのみ検出された DNA メチル化領域

検出頻度	DNA メチル化領域の数
62.5% (5/8 検体)	1
50.0% (4/8 検体)	3
37.5% (3/8 検体)	76

図25. 自然発症腫瘍、及び放射線誘発腫瘍において検出されたDNAメチル化領域の分布



しかしながら、放射線誘発腫瘍にのみに検出されるメチル化領域を抽出した結果、放射線誘発腫瘍の3割以上でメチル化されている領域が364箇所存在することが分かった(表10)。放射線誘発腫瘍の5割以上で高頻度にメチル化されている領域として、21箇所の領域を同定した。一方、自然発症腫瘍にのみに検出されるメチル化領域を抽出した結果、自然発症腫瘍の3割以上でメチル化されている領域は80箇所であり、放射線誘発腫瘍と比べ、少ないことが分かった(表11)。これらの結果から、放射線誘発腫瘍に特徴的なDNAメチル化異常が存在することが示唆された。また、自然発症腫瘍に比べ、放射線誘発腫瘍では、共通してメチル化されている領域が多く存在することから、分子生物学的特徴が似た腫瘍が多く発生していると考えられた。

#### 3.4.4 まとめ

未だ知見の乏しい、放射線発がんにおけるエピジェネティックな発がん機構の関与を明らかにすることは、発がんの突然変異説を見直すための科学的根拠を提示することとなり、放射線被ばくによる発がんリスク推定に関わる概念を発展させることに繋がる。また、本研究から明らかにされるエピジェネティック変異は、放射線被ばく後のがんの診断の指標となり得る。さらに、エピジェネティックな異常は、遺伝子の突然変異と異なり可逆的な変化であることから、新しいがんの予防法開発への応用が期待できる。業務1、2年目は、正常組織に加え、自然発生もしくは放射線誘発マウス腸腫瘍における*Apc* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を検討したが、メチル化はほとんど観察されなかった。さらに微量サンプルを用いたメチル化DNA濃縮法の検討を行い、次世代シーケンサーを用いたDNAメチル化状態のゲノム網羅的な解析系の構築を行った。業務3年目は、遺伝子変異解析で分別される、未知の変異パターンを持つ腫瘍について、*Apc* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態の検討を行ったところ、遺伝子発現の減少がメチル化状態の変化に寄るものではないことが明らかとなった。さらに、次世代シーケンサーを用いて、放射線誘発腫瘍、及び自然発生腫瘍におけるDNAメチル化状態のゲノム網羅的な解析を行ったところ、放射線誘発腫瘍に特徴的なDNAメチル化異常が存在することが示唆された。

### 3.5 リスクモデルの構築および発がんリスク評価(再委託先:量子科学技術研究開発機構) (H27-H29)

#### 3.5.1 目的

本研究で得られるマウスでの発がんリスクについてのデータと、ヒトにおけるデータを比較検討するため、放射線リスク評価におけるヒトのデータでの主要な情報源である広島・長崎の原爆被爆者の寿命調査と比較可能な結果を得るため、既存のソフトウェアを用いて過剰相対リスク(ERR)を算出する準備を行った。その後、ヒトでの職業被ばく、医療被ばくによる発がんリスクについての情報を収集し、集めた情報からヒトでの職業被ばく、医療被ばくによる発がんリスクについての過剰相対リスクを算出した。さらに過剰相対リスクが掲載してある文献からも情報も収集した。本研究で得られるマウスでの発がん実験データの解析を行って過剰相対リスクを算出し、ヒトにおけるデータと可能な限り条件を近づけ、両者の比較・検討を行った。

### 3.5.2 原爆被爆者を対象とした寿命調査と Preston ら 2007 の統計解析モデル (H27、H28)

本項目は、業務 1、2 年目に実施した。マウスでの発がんリスクとヒトにおけるデータを比較検討するには、両方のデータを同じモデルにて解析を行うことが必要である。マウスの発がんデータの結果からヒトのリスクについて言及するには、マウスの発がんデータを疫学データの解析モデルを用いて同じ効果の指標を求め、それを比較することが必要である。そこで動物実験の解析の準備として、現在放射線影響研究所のウェブサイト ([http://www.rerf.jp/index\\_j.html](http://www.rerf.jp/index_j.html)) からの申請にて利用可能な原爆被爆者寿命調査の罹患データを取得し、その解析を実行して公開されている論文と同じ結果が得られることを確認した。広島・長崎の原爆被爆者を対象とした寿命調査のデータは、放射線リスクの評価や放射線防護基準の策定に重要な役割を果たしている (29)。この研究の研究デザインは疫学研究における代表的な研究デザインであるコホート研究であり、特定の要因に曝露した集団と曝露していない集団を一定期間追跡し、疾患の罹患率を比較している。

ここでは平成 19 (2007) 年に Preston らが Radiation Research 誌に投稿した「Solid Cancer Incidence in Atomic Bomb Survivors: 1958-1998」のデータを放射線影響研究所のウェブサイトから申請して入手した (29)。この論文の目的は、がんの罹患率と放射線の線量の線量反応関係を記述することであり、その線量反応関係に影響を与える年齢や性別などの因子 (修飾因子) を可能な限り調整し、個々の臓器のリスクの特徴を記述している。固形がんの罹患率の解析は 1958 年の時点でがんを罹患しておらず、1998 年まで追跡した 111,952 名 (男性 45,880 名、女性 66,072 名) を対象とし、そのうち線量評価ができなかった 6,525 人を除く 105,427 名が解析に用いられた。固形がんを罹患した対象者は 17,448 名であった。

このデータには、各部位ごとの固形がん発症 (舌、唾液腺、食道、胃、小腸、結腸、直腸、肝臓、胆嚢、膵臓、肺、咽頭、骨、皮膚、乳腺、子宮頸部、子宮体部、卵巣、前立腺、膀胱、腎臓、中枢神経、甲状腺など) やそれらをまとめた全部位の罹患数、代表的な部位別の臓器線量 (結腸、骨髄、脳、乳腺、肝臓、肺、卵巣、膵臓、骨、皮膚、胃、睾丸、甲状腺、膀胱、子宮)、追跡人年、被ばく時・到達年齢や性別などの共変量がデータとして含まれている。今回解析を行うマウス小腸腫瘍と発がんメカニズムも近く、Radiation Research 誌に部位別の結果が掲載されており、なおかつ罹患数の多い結腸を選択して解析を行った。消化器の中で、胃がんの罹患数が最も多く 4,730 名であるが発がんメカニズムが異なると考えられ、比較的メカニズムが近い大腸がんのうち結腸がんの罹患した対象者は 1,516 名であり、一方直腸は 838 名であった。

原爆被爆者の寿命調査の論文で用いられた統計解析パッケージソフトウェア (以下統計パッケージ) は Epicure であり、その Epicure のコンポーネントの一つである AMFIT と呼ばれるプログラムにてポアソン回帰モデルの適用が行われ、推定値が求められている (31)。この Epicure は放射線疫学の解析にはしばしば用いられ、最近の Lancet Haematology 誌に掲載された 3 ヶ国の原子力作業従事者の白血病リスクに関するコホート研究 (INWORKS) の解析でも用いられている (32)。このように放射線疫学の解析では広く用いられている Epicure であるが、他の疫学研究で用いられることはほとんどない。放

放射線疫学でのみ他の分野では使われない Epicure が用いられている理由として、原爆被爆者の寿命調査データの解析は、放射線疫学のゴールドスタンダードと見做され、そこで使われた統計パッケージの知名度が高いことが挙げられるであろう。もう一つの理由として考えられるのは、原爆被爆者の寿命調査データで用いられる統計解析モデルがやや特殊であることである。

Preston らの統計解析モデルは、人数と時間を掛け合わせた人・時間を単位として用いており、単位人・時間あたりのがん罹患数をモデル化した罹患率のモデルとなっている。単位人・時間あたりの平均罹患数をパラメータとするポアソン分布にデータが従うと仮定するポアソン回帰モデルが用いられており、この回帰モデルは放射線疫学のみならず疫学研究、特にコホート研究では頻繁に用いられ、多くの統計パッケージで利用可能である。放射線疫学で用いられるモデルが特殊なのは、統計解析モデルの形状として、過剰絶対リスク (excess absolute risk; EAR) と過剰相対リスク (excess relative risk; ERR) が含まれることである。以下でさらに Preston らのモデルの詳細について示す。

ここでは解析対象集団の一部である部分集団のうち、解析にて用いられる共変量（線量と線量反応関係に影響を与える修飾因子）が同じ値に属する部分集団を考える。ポアソン回帰モデルはこの部分集団を一つのデータ単位として扱い解析を行う。このような部分集団は全固形がんに対しては 26,806 個存在し、この数は解析対象者数である 105,427 名と比べ少なくなっているが、これは共変量が同じ複数の対象者が一つの部分集団にまとめられたことを意味している。その際、部分集団における人・時間と罹患数は、その部分集団に属する各個人の和となっている。

共変量が同じ集団における固形がん罹患数を（部分集団での合計罹患数）、人・時間を（部分集団での合計人・時間）、都市（広島/長崎）を、性別を、被ばく時年齢を、到達年齢を（対数が取られている）、被ばく時の所在地を（市内もしくは市外を示す）、結腸における加重線量を（Gy）とし、以下のようなモデル化が行なわれている。

$$E\left(\frac{y_i}{t_i}\right) = \lambda_{i0} \cdot (1 + ERR_i)$$

上記変数のうち  $c_i$ 、 $s_i$ 、 $l_i$  は離散変数であるため、指示変数として扱っている。指示変数とは、二値（一般には 0 もしくは 1）の値を取るうる変数であり、離散変数は取るうる水準の指示変数に変換されてモデル中にて扱われる。一方で連続変数は、別途データ加工の一貫として変数変換を行わない場合にはそのままモデル中で扱われる。上記モデル式の左辺は固形がん罹患数を総人・時間で割った罹患率の平均を示しており、その平均罹患率をベースラインと過剰相対リスクである  $(1 + ERR_i)$  の部分に分けてモデル化している。 $\lambda_{i0}$  はベースライン罹患率、つまり部分集団  $i$  の被ばく線量が 0 である場合の罹患率を示しており、 $ERR_i$  は部分集団  $i$  における ERR を示している。このように ERR とはベースライン罹患率からのリスク増加をベースライン罹患率で割ることで基準化した指標である (1)。



一方、EAR とは基準化しないリスク増加を示し、以下のモデル式によって示される。

$$E\left(\frac{y_i}{t_i}\right) = \lambda_{i0} + EAR_i$$

本報告書ではベースライン罹患率に対する相対的なリスク増加を示す指標である ERR についてのみ扱う。またベースライン罹患率はさらに以下のようにモデル化されている。

$$\lambda_{i0} = \exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot s_i + \beta_2 \cdot c_i + \beta_3 \cdot c_i \cdot s_i + \Gamma_s(a_i) + \Gamma_s(e_i))$$

$\Gamma_s(\bullet)$  は性別によって異なる二次のスプライン関数である。スプライン関数とは、節点により分割された区間に対して、直線よりも滑らかな変化を許容する二次曲線などの多項式を区間ごとに構成しており、柔軟な変化を許容するモデルで用いられる。節点で関数が増加するが、滑らかに変化するように節点における導関数には一般に制約が置かれる。ここでは到達年齢のスプライン関数では 50 歳に節点を設定しており、一方で被ばく時年齢には節点を設定していない。このスプライン関数により、ベースライン罹患率が到達年齢や被ばく時年齢により柔軟に変化することを許容するモデルとなっている。

この解析における最も関心のあるパラメータは、ERR を構成する男女別のリスク増加パラメータ  $\beta_s$  であり、以下のようにモデル化されている。

$$ERR_i = \beta_s \cdot r_i \cdot \exp(\beta_4 \cdot e_i + \beta_5 \cdot a_i)$$

この形状は、ERR が被ばく線量の増加に伴って線形に増加することを仮定しており、は性別ごとの単位被ばく線量あたりのリスク増加と解釈することが可能である。このモデルでは、線量 に対応するリスク増加は、基本的には性別ごとに直線 ( $\beta_s \cdot r_i$ ) であると仮定し、その直線の傾きが被ばく時年齢や到達年齢 ( $\exp(\beta_4 \cdot e_i + \beta_5 \cdot a_i)$ ) によって変化することを許容している。以上が統計解析モデルであり、ベースラインである の部分に 15 個のパラメータが含まれ ( $\beta_0, \beta_1, \beta_2$  にそれぞれ 1 つずつ、 $\beta_3$  に 2 つ、 $\Gamma_s(a_i)$  に 6 つ、 $\Gamma_s(e_i)$  に 4 つ)、また ERR の部分に 4 個 ( $\beta_s$  に 2 つ、 $\beta_4, \beta_5$  に 1 つずつ) の未知パラメータが存在し、合計 19 個の推定値を得る必要がある。Preston らの論文では、上記モデルが固形がん全体の解析にも部位別の解析にも同様に用いられている。

### 3.5.3 統計解析モデルのパラメータ推定方法と統計パッケージによるモデル適用 (H27、H28)

本項目は、業務 1、2 年目に実施した。統計解析モデルにおいて、上で述べたようなデータの従う確率分布やそのモデル構造を仮定すると、手元のデータが得られる確率は、データの値とパラメータの関数として表現される。この関数を、データを固定、つまり手元のデータを代入してパラメータの関数として扱い、そのパラメータの値における尤もらしさを示す関数と見做したものを尤度と呼ぶ。通常尤度は独立していると考えられる単位の

確率（密度）関数の積として表現することが可能であり、最尤法とは尤度を最大にするパラメータの値が最もデータに即していると考え、尤度を最大とする数値をパラメータの推定値とする方法である（34）。今回のポアソン回帰モデルの場合、独立していると考えられる単位とは、共変量の値が等しい部分集団*i*に相当する。従って一度尤度を構成すれば、最尤法によるパラメータ推定は、その尤度を目的関数とした非線形最適化の問題に置き換えることが可能である。積の形の尤度関数は数学的に取り扱いが不便であるため、通常は単調な関係にある自然対数を取った対数尤度関数として扱われる。

前節のポアソン回帰モデルの対数尤度関数は、以下のような形状となる。

$$l = \sum_i [y_i \log\{t_i \exp(\beta_0 + \beta_1 s_i + \beta_2 c_i + \beta_3 c_i s_i + \Gamma_s(a_i) + \Gamma_s(e_i))(1 + \beta_4 r_i \exp(\beta_4 e_i + \beta_5 a_i))\}] - \sum_i t_i \exp(\beta_0 + \beta_1 s_i + \beta_2 c_i + \beta_3 c_i s_i + \Gamma_s(a_i) + \Gamma_s(e_i))(1 + \beta_4 r_i \exp(\beta_4 e_i + \beta_5 a_i))$$

この対数尤度関数のうち、通常の統計解析パッケージはベースラインである  $\exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot s_i + \beta_2 \cdot c_i + \beta_3 \cdot c_i \cdot s_i + \Gamma_s(a_i) + \Gamma_s(e_i))$  の部分のみのモデル化をサポートしているものが大半であり、その後ろに掛けられている  $\beta_4 \cdot r_i \cdot \exp(\beta_4 \cdot e_i + \beta_5 \cdot a_i)$  の部分も含めて容易にモデル化が可能な統計パッケージは限定され、その一つが Epicure である。しかしながら、Epicure は有償ソフトウェアであり、また放射線疫学以外ではあまり使われることも多くないため、ドキュメントなども公式のマニュアル以外には乏しく情報の入手が容易ではない。さらに少し前まで正式なバージョンが MS-DOS 版であり、Windows 版は正式版が販売されているものの高額のため汎用性にすぐれているとは言いがたい。しかしながら、対数尤度関数を記述可能なある独自の関数が定義可能なある程度の拡張性を持ち、非線形最適化の問題を適用する関数を備えた数値演算ソフトウェアがあれば、上記モデルのパラメータ推定は実行可能である。

最適化問題とは、自然科学・工学・社会科学など多種多様な分野で発生する基本的な問題の一つで、与えられた条件のもとで何らかの関数を最小化もしくは最大化するような問題である。この最適化問題を含む数理計画法は 1940 年代に登場した線形計画法に端を発しており、オペレーションズ・リサーチ (OR) の数理的な基礎にもなっている（35）。そのうち、非線形な関数である対数尤度に適用可能な方法である非線形最適化法は統計解析パッケージの内部に実装されており、統計パッケージ Epicure では非線形最適化の一つであるニュートン法が用いられている（36）。

R とはオープンソース・フリーソフトウェアの統計解析向けのプログラミング環境である。他の有償統計解析パッケージと異なり、環境を問わずにいつでもどこからでもダウンロードして利用することが可能であり、また Windows 版、MacOS 版、Linux 版が全て存在することもあり、近年世界中で爆発的に普及している。自前の関数の定義が可能であるために対数尤度関数を記述も可能であり、また非線形最適化法も optim 関数や nlm 関数など

表 1 2. R の “epifit” パッケージと Epicure の AMFIT 関数による結腸がん罹患率推定値

パラメータの説明	“epifit” パッケージ		Epicure AMFIT 関数	
	点推定値	標準誤差	点推定値	標準誤差
1 男性切片項	2.924	0.070	2.924	0.069
2 女性切片項	2.282	0.057	2.282	0.058
3 長崎	-0.027	0.065	-0.027	0.065
4 広島 NIC	-0.067	0.071	-0.067	0.071
5 長崎 NIC	-0.060	0.129	-0.060	0.129
6 到達年齢スプライン 1	7.754	0.745	7.754	0.743
7 到達年齢スプライン 2	8.781	0.569	8.781	0.569
8 到達年齢スプライン 3	-3.008	1.643	-3.008	1.642
9 到達年齢スプライン 4	1.798	1.069	1.799	1.058
10 到達年齢スプライン 5	-2.050	5.631	-2.051	5.633
11 到達年齢スプライン 6	-12.749	4.015	-12.750	4.008
12 被ばく時年齢スプライン 1	-0.716	0.044	-0.716	0.043
13 被ばく時年齢スプライン 2	-0.586	0.039	-0.586	0.039
14 被ばく時年齢スプライン 3	-0.001	0.019	-0.001	0.019
15 被ばく時年齢スプライン 4	0.031	0.017	0.031	0.017
16 男女平均 ERR	0.532	0.154	0.532	0.157
17 男女の ERR 差	-0.354	0.216	-0.355	0.220
18 ERR の被ばく時年齢修飾項	0.012	0.235	0.012	0.209
19 ERR の到達年齢修飾項	-2.664	1.578	-2.662	1.396

表 1 3. Preston らのモデルで被ばく時年齢、到達年齢を変化させた際の結腸がん罹患率の過剰相対リスク推定値

到達年齢	被ばく時年齢		
	5 歳	10 歳	30 歳
10 歳	92.140 (0.012)	92.698 (0.011)	94.952 (0.009)
30 歳	4.932 (4.438)	4.962 (4.758)	5.083 (6.515)
50 歳	1.265 (0.424)	1.272 (0.378)	1.303 (0.677)
70 歳	0.516 (0.312)	0.519 (0.262)	0.532 (0.154)

括弧内は標準誤差を示す

複数存在し、他の統計パッケージで簡単な記述で実行可能でないような複雑な統計解析モデルの最尤法の実行も可能である。しかしながら、そのような対数尤度関数の記述には統計学の背景知識を持たない利用者にとっては困難であり、誰にでも実行可能ではない。オープンソース・フリーソフトウェアであることと並んだ R の大きな特徴の一つとして、そ

の拡張が容易であることが挙げられる。ユーザーが R 言語で記述して作成した独自の関数をまとめ、それをパッケージとして登録する仕組みが整っており、膨大な R パッケージが公式サイトより容易に入手可能であり、また容易にインストールも可能である。平成 28 年 2 月 29 日には R の開発者用メーリングリストにてパッケージ数が 8000 を越えたことが報告され、その中で平均して 20.6 時間ごとに一パッケージ増加していること、さらに増加速度自体も増していることなども報告された。

“epifit” パッケージは、そのような従来の統計パッケージでは適用が困難なモデルを容易にデータに適用可能とすることを目的とした R のパッケージである。疫学研究のデータ加工でよく用いられるデータ加工に便利な関数やモデルのあてはめを行う関数を備えており、特に今回適用を行うモデルに必要なデータ形式である人・時間データの形状に整える関数も備えている。このパッケージを用いて、取得した Preston らの論文のデータに対して解析を実施し、論文と同じ解析結果が得られるか検討を行った。

放射線影響研究所のウェブサイトから申請にて利用可能な原爆被爆者寿命調査の罹患データの中には、当該データだけでなく、解析に用いられた Epicure のコマンドとそのログファイルも含まれている。従って、Epicure の AMFIT を使ってあてはめを行ったモデルの詳細のみならず、それ以前に行っているデータ加工の詳細なども完全に把握することが可能である。そのデータ加工の内容を R 言語にて再現して作成したデータに対し、“epifit” パッケージを用いて同じポアソン回帰モデルのあてはめを行った。Epicure のログファイルに掲載されている各パラメータの推定値の値と、R の “epifit” パッケージを用いて得られた推定値の比較を表 12 に示す。

19 個のパラメータの小数点以下第四位を四捨五入して第三位まで表示した推定値を比較した結果、9 番目のパラメータ（到達年齢スプライン 4）と 17 番目のパラメータ（男女の ERR 差）が 0.001 異なり、また 19 番目のパラメータ（ERR の到達年齢修飾項）が 0.002 異なった以外、差は見られなかった。一方でパラメータの標準誤差では最大で 0.182 だけ異なり、点推定値と比べても差が大きい結果となった。

点推定値の小さいながらも僅かの差が見受けられたが、その原因としては、両プログラム間での収束判断基準の違いが原因として考えられる。非線形最適化法にて最適解かどうかを判断するための収束判定基準として複数のものが提案されており、“epifit” パッケージはそのパラメータの値における目的関数の勾配と、一ステップの距離のどちらかが一定の基準以下になったら収束と判定される。一方で Epicure ではデビアンスの絶対値の変化量が基準値以下になったら収束と判定され、その基準値は  $0.0001$  ( $10^{-4}$ ) がデフォルトである。公開されている Epicure のスクリプトでこの収束基準に関するオプションを変更した記録はないために、このデフォルトの設定で推定値が求められているものと考えられる。一方で、“epifit” パッケージではやや厳しい基準値  $0.0000000001$  ( $10^{-10}$ ) を設定した。また標準誤差の違いであるが、どちらも目的関数の二階導関数から求めていると推測されるが、二階微分の推定精度はやや落ちることが知られている。他にも様々な違いがあると考えられるが、そのような中で点推定値は小数点以下三桁でほぼ一致し、また標準誤差に関しても実用上大きな問題はないと考えられる。以上のことから、“epifit” パッケージにて Epicure と同等の解析を実施でき、動物実験データをこの原爆被爆者の寿命調査

と同等の統計解析モデルにて解析を実施する準備は整った。

なお、この解析にて最も重要なパラメータは男女平均した 1Gy あたりの結腸がん罹患率の ERR (ERR/Gy) であり、被ばく時年齢 30 歳、到達年齢 70 歳にてその値は 0.532 (標準誤差 0.154) であった。男女別の ERR/Gy は、男性 0.720 (標準誤差 0.154)、女性 0.343 (標準誤差 0.216) であった。また動物実験データとの比較のため、被ばく時年齢 5 歳、10 歳、30 歳と、到達年齢 10 歳、30 歳、50 歳、70 歳における男女平均 ERR を求めた。その結果を表 13 に示す。

### 3.5.4 原爆被爆者を対象とした寿命調査と Grant ら平成 29 (2017) 年の統計解析モデルの適用 (H27、H28)

本項目は、業務 1、2 年目に実施した。前節では平成 19 (2007) 年に Preston らが Radiation Research 誌に投稿した「Solid Cancer Incidence in Atomic Bomb Survivors: 1958-1998」のデータを放射線影響研究所のウェブサイトから申請して入手して解析を行ったが、さらに新規に Grant らが Radiation Research 誌に投稿し、平成 29 (2017) 年に公表された「Solid Cancer Incidence among the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958-2009」の最新のがん罹患データを取得し、解析を行った (37)。

過去の平成 19 (2007) 年に公表された Preston らの論文との違いは、まず 11 年間追跡期間が延びたこと、そして線量が DS02R1 として更新されたこと (主に被爆者の位置情報と遮蔽情報の更新)、人年計算時の罹患把握地域への転出転入率推定値の更新、剖検プログラムによってのみ見付かったがんの取り扱いの再評価や一部の上皮内がんを打ち切りとするなどイベントの再鑑定、さらに統計解析モデルにて喫煙の調整が行われたことである。

論文中には固形がんの解析結果しか出ていないが、公開されているデータには結腸や直腸がんなどの個別臓器ごとの症例数は存在しないが、消化管がん症例数のデータまでは存在した。そこで、本報告書では論文とほぼ同じ統計解析モデルにて消化管がんでの罹患率の解析を行った。消化管がんには、胃がん、食道がん、結腸がん、直腸がん、肝臓がん、膵臓がんが含まれる。ここでは性別を示す添字を  $s$  とし、到達年齢を  $a$ 、誕生年を  $byr$ 、 $NIC$  を“not in city”の指示変数とすると、ベースラインハザードは以下のようにモデル化されている。

$$\lambda_{0i} = \exp\left(\alpha_s + \gamma_s \log\left(\frac{a}{70}\right) + \varepsilon_s \log^2\left(\frac{a}{70}\right) + \left[\eta_s \log^2\left(\frac{a}{70}\right)\right]_{a>70} + g\left(\frac{byr-1915}{10}\right) + city * NIC\right)$$

また喫煙の影響に関しては、一日あたりの喫煙強度 (本数) を  $cpd$  (cigarettes per day)、 $smkdur$  を喫煙期間 (年)、 $tsq$  を禁煙継続期間 (年) とすると、喫煙 ERR は、

$$ERR_{smk} = \beta_s \left(\frac{cpd}{20}\right)^{1+\theta_1} \cdot \left(\frac{smkdur}{50}\right)^{1+\theta_2} \cdot (1+tsq)^{\theta_3}$$

とモデル化し、さらに放射線 ERR は線量  $d$  と性別  $s$  に依存する関数として線形

( $\rho(d,s) = \beta_s \cdot d$ )、線形二次 ( $\rho(d,s) = \beta_{1s} \cdot d + \beta_{2s} \cdot d^2$ ) など複数の関数を想定し、

その関数に修飾項を掛けた形状を想定している。 $K$ は総遮蔽カーマ、 $e$ を被ばく時年齢とすると

$$ERR_{rad} = \rho(d, s) \cdot \exp\left(\delta_1 \log\left(\frac{a}{70}\right) + \delta_2 \left(\frac{e-30}{10}\right) + \phi \cdot I(K > 4)\right)$$

となり、全体のハザード関数として放射線と喫煙の同時効果に関して乗法 ERR モデルを仮定し

$$\lambda_i = \lambda_{0i} \cdot (1 + ERR_{rad}) \cdot (1 + ERR_{smk})$$

となるポアソン回帰モデルを適用している。解析は原爆被爆者のデータをダウンロードした際に付属していた R のサンプルプログラムを参考にして、gnm パッケージを用いた。

過去の 2007 年度との固形がんの解析結果との大きな違いは、男性の結果においては、ERR に対して線形の増加を仮定したモデルよりも直線二次を仮定したモデルの方があてはまりが良く、そのためにメインの結果としては、放射線の ERR の部分に関して男性には直線二次を仮定したモデルとなっている。しかながら、消化管がんに適用したところ、若干直線二次の方があてはまりは良かったがその差は大きくはなく、有意なあてはまりの指標である赤池情報量規準 (Akaike Information Criteria; AIC) の有意な差と考えられる 5.9 よりも小さく、また解釈の容易さなどの観点からここではどちらも直線を仮定し、残りの部分は全く同じモデルを用いた (38)。消化管がんの罹患率の過剰相対リスクを男女別 ( $\beta_s$ ) に算出したところ、男性 0.246 (95%CI: 0.120, 0.372)、女性 0.482 (95%CI: 0.315, 0.648) であった。また 2007 年の Preston らのデータと同様に動物実験データとの比較のため、被ばく時年齢 5 歳、10 歳、30 歳と、到達年齢 10 歳、30 歳、50 歳、70 歳における男女平均 ERR を求めた。その結果を表 14 に示す。

**表 14. Grant らのモデルで被ばく時年齢、到達年齢を変化させた際の男女別消化管がん罹患率推定値**

性別	到達年齢	被ばく時年齢		
		5 歳	10 歳	30 歳
男性	10 歳	19.343 (28.085)	17.882 (26.121)	13.060 (19.725)
	30 歳	2.052 (1.136)	1.897 (1.056)	1.386 (0.842)
	50 歳	0.723 (0.169)	0.669 (0.146)	0.488 (0.125)
	70 歳	0.364 (0.110)	0.336 (0.094)	0.246 (0.064)
女性	10 歳	11.605 (11.542)	10.728 (10.786)	7.836 (8.373)
	30 歳	2.403 (0.962)	2.222 (0.892)	1.623 (0.743)
	50 歳	1.156 (0.244)	1.068 (0.203)	0.780 (0.167)
	70 歳	0.714 (0.178)	0.660 (0.143)	0.482 (0.085)

括弧内は標準誤差を示す

### 3.5.5 核兵器施設における女性作業従事者の12コホートの死亡率データ (H27、H28)

本項目は、業務1、2年目に実施した。ここでは米国における核施設における女性作業従事者の12コホートを併合した65984人のデータを用いた。1943年から1980年以前にこれら12施設(Fernald, Linde, K-25, Savannah River, X-10, Y-12とLos Alamos, Mound, Pantex, Rocky Flats, Zia)で雇用された女性作業員で構成される後ろ向きコホート研究である。対象者は雇用開始から1994年まで各施設により外部被ばく線量がモニターされながら追跡され、平均線量はFernaldの0.65mSvからSavannah Riverの9.6mSvまでと各施設により差があった。

誕生日、雇用開始日、離職日、死亡日が日付データとして得られており、雇用開始から離職日と死亡日の早い方までを追跡期間とした。放射線感受性固形がん(食道、胃、大腸、気管、乳房、膀胱、泌尿器、神経組織)による死亡、また大腸がん(直腸と結腸)による死亡をイベントとし、それ以外の死亡や追跡終了を打ち切りとした。放射線感受性固形がんによる死亡は2314名、また大腸がんによる死亡は406名(結腸345名、直腸61名)であった。放射線感受性固形がんによる指示変数はデータに存在したが、大腸がんによる死亡は存在しなかったため、死亡原因を記載したICD-8のコードより、153.0-153.9と154.0-154.2までをそれぞれ結腸がん、直腸がんとし、両者をイベントとする指示変数を作成した。

ここではこのような追跡データに対して標準的に用いられるCox回帰モデルによる解析を行った。共変量で利用可能なものは多くなく、施設や線量に加えて、誕生日から計算可能な年齢だけであった。Cox回帰では、通常のCox回帰でのモデル化の後ろに過剰相対リスク(excess relative risk; ERR)の形状にて(1 + ERR)が掛けられている形状のモデルの適用をRの拡張パッケージであるepifitを用いて行なった。データを精査している間に、対象者の中には全く線量のデータがない対象者も存在し、それらの対象者は線量データが存在する対象者とは背景因子が異なる可能性が高く、それ故に線量データが存在しない対象者は、原爆被爆者の寿命調査にNIC(Not In the City)と同様に指示変数(fdose)を導入してそのベースラインリスクの違いを表現した。また対象者の誕生年は1871年から1962年まで100年弱に渡るため、その間の時代を変遷することによる生活週間などのコホート効果を調整するため、誕生日(byear)とその二乗項(byear2)をベースラインハザードとして加えた。施設は10施設にカテゴリ化されており、Fernaldを基準として各施設の指示変数(facilityHAN、facilityK25、facilityLAN、facilityPAN、facilityRF、facilitySR1、facilityX10、facilityY12、facilityZIA)をモデルに加え、また白色人種である指示変数をraceWとして加えた。線量はcSv単位(rem)で入力されており、そのまま用いた。ハザード関数は以下の式で表わされ、放射線感受性固形がんと大腸がんをイベントとしたときの推定値を表12、表13に示す。

$$\lambda_i = \exp(\beta_1 \cdot fdose_i + \beta_2 \cdot facility_i + \beta_3 \cdot raceW + \beta_4 \cdot byear + \beta_5 \cdot byear2) \cdot (1 + \beta_{ERR} \cdot dose_i)$$

ここで最も関心のあるパラメータ推定値は過剰相対リスクであり、Sv辺りに換算すると放射線感受性固形がんによる死亡ERRは0.905(95%CI: -5.404, 7.215)、また大腸がんによる死亡ERRは-13.288(95%CI: -27.728, 1.150)となった。どちらの推定値も信頼区

間が極めて広く、放射線感受性固形がんの結果はやや点推定値としては原爆被爆者の固形がんの結果よりやや高いものの信頼区間を考慮すれば矛盾しない一方、有意ではないもの大腸がんの死亡率の ERR はかなり大きな負の点推定値が得られ、従来の知見とは相反する結果となった。急性被ばくである原爆被爆者の男女を平均した固形がんによる死亡率の ERR は 0.42 (95%CI: 0.32, 0.53)、結腸は 0.54 (95%CI: 0.23, 0.93)、直腸は 0.17 (95%CI: -0.17, 0.64) であり、被ばく形態が異なるとはいえ負の ERR は考えにくい。このように解析結果が従来の知見と一致しない原因としては、100 年弱にも渡る追跡調査故で様々な生活習慣の変遷などを経ているにも関わらず、ベースライン共変量による調整が不十分でないことが考えられる。

### 3.5.6 結腸がんの発症リスクに関する疫学研究の文献による調査 (H27、H28)

表 15. 結腸がんの発症リスクに関する疫学研究の文献からのリスク推定値

研究			平均線			ERR/Sv (90%CI)
	観察症例	量 (Sv)	人年			
原爆被爆者の寿命調査	性別	男性	323	0.21	436,180	0.85 (0.52, 1.26)
		女性	348	0.20	729,607	0.42 (0.14, 0.76)
	被ばく時年齢	<20 歳	229	0.21	586,255	0.81 (0.46, 1.24)
		20-40 歳	301	0.21	378,204	0.44 (0.14, 0.82)
		>40 歳	141	0.19	201,329	0.45 (<0, 1.13)
	被ばくからの時間	12-15 年	12	0.21	119,774	2.02 (<0, 9.30)
		15-30 年	97	0.21	514,582	1.24 (0.51, 2.25)
		>30 年	562	0.20	531,432	0.52 (0.30, 0.78)
	合計		671	0.21	1,165,787	0.64 (0.42, 0.90)
	子宮頸がん症例・対照研究		409	24.00	N.A.	0.00 (-0.01, 0.02)
スウェーデンのメトロパーチコホート		12	0.093	9,289	5.0 (-2.2, 16)	
ストックホルムの皮膚血管腫		12	0.07	406,565	0.37	
カナダ全国線量登録		315	0.0662	2,667,903	2.6 (<0, 7.5)	
英国カーパンハー ストのウラン施設	性別	男性	14	0.0985	40,933	-1.30 (<-1.30, 23.97)
英国スプリングフィ ールズのウラン作 業者	性別	男性	52	0.0228	190,795	11.41 (<-6.27, 36.45)
英国チャペルクロ スの作業者	性別	男性	8	0.0836	39,210	2.10 (<-2.65, 13.92)

本項目は、業務 1、2 年目に実施した。結腸がんの罹患率に限定してリスク推定値の掲



載のある報告書を探したところ、国連科学委員会の原子放射線の影響に関する国連科学委員会（UNSCEAR）2006年報告書第1巻」の附属書Aに該当する研究とそのリスク推定値の掲載が見付かった。その中で、本研究に関連すると思われる推定値を抜粋して、表15に示す（38）。これらの推定値のうち、原爆被爆者のものはPrestonら2007の論文のものと同一1958年から1998年の固形がん罹患データを用いている一方で、解析モデルに関しては対象者*i*のハザードを $\lambda_i$ とすると

$$\lambda_i = \exp\left\{\beta_0 + \beta_1 s_i + \beta_2 c_i + \beta_3 s_i c_i + \beta_4 \ln(a) + \beta_5 \ln(a)^2 + \beta_6 s_i \ln(a) + \beta_7 s_i \ln(a)^2\right\} (1 + \beta_{ERR} \cdot d_i)$$

となっており、ベースラインハザードのモデル化や過剰相対リスクのモデル化の部分に修飾項が含まれていないなどの違いがある。本報告書では、動物実験の結果と比べる際には、被ばく時年齢、到達年齢の条件を変更できる解析結果を用い、これらの引用した数値は参考にするに留める。

### 3.5.7 マウスでの発がん実験データの解析（H28、H29）

本項目は、業務2、3年目に実施した。マウスでの発がんリスクとヒトにおけるデータを比較検討するには、両方のデータを同じモデルにて解析を行うことが必要である。マウスの発がんデータの結果からヒトのリスクについて言及するには、マウスの発がんデータを疫学データの解析モデルを用いて同じ効果の指標を求め、それを比較することが必要である。そこで、業務2年目は、ヒト疫学研究結果で用いた、Rの拡張パッケージであるepifitを用いて、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスにおける低線量放射線発がんデータにおけるERRの計算を行った。業務3年目では、これまでに得られた発がん実験データを加えることによりERRの再計算を行った。さらに、これまでの当研究室で行ったB6/B6-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスを用いた低線量放射線発がん実験データにおけるERRの計算を行った。実験途中で死亡したマウスを除いた場合、B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスでは非照射群112匹、0.02 Gy照射群32匹、0.05 Gy照射群24匹、0.1 Gy照射群19匹、0.5 Gy照射群26匹、2 Gy照射群24匹であった。一方で、B6/B6-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウスでは非照射群23匹、0.03 Gy照射群23匹、0.125 Gy照射群19匹、0.5 Gy照射群12匹、2 Gy照射群8匹であった。

業務3年目は、Rの拡張パッケージであるepifitを用い、個体*i*のハザード関数を $\lambda_i$ 、線量を $d_i$ とすると、以下の3通りの解析モデルの適用を行い、データへのモデルのあてはまりをAICで比較した。

1. 直線モデル

$$\lambda_i = \beta_0 \cdot (1 + \beta_{ERR} \cdot d_i)$$

2. 直線二次モデル

$$\lambda_i = \beta_0 \cdot (1 + \beta_{ERR} \cdot d_i + \beta_{ERR2} \cdot d_i^2)$$

3. 直線閾値モデル

$$\lambda_i = \beta_0 \cdot (1 + \beta_{ERR} \cdot \max(d_i - \tau, 0))$$

4. ノンパラメトリックモデル

$$\lambda_i = \beta_0 \cdot (1 + \sum \beta_i \cdot d_i)$$

**表 1 6. ノンパラメトリックモデルの各線量におけるリスク推定値  
(B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウス)**

線量 (Gy)	リスク推定値	95%信頼区間
0.02	0.116	(32.110, 36.158)
0.05	0.079	(-0.013, 0.245)
0.10	0.161	(-0.064, 0.222)
0.50	0.464	(0.002, 0.321)
1.00	1.373	(1.137, 1.609)
2.00	1.980	(1.761, 2.198)

AIC は 1905.666

**表 1 7. 線形閾値モデルにおける閾値と AIC の値  
( B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウス)**

$\tau$	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.01	0.02	0.05
AIC	1912.018	1912.079	1912.140	1912.203	1912.267	1912.598	1913.332	1914.652

**表 1 8. ノンパラメトリックモデルの各線量におけるリスク推定値  
(B6/B6-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウス)**

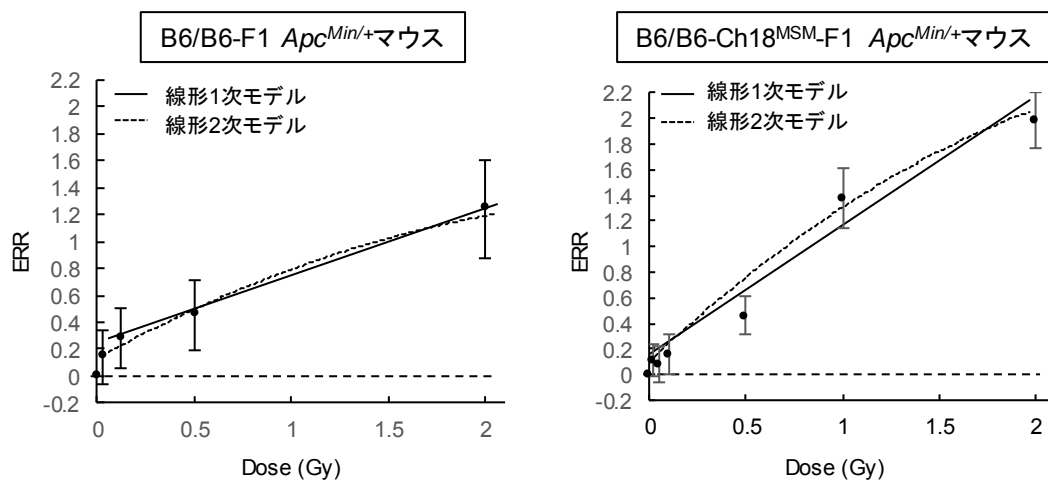
線量 (Gy)	リスク推定値	95%信頼区間
0.031	0.144	(-0.054, 0.342)
0.125	0.277	(0.057, 0.496)
0.500	0.456	(0.194, 0.718)
2.000	1.239	(0.873, 1.606)

AIC は 836.910

**表 1 9. 線形閾値モデルにおける閾値と AIC の値  
(B6/B6-F1 *Apc*<sup>Min/+</sup>マウス)**

$\tau$	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.01	0.02	0.05
AIC	835.689	835.717	835.744	835.772	835.800	835.940	836.228	837.052

図26.  $Apc^{Min/+}$ マウスを用いた発がん実験における線量とERRの関係



なお、ここで  $\beta_{ERR}$  は直線の係数であり、線量あたりの過剰相対リスクであり、 $\beta_{ERR2}$  は線量の二乗項の係数、 $\beta_i$  は各線量カテゴリにおける係数、max は二つの数値のうち大きい方を出力するものとする。従って  $\beta_{ERR}$  は閾値が  $\tau$  以下では 0 となり、それ以上ではとなる閾値モデルを表現している。

B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>-F1  $Apc^{Min/+}$ マウスに対して線形一次モデルをあてはめた結果、 $\beta_{ERR}$  は 0.978 (95%CI: 0.883, 1.072)、AIC は 1911.958 であった。線形二次モデルでは  $\beta_{ERR}$  は 1.237 (95%CI: 0.928, 1.547)、 $\beta_{ERR2}$  は -0.129 (95%CI: -0.274, 0.016)、AIC は 1910.841 であった。ノンパラメトリックモデルの各推定値とその信頼区間を表 18 に示す。個々の線量に自由にフィットするノンパラメトリックモデルを除けば、最もあてはまりが良かったのは線形二次モデルである。しかしながら、線形一次モデルとの差は 1.117 と、AIC の有意な差と考えられる 5.9 よりも小さい(38)。また、線量カテゴリの数も多くないために、本データからこの両者のあてはまりについて確固たる結論を下すことは困難である。線形閾値モデルの推定を試みた。直接閾値を推定することは困難のため、閾値を 0.001 から 0.005Gy まで変化させて、各値における AIC を算出したものを表 19 に示す。その結果、本データでは閾値は限りなく 0 に近く、閾値の存在は見られなかった。

B6/B6-F1  $Apc^{Min/+}$  マウスに対して線形一次モデルをあてはめた結果、 $\beta_{ERR}$  は 0.525 (95%CI: 0.394, 0.656)、AIC は 835.662 であった。直線二次モデルでは  $\beta_{ERR}$  は 0.864 (95%CI: 0.299, 1.429)、 $\beta_{ERR2}$  は -0.164 (95%CI: -0.429, 0.100)、AIC は 836.104 であった。ノンパラメトリックモデルの各推定値とその信頼区間を表 18 に示す。線形一次モデルと直線二次モデルの比較ではやや線形一次モデルの方があてはまりが良い結果であった。しかしながら、この場合も差は大きくなかった。線形閾値モデルの推定を行った結果を表 19 に示す。その結果、本データでは閾値は限りなく 0 に近く、閾値の存在は見られなかった。

3.5.4 で行った原爆被爆者の疫学研究から得られた消化管がんにおけるデータを用いた解析からは、線形一次モデルよりも、線形二次モデルの方が若干あてはまりが良いが、

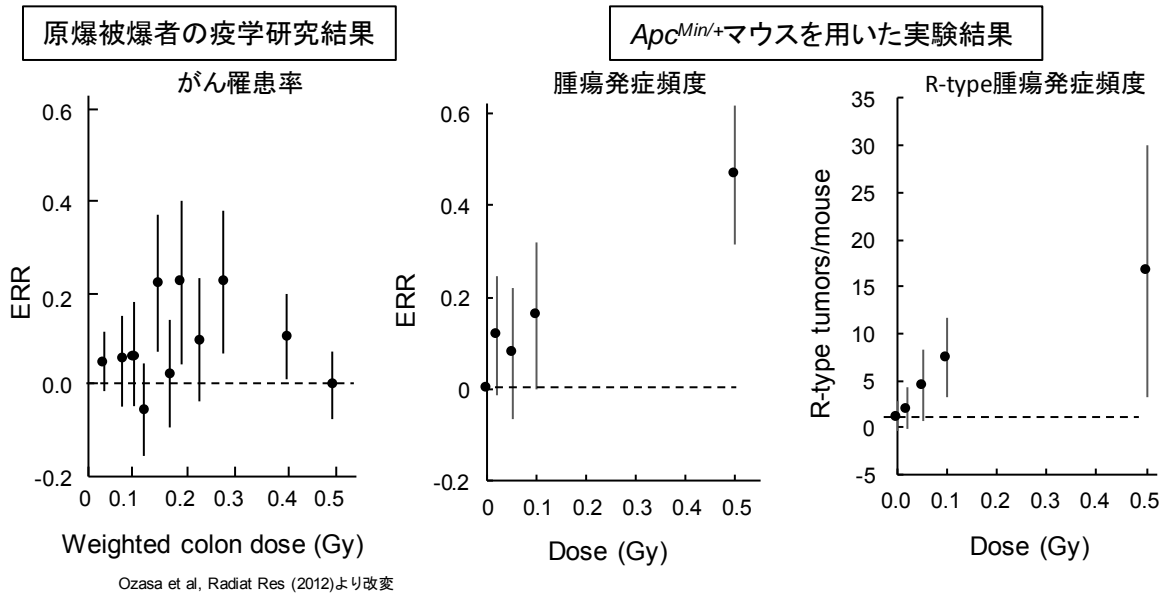
有意な違いはみられないという結果が得られており、本研究から得られた *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスにおける解析結果と同じ傾向を示したといえる（図 26）。さらに、低線量域に着目した場合、原爆被爆者の疫学研究結果では、0.5 Gy 以下の領域ではばらつきが大きく、線量効果関係に関する情報を得ることが難しいが、マウス動物実験からは、低線量域でも線量依存的にリスクの増加が観察された。

### 3.5.8 マウスの実験データとヒトの疫学データの比較と放射線防護政策への提言（H29）

業務 1、2 年目で得られたデータを基に、業務 3 年目に、マウス実験データとヒト疫学データの比較を行った。本報告書では、マウスの実験データとヒトの疫学データの比較を行うにあたり、いくつかの疫学データを集めた。原爆被爆者のデータでは被ばく時年齢や到達年齢がモデルに含まれており、またパラメータの基準化を変更してモデルの再適用可能なデータが得られたため、被ばく時年齢や到達年齢を変化させた場合の過剰相対リスクを算出した。その結果、比較的被ばく時年齢による変動は大きくない一方で、到達年齢による変動が大きいことが示唆された。その原因として、ヒトでは年齢と共に消化器・結腸がんの罹患率や死亡率が大きく変動することが挙げられる。その一方で、今回の *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスでは、日齢が 100 を越えるとマウス 1 匹あたりの腫瘍数は頭打ちとなることが知られており（41）、この違いによって同じ過剰相対リスクであっても到達年齢を揃えて比較することは難しいであろう。そもそも本研究で用いたマウスが *Apc* 遺伝子の片アリルに変異を有し、もう一方のアリルへの変異により腫瘍が誘発される特殊なモデルである。また、本マウスモデルは、放射線に高感受性であり、遺伝的背景が均一である一方、ヒトの集団では様々な背景因子を持っており、ベースラインリスクでも両者は異なる。

一方で、今回の動物実験系の最大の特徴は、ヒトの疫学データでは発症の有無と追跡期間しか得られない一方で、腫瘍の個数という連続量が得られるということである。それ故に、原爆被爆者の疫学研究では 0.5 Gy 以下の領域ではばらつきが大きく、はっきりとしたことが言えない一方、我々の結果では低線量域でもリスクの増加が観測された（42）。また本マウスデータの解析結果により、閾値は見られないという結果が得られており、これは現在の放射線防護政策を支持する一つの結果であり、今後はヒトとマウスの違いや、そのメカニズムに関する研究を継続していることが望まれる。現在、本研究結果について、解析数を増やしながら、論文投稿するための準備を行っている。

図27. 低線量域におけるヒト疫学研究結果および我々の実験結果の比較



### 3.5.9 謝辞

本報告書で用いた原爆被爆者の追跡データは広島および長崎の放射線影響研究所（放影研）から入手したものである。放影研は、日本の厚生労働省ならびに米国の学士院を通じてエネルギー省により資金提供を受けている公益法人である。当該データには、広島市・県および長崎市・県の腫瘍登録、ならびに広島・長崎の組織登録から得られた情報が含まれている。この報告書に示した結論は著者のものであり、必ずしも放影研またはその資金提供機関の判断を反映するものではない。

### 3.6 研究推進

研究代表者を含む各研究者間での打ち合わせを計9回実施した。そのうち1回は、外部の先生1名に研究推進委員として参加いただき研究の指導や助言をいただいた。打ち合わせでは活発な情報交換ならびに議論が行われ、得られた結果についての解釈などについて話し合った。本研究成果が認められ、平成29年6月10日に開催された日本環境変異原学会公開シンポジウムにて招待講演を行った。

## 4. 結言

本研究では、我々が作成した B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>  $Apc^{Min/+}$ マウスを用いて、低線量・低線量率放射線発がん実験を行った。動物実験で得られた低線量・低線量率発がんに関する知見をヒトで得られた大規模疫学調査結果と統合するためには、動物実験から得られたデータと疫学研究結果から得られたデータを同じ手法を用いて、統計解析をする必要があるといえる。そのため、本研究で得られた B6/B6-Ch18<sup>MSM</sup>  $Apc^{Min/+}$ マウス放射線発がん実験データおよび、原爆被爆者の疫学研究データを用いて、“epifit”による統計解析を行い、過剰相対リスク (Excess Relative risk: ERR)

を算出した。その結果、これまでのヒト疫学研究結果からは明らかにされていない低線量域において、発がんリスクが閾値なく線量依存的に増加することを明らかにした。さらに、遺伝子変異解析からも、低線量域においても、放射線に特有の爪痕といえる遺伝子変異を同定し、線量依存的な増加を検出することに成功した。本研究結果は、ICRPが採用している「閾値なし直線モデル (Linear Non-threshold: LNT 仮説)」を指示する重要な知見といえる。

本研究および我々のこれまでの研究結果から、*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスでは染色体1本が異なるだけで、放射線照射によって増加する遺伝子変異の種類が異なることを明らかにしている。更に、この違いが、「線量率効果」へ影響を及ぼし、線量率効果へ影響を及ぼす遺伝子変異を見出すことに成功している。そのため、我々の研究結果は、現在、国際的議論が続いている「線量・線量率効果係数: DDREF」の数値の妥当性に科学的根拠を提供できると期待できる。我々は、さらに研究を進展させることにより、低線量・低線量率放射線発がんリスクに関する科学的知見を蓄積させ、社会不安の低減と解消に寄与する科学的根拠の提供を続ける所存である。

## 参考文献

- (1) M. S. Pearce, J. A. Salotti, M. P. Little, K. McHugh, C. Lee, K. P. Kim, N. L. Howe, C. M. Ronckers, P. Rajaraman, A. W. Sir Craft, L. Parker, A. Berrington de Gonzalez, “Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours a retrospective cohort study.” *Lancet*, 380:499-505, (2012).
- (2) N. Journy, D. Laurier, M. O. Bernier, “Comment on: Are the studies on cancer risk from CT scans biased by indication? Elements of answer from a large-scale cohort study in France.” *Br. J. Cancer*, 112:1843-1844, (2015).
- (3) R. R. Nair, B. Rajan, S. Akiba, P. Jayalekshmi, M. K. Nair, P. Gangadharan, T. Koga, H. Morishima, S. Nakamura, T. Sugahara, “Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study.” *Health Phys.*, 96:55-66, (2009).
- (4) H. Shen, P. W. Laird, “Interplay between the cancer genome and epigenome.” *Cell*, 153:38-55, (2013).
- (5) S. Sasaki, “Influence of the age of mice at exposure to radiation on life-shortening and carcinogenesis.” *J. Radiat. Res.*, 32 Suppl 2:73-85, (1991).
- (6) R. L. Ullrich, J. B. Storer, “Influence of gamma irradiation on the development of neoplastic disease in mice. I. Reticular tissue tumors.” *Radiat. Res.*, 80(2):303-16, (1979).
- (7) R. L. Ullrich, J. B. Storer, “Influence of gamma irradiation on the development of neoplastic disease in mice. II. Solid tumors.” *Radiat. Res.*,

- 80(2):317-24, (1979).
- (8) R. L. Ullrich, J. B. Storer, "Influence of gamma irradiation on the development of neoplastic disease in mice. III. Dose-rate effects." *Radiat. Res.*, 80(2):325-42, (1979).
  - (9) E. J. Hall, A. J. Giaccia, "Radiobiology for the Radiologist." Seventh Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (2011).
  - (10) R. R. Nair, B. Rajan, S. Akiba, P. Jayalekshmi, M. K. Nair, P. Gangadharan, T. Koga, H. Morishima, S. Nakamura, T. R. Sugahara, "Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study." *Health Phys.*, 96(1):55-66, (2009).
  - (11) R. L. Ullrich, J. B. Storer, "Influence of gamma irradiation on the development of neoplastic disease in mice. III. Dose-rate effects." *Radiat. Res.*, 80(2):325-42, (1979).
  - (12) A. C. Upton, M. L. Randolph, J. W. Conklin, M. A. Kastenbaum, M. Slater, G. S. Melville, Jr., F. P. Conte, J. A. Jr. Sproul, "Late Effects of Fast Neutrons and Gamma-Rays in Mice as Influenced by the Dose Rate of Irradiation: Induction of Neoplasia." *Radiat. Res.*, 41(3):467-491, (1970).
  - (13) S. Varambally, S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. Sewalt, A. P. Otte, M. A. Rubin, A. M. Chinnaiyan, "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer." *Nature*, 419(6907):624-9, (2002).
  - (14) G. Nikoloski, S. M. Langemeijer, R. P. Kuiper, R. Knops, M. Massop, E. R. Tönnissen, A. van der Heijden, T. N. Scheele, P. Vandenberghe, T. de Witte, B. A. van der Reijden, J. H. Jansen. "Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes." *Nat. Genet.*, 42(8):665-7, (2010).
  - (15) C. J. Chang, M. C. Hung, "The role of EZH2 in tumour progression." *Br. J. Cancer*, 106(2):243-247, (2012).
  - (16) M. L. Suvà, N. Riggi, M. Janiszewska, I. Radovanovic, P. Provero, J. C. Stehle, K. Baumer, M. A. Le Bitoux, D. Marino, L. Cironi, V. E. Marquez, V. Clément, I. Stamenkovic, "EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance." *Cancer Res.*, 69(24):9211-9218, (2009).
  - (17) G. J. van Leenders, D. Dukers, D. Hessels, S. W. van den Kieboom, C. A.

- Hulsbergen, J. A. Witjes, A. P. Otte, C. J. Meijer, F. M. Raaphorst,  
“Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in  
prostate cancer with adverse pathologic and clinical features.” *Eur. Urol.*,  
52(2):455-463, (2007).
- (18) C. G. Kleer, Q. Cao, S. Varambally, R. Shen, I. Ota, S. A. Tomlins, D.  
Ghosh, R. G. Sewalt, A. P. Otte, D. F. Hayes, M. S. Sabel, D. Livant, S. J.  
Weiss, M. A. Rubin, A. M. Chinnaiyan, “EZH2 is a marker of aggressive  
breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial  
cells.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(20):11606-11611, (2003).
- (19) Z. Y. Rao, M. Y. Cai, G. F. Yang, L. R. He, S. J. Mai, W. F. Hua, Y. J.  
Liao, H. X. Deng, Y. C. Chen, X. Y. Guan, Y. X. Zeng, H. F. Kung, D. Xie,  
“EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via  
regulation of TGF- $\beta$ 1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma  
patients.” *Carcinogenesis*, 31(9):1576-1583, (2010).
- (20) S. Rizzo, J. M. Hersey, P. Mellor, et al., “Ovarian cancer stem cell-like  
side populations are enriched following chemotherapy and overexpress EZH2.”  
*Mol. Cancer. Ther.*, 10(2):325-335, (2011).
- (21) Huqun, R. Ishikawa, J. Zhang, H. Miyazawa, Y. Goto, Y. Shimizu, K. Hagiwara,  
N. Koyama, “Enhancer of zeste homolog 2 is a novel prognostic biomarker in  
nonsmall cell lung cancer.” *Cancer*, 118(6):1599-1606, (2012).
- (22) N. Kazgan, M. R. Metukuri, A. Purushotham, J. Lu, A. Rao, S. Lee, M. Pratt-  
Hyatt, A. Lickteig, I. L. Csanaky, Y. Zhao, P. A. Dawson, X. Li,  
“Intestine-specific deletion of SIRT1 in mice impairs DCoH2-HNF-1 $\alpha$ -FXR  
signaling and alters systemic bile acid homeostasis.” *Gastroenterology*,  
146(4):1006-16, (2014).
- (23) D. S. Byun, N. Ahmed, S. Nasser, J. Shin, S. Al-Obaidi, S. Goel, G. A.  
Corner, A. J. Wilson, D. J. Flanagan, D. S. Williams, L. H. Augenlicht, E.  
Vincan, J. M. Mariadason, “Intestinal epithelial-specific PTEN inactivation  
results in tumor formation.” *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.*,  
301(5):G856-64, (2011).
- (24) M. H. Kucherlapati, K. Yang, K. Fan, M. Kuraguchi, D. Sonkin, A. Rosulek, M.  
Lipkin, R. T. Bronson, B. J. Aronow, R. Kucherlapati, “Loss of Rb1 in the  
gastrointestinal tract of Apc1638N mice promotes tumors of the cecum and  
proximal colon.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105(40):15493-8, (2008).



- (25) M. D. Bettess, N. Dubois, M. J. Murphy, C. Dubey, C. Roger, S. Robine, A. Trumpp, “c-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium.” *Mol. Cell. Biol.*, 25(17):7868-78, (2005).
- (26) D. Pinto, S. Robine, F. Jaisser, F. E. Marjou, D. Louvard. “Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines.” *J. Biol. Chem.*, 274(10):6476-82, (1999).
- (27) N. Barker, J.H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters, H. Clevers, “Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*.” *Nature*, 449(7165):1003-7, (2007).
- (28) N. Barker, R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A. R. Clarke, O. J. Sansom, H. Clevers, “Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer.” *Nature*, 457(7229):608-11, (2009).
- (29) K. Kodama, K. Mabuchi, I. Shigematsu, “A long term cohort study of the atomic-bomb survivors.” *J. Epidemiol.*, 6:S95-105, (1996).
- (30) D. L. Preston, E. Ron, S. Tokuoka, S. Funamoto, N. Nishi, M. Soda, K. Mabuchi, K. Kodama, “Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998.” *Radiat. Res.*, 168:1-64, (2007).
- (31) D. L. Preston, 谷口るり子, *epicure: リスク解析ソフトウェア, 計算機統計学*, 7, 199-201 (1995).
- (32) K. Leuraud, D. B. Richardson, E. Cardis, R. D. Daniels, M. Gillies, J. A. O’ Hagan, G. B. Hamra, R. Haylock, D. Laurier, M. Moissonnier, M. K. Schubauer-Berigan, I. Thierry-Chef, A. Kesminiene, “Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study.” *The Lancet Haematol.*, 2(7) :e276-e281, (2015).
- (33) K. J. Rothman, S. Greenland, T. L. Lash, *Modern Epidemiology*, 3rd eds, Lippincott Williams & Wilkins (2008).
- (34) 東京大学教養学部統計学教室編, *自然科学の統計学*, 東京大学出版会 (1992).
- (35) 矢部博, *工学基礎 最適化とその応用*, サイエンス社 (2006).
- (36) HiroSoft International Corporation, *Epicure UserEpidemiology*, 3rd eds,

Lippincott Williams & Wilkin

- (37) E. J. Grant, A. Brenner, H. Sugiyama et al, “Solid cancer incidence among the life span study of atomic bomb survivors: 1958-2009.” *Radiat. Res.*, 187(5) :513-537, (2007).
- (38) L. Walsh. “A short review of model selection techniques for dadiation epidemiology.” *Radiat Environ Biophys.*, 46:205-213, (2007).
- (39) UNSCEAR, Effect of Ionizing Radiation, Volume I, United Nations (2006)
- (40) M. Okamoto, H. Yonekawa, “Intestinal tumorigenesis in Min mice is enhanced by X-irradiation in an age-dependent manner.” *J. Radiat. Res.*, 46:85-91, (2005).
- (41) A. H. Reitmair, M. Redston, JC. Cai et al. “spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh-2 deficient mice.” *Cancer Res.*, 56(16) :3842-9, (1996).
- (42) K. Ozasa, Y. Shimizu, A. Suyama et al. “Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases.” *Radiat. Res.*, 177(3):229-43, (2012).