

平成 30 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

幹細胞のキネティクスから
発がんの線量率効果を紐解く

成果報告書

平成 31 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 28～30 年度「幹細胞のキネティクスから発がんの線量率効果を紐解く」の成果を取りまとめたものです。

目次

	頁
概略	iv
1. はじめに	1
2. 業務計画	
2.1 全体計画	3
3. 業務の実施内容及び成果	
3.1 幹細胞生物学実験による線量率効果の解析	6
3.1.1 乳腺幹細胞における線量率効果の解析	6
3.1.1.1 乳腺幹細胞数等の動態評価	6
3.1.1.2 乳腺幹細胞系の分化への影響評価	17
3.1.1.3 乳腺幹細胞競合評価系の構築	20
3.1.1.4 共同研究用試料作製	27
3.1.2 消化管幹細胞における線量率効果の解析（再委託先：電中研）	28
3.1.3 甲状腺幹細胞における線量率効果の解析（再委託先：長崎大学）	36
3.2 シミュレーションによる線量率効果の解析	45
3.3 研究推進	57
4. 結言	61

図一覧

図 1-1 動物実験・疫学の橋渡し	1
図 2-1 全体計画図	5
図 3-1 フローサイトメトリーによる EdU 検出	8
図 3-2 放射線照射後の乳腺細胞で生じた DNA 二重鎖切断マーカー γ H2AX の検出例	9
図 3-3 実験プロトコル概略	10
図 3-4 フローサイトメトリーによる乳腺上皮細胞の分画	11
図 3-5 ラット初代乳腺細胞のフローサイトメトリー解析	12
図 3-6 ラット乳腺細胞における EdU 陽性率	13
図 3-7 ラットに 4Gy を照射後の γ H2AX フォーカスの蛍光免疫染色	14
図 3-8 乳腺幹細胞系の各細胞における DNA 損傷の生成と回復の動態	15
図 3-9 末梢芽状突起における EdU 保持細胞と CK18 陽性内腔細胞	18
図 3-10 末梢芽状突起における EdU 保持細胞の分化動態	18
図 3-11 分裂期マーカー-PH3 の動態	19
図 3-12 細胞競合評価系の概念図	20

図 3-13	組織透明化	21
図 3-14	二重遺伝子導入ラットへの混合移植実験	22
図 3-15	細胞競合実験の結果	24
図 3-16	照射後の移植再生実験によって計測される乳腺幹細胞活性の放射線感受性	25
図 3-17	腸管クリプトの幹細胞数への影響評価法	29
図 3-18	幹細胞と子孫細胞の蛍光分布	30
図 3-19	放射線 1Gy を異なる線量率で被ばくした 3 日後の腸管幹細胞の残存	30
図 3-20	新たな幹細胞の出現 (幹細胞の補充)	31
図 3-21	Lgr5+幹細胞の増殖状態の解析例	32
図 3-22	低線量率放射線 0.1Gy 照射後の腸管幹細胞の EdU 陽性の割合	32
図 3-23	低線量率放射線 0.1Gy 照射後の腸管幹細胞の EdU/PH3 両陽性細胞の割合	33
図 3-24	蛍光免疫染色による分化細胞マーカー (サイログロブリン) の検出	37
図 3-25	放射線照射後のサイログロブリン発現の時空間的变化	38
図 3-26	放射線照射により誘導された 53BP1 フォーカス	39
図 3-27	53BP1 フォーカスによる DNA 損傷評価	40
図 3-28	細胞増殖停止の解析	42
図 3-29	乳腺の末梢芽状突起の構造モデル	46
図 3-30	乳腺の末梢芽状突起の動態モデルにおいて考慮した細胞動態とパラメータ	47
図 3-31	乳腺の末梢芽状突起の状態遷移モデル	48
図 3-32	高・低線量率放射線照射時の細胞損傷量と末梢芽状突起内の非損傷細胞数	48
図 3-33	高・低線量率放射線照射時の非損傷細胞数	49
図 3-34	細胞競合を考慮した末梢芽状突起内非損傷細胞数の放射線応答	49
図 3-35	DNA 損傷を含む細胞生存率モデルの導入	51
図 3-36	損傷に関する指標の時間変化	52
図 3-37	発がんリスクに関する指標の時間変化	53
図 4-1	ラットの放射線誘発乳がんリスクの線量率効果	62

略語一覧

- AF: Alexa Fluor (アレクサフルオール (蛍光色素商品名))
- CK: cytokeratin (サイトケラチン)
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール)
- DsRed: Discosoma sp. red (赤色蛍光タンパクの一種)
- EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
- EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (5-エチニル-2'-デオキシウリジン)
- EGFP: Enhanced green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク)
- ERR/Gy: Excess relative risk per gray (1Gy あたりの相対リスクの増加)
- FBS: Fetal bovine serum (ウシ胎仔血清)
- HBSS: Hank's balanced salt solution (ハンクス平衡食塩水)
- ICRP: International Commission on Radiological Protection (国際放射線防護委員会)

LSL: loxP-STOP-loxP (loxP-終止コドン-loxP)

NCRP: National Council on Radiation Protection and Measurements (米国放射線防護・測定審議会)

PBS: Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

TBS-T: Tris buffered saline with Tween 20 (Tween20 含有トリス緩衝生理食塩水)

tdTomato: Tandem dimer tomato (赤色蛍光タンパクの一種)

概略

●研究の背景

東京電力福島第一原子力発電所の廃炉作業には、低線量率被ばくが伴う。作業員の4割が不安を感じているとの調査もある中、放射線の健康リスクの評価はますます重要となっている。

低線量率放射線の影響のような小さなリスクを、ヒトのデータから直接的に推定しようとする、避けることのできない「予期・制御できない要因」（バイアス）の影響が相対的に大きくなり、推定が困難である。一方、動物発がん実験等の生物学的研究では、「同じ累積線量を照射した場合でも、低線量率（6mGy/時程度）ではリスクも低くなる」という現象（線量率効果）が観察される。そこで現状では、高線量率放射線に被ばくした原爆被爆者等の疫学で高線量率のリスクを推定し、これを元にして、非常に単純化された生物学的モデルによって、低線量率（6mGy/時以下）のリスクを推定している。

この推定には不確実性があるため、どちらかといえばリスクを過大評価する方向で規制が行われ、国際的な議論も、線量率効果を仮定しない方向（低線量率であっても、リスクは高線量率と同等である、と仮定する方向）に傾きつつある。しかし、規制を実行するための社会的投資の大きさや、リスクの過大評価によってもたらされうる社会的問題を考えると、この不確実性を減らしていくことは、非常に重要である。

●解決すべき課題

疫学研究では調査の大規模化が試みられているが、予期・制御できない要因の問題は残る。動物実験では予期・制御できない要因は生じにくい、得られた結果をどうヒトに適用するかという課題がある。そこで、生物種の違いを超えて疫学と動物実験の間をつなぎ、解釈を補うための研究が、ますます重要になっている。これは、具体的には、発がんのメカニズムの解明、メカニズムに基づいた数理モデルの構築、数理モデルのヒトへの適用等の研究であり、国際機関等もこういった課題の重要性を支持している。

発がんのメカニズムに関しては、発がんに先立って起こる、発がんの標的細胞と考えられる幹細胞（組織幹細胞と前駆細胞をまとめて、本報告書ではこのように称する。）の動態の解明が、重要な課題の一つである。国際放射線防護委員会（ICRP）も、そのような課題を提示している。すなわち、放射線が生体に照射された後、幹細胞を含む組織の中では、数日～数週間ほどの時間スケールで、各種細胞の数・増殖等の動態の変化や、照射された細胞と健全な細胞の競合が起こると考えられるが、その実態はほとんど解明されておらず、解決すべき課題である。

●本研究の目的

本研究の目的は、幹細胞の動態に着目し、発がんの線量率効果のメカニズムについて、低線量率放射線リスク推定のさらなる合理化に資する新たな知見を創出することである。具体的には、被ばく後の幹細胞系の動態に関する実験的知見を収集する。また、シミュレーションを行って、被ばく後の幹細胞の動態が発がんの線量率効果を説明しうるかどうかを検証する。

●本研究の実施内容

被ばく後の幹細胞動態の実験的知見の収集については、放射線防護において重要な組織の一つ

である乳腺を中心に、照射後の幹細胞系における細胞数、増殖と分化の動態、細胞競合に関して、実験系の構築（初年度及び2年目）及びデータ収集（3年目）を行った。数理モデルによるシミュレーションでも、実際の組織のデータを適用した数理モデル構築及びシミュレーションを行った。乳腺以外にも、幹細胞系の特徴が異なり、放射線防護上も重要な、腸管及び甲状腺について、それぞれの研究で必要とされる幹細胞動態データを収集した。

●本研究の成果

幹細胞動態を研究するための実験系及び数理モデルの構築については、以下に代表されるような技術的な成果を得た。

- 》 ラット乳腺を構成する4種類の細胞を識別して解析する技術と、それらの細胞において増殖及びDNA損傷を解析する技術を、いずれも世界で初めて実現した。
- 》 細胞競合を個体内で解析するための基盤となる、識別可能なラット乳腺細胞が混合された組織を形成する技術と、ラット乳腺組織を透明化して蛍光観察する技術を、世界で初めて実現した。
- 》 ラット乳腺幹細胞系の放射線応答の数理モデルを、実験的観察で得られた数値を用いて、世界で初めて構築した。

これらの新規技術を既存技術と合わせて使用し、被ばく後の幹細胞動態に関して、以下に代表されるような新規の知見を得た。

- 》 ラットの乳腺では、内腔細胞と呼ばれる細胞（前駆細胞、分化細胞）は、放射線照射に対してDNA損傷応答を示す。一方、基底細胞と呼ばれる細胞は、不十分にしか応答しない。また、低線量率照射後に、基底細胞の入れ替わりが活発化していることが示唆される。
- 》 乳腺では、照射された細胞が組織中に10%程度の割合で存在する場合に、3週間経っても、非照射細胞との間の細胞競合は、ほとんど起こらない。
- 》 マウスの大腸では、高線量率照射の3日後でも幹細胞の入れ替わりが継続的に起こっているが、小腸では入れ替わりが抑制される。
- 》 甲状腺では、典型的な幹細胞が存在しない。高線量率照射後には老化様細胞死が誘導され、低線量率照射では誘導されない。
- 》 乳腺幹細胞系の増殖、分化、細胞死、損傷と修復について、実験で得られた数値も取り入れて数理モデル化し、発がんに関連する指標をシミュレーションすると、線量率効果のごく一部しか説明されない。これ以外の幹細胞動態が、今後の研究ターゲットである。

●今後の展望・将来の見通し

本研究では、発がんに先立って起こる幹細胞系の動態の中に、動物発がん実験で見られる線量率効果の少なくとも一部を説明し得る要因があることを示した。今後は、本研究で得られた成果をさらに発展させ、疫学と動物実験を統一的に解釈して、ヒトにおける低線量率放射線のリスク評価につなげることが必要である。それを実現するための将来の課題を、以下に挙げる。

- 》 本研究を先例として、動物発がん実験で見られる線量率効果のメカニズムを、様々な観点から総合的に明らかにし、動物発がん実験の線量率効果をよく再現する数理モデルを構築

する。

- 》 こうして得られた知見について、ヒト組織、ヒト細胞を用いた検証実験や、ヒトにおけるパラメータ収集を行い、動物とヒトの整合性を確認しつつ、数理モデルのヒト化を行う。
- 》 これらの、生物学的知見に立脚した数理モデルを用いて、動物発がん実験データとヒト疫学データを統一的に説明し、ヒトの被ばくリスクを予測する体系を確立する。
- 》 上記のような研究については、放射線規制に関わる国際機関、国際組織において議論しつつ、学術的なコンセンサスを得ながら推進し、放射線規制の科学的基盤への取り込みを図る。

1. はじめに

東京電力福島第一原子力発電所の廃炉は、我が国の原子力分野の最重要課題である。廃炉に関わる作業員の被ばく低減は進んでいるが、依然、一般的な放射線作業より高めで推移しており（平成28年8月で平均0.25mSv/月）、作業員の4割は調査に対し「被ばくによる健康への影響」の不安を回答している（文献1及び2）。通常の放射線作業に加え、廃炉に関わる人が増えていることから、健康に対する低線量率放射線リスクの評価は、ますます重要となっている。

【放射線リスク評価の現状と課題】 低線量率放射線リスクの評価については、ヒトを対象とした研究（疫学）が、重要な情報源として期待される。しかし、低線量率放射線の影響のような小さなリスクと比べると、疫学では避けられない、予期・制御できない要因（バイアス）の影響が非常に大きいため、結論は明快でなくなる。一方、動物発がん実験等の生物学的研究では、6mGy/時程度の低線量率において、明確な線量率効果（＝低線量率放射線の影響が、高線量率と比べて低くなること）が見られる。そのため現状では、高線量率放射線に被ばくした集団（原爆被爆者等）の疫学研究から高線量率放射線のリスクの大きさを推定し、それを元に、非常に単純化された生物学的モデル（線形二次モデル＝高線量率での影響の大きさは線量 x に対して $\alpha x + \beta x^2$ で表され、低線量率では αx で表されるという理論。）を用いて、低線量率放射線（6mGy/時以下）のリスクを推定している。様々な規制基準（作業員の線量限度、避難・除染の基準等）は、このリスク推定に基づいている。

この推定には科学的な不確実性が伴うため、規制基準はいわゆる「安全側」（どちらかといえばリスクを過大評価する方向）に設定されている。国際的な議論も、低線量率（6mGy/時）であっても高線量率と同等のリスクを仮定する方向にある。とはいえ、規制を実行するための社会的投資の大きさや、過大評価の方向で推定されたリスクを現実のものだと受け止めることに伴い得る社会的問題を考えると、この科学的な不確実性を減らしていくことは非常に重要である。

【課題克服に向けた研究開発の現状】 疫学分野では、多国間連携による大規模な原子力作業員研究等、推定の精度を上げる努力がなされ、データの蓄積が期待されるが、予期・制御できない要因の問題は残る。動物発がん実験は、疫学とは異なり予期・制御できない問題は生じにくいのが、得られた結果をどのようにヒトに適用できるかどうかという課題がある。疫学では線量率効果の証明が難しく、動物発がん実験では明確な線量率効果が見られることから、これらの疫学データ、動物実験データの間をつなぎ、解釈を補うため研究が、ますます重要になってくる。

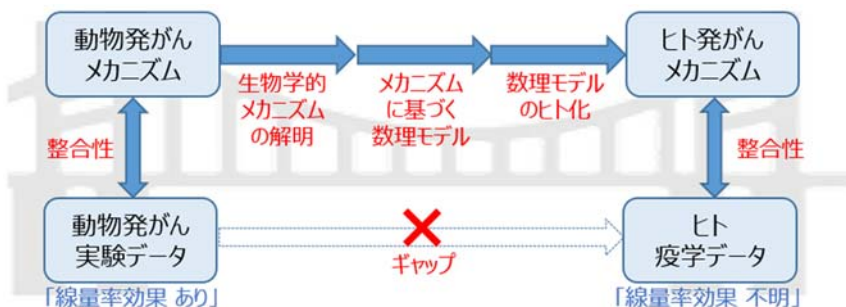


図 1-1 動物実験・疫学の橋渡し（文献4を元に改変）

疫学と生物学を統合するための基盤的研究開発として、発がんの生物学的メカニズムの解明、メカニズムに基づいた数理モデルの構築、数理モデルのパラメータ等のヒト化の取り組み等が挙げられる。これらを総合することにより、動物実験と疫学の統合的な説明が期待できる（図 1-1）。実際、こういった研究のニーズは、経済協力開発機構原子力機関（文献 3）や米国放射線防護・測定審議会（NCRP）（文献 4）でも議論されている。

この中で重要な生物学的メカニズムはいくつかあるが、発がんの標的細胞であると考えられる組織幹細胞やそれに近い前駆細胞（本報告書では特に断らない限りまとめて幹細胞と呼ぶ。）に関連するメカニズムは、特に未開拓かつ重要である。生体が放射線に照射された後、幹細胞を含む組織の中では、数日～数週間ほどの時間スケールで、各種細胞の数や増殖等の動態（キネティクス）が変化すると考えられる。また、近年「細胞競合」と呼ばれる現象の研究が進展し、照射された細胞と健全な細胞が競合して、照射された細胞が組織から除かれるという仮説が提示されるようになった。これらの幹細胞系の動態変化が生じた後に、数ヶ月、数年、数十年をかけた発がんの過程が開始することから、被ばく後初期の動態変化を解明することは重要である。しかしながら、その実態はほとんど解明されていない。国際放射線防護委員会（ICRP）も、2015 年の出版物において、幹細胞の生物学的特性が発がんの線量率効果に関わっている可能性を指摘し、放射線分野における幹細胞研究のニーズを提示している（文献 5）。近年、再生医療研究の発展と相俟って、幹細胞生物学の多様な解析ツールが開発され、発がんと幹細胞の関係も研究できるようになってきた。一方、放射線発がんにおける幹細胞の動態は体系的に調べられておらず、最先端の幹細胞研究を放射線防護の科学的基盤に還元するには至っていない。

【本研究の目的】 本研究では、幹細胞の動態に着目し、発がんの線量率効果のメカニズムについて、低線量率放射線リスク推定のさらなる合理化に資する新たな知見を創出する。具体的には、被ばく後の幹細胞系の動態、細胞競合に関する実験的知見を収集する。また、データに基づいた数理モデルを構築し、シミュレーションを行う。これらを通して、被ばく後の幹細胞のどのような動態が発がんの線量率効果を説明でき、あるいはできないかを、評価する。

参考文献

1. 東京電力「福島第一原子力発電所廃炉作業の至近の状況について」（2018/11/20）
2. 共同通信「福島第 1、作業員 4 割が「不安」 工期見通せず、東電調査」（2019/3/30）
3. Chauhan V et al. Is there a role for the adverse outcome pathway framework to support radiation protection? *Int J Radiat Biol* 95(2): 225-232, 2019.
4. NCRP. Commentary No. 24 - Health Effects of Low Doses of Radiation: Perspectives on Integrating Radiation Biology and Epidemiology. NCRP, 2015.
5. Niwa O et al. ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection. *Ann ICRP* 44(3-4):7-357, 2015.

2. 業務計画

2.1 全体計画

本業務は、被ばく後の幹細胞系の動態に関する実験的知見を収集するための様々な組織の幹細胞生物学実験（2.1.1）、数理モデルを構築して行うシミュレーション研究（2.1.2）、これらのまったく異なる領域の英知を結集し、研究を有機的かつ効率的に実施するための研究推進（2.1.3）の、3つの項目について計画した。

以下には、主に各年度の業務計画書の記載をまとめた。各項目の目的、方法等の詳細については、「3 業務の実施内容及び成果」に述べた。

2.1.1 幹細胞生物学実験による線量率効果の解析

実験的研究においては、放射線被ばくによる発がんリスクが比較的高い組織として、乳腺（2.1.1.1）、腸管（2.1.1.2）、甲状腺（2.1.1.3）に着目した。これらの組織の選定にあたっては、幹細胞系における細胞の入れ替わりが早いと考えられる組織（腸管）、遅い組織（甲状腺）、中間の組織（乳腺）という特徴も考慮した。各組織について高い専門性を持った研究を行うために、腸管、甲状腺については再委託機関の研究者が担当した。

2.1.1.1 乳腺幹細胞における線量率効果の解析

① 乳腺幹細胞数等の動態評価

平成28年度：ラット乳腺幹細胞系の動態変化の評価の基盤を構築するために、使用できる細胞表面抗原等の抗体をフローサイトメトリー（＝細胞の発する蛍光の種類及び強度によって細胞を解析する技術。）によって探索する実験を実施する。

平成29年度：ラット乳腺幹細胞系の動態変化の評価の基盤を構築するために、DNA損傷や増殖と幹細胞等の評価系を組み合わせたフローサイトメトリーの条件検討を実施するとともに、線量率を変えて照射したラットの細胞を用いて予備的な評価を行う。

平成30年度：線量率を変えて照射したラットの細胞を用いて、照射後の乳腺幹細胞系の動態を評価する実験を行い、データを精緻化する。

② 乳腺幹細胞系の分化への影響評価

平成30年度：チミジン類似体でラベルした細胞の分化に対する照射の影響を実験により評価する。

*（平成29年度に再委託先であった電力中央研究所は、平成30年度において委託業務を継続実施することができなくなったため、平成28年度、平成29年度の消化管での成果を踏まえて、本業務を「乳腺幹細胞系の分化への影響評価」に変更し、電力中央研究所担当予定であった「消化管細胞における線量率効果の解析」業務を補完する。）

③ 乳腺幹細胞競合評価系の構築

平成28年度：ラット乳腺組織において細胞競合を評価する基盤を構築するため、蛍光染色画像解析の検討、及び乳腺の三次元構造の蛍光解析を行うための組織透明化のシステム導入並びに条件検討を実施する。

平成29年度：ラット乳腺組織において細胞競合を評価する基盤を構築するため、蛍光タンパク遺伝子導入ラット乳腺細胞の混合移植を、照射細胞も用いて行い、再生した乳腺の細胞の混合状態や比率を解析して、細胞競合を検出可能かどうか検討する実験を実施する。

平成30年度：平成29年度の解析結果を元に、照射細胞を用いた蛍光タンパク遺伝子導入ラット乳腺細胞の混合移植の実験条件を検討して、細胞競合の有無を評価する実験を実施する。

④ 共同研究用試料作製

平成28～30年度：チミジン類似体をラットに投与し、長崎大学で使用するラット甲状腺の病理標本を作製し、作製した病理標本を長崎大学に送付する。

2.1.1.2 消化管幹細胞における線量率効果の解析（再委託先：電中研）

平成28年度：幹細胞数への影響評価のため、系譜追跡モデルマウスに細胞の標識及び放射線照射を行い、照射後に解剖して腸管クリプトを採材して、フローサイトメーターを用いて幹細胞プールを定量的に解析することによって、腸管幹細胞系の動態変化に関するデータを採取する。

平成29年度：幹細胞の増殖状態への影響評価のため、系譜追跡モデルマウスにチミジン類似体の投与及び放射線照射を行い、採取した腸管細胞をチミジン類似体及びリン酸化ヒストンH3を指標に解析して、腸管幹細胞系の細胞周期への放射線影響に関するデータを取得する。なお、本報告書では主に「腸管」という語を使用するが、他の文書との整合性のため、研究項目名にのみ「消化管」の語も使用する。

2.1.1.3 甲状腺幹細胞における線量率効果の解析（再委託先：長崎大学）

平成28年度：甲状腺の幹細胞系の動態変化を評価する基盤を構築するため、量研機構で作製したラット甲状腺の病理標本を用いて、幹細胞・分化細胞の識別マーカー及び細胞動態マーカーの免疫蛍光染色の条件の最適化を実施する。

平成29年度：甲状腺の幹細胞系の動態変化を評価するため、量研機構で作製したラット甲状腺の病理標本を用いて、幹細胞及び分化細胞の時空間的解析を実施し、放射線照射後の標本採取条件を決定する。また、免疫蛍光染色法によるDNA損傷解析及び細胞増殖停止解析の条件を最適化する。

平成30年度：甲状腺幹細胞動態に対する線量率効果を明らかにするため、量研機構で作製したラット甲状腺の病理標本を用いて、サイログロブリンとチミジン類似体の二重染色を行い、甲状腺幹細胞及び成熟細胞において、高線量率、低線量率照射後のDNA損傷動態及び増殖停止による細胞死動態の定量的評価を実施する。

2.1.2 シミュレーションによる線量率効果の解析

平成28年度：幹細胞を含む組織を構成する細胞集団の動態解析に適用するための基盤を整備するため、既存の細胞集団放射線応答モデルに、幹細胞系の構造、細胞種の区別

並びに細胞状態変化の導入を実施する。また、トラック構造に基づくDNA損傷生成シミュレーション手法を適用し、細胞応答の指標となる損傷に対する線量率・線量の影響を推定する計算モデルの設計を行う。

平成29年度：幹細胞を含む細胞集団の動態を解析する基盤を整備するため、線量率影響の計算モデルにDNA損傷の質を含めて詳細化を進めるとともに、幹細胞系の増殖等の動態変化を解析するための数理モデルの開発、正常細胞と変異細胞の間の細胞競合のモデル設計を実施し、各分化段階の細胞数、細胞競合等の解析のためのシミュレーションを実施する。

平成30年度：実験データとの比較を通してモデルを確立させ、異なる線量率の放射線照射に対する幹細胞の動態変化をシミュレーションによって評価し、メカニズムを推定する。また、実験で得られたデータとシミュレーション解析の比較により、観測される現象が細胞のどのような属性とメカニズムによるものかを推定する。

2.1.3 研究推進

平成28～30年度：研究代表者の下で各研究項目間、特に実験研究とシミュレーション研究の間における連携を密にして研究を進めるとともに、研究実施計画、とりまとめ等を協議するため委員会を開催する。本業務の全体計画図を図2-1に示す。

実施項目	平成28年度	平成29年度	平成30年度
1. 幹細胞生物学実験による線量率効果の解析	(量研機構)		
1-1. 乳腺幹細胞における線量率効果の解析			
1) 乳腺幹細胞数等の動態評価		← 解析系の立上げ →	← データ収集 →
2) 乳腺幹細胞系の分化への影響評価			← データ収集 →
3) 乳腺幹細胞競合評価系の構築		← 解析系の立上げ →	← データ収集 →
4) 共同研究用試料作製		← 試料収集・標本作製 →	
1-2. 消化管幹細胞における線量率効果の解析	(電中研)	← データ収集 →	
1-3. 甲状腺幹細胞における線量率効果の解析	(長崎大)	← 解析系の立上げ →	← データ収集 →
2. シミュレーションによる線量率効果の解析	(量研機構)	← データ収集 →	
		← データ管理・解析系の立上げ →	← データ収集・解析 →
3. 研究推進	(量研機構)	← 委員会開催・成果発表 →	

図 2-1 全体計画図

3. 業務の実施内容及び成果

以下に、幹細胞生物学実験（3.1）、シミュレーション（3.2）、研究推進（3.3）の3つの項目の実施内容と成果について述べる。

3.1 幹細胞生物学実験による線量率効果の解析

幹細胞生物学実験については、乳腺（3.1.1）、消化管（3.1.2）、甲状腺（3.1.3）の3つの項目に分けて、実施内容と成果を述べる。

3.1.1 乳腺幹細胞における線量率効果の解析（H28～H30）

乳腺幹細胞系の項目は、細胞数等の動態評価（3.1.1.1）、分化の評価（3.1.1.2）、細胞競合の評価（3.1.1.3）、共同研究用試料作製（3.1.1.4）の4項目からなる。

3.1.1.1 乳腺幹細胞数等の動態評価

平成29年度までは主に評価系の構築及び予備的検討、平成30年度は主にデータ収集を行った。

(1) 平成29年度までの実施内容・成果の概要

① 目的

本研究では放射線発がんモデル、ヒト乳がんモデルとして有用なラットの実験系を用いる一方、乳腺幹細胞研究が先行している生物種は、ラットではなく、ヒト及びマウスである。そこで平成28年度は、ヒト及びマウスで知見の蓄積されている乳腺幹細胞系の細胞表面マーカーを参考にして、ラット乳腺細胞を対象としたフローサイトメトリー実験のために使用できる市販抗体を探索することを目的とした。平成29年度は、これらの抗体による乳腺幹細胞評価系と、放射線照射後のDNA損傷（DNA二重鎖切断）の評価系、あるいは増殖細胞に取り込まれるチミジン類似体の評価系を組み合わせ、フローサイトメトリーで検出する実験系の条件検討を実施した。また、線量率を変えて照射したラットの乳腺細胞を用いて予備的な評価を行った。

② 材料と方法

1) 細胞の調製

ラットより乳腺を摘出し細切した後、0.1% III型コラゲナーゼ含有ハンクス平衡食塩水（HBSS）で37℃3時間消化し、2%ウシ胎仔血清（FBS）含有HBSS、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄したのち、20 μ m孔径メッシュを抜けなかった組織小片を回収、0.25%トリプシン含有エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液、5mg/mL ディスパーゼ溶液で順に消化し、40 μ m孔径及び10 μ m孔径メッシュを順次通して、通過した単離細胞を1%FBS含有HBSSに懸濁し、細胞数を血球計算板で計測した。これを最終濃度2.5～5.0%のホルマリンで固定して-80℃で保存した。DNA損傷の評価実験では、細胞をコラーゲンゲルに包埋して、後述の方法で γ 線（線量率30 Gy/時）を照射した。コラゲナーゼでゲルを溶解して細胞を回収し、上記と同様にホルマリンで固定、保存した。

2) フローサイトメトリー

融解した細胞を 1%FBS 含有 PBS に混ぜ、V 底 96 ウェルプレートに約 150,000 個となるように入れ、遠心して上清を除いたのち、抗体溶液を滴下して、氷上で 30 分間放置、200 μ L の 1%FBS 含有 PBS で洗浄、遠心して、250 μ L の 1%FBS 含有 PBS に懸濁した。これを簡易型フローサイトメーター (Guava easyCyte、メルクミリポア社) で解析した。EdU 陽性細胞の検出には、Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits (Thermo Fisher 社) を使用した。

3) 照射実験

細胞の照射は、 γ セル照射装置 (Nordion 社、 ^{137}Cs 、線量率 30Gy/時) を用いて、ラット個体 (日本クレア社、日本チャールスリバー株式会社) の照射は、 γ セル照射装置または連続 γ 線照射装置 (ポニー工業株式会社、 ^{137}Cs 、6mGy/時) を用いて、行った。

③ 結果と考察

1) ラット乳腺幹細胞系の解析に使用できる抗体の探索

基底細胞、内腔細胞を識別する抗体として CD49f (クローン Mab-5A)、CD24 (クローン HIS50) の組み合わせが、血管内皮細胞を識別する CD31 (クローン TLD-3A12) 及び白血球を識別する CD45 (クローン 0X-1) が、それぞれ使用できることがわかった。また、これらを組み合わせてフローサイトメトリーを行い、ラット乳腺細胞を基底細胞、2 種類の内腔細胞、線維芽細胞の 4 つに分画することに、世界で初めて成功した。

2) DNA 損傷を評価するフローサイトメトリーの条件検討

DNA 二重鎖切断のマーカーとして一般的な γ H2AX に着目した。まず、ラットのフローサイトメトリーに使用できる γ H2AX 抗体を検索した。また、 γ H2AX は細胞の核内に存在するが、抗体は細胞膜や核膜を通過しないため、膜透過処理の条件検討を行った。その結果、CD49f 及び CD24 抗体を抗体染色したあと 0.1%Triton-X100 溶液またはサポニン溶液 (いずれも界面活性作用を持つ物質) で処理した場合に適切なシグナルを得ることができた。一方で、0.5%Triton-X100 及び 100%メタノールによる透過処理ではこれらの標識抗体から適切なシグナルを得ることができなかった。

3) 増殖を評価するフローサイトメトリーの条件検討

エチニルデオキシウリジン (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) は、DNA の原料となるチミジンと類似した物質であり、増殖細胞中の DNA に取り込まれる。EdU の持つエチニル基を蛍光色素標識ピコリルアジドと共有結合させることで、EdU を取り込んだ細胞を蛍光色素標識することができる。しかし、蛍光色素標識ピコリルアジドは細胞膜を透過しないため、細胞膜透過処理を行う必要がある。初回の実験条件として、先行研究 (文献 1) を検討してサポニンによる細胞膜透過処理を行う条件を選択したところ、初回の条件で EdU を検出でき、それ以上の検討は要しなかった (図 3-1)。

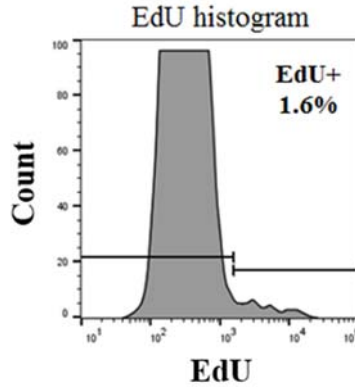


図 3-1 フローサイトメトリーによる EdU 検出 x 軸は EdU シグナル強度、y 軸はその強度を示す細胞数。EdU 陽性細胞は、陰性対照よりもシグナルが高い細胞として定義。

4) DNA 損傷、増殖、幹細胞等を組み合わせた評価系の条件検討

幹細胞等を評価するためには、乳腺幹細胞系の細胞表面マーカーである CD49f、CD24 や、無関係の血管内皮細胞や白血球を識別するための細胞表面マーカーである CD31、CD45 を染色する必要がある。しかし、膜透過処理が強すぎるとこれらのマーカーの検出を阻害するおそれがある。そこで、サポニン溶液で膜透過処理を行った細胞でこれらの細胞表面マーカーの検出を試みた。その結果、この膜透過処理を行った細胞でも細胞表面マーカーを検出することが可能であることが確認された。

5) 放射線誘発 DNA 損傷を検出するための培養条件の検討

放射線誘発 DNA 損傷を評価するため、ラット乳腺細胞を用いた検討を実施した。単離した細胞を照射し、直後から 2 時間に渡って細胞を回収し、フローサイトメトリーによって γ H2AX を検出した。その結果、予想に反して、非照射細胞であっても γ H2AX 応答が 2 時間にわたって増大した。その原因を検討した結果、2 時間まで細胞を培養している間の環境が、生存のために接着を要する乳腺細胞にとって適切でなく、接着がない場合に生じる細胞死であるアノイキスが開始して DNA が切断されているか、培養プレートの材質が適切でないために細胞に負荷がかかるためと推定された。そこで、細胞が接着する基質であるコラーゲングル内に細胞を包埋する方法を考案し、その効果を検討した。その結果、コラーゲングル内では非照射細胞に自然発生してしまう γ H2AX 誘導が抑制されることがわかった。この方法を用いると細胞表面マーカーを染色した状態で核膜内に生じた γ H2AX を安定して検出することができ、放射線線量に依存した γ H2AX 応答を乳腺幹細胞系の各細胞で確認することが可能になった (図 3-2)。

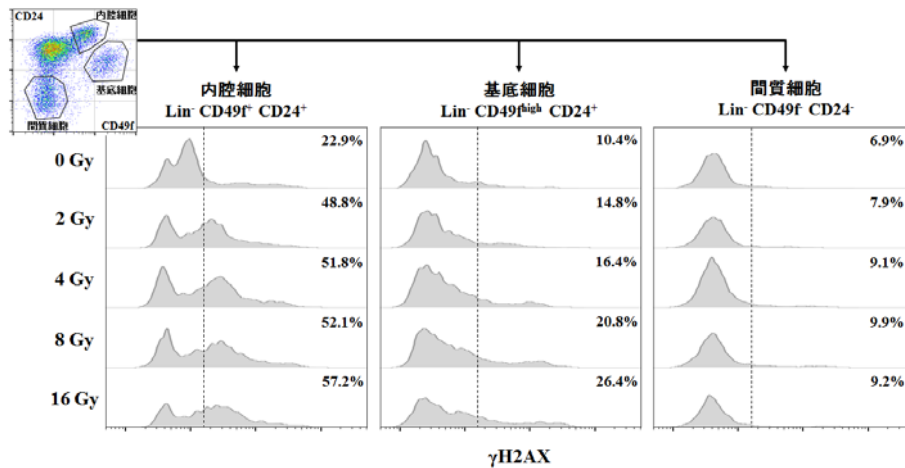


図 3-2 放射線照射後の乳腺細胞で生じた DNA 二重鎖切断マーカー γ H2AX の検出例 左上は、x 軸に細胞 (各点) の CD49f シグナル強度、y 軸に CD24 シグナル強度をとってをプロットしたもので、点の色は細胞密度の目安 (青 : 低、赤 : 高)。左、中央、右のパネルは、0~16Gy 照射後 1 時間における内腔細胞、基底細胞、間質細胞の γ H2AX シグナルのヒストグラム (x 軸は γ H2AX シグナル強度、y 軸は細胞数)。

6) 線量率を変えて照射したラットの細胞の予備的な評価

7 週齢 Jcl:SD 雌ラットに 6 mGy/時及び 30 Gy/時の線量率で累積線量 4 Gy (吸収線量) を照射し、または非照射のまま、6 mGy/時の照射が終了する時点 (11 週齢) で EdU を投与し、2 時間後に解剖して、単離した乳腺細胞を上記のフローサイトメトリーの条件で解析したところ、細胞割合が変化する傾向が見られたが、個体差が大きかった。

(2) 平成 30 年度の実施内容・成果

① 目的

前述の通り、放射線誘発乳がんモデルとして有用なラットでは、乳腺幹細胞研究の蓄積が少ないため、1 年目である平成 28 年度はラットの乳腺幹細胞系評価の手法を確立し、2 年目である平成 29 年度はこの評価系と DNA 損傷、細胞増殖の評価系を組み合わせる手法を確立した。3 年目である本年度は、データ精緻化のため、これまで表面抗原で定義してきた細胞集団の性質を評価した。また、線量率を変えて照射したラットの細胞を用いて、照射後の乳腺幹細胞系の動態を評価した。照射実験は、過去の本研究実施者らの発がん実験 (文献 2) で、発がんの線量率効果が見られている照射法を参考にした。なお、平成 29 年度の予備的検討において細胞割合の変化の個体差が大きかった点を考慮し、乳腺の細胞動態に影響すると考えられる発情周期をそろえることとした。

② 材料と方法

1) 動物の照射

「(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要」の「②材料と方法」の「3) 照射実験」に記載した方法により、高線量率 (30Gy/時)、低線量率 (6mGy/時) の γ 線照射を

行った (図 3-3a)。

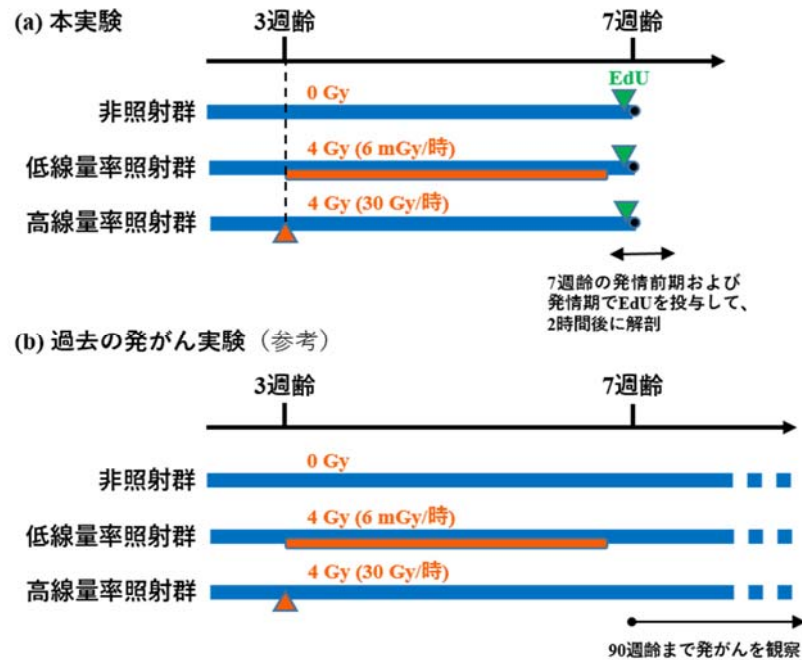


図 3-3 実験プロトコル概略 (a) 本実験のプロトコル。(b) 基になった過去の発がん実験 (文献 2)。照射はオレンジ色の部分。説明は本文参照。

2) 細胞の調製及びフローサイトメトリー

「(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要」の「②材料と方法」の「1) 細胞の調製」「2) フローサイトメトリー」と同じ方法で行った。

3) コロニー形成能評価

上記 2 の方法で調製した生細胞を染色し、セルソーター (Beckman Coulter 社 MoFlo-XDP) で分取した。これを 2mg/mL ラット尾由来 I 型コラーゲン (Corning 社) 及び 5mM HEPES を含む EpiCult-B 培地 (Stem Cell Technologies 社) 中に氷上で懸濁し、超低接着プレート (Corning 社) に播種して 37°C で 1 時間ゲル化した後、EpiCult-B 培地 (5%FBS、ラット上皮成長因子及び塩基性線維芽細胞成長因子、3 μ M Y-27632、10 μ M フォルスコリン、0.5 μ g/mL コルチコステロンを含む) に浸漬し、ウェル壁から剥離して培養した。3~4 日に 1 回、新鮮な培地に交換し、11~14 日培養した。

4) 蛍光免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋した組織を 4 μ m 厚に薄切し、脱パラフィン処理後に 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6) 中 121°C 10 分で抗原賦活化処理を行い、10%ブロッキング液 (Dako 社) を含む 0.5%Tween-20 含有トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) に希釈した一次抗体と 4°C で一晚反応させ、TBS-T で洗浄後、同様に希釈した蛍光標識二次抗体を 37°C で 1 時間反応させ、TBS-T で洗浄し、4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール (DAPI) を含む市販封入剤で封入した。

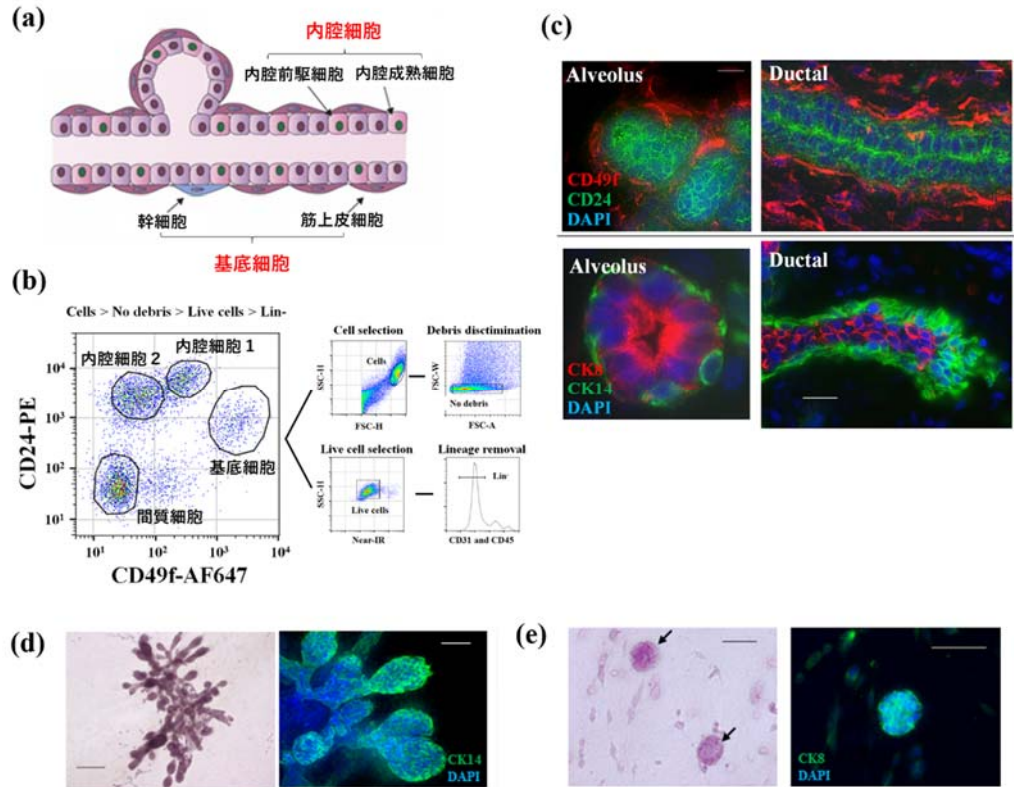


図 3-4 フローサイトメトリーによる乳腺上皮細胞の分画 (a)乳腺上皮組織の模式図。(b)ラット乳腺のフローサイトメトリー解析の代表的な結果。左は最終的な CD49f と CD24 の解析。右の 4 つはその前段の細胞選択 (左上及び右上：細胞破片の除去、左下：死細胞の除去、右下：血管内皮細胞と血球の除去)。(c)乳腺凍結切片の免疫染色。上段：CD49f (赤) と CD24 (緑) の二重染色。下段：CK8 (内腔細胞、緑) と CK4 (基底細胞、赤) の二重染色。左は腺房、右は腺管。(d)基底細胞の画分の細胞から形成されたコロニー。左:カルミンミョウバン染色像、右:CK14 (緑) 及び DAPI (青) 染色像。(e)内腔細胞 1 の画分の細胞から形成されたコロニー。1:カルミンミョウバン染色像、2:CK8 (緑) 及び DAPI (青) 染色像。

③ 結果と考察

1) ラット乳腺幹細胞系の性質の評価の精緻化

乳腺組織は上皮と間質から成り、上皮は内腔細胞と基底細胞から成る (図 3-4a)。ラットの初代乳腺細胞を CD49f、CD24 の発現によってフローサイトメトリーで分析すると、4 つの集団に分けることができる (図 3-4b)。マウス、ヒトの先行研究では、これらが基底細胞 (CD49f^{high} CD24^{low})、内腔細胞 (CD49f^{low} CD24^{high} 及び CD49f⁻ CD24^{high})、間質細胞 (CD49f⁻ CD24⁻) に対応する (Joshi et al. 2010 等)。これをラットにおいて確認するため、基底細胞マーカー (サイトケラチン (CK) 14)、内腔細胞マーカー (CK8) を用いて、CD49f が基底細胞で、CD24 が内腔細胞で、それぞれ強く発現することを確認した (図 3-4c)。分取した基底細胞を培養すると、基底細胞マーカー CK14 を発現する乳腺のような分枝状のコロ

ニーが (図 3-4d) 、内腔細胞 1 を培養すると内腔細胞マーカーCK8 を発現する腺房のような球状の内腔細胞のコロニーが (図 3-4e) それぞれ形成され、内腔細胞 2 と間質細胞からはコロニーが形成されなかった。従って、基底細胞及び内腔細胞 1 の集団に、それぞれの前駆細胞が含まれると考えられた。なお、既存の実験系 (文献 3) は CD49f の使用やコロニー形成能の評価を行っておらず、内腔細胞を 2 種類に分けることに成功していない。

2) 照射後のラット乳腺幹細胞系における数と増殖の動態

ラットの発情周期 (4~5 日) は、ヒトの月経周期 (約 28 日) に相当するもので、発情前期、発情期、発情後期、発情間期からなり、特に発情前期から発情期には血中ホルモンの濃度が劇的に変化するため、乳腺の状態も大きく変動する可能性がある。そこで、発情前期と発情期に乳腺を採取し、放射線が乳腺の細胞動態に与えた影響を評価した。

ラット乳腺の細胞増殖活性に対する放射線の線量率効果について調べるため、3 週齢の雌ラットに γ 線を低線量率 (6mGy/時、照射時 3~7 週齢) あるいは高線量率 (30Gy/時) で照射し、7 週齢時にチミジン類似体 (EdU) を投与して 2 時間後に解剖して乳腺細胞を採取し、フローサイトメトリーによって各種細胞と EdU 陽性細胞の割合を測定した (図 3-3a)。この照射法は、過去に本研究実施者らの行った発がん実験 (文献 2) で、発がんの線量率効果が確認されているものである (図 3-3b)。

これらの細胞集団の細胞数の割合に対する高線量率 (30Gy/時) 、低線量率 (6mGy/時) の γ 線 4Gy 照射の影響を調べた。その結果、低線量率で照射した後、発情期において基底細胞の割合が非照射群より有意に増加することがわかった (図 3-5)。高線量率照射後の割合は非照射群とほとんど変わらなかった。なお、これらの有意差は、間質細胞を考慮せずに、3 種類の上皮細胞の割合の変化について解析しても、同様であった。

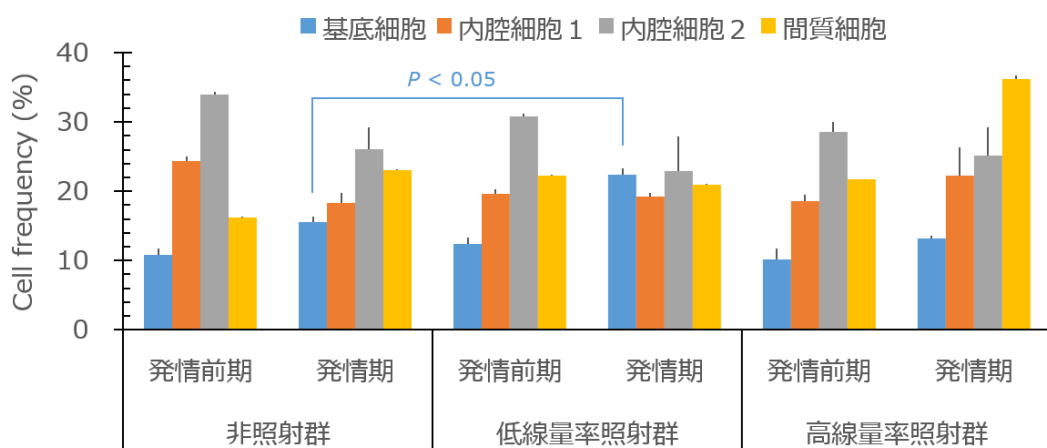


図 3-5 ラット初代乳腺細胞のフローサイトメトリー解析 基底細胞、内腔細胞 1、内腔細胞 2、間質細胞の全細胞数に対する割合。データは平均値と標準誤差 (n=4~8)。

さらに、照射が増殖状態に与える影響を調べるため、EdU 陽性細胞の割合を解析した

(図 3-6)。非照射群、低線量率照射群、高線量率照射群において、発情前期の EdU 陽性率は基底細胞で最も高く、次いで内腔細胞 1、内腔細胞 2、間質細胞となる傾向があった。発情期では、基底細胞、内腔細胞 1、内腔細胞 2 で細胞増殖活性が高まり、低線量率照射群の基底細胞で最も高くなる傾向が見られた（非照射群と比べ非有意）。

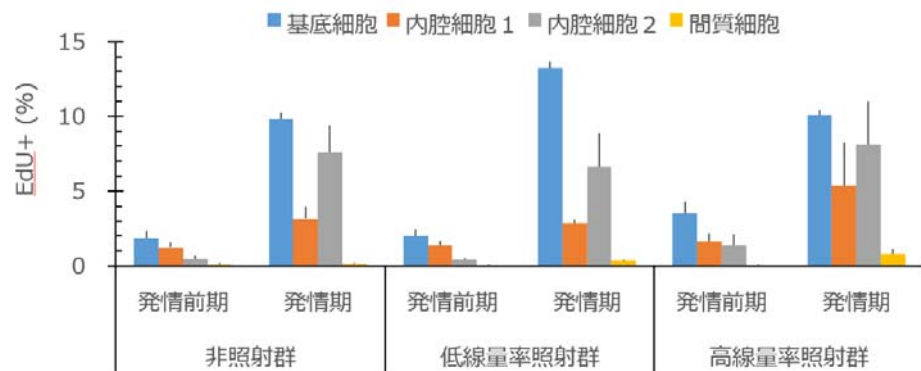


図 3-6 ラット乳腺細胞における EdU 陽性率 EdU 投与の 2 時間後に解剖して細胞を採取し、フローサイトメトリーで解析した。データは平均値と標準誤差 (n=2~5)。

以上のように、低線量率照射後の乳腺では基底細胞の割合が発情期に有意に増加することが、初めて判明した。細胞増殖も低線量率照射後の基底細胞で高い傾向が見られた。高線量率照射群では非照射群とほぼ差異がなかった。発情前期には、低線量率照射後でも非照射群と違いがないことから、この細胞割合の増加は、発情前期から発情期にかけての卵巢ホルモンの増加によって引き起こされる増殖によるものと推定されるが、EdU 陽性率の増加が有意でないことから、メカニズムについてはさらなる検討を要する。また、発情前期の細胞割合に照射の影響が見られないことから、発情期に増加した基底細胞は次の発情前期までに減少すると考えることができ、基底細胞の除去と生成（入れ替わり）が活発に起こっていると推測される。

研究実施者らの最新の動物発がん実験の結果（文献 2）によると、3 週齢雌ラットに 0~4Gy を照射した場合、1Gy あたりの乳がんの相対リスクの増加 (ERR/Gy) は、30Gy/時では 1.03 ± 0.35 、6mGy/時では 0.39 ± 0.17 (平均±標準誤差) であって、明確な線量率効果がある。従って、低線量率照射後に、乳腺における基底細胞の除去と生成が活発になっていることが、たとえば重大な損傷や変異を生じた細胞を除去することなどを通して、がんリスクの低下に寄与しているという仮説を提示できる。これは本事業で初めて発見された現象であるため、今後のさらなる検証が必要である。

3) 照射後のラット乳腺幹細胞系における DNA 損傷の動態

各乳腺細胞の放射線感受性を調べるため、DNA 二重鎖切断マーカである γ H2AX を解析した。In vivo で照射した場合、動物の解剖からフローサイトメトリーまでに数時間を要するため、 γ H2AX のピーク時のシグナルを測定するのは難しい。そこで、動物から取り出した細胞に照射して照射後 0.5~4 時間の各細胞画分における γ H2AX 動態をフ

ローサイトメトリーで調べるとともに、in vivo 照射後の反応を蛍光免疫染色で調べることで補完した。

蛍光免疫染色では、高線量率 (30Gy/時) で 4Gy 照射した後の乳腺内の γ H2AX フォーカスは照射後 1 時間で内腔細胞を中心に広範囲に発現し、照射後 2 時間以降にシグナルは減衰した (図 3-7)。照射後 4 時間ではほとんどのシグナルが減衰したが、代わって内腔細胞の位置にアポトーシスと考えられる高輝度のシグナルが出現した (図 3-7)。

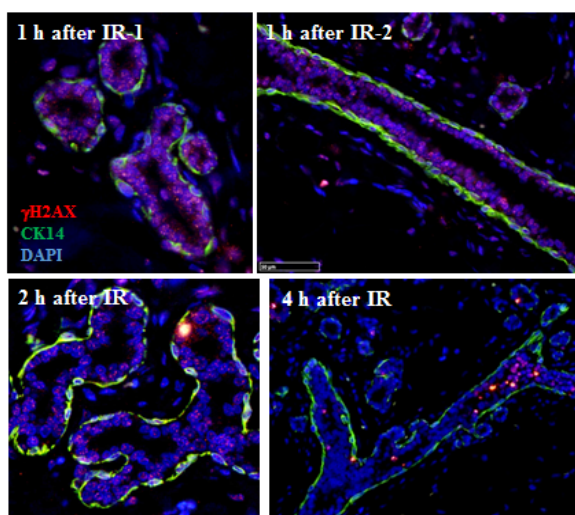


図 3-7 ラットに 4Gy を照射後の γ H2AX フォーカスの蛍光免疫染色 左上及び右上：照射 1 時間後。左下：2 時間後。右下：4 時間後。赤： γ H2AX。緑：CK14 (基底細胞マーカー)。青：DAPI (核 DNA)。

次に、フローサイトメトリーで分画される各乳腺細胞中の γ H2AX を測定するため、コラーゲンゲルに包埋したラット乳腺細胞を γ 線照射し、細胞を回収して、 γ H2AX を測定した (図 3-8)。照射後、各細胞の γ H2AX シグナルは非照射群に比べて増加し、特に内腔前駆細胞では顕著な反応が見られた (図 3-8a)。これら照射後の乳腺細胞が γ H2AX フォーカスを持つことは蛍光顕微鏡で確認した (図 3-8b)。1~8Gy 照射後 0.5~4 時間における γ H2AX 中央値は 0.5~1 時間でピークを示し、2 時間では DNA 修復による減衰が見られた (図 3-8c)。特に内腔前駆細胞と成熟内腔細胞では γ H2AX 蛍光強度が高く、基底細胞、間質細胞より 5~10 倍高かった。一方、内腔前駆細胞、成熟内腔細胞と基底細胞では、 γ H2AX 蛍光強度が照射後 4 時間で増加したが、これはアポトーシスによるものと考えられる。間質細胞では照射後 0.5 時間での小さな増加と、それに続く緩やかな減衰を示した。

本研究では、ラット乳腺における放射線応答が、基底細胞では弱く、二種の内腔細胞では敏感に起こることを、世界で初めて明らかにした。今回の実験方法の感度で基底細胞や間質細胞における DNA 損傷の増加を検出するには 4Gy 程度の線量を照射する必要があるが、低線量率でこれを照射すると 28 日間という長い期間を要するため、細胞を体外に取り出して照射する今回の実験法は低線量率では行えないことがわかった。

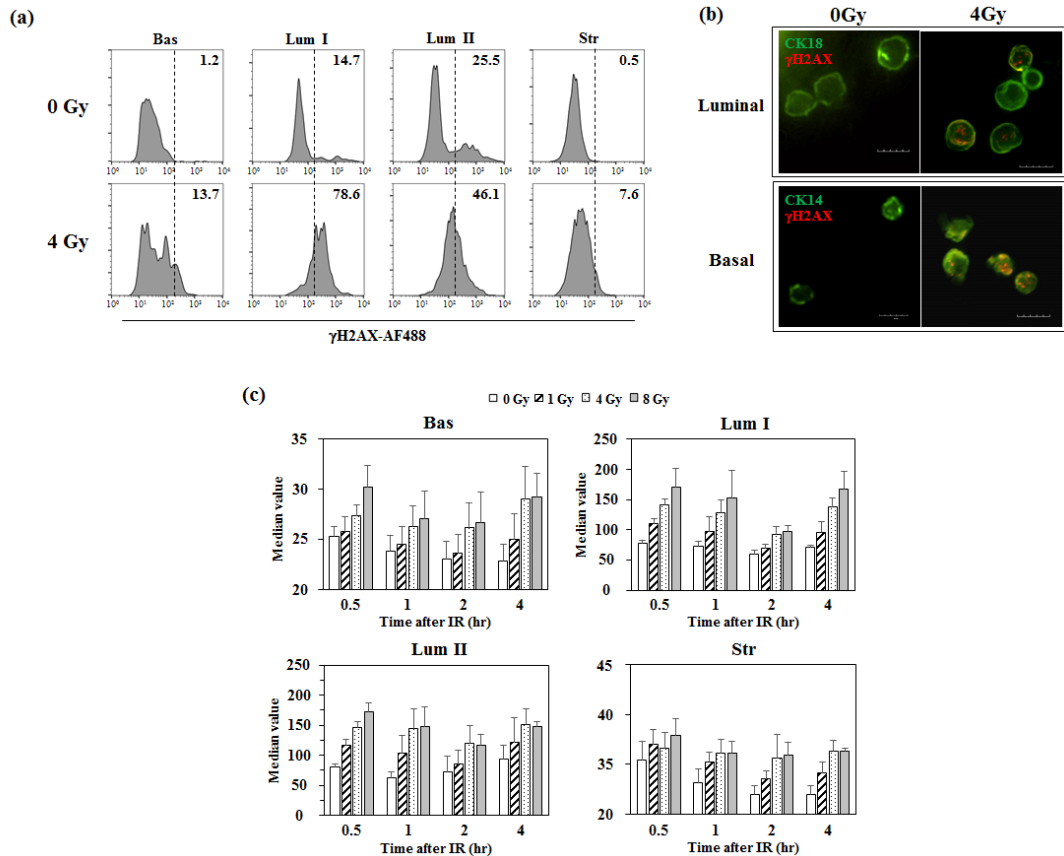


図 3-8 乳腺幹細胞系の各細胞における DNA 損傷の生成と回復の動態
 (a) 0 あるいは 4Gy 照射した 1 時間後の γ H2AX シグナルの分布。横軸は γ H2AX シグナル、縦軸は頻度。数字は γ H2AX 陽性細胞の割合 (%)。 (b) γ H2AX (赤) と CK18 (内腔細胞マーカー。上段の緑) あるいは CK14 (基底細胞マーカー。下段の緑) の二重染色像。 γ H2AX はフォーカスを形成している。 (c) 0~8Gy 照射後、0.5~4 時間後の γ H2AX シグナルの中央値 (3 回の実験の平均と標準偏差)。

本項目の本年度業務の前半では、低線量率照射後に基底細胞の生成と除去が活発化することを示唆する実験結果を述べた。業務後半では、高線量率照射後の観察で、基底細胞において放射線応答が活発でないことを示した。総合すると、低線量率照射中に DNA 損傷が蓄積された基底細胞が持続的に除去され、それを補うために基底細胞の生成が持続的に活発化するという、新しい仮説を提示できる。

以上、線量率を変えて照射したラットの細胞を用いて、照射後の乳腺幹細胞系の動態を評価する実験を行い、データを精緻化した。その結果、線量率を変えて照射したラットの乳腺幹細胞系ではその動態が変化することを示すデータを得た。

(3) 3 年間の成果のまとめ

放射線照射された組織においては、線量率に応じて幹細胞系の細胞数と増殖に動態変化が生じると考えられ、発がんはその変化が収束した後から開始する。本項目の 3 年間

を通した目的は、ラット乳腺発がんモデルを用いて幹細胞系の動態を評価できる実験系を構築すること、さらに、その実験系を利用して幹細胞系の動態を解明し、線量率効果への寄与を評価することである。

3年間で達成した事柄をまとめると、以下の通りである。

- ラット乳腺の幹細胞系を構成する細胞を、CD49f と CD24 を利用して、基底細胞（コロニー形成能あり）、内腔細胞 1（コロニー形成能あり）、内腔細胞 2（コロニー形成能なし）、間質細胞に分けて解析するフローサイトメトリー系を、世界で初めて構築した。
- 上記の実験系を発展させ、ラット乳腺の幹細胞系を構成する細胞において増殖（EdU）や DNA 損傷マーカー（ γ H2AX）を解析する実験系を世界で初めて構築した。
- 上記の実験系を用いて、発がん線量率効果が見られる 6mGy/時の低線量率照射後に、基底細胞の除去と生成（入れ替わり）が活発化していることを示唆する結果を、世界で初めて得た。
- 上記の実験系を用いて、ラット乳腺の基底細胞では放射線応答が不十分にしか起こらないこと、二種の内腔細胞では放射線応答が敏感に起こることを、世界で初めて明らかにした。

本研究の成果に基づき、将来の課題として以下を挙げることができる。

- 異なる線量率で照射後の乳腺幹細胞系の動態について、ラットの実験系を用いて、（今回初めて得られた知見の検証を含め）さらに多面的な知見を得る。
- 上記の知見は本事業の最終年度に得られたため、乳腺幹細胞系の数理モデル（後述）に取り入れることができなかったが、今後、この知見を反映させていく。
- 可能な限りヒト乳腺細胞を用いた実験を行い、ラットで得られた知見との整合性やヒト特有の現象を確認して、数理モデルのヒト化を行うこと。
- 生物学的知見に立脚した数理モデルを用いて、動物発がん実験データとヒト疫学データを統合的に説明し、ヒトの被ばくリスクを予測する体系を確立すること。

参考文献

1. Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* 44(7):927-929, 2008.
 2. Imaoka T et al. Prominent Dose-Rate Effect and Its Age Dependence of Rat Mammary Carcinogenesis Induced by Continuous Gamma-Ray Exposure. *Radiat Res* 191(3): 245-254, 2019.
- Sharma D et al. Quantification of Epithelial Cell Differentiation in Mammary Glands and Carcinomas from DMBA- and MNU-Exposed Rats. *PLoS One*. 6(10): e26145, 2011.

3.1.1.2 乳腺幹細胞系の分化への影響評価

(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要

平成 29 年度に再委託先であった電力中央研究所は、平成 30 年度において委託業務を継続実施することができなくなったため、平成 28 年度、平成 29 年度の消化管での成果を踏まえて、電力中央研究所担当予定であった「消化管細胞における線量率効果の解析」業務を「乳腺幹細胞系の分化への影響評価」に変更し、補完した。そのため、本項目は平成 30 年度のみ実施した。

(2) 平成 30 年度の実施内容・成果

① 目的

幹細胞系においては、幹細胞、前駆細胞が産み出す細胞は、最終的には組織の機能を担う分化細胞となる。放射線照射による発がんの前に、幹細胞系の分化に起こる影響は、解明されていない。本項目では、乳腺の未分化な細胞集団である末梢芽状突起に着目して、EdU によって標識された細胞が分化して末梢芽状突起から流出する動態に対し、放射線が与える影響を調べた。

② 材料と方法

1) EdU 投与と放射線照射

EdU を生理食塩水中に溶解 (5mg/mL) し、ラットの腹腔内に約 8 時間おきに 3 回投与して (体重 kg あたり 50mg/回)、最終投与から 2 時間後にガンマセル 40 で γ 線 4Gy (線量率 30Gy/時) を全身照射し、1 時間後に解剖して乳腺を採取した。

2) 蛍光免疫染色

動物から摘出した乳腺組織は、ホルマリン固定後にパラフィンに包埋した。その後、 $4\mu\text{m}$ の厚さで薄切した組織切片を準備し、脱パラフィン処理後に PBS 中 95°C で抗原賦活化処理を行い、5%スキムミルクを含む 0.5%Tween-20 含有 TBS-T に希釈した一次抗体と 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後、PBS によりよく洗浄した後に、同様に希釈した二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa Fluor (AF) 488 標識、AF555 標識、あるいは AF647 標識の抗体を用いた。標本は、 $1\mu\text{g/ml}$ の DAPI を含む 10%グリセリン PBS 溶液中に封入して保存した。作製した標本は、蛍光顕微鏡 (DM-6000B、LEICA) を用いて観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システム (FW4000、LEICA) により解析を行った。定量的解析は、DAPI により染色された細胞核の数を指標に、細胞あたりの陽性数あるいは陽性頻度を算出することにより実施した。

③ 結果と考察

末梢芽状突起は活発な細胞増殖が起こる場所であり、思春期後の乳管の伸長はこの細胞増殖によっている。そのため、EdU は末梢芽状突起の増殖細胞に取り込まれることが予想される。乳管が伸長すると、末梢芽状突起の細胞が乳管細胞に分化し、末梢芽状突起内の EdU 陽性細胞は減少すると考えられる。従って、EdU 陽性細胞の減少によって分

化を評価できる。

実際、放射線を照射しない場合、EdU 投与当日（最終投与 2 時間後）の末梢芽状突起において、EdU 陽性細胞は基底細胞及び内腔細胞に分布し（図 3-9 左）、2 日後には EdU 陽性細胞は減少した（図 3-9 右）。基底細胞マーカーである CK14 の陽性細胞と CK18 陽性及び陰性の内腔細胞の EdU 陽性率を計測した。CK18 陰性の内腔細胞は、CK18 陽性細胞よりも未分化な内腔細胞であると考えられている。いずれの細胞においても、EdU 陽性率の減衰が観察され、7 日後には EdU 陽性細胞は観察されなくなった（図 3-10 左）。この減衰は基底細胞で内腔細胞よりも速い傾向が見られた。

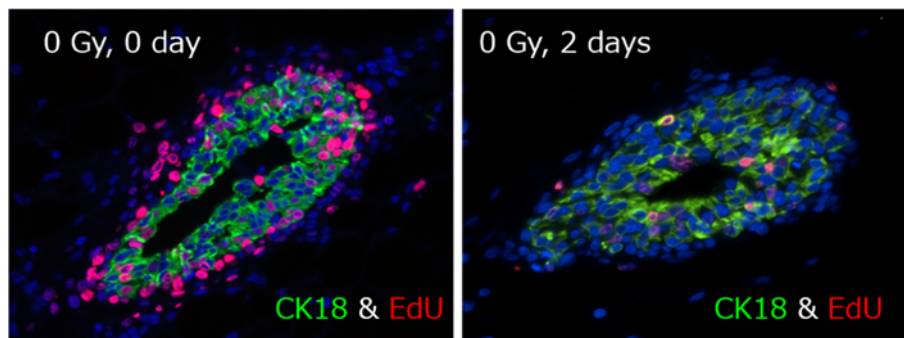


図 3-9 末梢芽状突起における EdU 保持細胞と CK18 陽性内腔細胞 EdU 標識直後（左）と比較して、標識 2 日後（右）では多くの EdU 保持細胞（赤色）は分化して、末梢芽状突起内からすでに出ている。緑色は内腔細胞マーカーである CK18。

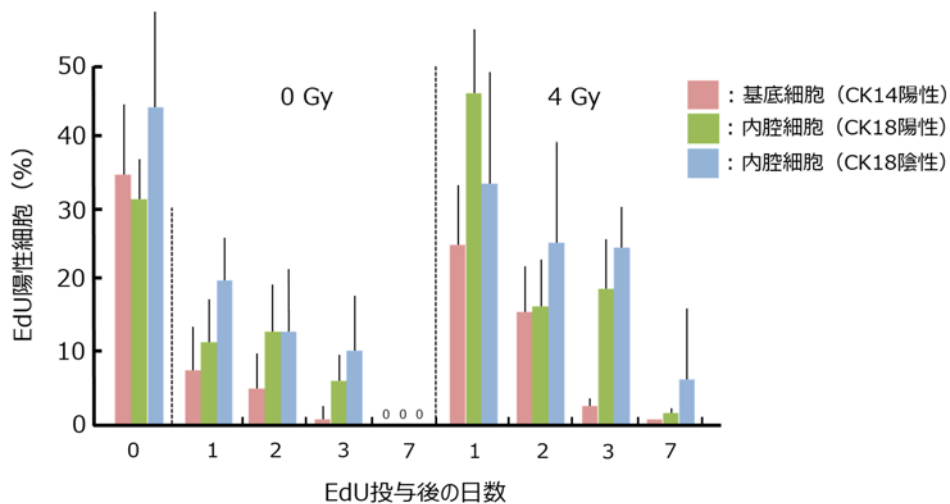


図 3-10 末梢芽状突起における EdU 保持細胞の分化動態 EdU 陽性細胞は、標識当日（0 日）は 30～40%存在する。その割合は、末梢芽状突起から分化によって押し出されることで徐々に減少し、照射しない場合（0 Gy）は 1 日後から減少が見られ 7 日後には検出されなくなるが、照射した場合（4 Gy）は分化が遅れて 7 日後でも非照射の 3 日後と同程度の割合を示した。データは平均値と標準偏差。

一方、放射線を 4Gy 照射した場合は、1 日後でも照射前と同程度の EdU 保持細胞が見られ、その後の減衰も遅延して、7 日後にも EdU 保持細胞が見られた（図 3-10 右）。7 日後の EdU 保持細胞の割合は非照射の 3 日後と同程度であった。減衰が基底細胞で速いという傾向は、照射後も変わらなかった。この結果は、照射によって末梢芽状突起細胞の分化が遅延したことを示している。

なお、分裂期マーカー-PH3 によってこの時の細胞増殖を解析すると、照射しない場合は一定であるが、照射した場合はいったん増殖が停止し、その後再開する様子が認められた（図 3-11）。従って上記の分化の遅延は、細胞増殖が一時的に停止した結果であると考えられる。

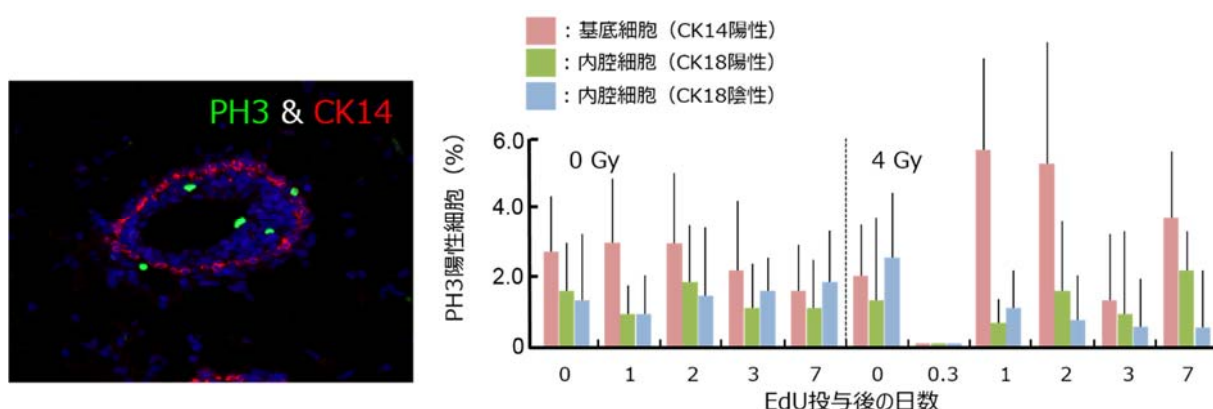


図 3-11 分裂期マーカー-PH3 の動態 PH3 はリン酸化ヒストン 3 で、末梢芽状突起内の細胞の一部で陽性となる（左の写真）。その陽性率は、非照射の場合（0Gy）はほぼ一定であるが、照射した場合（4Gy）は 0.3 日後にほぼ 0%まで減少し、その後基底細胞では一時的に増加、内腔細胞ではほぼ一定を保つ。データは平均値と標準偏差。

以上のように、業務計画書に記載されたとおり、チミジン類似体でラベルした細胞の分化に対する照射の影響を実験により評価した。その結果、ラット乳腺では照射の影響によってチミジン類似体でラベルした細胞の分化が抑制されることが初めて示された。

(3) 3 年間の成果のまとめ

本項目は平成 30 年度のみ実施したため、この記載は省略する。

3.1.1.3 乳腺幹細胞競合評価系の構築

(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要

① 目的

「細胞競合」は、不均一な細胞集団の中で、特定の特徴を有する細胞が他の細胞の作用を受けて、集団から排除される現象である。ショウジョウバエの発生過程で、少数の変異細胞が正常細胞の中に混ざっている場合に、変異細胞が排除されることから発見された。変異細胞のみ、あるいは正常細胞のみからなる集団では、このような現象は生じないのが特徴である。最近、哺乳類の上皮細胞でも類似の現象が存在することが発見され、がんを抑制する生体機構の一つではないかとの仮説が提唱されている。ICRP Publication 113（文献 1）はこの考えを敷衍し、低線量率照射の場合は照射の影響を受けた細胞と受けない細胞が混在することから、細胞競合によって影響を受けた細胞が排除されるという仮説を提唱し、これが事実であれば線量率効果を説明する新たな原理になるとした。実際、Bondar らは造血系において、照射した細胞と照射しない細胞を混合して移植すると照射した細胞が排除されることを示している（文献 2）。しかし、このような研究は Bondar らの 1 報を除いてほかにはない。

そこで本項目では、移植実験が可能であるという乳腺の特徴を活かして、照射した細胞と照射しない細胞を混合して同時に生体内に移植し、その後に形成される組織において、それぞれの細胞がどのような割合で保持されているかを解析することによって、細胞競合を評価する実験系を構築する（図 3-12）。これは、照射した細胞と照射しない細胞の間の細胞競合について造血系を対象に研究した唯一の報告である文献 2 を参考にしたものである。

平成 29 年度までは、ラット乳腺組織において細胞競合を評価する基盤を構築するため、ラット乳腺の透明化及び蛍光画像解析法と、蛍光タンパク遺伝子導入ラット乳腺細胞の混合移植について、検討を行った。

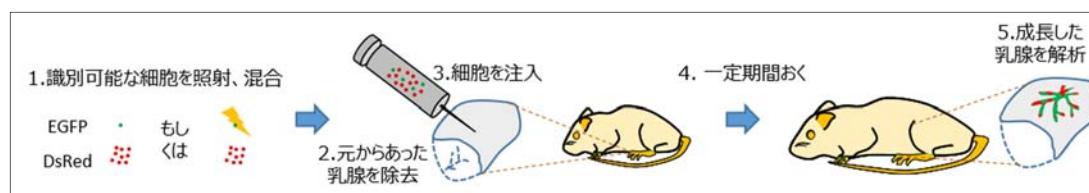


図 3-12 細胞競合評価系の概念図 識別可能な緑色蛍光タンパク（EGFP）もしくは赤色蛍光タンパク（DsRed）を発現する細胞の片方を照射し（1の黄色の雷マーク。図ではEGFP細胞を照射。）、元からあった乳腺を除去した乳腺周囲脂肪体（2）に、混合した細胞を移植する（3）。一定期間後に（4）、成長した乳腺を解析する（5）。

② 材料と方法

1) 細胞の調製

EGFP もしくは DsRed 遺伝子導入ラットより乳腺を摘出し、「3.1.1.1 乳腺幹細胞数等

の動態評価」の「(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要」の「②材料と方法」の「1) 細胞の調製」と同じ方法で細胞を調製した。これを細胞凍結保存液セルバンカー（日本全薬工業株式会社）に懸濁して -80°C で保存した。使用時には 37°C 温浴によって解凍し、2%FBS 含有 HBSS で洗浄して、生存率と細胞数をトリパンブルー染色（死細胞では細胞膜の崩壊によって取り込まれるが生細胞にはとりこまれない。）及び血球計算板によって計測し、2%FBS を含む HBSS で目的の濃度に調整した。

2) 移植手術

細胞を懸濁液の状態では非照射または γ 線照射装置によって照射後、目的に合わせて適切な組み合わせで細胞を混合し、手術まで氷上で保管した。レシピエントラットにイソフルラン麻酔を行い、下半身を動物用バリカンで剃毛したのち、手術部位にマジックによるマーキング及びヒビテン消毒液による消毒をして、保温しながら、乳腺組織を含む皮下脂肪組織を、電気メスを用いて摘出した。続けて、残存している、乳腺組織を含まない皮下脂肪組織に、ハミルトンシリンジを用いて細胞を注入した。切開部を外科用クリップで閉創し、ヒビテン消毒液によって消毒したのち、飼育ケージ内で覚醒させ、通常飼育した。3 週間後に安楽死後、解剖して、移植した皮下脂肪組織を摘出した。

3) 組織透明化

CLARITY 法は、組織をゲル化し電気泳動することによって、脂質を除去し透明化する方法である。本法には組織透明化システム（LifeCanvas Technologies 社。韓国 LCI 社より移管）を用いた。上記のラット乳腺をスライドガラスに貼付して、50mL プラスチック遠心管内で 4°C においてアクリルアミド水ゲルモノマーに1日から2日浸漬した。これを水ゲル重合システム（EasyGel）に設置して、陰圧下でモノマー溶液の浸透を行った後、洗浄して、SDS 電気泳動システム（SmartClearII、旧名称 EasyClear）で脂質を除去した。その後、屈折率調整透明化試薬（EasyIndex）に浸漬した。観察にはディスク型共焦点顕微鏡システム（オリンパス株式会社）を使用した。

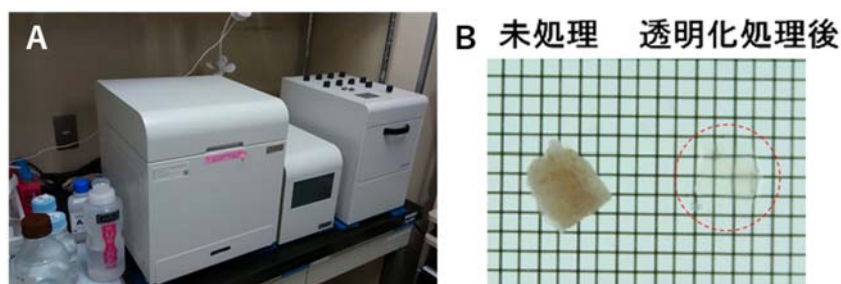


図 3-13 組織透明化 A：組織透明化装置の外観。B：透明化処理前後の乳腺組織片。格子は2mm。

③ 結果と考察

1) ラット乳腺に対する組織透明化及び画像解析の適用

CLARITY 法を行う透明化装置を導入し、ラット乳腺組織が透明化できることを世界で

初めて示したほか（図 3-13）、蛍光画像のソフトウェアでの解析条件を確認した。

2) 移植実験におけるラットの遺伝子型の条件検討

EGFP 遺伝子導入 LEW 系統ラットの乳腺細胞と、同じ系統の DsRed 遺伝子導入ラットの乳腺細胞を混合し、EGFP 及び DsRed 遺伝子を持たない（＝野生型の）同系ラットに移植した。3 週間後の移植部位を蛍光顕微鏡で観察したところ、移植した細胞に由来する乳腺組織の再生を観察することはできたが、混合状態については、期待に反して、EGFP と DsRed を発現する 2 種の細胞が混合した乳腺組織が再生されず、EGFP 発現細胞のみからなる部位と DsRed 発現細胞のみからなる部位が明瞭に分かれた組織が再生された。

その原因を解析したところ、EGFP 発現細胞を野生型ラットに移植した後に再生した乳腺組織には炎症性細胞が非常に多く浸潤しており、レシピエントにとって異物である EGFP や DsRed が免疫系によって拒絶・排除され、再生に関与する細胞数が非常に少なくなっていることが示唆された。その場合、孤立した単独の幹細胞が組織を再生するため、EGFP 発現幹細胞と DsRed 発現幹細胞が共同して 1 つの組織を再生することができないことになる。そこで、これらのタンパク質を自己の一部として持つ EGFP/DsRed 二重遺伝子導入ラットを作製し、これをレシピエントとして同様の実験を行ったところ、再生した乳腺組織には炎症性細胞の浸潤は観察されなかった。そこで、以後の移植実験ではレシピエントとして EGFP/DsRed 二重遺伝子導入ラットを用いることとした。

3) ラット乳腺に対する組織透明化及び画像解析の適用

次に、EGFP 発現細胞と DsRed 発現細胞を一定の比率で混合し、EGFP/DsRed 二重遺伝子導入ラットに移植した。すると、再生した乳腺組織において EGFP 発現部位と DsRed 発現部位が明瞭に分かれてしまう現象は回避され、透明化組織標本において、EGFP 発現細胞と DsRed 発現細胞が組織内で期待通りに混合されていることが確認できた（図 3-14）。さらに、本法を用いて細胞競合を検出することが可能な実験デザイン及び統計学的手法を検討した。

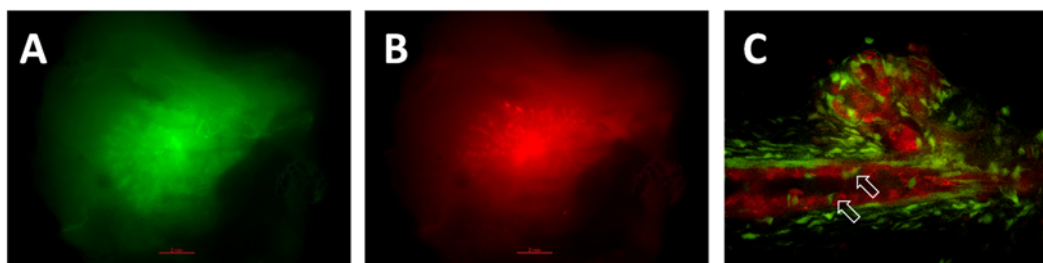


図 3-14 二重遺伝子導入ラットへの混合移植実験 A. EGFP 画像 B. DsRed 画像。両者は同一の分布を示している。C. 共焦点蛍光画像。矢印は混合されている EGFP 発現細胞の例。

また、非照射または 1Gy 照射した EGFP 発現細胞と、非照射または 1Gy 照射した

DsRed 発現細胞を混合して、EGFP/DsRed 二重遺伝子導入ラットに移植した。再生した乳腺組織を採取し、透明化を行って観察すると、画像上で細胞数を正確に計測するのが困難であることが判明し、検討が必要であることがわかった。

以上のように、細胞競合評価系の条件検討を進め、照射した細胞も用いて評価を試みることにより、さらなる条件検討のポイントを確認した。

(2) 平成 30 年度の実施内容・成果

① 目的

平成 29 年度の解析結果を元に、照射細胞を用いた蛍光タンパク遺伝子導入ラット乳腺細胞の混合移植の実験条件をさらに検討して実験条件を決定する。また、それを用いて照射細胞と非照射細胞の間における細胞競合の有無を評価する。

② 材料と方法

「(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要」の「②材料と方法」と同様の方法で行った。

③ 結果と考察

1) 実験条件の検討

昨年度の検討で明らかになった課題である、透明化標本における細胞混合割合の評価法を検討した。細胞数の確認を容易にすることを期待して、透明化標本に DAPI による細胞核の染色を追加し、染色された核の数を計測することを検討した。しかし今回の透明化標本においては、DAPI の青色の波長の光では散乱が大きく共焦点画像の画質が著しく劣化し、核の個数を計測するのが困難であることが判明した。原因としては透明化標本中に残存した脂質成分による光の散乱が考えられた。

脂質を徹底的に除去するためには、初年度に購入した脂質除去のための電気泳動装置や付属バッファの改良が考えられるが、いずれも市販品を取り入れて使用しているため、短期間でそれらの改良を実行することは困難と考えられた。また、DAPI とは異なる波長の光を発する核染色試薬の使用を検討したが、現有する顕微鏡の蛍光チャンネルが少ないため、適切な試薬を選べなかった。

そこで、同じ目的を達成する別の方法を検討するべきであると考え、EGFP あるいは DsRed シグナルを元にした細胞の占有面積を指標に解析する方法を選択した。

2) 細胞競合の評価

十分に高い線量における細胞競合の有無を評価するため、EGFP 細胞を 0Gy (偽照射) もしくは 4Gy で照射した後、EGFP 細胞と DsRed 細胞を 1:9 もしくは 9:1 の混合率で混合し、ラットの乳腺組織郭清脂肪組織に移植した。3 週間後に再生組織を採取して、透明化標本を作製し、共焦点顕微鏡によって上皮組織の画像を撮影して、再生組織における EGFP 細胞と DsRed 細胞の割合を評価した (図 3-15A)。これは 2 要因 (初期混合率、及び、照射の有無) の影響を調べる実験デザインであり、二元配置分散分析によって、

初期混合率を変えることの効果、照射によって初期混合率に関わらず生じる効果（放射線による細胞死の効果など）、初期混合率と照射の両方によって生じる効果（放射線による細胞競合の効果）の三者を解析した。このデザインによって、初期混合率に関わらず現れる細胞死の効果と、照射された細胞が集団内で少数派である場合にのみ現れる細胞競合の効果と、それぞれ評価することが可能である。

解析の結果、初期混合率の効果は有意であったが、細胞死の効果と細胞競合の効果は非有意であった（図 3-15B 及び C）。この結果は、4Gy という線量は非常に高いにも関わらず、この線量を照射された細胞が集団内で非照射細胞とほとんど同じように 3 週間存続し、細胞死や細胞競合による排除が顕著には働かないことを示している。

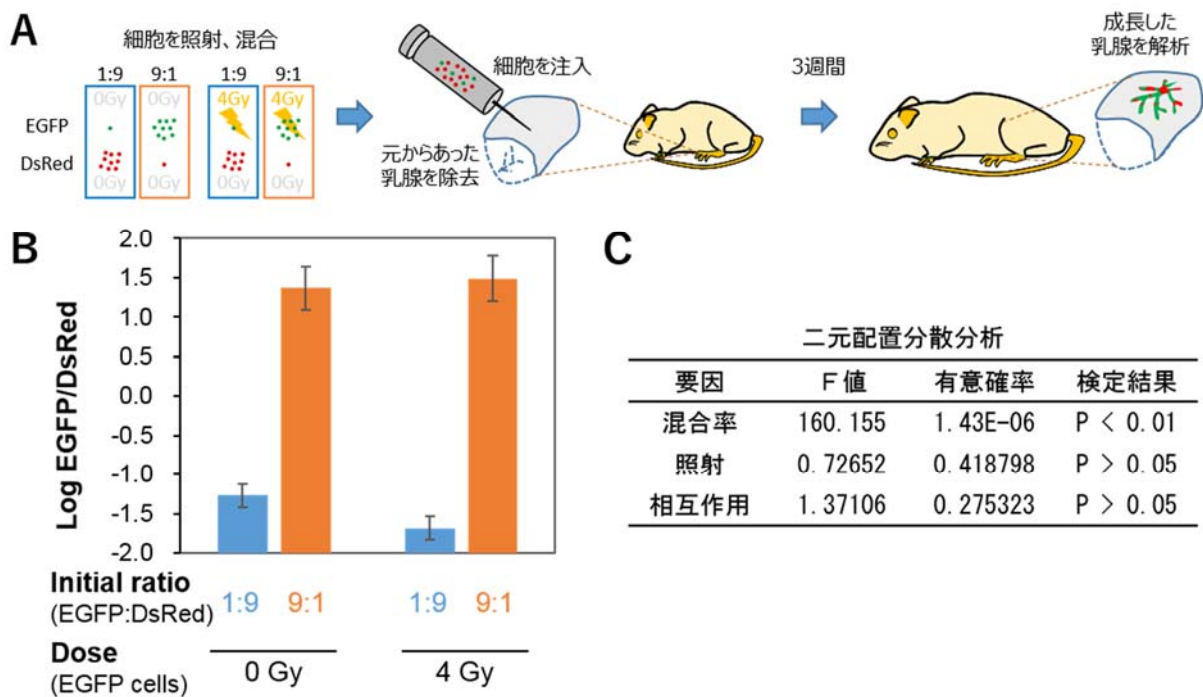


図 3-15 細胞競合実験の結果 A. EGFP 細胞を偽照射もしくは 4Gy で照射した後、EGFP 細胞と DsRed 細胞を 1:9 もしくは 9:1 の混合率で移植した後、再生組織における EGFP 細胞と DsRed 細胞の割合を解析した。B. 再生組織における EGFP 細胞と DsRed 細胞の割合（対数值）のデータの例。N=2-4 視野の平均値と標準誤差。C. B の結果の二元配置分散分析。

同じ系統のラットに 4Gy を照射して移植した 3 週間後の再生率を評価した過去の実験 (Hosoki et al. 投稿準備中) では、再生率は約 10 分の 1 に減少している (図 3-16)。そのため、今回の実験で細胞死の効果が検出されなかったことは予想外であった。

その理由としては、今回の実験では非常に多い細胞数を移植していることが考えられる。過去の実験 (Hosoki et al.) では、再生の有無を鋭敏に評価することが目的であったため、少数の細胞 (10~30 細胞など) を移植した。今回の実験は、再生組織における細胞競合を評価することが目的であるため、再生が確実に起こる細胞数 (50,000 細胞) を移植した。マウスにおける実験で、幹細胞以外の細胞が多く存在する場合には、

他の細胞（前駆細胞等）も乳腺組織の再生に寄与することが報告されている（文献 3）。今回の実験でも前駆細胞等が再生に寄与したと考えられる。

このように考えると、今回の実験において照射による細胞死の効果が検出されなかったことは、幹細胞以外の再生に寄与する細胞（内腔前駆細胞など）が放射線耐性であると仮定すれば説明でき、異常な結果ではないと考えられる。

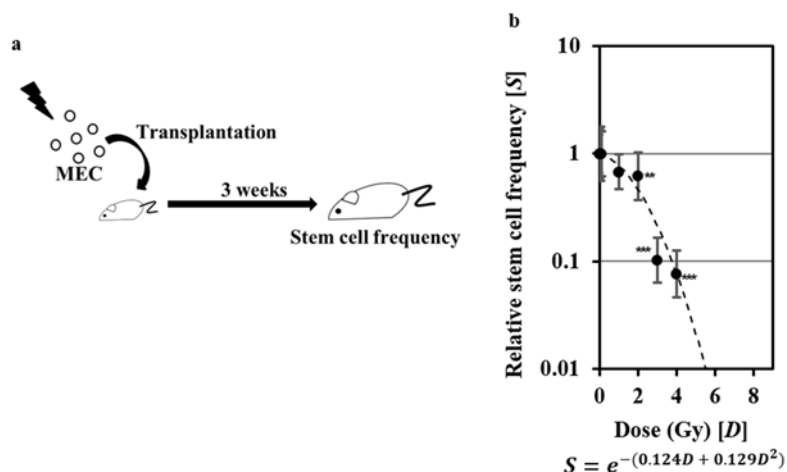


図 3-16 照射後の移植再生実験によって計測される乳腺幹細胞活性の放射線感受性 乳腺細胞を 0.1~4Gy で照射し、10~10,000 細胞を移植した 3 週間後の再生率を調べる実験を行い (a)、その相対値をプロットした (b)。4Gy の照射で再生率は約 10 分の 1 に減少する (Hosoki et al. 投稿準備中論文より引用)。

さらに今回の実験系では、4Gy の照射によっても、顕著な細胞競合が誘導されなかった。乳腺で放射線照射による細胞競合の誘導を解析した実験系はこれまでになく、あるのは造血幹細胞を対象にした Bondar らの実験（文献 2）だけであるので、今回の実験系は非常に新規性の高いものである。同じ実験系で線量を下げても、細胞競合が起こることは期待しにくいと考えられる。この実験系を基盤として、ラットの系統、細胞混合率、さらに長い観察期間等の条件を検討することで、今回得られた知見の一般性を確認することは、今後の重要な課題である。

(3) 3 年間の成果のまとめ

本項目の 3 年間を通した目的は、放射線発がんの線量率効果を考察する上で重要な仮説である「放射線照射された細胞と照射されていない細胞の間に細胞競合が存在する」（ICRP Publication 103; 文献 1）かどうかについて、ラット乳腺発がんの実験系を基にした世界で初めての評価系を構築して、この系で検出する細胞競合の有無を確認することである。

3 年間で達成した事柄をまとめると、以下の通りである。

- 異なる蛍光タンパク質を発現する 2 種類の同系統（LEW 系統）のラット乳腺細胞を

用いて、移植実験によって、両者が混合した乳腺組織をラット体内に形成させることに、世界で初めて成功した。

- ラット乳腺組織を透明化して共焦点蛍光顕微鏡によって三次元的な観察を行うことに世界で初めて成功した。
- 上記二者を組み合わせ、異なる蛍光タンパク質を発現する細胞が混合した乳腺を三次元的に観察し、乳管における混合率を推定する評価系を構築した。
- この評価系を使用し、4Gy 照射された細胞が組織中に 10 分の 1 の割合で存在する場合には、移植後 3 週間経っても、残りの非照射細胞からの細胞競合はまったく受けないか、もし受けたとしてもその程度が非常に小さくて検出が難しいと考えられることを示す結果を得た。
- このことから、現時点では、本研究において構築する数理モデルシミュレーションには、細胞競合を積極的に取り入れる必要性はないと判断した。

本研究の成果に基づき、将来の課題として以下を挙げるができる。

- 本研究で構築された評価系を活用して、ラットの系統、細胞混合率、さらに長い観察期間等の条件を幅広く検討することによって、今回得られた知見の一般性を確認することが、将来の重要な研究課題となる。

参考文献

- 1) Niwa O et al. ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection. Ann ICRP 44(3-4):7-357, 2015.
- 2) Bondar T and Medzhitov R. p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. Cell Stem Cell 6: 309-322, 2010
- 3) Van Keymeulen A. et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance, Nature 479: 189-193, 2011

3.1.1.4 共同研究用試料作製 (H28~H30)

① 目的

ラットの標本を作製し、作製した病理標本を長崎大学に送付する。

② 材料と方法

動物の γ 線照射は、「3.1.1.1 乳腺幹細胞数等の動態評価」の「(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要」の「②材料と方法」の「3) 照射実験」に記載した方法により、高線量率 (30Gy/時) または低線量率 (6mGy/時) で行った。飼育されたラットより採取された甲状腺組織を、ホルマリン中で固定後にパラフィンに包埋した。その後、 $4\mu\text{m}$ の厚さで薄切した組織切片を準備し、脱パラフィン処理後に PBS 中に保存し、冷凍状態で長崎大学に送付した。

③ 結果と考察

予定通りに病理標本の作製を行い、長崎大学に送付した（「3.1.3 甲状腺幹細胞における線量率効果の解析」を参照）。

3.1.2 消化管幹細胞における線量率効果の解析（再委託先：電力中央研究所）（H28～H29）

本項目は、腸管の幹細胞系に着目して、その動態から線量率効果を明らかにすることを目的とする。平成 28 年度は腸管幹細胞の数（消失と補充）、平成 29 年度は増殖を評価した。

（1）平成 29 年度までの実施内容・成果の概要

① 目的

腸管は、放射線発がんにおける主要な標的組織の一つである（文献 1）。腸管の発がんの起源となる細胞は、腸管内のクリプトと呼ばれる場所（図 3-17）に存在して、Lgr5 というマーカー分子の発現によって識別できる、「Lgr5+幹細胞」と呼ばれる組織幹細胞である（文献 2）。以下、Lgr5+幹細胞を、単に幹細胞と呼ぶ。

「細胞系譜追跡法」は、マウス体内において、実験者が注目する細胞に、意図したタイミングで遺伝子組換えを起こし、その細胞及びその子孫に永続的なマーキング（蛍光タンパク質発現など）を施し、一定時間後の状態を追跡する方法である。本項目の実施者らはこの方法を用いて、高及び低線量率で放射線を照射した後の幹細胞とその子孫細胞の動態を評価してきた（文献 3～5）。その結果、マウスの大腸では、高線量率（30Gy/時）被ばくから 2 週間が経過した後、照射によって減少した幹細胞が別の細胞から補充されていること、小腸ではこのような補充の変化は顕著でないことを明らかにした。一方、低線量率（3mGy/時）被ばく後は、大腸でもこのような補充の変化が見られない（すなわち線量率効果がある）ことを報告した。

本研究では、この線量率効果がどのように生じるのかを理解するため、被ばく後の早い時点における幹細胞の数、補充、増殖状態を解明することを目的とした。

② 材料と方法

1) 腸管幹細胞の細胞系譜追跡（原理）

幹細胞数に及ぼす影響の評価には、細胞系譜追跡法の原理を利用した。これには、以下の 2 種類の遺伝子組換えマウスを用いた。マウス①（Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2）は、Lgr5 を発現する幹細胞の一部で EGFP と CreERT2 を同時に発現する（図 3-17 左）（CreERT2 は、タモキシフェンという薬剤が結合すると核内に移行し、DNA 内の loxP と呼ばれる配列を切断してつなぎかえる酵素である）。マウス②（ROSA26-LSL-tdTomato。LSL は「loxP-終止コドン-loxP」）は、そのままでは何も起こらないが、CreERT2 が働いた細胞内でのみ、loxP 配列で挟まれた終止コドンが組換えによって消失し、赤色蛍光タンパク（tdTomato）が発現する。これらを交配して両方の遺伝子を持つマウスを作製すると、タモキシフェン投与によって、投与時に存在する幹細胞が tdTomato を発現するようになり（標識され）、その子孫細胞も同じように tdTomato で標識される（図 3-17 中央）。なお、投与時には幹細胞でなかった細胞が、時間をおいて幹細胞に変わったとしても、tdTomato では標識されない（図 3-17 右）。

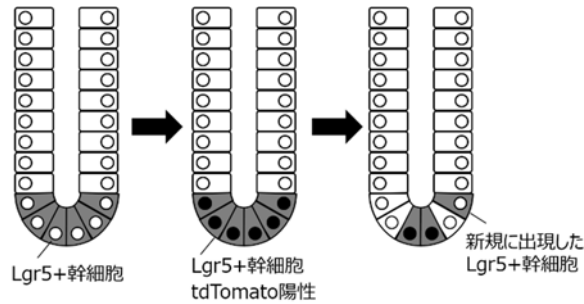


図 3-17 腸管クリプトの幹細胞数への影響評価法 (左) Lgr5 を発現する幹細胞は EGFP (緑色蛍光タンパク) 及び CreERT2 も発現する (灰色の細胞)。(中央) タモキシフェンを投与すると、幹細胞の DNA に組換えが起こり tdTomato (赤色蛍光タンパク) を発現する (黒い丸)。(右) その後、照射時から存在する幹細胞は EGFP (灰色) と tdTomato (黒) を両方を発現する細胞として、新規に出現した Lgr5+幹細胞は EGFP を発現するが tdTomato を発現しない細胞として、それぞれ識別される。

2) 腸管幹細胞数に対する放射線影響の評価

Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 と ROSA26-LSL-tdTomato の交配により作製したマウス (オス 13~22 週齢) に 4-ヒドロキシタモキシフェン (投与されたタモキシフェンは肝臓で 4-ヒドロキシタモキシフェンに代謝されてから作用することから、代謝の速度に影響されないために 4-ヒドロキシタモキシフェンを投与した。) を体重 40g あたり 3mg ずつ投与し、24 時間後に X 線 (線量率 3 あるいは 30Gy/時、累積線量 1Gy) を照射した。照射終了の 3 日後に解剖し、小腸 (十二指腸) 及び大腸を摘出した。摘出した腸管は、氷冷 50mM EDTA/PBS に浸漬してクリプトを単離し、4%パラホルムアルデヒド中性緩衝液で固定した。解析時にクリプトを単一細胞に分散し、フローサイトメーター (MoFlo Astrios-EQ, ベックマンコールター社製) を用いて各細胞の蛍光強度を測定した。

3) 腸管幹細胞の増殖に対する放射線影響の評価

幹細胞の増殖状態は、細胞が DNA を合成する時 (S 期) に取り込む EdU と、細胞が分裂する時 (M 期) に発現する分裂期マーカー PH3 の両方で評価した。Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 マウスに低線量率放射線 (3mGy/時、累積線量 0.1 Gy) を照射し、照射終了後、直ちに 50mg/kg 体重の EdU を単回腹腔内投与し、様々な経過時間後に解剖した。採取した小腸及び大腸から、氷冷 50mM EDTA/PBS 処理でクリプトを単離し、TrypLE Express 溶液で単一細胞に分散して、4%パラホルムアルデヒド緩衝液に 37°C で 10 分間、続いて 70%エタノールに 4°C で 1 時間浸漬して固定した。次に 0.5% TritonX-100 含有 PBS 中で 4°C、30 分振盪し、フローサイトメーター用バッファー中に保存した。その後、Click-iT Plus EdU Alexa Flour 647 Flow Cytometry Assay Kit (ThermoFisher 社) で EdU を染色し、最後に AF546 標識 PH3 抗体 (Ser10, CST) で染色して、フローサイトメーターで解析した。

③ 結果と考察

1) 腸管幹細胞数に対する放射線影響

平成 28 年度は、様々な線量率の放射線が幹細胞の数にどのような影響をもたらすかを評価する実験を行った。幹細胞が tdTomato で標識された時点で放射線を照射し、標識された幹細胞の集団と新規に出現した幹細胞の集団の量的関係から、照射によって増えた幹細胞の分画と減った幹細胞の分画の割合を明らかにした (図 3-18)。

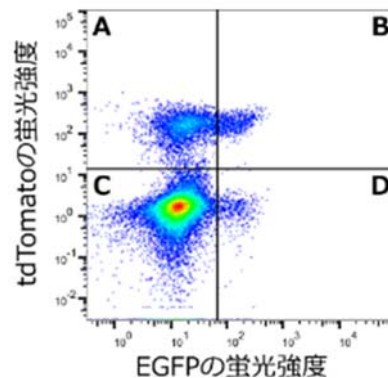


図 3-18 幹細胞と子孫細胞の蛍光分布 フローサイトメーターで取得した EGFP の蛍光強度を横軸に、tdTomato の蛍光強度を縦軸にとり、各細胞の蛍光強度の分布をまとめたもの。大部分の細胞はタモキシフェン投与時に分化細胞であるため、蛍光を持たない (分画 C)。幹細胞 (EGFP 陽性である分画 B 及び D) のうち、タモキシフェン投与時に幹細胞であったものは分画 B (tdTomato 陽性) に現れる。tdTomato 標識された幹細胞が分化して幹細胞でなくなると分画 A に現れる。タモキシフェン投与時には幹細胞でなく、その後新たに幹細胞になったものは、分画 D に現れる。青～赤の色はプロット上の細胞密度を低い方から高い方へと表示したもの。

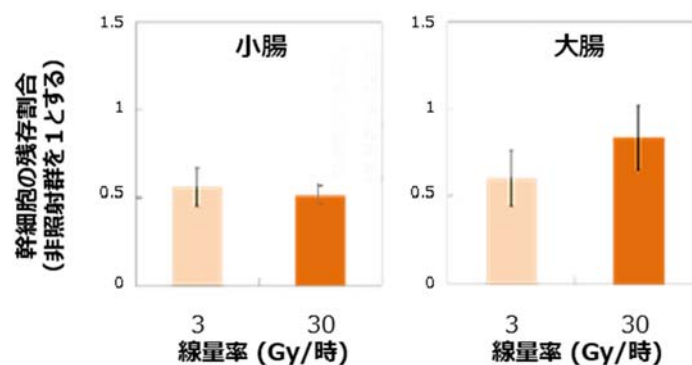


図 3-19 放射線 1Gy を異なる線量率で被ばくした 3 日後の腸管幹細胞の残存 縦軸は幹細胞数 (図 3-18 の分画 B 及び D の割合の合計) の非照射群に対する比 (各群 n=2~3)。

フローサイトメーターで得られたデータ (図 3-18) において、全体に対する分画 B と分画 D の合計の割合を幹細胞の数の指標とし、照射した場合の残存割合 (放射線を照射

しない場合を 1 とする。) を図 3-19 に示す。小腸及び大腸のいずれにおいても、1Gy の照射後 3 日目で幹細胞が減少していた。大腸の場合、高線量率照射の方が残存した幹細胞が多い傾向が見られた。

これが、大腸において幹細胞の補充が効率よく起こった結果なのかを確かめるため、新たに出現した (=補充された) 幹細胞 (図 3-18 の分画 D) の割合を表したのが図 3-20 である。30Gy/時で照射した 3 日後、幹細胞の補充は、小腸では半減するが、大腸では非照射時のレベルを保っていた (図 3-20)。3Gy/時での照射の影響は顕著でなかった (図 3-20)。

上述の通り、この実験系では、30Gy/時で 1Gy 照射後 2 週間までに大腸では幹細胞が補充され、小腸や低線量率照射後には補充は顕著でない (文献 3~5)。これと今回得られた知見を総合すると、小腸では、30Gy/時で照射した後、少なくとも 3 日までに幹細胞の補充が抑制されるため、2 週間後の時点で補充が顕著でなかったと考えられる。一方、大腸では 30Gy/時で照射後も補充が抑制されずに継続しているため、2 週間後には顕著な補充が見られたと考えられる。これは、今回の実験で初めてわかったことである。一方、線量率を 3Gy/時に下げた場合、3 日後までに幹細胞は減少するが、幹細胞補充の変化は明確でなく、低線量率での 2 週間後の変化を説明する知見は得られなかった。

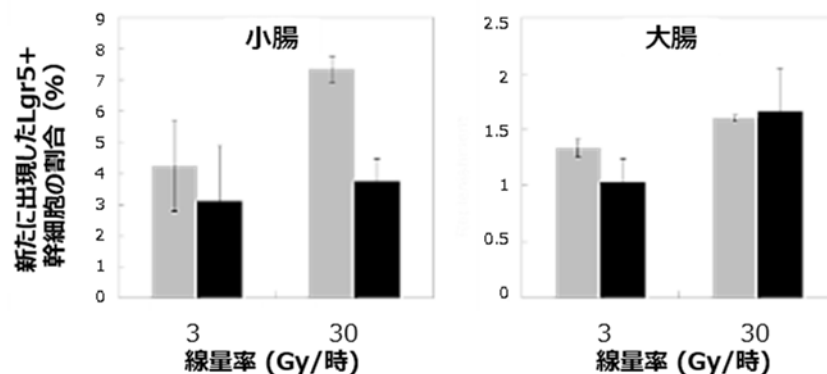


図 3-20 新たな幹細胞の出現 (幹細胞の補充) タモキシフェン投与 3 日後。灰色 : 非照射コントロール、黒色 : 1Gy 照射群。縦軸は EGFP 陽性 /tdTomato 陰性細胞 (図 3-18 の分画 D) の割合 (各群 n=2)。

2) 腸管幹細胞の増殖に対する放射線影響

平成 29 年度は、幹細胞の増殖状態を解析した。腸管幹細胞の増殖状態は、組織切片上の EdU・PH3 両陽性細胞 (すなわち一定時間の間に DNA 合成と細胞分裂を行った細胞) の数の時間推移によって評価した先行研究 (文献 6) を基にした。ただし、先行研究のように組織切片で評価する方法を用いると、少数の細胞しか調べられないため、照射によって幹細胞数が変動した場合に効率的にデータを取得することが困難であることが予想された。そこで、多数の細胞を解析できるフローサイトメーターを用いて評価する実験系を新たに構築した。EdU 及び PH3 染色した単離細胞の蛍光強度を測定した代表例を図 3-21 に示す。EdU 投与 3 時間後の非照射マウスの場合、EGFP 陽性細胞は全体の 9.4%

(図 3-21A)、そのうち 0.55%が EdU・PH3 両陽性細胞であった(図 3-21B)。投与後に血液中に存在する EdU 量は半減期約 30 分(文献 7、8)で迅速に減少するため、6~50 時間後に検出される EdU は、投与直後に幹細胞に取り込まれ保持されたものである。

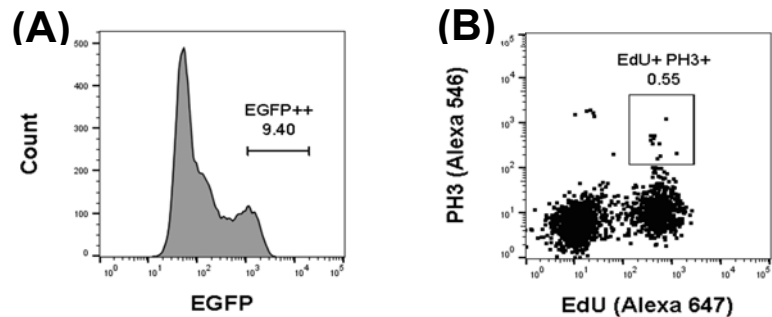


図 3-21 Lgr5+幹細胞の増殖状態の解析例 EdU をマウスに投与し、3 時間後に小腸クリプト細胞を解析した。(A)EdU 及び PH3 染色を行った小腸クリプト細胞の EGFP (Lgr5 の発現の指標) の蛍光強度(横軸)とその頻度(縦軸)。EGFP 強度の高い分画(EGFP++)が Lgr5+幹細胞である。(B)EGFP++分画に対して EdU (横軸)と PH3 (縦軸)の蛍光強度をプロットし、両陽性分画(グラフ中では EdU+ PH3+)の細胞の割合を評価した。

高線量の照射で幹細胞の増殖が停止することはわかっているため、今回はこの実験系で、0.1Gy の低線量率(3mGy/時)照射が幹細胞の増殖状態にどのような影響をもたらすかを評価した。照射した直後のマウスに EdU を投与し、6~50 時間後の小腸及び大腸クリプトにおける幹細胞中の EdU 陽性割合を解析した(図 3-22)。小腸幹細胞の EdU 陽性割合は投与後の時間経過に伴い減少したが、この減少は、細胞分裂によって子孫細胞に分配されていくことで EdU が減少し、検出限界以下になったことを反映する。照射の影響はほとんどなかった。

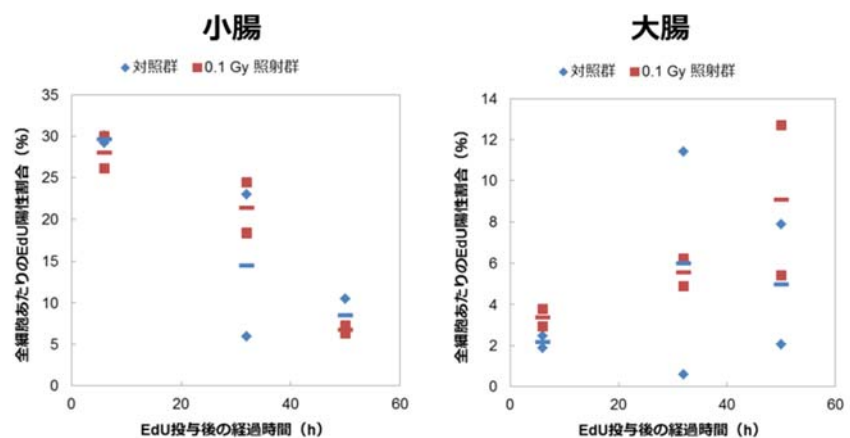


図 3-22 低線量率放射線 0.1Gy 照射後の腸管幹細胞の EdU 陽性の割合 横棒(—)は平均値、◆(非照射群)及び■(照射群)は各測定値。

一方、大腸においては6時間後に幹細胞で検出されるEdUは小腸より一桁程度少なかった。これは大腸幹細胞の細胞周期が小腸より遅いためであると考えられる。大腸では、時間経過に伴うEdU陽性割合の変化は、データの個体差と比べて顕著ではなく、これも細胞周期が遅いことを反映していると考えられた。照射の影響も、個体差の方が大きく、ほとんど見られなかった。

次に、幹細胞のうち、EdU・PH3両陽性であった細胞の割合を解析した(図3-23)。小腸においてはこの割合は時間経過とともに減少したが($P < 0.001$)、これはDNA合成から細胞分裂までの時間が6時間後程度の幹細胞が最も多いことを意味する。大腸においてはDNA合成から細胞分裂までの時間はもっと広い範囲に分布した。小腸では0.1Gyの低線量率照射による影響はほとんどなく、大腸では分布が変化する傾向がややあるものの、有意ではなかった。

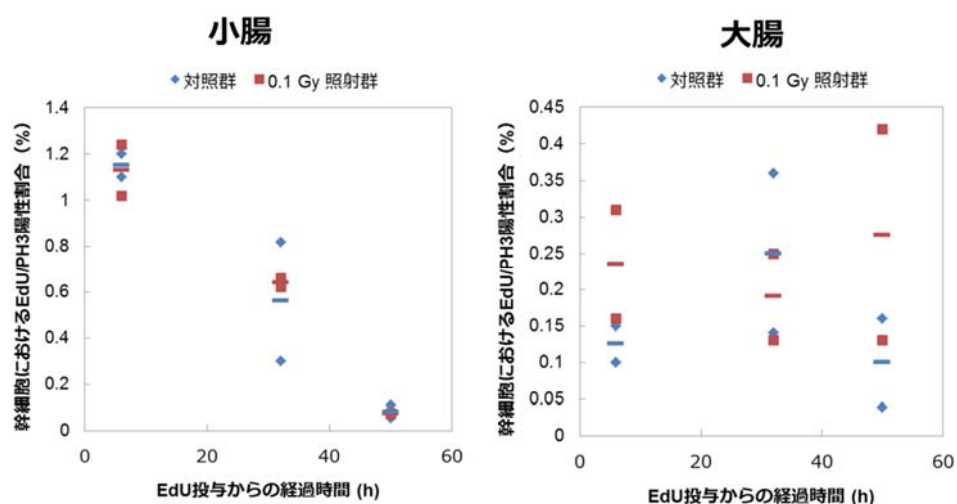


図3-23 低線量率放射線0.1Gy照射後の腸管幹細胞のEdU/PH3両陽性細胞の割合。横棒(—)は平均値、◆(非照射群)及び■(照射群)は各測定値。

以上のように、マウス個体における腸管幹細胞の増殖状態を大量の細胞を用いて解析する評価系を新たに構築し、低線量放射線の影響を評価する実験を行うことができた。0.1Gyの低線量率照射の影響は小腸、大腸ではほとんど見られなかった。

(2) 平成30年度の実施状況

平成29年度に再委託先であった電力中央研究所は、平成30年度において委託業務を継続実施することができなくなったため、平成28年度、平成29年度の消化管での成果を踏まえて、本業務を「乳腺幹細胞系の分化への影響評価」に変更し、電力中央研究所担当予定であった「消化管細胞における線量率効果の解析」業務を補完した。

なお、これは平成29年度までに本項目を担当した研究者が、腸管幹細胞をテーマとする米国の研究室への海外留学の機会を得たことに伴うものである。本事業の推進においても2年間活躍した人材が関連研究における飛躍の機会を獲得したことは、人材育成

の観点から大変望ましい成果である。

(3) 2年間の成果のまとめ

放射線照射された組織においては、線量率に応じて幹細胞系の細胞数や増殖に動態変化が生じると考えられ、発がんはその後から開始する。

高線量率 (30Gy/時) で細胞系譜追跡マウスを 1Gy 照射して 2 週間が経過した後において、大腸では照射によって減少した幹細胞が別の細胞から積極的に補充された痕跡があるのに対し、小腸や低線量率 (3mGy/時) 被ばく後の大腸ではこのような補充の変化が顕著でない (文献 3~5)。本研究では、この線量率効果がどのように生じるのかを理解するため、被ばく終了後の早い時点 (数日後程度) における幹細胞の数、補充、増殖状態を解明することを目的とした。

2年間で達成した事柄をまとめると、以下の通りである。

- マウスの腸管において、30Gy/時で照射後に、大腸幹細胞の補充は抑制されずに続くが、小腸幹細胞の補充は抑制されることを、初めて明らかにした。
- マウスの腸管の幹細胞の増殖動態の高効率に評価する新しい系を初めて構築し、3mGy/時で 0.1Gy 照射した後の 2 日間で、小腸、大腸の幹細胞の増殖は照射の影響を顕著には受けないことを示唆する結果を得た。

以上を総合すると、小腸においては、照射の 2 週間後に幹細胞が補充されていないが、その少なくとも一部は、照射 3 日後までに幹細胞の補充が抑制されることで説明される。大腸においては、30Gy/時で 1Gy 照射した 3 日後、幹細胞の補充は抑制されずに継続し、これが 2 週間後に見られる補充を説明する。線量率が低い時に 2 週間後に顕著な補充が見られないメカニズムは、3 日後の観察結果からは説明できず、3 日以降、2 週間までの中間の時点で観察する必要があることが示唆された。

本研究の成果に基づき、将来の課題として以下を挙げることができる。

- 幹細胞の減少、補充、増殖動態の知見に基づいた腸管の数理モデルを構築し、ヒト腸管に適用できる数理モデル用パラメータ情報を収集して、これらの数理モデルによって動物発がん実験や疫学データを統一的に解釈すること。

参考文献

1. ICRP, The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection (ICRP Publication 103). Ann ICRP 37, 2-4, 2007.
2. Barker N et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature 449, 1003-7, 2007.
3. Otsuka K et al. Ionizing radiation leads to the replacement and de novo production of colonic Lgr5+ stem cells. Radiat Res 179, 637-646, 2013.
4. Otsuka K and Suzuki K. Differences in radiation dose response between small

- and large Intestinal crypts. *Radiat Res* 186, 302-314, 2016.
5. Otsuka K and Iwasaki T. Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing. *J Radiat Res* 56, 615-622, 2015.
 6. Schepers AG et al. Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J* 30, 1104-1109, 2011.
 7. Cheraghali AM et al. Bioavailability and pharmacokinetic parameters for 5-ethyl-2'-deoxyuridine. *Antiviral Res* 25, 259-267, 1994.
 8. Cheraghali AM et al. Pharmacokinetics and bioavailability of 5-ethyl-2'-deoxyuridine and its novel (5R,6R)-5-bromo-6-ethoxy-5,6-dihydro prodrugs in mice. *Drug Metab Dispos* 23, 223-226, 1995.
 9. Myant KB et al. ROS production and NF- κ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cells proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell* 12, 761-773, 2013.

3.1.3 甲状腺幹細胞における線量率効果の解析（再委託先：長崎大学）（H28～H30）

本項目は、甲状腺の幹細胞系に着目して、その動態に対する線量率効果を明らかにすることを目的とする。平成 28 及び 29 年度は、甲状腺の幹細胞系の動態を評価するための基盤となる実験条件の最適化を行い、平成 30 年度に DNA 損傷動態及び増殖の定量的評価を実施して、線量率効果を解析した。

(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要

① 目的

本項目では、甲状腺幹細胞及び分化（成熟）細胞において、高線量率、低線量率照射後の DNA 損傷及び増殖の動態を定量的に評価し、線量率効果を解明することを目指した。平成 28 及び 29 年度は、幹細胞・分化細胞の識別マーカー及び細胞動態マーカーの免疫蛍光染色の条件の最適化、DNA 損傷解析及び細胞増殖解析の条件の最適化等を行って、甲状腺の幹細胞系の動態変化を評価するための基盤を構築した。

② 材料と方法

「3.1.1.4 共同研究用試料作製」で長崎大学に送付された試料を、蛍光免疫染色による検討に用いた。甲状腺組織標本は、解凍後に、95°Cのウォータバスインキュベータ中で抗原の賦活化処理を行い、その後、5%スキムミルク含有 TBS-T に希釈した一次抗体と 37°Cで 2 時間反応させた。反応終了後、PBS で洗浄し、同様に希釈した二次抗体（AF488、AF555 あるいは AF647 標識した抗ウサギあるいはマウスイムノグロブリン G 抗体）と 37°Cで 1 時間反応させた。標本は、1 μ g/mL DAPI 含有 10%グリセリン PBS 溶液中に封入し、蛍光顕微鏡（DM-6000B、ライカ社）で観察及びデジタル画像取得を行った後、画像解析システム（FW4000、ライカ社）で解析した。

③ 結果と考察

1) 幹細胞・分化細胞識別の最適化

甲状腺は、濾胞（ブドウの房状の構造体）が密に集合した構造である。出生前までに活発な細胞増殖を行うが、出生後はほとんど細胞増殖が見られない（＝組織代謝回転が低い）。実際、甲状腺の濾胞上皮細胞の大半は成熟細胞（分化マーカーであるサイログロブリンを発現する細胞）である。そのため、組織幹細胞が存在するとすれば、ごく少数のサイログロブリン陰性細胞がその候補になる。組織幹細胞と分化細胞を識別するためにサイログロブリンを蛍光免疫染色する条件を最適化した。市販のサイログロブリン検出用抗体 6 種類を用いて、ラットホルマリン固定パラフィン包埋標本への交差性を確認した。検出のための蛍光色素については、自家蛍光色との重なりが大きい緑色の使用を避け、AF555（赤橙色蛍光、取得画像は赤色で表示）あるいは AF647（遠赤色光、取得画像は緑色で表示）の使用を検討した。その結果、2 種類の抗サイログロブリン抗体において、AF555 及び AF647 の蛍光シグナルの確認に成功した（図 3-24）。予想通り、シグナルは濾胞細胞（特に内腔側）に検出された。他の抗体では全くシグナルが得られなかったため、この 2 種類の一次抗体を今後の検討で使用することにした。

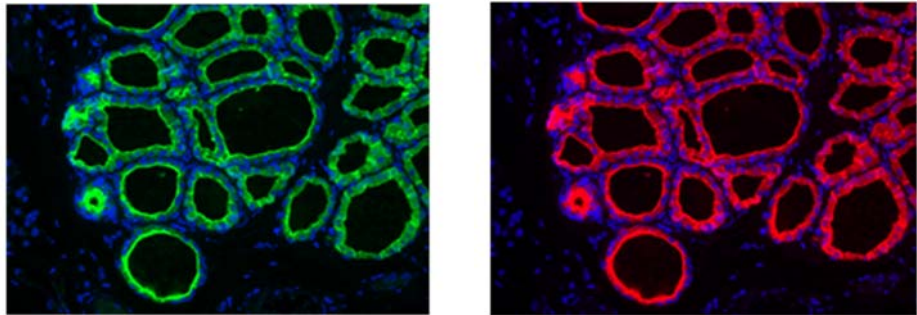


図 3-24 蛍光免疫染色による分化細胞マーカー（サイログロブリン）の検出 ラット甲状腺組織から作成した組織切片において、様々な抗サイログロブリン抗体を用いて、甲状腺濾胞細胞におけるサイログロブリンの発現を検討した。左図は抗サイログロブリン抗体クローン 2H11（蛍光色素は AF647）、右図は抗サイログロブリン抗体クローン EPR9730（蛍光色素は AF555）による染色結果。

2) 細胞動態解析の最適化

組織幹細胞は、分化マーカーを発現しておらず、組織障害が起こった際には、組織修復に関与するため、細胞増殖活性を有すると考えられる。そこで、細胞動態を解析するために、増殖細胞において DNA 複製の際に DNA 中に取り込まれるチミジン類似体 EdU を検出する条件を検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片において、アジ化化合物（蛍光物質で標識されたもの。エチニル基と特異的に反応する。）を銅イオン存在下で反応させ、細胞核内の EdU のエチニル基に蛍光物質（AF488 もしくは AF594）を共有結合させる条件の最適化を行った。特に、反応の触媒に用いる銅イオンが、その後の抗体反応を阻害することがわかったため、銅イオン濃度の詳細な検討を実施し、低濃度の銅イオン存在下で EdU を効率的に検出する条件を決定した。

3) 幹細胞及び分化細胞の時空間的解析

幹細胞及び分化細胞の時空間的動態を、最適化した条件により解析した。その結果、照射前には、全ての濾胞細胞でサイログロブリンの発現が認められた（図 3-25）。上述のように、もし甲状腺組織内に幹細胞が存在するとしたら、その細胞は分化マーカーを発現しないと推察される。興味深いことに、EdU 陽性の増殖細胞においても、サイログロブリンの発現が確認された。

これに対し、照射後は、サイログロブリンの発現が低下した濾胞が散在して認められた（図 3-25 右）。サイログロブリン量の低下は、分化細胞の機能障害を意味する。そこで、甲状腺濾胞細胞でサイログロブリン遺伝子の発現を制御することが知られる転写因子の発現について検討した。すると、この転写因子の発現も、非照射の場合には全ての細胞で認められたが、照射後 7 日目には多くの濾胞で認められなくなった。この機能障害を補うために、EdU 陽性細胞のような甲状腺前駆細胞の増殖・分化が促進されることが考えられた。

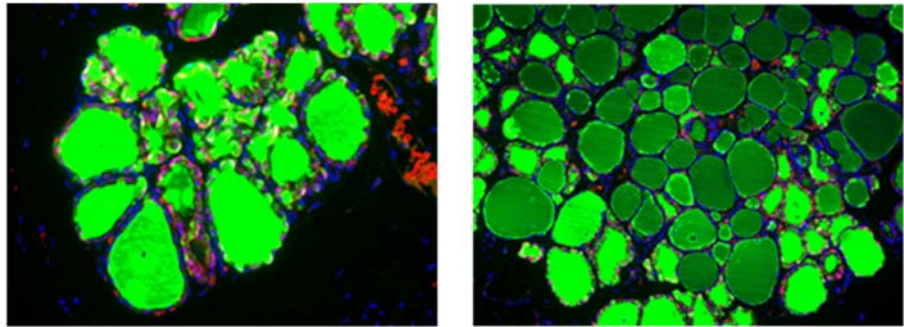


図 3-25 放射線照射後のサイログロブリン発現の時空間的变化 ラット甲状腺の組織切片において、蛍光免疫染色により、濾胞細胞におけるサイログロブリンの発現を検討した。左：非照射。右：4Gy 照射後 7 日目（緑色シグナルの低下は、サイログロブリンの発現低下を示す）。

甲状腺濾胞細胞のすべての細胞が分化マーカーであるサイログロブリンを発現する観察結果と、甲状腺で EdU を取り込む増殖細胞がこの分化マーカーを発現しているという結果から、甲状腺組織中には、典型的な組織幹細胞は存在しないことが明確になった。つまり、甲状腺組織内には、分化形質を有する成熟細胞が、同時に増殖性をも合わせ持つという、多様な組織の中では他に例のない、極めてユニークな性質を持つ組織であることが明らかになった。このような甲状腺濾胞細胞の性質は、線量率効果を評価する上で、極めて重要な意味を持つ。なぜならば、甲状腺においては、分化し機能を有する成熟細胞でさえ、発がんリスクの標的細胞になりうることを意味しているからである。

4) DNA 損傷及び細胞増殖の解析条件の最適化

甲状腺の濾胞細胞に、放射線照射後に組織障害が起こった際には、組織修復に関与するため、細胞増殖が亢進すると考えられる。EdU 投与時期に依存しない増殖細胞の検出のため、細胞増殖マーカーである Ki-67 を指標にした蛍光染色法を確立し、照射後の細胞増殖の評価を可能にした。

一方、放射線による細胞障害には、重篤な致命的損傷として知られる DNA 二重鎖切断が関わっている。DNA 二重鎖切断のマーカーの一つに 53BP1 フォーカス（フォーカスとは点状の集積のこと。）がある。53BP1 タンパク質は、普段は核質内に均質に分布しているが、DNA 二重鎖切断が生じると、切断の周辺に集積して巨大なタンパク質複合体を形成する。この複合体には、53BP1 以外にも、DNA 損傷応答に係わる数種類のタンパク質が共局在し、これらが情報を伝達することで、DNA 損傷情報を増幅する。53BP1 フォーカス数は、DNA 二重鎖切断数とも相関するため、DNA 二重鎖切断のマーカーとして γ H2AX フォーカスと共に広く用いられる。そこで、上述のように EdU 検出過程における銅イオンによる抗体反応の阻害を念頭に、53BP1 フォーカス検出の条件を検討した。抗 53BP1 抗体として、マウス及びウサギ由来の抗体を検討した結果、ウサギ由来抗体の検出感度が極めて高く、銅イオン存在下でも 53BP1 フォーカスを検出可能であることが明らかになり、これを用いることに決定した。

(2) 平成 30 年度の実施内容・成果の概要

① 目的

これまで最適化を行ってきた評価系を用いて、甲状腺において、高線量率、低線量率照射後の DNA 損傷動態及び増殖停止による細胞死動態の定量的評価を実施した。これによって、低線量率照射後の DNA 損傷が、高線量率照射後の DNA 損傷動態と線量率の違いによって説明できるかどうか、増殖停止が高線量率と低線量率で同じように起こるかどうかを、それぞれ調べた。

② 材料と方法

「3.1.1.4 共同研究用試料作製」で長崎大学に送付された試料を用い、「(1) 平成 29 年度までの実施内容・成果の概要」の「②材料と方法」に記載された方法で蛍光免疫染色を行った。定量的解析は、DAPI により染色された細胞核の数を指標に、細胞あたりの陽性数あるいは陽性頻度を算出することにより実施した。

③ 結果と考察

1) DNA 損傷動態の解析

放射線の影響は、放射線エネルギーの吸収により DNA 損傷が誘発されることが起点となる。甲状腺の濾胞細胞において DNA 損傷動態を解析するために、53BP1 フォーカスの個数を指標として、DNA 損傷のレベルを評価した。照射後には、53BP1 フォーカス（赤い斑点状のシグナル）が観察された（図 3-26）。

甲状腺幹細胞と成熟細胞の区別には、引き続きサイログロブリンとの二重染色も実施したが、平成 29 年度の検討と同様に、EdU 陽性細胞も含め、照射前にはすべての細胞がサイログロブリンを発現していた。そこで、分化してサイログロブリンを発現している成熟細胞も、発がんリスクの標的細胞になりうると判断し、全ての甲状腺濾胞細胞において、53BP1 フォーカスの検討を実施した。

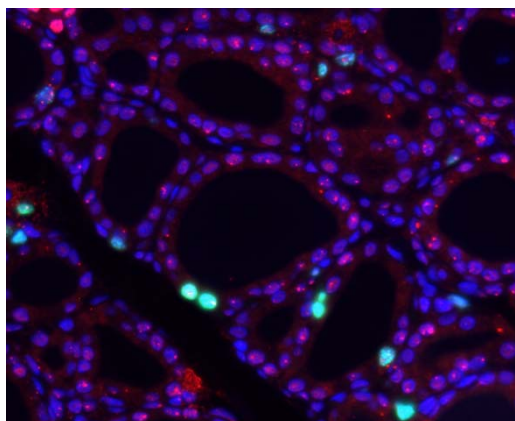


図 3-26 放射線照射により誘導された 53BP1 フォーカス 青：DAPI（細胞核）。赤：53BP1（斑点状のものはフォーカス。核質全体に薄く染まるものはフォーカスを形成していない 53BP1）。シアン色：EdU 陽性細胞（緑）と DAPI（青）が重なったもの。

誘発された DNA 損傷は、一般に、細胞が持つ DNA 損傷修復活性により修復される。照射後初期の数時間の修復動態は早く、一般的には、照射 6 時間後までに初期に生成した DNA 損傷は 10 分の 1 程度にまで修復される。その後は、残存した DNA 損傷は徐々に修復されるが、4Gy では通常、修復されずに残存する DNA 損傷が認められる。連続照射では、DNA 損傷の生成と修復が同時に起こっており、DNA 損傷の動態を観察しにくい。そこで、初めに、非照射と高線量率 4Gy 照射後の DNA 損傷の動態を解析した (図 3-27)。その結果、非照射で少し見られる 53BP1 フォーカスと比べ、照射 1 日後では、細胞当たりのフォーカス数が非照射時の約 0.1 個から約 0.45 個に増加 (増分は約 0.35 個) しており、DNA 損傷の誘発が確認された (図 3-27 左の矢印)。その後、フォーカス数は徐々に減少したが、2 及び 3 日後にも約 0.2 個が増分として残っていた (半減期 1~2 日)。このようなフォーカスは、非常に修復が困難な DNA 損傷が残存していることを反映すると考えられている (文献 1)。興味深いことに、照射 7 日後では、修復困難な損傷と考えられるフォーカスの数もさらに減少し、非照射と同等になった (図 3-27)。照射 3 日後までに修復されなかった修復困難な DNA 損傷が、その後全て修復されるとは考えにくいため、DNA 損傷修復というよりは、組織の代謝 (損傷を持つ細胞の除去) によって、損傷を持つ細胞が組織から脱落するため、照射前のレベルに戻ったと考察される。

続いて、4Gy を高線量率 (30Gy/時) あるいは低線量率 (6mGy/時) で照射した場合の DNA 損傷について検討した。照射の方法は図 3-3 の通りである。上述の通り、低線量率照射の場合は、照射中に DNA 損傷がゆっくりと発生すると同時に、その修復も常時起こっており、高線量率実験と同様の修復の過程を見ることは難しい。そこで今回は、高線量率もしくは低線量率で照射終了後、7 週齢の時点の DNA 損傷の残存状態を比較した。その結果、3~7 週齢で低線量率照射した後の細胞当たりのフォーカス数は約 0.025 個上昇していることが明らかになった (図 3-27 右の矢印)。

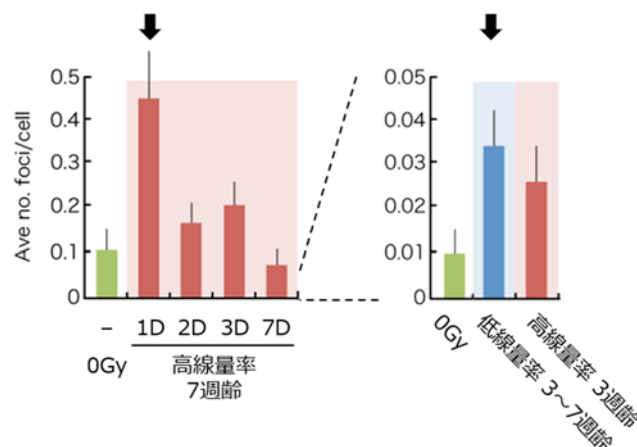


図 3-27 53BP1 フォーカスによる DNA 損傷評価 左: 7 週齢で高線量率照射 (30Gy/時、4Gy) 後。右: 3 週齢から低線量率照射、もしくは 3 週齢で高線量率照射し、7 週齢で解析。緑色は非照射、赤色は高線量率照射、青色は低線量率照射 (6mGy/時) (4 匹の平均と SD)。D は日。

高線量率 (30Gy/時) で 4Gy 照射した 1 日後のフォーカス数の増加量が、今回の実験結果のように細胞当たり約 0.35 個であるとすると、低線量率照射中 (6mGy/時、すなわち 1 日の線量は 144mGy で、4Gy の 28 分の 1) の DNA 損傷の増加速度 (d とする) は、1 日あたりで約 0.01 個 ($\cong 0.35/28$) でしかない。DNA 損傷の修復速度 (r とする) が、今回の照射 3 日後までのデータで見られたように半減期 1~2 日程度 (例えば 1.5 日) であると、照射によって損傷が増える効果と、修復によって減る効果がつり合った平衡状態になり、損傷量は一定になる。高線量率照射後 t 日目の DNA 損傷量 (フォーカス数) $D_H(t)$ 、低線量率照射開始後 t 日目の DNA 損傷量 (フォーカス数) $D_L(t)$ は、微分方程式によってそれぞれ、

$$dD_H/dt = -rD_H$$

$$dD_L/dt = -rD_L + d$$

のように定式化でき、これを解析的に解くと、

$$D_H(t) = D_{H0} \exp(-rt)$$

$$D_L(t) = (d/r)[1 - \exp(-rt)]$$

(ただし、 $D_{H0} = 0.35$ 、 $r = 0.693/1.5$ 、 $d = 0.35/28$ 程度)

となる。すなわち、低線量率照射中の平衡状態 ($\exp(-rt) \cong 0$ となる時) のフォーカス数は、細胞当たり $d/r = 0.03$ 個程度にすぎないと予想される。実際、低線量率照射後に観察された DNA 損傷レベルは、細胞あたりフォーカス 0.025 個程度であり (図 3-27 右の矢印)、上記の計算による約 0.03 個とほぼ一致する。これに対し、高線量率での照射実験の結果では、4Gy 照射による正味の増加分は、照射 1 日後で 0.35 個程度であった (図 3-27 左の矢印)。つまり、同じ 4Gy による誘発でも、細胞あたりに蓄積する DNA 損傷レベルには顕著な違いが観察され、このことから、DNA 損傷動態には明らかな線量率効果が存在すると結論できる。

なお、高線量率で 3 週齢で 4Gy 照射した 4 週間後にも、DNA 損傷の増加 (細胞当たりフォーカス 0.015 個程度) が観察された (図 3-27 右)。照射から時間を経て現れる DNA 損傷の誘導は、ゲノム不安定性が増加したことを表すと解釈できる。このような効果が、低線量率照射後にも生じるかどうかは、今回の実験から提出された、今後の課題である。また、今回の実験では、想定に反して実験間で非照射群の DNA 損傷が 1 桁程度異なっており、一つの限界となっている。

2) 細胞死と増殖停止の動態の解析

放射線照射後に誘発される細胞死を検出するため、まず、代表的な細胞死の様式であるアポトーシスの誘導を予備的に検討した。アポトーシスは、造血系細胞等で放射線照射後に観察される細胞死の様式で、早い場合は、照射後数時間から DNA の断片化とともに核の断片が顕在化し、最終的には、細胞全体が小片に分断して細胞死が起こる。このため、組織中にアポトーシスが生じた場合には、DAPI による細胞核の染色によって検出される断片化核により判定できる。その結果、高線量率、低線量率の照射の後、甲状腺濾胞細胞の核の断片化を伴うアポトーシスは全く観察されなかった。以上の結果が

ら、放射線照射後に誘導される細胞死は、非アポトーシス性の、老化様細胞死である可能性が高いと考えられる。別の細胞死の様式である老化様細胞死は、不可逆的な細胞増殖停止であり、細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現を指標に解析できる。そこで、Ki-67 を指標として細胞増殖停止について検討した。

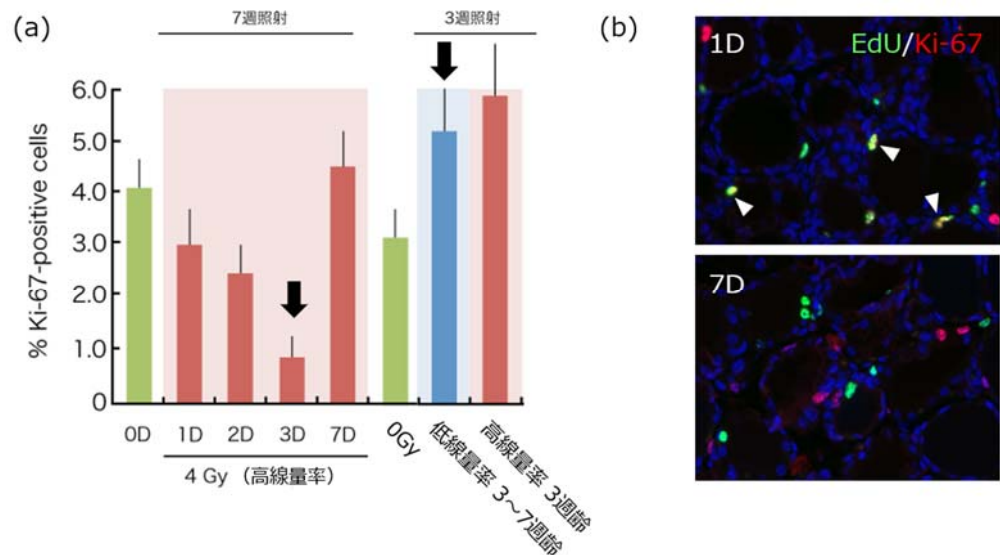


図 3-28 細胞増殖停止の解析 高線量率、及び低線量率で照射した場合の Ki-67 陽性細胞の解析結果。D は日。(a) 左：7 週齢で高線量率照射後の Ki-67 陽性率。右：3 週齢で高線量率照射、もしくは 3 週齢から低線量率照射し、7 週齢で解析。緑色は非照射、赤色は高線量率照射 (30Gy/時、4Gy)、青色は低線量率照射 (6mGy/時) を表す (4 匹のラットの平均と SD)。(b) 7 週齢で高線量率照射後の EdU 陽性細胞における Ki-67 発現。照射 1 日後は EdU (緑色シグナル) を保持する細胞が増殖マーカー Ki-67 (赤色シグナル) を発現する (▽印) が、7 日後は EdU を保持しない細胞のみが Ki-67 を発現する。

その結果 (図 3-28a 左)、非照射の場合の Ki-67 陽性率 (4~5%程度) と比べ、高線量率照射後は、Ki-67 陽性率は 3 日目に非常に低くなり、組織内のほとんどの細胞が照射 3 日以内に増殖停止に入ることがわかった。照射 7 日後には、組織内の Ki-67 陽性率は照射前のレベル (4%程度) に回復していた。次に、EdU をあらかじめ取り込ませた増殖細胞におけるその後の Ki-67 発現を解析すると、一回増殖した (EdU を取り込んだ) 細胞は、組織内では長期の増殖停止に入り (Ki-67 を発現せず)、照射後 7 日の再増殖には寄与しないことが示唆された (図 3-28b)。すなわち、照射後 7 日目に見られる再増殖は、増殖停止した細胞の再増殖ではなく、組織内の別の細胞が増殖を開始したものであると考えられた。

以上を踏まえ、3 週齢から 7 週齢まで低線量率照射を行った後の増殖を解析した (照射のプロトコルは図 3-3)。すると、照射直後の 7 週齢の時点では、高線量照射後のよ

うな Ki-67 陽性率の低下（組織全体の増殖停止）は認められず、逆に、Ki-67 陽性率は非照射よりも増加していた（図 3-28a 青色）。

以上より、高線量率照射後に、まず組織レベルで細胞増殖抑制が認められること（図 3-28 左の矢印）、続いて、新たな細胞の増殖により組織全体の増殖活性が亢進することが確認された。一方、低線量率照射の場合には、照射を持続しているにもかかわらず、組織レベルの細胞増殖抑制は顕著に観察されず（図 3-28 右の矢印）、細胞動態に対する効果は、線量率により異なることが明らかになった。一方、3 週間の低線量率照射後には、非照射時よりも若干高い細胞増殖が確認されたが、高線量率照射でも、照射 3 週間後には、同様の傾向が認められ、いずれの線量率にも、組織全体の増殖活性を亢進する効果は存在するといえる。

明確なアポトーシスによる細胞死は異なる線量率のいずれの場合でも誘導が認められなかったことから、甲状腺濾胞細胞で誘導される細胞死は低線量率放射線でも老化様細胞死であろうと予想される。しかしながら、その結論を導き出すためには、今後、照射中に EdU を投与するなど、老化様細胞死の誘導を直接的に検証する実験を行うことが必要である。

細胞増殖動態の検討から、少なくとも、細胞増殖の抑制は高線量率の照射では顕著に認められたが、低線量率照射ではそのような傾向は認められず、線量率効果は、照射後の細胞増殖抑制動態に顕在化することが結論づけられた。

(3) 3 年間の成果のまとめ

甲状腺幹細胞動態に対する線量率効果を明らかにするため、量研機構で作製したラット甲状腺の病理標本を用いて、高線量率、低線量率照射後の DNA 損傷動態及び増殖停止による細胞死動態の定量的評価を実施し、線量率効果の解析をすることを目的とした。

3 年間で達成した事柄をまとめると、次の通りである。

- ラット甲状腺の幹細胞・分化細胞の識別マーカー、細胞動態マーカー、DNA 損傷マーカー、細胞増殖マーカーの蛍光免疫染色法による解析条件を最適化した。
- 甲状腺組織には、いわゆる組織幹細胞に該当する細胞が存在せず、分化した細胞が増殖能を保持して幹細胞系を構成することを発見し、このように分化しかつ増殖能を持つ細胞が、放射線による発がんの起源になることを提唱した。
- 甲状腺組織では、低線量率照射後の DNA 損傷量は、高線量率照射後の DNA 損傷の動態と矛盾する点は見られなかった。高線量率照射の場合に、組織代謝によって残存 DNA 損傷保有細胞が排除されることも示唆した。
- 甲状腺組織では、明確なアポトーシスによる細胞死は起こらないことを見だし、甲状腺濾胞細胞では老化様細胞死が誘導されると考えた。加えて、高線量率の照射では顕著な細胞増殖の抑制を認めたが、低線量率照射ではそのような傾向は認められず、細胞動態においても、明確な線量率効果を認めた。

以上の結果から、甲状腺組織において、発がんの標的となる組織幹細胞に相当する

細胞において、放射線照射後の動態に線量率効果が存在することを示した。

本研究の成果に基づき、将来の課題として以下を挙げることができる。

- 甲状腺濾胞上皮細胞の特徴である、明確な幹細胞と分化細胞の区別が存在せず、分化細胞が発がんの標的になり得るという特徴や、今回の実験で明らかになった細胞増殖動態の特徴を反映した、甲状腺の数値モデルを構築すること。

参考文献

1. Noda A. Radiation-induced unrepairable DSBs: their role in the late effects of radiation and possible applications to biodosimetry. J Radiat Res 59, ii114-ii120, 2018.

3.2 シミュレーションによる線量率効果の解析 (H28~H30)

「はじめに」で述べたように、生物学的研究で得られる知見を一般化し、ヒトにおけるリスクの予測へ橋渡しするためには、得られた知見を数理モデル化して、シミュレーションを行うこと（システムバイオロジー的アプローチ）が有用であると考えられている。本研究では、乳腺幹細胞系を例にとり、実験データを取り入れた数理モデルを構築し、動物発がん実験で見られる線量率効果を理解することを目指す。

(1) シミュレーション研究の位置づけ

初めに、数理モデルを用いたシミュレーション研究の生物学における位置づけについて、成書（文献1等）を参考に述べる。

生命を数理モデルとして理解することには、二つの方向性がある。一つは、複雑な生命現象を詳細に調べ上げ、それを完全にシミュレーションできる数理モデルを作り上げて、これを利用して生命の操作・改変を目指す方向性である。これは、工学、気象等におけるシミュレーションの位置づけを考えると、理解しやすい。一般的には、医学、創薬等においては、このような方向性のシミュレーション研究が目指されることが多いであろう。たとえば心臓手術のために開発された心臓シミュレータは、このような例である。

もう一つの方向性は、生命現象を支配する基本法則が不完全にしか理解されていない状況において、その現象を理解するために、現象を「ある程度」再現する数理モデルを構築し、シミュレーションを行って、生命現象の定性的な理解につなげる方向性である。たとえば、「飛行機はなぜ宙に浮けるのか」を理解するためには、安全装置や自動操縦システムについては捨象すべきであり、翼の設計と揚力の力学をラフにモデル化したシミュレーションが有用である。

本研究は2つめの方向性を持った研究であり、放射線発がんにおける線量率効果のメカニズムの理解につなげるため、放射線で発がんする動物モデルの幹細胞系を対象とした数理モデルを構築してシミュレーションを行う。

(2) 平成29年度までの実施内容・成果の概要

① 目的

本研究は、幹細胞系の細胞数や状態等の動態が、線量率の異なる放射線照射に対してどのように変化するかを再現する数理モデルを構築し、シミュレーション結果と実験結果を比較することにより、線量率と発がんとの関係性を評価する基礎とすることを目的としている。

平成28、29年度は、幹細胞系である乳腺末梢芽状突起の細胞動態の数理モデルを構築し、この数理モデルにおける幹細胞等の細胞数の変化等について、線量率の異なる放射線照射に対する応答の動態の予備的なシミュレーションを行うことで、数理モデルの原型の構築について方向性を定めることを目的とした。

② モデル構築の概要

平成28年度は、一様な（＝細胞の間に幹細胞・分化細胞等の違いがない）モデルで

ある培養細胞を念頭に置いて構築した細胞集団の放射線応答モデル（文献 2）をベースにして、幹細胞系の動態解析に適用することを目指した。そのため、まず、乳腺幹細胞系（末梢芽状突起）の空間的な基本形状を、細胞レベルのモデルとして構築した。また、幹細胞とその子孫細胞を区別し、細胞分裂に際して、幹細胞・前駆細胞・成熟細胞の間の分化と脱分化という状態変化を導入した細胞状態遷移モデルの基本型を構築した。これらを通して、検討課題を抽出した。

平成 29 年度は、実測値に基づいた現実的なパラメータを用いることのできる数理モデルとして、乳腺末梢芽状突起の細胞状態遷移モデルの改良を行った。また、放射線照射による DNA 損傷に対する線量率・線量の影響を推定する計算モデルの改良を行い、線量率の異なる放射線照射に対する動態シミュレーションを実施できるようにした。

③ モデル構築の詳細及び考察

1) 幹細胞系の構造の構築と細胞状態変化のモデル化

幹細胞系の例として、乳腺の末梢芽状突起を対象とし、図 3-29 に示したように、細胞レベルの 2 次元のモデルを構築した。本モデルは、幹細胞と基底細胞と内腔細胞から成り、個々の細胞が位置情報を持つ。この細胞系において、各細胞は、幹細胞から基底細胞と内腔細胞（前駆細胞・成熟細胞）へと分化し、空間的に移動することによって、集団として、組織形態保持と伸長を示す。このモデルにおいて、放射線が照射されていない場合の細胞間の状態遷移を図 3-30 のように仮定した。このモデルでは、各細胞の個数は時間の関数として変化する。その変化（分化や移動による）の確率は、パラメータで表現するとともに、その値は個々の細胞の位置情報を反映する場合があるとした。このモデルで数値計算を行うことにより細胞数の時間変化を求めることができる。しかし、本モデルでは、パラメータの数が多く、実測値がないパラメータも含まれるため、モデルの簡略化と、必要なパラメータの収集が、検討課題として抽出された。

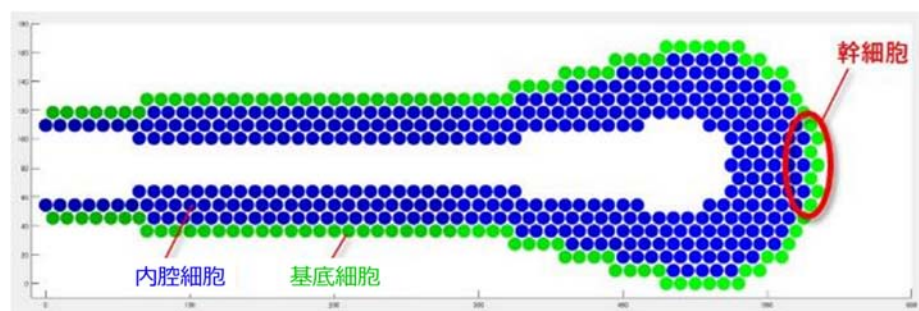


図 3-29 乳腺の末梢芽状突起の構造モデル 幹細胞と基底細胞と内腔細胞から成り、個々の細胞が位置情報を持つ。細胞の分化と移動は、図 3-30 の状態遷移モデルを組み合わせて表現する。

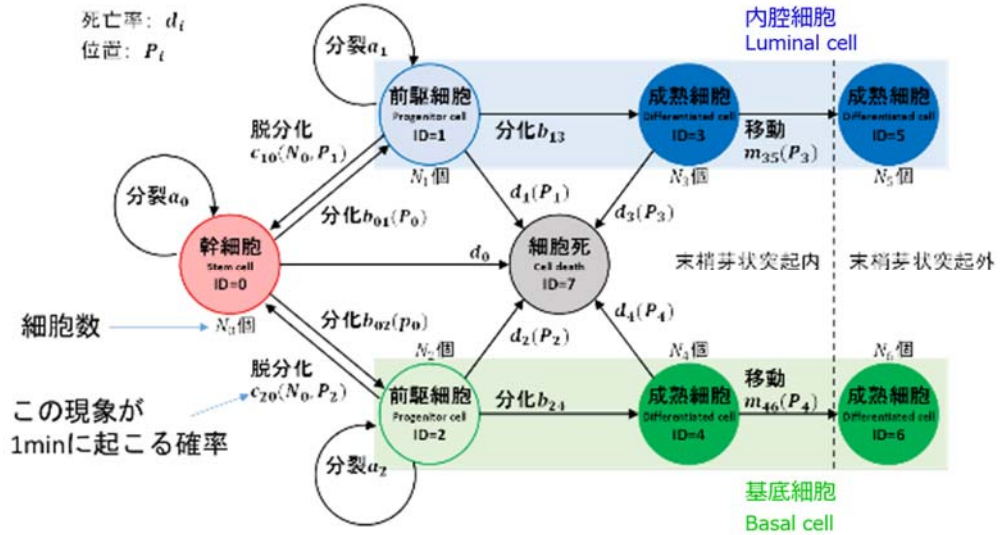


図 3-30 乳腺の末梢芽状突起の動態モデルにおいて考慮した細胞動態とパラメータ ID は各細胞の状態を示す。各状態の細胞の個数 (N_i 個) は、時間の関数として変化する。分化や移動の確率は、個々の細胞の位置情報 (図 3-29) を反映する場合があるとした。

2) 幹細胞系細胞動態の放射線応答解析のためのモデルの構築と改良

次に、上記の検討で抽出された検討課題である、モデルの簡略化を進めた。具体的には、乳腺の末梢芽状突起の 8 種類あった細胞状態を、2 種の細胞種 (基底細胞、内腔細胞) と 2 種の分裂能 (幹細胞と前駆細胞を連続的なものと考えてまとめた「増殖細胞」と、分化した「成熟細胞」) によって決まる 4 つの状態に統合し、各細胞間の状態遷移を仮定した (なお、幹細胞は休止期にあって、活発に活動する前駆細胞とは連続していないという考えもあるが、乳腺においては休止期の幹細胞の存在を示唆する実験的知見が少なく、前駆細胞的な細胞の存在は明確に示されている (文献 3))。各状態の細胞の個数は、時間の関数として変化する。分化や移動の確率は、他の細胞の個数を反映する場合があるとし、細胞競合の生じる条件もこの場合に含めた。

また、放射線によって損傷した細胞を表現するために、損傷状態も考慮した。線量や線量率の損傷状態への影響については、DNA 損傷の修復の効率と時間変化に反映させた。この損傷量は、細胞の状態遷移である分化あるいは細胞死を決定する入力情報であるとした。損傷と修復の確率は、細胞の損傷量によって決定される。このモデルの概要と用いたパラメータは、図 3-31 に整理した。また、このモデルを、次に示すような微分方程式を用いて数理化して数値計算を行うことにより細胞数の時間変化を求めることができるようにした。

$$\frac{dN_{\text{NBP}}(t)}{dt} = (p_B - d_{\text{NBP}} - c_B - m_{\text{NBP}} - g)N_{\text{NBP}}(t) + rN_{\text{DBP}}(t)$$

$$\frac{dN_{\text{NBM}}(t)}{dt} = (-d_{\text{NBM}} - m_{\text{NBM}} - g)N_{\text{NBM}}(t) + c_B N_{\text{NBP}}(t) + rN_{\text{DBM}}(t)$$

$$\frac{dN_{DBP}(t)}{dt} = (-d_{DBP} - m_{DBP} - r)N_{DBP}(t) + gN_{NBP}(t)$$

$$\frac{dN_{DBM}(t)}{dt} = (-d_{DBM} - m_{DBM} - r)N_{DBM}(t) + gN_{NBM}(t)$$

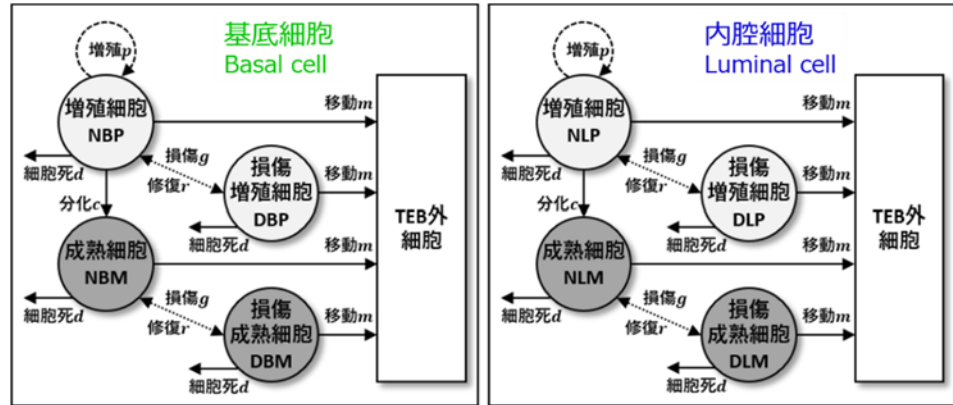


図 3-31 乳腺の末梢芽状突起の状態遷移モデル 1) で構築したモデルを基に、簡略化と、損傷状態の追加を行った。TEB は末梢芽状突起。

3) 放射線照射の線量率の違いによる細胞動態への影響のシミュレーション

定常状態の細胞動態については、細胞数の実験データを基に、状態遷移のパラメータ値を推定することで、モデルの初期値の細胞数から時間変化しないことを確認した。

次に、放射線照射に伴う細胞動態の変化をシミュレーションした。図 3-32 と図 3-33 には、このモデルを用いて推定した、細胞損傷量と線量率の違いによる細胞数の時間変化を示した。図 3-32 と図 3-33 より、線量率が細胞損傷量と細胞動態に影響を与えることを確認できた。

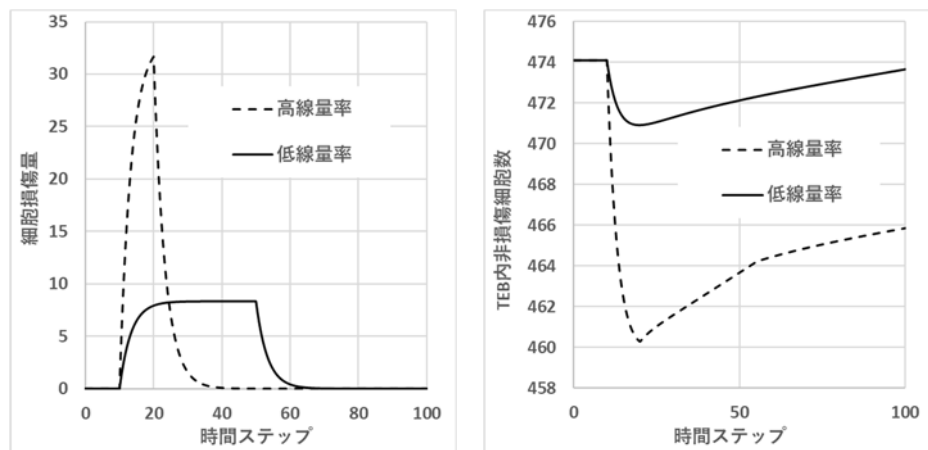


図 3-32 高・低線量率放射線照射時の細胞損傷量と末梢芽状突起内の非損傷細胞数 (左) 細胞損傷量、(右) TEB 内の非損傷細胞数。TEB は末梢芽状突起。

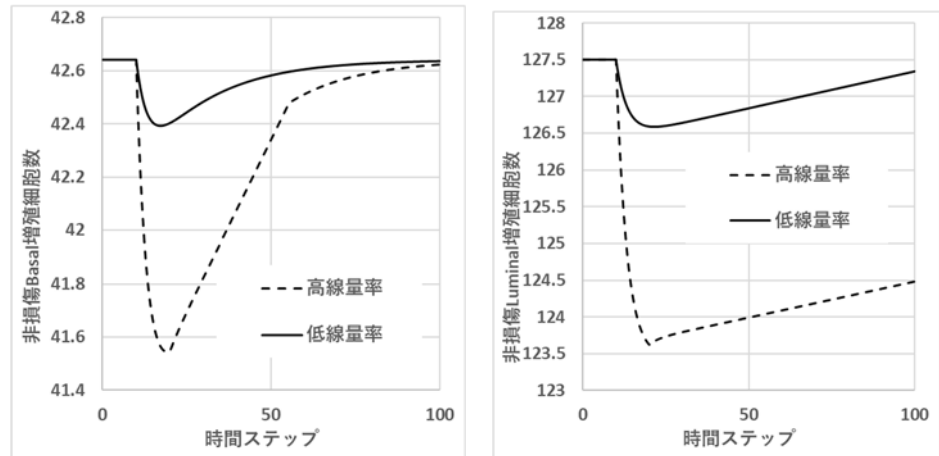


図 3-33 高・低線量率放射線照射時の非損傷細胞数 (左) 非損傷基底 (basal) 細胞、(右) 非損傷内腔 (luminal) 細胞。

また、図 3-34 には、細胞競合をモデルで考慮した場合の低線量率と高線量率の細胞数の時間変化を示した。この結果では、細胞競合による損傷細胞の排除効果が大きければ、高線量率でも低線量率と同様な細胞数の時間変化が現れた。なお、これらのモデルでは時間軸のスケールは未考慮である。

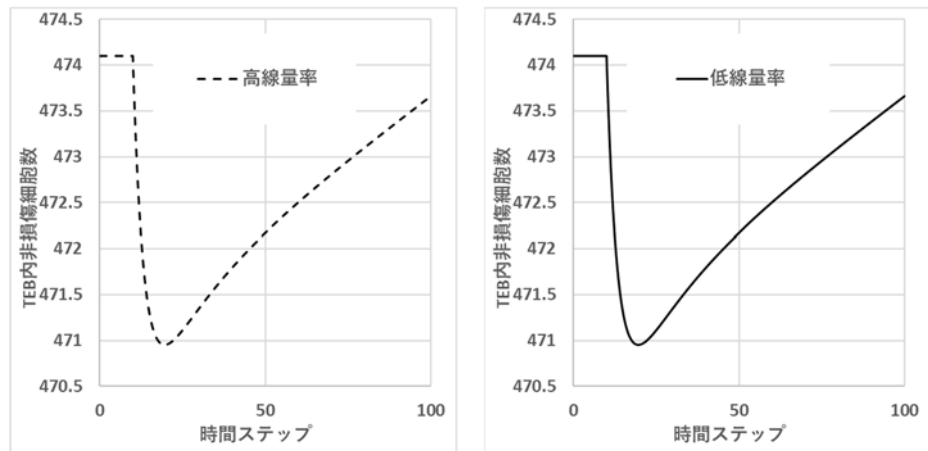


図 3-34 細胞競合を考慮した末梢芽状突起内非損傷細胞数の放射線応答 高線量率 (左) と低線量率 (右)。TEB は末梢芽状突起。

以上のように、乳腺の末梢芽状突起を対象としたモデル構築を行い、細胞動態のシミュレーションに必要なパラメータをいくつか決定した。また、これを用いて線量率の違いによる乳腺組織における細胞の動態シミュレーションを可能にした。

(3) 平成 30 年度の実施内容・成果の概要

① 目的

平成 30 年度は、実験から得られた幹細胞系の特徴を反映し、これまで開発してきた数理モデルを確立すること、異なる線量率の照射に対する幹細胞の動態変化をシミュレ

ーションによって評価しメカニズムを推定すること、過去の動物発がん実験で得られたデータとシミュレーション解析の比較により、発がん実験で観測される線量率効果が、幹細胞系のどのような属性とメカニズムによるものかを推定することを、目的とした。

② モデル構築の概要

平成 30 年度は、前年度までに構築した乳腺末梢芽状突起の放射線応答モデルをより実際に近づけるために、細胞の計測データをさらに反映してモデルに取り入れた。また、将来的に DNA 損傷量の計測データと対応できるための準備として、DNA 損傷と修復の動態をモデルに取り入れ、細胞の状態変化の判定に、DNA 損傷の蓄積と修復を考慮した細胞生存率モデルを導入した。

また、前年度までのモデルでは、内腔細胞と基底細胞で異なるモデルを用いていたが、幹細胞系全般へ適用可能とするために細胞種の違いを排してモデルを統一化した。

さらに、このモデルを用いて、異なる線量率の放射線照射のシミュレーションを実施し、過去の発がん実験データにおける線量率効果と比較した。その際は、発がんリスクと関連した指標でシミュレーション結果を評価し、実験データとの比較を行うために、損傷蓄積増殖細胞が放射線によるなんらかの異常を抱えたまま非損傷増殖細胞へ状態が変わり、その細胞が増殖することが発がんリスクにつながると仮定した。

③ モデル構築の詳細及び考察

1) 幹細胞系の数理モデルの確立

まず、前年度までに構築した状態遷移モデルについて、図 3-35 の上図に示すように、内腔細胞と基底細胞のどちらでも利用可能な統一的な状態遷移モデルとして改良した。なお、前年度の項に記載したように、幹細胞・前駆細胞は連続的なものであると考え、まとめて「増殖細胞」と呼称した。末梢芽状突起内の内腔細胞及び基底細胞の数の計測データ、末梢芽状突起の移動速度の計測データ、細胞の増殖活性の計測データから、非照射時における 7 個のパラメータのうち 3 個を設定した。残りの 4 つのパラメータは、先に決定した 3 個のパラメータの値から、ある程度妥当な範囲で、まずは 2 つを任意に決定し、残った 2 つのパラメータは、決定された 5 つのパラメータ値を基に、モデル式の制約による関係式から導出した。

次に、前年度までに構築した状態遷移モデルでの損傷細胞の状態を「損傷蓄積中」と「放射線による細胞死」の 2 状態に分割し、「損傷蓄積中」状態は、DNA 損傷の蓄積と修復を考慮した細胞生存率モデルとした（図 3-35）。細胞生存率モデルは、時間変化の計算に対応可能な、先行研究で構築したモデル（文献 2）を応用した。この細胞生存率モデルでは、放射線誘発 DNA 損傷の蓄積量に対応した内部状態を別に持っており、蓄積量が増加すると、最終的に「放射線による細胞死」状態となる。一方、DNA 損傷の修復効果も考慮し、DNA 損傷の蓄積量の減少方向への状態遷移として表現している。また、一般的な生物学的知見を踏まえ、DNA 損傷が蓄積している間は、細胞周期の停止が起こり、増殖細胞も増殖を示さないとした。この生存率モデルを乳腺の末梢芽状突起の状態遷移モデルへ新たに導入することで、末梢芽状突起内の細胞の動態推定に、放射線

誘発 DNA 損傷が対応付けでき、放射線照射実験データのモデルへの反映と、放射線による影響を考慮した細胞の動態推定の高度化を図った。

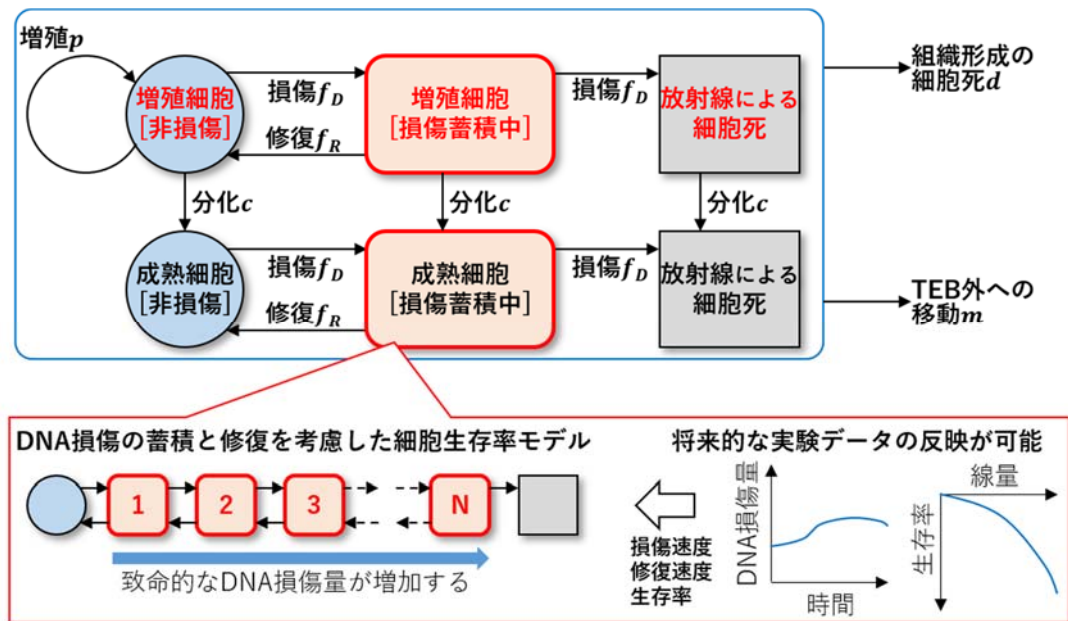


図 3-35 DNA 損傷を含む細胞生存率モデルの導入

2) 異なる線量率の放射線照射シミュレーションの実施

改良したモデルを用いて、異なる線量率の放射線を照射した時の細胞動態の変化をシミュレーションで調べた。低線量率照射は 6mGy/時、高線量率照射は 30Gy/時（線量は 4Gy）とした。ただし、動物の成長に伴う複雑な変化は今回のモデルに含めていないため、シミュレーション内時間は 72 時間とした（従って、低線量率照射の累積線量は 4Gy には達していない）。また、放射線を照射した時のモデルの動作を決定するパラメータとして、1Gy 当たりの損傷蓄積細胞の増加率や、細胞の損傷修復率、DNA 損傷の許容蓄積量がある。これらのパラメータの値は、従来研究のパラメータ値を参考に決定した。

内腔細胞の「非損傷」増殖細胞数の時間変化のシミュレーションの結果を図 3-36a に示す。低線量率照射では非損傷増殖細胞はほとんど減少しなかった。対照的に、高線量率照射では非損傷細胞数が急減して非常に少ない状態となり、照射時間中の 8 分間で非損傷増殖細胞数が急激に減少し、その後急速に回復したが、完全に回復するのは 24 時間後以降であった。内腔細胞における「損傷蓄積中」増殖細胞数の時間変化を図 3-36b に示す。「損傷蓄積中」増殖細胞は、低線量率では、照射開始後もあまり増加しなかったが、高線量率では、照射直後に急激に増加し、その後、急激に減少した。この結果は、パラメータ設定には用いなかった観察結果（研究項目「3.1.1.1 乳腺幹細胞数等の動態評価」、図 3-7、図 3-8）をよく再現している。また、その回復は、上記の非損傷増殖細胞数の回復とは異なり、24 時間を要することはなかった。このことから、非損傷増殖細胞数の回復に 24 時間以上を要するメカニズムは、損傷修復に時間を要する

ためではなく、細胞の増殖数と組織形成の細胞死の数のバランスの乱れを回復する時間が必要であるためだと推定された。このように、末梢芽状突起の放射線応答モデルに細胞生存率モデルを内包することで、細胞数動態と放射線照射による影響を関連付けて解析することができた。

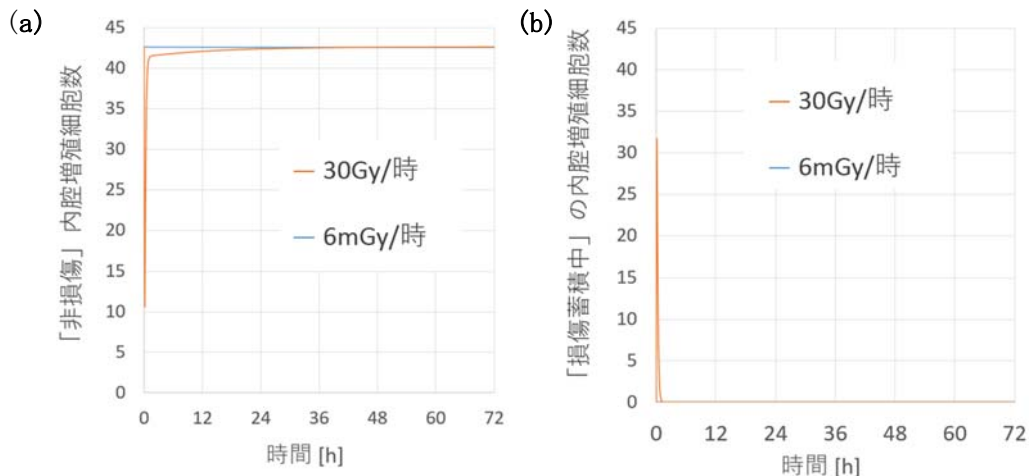


図 3-36 損傷に関する指標の時間変化 (a)「非損傷」増殖細胞数の時間変化。(b)「損傷蓄積中」増殖細胞数の時間変化。内腔細胞を例に示す。

3) 実験データとの比較による推定

次に、発がんリスクと関連した指標でシミュレーション結果を評価し、実験データとの比較を行うことを目指した。今回の数理モデルは、発がんリスクを直接的に推定するには設計されていない。しかし、遺伝子の突然変異が放射線による発がんの主要因であることや、突然変異が DNA 損傷の誤修復によって起こることは、放射線防護の基礎として専門分野での共通理解となっている（文献 4）。そのため、増殖細胞（幹細胞・前駆細胞）において損傷が修復されることが遺伝子の突然変異等のリスクを高めると考えた。そして、それに関連する、以下の指標の時間変化を調べた。シミュレーション条件については、2) のシミュレーションと同じものを利用した。

- » 「損傷蓄積中」から「非損傷」へ状態が変わる増殖細胞（「発がんリスク細胞」と呼称する。）の数が、一定時間内にどれだけ存在するのか（すなわち「発がんリスク細胞数」の増加速度）。また、その累積の数。
- » 上記の「発がんリスク細胞」における累積の修復回数（修復の回数が多いほど、遺伝子変異等を持つ可能性も高いという推定に基づく）

シミュレーションの結果の内腔細胞の「発がんリスク細胞数の増加速度」の時間変化を図 3-37a に示す。高線量率照射では、照射開始後すぐに増加速度が急激に上昇し、その後、すぐに減少して、2 時間後にはほぼ 0 となった。この時、累積の発がんリスク細胞数は、1 時間後に約 41 個に達した（図 3-37b）。これらにおける累積の修復回数（図 3-37c）は、2 時間後には約 84 個に達し、それ以後は変化しなかった。非照射時の

末梢芽状突起内の増殖細胞数は約 42 個であり、照射中に約 0.5 個の細胞が増殖によって増加し、約 0.5 個の細胞が分化または細胞死によって除去された。これらのことを考慮すると、高線量率照射によって、照射開始時に存在したほぼすべての細胞が同時に発がんリスク細胞となり、その一部は損傷と修復を 2 回以上繰り返したと考えられる。

一方、低線量率照射では、発がんリスク細胞の増加速度は 0.00207 個/分（すなわち約 8 時間で 1 個）と非常に小さい値で、72 時間の間ではほとんど変化がなかった（図 3-37a）。その累積の数は一定速度で増加し（図 3-37b）、累積線量が 4Gy になるまで同じ速度で蓄積すると仮定すると、約 83 個となると計算された。累積の修復回数（図 3-37c）も約 83 個となった。非照射時の増殖細胞数は約 42 個であるが、照射中に約 5,100 個の細胞が増殖によって増加し、同数の細胞が分化または細胞死によって除去された。これらのことを考えると、約 42 個の増殖細胞集団において、のべ約 5,100 個の細胞が入れ替わる中で、約 8 時間に 1 回、1 個の細胞において損傷と修復が生じ、これが約 83 回繰り返されたと考えられる。

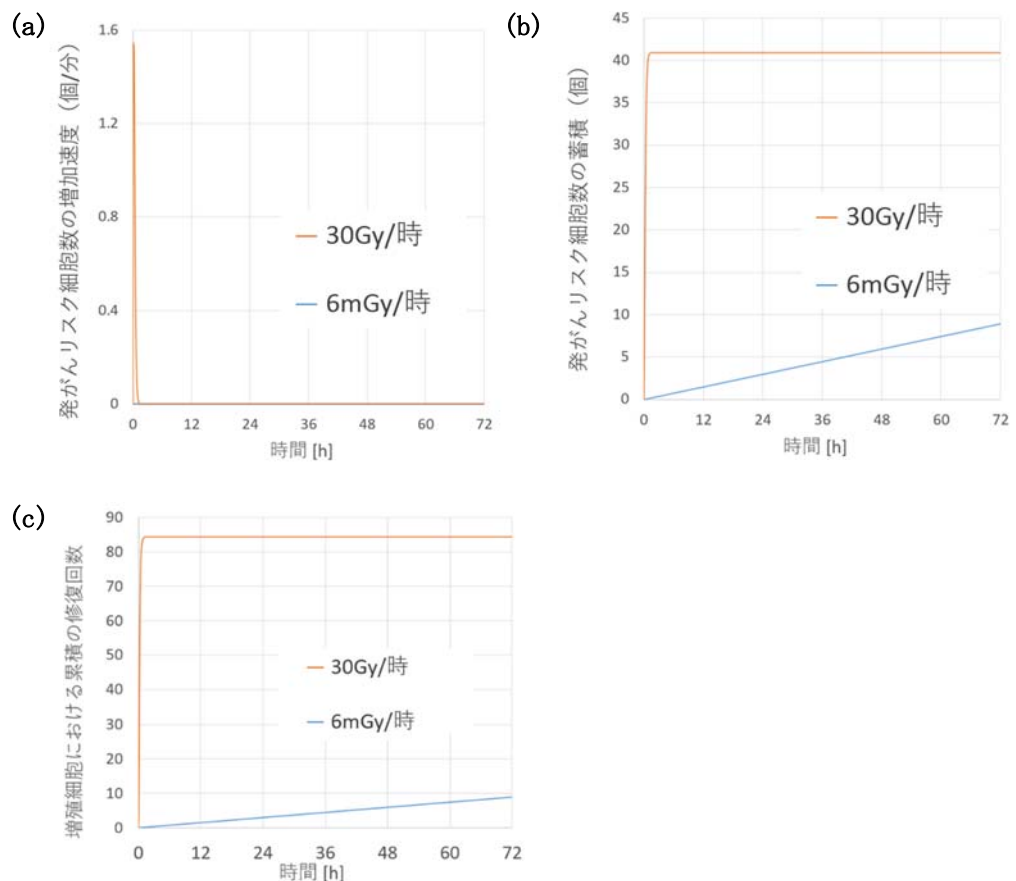


図 3-37 発がんリスクに関する指標の時間変化 (a) 発がんリスク細胞数の増加速度。(b) 発がんリスク細胞数。(c) 累積の修復回数。

以上のことから、高線量率では、増殖細胞の多くがほぼ同時に「発がんリスク細胞」となること、その中には損傷と修復を繰り返して再び増殖可能となる細胞がある程度存在すること、照射中に細胞の入れ替わりはほとんどないことがわかる。これに対し、低

線量率では、「発がんリスク細胞」は約 8 時間に 1 個ずつ生じ、損傷と修復は繰り返されず、この間に非常に大量の細胞の入れ替わりが生じた。一方、発がんリスク細胞における「累積の修復回数」は高線量率で約 84 個、低線量率で約 83 個（約 1.02 倍の違い）であり、多少の違いはあるものの、この個数だけを見ると線量率効果は小さいことも、わかった。この線量率効果の小ささは、ある程度任意に決めたパラメータを変動させても 1.01~1.09 倍程度の変動しか示さず、頑健な結果であった。

過去の動物発がん実験データでは、同じ累積線量でも、高線量率（30Gy/時）の放射線照射では乳がんがよく発生し、低線量率（6mGy/時）では乳がんが発生しにくい（約 3 倍の違いがある）ことが示されている（文献 5）。このことと、シミュレーションで示唆されたことを比較すると、発がんの線量率効果を、1.1 倍未満という「累積の修復回数」の線量率効果に求めることはできないことがわかった。

4) まとめと展望

以上を総括すると、本研究では、幹細胞系の細胞増殖、分化、細胞死、損傷と修復を仮定した状態遷移モデルでは、現実的なパラメータを選んだ場合、発がんリスクの指標となる「累積の修復回数」の線量率効果（高線量率と低線量率におけるシミュレーションの結果の比）は 1.1 倍未満であり、発がん実験で観察された線量率効果のごく一部しか説明されないことがわかった。

一方、増殖細胞において「損傷と修復が同一細胞において繰り返されること」「発がんリスク細胞が同時に多数発生すること」「照射中に細胞がほとんど入れ替わらないこと」は高線量率照射に、「損傷と修復が同一細胞において 1 回ずつ起こること」「発がんリスク細胞が 1 個ずつ発生すること」「照射中に大量の細胞が入れ替わること」は低線量率照射に、それぞれ特徴的であった。損傷と修復の繰り返しは、がんの原因となる遺伝子変異の組み合わせの発生確率が増殖細胞において高まる可能性を示唆する。また、発がんリスク細胞が 1 個ずつ発生し、その間に大量の細胞の入れ替わりが存在することは、損傷と修復を経験した細胞が細胞集団から除去される可能性を示唆する。これらの可能性をシミュレーションで調べるためには、個々の細胞がどれくらい損傷と修復を経験したかを識別することが必要であるため、今回採用した状態遷移モデルを、個々の細胞をモデル化したエージェントベースモデルに、発展させていくことが有効だと考えられる。

さらに、「3.1.1.1 乳腺幹細胞等の動態評価」の項目における最終年度の実験では、低線量率照射後の基底細胞の動態変化が示唆されたが、これは予想外の結果であり、今後、数理モデルへの取り込みを検討すべきである。

(4) 3 年間の成果のまとめ

放射線リスクの研究において、生物学的研究で得られる知見を一般化し、ヒトにおけるリスクの予測へ橋渡しするためには、得られた知見を数理モデル化して、シミュレーションを可能にすること（システムバイオロジー的アプローチ）が有用である。ここでは、生命現象を完全に再現し予測することを目指すのではなく、基本法則が不完全にし

か理解されていない状況において、基本法則の理解に有用なシミュレーションを目指した。具体的には、ラット乳腺幹細胞系を例にとり、実験データを取り入れた数理モデルを構築し、動物発がん実験で見られる線量率効果を理解することを目指した。

3年間で達成した事柄をまとめると、次の通りである。

- ラット乳腺幹細胞系（末梢芽状突起）の内部に、2つの細胞種（基底細胞、内腔細胞）と2つの分化状態（増殖細胞 [= 幹細胞・前駆細胞] と成熟細胞）を仮定し、基底細胞と内腔細胞の数や乳管の伸長速度等の実験データを再現できる数理モデルを構築することに成功した。
- さらに放射線による損傷状態を加えた数理モデルを構築し、高線量率照射後の動態変化の傾向がシミュレーションによって再現できることを示し、低線量率照射中の動態変化を予測した。
- 乳腺幹細胞系の状態遷移数理モデルで、発がんに関連する指標をシミュレーションすると、線量率効果のごく一部しか説明されない。

以上のように、本研究では、幹細胞の増殖、分化、死、損傷と修復を考慮し、実験データを元にパラメータを選択した状態遷移モデルによってシミュレーションを行い、これらの動態によっては、発がんリスクの線量率効果の一部しか説明されないことを示した。

本研究の成果に基づき、将来の課題として以下を挙げるができる。

- 個々の細胞における累積の損傷・修復の回数は、線量率効果を説明する可能性があり、個々の細胞をモデル化したシミュレーション系を構築することが、今後の課題である。
- 本シミュレーション研究を実施中に幹細胞実験の研究において得られた予期しない成果（低線量率照射によって、乳腺の基底細胞の回転が加速される可能性）を考慮することも、今後の課題である。
- 幹細胞生物学とシミュレーションという異分野の英知を結集して、初めて、発がんの線量率効果の解明に挑戦した。分野間の言葉や考え方の違いを乗り越えて英知を結集する難しさがあったが、3年間を経て、効果的な共同研究が可能になった。この研究体制を維持・発展させることは、将来への重要な課題である。
- これらの研究は、ヒト細胞を用いた幹細胞実験と数理モデルのヒト化を視野に入れて進め、最終的にはヒトと動物の放射線発がんを統一的に理解することを目標とすべきである。

参考文献

1. 近藤滋、北野宏明、金子邦彦、黒田真也『システムバイオロジー』（「現代生物学入門」8）岩波書店、2010年
2. Hattori Y et al. Cellular automaton-based model for radiation-induced

- bystander effects. *BMC Syst Biol* 9, 90, 2015.
3. Van Keymeulen, A. et al : Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance, *Nature* 479 : 189-193, 2011
 4. ICRP, Low-dose Extrapolation of Radiation-related Cancer Risk (ICRP Publication 99). *Ann ICRP* 35(4), 2005.
 5. Imaoka T et al. Prominent Dose-Rate Effect and Its Age Dependence of Rat Mammary Carcinogenesis Induced by Continuous Gamma-Ray Exposure. *Radiat Res* 191(3): 245-254, 2019.

3.3 研究推進 (H28~H30)

3.3.1 研究推進に係る会議等

本研究を推進するにあたり、研究代表者の下で各研究項目間、特に実験研究とシミュレーション研究の間における連携を密にして研究を進めるとともに、研究実施計画等を協議するため、全体会議及び個別打合せを以下の通り開催した。

(1) 平成 28 年度全体会議 (平成 28 年 12 月 15 日、量研機構放医研)

今岡達彦、高島賢、鶴岡千鶴、西村由希子、大塚健介、藤通有希、鈴木啓司、渡辺立子、服部佑哉が参加した。まず、「乳腺幹細胞における線量率効果の解析」(今岡)、「消化管幹細胞における線量率効果の解析」(大塚)、「甲状腺幹細胞における線量率効果の解析」(鈴木)、「シミュレーションによる線量率効果の解析(渡辺)」、「研究推進」(今岡)について、計画を発表した。ディスカッションでは、統一性を持ったプロジェクトとするための提案として、①蛍光免疫染色を用いた動態解析を甲状腺だけでなく乳腺でも行うこと、②発がんの原因となる「放射線のヒット」の実態については発生確率が数オーダー異なる電離飛跡の通過、DNA 切断、突然変異等にわたって幅を広げて考察すべきこと(特に数理モデル化の際)が提案された。この会議では、相互の研究の理解に重点を置き、今後サイエンティフィックな議論を行っていく上での基盤とした。

(2) 平成 28 年度個別打合せ

① 消化管幹細胞の解析に関する打合せ、現地調査 (平成 30 年 3 月 7 日、電中研)

今岡が電中研を訪問し、電中研での中心的な解析手法となるフローサイトメトリーでの使用機器(Beckman Coulter 社製 MoFlo Astrios EQ)を視察して適正な研究環境であることを確認したほか、技術的な確認を行った。研究の進捗については、大塚の説明により、年度内に目標達成が可能な進捗状況であることを確認した。

② 甲状腺幹細胞解析に関する打合せ、現地調査 (平成 30 年 3 月 9 日、長崎大学)

今岡が長崎大学を訪問し、鈴木が対応した。研究環境の調査としては、長崎大学での中心的な解析手法となる蛍光免疫染色について調査し、蛍光顕微鏡を実際に操作して甲状腺病理標本を観察すること等によって適正な研究環境であることを確認したほか、技術的な確認を行った。研究の進捗については、実際のデータを元に議論し、進捗状況が適正であることを確認した。

(3) 平成 29 年度全体会議 (平成 29 年 11 月 30 日、量研機構東京事務所)

今岡達彦、工藤健一、高島賢、西村由希子、大塚健介、藤通有希、鈴木啓司、渡辺立子、服部佑哉が出席した。まず、「乳腺幹細胞における線量率効果の解析」(工藤健一)、「消化管幹細胞における線量率効果の解析」(大塚健介)、「甲状腺幹細胞における線量率効果の解析」(鈴木啓司)、「シミュレーションによる線量率効果の解析」(渡辺立子、服部佑哉)について、研究進捗及び今後の計画を発表した。ディスカッションでは、項目間の連携推進として、乳腺幹細胞のための照射実験とともに甲状腺組織を採取する計画を議論した。また、乳腺組織を甲状腺組織の研究手法である蛍光免疫染色で解析することを議論した。さ

らに、シミュレーションに必要なパラメータを取得する実験計画の素案を議論し、別途機会を設けて詳細なディスカッションを行うこととした。

(4) 平成 29 年度個別打合せ

① シミュレーション研究打合せ（平成 29 年 4 月 17 日、量研機構東京事務所）

進捗について渡辺、服部から報告し、今岡が不明点を質問した。モデルに必要な生物学的知見を示した論文について今岡から渡辺、服部に紹介した。

② シミュレーション研究打合せ（平成 29 年 12 月 19 日、量研機構放医研）

乳腺をモデルとした細胞動態数理モデル構築のために有用な実験データについて、過去の文献や、過去あるいは近い将来に手に入る材料等を元に議論・検討を行い、データ取得項目について決定した。またシミュレーションにおいて実験ではすぐにはわからないメカニズムを仮定して実験データとの整合性を解析することで重要なメカニズムに関する仮説を提案できる例を検討し、具体例を確認した。

③ 甲状腺幹細胞解析に関する打合せ（平成 30 年 3 月 13 日、長崎大学）

長崎大学を今岡が訪問し、鈴木が対応した。研究の進捗状況については、量研で作製し送付して長崎大学で解析を行った免疫蛍光染色の結果に関するプレゼンテーションを鈴木が行い、進捗を確認したほか、内容について科学的見地からの討議を行った。また、蛍光染色標本を顕微鏡で直接確認した。さらに、来年度の研究推進についての協議も行った。研究環境についても、蛍光顕微鏡や抗体の購入について確認し、適正な研究環境であることを確認した。

④ 消化管幹細胞の解析に関する打合せ（平成 30 年 3 月 14 日、電中研）

電中研を今岡が訪問し、大塚が対応した。研究の進捗状況については、EdU 投与後に一定期間において PH3 を指標に分裂期細胞を検出する実験系の検討及びデータ収集状況について、プレゼンテーションを大塚が行い、進捗を確認したほか、内容について科学的見地からの討議を行った。さらに、次年度の研究推進（電中研では再委託せず量研にて同等内容を実施する可能性）についての協議も行った。

⑤ シミュレーション研究打合せ（平成 30 年 3 月 29 日、量研機構放医研）

乳腺幹細胞組織の定常状態及び放射線応答に関する数理モデル化とシミュレーション計算に反映するために実験研究で取得したデータの詳細について確認を行い、今後の課題を抽出した。また、細胞競合モデルに必要な知見の確認など放射線応答の線量率効果を解析する方法についての議論を通して今後の具体的な方向性を共有した。

(5) 平成 30 年度全体会議（平成 31 年 1 月 16 日、量研東京事務所）

今岡達彦、工藤健一、西村由希子、鈴木啓司、渡辺立子、服部佑哉が参加した。まず、「乳腺幹細胞における線量率効果の解析」（工藤）、「乳腺における細胞競合の解析」（今岡）、「甲状腺幹細胞における線量率効果の解析」（鈴木）、「シミュレーションによる線量率効果の解析」（渡辺、服部）について、進捗を発表した。得られたデータの中のどのようなものが数理モデルシミュレーションに使えるか、データ取得方法に適用できる改善法はあるか、得られたデータの意味するところは何か、シミュレーションの成果をどのように意

義づけるべきか等を議論した。3年間の共同研究によって、専門の壁、言葉の壁を乗り越えて英知を結集することができるようになってきていると感じた。

(6) 平成30年度個別打合せ

① 数理モデルに関する打合せ（平成30年9月14日、量研機構放医研）

数理モデル研究の進捗状況について服部より報告し、今岡、渡辺を交えて議論を行った。特にパラメータを実験データや物理的シミュレーションと整合する形で取得する方策を議論した。成果発表の方策についても議論した。

② 甲状腺幹細胞に関する打合せ（平成30年10月26日、量研機構放医研）

進捗状況について鈴木より報告を受け、今岡と議論を行った。特に免疫染色の方策を議論した。乳腺幹細胞のパートについても議論を行った。

③ 甲状腺幹細胞に関する打合せ（平成31年3月5日、長崎大学）

長崎大学における研究進捗、成果について鈴木より説明し、今岡と内容について討議を行った。量研における研究成果（乳腺幹細胞系のDNA損傷、細胞競合）についても討議を行った。特に最終年度の取りまとめについて方向性をまとめた。

④ 数理モデルに関する打合せ（平成31年3月14日、量研機構東京事務所）

数理モデル研究の研究成果について服部、渡辺より説明し、今岡と内容について議論を行った。特に最終年度の取りまとめについて方向性をまとめた。

3.3.2 成果発表等

(1) 論文

1. 今岡達彦、高島賢、鶴岡千鶴、西村由希子、飯塚大輔、島田義也、柿沼志津子「乳腺の幹細胞系：細胞表面マーカーと細胞系譜追跡の研究から」乳癌基礎研究 25, 15-25, 2017年4月, 国内, 査読有
2. 渡辺立子、甲斐健師、服部佑哉「計算機シミュレーションによる放射線生物作用の初期過程の研究」Radioisotopes 66(11), 525-530, 2017年11月, 国内, 査読有
3. 渡辺立子「シミュレーションによって推定される放射線誘発 DNA 損傷の特徴」放射線と産業 141号, 2017年12月, 国内, 査読無

(2) 学会発表

1. 工藤健一、今岡達彦「放射線被ばくした幹細胞の動態評価と細胞競合の役割」第15回幹細胞シンポジウムつくしの会, 2017/5/26, 国内, 口頭
2. 服部佑哉、横谷明德、倉林大輔、渡辺立子「Computational analysis of bystander signaling in cellular population irradiated with microbeam」第55回日本生物物理学会年会, 2017/9/20, 国内, 口頭
3. 工藤健一、西村由希子、高島賢、飯塚大輔、柿沼志津子、今岡達彦「放射線照射における乳腺幹細胞の動態評価実験系の構築」日本放射線影響学会第60回大会, 2017/10/26, 国内, ポスター
4. 西村由希子、横谷明德、神長輝一、工藤健一、宇佐美徳子、柿沼志津子、今岡達彦「放

- 射線による細胞競合を解析するための蛍光タンパク発現ラット乳腺細胞培養技術」日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017/10/26, 国内, ポスター
5. 服部佑哉、今岡達彦、横谷明德、渡辺立子「乳腺の末梢芽状突起の低線量放射線応答モデルの構築」日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017/10/26, 国内, ポスター
 6. 渡辺立子、服部佑哉、横谷明德「放射線照射による線量分布と DNA 損傷応答のシミュレーション研究」第 65 回応用物理学会春季学術講演会, 2017/3/18, 国内, 口頭
 7. 工藤健一、西村由希子、高島賢、臺野和広、飯塚大輔、柿沼志津子、今岡達彦「ラット乳腺細胞の放射線応答から放射線影響のメカニズムを探る」日本放射線影響学会第 61 回大会, 2018/11/7, 国内, 口頭
 8. 今岡達彦、西村由希子、工藤健一、太田原雅美、小川真里、藤田美鈴、高島賢、飯塚大輔、西村まゆみ、臺野和広、柿沼志津子「ラット乳腺上皮細胞移植実験系を用いた放射線照射・非照射細胞間の細胞競合モデルの検討」日本放射線影響学会第 61 回大会, 2018/11/7, 国内, 口頭
 9. 服部佑哉、今岡達彦、横谷明德、渡辺（横谷）立子「放射線照射後の乳腺末梢芽状突起の細胞数動態推定モデル」日本放射線影響学会第 61 回大会, 2018/11/8, 国内, 口頭
 10. Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma. Assessment systems of cell competition between irradiated and non-irradiated rat mammary epithelial cells. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018/9/27, 国内, 口頭
 11. Tatsuhiko Imaoka, Ken-ichi Kudo, Yukiko Nishimura, Daisuke Iizuka, Yuya Hattori, Ritsuko Watanabe, Akinari Yokoya, Shizuko Kakinuma. Basic properties of the mammary stem cell system of rats: towards mathematical modeling of its response to ionizing radiation. 第 16 回幹細胞シンポジウム, 2018/5/31, 国内, ポスター
 12. Tatsuhiko Imaoka, Yukiko Nishimura, Ken-ichi Kudo, Kiichi Kaminaga, Akinari Yokoya, Noriko Usami, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma. Application of ex vivo and in vivo models of rat mammary gland to study competition between irradiated and non-irradiated cells. 44th European Radiation Research Congress (ERRS44), 2018/8/23, 国外, ポスター
 13. 工藤健一、西村由希子、高島賢、臺野和広、飯塚大輔、柿沼志津子、今岡達彦「ラット乳腺の放射線応答から幹細胞・前駆細胞の性質を探る」第 18 回日本再生医療学会総会, 2019/3/22, 国内, ポスター

4. 結言

4-1. 本委託業務の成果の総括

本研究では、被ばく後の幹細胞系の動態に関する実験的知見を収集し、数理モデルによるシミュレーションを行って、被ばく後の幹細胞系のどのような動態が発がんの線量率効果を説明しうるかを評価した。得られた成果の概要は、以下の通りである。

(1) 研究手法に関する技術的な成果

- ▶ ラット乳腺を構成する 4 種類の細胞を識別して解析する技術と、それらの細胞において増殖及び DNA 損傷を解析する技術を、いずれも世界で初めて実現した。
- ▶ 細胞競合を個体内で解析するための基盤となる、識別可能なラット乳腺細胞が混合された組織を形成する技術と、ラット乳腺組織を透明化して蛍光観察する技術を、世界で初めて実現した。
- ▶ ラット乳腺幹細胞系の数理モデルを、実験的観察で得られた数値を用いて初めて構築した。

(2) 被ばく後の幹細胞系の動態に関して得られた主な知見

- ▶ 乳腺では、内腔細胞と呼ばれる細胞（前駆細胞、分化細胞）が、放射線照射に対して DNA 損傷応答を示す。一方、基底細胞と呼ばれる細胞は、不十分にしか応答しない。また、低線量率照射後に、基底細胞の入れ替わりが活発化していることが示唆される。
- ▶ 乳腺では、照射された細胞が組織中に 10% 程度の割合で存在する場合に、3 週間経っても、非照射細胞との間の細胞競合は、ほとんどない。
- ▶ 大腸では、高線量率照射の 3 日後でも幹細胞の入れ替わりが継続的に起こっているが、小腸では入れ替わりが抑制される。先行研究で見られた、線量率を下げると大腸幹細胞の入れ替わりが顕著でなくなる現象を説明するには、照射 3 日目より後の入れ替わりを観察する必要がある。
- ▶ 甲状腺では、典型的な幹細胞が存在しない。高線量率照射後には老化様細胞死が誘導され、低線量率照射では誘導されない。
- ▶ 乳腺幹細胞系の増殖、分化、死、損傷と修復を考慮し、実験データを元にパラメータを選択した状態遷移モデルによってシミュレーションを行うと、これらの動態によっては、発がんリスクの線量率効果の一部しか説明されない。
- ▶ 腸管、甲状腺の幹細胞系のシミュレーションを将来的に行う際は、腸管では幹細胞の入れ替わり、甲状腺では分化細胞が細胞増殖を担うことなどの特徴を、数理モデルにおいて考慮すべきである。

(3) 被ばく後の幹細胞系のどのような動態が、動物発がん実験の線量率効果を説明しうるか

研究実施者らは、ラット乳がんモデルを用いた動物発がん実験で、総線量 0~4Gy、線量率 30Gy/時、6mGy/時で、顕著な線量率効果があることを示している（図 4-1）。今回のシミュレーション研究において、幹細胞系を構成する細胞の増殖、分化、死、損傷と修復の動態のみによっては、発がんリスクの線量率効果のごく一部しか説明されないことがわかった。実験研究においては、数週間以内におこる細胞競合も、線量率効果を説明できないことがわかった。残

った大部分を説明する可能性がある幹細胞系動態として、シミュレーション研究からは、個々の幹細胞における損傷・修復の反復数が、実験研究からは、基底細胞の回転が数週間の低線量率照射によって活発化する現象が、示唆された。合わせて、今回の実験では対象としなかった、数週間から数ヶ月をかけて起こる細胞競合も線量率効果を説明する可能性がある。

腸管腫瘍と甲状腺については、平成 27～29 年度の本事業（研究代表者・笹谷めぐみ）において、本研究と同じ B6 系統マウスでは小腸腫瘍の発生に線量率効果がないと報告されており、本研究でも小腸幹細胞の動態に線量率効果が見られていない。大腸及び甲状腺については、環境省「放射線の健康影響に係る研究調査事業」が進行中である。本研究で示された幹細胞系動態の線量率効果が、その観察結果を説明するかどうかを検討することは、今後の課題である。

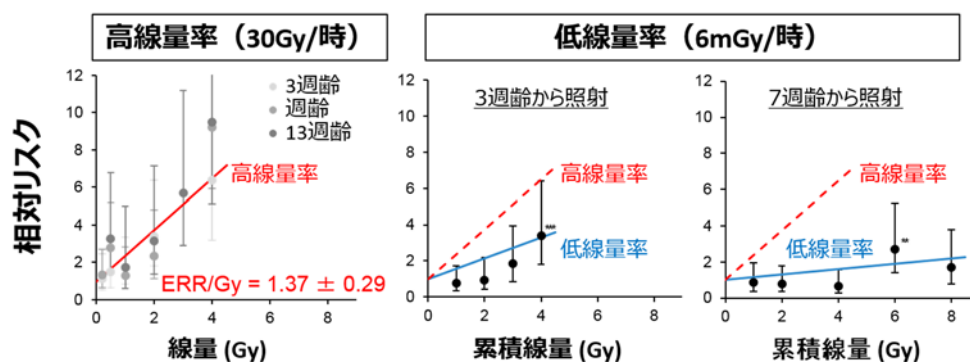


図 4-1 ラットの放射線誘発乳がんリスクの線量率効果 高線量率の 1Gy 当たりの相対リスク増加 (ERR/Gy) は 1.37 ± 0.29 、低線量率では 3 週齢で 0.39 ± 0.17 、7 週齢で 0.11 ± 0.07 (平均 \pm SE)。文献 1 のデータを再解析。

4-2. 今後の展望・将来の見通し

今後は、本研究で得られた成果をさらに発展させ、疫学と動物実験を統一的に解釈して、ヒトにおける低線量率放射線のリスク評価につなげることが必要である。それを実現するための将来の課題を、以下に挙げる。

- 》本研究を先例として、動物発がん実験で見られる線量率効果のメカニズムを、様々な観点から総合的に明らかにし、動物発がん実験の線量率効果をよく再現する数理モデルを構築する。
- 》こうして得られた知見について、ヒト組織、ヒト細胞を用いた検証実験や、ヒトにおけるパラメータ収集を行い、動物とヒトの整合性を確認しつつ、数理モデルのヒト化を行う。
- 》これらの、生物学的知見に立脚した数理モデルを用いて、動物発がん実験データとヒト疫学データを統一的に説明し、ヒトの被ばくリスクを予測する体系を確立する。
- 》上記のような研究については、放射線規制に関わる国際機関、国際組織において議論しつつ、国際的コンセンサスを得ながら推進し、放射線規制の科学的基盤への取り込みを図る。

参考文献

1. Imaoka T et al. Prominent Dose-Rate Effect and Its Age Dependence of Rat Mammary Carcinogenesis Induced by Continuous Gamma-Ray Exposure. *Radiat Res* 191(3): 245-254, 2019.