

Radiation exposure is a proven risk factor for breast cancer. The risk of breast cancer was modified by several factors such as age at exposure and reproductive status. However the underlying mechanisms of cancer risk modification by these factors are still unclear. While previous studies show that genomic aberrations are more frequent in radiation-induced cancer than sporadic cancer, epigenetic modifications (*e.g.*, DNA methylation, histone modification) ,which do not change DNA sequence, are recently paid much more attention to cancer development. Little information, however, is available regarding epigenetic effects on radiation-induced mammary carcinogenesis. In this thesis, I studied epigenetic changes associated with age at exposure in radiation-induced rat mammary carcinogenesis in order to (i) examine the differences between spontaneous- and radiation-induced rat mammary carcinomas by molecular analyses (Chapter I), and (ii) demonstrate the effects of full-term pregnancy on rat mammary carcinoma induction after exposure to either radiation or N-methyl-N-nitrosourea (MNU; Chapter II). In Chapter I, DNA methylation status was analyzed in carcinomas induced by irradiation at pre- and postpubertal ages, as well as spontaneous carcinomas. The incidence of mammary carcinomas induced by postpubertal irradiation was higher than those induced by prepubertal irradiation. Carcinomas induced by prepubertal irradiation showed global hypomethylation together with hypermethylation of a small set of genes related to branching morphogenesis. Carcinomas induced by postpubertal irradiation were characterized by

hypermethylation of regions of several genes, such as *Lox11*. Spontaneous carcinomas showed marked site-specific and global hypomethylation. In Chapter II, pre- or postpubertal female rats were irradiated or were injected intraperitoneally with MNU or were left untreated. At 10 weeks of age, about half of the rats were paired with male rats for 2 weeks. Rats which carried a litter to term and weaning (parous) were compared to the unmated rats (virgin) for mammary cancer development. Mammary carcinoma-free survival was significantly decreased up to 18 weeks of age (before weaning) in the parous rats treated with MNU at postpubertal age compared to the age-matched virgin rats. After 19 weeks of age, the carcinoma-free survival was significantly improved in the parous rats injected with MNU at pre- and postpubertal ages. This improvement was also evident in rats irradiated at prepubertal, but not postpubertal, age. These results suggest that protective effects of full-term pregnancy were different between radiation-induced and chemically induced mammary carcinomas and between ages at exposure. It is quite interesting to delineate the epigenetic changes in the carcinomas developed in parous rats.

Unlike genomic aberrations, epigenetic modifications are reversible and, hence, these results could contribute to prevention of second cancer after radiation exposure.

放射線治療患者や原爆被爆者の疫学的調査から、若い年齢での被ばくは、その後の乳がんのリスクを増加させることが明らかとなっている。一方、乳がんリスクは、妊娠・出産を経験することによって変化する。しかしながら、なぜ被ばく時年齢によって乳がんリスクが異なるのか、妊娠・出産がどのような機構でリスクを修飾するのかよく分かっていない。先行研究で放射線誘発乳がんは自然発生乳がんと比べて、欠失などゲノムの直接的な変異が多いと報告されている。本研究では、近年発がんの主要なメカニズムとして注目されている、ゲノム DNA の直接的な変化を伴わないエピジェネティックな変化に注目し、解析を行った。まず、分子生物学的手法により思春期前または思春期後の放射線照射で誘発された乳がんを自然発生乳がんと比較しながらエピジェネティックな変化である DNA のメチル化を調べた(第一章)。次に、妊娠・出産が発がんのエピジェネティックな変化を修飾するかどうかを明らかにするために、まず、放射線被ばく後の妊娠・出産の経験による(経産)乳がんリスクの変化について検討した(第二章)。

第一章では、思春期前(3 週齢)または思春期後(7 週齢)に γ 線被ばくにより誘発した乳がんと自然発生乳がんについて DNA メチル化の違いを調べた。乳がんの発生率は、7 週齢被ばくのほうが 3 週齢被ばくに比べ高く、被ばく時年齢依存性が認められた。3 週齢被ばくで誘発された乳がんは、発生・分化に関わる遺伝子の近傍領域の高メチル化とゲノム DNA のグローバルな低メチル化が特徴的で、7 週齢被ばくで誘発された乳がんでは、*Lox11* 遺伝子を含む種々の遺伝子の近傍領域の高メチル化が顕著で、思春期を境に、発がんにおけるエピゲノム変化が異なることが明らかとなった。一方、自然発生乳がんにおいては、ゲノム DNA のグローバルおよび遺伝子の近傍領域の低メチル化が特徴的であった。第二章においては、思春期前後に γ 線または化学発がん物質であるメチルニトロソウレア(MNU)を暴露した後、生後 10 週齢より交配させ、妊娠を経験させた群(以下、経産群)と未経産群に分けて、乳腺腫瘍の発生頻度および発生時期の変化を観察した。離乳直後(生後 18 週齢)までの乳がんリスクは、経産群で上昇する傾向が観察され、特に 7 週齢 MNU 暴露群で顕著であった。19 週齢以後に発生する乳がんにおいては、MNU 暴露群においては暴露年齢にかかわらず乳がんリスクの減少と発生の遅延が観察された。一方、 γ 線被ばく群においては、妊娠・出産のリスク低減効果は 3 週齢被ばく群でのみ観察され、7 週齢被ばく群では観察されなかった。即ち、放射線被ばくにおいては、妊娠・出産は 3 週齢被ばくにより活性化または不活性化された発がん経路を阻害することが示唆された。

以上の結果から、自然発生乳がんと放射線誘発乳がんでは、発がんに関わるエピジェネティックな変化が違ふこと、エピジェネティックな変化に被ばく時年齢依存性があることが明らかとなった。妊娠の効果も、乳がんの発生時期や被ばく時年齢、発がん因子により異なることから、その原因としてのエピジェネティックな変化を同定することが重要である。エピジェネティックな変化は薬剤により制御可能なので、これらの知見は、

放射線被ばく後の二次がん予防などに重要な知見を与えると考えられる。