

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

エンリッチメント環境による Eustress（よい
ストレス）で放射線のリスクを低減する

成果報告書

平成 30 年 3 月

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構

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、国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構が実施した平成 27-29 年度「エンリッチメント環境による Eustress（よいストレス）で放射線のリスクを低減する」の成果を取りまとめたものです。

目次

概略	v
1. はじめに	1
2. 業務計画	
2.1 全体計画	2
3. 平成 27 年度～平成 29 年度の 3 年間の実施内容及び成果	
3.1 エンリッチメント環境によるホメオスタシス増強とがん予防 (H27～H29)	5
3.1.1 内分泌ならびに発がんに関する研究 (H27～H29)	5
1) エンリッチメント環境の設定 (H27)	5
(1) 目的	5
(2) 方法	5
(3) 結果と考察	6
2) エンリッチメント環境による脂質・糖質及び内分泌に対する修飾効果の検証と放射線誘発消化管腫瘍に対する予防実験の設定 (H28)	7
(1) 目的	7
(2) 方法	7
(3) 結果と考察	8
3) エンリッチメント環境によるアポトーシス誘導効果とがん予防効果の検証 (H29)	10
(1) 目的	10
(2) 方法	11
(3) 結果と考察	11
3.1.2 自然免疫に関する研究 (再委託先：東邦大学) (H27～H29)	13
1) 腹腔マクロファージのバクテリア貪食に対する EE の影響 (H27)	13
(1) 目的	13
(2) 方法	13
(3) 結果と考察	14
2) 腹腔マクロファージのアポトーシス好中球、2 次的ネクローシス好中球の貪食に対する EE の影響 (H28)	14
(1) 目的	14
(2) 方法	14
(3) 結果と考察	14
(4) 結語	15
3) 腹腔マクロファージの M1/M2 サブタイプの解析、ケモカイン産生に対する EE の影響 (H29)	15
(1) 目的	15

(2) 方法	15
(3) 結果と考察	15
(4) 結語	16
4) 全体の結語 (H27～H29)	16
3.1.3 DNA 修復に関する研究 (再委託先: 茨城大学) (H27～H29)	17
1) 目的 (H27～H29)	17
2) エンリッチメント環境に影響を受ける損傷応答因子の解析 (H27～H28)	17
(1) 方法	17
(2) 結果と考察	19
3) エンリッチメント環境が細胞および組織の DNA 損傷修復応答に与える影響の解析 (H29)	21
(1) 方法	21
(2) 結果と考察	22
4) 全体の結語 (H27～H29)	26
3.2 放射線発がんの新たな分子機構とエンリッチメント環境による修飾 (再委託先: 東京大学) (H27～H29)	27
3.2.1 目的 (H27～H29)	27
3.2.2 lncRNA を特異的に検出するためのプライマー品質確認の結果 (H27)	27
3.2.3 組織からの lncRNA 抽出および発現解析 (H28)	27
1) 方法	27
2) 結果と考察	29
3.2.4 lncRNA の組織内動態機構の解析 (H29)	29
1) 方法	29
2) 結果と考察	29
3.3 エンリッチメント環境 (適温) に関する研究 (再委託先: 産業医科大学) (H27～H29)	31
3.3.1 目的 (H27～H29)	31
3.3.2 試験方法と材料 (H27～H29)	31
3.3.3 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の方法 (H27～H28)	32
3.3.4 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の方法 (H29)	33
3.3.5 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の結果 (H27～H28)	34
3.3.6 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の結果 (H29)	34
3.3.7 試験結果の考察 (H27～H29)	41
3.4 研究推進 (H27～H29)	42
4. 結語 (H27～H29)	43

図表一覧

	頁
図 1. 全体計画図	2
図 2. エンリッチメント環境での飼育	5
図 3. 実験デザイン 1	5
図 4. B6C3F1 マウスの体重変化	6
図 5. 実験デザイン 2	7
図 6. 放射線発生装置 (PANTAK HF-320)	7
図 7. 凍結保存された血清サンプル	8
図 8. 実験デザイン 3	8
図 9. 幼若期 (a-c) 及び成体期 (d-f) からの EE が体重、白色脂肪及び褐色脂肪組織重量に与える効果	9
図 10. 幼若期 (a-f) 及び成体期 (g-l) からの EE による脂質代謝、糖代謝、インスリン及びアディポカイン分泌に与える効果	10
図 11. SE 及び EE 飼育後のマウス褐色脂肪組織の病理組織像と UCP1 発現の比較	10
図 12. 幼若期 (a, b) 及び成体期 (c, d) からの EE による小腸と大腸におけるアポトーシス誘導効果	11
図 13. EE が $Apc^{Min/+}$ マウスの脂質代謝に与える効果	12
図 14. SE 及び EE 飼育後の $Apc^{Min/+}$ マウス褐色脂肪組織の病理組織像	13
図 15. EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する抑制効果	13
図 16. SE マクロファージと EE マクロファージとの CD40 陽性細胞数の比較	16
図 17. SE マクロファージと EE マクロファージとの IL-6 mRNA レベルの比較	16
図 18. X 線照射後のリン酸化 H2AX フォーカスの経時変化	20
図 19. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX フォーカスの輝度の経時変化	21
図 20. 非照射時のマウス肝臓組織における炎症反応レベル	21
図 21. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX 量 (輝度) の経時変化	22
図 22. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX フォーカス数の経時変化	23
図 23. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX 量の経時変化	24
図 24. マウス組織における放射線誘発 DNA 損傷レベル①	24
図 25. マウス組織における放射線照射直後の DNA 損傷レベル②	25
図 26. マウス組織における放射線誘発 DNA 損傷の減少率変化	25
図 27. マウス組織における放射線誘発炎症反応の変化	26
図 28. EE 及び放射線に应答し変動する lncRNA	30
図 29. 実験群の構成と処置の概要	32
図 30. EE が体重増加におよぼす影響	35
図 31. EE が臓器重量増加におよぼす影響	37
図 32. EE が免疫賦活能におよぼす影響	38
図 33. EE が移植腫瘍の増殖におよぼす影響	39
図 34. 脾臓における組織学的解析	40

表 1. マウス lncRNA Q-PCR プライマーリスト	28
表 2. EE が抗酸化能におよぼす影響（活性酸素代謝産物量）	40

略語一覧

EE : Enriched Environment (豊かな環境)

SE : Standard Environment (通常環境)

lncRNA : Long non-coding RNA (長鎖非コードリボ核酸)

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (酵素結合免疫吸着法)

概略

原子力発電所の事故や津波、火山の爆発などで生活スタイルが一変することによる心理的、身体的ストレスの増加によって健康の悪化が指摘されている。特に子どもは、長引く避難所や仮設住宅での生活によって、友達と一緒に外で遊べない（遊ばない）、それに伴う運動不足、食事のバランスの悪化、家族が離ればなれになることの精神的な不安などの影響を受けやすいと考えられる。例えば、災害後の生活で親に対する極度の甘え行動が高まっていることが最近の災害事例として報告されている。近年、環境エンリッチメント（豊かで快適な「よいストレス」：eustress）は健康を増進する効果があることが実験的に実証されつつある。中枢神経系から分泌される種々の因子が、神経や内分泌、免疫系に作用し、神経細胞の増殖や活性化を促し、脳の老化を抑制し、また、脂肪代謝を活性化することでメタボリック症候群を抑制、更には発がん抑制に効果的であることが報告されつつある。

そこで本研究では、マウスを用い、遊びや運動、社会的交流がある豊かな環境（エンリッチメント環境、EE：Enriched Environment）を提供することで、健康を増進することができるか、また、放射線による健康障害の予防・低減が可能かどうかを通常環境（SE：Standard Environment）と比較して多面的な指標で検証することを目的とした。特に、放射線に対する発がん感受性が高いと考えられる幼若期における EE の効果の実証研究を行った。研究実施体制は、動物実験をマウスを用いた実験の実績のある量研機構で行い、内分泌（量研機構）、免疫（東邦大学）、放射線生物学（茨城大学）及び分子生物学（東京大学）の専門家と連携して総合的に EE の効果を検証した。平成 27 年度から平成 29 年度の 3 年間で、以下の項目について明らかにした。

(1) エンリッチメント環境 (EE) によるホメオスタシス増強とがん予防

① 内分泌ならびに発がんに関する研究

EE（遊びや隠れ家、巣作り環境）による内分泌因子ならびに発がんへの修飾効果

② 自然免疫に関する研究（再委託先：東邦大学）

EE による自然免疫細胞であるマクロファージなどの機能への修飾効果

③ DNA 修復に関する研究（再委託先：茨城大学）

EE による DNA 損傷修復力への効果と修復能力に影響を及ぼす体内因子の有無

(2) 放射線発がんの新たな分子機構と EE による修飾（再委託先：東京大学）

EE 及び放射線被ばく後の応答に関わる lncRNA（長鎖非コードリボ核酸）の同定とその発現変化

(3) EE（適温）に関する研究（再委託先：産業医科大学）

環境因子としての適温環境による免疫やがん細胞増殖抑制効果

上記の研究テーマ毎の結果を以下に示す。

(1) エンリッチメント環境 (EE) によるホメオスタシス増強とがん予防

① 内分泌ならびに発がんに関する研究

平成 27 年度

量研機構の実験動物研究棟に EE を構築し、3 週齢のマウスの飼育を行った。4 週間後（生後 7 週齢）と 6 週間後（生後 9 週齢）に解剖し、血清と臓器（胸腺、脾臓、肝臓、肺、

脂肪) を、DNA 修復タンパク解析と臓器の免疫染色用 (茨城大学) に一部冷凍保存した。また、自然免疫に関する研究 (東邦大学) のために、腹腔内細胞を回収した。また、それらの臓器の病理標本を作製した。採取した血清のレプチンなどのサイトカインを測定した。

その結果、6 週間の EE によって体重は有意に減少することが明らかとなった。これは、白色脂肪組織の重量が減少したことによる。また、内分泌関係のホルモンでは、レプチン (別名肥満ホルモンとも言われる。食欲を抑え、肝臓や筋肉でのエネルギー代謝を高める) の産生が減少していた。これは、レプチンを産生する脂肪組織が減少したことによると考えられる。また、血中のグルコースやコレステロールの濃度も減少していた。グルコースの減少は、インシュリン濃度の高まりによると考えられた。

平成 28 年度

生後3週齢からEEとSEを施し飼育したマウスを9週齢 (EE6週間) で解剖し、血清と臓器 (胸腺、脾臓、肝臓、肺、脂肪) を茨城大学のDNA修復に関する研究用に凍結保存した。また、東邦大学の自然免疫に関する研究のために、マウスを解剖した。生後11週齢の成体マウスに対し、同様にEEを施し、4週後と6週後に血清保存や臓器保存を行った。また、一部、病理解析を行った。EEで飼育後のマウスに放射線照射 (4Gyと0.1Gy) し、継時的にサンプルを収集し、茨城大学と東京大学に提供した。量研機構で繁殖しているApc^{Min/+}雄マウスを交配によって数を増やし、生後2週齢に4Gy照射し、生後3週からEEとSEで飼育を開始した。

4週間と6週間のEEの効果を検討した結果、体重、白色脂肪重量、血中総コレステロール及びレプチンの抑制効果は、EEの期間が長期であるほど高いこと、血中インスリンと中性脂肪に関してはEEの効果が認められなかったことより、8週間のEEの期間も追加して実験を実施した。その結果、8週間のEEは、4週間と6週間のEEに比べて上記項目においてより顕著な抑制効果が認められた。EEのがん予防効果に関する実験では、2週齢マウスへの放射線4Gy照射は胸腺リンパ腫の発生により、1ケージ5匹での飼育条件の維持が困難になる可能性が予測されるため、胸腺リンパ腫の発生が見られない2Gyも追加して実験を開始した。

平成 29 年度

EE が放射線生体応答に対する効果を検証するため、平成 28 年度に引き続き、3 週齢あるいは 11 週齢からエンリッチメント環境 (EE) あるいは通常環境 (SE) で 8 週間飼育したマウスに X 線を 0~2Gy 照射した後に解剖し、(1)①の内分泌と発がんに関する研究と (1)③の DNA 修復に関する研究のために血清と臓器 (胸腺、脾臓、肝臓、肺、脂肪) を凍結保存した。凍結保存した血清と臓器は、再委託先の茨城大学に提供した。また、解剖時に (1)②の自然免疫に関する研究のために腹腔細胞を再委託先の東邦大学の研究者により回収した。さらに、ホルマリン固定した消化管組織の病理解析 (クリプトの形態学的変化、アポトーシス数の測定など) を行った。加えて、生後 2 週齢の Apc^{Min/+}雄マウスに X 線を 0~2Gy 照射し、3 週齢から EE あるいは SE で飼育した。20 週齢時に解剖し、血清と臓器の保存を行い、血清の生化学検査と臓器の病理解析を行った。

消化管組織と脂肪組織の病理解析を行った結果、EE によりアポトーシスが誘導されることや褐色脂肪中の脂肪滴のサイズが減少する傾向が認められた。また、血清検査の結果、

EE は血清中の総コレステロールと中性脂肪を有意に減少させることが分かった。更に、Apc^{Min/+}マウスの実験では、消化管腫瘍の病理解析より腫瘍径の増大に伴い悪性度が上昇することが分かった。加えて、EE により、腫瘍径の増大が抑制されることが認められた。

② 自然免疫に関する研究（再委託先：東邦大学）

平成 27 年度

自然免疫を担う腹腔マクロファージのフローサイトメトリーや黄色ブドウ球菌の貪食実験の条件を確立した。その後、短期間 EE の自然免疫に対する効果を明らかにするため、

(1) ①で回収されたマウスの腹腔細胞に対してフローサイトメトリーにより腹腔マクロファージ数を測定した。また、腹腔マクロファージに蛍光標識黄色ブドウ球菌を *in vitro* で貪食させ、貪食能を共焦点顕微鏡により評価した。

その結果、6 週間 EE を施したマウスにおいて、マクロファージの総数は変化しなかったものの、黄色ブドウ球菌を貪食したマクロファージの数と、個々のマクロファージの黄色ブドウ球菌を貪食する能力が増加する傾向があることが分かった。

平成 28 年度

EE の自然免疫に対する効果を明らかにするため、量研機構で行った研究で EE を施したマウスの腹腔から腹腔マクロファージを回収し、蛍光標識黄色ブドウ球菌等と共培養して貪食させた。その後培養上清を回収し、好中球ケモカイン等の産生量を ELISA（酵素結合免疫吸着法）にて評価した。前年度の蛍光標識黄色ブドウ球菌に対する貪食能の評価に加え、今年度は蛍光標識アポトーシス好中球及び蛍光標識 2 次的ネクローシス好中球に対する貪食について調べた。

その結果、アポトーシス好中球に対する貪食率は EE で増加したが、2 次的ネクローシス好中球に対する貪食率は EE で変化がなかった。従って EE は細菌感染に伴う炎症を軽減させると予想された。また、培養上清中の好中球ケモカイン等の産生量についても解析した。

平成 29 年度

短期間エンリッチメント環境（EE）の自然免疫に対する効果を明らかにするため、EE を施したマウス腹腔細胞を回収してフローサイトメトリーと定量的 PCR により腹腔マクロファージの M1/M2 サブタイプを比較した。また腹腔マクロファージを取得し、蛍光標識 2 次的ネクローシス細胞を *in vitro* で貪食させ、貪食能を共焦点顕微鏡により評価した。さらに貪食時に産生されるケモカインのパターンを調べた。

フローサイトメトリーの解析結果より、EE は M1 マーカー（CD40）発現マクロファージを増加させたが M2 マーカー（CD206）発現マクロファージには影響しないことがわかった。また、定量的 PCR の結果、EE は M1 マーカー（IL-6）と M2 マーカー（Irf4）を増加させたが、他の M1 マーカー（CD38）は減少させ、他の M1 マーカー（NOS2）と他の M2 マーカー（Arg1、c-Myc）には影響がなかった。次に、共焦点顕微鏡を用いて貪食能を評価した結果、EE は貪食には影響を与えなかった。更に、貪食時に産生されるケモカインのパターンを調べた結果、2 次的ネクローシス細胞との共培養では有意なケモカイン産生は見られず、ネクローシス細胞との共培養では EE は MCP-1 産生を抑制したが、黄色ブドウ球菌との共培養では EE は MIP-2、KC、MCP-1 産生を増加させる傾向にあった。

③ DNA 修復に関する研究（再委託先：茨城大学）

平成 27 年度

DNA 損傷の修復効率や修復の品質に与える EE 飼育の影響を検証するため以下の実験を実施した。放射線を 4Gy 照射したマウス胚由来細胞（m5S 細胞）の培養液に（1）①により保存された EE を施したマウスからの血清を添加して、修復タンパク質（ヒストン H2AX）のリン酸化の変化の程度を免疫染色で観察し、血清中に DNA 損傷の修復効率を変えるような成分が含まれているかを調べた。

その結果、まず、マウス血清を添加しない場合、ヒストン H2AX のリン酸化は照射 1 時間後に最も高くなり、その後減少していくことが観察されたが、マウス血清を添加した場合は、免疫染色における非特異的な結合が高くなり、放射線によるリン酸化の増加の観察が困難になった。今後、免疫染色の方法を検討する必要があることが分かった。また、

（1）①により保存されたマウスの組織における放射線損傷応答タンパク質（ヒストン H2AX）のリン酸化ならびにマクロファージのマーカーである F4/80 の染色方法を確立した。

平成 28 年度

EE 飼育による体内環境の違いが DNA 損傷の修復効率や修復の品質に影響を与える可能性を検証した。放射線を照射あるいは非照射のマウス培養細胞の培養液に、量研機構が実施した「内分泌ならびに発がんに関する研究」で保存された EE もしくは SE 飼育したマウスから採取した血清を添加して、修復タンパク質の挙動を経時的に調べる実験を繰り返し実施した。また、EE または SE 飼育マウスの組織あるいは血清中において、放射線照射後の損傷応答タンパク質のリン酸化ならびに炎症マーカーの発現の解析を実施した。

飼育環境の異なるマウス血清を放射線照射あるいは非照射の細胞の培養液に添加する実験の結果、損傷導入から数時間後までのリン酸化ヒストン H2AX の挙動において、飼育環境の違いによる変化が見られ、マウス血清中には飼育環境によって DNA 損傷修復に影響を与えるような成分が存在する可能性が示唆された。また、免疫組織学的手法によるマウス組織または血清中における損傷応答タンパク質のリン酸化ならびに炎症マーカーの発現の解析の結果、放射線照射後の肝臓における DNA 損傷レベル及びマクロファージの活性化に飼育環境による違いが見られ、マウスの飼育環境の違いが DNA 損傷修復及び炎症反応応答に変化を生じさせている可能性が示唆された。

平成 29 年度

EE 飼育による体内環境の違いが DNA 損傷の修復効率や修復の品質に影響を与えるかどうかのさらなる検証を行った。量研機構において EE もしくは SE で飼育したマウスから採取した血清を、茨城大学において放射線照射・非照射のマウス培養細胞の培養液に添加し、DNA 損傷修復タンパク質の蓄積量の違いの有無を比較する実験を繰り返して実施した。さらに量研機構の研究で EE もしくは SE で飼育したマウスの組織あるいは血清中について、放射線照射後の損傷応答タンパク質のリン酸化ならびに炎症マーカーの発現解析を継続して実施した。

培地に加える牛胎児血清濃度を下げた条件で DNA 損傷の修復効率や修復の品質を検証した実験を行った結果、EE マウス血清の効果はこれまでと同様に認められ、特に若年期 EE マウスにおいて血清中に DNA 修復を早める成分が含まれていることが明らかとなった。ま

た、放射線照射後の損傷応答タンパク質のリン酸化ならびに炎症マーカーの発現解析結果より、EE マウスの肝臓及び肺では放射線照射直後に検出される DNA 損傷レベルが SE マウスよりも上昇した一方で、照射後には損傷が SE マウスよりも迅速に減少したことから、EE マウスでは DNA 損傷発生に対して高感度・高精度かつ効率よく応答していることが明らかとなった。また、EE マウスの肝臓及び肺において、放射線照射後の迅速なマクロファージの活性化と沈静化が検出され、EE 飼育が慢性炎症の発生を抑制する可能性も示唆された。

(2) 放射線発がんの新たな分子機構と EE による修飾（再委託先：東京大学）

平成 27 年度

マウスを使った長鎖非コード RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 解析の条件検討を行うため以下を実施した。まず、放射線応答や発がんに関わる lncRNA を文献から探索し、特異的に検出することが可能と考えられるプライマーを 50 種類程度作成した。全 RNA を抽出後、逆転写反応により、cDNA に変換し、定量 PCR 法によって発現解析を正確に行える条件検討を行い、次年度以降の実験に使用するプライマーを決定した。

具体的には、マウスで発現が確認されている lncRNA の中から、アポトーシスやストレス応答に関連がありそうな Malat1 や lincRNA-p21 等とともに、機能が未知の lncRNA のプライマーを作成した。

平成 28 年度

定量 PCR 法(ポリメラーゼ連鎖反応)によりマウス組織の lncRNA 発現を正確に検出するための適切な条件の確立と量研機構より提供された放射線照射したマウス組織における lncRNA の発現様式の検討を行った。また、それと並行して、in situ 染色系のための試薬を揃え、その条件の確立を試みた。

その結果、放射線被ばくに応答する lncRNA 候補を幾つか見出した。

平成 29 年度

EE 環境で飼育したマウスとそうでないマウスに各々放射線を照射した際に発現変化に違いが見られる lncRNA (長鎖非コード RNA) の細胞内挙動を同定した。まず、マウス組織から全 RNA を抽出後、逆転写反応により、cDNA に変換し、定量 PCR 法によって発現解析を行った。続いて、lncRNA に特異的なプローブを in vitro 転写法により合成し、それを用いて蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行い、lncRNA の細胞内局在機構を解明した。一連の実験により EE 環境や放射線に応答する lncRNA の細胞内動態を明らかにし、細胞内動態と突然変異との関連性を検討した。

EE で飼育や放射線照射により発現が変化する数種類の lncRNA を見出すことができた。次に、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを用いて lncRNA の細胞内の局在を解析した結果、EE 飼育や放射線照射により lncRNA の細胞内での特徴的な局在変化は認められなかった。

(3) EE (適温) に関する研究（再委託先：産業医科大学）

平成 27 年度

エンリッチメント環境の 1 つの要因である温度の影響を調べるため、以下を実施した。

B6C3F1 雌マウス（各群 50 匹）を 3 週齢と 11 週齢から適温環境（EE、本実験では 31℃）で 8 週間飼育後、通常環境（SE、25.6℃）に戻して飼育する群とそのまま EE で継続飼育する群を設定した。また、SE のみで飼育する対照群を設定した。3 週齢処理群の一部を、処理後 0, 1, 3 ヶ月目（6, 12 ヶ月目は次年度）に血液並びに組織の検体を採取後、免疫能の解析及び病理検査を開始した。残りのマウスはがん細胞移植を行い、がん細胞の増殖におよぼす EE の影響を調べる実験群の飼育を開始した。また、11 週齢処理群と対照群においても同様の実験を開始した。

その結果、EE（31℃）で飼育したマウスでは、体重が増加し、さらに移植したがんの増殖が抑制されることが示唆された。当初の計画では、通常環境は 22℃であったが、当施設は 25.6℃であったので、本研究では 25.6℃とした。論文（Kokolus et al. PNAS 110, 20176-20181, 2013）では、通常温度は 20-26℃が使用されているので、研究結果には大きな問題は無いと考えられる。

平成 28 年度

EE 要因の 1 つである温度の影響を調べるため、以下を実施した。B6C3F1 雌マウスを 3 週齢から適温環境（31℃）で 8 週間飼育処理後、通常環境（25.6℃）に戻して飼育する群（A 群）とそのまま適温環境（31℃）で継続飼育する群（B 群）を設定し飼育した。また、初めから通常環境（26℃）で飼育する対照群（C 群）を設定した（各群 50 匹）。適温環境処理後の一部のマウスは経時的に解剖し脾臓を採取後、免疫能の解析及び一部のサンプル（臓器）に対し病理検査を行った。残りのマウスにはがん細胞移植を行い、がん細胞増殖への影響を解析する実験群として飼育を継続した。対照各群もこれに対応した時間で同様の解析を行った。2 回目の同様の実験群の設定を行った。

その結果、EE（適温:31℃）で飼育した B 群では、体重の有意な増加と 12 ヶ月目に移植したがん細胞の増殖抑制が認められた。

平成 29 年度

EE 要因のひとつである温度の影響を調べるため、平成 28 年度に続き以下を実施した。B6C3F1 雌マウス（各群 50 匹程度）を 3 週齢と 11 週齢から適温環境（31℃）で 8 週間飼育後、通常環境（25.6℃）に戻して飼育する群とそのまま適温環境で継続飼育する群、さらに通常環境のみで飼育する対照群を設定しており飼育を継続した。3 週齢処理群の一部を、処理後 0, 1, 3, 6, 12 ヶ月目に血液並びに組織の検体を採取後、免疫能の解析及び病理検査を行った。本年度は第 2 実験群の 12 ヶ月目のみとなった。残りのマウスはがん細胞移植を行い、がん細胞の増殖におよぼす EE の影響を調べる実験群として飼育を継続した。また、11 週齢処理群と対照群においても同様の実験を継続した。さらに 3 週齢開始の同様の実験群を 1 つ設定し、第 3 実験群として開始した。

発がん予防は、ビタミンなどの「抗酸化物質」などの化学物質が研究対象であった。しかし、本研究では、化学物質ではなく、豊かな環境（EE）で実験動物（マウス）を飼育することで内分泌系（脂肪組織を含む）・脳神経系・免疫系を全身的に活性化させ、放射線に起因する発がんを予防する試みを検証するものである。EE は、副作用を懸念する必要がなく、ヒトへの応用（試み）も容易である。また、近年、エピジェネティクスで注目されつつある遺伝子発現制御系であ

る lncRNA に着目し、放射線被ばくや放射線発がんに関わる lncRNA を探索するアプローチは新規性がある。平成 27 年度から平成 29 年度の 3 年間で、EE が体重、内分泌系や免疫系への修飾効果を有することに加え、DNA 損傷修復応答を変化させる可能性を見出した。また、放射線被ばくや EE に応答する lncRNA 候補も新たに発見した。更に、EE が放射線誘発消化管腫瘍を予防する可能性を実験的に明らかにした。以上の結果は、生活環境の改善が放射線による健康影響のリスクを低減可能であることを実験的に実証したものであり、本事業の成果は今後の災害時の避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復（維持）の施策の基本情報と成り得る有用なものと考えられる。

1. はじめに

近年、EE は動物が持つ本来の行動を刺激することから動物愛護の観点より重要であると指摘されている。更に健康増進の視点においても、EE が中枢神経系の活性化を介して副腎皮質・髄質などの内分泌機能を高めること、更に脂肪組織でのエネルギー産生促進による肥満予防への関与などが明らかとなってきた。加えて、EE で飼育されたマウスでは、移植がんの成長を抑えることも明らかとなってきた。

原発事故や地震、津波などの災害時において長期の劣悪な避難生活や仮設住宅でのこもりきりの生活は心身共に健康に悪影響を及ぼす。予防するには適切な住環境や社会環境が必要なのは言うまでもないが実際は長期避難を強いられるケースも多い。それに加え、十分な睡眠、運動（子どもの場合は好奇心のでの遊び）、そして社会的なつながりも十分ではなくなる。近年、広い空間、運動、巣作り、快適な飼育温度は、脳の機能を活性化しアルツハイマー病などの老化を予防し、肥満予防、がん予防にも寄与することが実験的に明らかとなってきた。本研究室は、放射線による障害がエンリッチメント環境を提供することで低減するのではないかと予測した。

また、子どもは放射線被ばく後の発がんリスクが高いことが、原爆被ばくやチェルノブイリ発電所の事故調査で明らかになっている。我々も、マウスやラットを用いて、思春期以前の幼若期は成体期に比べ発がんリスクが高くなり、寿命も短くなることを示してきた。例えば、出生前後の被ばくでは腎がんや脳腫瘍のリスクが高く、生後 1-3 週齢（ヒトでは幼児・小児期に対応）の被ばくで、T リンパ腫、肝がん、消化器系がんのリスクが高くなる。そこで、本研究では EE 飼育によって幼若期被ばくの発がんリスクが下がることを期待し、被ばく後の EE による健康増進効果を幼若期（生後 3 週齢、離乳期）と成体期（生後 11 週齢）で定量的に比べることにした。発がん予防効果実験には、消化管腫瘍のモデルマウスである $Apc^{Min/+}$ マウスを用いる。 $Apc^{Min/+}$ マウスは、家族性大腸腺腫症のモデルで、数ヶ月以内に多数の小腸・大腸ポリープを発症する。生後 1-3 週齢の被ばくで発がんリスクが最も高くなる。合わせて、レプチンやアディポネクチンなどの脂肪由来サイトカイン、炎症性サイトカイン、自然免疫力、放射線損傷修復能力など発がんリスクを修飾する要因を多角的に調べる。

本研究を通して、放射線の健康影響を、生活の環境改善で低減できることを示すことで、今後の避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復（維持）の施策の基礎情報としたい。

2. 業務計画

2.1 全体計画

本業務の全体計画を図1に示す。

研究項目	平成27年度	平成28年度	平成29年度
(1) エンリッチメント環境によるホメオスタシス増強とがん予防			
① 内分泌ならびに発がんに関する研究（量研機構）	← EEの準備	← EEでの飼育とサンプル提供	← 取りまとめ
② 自然免疫に関する研究（東邦大学）	← EEによるMΦの貪食能	← 微生物またはネクローシス細胞によるケモカイン産生	← 微生物またはネクローシス細胞による炎症応答解析
③ DNA修復に関する研究（茨城大学）	← 突然変異検出系の確立	← EEによる血清中成分による突然変異誘発効果の違い	← EEによる損傷シグナルの違いとまとめ
(2) 放射線発がんの新たな分子機構とエンリッチメント環境による修飾（東京大学）	← マウス lncRNA 解析法の確立	← lncRNA の放射線応答と in situ 染色系の確立	← 突然変異検出系の確立
(3) エンリッチメント環境（適温）に関する研究（産業医科大学）	← EEの準備	← EEでの飼育とサンプル提供	← 検体の解析と取りまとめ
(4) 研究推進	←		

図1. 全体計画図

量研機構と産業医大の動物飼育室内に EE [「遊び、運動、認知行動の刺激のある豊かな環境」（量研機構）と「快適温度飼育環境」（産業医科大学）] をセットアップする。EE が生体の恒常性を活性化しているか否かを調べるために、EE で飼育したマウスを内分泌学的（血清中のレプチンなどの脂肪由来ホルモンや TNF α などの炎症性サイトカイン、IL-6 などの抗炎症性サイトカイン）、免疫学的（マクロファージの貪食能やサイトカイン産生、脾臓中の活性化 T 細胞の割合など）に調べる。合わせて、放射線に対する影響を調べるために、DNA 修復能ならびに被ばく後の応答反応 [DNA 修復タンパクの量や、照射後の誘導能、lncRNA（長鎖非コードリボ核酸）の

発現] も調べる。

次に EE の自然発がんならびに放射線発がんへの予防効果を明らかにするために、消化管がんモデルである $Apc^{Min/+}$ マウスに生後 2 週齢に 0Gy (非照射)、0.1Gy から 4Gy を照射し、3 週目 (離乳期) から EE で飼育開始し、生後 30 週後に解剖し、小腸・大腸の腫瘍の数と大きさを測定する。

2.1.1 エンリッチメント環境によるホメオスタシス増強とがん予防

(1) 内分泌ならびに発がんに関する研究

- ① EE を量研機構の動物施設に設定する。EE は、通常のケージの約 8 倍程度広いケージの中で、トンネルや回転盤、巣作り材が与えられた環境で飼育する系を確立する。
- ② EE で飼育されたマウスの血清成分解析 (内分泌関連のレプチン、アディポネクチン、CRP などの炎症性サイトカイン) と全身臓器の病理解析を行う。
- ③ B6C3F1 マウス 3 週齢 (離乳期)、11 週齢 (成体期) に EE を施し、4 週間ならびに 8 週間後に安楽死させ、材料を連携機関に提供。血清の生化学試験と病理検索 (免疫組織学的に、各臓器の増殖、アポトーシス) を行う。
- ④ $Apc^{Min/+}$ マウス (消化管発がんモデル) を 2 週齢に、0.1Gy から 4Gy の放射線を照射し、EE で飼育し、通常環境 (SE) 飼育マウスの結果と比較し、EE の発がん予防効果を検討する。

(2) 自然免疫に関する研究 (再委託先: 東邦大学)

- ① EE を施したマウスから腹腔細胞を回収してフローサイトメトリーにより腹腔マクロファージ数を測定する。腹腔マクロファージを取得し、蛍光標識黄色ブドウ球菌等を *in vitro* で貪食させ、貪食能を共焦点顕微鏡により評価する。
- ② 腹腔マクロファージを黄色ブドウ球菌等と共培養して、好中球ケモカイン産生量を ELISA にて評価する。
- ③ マウス腹腔に黄色ブドウ球菌等を投与し、経時的に腹腔浸出細胞を回収してフローサイトメトリーにより分析する。同時に上清中の好中球ケモカイン量を ELISA にて評価する。

(3) DNA 修復に関する研究 (再委託先: 茨城大学)

- ① 体内環境の違いが DNA 損傷の修復効率や修復の品質に影響を与えている可能性は十分考えられる。そこで、飼育環境 [豊かな環境 (EE) と通常環境 (SE)] による細胞の放射線初期応答の違いと、放射線損傷を修飾する体内環境因子の違いを解析する。
- ② EE 飼育下での体内環境の変化が細胞の DNA 修復能に影響を与えるのかを見るために、解剖時に得られる血液から血清を調製し、照射したマウス培養細胞 (m5S など) の培養液に添加することにより、DNA 損傷初期応答が変わるかを調べる。
- ③ 飼育環境の異なるマウスの組織で被ばく後の DNA 修復シグナル起動酵素の活性化度に違いがあるかをウェスタンブロット法や免疫組織染色で比較する。また、照射後、発がんに関わる炎症マーカーの発現や炎症細胞であるマクロファージの集積を調べる。

2.1.2 放射線発がんの新たな分子機構とエンリッチメント環境による修飾 (再委託先: 東京大学)

- ① マウスの lncRNA を 50 種類リストアップし、作成する。lncRNA のほとんどは近年発見さ

れたので機能はほとんど分かっていないが、アポトーシスや炎症に関与しているものも作成する。特に被ばく時週齢の異なるマウスの放射線照射前後の種々の組織（胸腺、脾臓、肝臓、肺、脂肪など）から total RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法や micro array 法にて選別した lncRNA の発現を解析する。これにより、EE 依存的、被ばく時週齢特異的、組織特異的に放射線応答する lncRNA を同定する。

- ② 一般的に、RNA はタンパク質と相互作用することで機能を発揮することが多いことから、lncRNA と相互作用するタンパク質を免疫沈降法などで解析し、lncRNA の関与する生物学的機能を推測する。また、凍結組織標本を作成したのち、in situ ハイブリダイゼーション法や免疫沈降法によって lncRNA とそれと相互作用するタンパク質の局在様式を解析する。これらによって個体レベルの放射線応答に関係する lncRNA の組織内動態を解明する。放射線応答に関与する研究は世界で初めてである。

2.1.3 エンリッチメント環境（適温）に関する研究（再委託先：産業医科大学）

- ① 3 週齢ならびに 11 週齢の B6C3F1 雌マウスを 31℃（適温環境、EE）と 25.6℃（通常温度環境、SE）の飼育環境下で飼育し、EE の体重や組織重量変化を調べる。
- ② EE 飼育後、0 日、1、3、6、12 か月に実験群と対照群マウスの脾臓の免疫能の賦活状況や病理組織学的解析を行う。
- ③ EE と通常環境で飼育したマウスの移植癌（エールリッヒ腹水癌）の増殖パターンを SE 飼育マウスのそれと比較する。

3. 平成 27 年度～平成 29 年度の 3 年間の実施内容及び成果

3.1 エンリッチメント環境によるホメオスタシス増強とがん予防 (H27～H29)

3.1.1 内分泌ならびに発がんに関する研究 (H27～H29)

1) エンリッチメント環境の設定 (H27)

(1) 目的

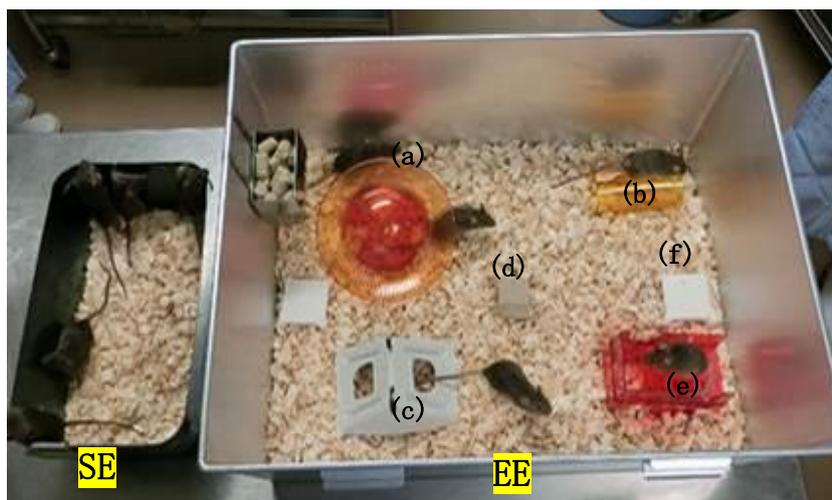
健康影響リスクの低減策の 1 つとして、環境エンリッチメント(EE：豊かで快適な「よいストレス」：eustress) による内分泌機能の変化を幼若期と成体期で定量的に比較し、幼若期被ばく後の EE の効果を明らかにすることを目的とした。そのために、マウスのエンリッチメント環境の設定を行った。

(2) 方法

本実験には、B6C3F1 系統の雄マウス (B6C3F1/Cr1、日本チャールズリバー) を用いた。すべての動物実験は、放射線医学総合研究所実験動物規定の審査を受けた動物実験計画書 (15-1024) に基づいて行った。

飼育条件は、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $45\pm 5\%$ 、12 時間明暗照明サイクルで行った。3 週齢マウスを購入し、直ちに通常ケージ(SE 群) と 4 倍程度の広さにエンリッチ環境整備用品を入れたケージ (EE 群) で飼育した。

エンリッチ環境用品は、回転盤 (図 2)、トンネル (b)、バイオハット (c)、硬木ブロック (d)、避難所 (e)、巣作りシート (f) である。匹数はエンリッチ環境に影響するため、EE 群と SE 群のマウスは 1 ケージあたり 5 匹ずつ飼育する



ことで統一した。餌は MB-1((株)船橋ファーム)を使用し、飲水は自由摂取させた。

それぞれの環境で 4 週間もしくは 6 週間飼育後 4%イソフルランによる深麻酔下にて、心臓あるいは下大静脈より血液を採取した (図 3)。同時に腹腔マクロファージを採取し、これを東邦大学に供与した。その後放血により安楽死処置を行った。マウスは解剖し、胸腺・肝臓・脾

図 2 エンリッチメント環境での飼育
SE：通常環境、EE：エンリッチメント環境

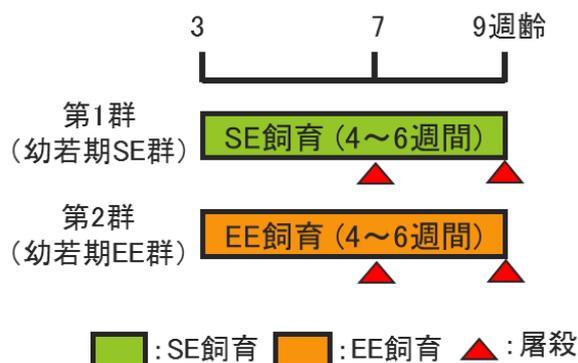


図 3. 実験デザイン 1

臓・肺・白色脂肪・褐色脂肪の一部についてサンプリングを行い-80℃保存及び病理標本を作製した。

採血した血液は、血清を分離し、0.6mL は T-CHO・TG(酵素法)、GUL(HK-G6PDH 法)、インスリン、レプチン、アディポネクチン、IGF-1、CRP 他 (ELISA 法)、コルチコステロン(EIA 法)で成分検査した(オリエンタル酵母)。残りの血清は茨城大学に供与した。同様に 11 週齢でのマウスの EE 飼育を開始した。

(3) 結果と考察

①エンリッチ環境によるマウスの変化

マウス (3 週齢) は設置した遊具でよく遊び、より活動的であった。登り降りが多いので空間を立体的に利用して生活していた。回し車は 1 匹だけではなく複数で遊ぶこともあった。通常飼育環境 (SE) と比べて動きが素早く長い間走り回っているように観察された。また遊具やトンネルの中を寝床にしていた。紙製の小屋や床材はちぎって巣作りに使っていた。

②エンリッチ飼育による体重変化

エンリッチ環境が個体の成長に与える影響を明らかにするために、飼育開始から解剖までの週に一度、経時的に体重を測定した。4 週間 (3-7weeks) あるいは 6 週間 (3-9weeks) 飼育の体重変化を示した (図 4)。6 週間 EE 群の 9 週齢時点の体重 29.1 ± 1.56 [g] は SE 群 31.8 ± 1.74 [g] と比べて有意な減少が見られた。しかし 4 週間エンリッチ環境で飼育した場合には SE 群比べて有意な差は見られなかった。

エンリッチ環境で飼育した方がより運動していたの

で体重減少につながったと考えられる。また長い飼育あるいは大人のマウスの方が、エンリッチ環境が体重減少に与える影響は大きいと考えられる。

エンリッチ環境 (EE 群) と通常飼育 (SE 群) の胸腺・肝臓・脾臓・白色脂肪・褐色脂肪の重量の違いを調べた。EE 群は SE 群と比べて白色脂肪、褐色脂肪の重量が有意に減少した ($p < 0.05$, T 検定 5%の間違い率以下)。肝臓、脾臓を含めた他の臓器に有意な変化は見られなかった。

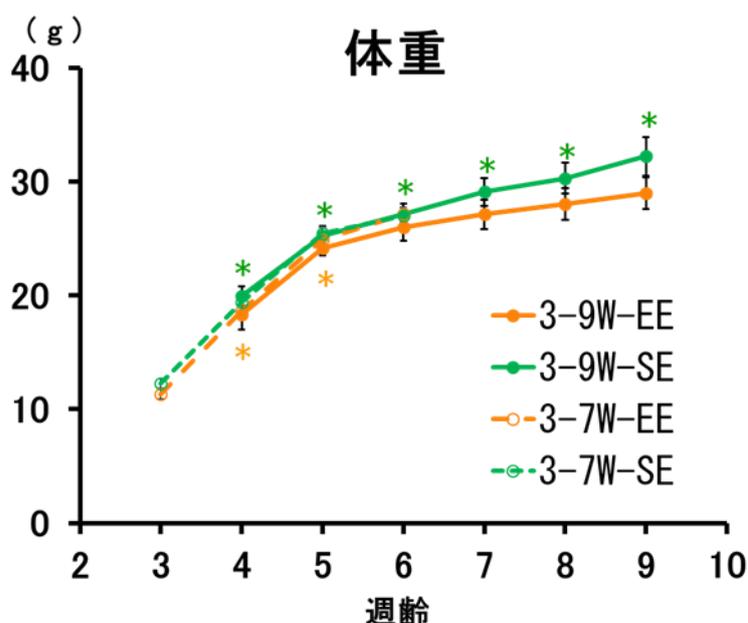


図 4. B6C3F1 マウスの体重変化
 値は平均値±SD 値 (n=5 匹), 実線がエンリッチ環境飼育群 (EE 群)、点線がコントロール群 (SE 群)
 * $P < 0.05$ (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計学的に有意を示す。)

③血中の生化学的指標

次に血中の生化学指標を調べた。3週から9週齢までの6週間のEE群(3-9週齢)において、レプチンに関してEE群の 1.0 ± 0.4 [ng/mL]がSE群の 4.6 ± 0.5 [ng/mL]と比べて有意に低値を示した。同様に3週齢から7週齢までの4週間(3-7w)でEE群の 2.1 ± 0.5 [ng/mL]がSE群の 3.2 ± 0.6 [ng/mL]と比べて有意に低値を示した。

レプチンやアディポネクチンの関与でインスリン感受性にも影響を与えるとされることからインスリンの血中濃度も測定したが両群に有意差は出なかった。理由としては解剖前の食事条件を統一しなかったため結果にばらつきが出たと考えられる。各脂質の濃度では、6週間のエンリッチ環境での飼育(3-9w)において、EE群の総コレステロール量(T-CHO) 89.6 ± 8.4 [mg/dl]はSE群 101.8 ± 3.2 [mg/dl]と比べて有意に低値を示した。さらにEE群のグルコース量(GLU) 137.6 ± 12.6 [mg/dl]はSE群 174.8 ± 20.0 [mg/dl]と比べて有意に低値を示したが、これは血清インシュリンの増加に関係すると思われる。臓器と同様に血中でもエンリッチが脂質減少に作用していると考えられる。

2) エンリッチメント環境による脂質・糖質及び内分泌に対する修飾効果の検証と放射線誘発消化管腫瘍に対する予防実験の設定 (H28)

(1) 目的

健康影響リスクの低減策の1つとして、環境エンリッチメント(豊かで快適な「よいストレス」: eustress)による内分泌機能の変化を幼若期と成体期で定量的に比較し、幼若期被ばく後のEEの効果を明らかにすることを目的とした。また、EEのがん予防効果をヒト家族性大腸腺腫症モデルである $Apc^{Min/+}$ マウスを用いて検証する。

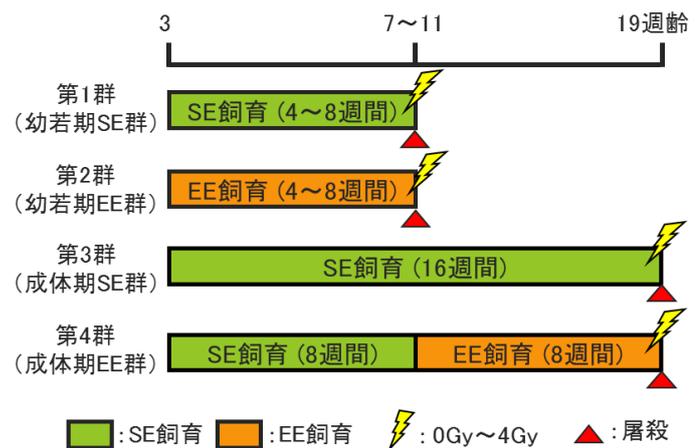


図 5. 実験デザイン 2

(2) 方法

3週齢 B6C3F1 雄マウスを4群に分け実験を行った(図5)。第1群は3週齢から4~8週間SEで飼育する群(幼若期SE群)、第2群は3週齢から4~8週間EEで飼育する群(幼若期EE群)、第3群は3週齢から16週間SEで飼育する群(成体期SE群)、第4群は3週齢から8週間SEで飼育後、11週齢から8週間EEで飼育する群(成体期EE群)とした。第1群と2群は7~



図 6. 放射線発生装置 (PANTAK HF-320)

11 週齢時に、第 3 群と第 4 群は 19 週齢時に X 線 (0~4Gy) を照射 (図 6) し、経時的に (照射後 0, 1, 3, 6, 24 時間) 解剖を行い、血液と各臓器 (胸腺、脾臓、肝臓、肺、白色及び褐色脂肪) を採取した。採取した血液は、遠心分離し血清を用いて、脂質、糖質成分及びホルモン値を酵素法、HK-G6PHD 法及び ELISA 法により測定した。臓器は、一部を病理組織検査用にホルマリン固定した。残りの血清と臓器は、DNA 修復に関する研究 (茨城大学) と放射線発がんの新たな分子機構と EE による修飾に関する研究 (東京大学) のために冷凍保存し提供した

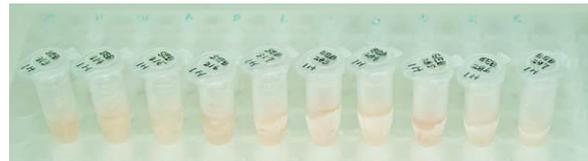


図 7. 凍結保存された血清サンプル

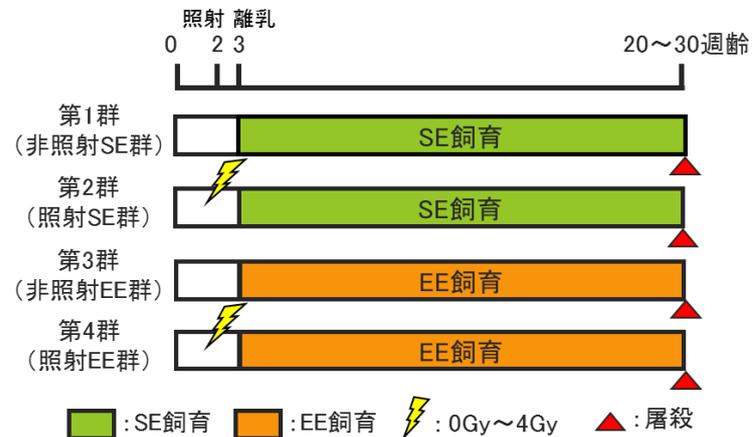


図 8. 実験デザイン 3

(図 7)。また、自然免疫に関する研究 (東邦大学) のために、腹腔細胞を回収した。また、EE のがん予防効果に関する検証実験は、放射線特異的に消化管腫瘍を誘発可能なモデルである C3B6F1Apc^{Min/+}雄マウスを用いて行った。2 週齢 C3B6F1Apc^{Min/+}雄マウスを 4 群に分け実験を行った (図 8)。第 1 群は 3 週齢から SE で飼育する群 (非照射 SE 群)、第 2 群は 2 週齢に X 線を 0 ~4Gy 照射し (図 6)、3 週齢から SE で飼育する群 (照射 SE 群)、第 3 群は 3 週齢から EE で飼育する群 (非照射 EE 群)、第 4 群は 2 週齢に X 線を 0 ~4Gy 照射し 3 週齢から EE で飼育する群 (照射 EE 群) を設定し飼育を開始した。屠殺時期の検討を行うための予備実験群も設定し開始した。今回使用した線量 4Gy を 2 週齢マウスに照射した場合、胸腺リンパ腫の発生が予測されスムーズな実験遂行に支障が出る可能性があることより胸腺リンパ腫の発生が見られない 2Gy も追加して実験を開始した。

(3) 結果と考察

① EE が体重及び臓器重量に与える効果

幼若期と成体期からの EE と SE による体重の経時的変化と屠殺時の白色脂肪及び褐色脂肪組織重量を図 9 に示す。幼若期からの EE は、開始 1 週目より SE に比較して有意に体重の経時的な増加が抑制され、EE 開始 8 週目では約 3.3g の体重差が認められた (図 9a)。幼若期からの EE は、体重の増加を緩やかにする効果を有することが考えられた。一方、成体期からの EE は、開始 1 週目に SE に比較して有意な体重減少を示したがその後の経時的な体重増加は認めなかった (図 9d)。EE 開始 8 週目では、SE に比較して約 5.3g の有意な体重差を認めた (図 9d)。成体期からの EE は、初期の体重減少とその後の経時的な体重増加を抑制する効果を有することが考えられた。更に、幼若期と成体期からの EE は、共に精巣周囲部白色脂肪 (脂肪体) と肩甲骨部褐色脂肪組織重量を SE に比較して有意に減少さ

せた (図 9b, 9c, 9e, 9f)。特に、白色脂肪組織重量の減少率が高く、成体期 EE でより顕著であった。EE による体重増加抑制効果は、脂肪組織重量を減少させたことに起因するものと考えられた。

② EE が血中脂質・糖質成分及びホルモンに与える効果

EE による血清中の脂質、糖質成分及びホルモンに与える効果を図 10 に示す。幼若期と成体期からの EE は、

共に SE に比較して総コレステロールや中性脂肪を有意に減少させた (図 10a, 10b, 10g, 10h)。しかしながら、グルコースは減少傾向を示したものの有意な差は認められなかった (図 10c, 10i)。EE の内分泌ホルモンへの効果としては、血糖値を調節するインスリン (図 10d, 10j)、摂食抑制とエネルギー代謝を調節するレプチン (図 10e, 10k) を有意に減少

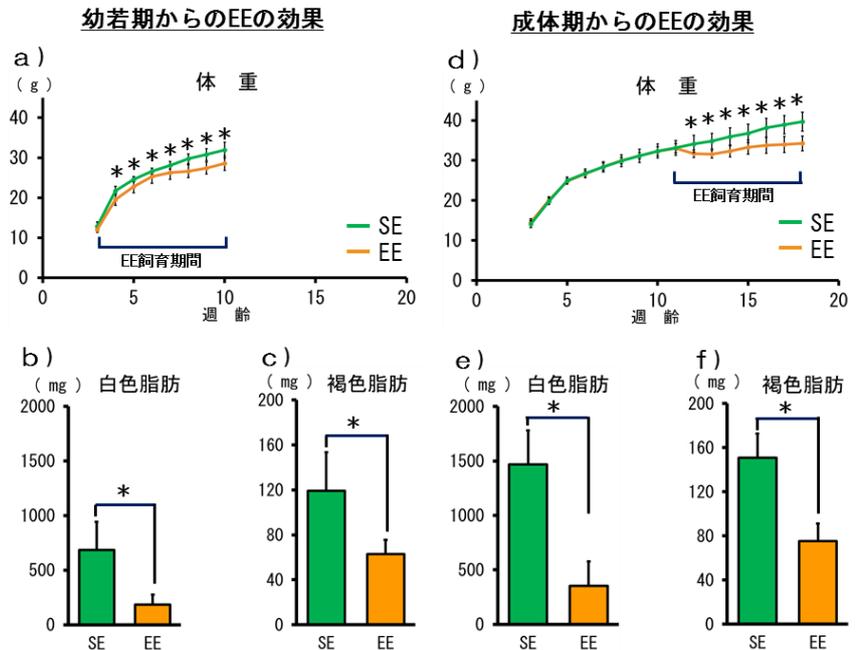


図 9. 幼若期(a-c)及び成体期 (d-f)からの EE が体重、白色脂肪及び褐色脂肪組織重量に与える効果

a, d) 体重の経時的変化、b, e) 白色脂肪組織重量の変化、c, f) 褐色脂肪組織重量の変化

データは、平均値±標準偏差(n=15)を示す。

*P<0.01 (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計的に有意を示す。)

させた。EE 群において、インスリンが減少したにも拘わらずグルコースが減少した理由として EE による運動量の増加が関与しているものと考えられた。また、レプチンは、脂肪重量に比例し増加するホルモンであることより、EE による脂肪組織重量の減少効果がレプチンを減少させたものと考えられた。一方、インスリン抵抗性を抑制し糖尿病予防効果が報告されているアディポネクチンは、EE により有意に減少を示した (図 10f, 10i)。肥満における脂肪組織重量の増加は、レプチンの上昇と、アディポネクチンの減少が特徴とされている。しかし、今回、EE の結果では、脂肪組織の重量減少にも拘わらずレプチン、アディポネクチンの両方で有意な減少が見られた。近年、アディポネクチン/レプチン比 (A/L 比) が糖尿病、動脈硬化や乳がんの病態を知るバイオマーカーとして重要であることが報告されている。カロリー制限は A/L 比を増加させ乳がんの発症を減少させることが示されている。今回の実験結果もカロリー制限同様、成体期では A/L 比が SE の 2.1 から EE の 6.4 に増加し、幼若期では A/L 比が SE の 2.6 から EE の 15.2 に増加した。このことは EE がカロリー制限と同様の効果を有している可能性を示唆している。

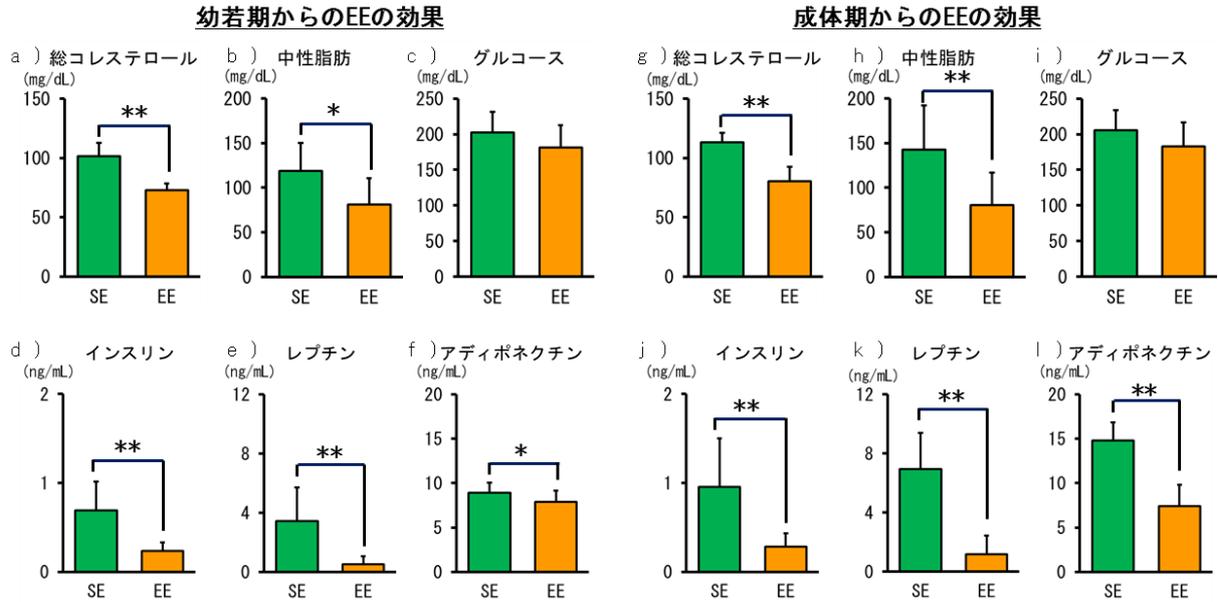


図 10. 幼若期(a-f)及び成体期 (g-l)からの EE による脂質代謝、糖代謝、インスリン及びアディポカイン分泌に与える効果
データは、平均値±標準偏差を示す。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計学的に有意を示す。)

③ EE による褐色脂肪組織における組織像と脱共役タンパク質 (UCP1) 発現の変化

解剖時の褐色脂肪組織の肉眼像、組織像及び UCP1 の免疫組織化学染色像を図 11 に示す。

EE によって褐色脂肪組織は褐色調が SE に比較して強いことが認められた (図 11a, 11d)。組織学的には、EE により細胞質内の油滴サイズの著明な減少を認めた (図 11b, 11e)。また、EE によって熱産生と脂質代謝促進に参与する UCP1 の発現が増加することが認められた (図 11c, 11f)。

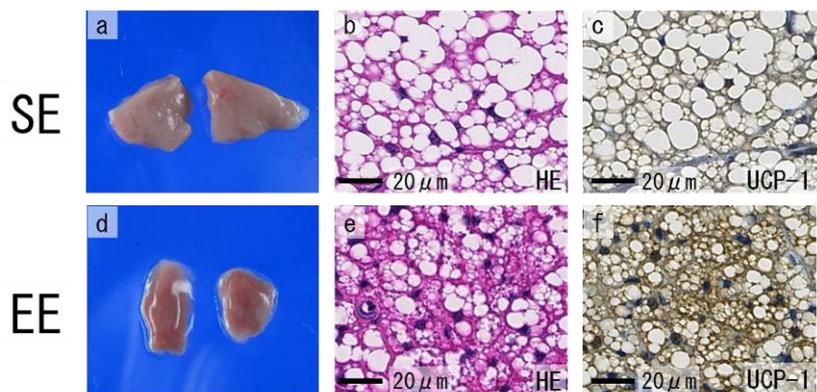


図 11. SE 及び EE 飼育後のマウス褐色脂肪組織の病理組織像と UCP1 発現の比較

a, d) 肩甲骨部褐色脂肪組織の肉眼像
b, e) 褐色脂肪組織の HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色像
c, f) UCP1 (uncoupling protein 1) の免疫組織化学染色像

UCP1 の発現増加は、EE によりミトコンドリア数が増加したことによるものと考えられた。

3) エンリッチメント環境によるアポトーシス誘導効果とがん予防効果の検証 (H29)

(1) 目的

EE が放射線被ばく後の生体応答に対する効果を検証するため、消化管におけるクリプト

の形態変化とアポトーシス数変化を EE 群と SE 群で定量的に比較し、EE の効果を明らかにすることを目的とした。また、EE のがん予防効果をヒト家族性大腸腺腫症モデルである Apc^{Min/+}マウスを用いて検証した。

(2) 方法

平成 28 年度の実験 (図 5) と同様に、3 週齢あるいは 11 週齢からエンリッチメント環境 (EE) あるいは通常環境 (SE) で 8 週間飼育したマウスに X 線を 0~2Gy 照射した後に解剖し、(1)①の内分泌と発がんに関する研究と(1)③の DNA 修復に関する研究のために血清と臓器 (胸腺、脾臓、肝臓、肺、脂肪) を凍結保存した。また、解剖時に(1)②の自然免疫に関する研究のために腹腔細胞を再委託先の東邦大学の研究者により回収した。さらに、ホルマリン固定した消化管組織の病理解析 (クリプトの形態学変化、アポトーシス数の測定など) を行った。加えて、平成 28 年度と同様 (図 8) に、生後 2 週齢の Apc^{Min/+}雄マウスに X 線を 0~2Gy 照射し、3 週齢から EE あるいは SE で飼育した。20 週齢時に解剖し、血清と臓器の保存を行い、血清の生化学検査と臓器の病理解析を行った。

(3) 結果と考察

① EE による消化管上皮におけるアポトーシス誘導効果

図 5 の実験デザインで得られた小腸と大腸を用いて、EE の非照射及び放射線照射後 6 と 24 時間後のアポトーシス誘導効果を図 12 に示す。幼若期からの EE は SE に比較して、小

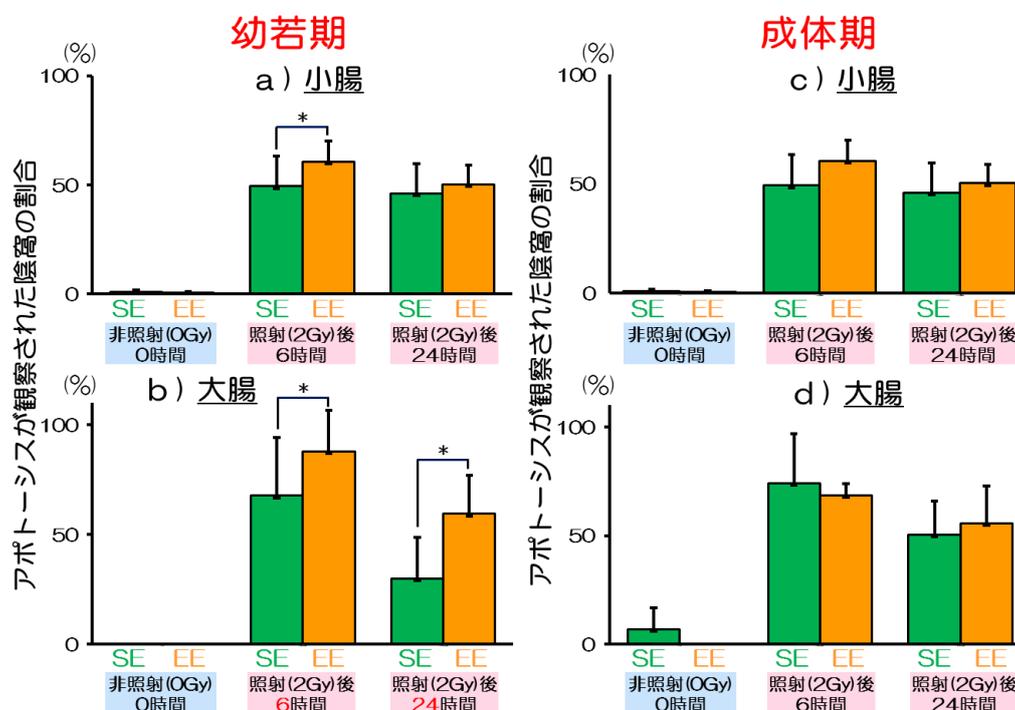


図 12. 幼若期 (a, b) 及び成体期 (c, d) からの EE による小腸と大腸におけるアポトーシス誘導効果

データは、平均値±標準偏差 (n=2~3) を示す。

*P<0.05 (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計学的に有意を示す。)

腸（照射後 6 時間）と大腸（照射後 6、24 時間）のクリプトにおけるアポトーシスの割合を有意に増加させた。一方、成体期においては、EE と SE との間には、有意な差は認められなかった。また、非照射群においてもアポトーシス誘導効果はみられなかった。以上の結果は、幼若期の EE は放射線照射により生じる DNA 損傷を有した細胞を有意にアポトーシスにより排除することが示唆される。

② EE がヒト家族性大腸腺腫症モデルマウスの脂質代謝に与える効果

EE によるヒト家族性大腸腺腫症モデルマウス ($Apc^{Min/+}$ マウス) の血清中の脂質代謝に与える効果を図 13 に示す。総コレステロール、中性脂肪及び悪玉コレステロール (LDL) は、照射により増加する傾向がみられた。一方、善玉コレステロール (HDL) は、照射により減少する傾向を示した。非照射群及び照射群において、EE は SE に比較して有意に総コレステロール、中性脂肪及び LDL を抑制した。一方、HDL は、有意に増加させた。以上の結果は、EE が脂質代謝を改善する効果を有することを示唆するものである。加えて、褐色脂肪組織の病理解析より、EE により細胞質内の油滴サイズの著明な現象を認めた (図 14)。

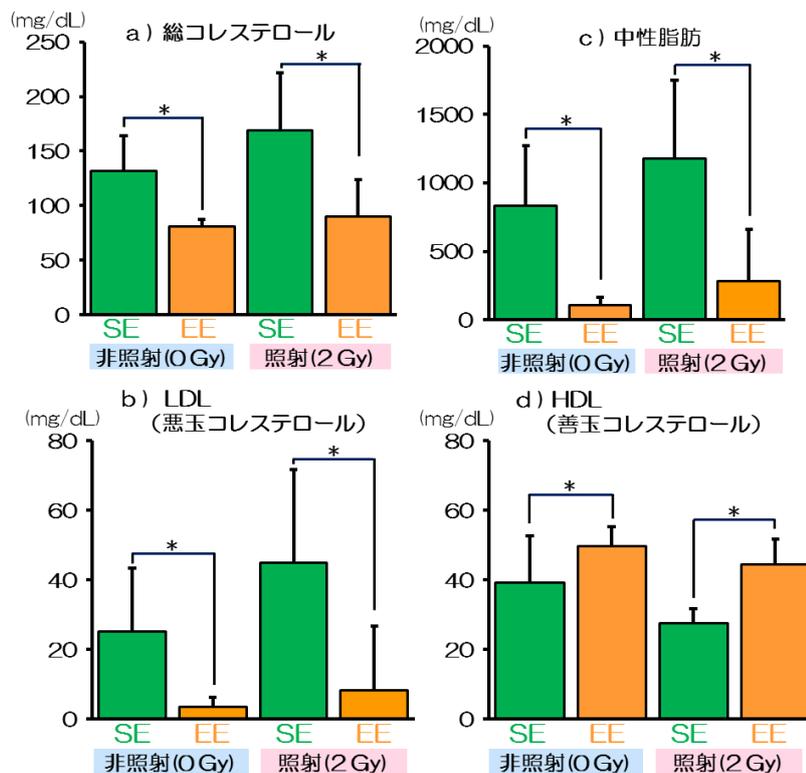


図 13. EE が $Apc^{Min/+}$ マウスの脂質代謝に与える効果
 データは、平均値±標準偏差 (n=20~24)
 * $P < 0.01$ (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計学的に有意を示す。)

③ EE の消化管腫瘍に対する抑制効果

EE による消化管腫瘍の抑制効果を図 15 に示す。消化管腫瘍の病理解析により腫瘍径の増大に伴い悪性度が上昇することが分かった。小腸及び大腸腫瘍数は、照射により増加した。EE は、SE に比較して長径 2mm 以上の小腸腫瘍数を有意に抑制したが総腫瘍数の抑制効果はみられなかった。一方、大腸腫瘍に関しては、EE は腫瘍数と腫瘍径を有意に抑制する

ことがわかった。以上の結果より、EE が放射線誘発消化管腫瘍の増殖（小腸腫瘍）と発がん（大腸腫瘍）を抑制したものと考えられる。

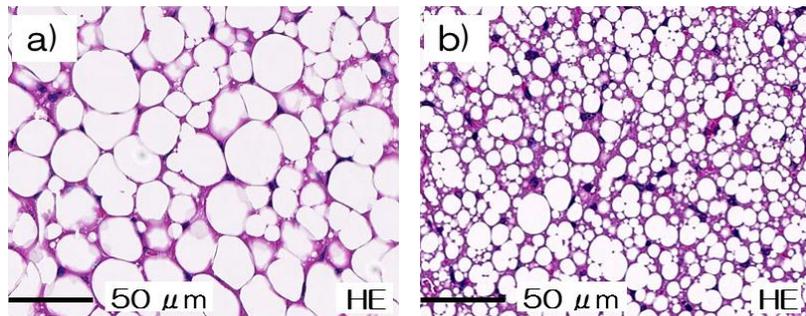


図 14. SE 及び EE 飼育後の Apc^{Min/+}マウス褐色脂肪組織の病理組織像
a) SE 飼育マウスの褐色脂肪組織、b) EE 飼育マウスの褐色脂肪組織
HE, ヘマトキシリン・エオジン染色

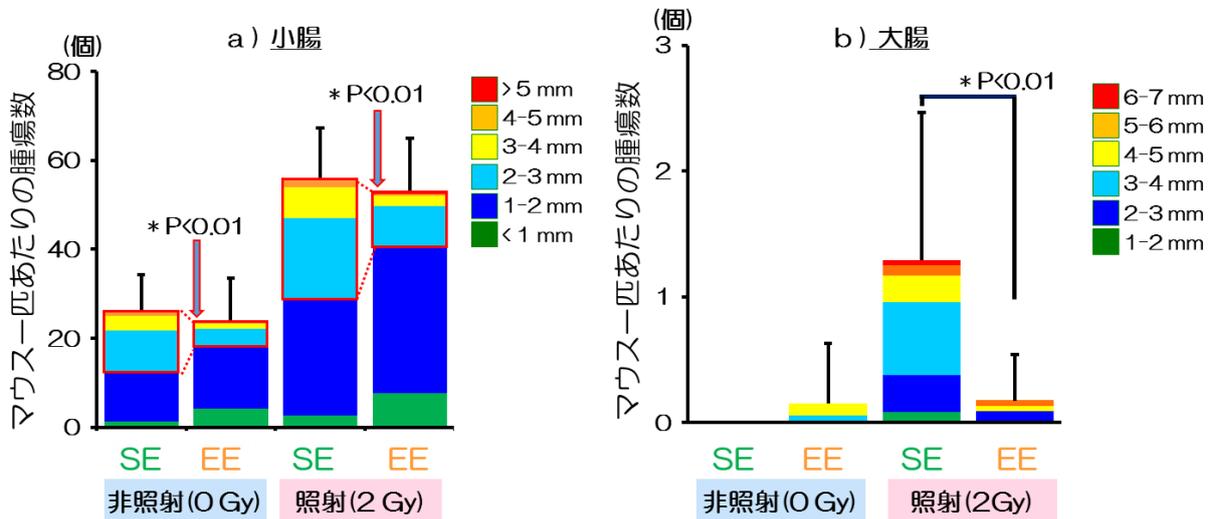


図 15. EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する抑制効果
データは、平均値±標準偏差 (n=20~24)
*P<0.01 (t 検定もしくはウェルチの検定で SE と EE の間で統計学的に有意を示す。)

3.1.2 自然免疫に関する研究（再委託先：東邦大学）（H27~H29）

1) 腹腔マクロファージのバクテリア貪食に対する EE の影響（H27）

(1) 目的

量研機構で行った研究により EE、SE で飼育されたマウス（B6C3F1 雄）から腹腔細胞を採取し、腹腔マクロファージについてフローサイトメトリーによる解析を行う。黄色ブドウ球菌をバクテリアの代表として用いて、腹腔マクロファージの貪食率、貪食能を調べる。

(2) 方法

量研の研究により EE、SE で飼育されたマウス（B6C3F1 雄）から腹腔細胞を回収し、フローサイトメトリーにより腹腔マクロファージの割合を求めた。また、腹腔マクロファージに蛍光標識黄色ブドウ球菌を貪食させ、貪食能を共焦点顕微鏡により評価した。具体的には、回収した腹腔細胞を Fc block で処理後、FITC 標識抗 F4/80（マクロファージのマーカー）、

ビオチン標識抗 Mac-1 (同マーカー)、PE 標識アビジン、PI で染色、フローサイトメータで分析した。F4/80 と Mac-1 とともに高発現している細胞群を常在性腹腔マクロファージと定義し、細胞の割合 (%) を求めた。細胞の別の一部は flexi PERM micro12 に 37° C で 1 時間接着させた後、0.25 mg/ml pHrodo RED 標識黄色ブドウ球菌と 1 時間共培養。洗浄後 20 分固定、Mowiol で封入し、共焦点顕微鏡で観察した。1 匹のマウスから得た腹腔細胞は 3 ウェルに播種。1 ウェルあたり 3 カ所観察して、それぞれ食食率、食食能を求めた。食食能は食食している細胞数あたりの (リソソーム内の) 赤色蛍光部分の面積で表示した。結果は平均値±標準偏差で表示し、Student's t test で検定した。

(3) 結果と考察

体重、腹腔細胞数、%マクロファージ、マクロファージ数、食食率、食食能を調べた結果、食食率、食食能いずれも EE 6 週間で有意に増加した。マクロファージ数は有意に変化しなかったため、食食するマクロファージの割合と個々のマクロファージの食食機能が増加したと考えられる。

2) 腹腔マクロファージのアポトーシス好中球、2 次的ネクローシス好中球の食食に対する EE の影響 (H28)

(1) 目的

量研機構で行った研究により EE、SE で飼育されたマウス (B6C3F1 雄) の腹腔から腹腔マクロファージを回収し、食食能や食食に伴う好中球ケモカイン等の産生能を調べる。前年度、蛍光標識黄色ブドウ球菌に対する食食について調べたので、平成 28 年度は蛍光標識アポトーシス好中球及び蛍光標識 2 次的ネクローシス好中球に対する食食について調べる。なお平成 27 年度の結果から腹腔マクロファージ数や腹腔マクロファージ食食能に EE の影響がみられたので、平成 28 年度は脂肪組織の実験は行わない。

(2) 方法

量研機構で行なった研究により EE、SE で飼育されたマウス (B6C3F1 雄) の腹腔から腹腔マクロファージを回収、これを蛍光標識後、プラスチックプレートのウェルに播種、洗浄して付着性細胞 (マクロファージ) を得た。一方、マウス (C57BL/6) にチオグリコレート培地を腹腔内投与、6 時間後に腹腔浸出細胞を回収して好中球に富む細胞集団を得た。これを 2 時間培養してアポトーシス好中球を、16 時間培養して 2 次的ネクローシス好中球を得、マクロファージとは別の蛍光色素で標識して、マクロファージに対し 1 : 2 の比率で加え、2 時間培養した。食食像を共焦点顕微鏡で観察し、食食率を求めた。結果は平均値±標準偏差で表示し、Student's t test で検定した。

(3) 結果と考察

アポトーシス好中球に対する食食率は EE で増加したが、2 次的ネクローシス好中球に対する食食率は EE で変化がなかった。一方、腹腔細胞数は EE で増加したが、プラスチック付着性細胞 (マクロファージ) の割合は変化しなかった。

(4) 結語

細菌感染やそのほかの原因で浸潤した好中球は役目を終えるとアポトーシスに陥るが、マクロファージがこれをすみやかに貪食除去すればなんら応答を惹起することなくやがて組織は修復される。今回の結果から EE はこの過程を促進すると予想された。

3) 腹腔マクロファージの M1/M2 サブタイプの解析、ケモカイン産生に対する EE の影響 (H29)

(1) 目的

量研機構で行なった研究により EE、SE で飼育されたマウス (B6C3F1 雄) から腹腔細胞を回収してフローサイトメトリーと定量的 PCR により腹腔マクロファージの M1/M2 サブタイプを比較する。また 2 次的ネクロシス細胞、ネクロシス細胞、(ホルマリン処理加熱済み) 黄色ブドウ球菌との共培養で産生されるケモカイン量を調べる。

(2) 方法

量研機構で行なった研究により EE、SE で飼育されたマウス (B6C3F1 雄) の腹腔から腹腔マクロファージを回収、これをプラスチックディッシュに播種、洗浄して付着性細胞 (マクロファージ) を得た。平成 27 年度の結果に記載した方法でフローサイトメトリーを行い、マクロファージ (F4/80 強陽性細胞) 中の CD40 (M1 マーカー) と CD206 (M2 マーカー) の発現を調べた。また一部から RNA を得て、cDNA とし、定量的 PCR により M1 マーカーである IL-6、NOS2、CD38 と M2 マーカーである Irf4、Arg-1、c-Myc の mRNA レベルを調べ、12S ribosomal RNA に対する比率 (%) として求めた。一方、マウス (C57BL/6) にチオグリコレート培地を腹腔内投与、6 時間後に腹腔浸出細胞を回収して好中球に富む細胞集団を得た。これを 16 時間培養して 2 次的ネクロシス好中球を、または直ちに 3 回凍結融解してネクロシス好中球を、それぞれ得た。2 次的ネクロシス好中球またはネクロシス好中球をマクロファージに対し 1 : 2 の比率として、もしくは (ホルマリン固定加熱済み) 黄色ブドウ球菌を 0.25mg/ml として、24 時間培養し、上清を得た。上清中のケモカイン (MIP-2、KC、MCP-1) 量は ELISA により測定した。結果は平均値±標準偏差で表示し、Student's t test で検定した。

(3) 結果と考察

腹腔細胞数は平成 27 年度と異なり変化がなかったが、腹腔マクロファージ (F4/80 強陽性細胞) 数は平成 27 年度のプラスチック付着性細胞数と同様変化がなかった ($2.0 \pm 0.22 \times 10^6$ cells vs. $2.1 \pm 0.13 \times 10^6$ cells)。フローサイトメトリーの結果、EE は M1 マーカー (CD40) 発現マクロファージ数を増加させ ($5.8 \pm 0.17 \times 10^5$ cells vs. $8.5 \pm 0.09 \times 10^5$ cells, $*p < 0.01$; 図 16)、M2 マーカー (CD206) 発現マクロファージ数には影響がなかった ($1.0 \pm 0.08 \times 10^5$ cells vs. $1.1 \pm 0.1 \times 10^5$ cells)。また、定量的 PCR の結果、EE は M1 マーカー (IL-6; $0.61 \pm 0.19\%$ vs. $7.3 \pm 1.3\%$, $*p < 0.05$; 図 17) と M2 マーカー (Irf4; $0.42 \pm 0.09\%$ vs. $0.77 \pm 0.09\%$, $p < 0.01$) を増加させたが、他の M1 マーカー (CD38: $8.0 \pm 0.8\%$ vs. $5.1 \pm 0.5\%$, $p < 0.01$) は減少させ、他の M1 マーカー (NOS2) と M2 マーカー

(Arg1, c-Myc)には影響がなかった。なおこれらが確かに M1、M2 マーカーであることは別に確認した。

CD40陽性細胞数

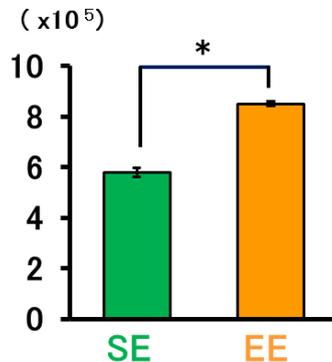


図 16. SE マクロファージと EE マクロファージとの CD40 陽性細胞数の比較

IL-6 mRNA発現量

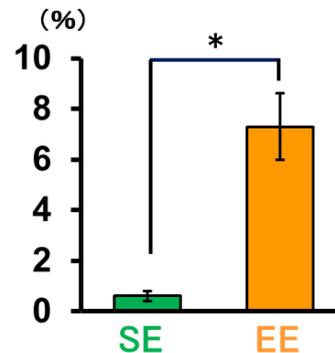


図 17. SE マクロファージと EE マクロファージとの IL-6 mRNA レベルの比較

次に 2 次的ネクロシス細胞、ネクロシス細胞、黄色ブドウ球菌とマクロファージを共培養した時に産生されるケモカイン量を調べた。結果、2 次的ネクロシス細胞との共培養では有意なケモカイン産生は見られず、ネクロシス細胞との共培養では EE は MCP-1 産生を抑制した (301 ± 188 ng/ml vs. 0.6 ± 0.5 ng/ml, $p < 0.05$)。一方黄色ブドウ球菌との共培養では EE は MIP-2 (13.6 ± 0.8 ng/ml vs. 15.9 ± 4.7 ng/ml, $p = 0.2$)、KC (4.6 ± 0.4 ng/ml vs. 6.0 ± 1.7 ng/ml, $p = 0.1$)、MCP-1 (29.9 ± 15.6 ng/ml vs. 109 ± 70 ng/ml, $p = 0.06$) 産生を増加させる傾向にあった。

(4) 結語

EE は M1/M2 以外の新しいタイプのマクロファージを誘導する可能性がある。また EE は黄色ブドウ球菌に伴う炎症応答を増加させ、結果生じるネクロシス細胞に対する炎症応答は抑制して炎症の悪循環を防いでいる可能性がある。

4) 全体の結語 (H27~H29)

今回の研究から、黄色ブドウ球菌が感染すると EE マクロファージはそれを効率よく貪食し (平成 27 年度結果)、また感染に伴う炎症応答を促進して (平成 29 年度結果)、感染防御を助ける一方、役目を終えた好中球がアポトーシスに陥ると EE マクロファージはそれを効率よく貪食し (平成 28 年度結果)、万が一好中球がネクロシスに陥っても炎症の悪循環を起こさないようにしている (平成 29 年度結果)、と予想された。EE の自然免疫に及ぼす良い効果の一端が明らかになったと考える。また EE が M1/M2 以外の新しいタイプのマクロファージを誘導する可能性が生じた (平成 29 年度結果) が、運動によって M1 マーカー (IL-6) が増加することが報告されているので、このマクロファージの誘導に EE で飼育されている間の運動量の増加が関与している可能性がある。

3. 1. 3 DNA 修復に関する研究（再委託先：茨城大学）（H27～H29）

1) 目的（H27～H29）

放射線の生体影響に関する最も重要な標的は、細胞核の中にある DNA である。放射線は様々なタイプの DNA 損傷（DNA の化学変化）を引き起こすが、それらのなかで最も重篤な損傷とされているのが DNA 二重鎖切断である。細胞には DNA 二重鎖切断を修復する複数の機構が備わっており、その効率は細胞側の要因、すなわち、細胞周期や他の細胞・組織からの刺激によって変化することが知られている。このことから、体内環境の違いが DNA 損傷の修復効率や修復の品質に影響を与えている可能性は十分考えられるので、マウスの飼育環境によって DNA 修復効率が変わるのかどうかを検証することとした。

本項目では飼育環境による細胞そのものの性質の変化と、体内環境全体に由来する細胞応答制御シグナルの違いという、2つの視点から DNA 修復活性を解析することを目的としている。具体的には、飼育環境の異なるマウス血清中に含まれる成分によって放射線で生じた DNA 二重鎖切断の修復効率が変わるのかどうか、飼育環境の異なるマウスの組織において、放射線被ばく後の DNA 修復の活性化の度合いや、がん化に関連する細胞応答に違いがあるかどうかを、免疫組織化学染色などを用いて比較することとした。平成 27 年度に予備的な解析を行って細胞の選定と実験条件、蛍光免疫染色に用いる抗体、さらには組織切片の厚さ等の検討を行い、平成 28 年度及び平成 29 年度には決定した条件に基づいて細胞及び組織切片を用いた本格的な解析を行った。また、細胞の実験については実験過程で得られた結果から、さらに標的成分を特定することも考えて培養条件を改良しての実験も実施した。

本項目で DNA 損傷の指標としたのは、DNA 二重鎖切断などに応答するタンパク質の翻訳後修飾（化学修飾）の変化である。ヒトのような真核生物の細胞内では、遺伝子 DNA（ゲノム DNA）はヒストンと呼ばれるタンパク質の複合体（八量体）に巻きついて、クロマチンと呼ばれる特殊な構造をとっている。放射線などで DNA 二重鎖切断が生じると、ゲノム DNA と共にクロマチンを形成しているヒストンタンパク質の化学修飾が起きる。なかでもヒストン H2A の一種（バリエント）である H2AX は、DNA 損傷に応答して速やかにリン酸化されることが知られている。多くの培養細胞では、リン酸化されたヒストン H2AX の量は、放射線の照射後 1 時間以内にピークに達し、リン酸化される量も放射線の線量に依存して増加することや、損傷の修復が進むにつれて減少する様子が観察されることから、DNA 損傷の動態解析に有用なマーカーとして用いられている¹⁾。本項では、このヒストン H2AX のリン酸化を指標として、体液成分の違いの検証に加えて、飼育環境が細胞そのものに与える変化の検証として、組織切片を用いた損傷応答の比較も行った。さらに組織切片を用いた解析では、炎症反応を示す細胞マーカー（タンパク質）や、炎症に関わるマクロファージの活性化についての解析も実施した。

2) エンリッチメント環境に影響を受ける損傷応答因子の解析（H27～H28）

(1) 方法

① 培養細胞を用いた損傷マーカーの動態解析

もし EE 条件下での飼育により、体内環境全体として発がんにつながる遺伝子変異などが抑えられているのであれば、EE マウスの体液（本研究では血清）中には細胞の修復能に影響

響を与える成分が分泌されて含まれているはずである。そこで、異なる飼育条件下での体内環境として細胞の DNA 修復能に影響を与えるような反応があるのかどうかを確かめるために、マウスの解剖時に採取した血液から血清を調製してマウス培養細胞の細胞培養液に添加し、放射線照射後の DNA 損傷修復過程をモニターすることで、血清中に DNA 修復効率を変えるような成分が含まれているのかを調べた。

平成 27 年度は実験に用いる細胞と検出条件の検討を行った。まず、細胞株を検討した結果、マウス培養細胞株として正常な近二倍体細胞株である m5S 細胞を用いることとし、細胞は MEM- α 培地を用いて培養した。一般に、細胞培養では、細胞の維持と増殖を促すために培地に 10% 程度の牛胎児血清 (FBS) を加えるが、牛胎児血清が大量に入っているとマウス血清の効果を見ることが困難になる可能性が考えられた。そこで、低濃度でも十分に高い細胞増殖刺激性が認められる牛胎児血清のロットを選択して使用することにより、牛胎児血清の濃度を下げ、添加するマウス血清の効果がより明確に現れるようにすることを考えた。最終的に決定した条件では、通常時の培養では 5% の牛胎児血清を添加した培地で培養し、EE あるいは SE マウス血清の影響を調べる際には、培地の牛胎児血清濃度を 2% に下げ、そこに試料となるマウス血清を添加した培地を用いて、照射 24 時間前からチャンバースライドで培養した。また、マウス血清の添加濃度は、マウス 1 匹から得られる量が非常に少ないため、予備的解析の結果を踏まえて最終的に 2.5% とした。なお、最終年度に追加した解析では、マウス血清の効果をより明確にする目的で、培地を特殊なブレンドに変更し、通常時の培養を 2% の牛胎児血清で行い、チャンバースライドにまく際に牛胎児血清濃度を 0.5% に下げるといった条件での実験を行った。

免疫染色に用いる抗体については、当初はマウスモノクローナル抗体を用いての予備実験を行ったが、透過処理やブロッキング等で調整しても培地に加えたマウス血清と二次抗体が反応してバックグラウンドが高くなることが判明した。そのため、最終的にはリン酸化 H2AX に対する一次抗体をウサギモノクローナル抗体に変えることとした。これにより、バックグラウンドは大幅に改善し、フォーカスの検出も鮮明にできるようになったので、2 年目以降の本格的な解析ではすべてウサギモノクローナル抗体を用いた免疫染色により行った。

背景で述べたように、ゲノム DNA に損傷が入るとヒストン H2AX がリン酸化される。この反応は、真核生物であれば生物種を問わず起きることから、DNA 損傷のマーカーとして広く用いられている。本研究でも DNA 損傷部に形成されるヒストン H2AX のリン酸化を検出することで、損傷修復能への影響を解析することとした。

まず、X 線照射の 24 時間前より、EE マウスまたは SE マウスの血清を添加した培地を用いて m5S 細胞をチャンバースライド上で培養した。この細胞に 4Gy の X 線 (線量率は 1.52 Gy/min) を照射した後、37°C で培養し、0.5 時間、1 時間、4 時間、24 時間経過した時点で細胞を生理食塩リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄してから氷上で界面活性剤を含む PBS で前透過処理を行った。その後、2% パラホルムアルデヒドによる固定とエタノールによる細胞膜透過処理を行い、リン酸化ヒストン H2AX 抗体 (ウサギモノクローナル抗体: Abcam 社) を用いた一次染色と蛍光標識抗ウサギ IgG 抗体による二次染色を行って、落射蛍光顕微鏡 (オリンパス) に設置した CCD カメラを用いて同一条件にて画像を撮影し、データをパソコン

に取り込んだ。次に、取り込んだ画像を用いてフォーカス（損傷部に形成されるタンパク質集合体）の計数を行うとともに、Image-J ソフトウェアを利用して細胞核あたりの蛍光強度の数値化を行った。これらを DNA 損傷量のデータとして複数個体（繰り返し）分をまとめて統計処理を行った。

③ 組織切片を用いた解析

量研機構により保存された EE マウスまたは SE マウスの組織を用いて、放射線損傷応答タンパク質のリン酸化ならびにマクロファージ活性化の解析を行うための凍結組織切片の条件を検討した。具体的には、放医研で作製された臓器凍結 OCT 包埋ブロックを冷凍保存状態で茨城大学に配送し、薄切凍結切片作成まではマイナス 80℃冷凍保管庫にて保管した。その後、クリオスタットを用いて薄切凍結切片の作成を行った。その結果、4 マイクロン程度の厚さが最も臓器解析に適していることがわかり、切片作成条件を決定した。また、作製した凍結組織切片は 4%パラホルムアルデヒドで固定を行った後にエタノールによる透過処理を行った。放射線損傷応答のマーカーとしてリン酸化ヒストン H2AX 抗体（ウサギポリクローナル抗体）を、マクロファージ活性化のマーカーとして F4/80 タンパク質抗体（ウサギポリクローナル抗体）を用いて一次免疫染色反応を行い、その後、蛍光色素標識二次抗体（抗ウサギ IgG 認識 Alexa488 標識抗体）による免疫組織染色を行った。染色したスライドは蛍光顕微鏡下で観察し、画像データをオリンパス社製の Cellsens ソフトウェアを用いて取りこんだ。取り込んだ画像より、リン酸化ヒストン H2AX 陽性細胞を目視によって計測し、DNA 損傷陽性細胞の定量を行った。また、マクロファージ活性については、取りこんだ画像の F4/80 による染色が認められた領域について画像解析ソフトを用いて定量し、マクロファージ活性のレベルを判定した。平成 28 年度までは、放射線照射後 6 時間までの肝臓組織における DNA 損傷レベルの検出及び、放射線非照射時におけるマクロファージレベルについて検討を行った。

(2) 結果と考察 (H27～H28)

① 培養細胞を用いた解析

まず、初年度は細胞株を m5S 細胞に決定して実験条件の設定を行った。特に、当初の予備実験で明らかとなった、マウスモノクローナル抗体ではバックグラウンドが高いという問題点を解決するために、リン酸化ヒストン H2AX 抗体の免疫生物をウサギに変えて固定、染色条件の検討を行った結果、ウサギモノクローナル抗体を用いることで、低いバックグラウンドが得られ、シグナル計測もしやすい実験条件を設定できた。以降の実験では、ウサギモノクローナル抗体を用いることでバックグラウンドが低くなったことから、添加するマウス血清の濃度を当初の 2%から 2.5%に変更し、少しでも違いが明確になるようにした。

平成 28 年度は、牛胎児血清を 2%添加した培地を用いて、EE マウスの血清中に DNA 修復効率に影響を与える成分が含まれているかを調べる実験を繰り返し行った。放医研において 3 週齢から 11 週齢まで（若齢期）、あるいは 11 週齢から 19 週齢まで（成体期）の間、EE または SE 環境で飼育したマウスより得られた血清を、マウス m5S 細胞の培養液に添加して培養し、4Gy の X 線照射による DNA 損傷導入後 30 分から 24 時間後までのリン酸化ヒ

ストン H2AX の挙動（フォーカスと呼ばれるタンパク質集合体の形成数、あるいはその蓄積度合いを示す蛍光強度）を解析した。その解析例を図 18 に示した。リン酸化 H2AX のフォーカス（写真のドット状の集合体）は X 線照射後 30 分から 1 時間で最大となり。その後時間とともに減少して 24 時間後にはほぼ非照射レベルに戻り、DNA 損傷の修復が進行する様子が観察できる。なお、解析は個体ごとに行い、個体差も含めつつ複数回の実験をまとめて評価できるように配慮した。その結果、3 週齢から 11 週齢まで EE 環境で飼育されたマウスから得られた血清を添加した場合には、SE 環境で飼育し続けたマウスの血清と比較して X 線照射後 4 時間でのリン酸化 H2AX の集積輝度が明らかに低下することが示唆され（図 19）、EE 環境のマウス血清には DNA 損傷の修復を早める効果のある成分が存在する可能性が考えられた。

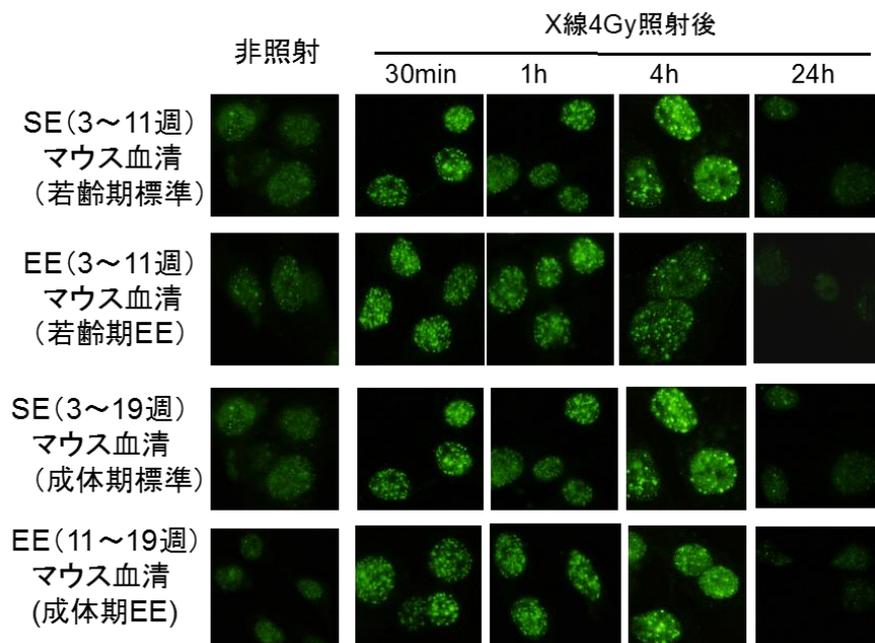


図 18. X 線照射後のリン酸化 H2AX フォーカスの経時変化（写真は典型例を示す）
若齢期 EE または成体期 EE マウスの血清を添加した培地で培養したマウス細胞に X 線を照射し、示した時間でリン酸化 H2AX の免疫染色を行った。SE はそれぞれの対照（標準飼育）である。

②組織切片を用いた解析

3.1.1 により保存されたマウスの組織における放射線損傷応答ならびにマクロファージ活性について、それぞれのマーカータンパク質を用いた免疫組織学的手法によって解析を実施した。平成 28 年度までは EE 群と SE 群の放射線損傷応答変化を明確にするために、放射線被ばく後経時的なリン酸化ヒストン H2AX の変化について肝臓組織切片を用いて解析した。一細胞あたりに 4 つ以上のリン酸化 H2AX フォーカスを有する細胞を陽性細胞として計測し、DNA 損傷レベルを経時的に検討した結果、放射線照射後 6 時間での肝臓における DNA 損傷レベルが SE 群と比較して EE 群でわずかに低下していた。このことは、EE 群の肝臓では放射線によって誘発された DNA 損傷が SE 群より効率的に修復されていることを示唆して

いる。次に、飼育環境による非照射時における組織炎症反応及び放射線照射後の組織炎症反応についてマクロファージマーカーである F4/80 タンパク質に対する免疫蛍光染色によって検討した。その結果、EE マウス群では SE マウス群と比較して高いレベルの F4/80 陽性反応が認められた (図 20)。非ストレス条件下の肝臓において炎症反応の活性化がみられたこの結果は、EE マウス群で血中の中性脂肪レベルや総コレステロールレベルが減少している放医研のデータを考慮すると、肝臓において脂肪細胞などの積極的な貪食作用が誘導されていることを示唆している。

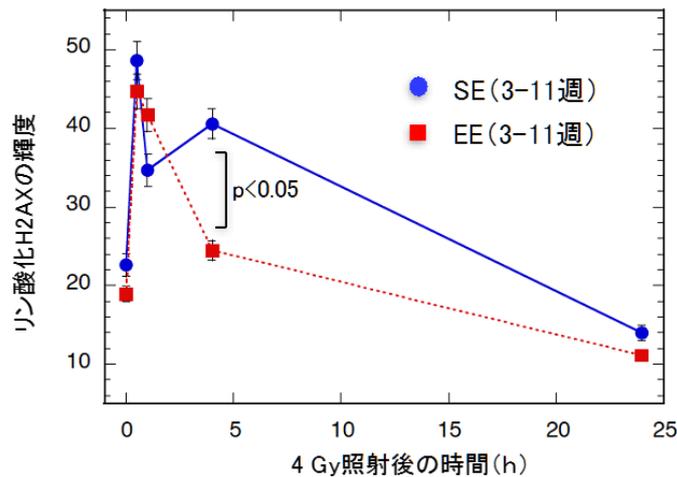


図 19. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX フォーカスの輝度の経時変化
プロットは核処理群における独立した実験から得られた平均値と標準偏差を示す (n=3)。

	group	Dose (Gy)	Mouse #	F4/80 staining positivity
	SEA	0	68	+
			73	+
			76	+
	SEB	0	38	+++ *
			44	-
	EEA	0	53	+++
			61	+
	EEB	0	23	+++
			26	++
			29	+

図 20. 非照射時のマウス肝臓組織における炎症反応レベル

(左の写真) 肝臓組織の F4/80 抗体による免疫染色の画像。F4/80 染色レベルによって 3 段階の陽性度として評価した。(右表) 各マウス肝臓組織での F4/80 陽性度を示す陽性度を示す。

SEA: 若齢期 SE
SEB: 成体期 SE
EEA: 若齢期 EE
EEB: 成体期 EE

3) エンリッチメント環境が細胞および組織の DNA 損傷修復応答に与える影響の解析 (H29)

(1) 方法

① 培養細胞を用いた解析

平成 29 年度には、さらに実験を繰り返し、前年度までのデータとあわせて統計処理を行った。これに加えて、マウス血清に含まれる DNA 損傷修復効率に影響を与える成分を特定

する布石として、通常の細胞培養液に添加する牛胎児血清の影響を極力排除するような条件（現時点で 0.5%）での実験にも取り組んだ。

②組織切片を用いた解析

量研機構により保存された EE マウスまたは SE マウスの組織を用いて、放射線損傷応答タンパク質のリン酸化ならびにマクロファージ活性化の解析を行った。平成 28 年度までに確立した解析方法を用い、平成 29 年度については、肝臓組織及び肺組織における放射線損傷応答の長期的な解析、さらには放射線照射後の炎症反応の変化について検討を行った。

(2) 結果と考察

①培養細胞を用いた解析

平成 29 年度はさらに 4 回の実験を追加し、それらを全て合わせて解析を行った。その結果、3 週齢から 11 週齢まで EE 環境で飼育されたマウス（若齢期 EE マウス：EEA）から得られた血清を添加した場合には、同時期に SE 環境で飼育し続けたマウス（SEA）の血清と比較して X 線照射後 4 時間でのリン酸化 H2AX の集積輝度が明らかに低下すること（統計的有意差あり）が観察された。その効果は、成体期である 7 週齢から 15 週齢まで EE 環境で飼育したマウス（成体期 EE マウス：EEB）の血清では非常に小さくなり、比較対照の SE マウス（SEB）の血清と比較して統計的な差は見られなくなった（図 21）。さらに、DNA 二重鎖切断の数と相関する細胞核あたりのリン酸化 H2AX フォーカス数においても、若齢期 EE マウスの血清でのみ、照射後 1 時間におけるフォーカス数が他の血清と比較してわずかではあるが統計的に有意に低下することがわかった（図 22）。なお、リン酸化ヒストン H2AX のバックグラウンド値及び照射後の最大値については、どのマウスの血清でも差がなかったことから、若齢期 EE マウスの血清中には細胞の DNA 損傷修復を早めるような成分が含まれていることが示唆された。

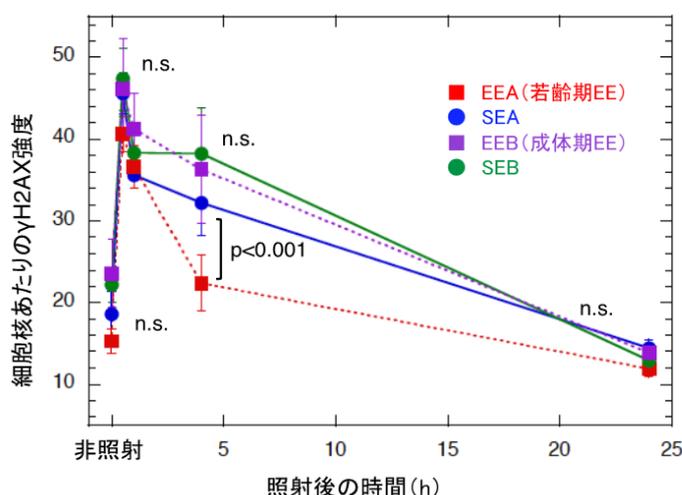


図 21. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX 量（輝度）の経時変化
若齢期 EE（EEA）、成体期 EE（EEB）とそれぞれの対照となる標準環境（SEA、SEB）の結果を示している。エラーバーは標準偏差（n=7）を示す。照射後 4 時間の EEA と SEA の間には有意差がある（ $p < 0.001$ ）。n. s. は有意差が無いことを示す。

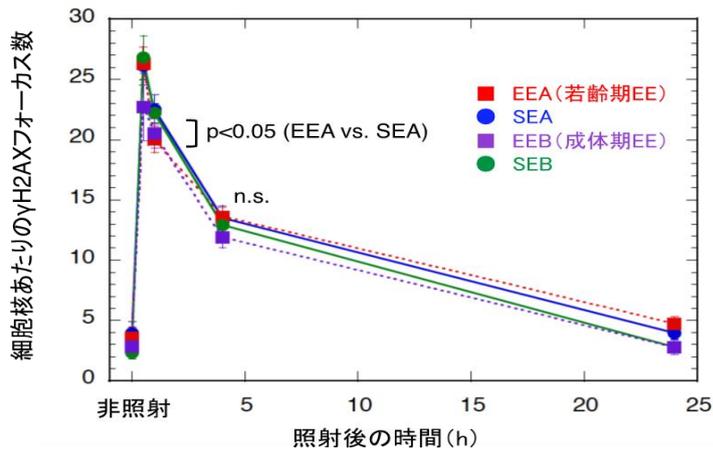


図 22. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX フォーカス数の経時変化
 若齢期 EE (EEA)、成体期 EE (EEB) と、それぞれの対照となる標準環境 (SEA、SEB) の結果を示している。エラーバーは標準偏差 (n=7) を示す。
 照射後 1 時間においてのみ、若齢期 EE と SE の間に有意差があった。

次に、マウス血清の効果をより明確にすることと、影響を与えている血清成分の分析を可能にする手段として、培地中の牛胎児血清の濃度を極力下げた実験を繰り返し行った。これは牛胎児血清には未知成分が含まれているため、マウス血清との相互作用などで DNA 損傷修復が影響を受けた可能性が排除できないためである。なお、通常の細胞培養では、牛胎児血清の濃度を極端に下げると細胞増殖が停止したり、細胞が死んでしまうことがあるため、実験では通常用いてきた MEM- α 培地にハムスター細胞の無血清培養に用いる馴化培地 (CD-0ptiCHO 培地) を添加して、細胞の増殖を保ちつつ、牛胎児血清を下げるができる培養条件を探った。実施期間内に細胞を無血清培地に完全馴化することはできなかったが、牛胎児血清を 0.5% に下げても 1 週間程度であれば増殖を保って維持できるようになったので、牛胎児血清を 0.5%、マウス血清を 2.5% という条件での照射実験を、若齢期 EE マウス血清と対照の SE マウス血清について実施し、同様の効果が得られるかを比較した。その結果、牛胎児血清の濃度を極端に下げたことで、細胞の増殖速度が低下し、細胞周期の構成は若干変わっていることが考えられるものの、若齢期 EE マウスの血清を添加した場合には、対照の SE マウスの血清を添加した場合と比較して、X 線照射後 4 時間でのリン酸化 H2AX の輝度が有意に低下し、これまでの実験と同様に若齢期 EE マウス血清が DNA 損傷の修復効率を上昇させていることが確認された (図 23)。このことから、若齢期を EE 環境で過ごしたマウス血清には DNA 損傷の修復を早める効果を持つ成分が存在する可能性が考えられた。以上の結果は、マウスの血清中には DNA 損傷修復に影響を与える成分が存在しており、その成分あるいは量が飼育環境の違いによって変化する可能性を示している。特に成体になる前の若齢期の飼育環境が大きな影響を与えているものと考えられる。

②組織切片を用いた解析

3.1.1 により保存されたマウスの組織における放射線損傷応答ならびにマクロファージ活性について、それぞれのマーカータンパク質を用いた免疫組織学的手法によって解析を実施した。まず、EE マウス群と SE マウス群の放射線損傷応答変化を明確にするために、2 Gy の放射線被ばく後の経時的な DNA 損傷レベルの変化について照射後 1 時間から 144 時間

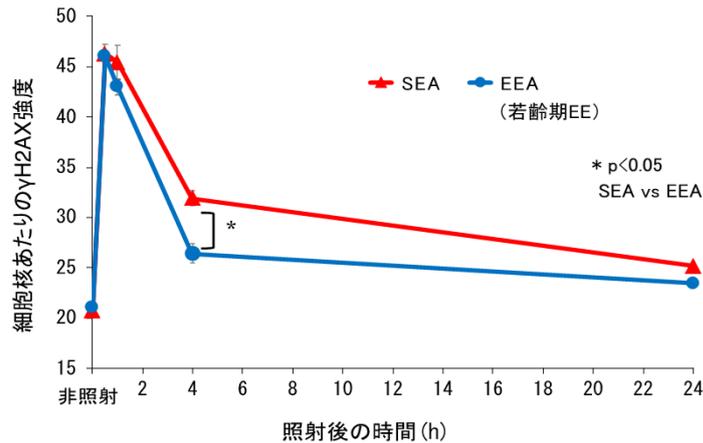


図 23. 細胞核あたりのリン酸化 H2AX 量の経時変化

牛胎児血清を 0.5%として解析した結果。当初計画の実験で有意差が顕著であった若齢期 EE (EEA) とその対照となる若齢期標準環境 (SEA) についてのみ実験を行った。エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す。

まで経時的に肝臓組織切片及び肺組織切片を用いて解析した (図 24)。具体的には、作製した組織切片をリン酸化ヒストン H2AX に対する抗体を用いて免疫染色を行い、一細胞あたりに 4 つ以上のリン酸化 H2AX フォーカスを有する細胞を陽性細胞として計測した。興味深いことに、EE マウス群では SE マウス群と比較して、肝臓組織と肺組織のいずれにおいても照射後 1 時間での DNA 損傷レベルが上昇していた (図 25)。このことは、EE マウス群では放射線誘発性 DNA 損傷に対してより高感度かつ迅速に損傷応答が活性化していることを示唆している。

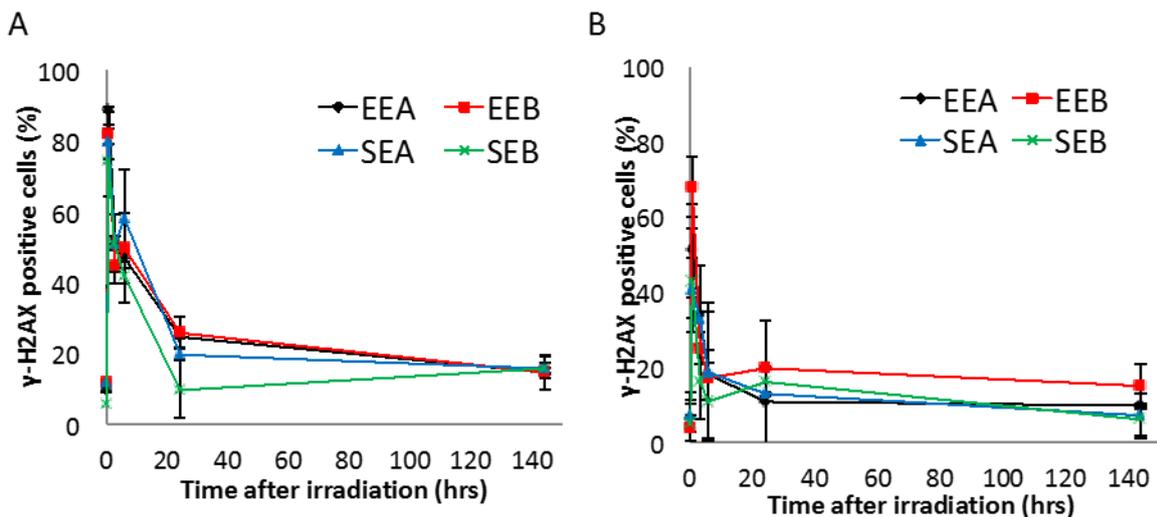


図 24. マウス組織における放射線誘発 DNA 損傷レベル①

放射線照射後 1 時間から 144 時間にかけての肝臓 (A) 及び肺組織 (B) における経時的なリン酸化 H2AX 陽性細胞の変化。エラーバーは標準偏差 (n=3) を示す。

EEA: 若齢期 EE、EEB: 成体期 EE、SEA: 若齢期 SE、SEB: 成体期 SE

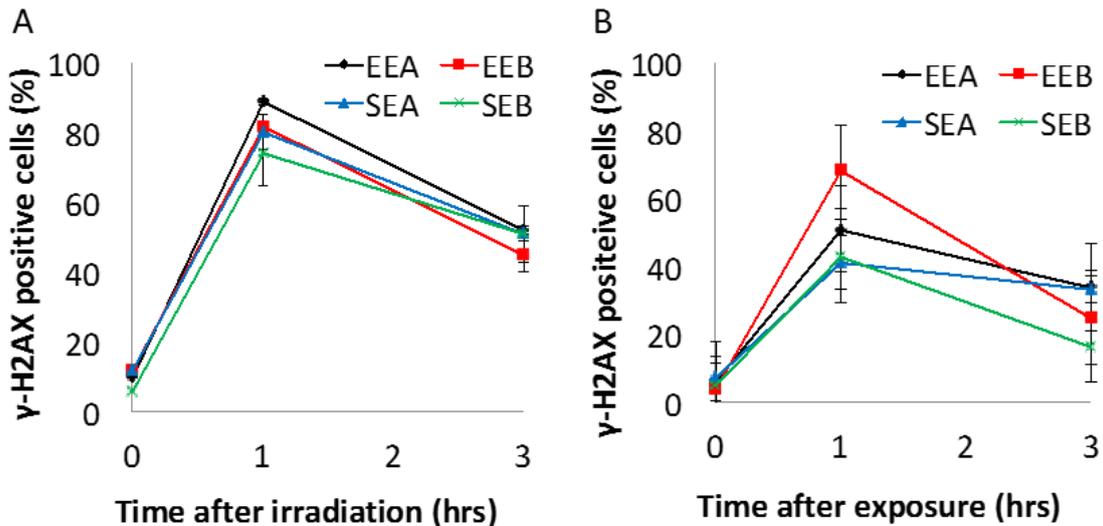


図 25. マウス組織における放射線照射直後の DNA 損傷レベル②
放射線照射直後（1 時間後）のマウス肝臓（A）及び肺組織（B）におけるリン酸化 H2AX 陽性細胞の割合。エラーバーは標準偏差（n=3）を示す。
EEA:若齢期 EE、EEB:成体期 EE、SEA:若齢期 SE、SEB:成体期 SE

次に、放射線被ばく後経時的な放射線損傷応答変化を明確にするために、放射線照射後 1 時間で検出されたリン酸化 H2AX フォーカス数に対する相対的なフォーカス数の経時的な減少（=DNA 損傷の修復）をグラフ化したところ、肝臓、肺組織いずれにおいても、SE マウス群と比較して EE マウス群ではその減少率が顕著であった（図 26）。このことは、EE マウス群の組織では放射線によって誘発された DNA 損傷がより効率的に修復されていることを示唆している。ただし、成体期 EE マウス群の肺組織では SE マウス群との違いは検出されなかったことから、DNA 損傷修復効率への影響には年齢依存性が存在する可能性がある。

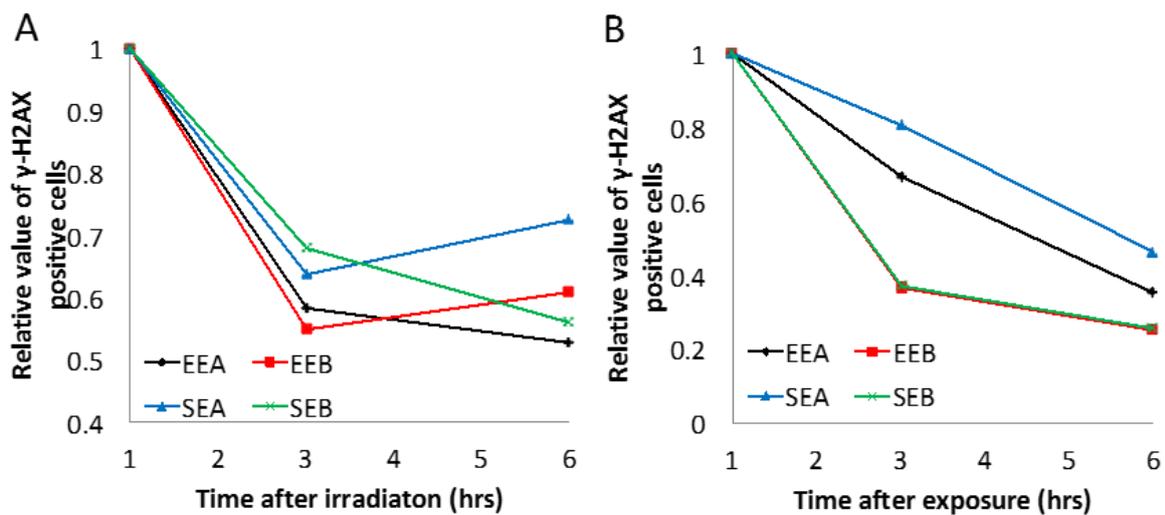


図 26. マウス組織における放射線誘発 DNA 損傷の減少率変化
肝臓（A）及び肺組織（B）での放射線照射後のリン酸化 H2AX レベルの変化を相対的に示す。
EEA:若齢期 EE、EEB:成体期 EE、SEA:若齢期 SE、SEB:成体期 SE

放射線発がん過程において、組織の炎症反応に代表される組織微小環境の変化は重要な役割を有している。そこで、飼育環境による非照射時における組織炎症反応及び放射線照射後の組織炎症反応についてマクロファージマーカーである F4/80 タンパク質に対する免疫蛍光染色によって検討した。具体的には、F4/80 の陽性細胞の割合を目視あるいは画像解析ソフトを用いて定量し、EE マウス群及び SE マウス群の放射線照射後の炎症反応の変化について、肝臓組織及び肺組織における F4/80 陽性反応を照射後 1 時間から 144 時間にかけて解析した。その結果、EE マウス群の肝臓と肺組織では放射線照射後それぞれ 6 時間と 24 時間にかけて、急速な F4/80 陽性細胞の上昇が認められた後に、144 時間後には照射前レベルまで減少している傾向が認められた (図 27)。一方 SE マウス群では、照射後 24 時間にかけて上昇したマクロファージの活性化は 144 時間後にも継続して認められた (図 27)。このことは、放射線照射によって炎症反応の活性化、そして炎症反応の慢性化が SE マウス群では誘発されている一方で、EE マウス群では放射線照射誘発性炎症性反応の迅速な活性化及び沈静化によって慢性炎症反応の惹起を抑制しているのではないかと考えられた。非照射時における EE 飼育環境は肝臓におけるマクロファージの活性化を誘発していることから、放射線照射というストレス刺激に対する炎症反応と、非ストレス下での炎症反応には異なる役割があり、EE マウス群では抗がん機構としての炎症反応を活性化している可能性が示唆された。

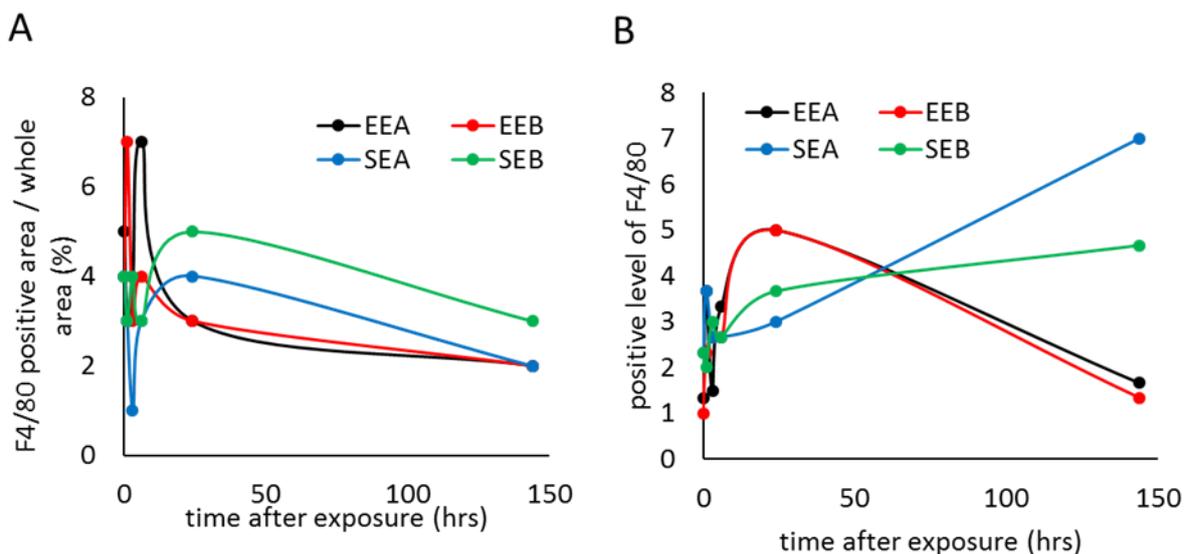


図 27. マウス組織における放射線誘発炎症反応の変化
肝臓 (A) 及び肺組織 (B) での放射線照射後の F4/80 陽性度の変化を示す。
EEA: 若齢期 EE、EEB: 成体期 EE、SEA: 若齢期 SE、SEB: 成体期 SE

4) 全体の結語 (H27~H29)

本項目の研究により、EE マウスの組織及び血清中には放射線照射で生じた DNA 損傷の修復を早める成分が存在しており、特に若齢期を EE で飼育したマウスでその効果が大きくなることがわかった。組織解析の結果も、EE 飼育によって DNA 損傷修復応答及び炎症反応応答に変化が生じていることを示しており、飼育環境によって生体の組織応答が強く影響を受けることを証明する貴重なデータである。また、組織解析の結果は EE 飼育特異的な組織応

答が発がん抑制に関与していることを示唆するものでもある。

今後は、特に若齢期 EE 飼育で特異的な血清成分の特定と EE マウスの組織応答を誘発するメカニズムについて分子レベルでの解析が必要になると考えられる。血清成分による細胞への効果については、今後も継続して取り組み、実際に影響を与えている成分を突きとめることを目指したいと考えているが、成分を突きとめるには細胞を無血清培養に完全馴化することが最も有効である。現在のところ m5S 細胞を完全無血清培養へ馴化するには至っていないので、今後も m5S 細胞の無血清培養への馴化を継続しつつ、血清成分を分画して効果を示している成分の実態が何であるのかについて絞り込む実験を継続する予定である。また、組織解析についても、より詳細な解析に組み込み、EE 飼育による組織応答が発がん抑制をもたらすメカニズムの一端を解明したいと考えている。

参考文献

- 1) Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, and Martin OA: Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. Cancer Letters 327: 123–133, 2012.

3.2 放射線発がんの新たな分子機構とエンリッチメント環境による修飾（再委託先：東京大学）（H27～H29）

3.2.1 目的（H27～H29）

本研究では、これまで放射線発がん研究において扱われることがなかった long non-coding RNA (lncRNA) をターゲットとし、放射線被ばくや発がんの新規分子メカニズムの探索、またエンリッチメント環境（以下、EE）によりどのように変化するかを調べることを目的とする。ncRNA は DNA 上から多量に転写されてくるが、タンパク質に翻訳されることがなく RNA の状態で生理機能を発揮する生体内分子であるが、その中でも長塩基長の ncRNA であり、機能未知なものがほとんどである lncRNA に注目する。放射線生物学分野ではまさに lncRNA を切り口にした研究は皆無であり、そういう点で大変新規性が高い結果を得られるものと期待できる。

3.2.2 lncRNA を特異的に検出するためのプライマー品質確認の結果（H27）

lncRNA 発現解析用プライマーとして、機能が報告されている既知の lncRNA である TUG1、MALAT1、APRT、MEG3 に加え、放射線応答や発がんに関わる 50 種類以上の lncRNA に関してもプライマーを作製した（表 1）。また、作製したプライマーを用いて、定性・定量性両方に富み汎用性が高く定量性のある PCR で使用可能であることを確認した。

3.2.3 組織からの lncRNA 抽出および発現解析（H28）

1) 方法

量研機構より提供された EE 及び放射線照射したマウスの各種組織より核酸、タンパク質を抽出した。そのうち抽出した核酸の 1 つである total RNA を用いて定量 PCR と in situ 染色の条件確立を行った。

表 1. マウス lncRNA Q-PCR プライマーリスト

LncRNA/Gene	Forward	Reverse
mGAPDH1	TGCCCCCATGTTTGTGATG	TGTGGTCATGAGCCCTTCC
mβ-Actin1	AGGTCATCACTATTGGCAACG	TACTCCTGCTTGGTATCCAC
mMrhl RNA	TGAGGACCATGGCTGGACTCT	AGATGCAGTTTCCAATGTCCAAAT
mXLOC_033862	TGCAGCTAAGAATGACCCAG	CTTCAAGTTCATCCCAACACAG
mβ-Actin2	GCACCACACCTTCTACAATGAG	ACAGCCTGGATGGCTACGT
hβ-Actin1	ACACTGTGCCCATCTACGAGG	AGGGGCCGGACTCGTCACTACT
mAK015487	CGGCTCAGCACCAGAACGA	CACTCCACAGCACCTCCACTT
mAK021106	ACAGTCTGGAAGAAATGATGA	AAGAACAACCCGACCGTAT
mAK016494	ACTTGGGACAAAATGGAGTGAC	TCTGGAAGGCAGGTGTAGGA
mAK044545	GCTGTGCGGAGCATCTAGG	TGCCAGGACAGGGAATCTACTT
mβ-Actin3	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA
hGAPDH1	CCAGGCGCCCAATACG	CCACATCGCTCAGACACCAT
mGAPDH2	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA
mAK048114	GAACCCGGGTCTAACCTAGC	AGCTGCTCTTGGGAAAACA
mAK050743	CTCTGAGCAAACGTCCTTCC	AGGATGCTGCGATTACGTTT
mAK051369	ACCAGAATTGGTCTGCATC	ACCTGAAAGCTTGGAGGACA
mAK083183	CCAGAGTGGCCTTAGACTGC	CCCAGAAAGTGCCCTCCTTTGT
mENSMUST00000019980	CCCTGTTGAAGCTTGCTAGG	TTACTCGGCTCTCTGGGAAA
mENSMUST00000046048	CGATCCAAATGATTCCAAGC	CATCCTCCCAGTCTTTCCAA
mENSMUST00000117483	TTCTCAAGCACAGCAAATGG	TCGATGATGTCAGCTTTCCA
mENSMUST00000119471	TGGACTACGACATGGTGCAT	TGTGCTTTGTAAGGCCACAG
mENSMUST00000120403	ACAATCTGCCACACACGGTA	TTCAGGATGCCCTATTTCAG
mENSMUST00000148357	CCATCGGAAAGATTTGGTG	GGAGGTCGGAGATATGCTGA
mENSMUST00000160255	GGCTGAGTGGTCTTGGC	TGGGCACTCTCCATTGT
mChast	CCACTGACCCCTCATCCTTGT	CCCAGAAAGTGCCCTCCTTTGT
muc009biz.1	TGGTTTGGTTTGGTTTTGA	TCCACTGGCAGAAAACAATG
mNeat1	TGGCCCTTTTGTTCATTAGC	TGGAAGGCCATTGTTTCAGG
mXist	TCATCCGCTTGCGTTCATAG	GAGATCAGTCTGGCTAAATCAGA
mSpeer7-ps1	CATGCTCTCATGCTCACCGA	TACGCTGTAGGACCAGAACAC
m-uc007pbc.1	CATCTAGACCCGTAAACGCC	TGGTAGGCAAGCATCCACAG
mENSMUST00000171761	TCGGAGACTTCTCTCCGGT	AAGACAATGCAGATGGGGCA
mENSMUST00000097503	AGGTCATCCACTTTGGTACAC	GAGTTTGGTTTGGGGGTCT
mGAPDH3	TGTTCCCTACCCCAATGTG	GTGTAGCCCAAGATGCCTC
mMEG3	AAACCATGCTGAGCCTACCC	AGGGAGAAGATTGCAAGCCC
mGAPDH4	GGGAAATGAGAGAGGCCAG	TACGGCCAAATCCGTTCCACA
hGAPDH2	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
mGAPDH5	GGTGAAGGTGGTGTGAACG	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG
UC007mmq.1	CGACTGGAGGAGAAGAGGTG	ATTGAGACGGGCATTCAAAG
AK052811	ATTGGAATGGCAGGACTTTG	GCCCAGAGCTTAGGAGGACT
UC008dzt.1	CCAGAGCGGAGAGGTATCTG	GGGAATCCTCGACTTCCTTC
ENSMUST00000159621	CACAGACCCCAAGATCCAGT	ACCAACAAGAAGGCATCCAG
2700086A05Rik	GCAAGAAGCCCTGTTGTCTC	CGTCGTCTCTCTTCCCACTC
UC.77	CTGTCCACTGCTCCAAGA	TCAGCCAAAGATGCTTGAAA
UC009ktt.1	GGTCCATCTGCAGTGGTTT	CCCCTACCCTTCAGATCCAT
ENSMUST00000121776	TGGCATCCTCCTCATCTTTC	GCCTATGCAGAGGATTTGG
UC.455-	ACCTAGGGGACCACGGTACA	CGTGATGAATAAATGCCATC
BC027568	TCCGGTACATCCCTCTTCTG	TACCCTCGCAATGAGTTTCC
ENSMUST00000065709	ACCCCTATTTGGTGGACTC	AAAGCCAAGCCTGTTTAGCA
UC.456	ACCCCTTTGGCTGACCTTACC	TGAGGTTTTTGGTGGTGGTT
ENSMUST00000119054	TGCATGTGACATCAAGCAAA	CTCCCTGAGGATGATGAAA
ENSMUST00000120952	AGGGTCGTCTTCACTGTGCT	AAGTGGTGCCTGATGAAAG
ZEB2	CCACCAGCCCTTTAGGTGTA	CCCTTGTCTTCTGGCTGAG
HOXA3	GGCCTGCTTCTTCTGCATAC	GGCCTGCTTCTTCTGCATAC
mlncTP73-AS1	CCGGTTTTCCAGTCTTGCAC	GCCTCACAGGGAAACTTCATGC
mlncTP73-AS1	CCGGTTTTCCAGTCTTGCAC	GCCTCACAGGGAAACTTCATGC
mlincRNA-p21	CCTGTCCACTCGCTTTC	GGAAGTGGAGACGGAATGTC
mHOTAIR	CCTTATAAGCTCATCGGAGCA	CATTTCTGGGTGGTTCTTT
mGAPDH6	TATGACAATGAATACGGCT	CTCCTGTTATTATGGGGG
mAPTR	TGGCCTCGAACTCAAATC	GGTCTAGCTTCAGGGAATACTC
hAPTR	TTGCCAAACGGTTCTTTC	CGGAGGAGAGTAAATACAACAG
mGAPDH7	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTT
mMalat1	TGCGGGTGTGTAGGTTTTT	ACAGGAGTGAGGCTTGTGGT
mGomafu	GCCAGGACGCAGAATAAGCA	CTACAACCAGCAACGGAGCA
Gm21781	CCGGTGTATGGCTGCTTCTT	TTGCCTTGGTCATGGTGTCT
Gm11762	AAAGAGGAGTGAGGGGACCA	CACAGCAACAGAAGGGTAACTATG
mAK036791	TGGTGATTCTGTTACCGTCT	AGGAGGTCCAAATACAAGAT

LncRNA/Gene	Forward	Reverse
mAK041753	CTGTCCTTGGTGATGCTGTT	TGCACTGAAGCATTCTCTCTCC
mAK046893	CTCCTCCTCCTGGGAATGTCT	CCCTAAATGTTCTCCTCCGTCTT
mAK053003	CTCAGGAGGTCATTCCGG	GAGAAACCTGGAGTAGTGG
mAK034848	TGATAAGGAGGGCGTCACAA	ACCTTCACCAGCACCCAGA
mAK019917	CCCCTCTAAGCCTGGGAECT	AACAAACCAACAAAAGCCACCT
mAK085108	AAACCAACAACAGGACCTCT	ATTGGGAGTTTGTATGCTTTC
mAK048817	AGGATGTGAGTGGACTGTGG	TTTGGTTGTCAGAGATGGCT
mAK081238	TGTTGTGGGTATATGTGGAT	ACAGTCAAATAAGATGGACC
mAK080587	AGCAGAGGATGTATCAAAGC	ACCAAAGGGACTGACAGAAT
mAK003846	GTGTGCTCCAGAAAGTGTA	GAGAAGAAGAGAGAGGTTGC
mAK142426	TTTTGGGAGGGTGAGGG	GAACGGTGAAGGCAGACA
mGAPDH8	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGAGGAG
mTUG1	GGCACCCAGTGTAAGCA	AAGCAGCAGATAACAGAGTTGA
mAI506816: AK161191	GCCATACATACAGACCTTG	AGGACTACCTCGGATAAC
mAI506816: NR015554	GATTAGACAAGTGGTGGGC	TACTGGCAGGGTATGAG
mAI506816: NR038090	TGTGGTTGCTGGGATTTG	GAGACGGCTCAGTGGTAAAG
mAK003497	CCTTGGAGTTCGGTTTGTGT	TCAGTGTAGCCAGGCTGTG
mGm12407	CAAGAACAAGGCAACAGCA	AGCCACAGAGAGACGGTGT
mAK156710	GACTGAGGGCATTTCATTGCT	TGCCCTAAAGGGTGTCTAATG
mUC. 417	CTCCGACCTAGGTGTGGTGT	GGAGCAGCCATGAAGAAATG
mA530053G22Rik	GAGCCTTGATCTCAGGAGGA	AGCATGATGTGCATTGGGTA
mAK0158867	CGGGTACCATCGAGAACAAG	CAGCCTCCACGAAGTCTCC
mGm128567	TGGACTACGACATGGTGCAT	TGTGCTTTGTAAGGCCACAG
mGm2862	CCTCCACCTTTGTCACCAAT	CCACTGCTTCCTGCTTCTTC
mCU041236. 1	ATGCTCCGAGAGATGGAAGA	TTGATCTTTGGCGATTTTC
mGm8773	GGCTCTGCTGTAAGGAGGTG	AAATTCCAGAACGCATCCAC
mLncRNA Tmem189	TTCTCCCTCAGCCCTGTAGA	AGACCTCAGAAGTGGCTGGA
mLncRNA Cebp	AGAAGCTGGTGGAGTTGTCG	CGCAGGTCCCAAAGAAACTA
mBC094356	GGTCTGACTGTCCCACTGAA	CCCCACCATACACTGTCACT
m0610040B09Rik	TCCAAGACCTCACCATCTC	GGAAAGTCTGGTCTCTGTGG
mGm15051	GGAGTCGAGACTGCCTTCTG	CCCATTTTCAGTGTGGTTGA

2) 結果と考察

エンリッチメント環境に応答する lncRNA を 1 つ、放射線にのみ応答するもの 3 つ、更にエンリッチメント環境と放射線両方に応答するもの 1 つを発見した。ただし、この条件で 3 回の独立した実験を行ったが、lncRNA 発現の検出の再現性は得られなかった。その為、再現性を含めて、更なる検討が必要と考えられる。

3. 2. 4 lncRNA の組織内動態機構の解析 (H29)

1) 方法

EEとSEで飼育したマウスに放射線を照射した際に発現変化に違いが見られる lncRNA の細胞内挙動を同定した。まず、マウス組織から全 RNA を抽出後、逆転写反応により、cDNA に変換し、定量 PCR 法によって発現解析を行った。続いて、lncRNA に特異的なプローブを *in vitro* 転写法により合成し、それを用いて蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、lncRNA の細胞内局在機構を解明した。一連の実験により EE 環境や放射線に応答する lncRNA の細胞内動態と突然変異との関連性を検討した。

2) 結果と考察

表 1 に示すプライマーを用いて検討した結果、EE と放射線に特異的に応答し発現変動する lncRNA を見出した。加えて、放射線に反応する lncRNA のうち、EE により発現が修飾さ

れる lncRNA 群を同定することに成功した。lincRNA-p21 は、SE では放射線照射により発現が増加したが EE により抑制された (図 28a)。一方、Gomafu と XIST は SE では放射線照射によって発現が低下したが EE では発現に変化は認められなかった (図 28b, 28c)。これらの結果は、EE が放射線に応答する lncRNA を修飾する可能性を示唆している。lncRNA Cebpd は、EE 単独及び EE と放射線照射の複合により発現増加を示し、特に複合により増加することが分かった。しかし、放射線単独では変化がみられなかった (図 28d)。EE と放射線の複合により強く応答する lncRNA の存在を見出した。更に、EE と放射線照射に対して有意な発現変化を示さない lncRNA も存在することより、本研究で同定された lncRNA 群は EE や放射線被ばくに密接に関わっている可能性が高いと推測される。これまでに、EE に関わる lncRNA についての報告はなく、本研究成果は世界発の知見である。また、細胞内局在を蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行い、発現変化が見られた lncRNA の細胞内局在機構や突然変異との関連性の解明を試みたが有為な結果は得られなかった。

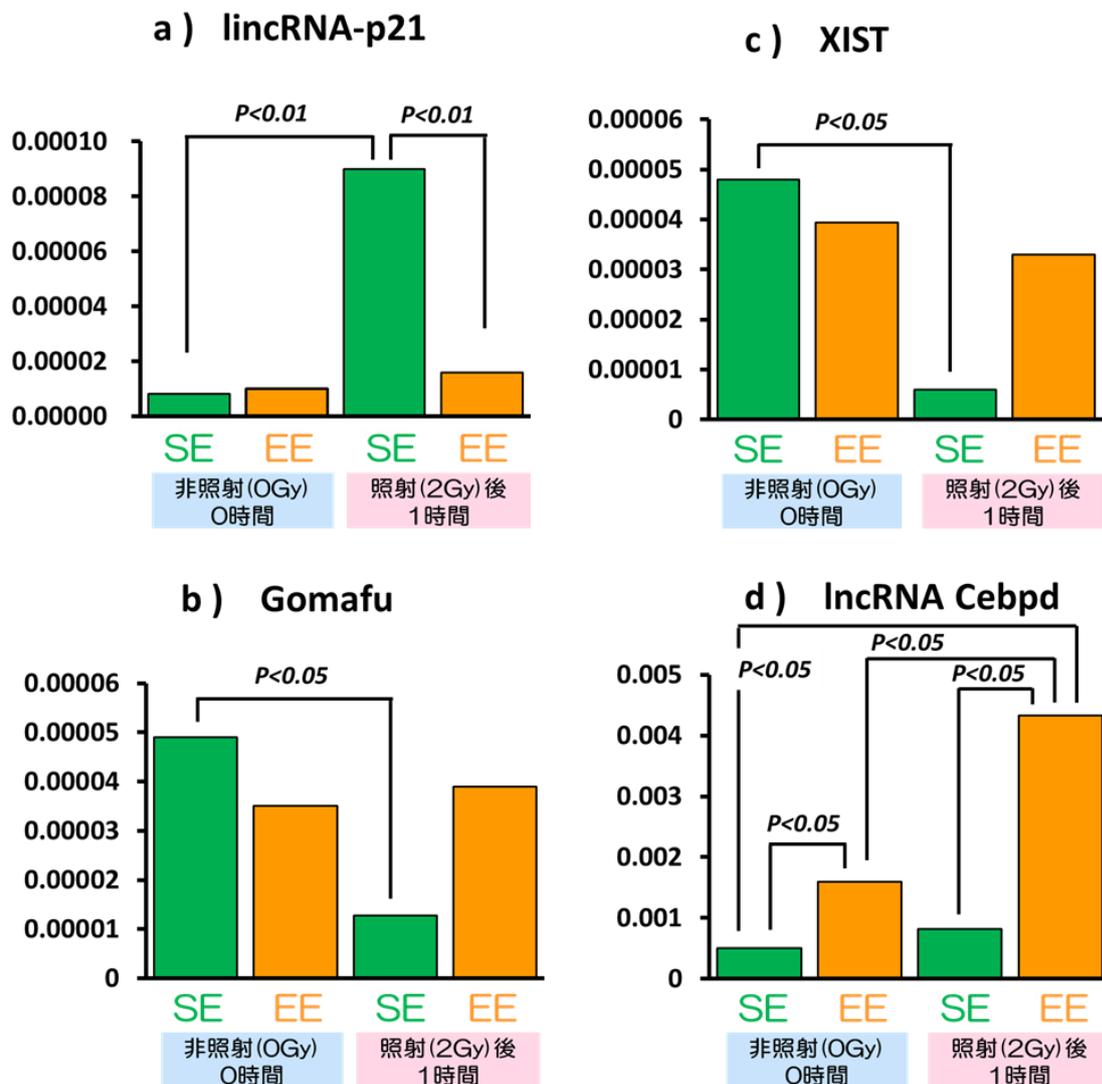


図 28. EE 及び放射線に応答し変動する lncRNA

3.3 エンリッチメント環境（適温）に関する研究（再委託先：産業医科大学）（H27～H29）

3.3.1 目的（H27～H29）

通常動物実験に用いるマウスは標準化された室温 20-26℃で飼育（通常環境：Standard Temperature:ST）されるが、この温度はマウスにとって慢性のコールドストレスを与えていると最近の幾つかの研究で示されている。室温 30-31℃で飼育（適温環境：Thermoneutral Temperature:TT）したマウスでは、移植腫瘍増腫瘍性や転移の抑制がみられ、細胞障害性 T cell (CD8⁺)の増加や免疫抑制性細胞の減少の関与が示唆されている¹⁾。また同様の実験条件では別の経路での免疫能活性化の報告もある^{2, 3)}。本試験では室温 30-31℃で飼育したマウスは環境エンリッチメント (EE) (適温)にあるととらえ、適温環境の生体への好ましい影響について、特に幼若期と成体期でそれぞれ TT 環境と ST 環境において飼育した場合、EE 効果の好ましい影響がみられるのか、さらにその効果に幼若期と成体期で差が生じるのか否かを調べる。

3.3.2 試験方法と材料（H27～H29）

実験群は第1実験群(A, B, C, D, E, F群)と、これと同一実験条件の第2実験群(a, b, c, d, e, f群)を設定し、実験処置の概要を図29aに示した。3週齢マウス(A, B, C群, a, b, c群)と11週齢マウス(D, E, F群, d, e, f群)を準備し、TTで8週間飼育後、STに戻して飼育する群(A, D群, a, d群:各50匹)とそのままTTで継続飼育する群(B, E群, b, e群:各50匹)を設定した。さらにSTのみで飼育する対照群(C, F, 群, c, f群:各50匹)を設定した。実験開始2ヶ月後から経時的に0, 1, 3, 6, 12ヶ月目で各実験群中5匹から血液ならびに組織検体(胸腺・脾臓)を採取後、病理組織検査及び単個細胞に調整した脾細胞に免疫染色を行いセルアナライザーで免疫系細胞動態の解析を行った。同時に同実験群中5匹に腹水がん細胞移植を行い、移植群として飼育を継続しがん細胞の増殖率を計測した。

さらに第3実験群として、3週齢マウスを用いて3週齢開始のみのX, Y, Z群を設定し、TTで8週間飼育後、STに戻して飼育するX群(30匹)とそのままTTで継続飼育するY群(30匹)、STのみで飼育する対照群のZ群(30匹)を設定した(図29b)。実験開始2ヶ月後から0, 1, 3ヶ月目で各実験群中5匹から血液ならびに組織検体(胸腺・脾臓)を採取後、病理組織検査及び単個細胞に調整した脾細胞に免疫染色を行いセルアナライザーで免疫系細胞の解析をおこなった。同時に同実験群中5匹に卵巣がん細胞移植を行い、移植群として飼育を継続しがん細胞の増殖率を計測した。また採取した血液から血漿を分離し、抗酸化能の解析をおこなった。

- (1) 実験動物：B6C3F1マウス(オリエンタルバイオサービスKK、京都)、雌3週齢(390匹)、雌11週齢(300匹)
- (2) 腫瘍増殖能解析：腹水がん(RBRC-RCB0142 Ehrlich、理化学研究所Cell Bank、筑波)、卵巣がん(RBRC-RCB1483 OV2944-HM-1、理化学研究所Cell Bank、筑波)
- (3) 免疫能解析：セルアナライザーEC800(ソニー、東京)、FCM用抗マウス抗体：CD3-PE、CD8-FITC、CD69-APC、NKp46-FITC(Miltenyi Biotec., Germany)、免疫染色用抗マウス抗体：CD3(Abcam, SP7, 日本)、CD8(D4W2Z, Cell Signaling, USA)。
- (4) 抗酸化能解析：スポットケムTMi-Pack Oxystress Test(アークレイKK、京都)

3.3.3 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の方法 (H27~H28)

第 1 実験群の A 群は、TT で飼育を開始し、A1 群：5 匹(TT 飼育開始 8 週間+0 日目)、A2 群：5 匹(TT 飼育開始 8 週間+ST 飼育 1 ヶ月目)、A3 群：5 匹(TT 飼育開始 8 週間+ST 飼育 3 ヶ月目)、A4 群：5 匹(TT 飼育開始 8 週間+ST 飼育 6 ヶ月目)、A5 群：5 匹(TT 飼育開始 8 週間+ST 飼育 12 ヶ月目)を経時的に剖検し、血液・脾臓、胸腺組織を採取後、免疫能と病理学的解

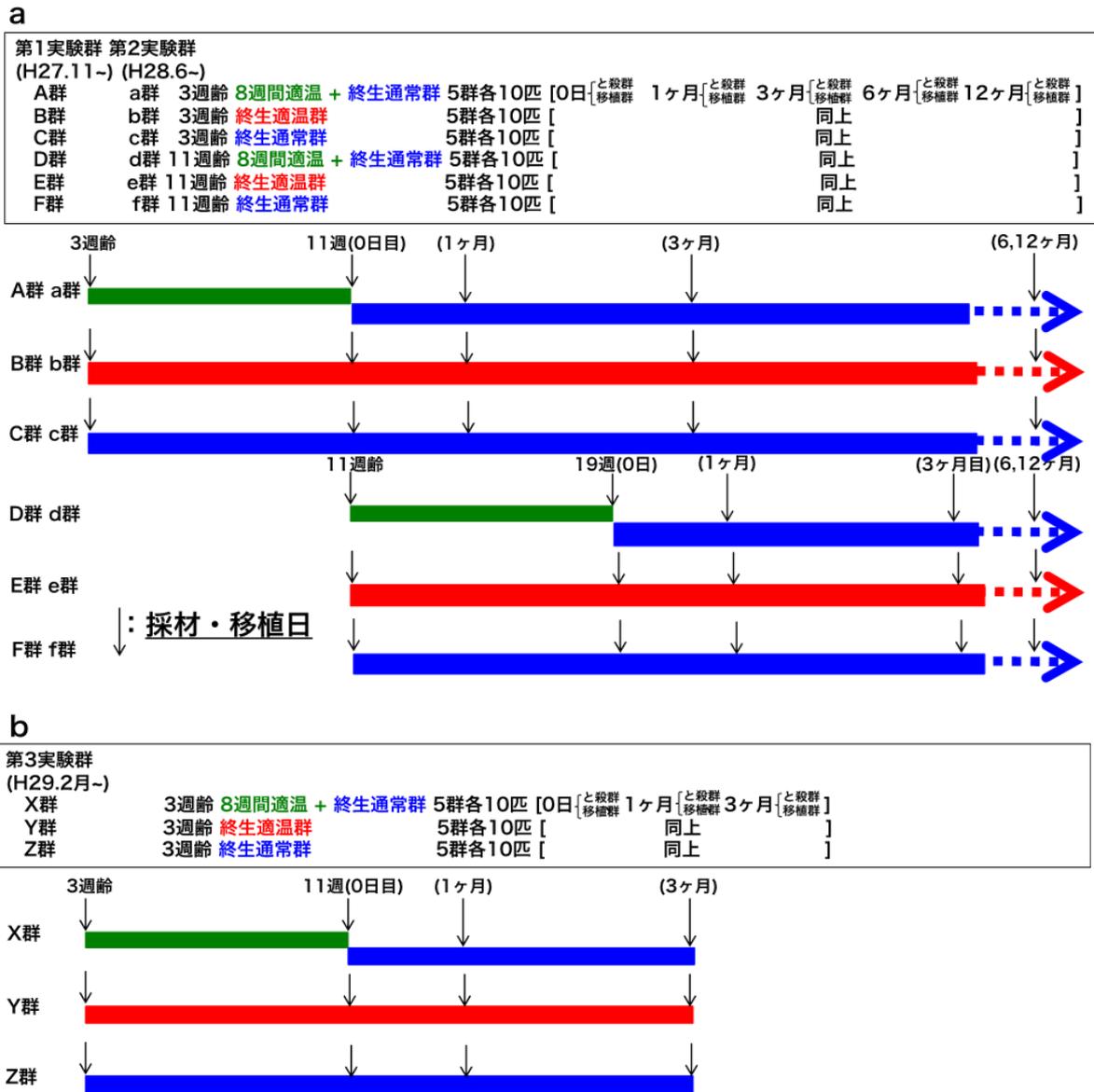


図 29. 実験群の構成と処置の概要

析をおこなった。また 5 群ともがん細胞 (Ehrlich) 腹腔移植を行い、がん細胞の増殖への影響を調べる実験群 (各群 5 匹) の飼育をおこなった。ST 飼育への移行を行なわない B 群は、TT で飼育を開始し、B1 群：5 匹(TT 飼育開始 8 週間目)、B2 群：5 匹(TT 飼育開始 12 週間目)、B3 群：5 匹(TT 飼育開始 20 週間目)、B4 群：5 匹(TT 飼育開始 32 週間目)、B5 群：5 匹(TT 飼育開始 56 週間目)とし A 群と同様の時系列で実験をおこなった。C 群は、ST で飼育を開始し、C1 群：5 匹(ST 飼育開始 8 週間目)、C2 群：5 匹(ST 飼育開始 12 週間目)、C3 群：5 匹(ST 飼育開始 20 週間目)、C4 群：5 匹(ST 飼育開始 32 週間目)、C5 群：5 匹(ST 飼育開始 56 週間目)とし A 群

と同様の時系列で実験をおこなった。11 週齢開始群は D 群、E 群、F 群で、3 週齢群と同様の条件で飼育を開始し、3 週齢群と同様の時系列で実験をおこなった。

第 2 実験群の a 群、b 群、c 群は、3 週齢群と同様の条件で飼育を開始し第 1 実験群と同様の時系列で実験をおこなった。11 週齢開始群は d 群、e 群、f 群で、3 週齢群と同様の条件で飼育を開始し、第 1 実験群と同様の時系列で実験をおこなった。a5、b5、c5、d5、e5、f5 群の解析は H29 年度となる。

3.3.4 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の方法 (H29)

前年度から引き続き第 2 実験群の実験開始後 12 ヶ月目と、本年度開始の第 3 実験群の実験開始後 0、1、3 ヶ月目の観察を行った。

第 2 実験群の 3 週齢開始群である a5 群：5 匹、b5 群：5 匹、c5 群：5 匹と 11 週齢開始群である d5 群：5 匹、e5 群：5 匹、f5 群：5 匹を処理後 12 ヶ月目に剖検し、血液・脾臓、胸腺組織を採取後、免疫能と病理学的解析をおこなった。また 6 群ともがん細胞 (Ehrlich) 腹腔移植を行い、がん細胞の増殖への影響を調べる実験群 (各群 5 匹) の飼育を開始した。

第 3 実験群 (3 週齢開始群のみ) のうち、TT で飼育する群である X1 群、X2 群、X3 群を設定し実験を開始した。実験開始後、X1 群：5 匹 (TT 飼育開始 8 週間+0 日目)、X2 群：5 匹 (TT 飼育開始 8 週間+ST 飼育 1 ヶ月目)、X3 群：5 匹 (TT 飼育開始 8 週間+ST 飼育 3 ヶ月目) を経時的に剖検し、血液・脾臓、胸腺組織を採取後、抗酸化能・免疫能と病理学的解析をおこなった。また 3 群 (X1T, X2T, X3T) ともがん細胞 (OV2944) 移植を行い、がん細胞の増殖への影響を調べる実験群 (各群 5 匹) の飼育をおこなった。

TT で 8 週間飼育直後から ST に飼育移行する群である Y1 群、Y2 群、Y3 群を設定し実験を開始した。実験開始後、Y1 群：5 匹 (TT 飼育開始 8 週間目)、Y2 群：5 匹 (TT 飼育開始 12 週間目)、Y3 群：5 匹 (TT 飼育開始 20 週間目) を経時的に剖検し、血液・脾臓、胸腺組織を採取後、抗酸化能・免疫能と病理学的解析を行った。また 3 群 (Y1T, Y2T, Y3T) ともがん細胞 (OV2944) 移植を行い、がん細胞の増殖への影響を調べる実験群 (各群 5 匹) の飼育を開始した。

ST で飼育する群である Z1 群、Z2 群、Z3 群を設定し実験を開始した。実験開始後、Z1 群：5 匹 (TT 飼育開始 8 週間目)、Z2 群：5 匹 (TT 飼育開始 12 週間目)、Z3 群：5 匹 (TT 飼育開始 20 週間目) を経時的に剖検し、血液・脾臓、胸腺組織を採取後、抗酸化能・免疫能と病理学的解析を行った。また 3 群 (Z1T, Z2T, Z3T) ともがん細胞 (OV2944) 移植を行い、がん細胞の増殖への影響を調べる実験群 (各群 5 匹) の飼育を開始した。

各実験群ともに、1 回/週に体重の測定を行った。血液ならびに組織を採取後、免疫能の解析では脾臓から T 細胞を採取し、フローサイトメーターを用いて免疫能の解析 (CD8⁺CD3⁺、CD69⁺CD3⁺、Nkp46⁺CD3⁻細胞割合を測定) を行った。採取組織は脾臓と胸腺をホルマリン固定で保存した。剖検時に脾臓と胸腺の重さを計測した。がん細胞の増殖能におよぼす飼育温度の影響は、第 2 実験群では培養 Ehrlich 腹水がん 3x10⁶ 個 をマウスの腹腔内に移植後 2 日毎に体重を測定し、各マウスの移植腫瘍が増殖し体重がピークに至るまでの期間 (日数) を平均して増殖能として評価した。第 3 実験群では本年度から移植腫瘍を培養 OV2944 卵巣がんとし、3x10⁶ 個 をマウスの鼠径部皮下に移植後 2 日毎に腫瘍体積を測定 (長径 x 短径²) し、各マウスの移植腫瘍の増殖動態を経時的に測定した。

H29 年度からは血中の抗酸化能をアークレイ社の i-Pack Oxystress Test を用いて、血漿中の酸化ストレス度と抗酸化能の測定を追加した。

3.3.5 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の結果 (H27~H28)

- (1) EEが体重増加におよぼす影響：第1実験群の3週齢開始群(A, B, C群)のB群とA, C群間で16-17週目にB群の体重増加で有意差がみられた(図30a)。11週齢開始群(D, E, F群)のE群とD, E群間で13-14週目にE群の体重増の有意差がみられた(図30c)。第2実験群の3週齢開始群(a, b, c群)のb群とa, c群間で23週目にb群の体重増の有意差がみられた(図30b)。しかし11週齢開始群(d, e, f群)では各群間に有意差はみられず、e群で体重低下の傾向が観察された(図30d)。
- (2) EEが臓器重量増加におよぼす影響：脾臓重量の体重比では第1実験群の3週齢開始群(A, B, C群)と11週齢開始群(D, E, F群)、第2実験群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)の各群間同月齢での変動に有意差はなかった(図31a, 31c)。胸腺重量の体重比では第1実験群の3週齢開始群(A, B, C群)と11週齢開始群(D, E, F群)、第2群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)の各群間同月齢での変動に有意差は認められなかった(図31b, 31d)。
- (3) EEが免疫賦活能におよぼす影響：第1実験群の解析では抗CD3抗体の品質に疑義が生じたため、第2実験群のみの結果となった。第2群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)の各群間同月齢での各陽性細胞割合の変動に有意差を示す結果も認められたが、EEが免疫賦活能増加への有効性を積極的に示す様な相関関係は認められなかった(図32a, 32b, 32c)。
- (4) EEが移植腫瘍の増殖におよぼす影響：第1実験群の3週齢開始群(A, B, C群)間でTTのA1, B1群でC1群に比べ発がん開始までの日数の延長に有意差がみられた。また、A5, B5群ならびに11週齢開始群D5, E5群で増殖期間の延長がみられ、B5とC5群間では有意差がみられた(図33a)が、EEが免疫賦活能増加への有効性を積極的に示す様な相関関係は認められなかった。第2実験群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)ではc4, d1で発がん開始までの日数の延長がみられた。その他の各群間同月齢での移植がん増殖能の変動に有意差は認められなかった(図33b)。
- (5) 組織学的解析：第1実験群と第2実験群の3週齢開始群と11週齢開始群の処理後0, 1, 3, 6ヶ月目の脾臓、胸腺のHE染色ならびにCD3⁺、CD8⁺細胞の免疫染色像を調べたが、各群間同月齢での組織像に差は認められなかった。

3.3.6 飼育環境温度の違いによる EE 効果解析の結果 (H29)

- (1) EEが体重増加におよぼす影響：第2実験群の3週齢開始群(a, b, c群)も11週齢開始群(d, e, f群)も、前年度に有意差が見られて以降12ヶ月終了まで各群間に有意差はみられなかった(図30a, 30b, 30c, 30d)。第3実験群ではZ-XY群間で23週目にZ群の体重増の有意差がみられた(図30e)。

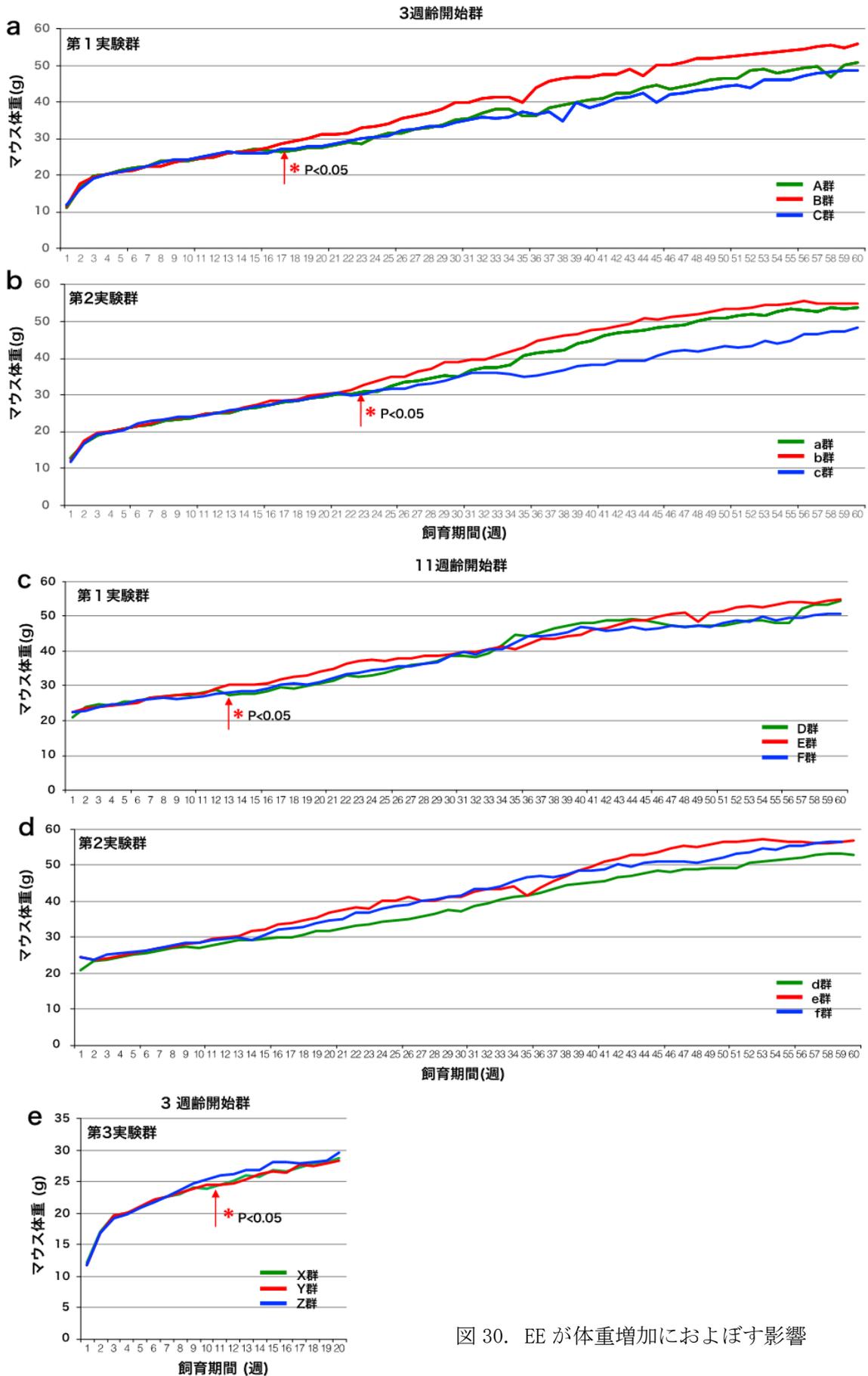


図 30. EE が体重増加におよぼす影響

- (2) EEが臓器重量増加におよぼす影響：脾臓重量の体重比は第2群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)の12ヶ月群間までの変動に有意差は無かったはなかったが、A5、E5、F5、e5、f5(12ヶ月目剖検群)で重量比の増加傾向が認められた(図31a, 31c)。第3実験群では0, 1, 3ヶ月群の非移植群間で重量比の異常な増減はなかった(図31e)。第3実験群の固形腫瘍移植群移植後30日目と非移植群との脾臓重量では0, 1, 3ヶ月群全で移植群の重量増加に有意差が認められた(図31g)。第1実験群と第2実験群では腹水がん移植をおこなったため移植群の脾臓重量の記録はない。胸腺重量の体重比は第1実験群の3週齢開始群(A, B, C群)と11週齢開始群(D, E, F群)、第2実験群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)の12ヶ月齢での変動に有意差は認められなかった。第3実験群では0, 1, 3ヶ月群の非移植群間で重量比の異常な増減はなかった(図31f)。
- (3) EEが免疫賦活能におよぼす影響：第2実験群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)の12ヶ月齢での各陽性細胞割合の変動に有意差を示す結果も認められたが、EEが免疫賦活能増加への有効性を積極的に示す相関関係は認められなかった(図32a, 32b, 32c)。第3実験群では0, 1, 3ヶ月群の腫瘍移植群(X1T, X2T, X3T, Y1T, Y2T, Y3T, Z1T, Z2T, Z3T)30日目のCD69⁺CD3⁺細胞割合にX1群とX1T群、X2群とX2T群、X3群とX3T群、Y1群とY1T群、Y2群とY2T群、Y3群とY3T群、Z1群とZ1T群、Z2群とZ2T群、Z3群とZ3T群間で有意差がみられた。また、X1T群とZ1T群、X3T群とZ3T群、Y3T群とZ3T群間で有意差がみられたが、EEが免疫賦活能増加への有効性を積極的に示す相関関係は認められなかった(図32d, 32e, 32f)。
- (4) EEが移植腫瘍の増殖におよぼす影響：がん細胞の増殖への影響を調べる実験では、第2実験群の3週齢開始群(a, b, c群)と11週齢開始群(d, e, f群)ではc5で発がん開始までの日数の延長がみられた(図33b)。第3実験群では、EEが有意に抗腫瘍増殖性を示す結果は認められなかった(図33c)。
- (5) 組織学的解析：第2実験群の3週齢開始群と11週齢開始群の処理後12ヶ月目の脾臓、胸腺のHE染色ならびにCD3⁺、CD8⁺細胞の免疫染色像を解析したが、各群間同月齢での組織像に差は認められなかった。第3実験群では0, 1, 3ヶ月群の腫瘍移植群(X1T, X2T, X3T, Y1T, Y2T, Y3T, Z1T, Z2T, X3T群)すべてで肉眼的な脾臓の腫脹が観察され(図34a:Z1群、図34b:Z1T群)、組織学的には赤脾髄の高度拡大と巨核球の増加が観察された(図34c:Z1T群)。
- (6) EEが抗酸化能におよぼす影響：酸化ストレス度は、Y3<X3<Z3の順番で、抗酸化能はY3>X3>Z3の順番となる傾向がみられており、EE環境だと、抗酸化能が高く酸化ストレスが低いようにみえる。ただし、各群間での有意差はみられなかった(表2)。

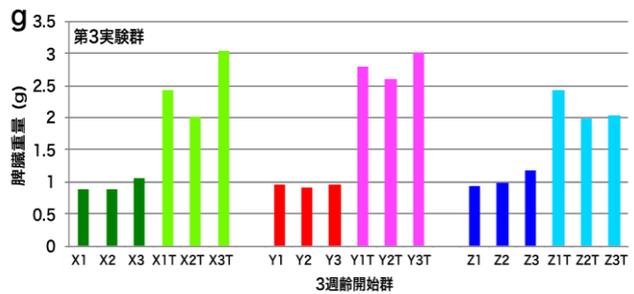
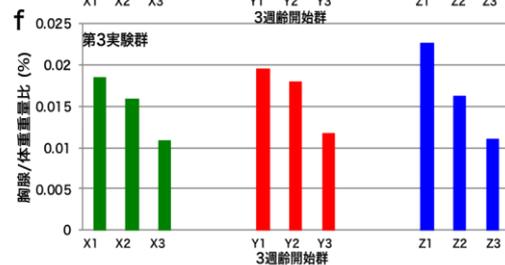
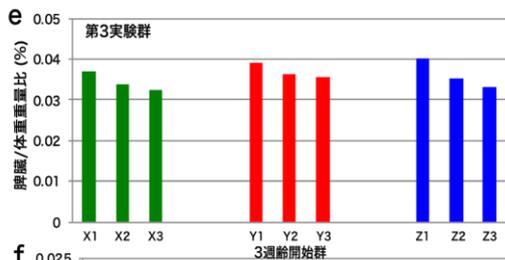
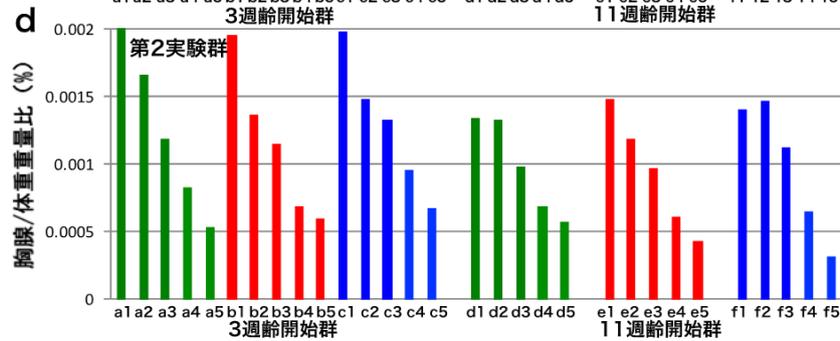
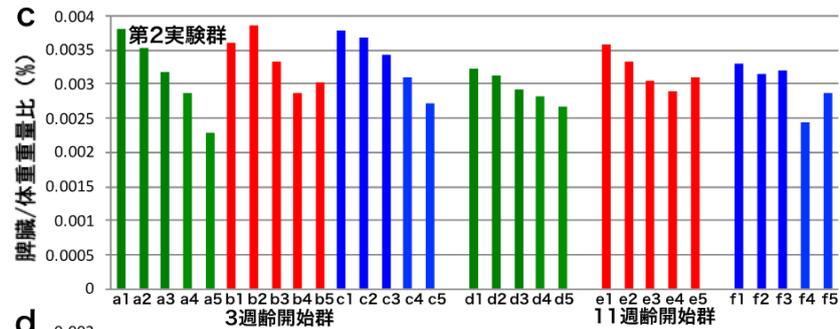
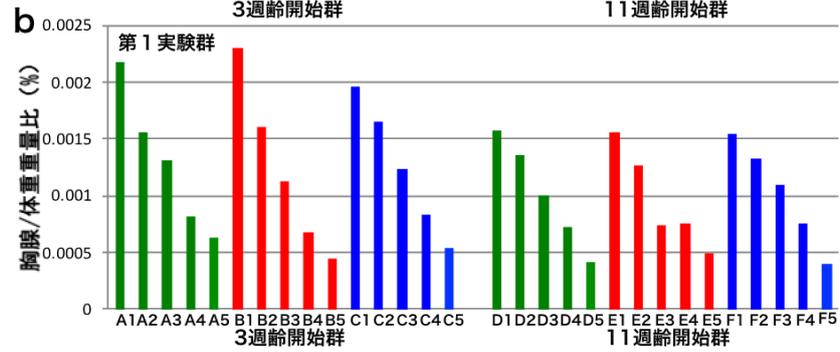
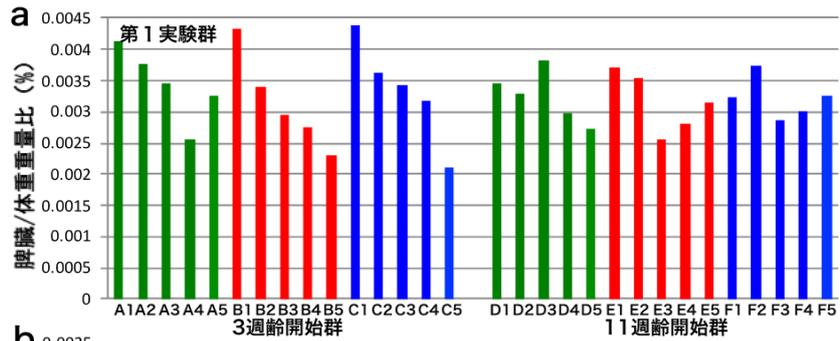


図 31. EE が臓器重量増加におよぼす影響

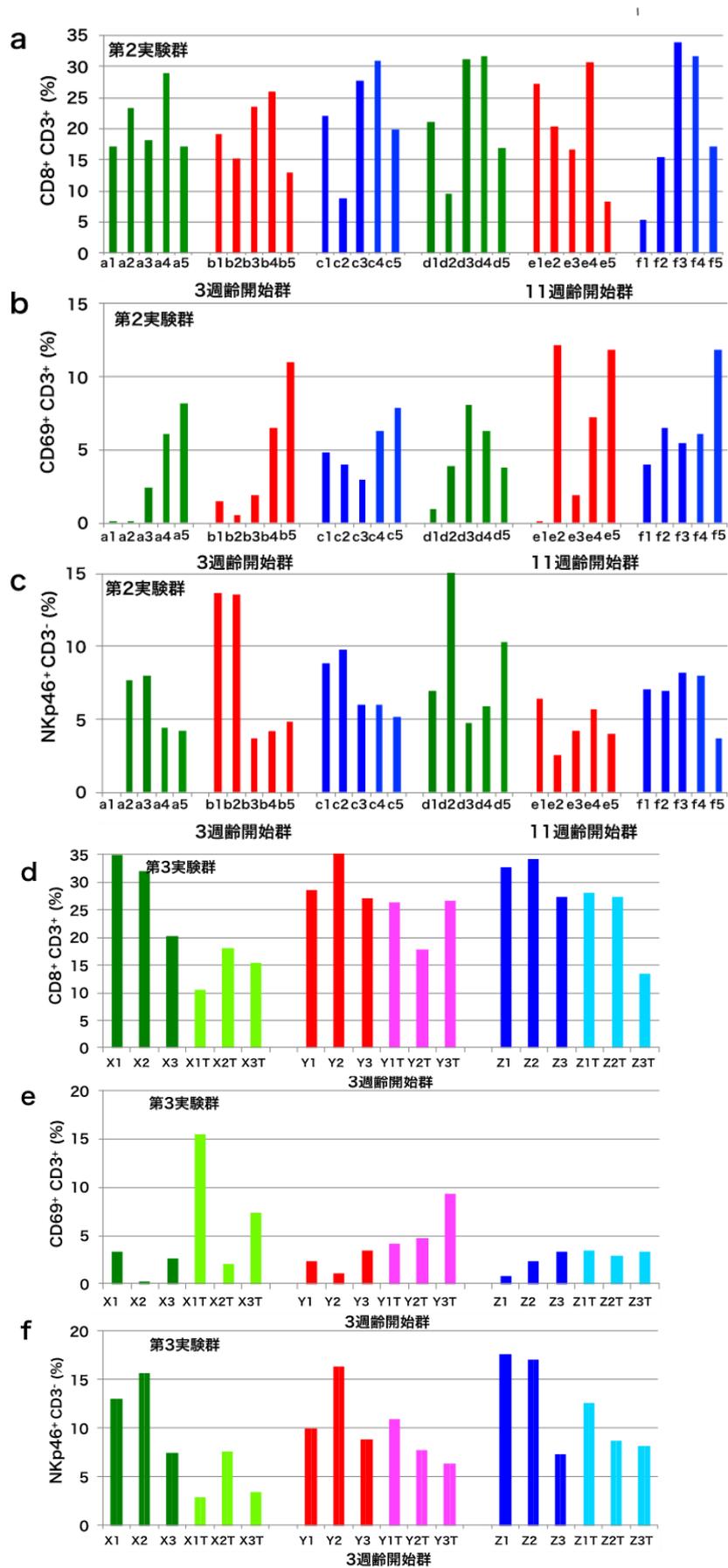


図 32. EE が免疫賦活能におよぼす影響

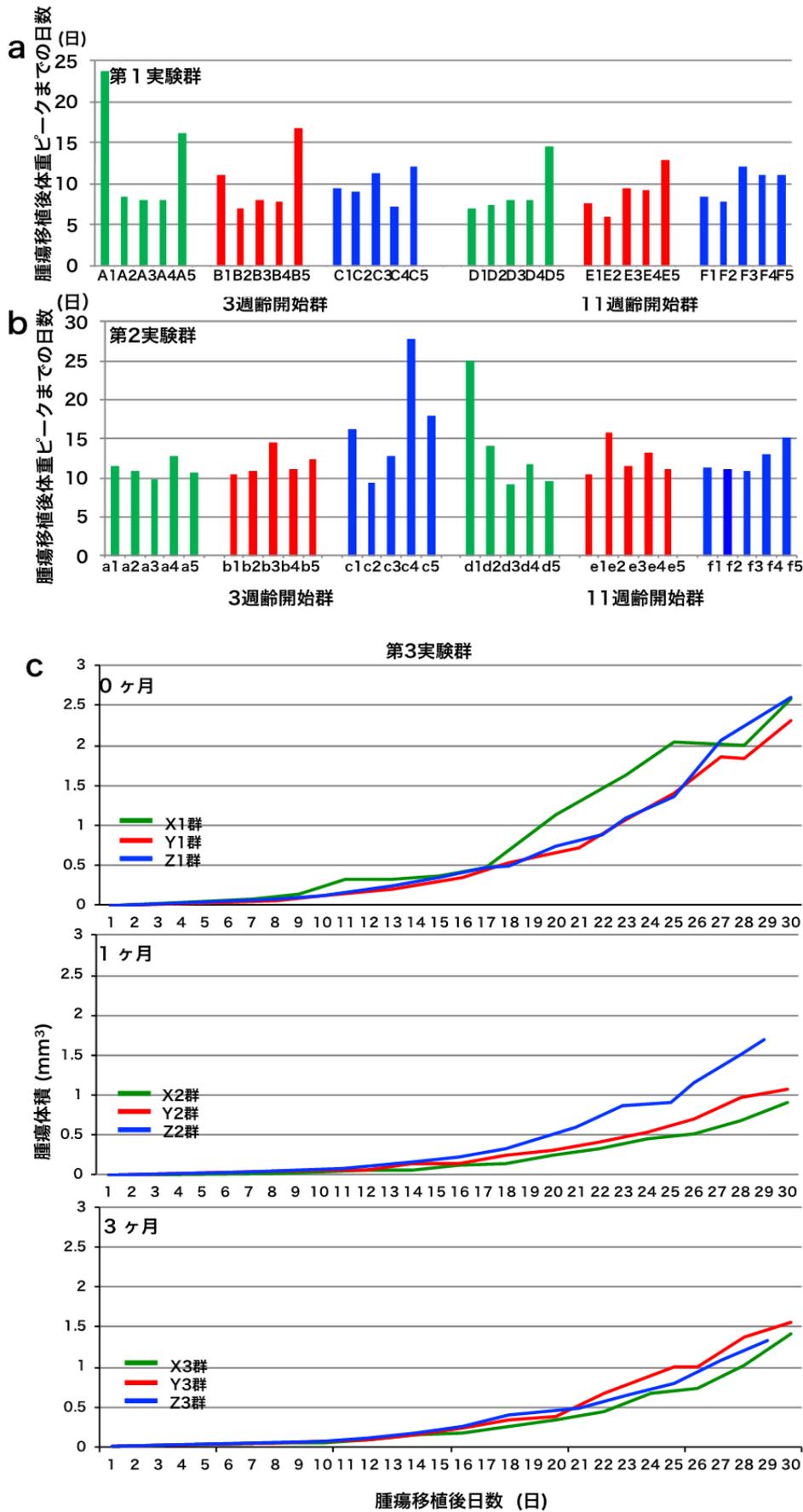


図 33. EE が移植腫瘍の増殖におよぼす影響

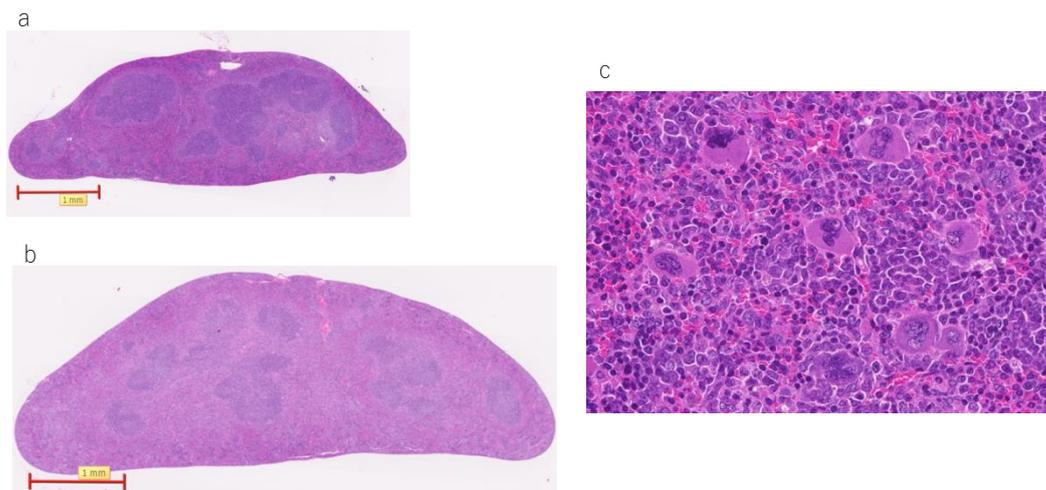


図 34. 脾臓における組織学的解析

表 2. EE が抗酸化能におよぼす影響（活性酸素代謝産物量）

第3実験群

血漿抗酸化力	μmol/L				
実験群	X1	Z1	X3	Y3	Z3
Sample #1	1926.90	2118.00	1789.20	1989.20	1629.80
Sample #2	ND	1672.20	ND	1894.10	ND
Sample #3	1948.30	1982.80	1862.30	1983.80	1634.90
Sample #4	2067.00	1794.00	1922.00	1802.90	1831.40
average	1980.73	1891.75	1857.83	1917.50	1698.70
SD	75.47	197.68	66.51	87.97	114.95
血漿酸化ストレス度	mg/dL				
実験群	X1	Z1	X3	Y3	Z3
Sample #1	7.06	6.63	5.94	5.77	6.14
Sample #2	ND	5.16	6.37	5.68	6.64
Sample #3	6.77	6.06	4.94	ND	ND
Sample #4	6.54	5.43	7.11	5.76	6.34
average	6.79	5.82	6.09	5.74	6.37
SD	0.26	0.66	0.91	0.05	0.25

3.3.7 試験結果の考察 (H27~H29)

実験群により相対する結果となり体重の増減に EE 環境が効いているかどうかの判断はできなかった。臓器重量の変化については、本試験では免疫系の臓器である胸腺と脾臓に着目したが、第 1 実験群、第 2 実験群、第 3 実験群とも重量比にわずかに異なる動態を示す群もあったが、ほぼ生理的な通常の経時的動態を示し EE 効果は認められなかった。第 3 実験群で固形腫瘍を移植した全群で脾臓重量が 2~3 倍の反応性と思われる増加を示したが、ここでも EE 環境による差はみられなかった。がん細胞移植によるがん増殖抑制効果をみる実験では、腹水がんを移植した第 1 実験群の 3 週齢開始群の A1、B1、B5 群で C 群よりがん増殖時間の有意な遅延がみられたが、同様に腹水がんを移植した第 2 実験群ではみられておらず EE 環境ががん増殖抑制にたいする効果はみられなかった。第 3 実験群では移植がんを OV2944(固形がん)に変えて実験を行ったが、全ての実験群で EE 環境ががん増殖抑制にたいする効果はみられなかった。免疫細胞賦活能をみる実験では第 2 実験群の 3 週齢開始群と 11 週齢開始群で CD8⁺CD3⁺、CD69⁺CD3⁺、NKp46⁺CD3⁻細胞割合の変化に EE 環境の効果はみられなかった。第 3 実験群のがん移植群と非移植群間の CD69⁺CD3⁺細胞割合の増加で有意差がみられる群も存在したが、特に EE 環境に関連した傾向はなかった。ただし、移植群すべての脾臓に重量増加と組織学的には赤脾髄の領域拡大ならびに巨細胞数の増加がみられており、移植がん細胞にたいする反応性の変化はみられたが、EE 環境の有無による違いは明らかでなかった。文献的には EE 環境ではこれらの免疫関連細胞割合増加による免疫能賦活効果が支持され、このことが腫瘍増殖抑制にも働いているとするデータが示されていたが¹⁾、本試験では確認できず使用したマウス種の免疫系の反応の違いが反映されている可能性が示唆された。抗酸化能については第 3 実験群でのみ解析をおこない、血漿の抗酸化力ならびに酸化ストレス度について EE 環境が効いている可能性が示され、さらに効果の持続には EE 環境内にとどまり続ける必要性が示唆された。本試験で調べた項目すべてで EE 環境、本試験では適温環境の生体への好ましい影響については幼若期からでも成体からでも明瞭な効果はみられなかった。ただし、文献的には TT 環境については 31℃と本試験と同じであるが、ST 環境の温度が 22℃と本試験の設定よりも 4℃ほど低く、このことが明瞭な違いを EE 環境で得られなかった原因になった可能性もある。

参考文献

- 1) Kokolus KM et al. Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature. PNAS. 2013;110 (50):20176-81.
- 2) Messmer MN et al. Mild cold-stress depresses immune responses: Implications for cancer models involving laboratory mice. Bioessays. 2014;36(9):884-91.
- 3) Eng JW et al. Housing temperature-induced stress drives therapeutic resistance in murine tumour models through β 2-adrenergic receptor activation. Nat Commun. 2015;6:#6426.

3.4 研究推進(H27～H29)

平成 27 年度から平成 29 年度の 3 年間、研究代表者の下、各委託先研究機関と研究の進捗状況報告会を開催するなど、連携を密にして研究を進めた。

4. 結語 (H27～H29)

本研究は、エンリッチメント環境 (Enriched Environment: EE と略) が、内分泌や免疫機能に対してよい効果があるのか、放射線による DNA 損傷に対して修復能を増加させ、放射線による発がんを予防するのか、これらの可能性を検証することを目的としている。また、近年、エピジェネティクスで注目されつつある遺伝子発現制御系である lncRNA (Long non-coding RNA: 長鎖非コードリボ核酸) に着目し、放射線発がんを含む放射線影響を新規的なアプローチによる解明も行う。量子科学技術研究開発研究機構放射線医学総合研究所は、既に子どもは放射線発がんリスクが高いというエビデンスを蓄積しており、本研究においても、子どもの健康維持ならびに放射線発がんリスクの低減に着目している。

平成 27 年度から平成 29 年度の 3 年間で、2 つの EE の条件「遊び、運動、認知行動の刺激のある豊かな環境」(量研機構)と「快適温度飼育環境」(産業医科大学)で飼育した実験動物を用いて EE の効果を検証した。その結果、8 週間の「遊び、運動、認知行動の刺激のある豊かな環境」の EE は、体重増加の抑制、脂質代謝・糖代謝の亢進、内分泌機能の修飾効果、がん予防効果、免疫機能の活性化及び放射線による DNA 損傷の修復能の増加が認められた。また、lncRNA に関しては、再現性の必要性はあるものの EE や放射線被ばくに応答する lncRNA 候補を見出すことができた。「快適温度飼育環境」の EE では、体重への好影響が認められた。本事業の 3 年間を通して再委託先研究者との密な連携により、EE の有する様々な効果の実証データの蓄積と成果のまとめができた。

今後、本事業の成果が災害時の避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復・維持の施策の基本情報と成ることを期待する。