

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

(受託者) 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

(研究代表者) 今岡達彦 放射線影響研究部

(再委託先) 一般社団法人電力中央研究所、国立大学法人長崎大学

(研究期間) 平成28年度～30年度

1. 研究の背景とねらい

発がんの標的細胞は、組織幹細胞やそれに近い前駆細胞（まとめて幹細胞と呼ぶ。）であると考えられている。発がんの線量率効果（＝低線量率放射線のがんリスクが高線量率と比べて低いのか、低いとすればどのくらい低いのか）については、疫学研究による知見の不確実性が大きい。現状では、放射線作用の生物学的モデルと疫学を組み合わせ、低線量率のリスクを評価している。

近年、幹細胞生物学が進展し、発がん和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できていない。実際、2015年には国際放射線防護委員会（ICRP）が、幹細胞が発がんの線量率効果に関わっている可能性を指摘し、研究ニーズを提示している。

本研究では、幹細胞の動態（キネティクス）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細胞数等の変動や細胞競合に関する実験とシミュレーションを組み合わせ、線量率効果を説明する要因をいくつかのモデル臓器で明らかにする。

2. これまでの研究成果

1. 乳腺幹細胞における線量率効果の解析

乳腺は、放射線による発がん感受性の高い器官である。乳腺は、分岐しながら広がった管状の上皮からなる器官で、母乳を作る内腔細胞とそれを取り囲む基底細胞の2種類からなる（図1A）。これらは胎児期に存在する同一の幹細胞に起源を持ち、生後は主にそれぞれの前駆細胞によって成長し、維持される（図1B）。乳がんは内腔細胞から発生すると考えられる。これらの細胞は表面マーカーを用いたフローサイトメトリーによって分析できる（図1C）。

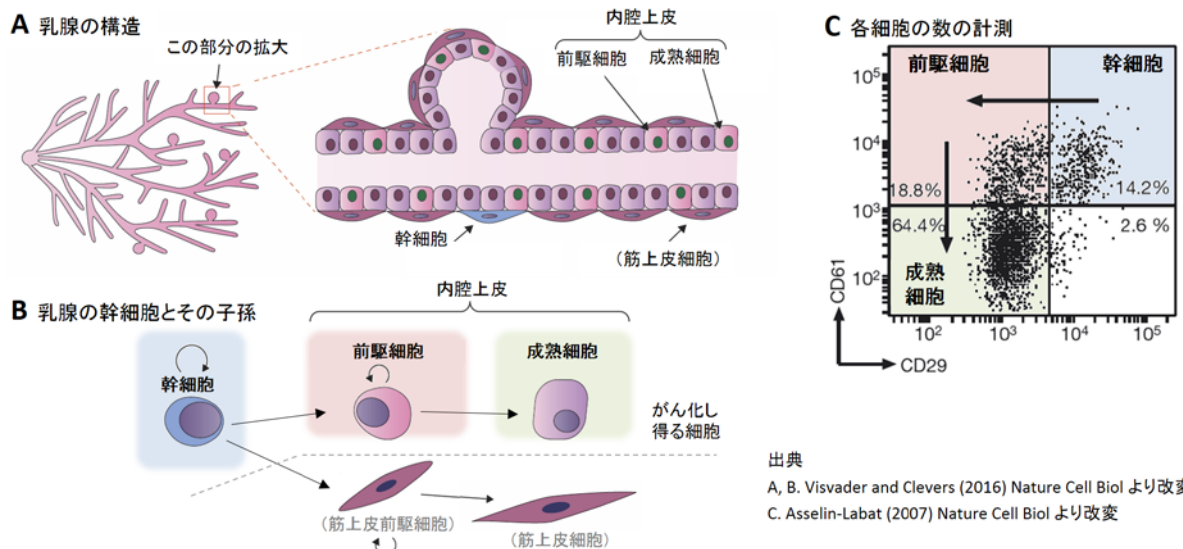


図1 乳腺の構造及びその幹細胞系

放射線発がん研究ではラット乳腺のデータが蓄積しているが、乳腺幹細胞研究が先行している生物種はヒト、マウスである。そこで、ヒト、マウスで知られる表面マーカーを元に、ラットの評価系を確立することを最初の目的とした。フローサイトメトリー実験でラット乳腺細胞に対して使用できる市販抗体を探索し、1) 基底細胞と内腔細胞を識別する抗体として CD49f、CD24 の組み合わせが、2) 内腔前駆細胞を識別するための抗体として CD61 が、3) 混入した血管内皮細胞、白血球を識別する CD31、CD45 が、それぞれ使用できることがわかった。これらを組み合わせて、基底細胞、内腔上皮細胞、成熟内腔細胞の分析に成功した (図 2 左)。また、ラット乳腺の三次元構造を保持したまま蛍光解析を行うための組織透明化に世界で初めて成功した (図 2 右)。

これらの成果は学会で報告した (工藤他、第 15 回幹細胞シンポジウム及び日本放射線影響学会第 60 回大会)。研究過程で得た乳腺幹細胞系に関する先行的知見は和文総説として出版した (今岡他、乳癌基礎研究 25: 15-25, 2017)。

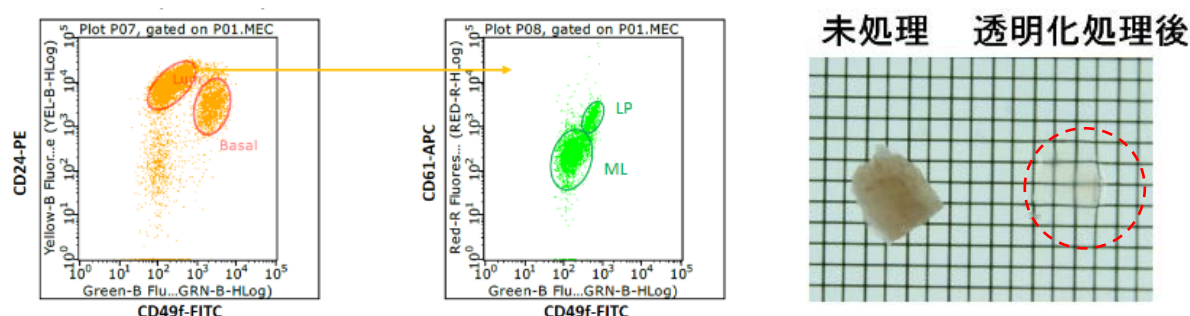


図 2 乳腺幹細胞系の解析法の確立

(左) フローサイトメトリーによる表面マーカーの解析。Basal: 基底細胞。Lum: 内腔細胞。LP: 内腔前駆細胞。ML: 成熟内腔細胞。(右) 透明化処理前後の乳腺組織片。赤い枠内が透明化した組織。格子は 2mm。

2. 消化管幹細胞における線量率効果の解析

消化管の発がんの起源は、Lgr5 というタンパク質を発現する幹細胞 (Lgr5⁺ 幹細胞) であることが知られる。消化管幹細胞の動態に対する放射線の影響を評価するため、Lgr5⁺ 幹細胞とその子孫細胞の動態を追跡する時期特異的遺伝子組換え技術 (図 3) を用いた。これまで、高線量率の放射線を照射した 3 日後において、大腸の Lgr5⁺ 幹細胞の一部が、新たに作られた (= de novo) Lgr5⁺ 幹細胞に入れ替わっていること、低線量率ではこの入れ替わりが少ないことを示した。

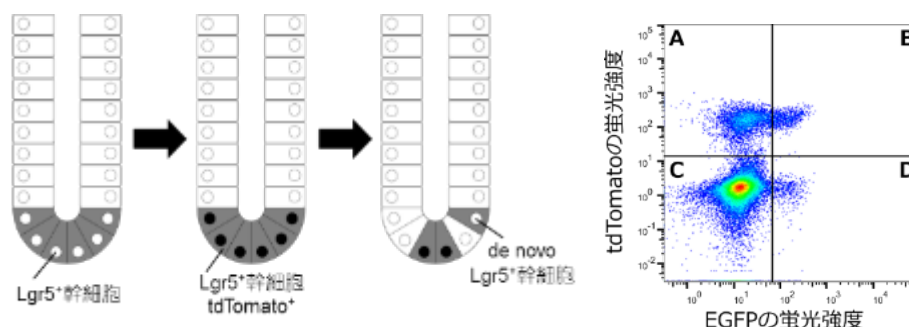


図 3 消化管幹細胞解析系の概念とデータ例

(左) 灰色は Lgr5⁺ 幹細胞。薬剤により Lgr5⁺ 幹細胞とその子孫に恒久的に tdTomato (蛍光タンパ

ク質)を発現させることができる(黒丸)。薬剤投与後に新たに作られた(de novo) Lgr5⁺細胞は tdTomato を発現しない。(右)フローサイトメトリーによる Lgr5 (x 軸) と tdTomato (y 軸) の発現量の解析例。B が tdTomato 標識された Lgr5⁺幹細胞。D が de novo Lgr5⁺幹細胞。

3. 甲状腺幹細胞における線量率効果の解析

甲状腺は、放射線による発がん感受性の高い器官である。甲状腺では、濾胞と呼ばれるブドウの房状の構造体が密に集合している。出生前までに活発な増殖を繰り返し、出生後は細胞の増殖がほとんど見られない。実際に、甲状腺濾胞を構成する上皮細胞は、大半が成熟細胞(分化マーカーであるサイログロブリンに陽性の細胞)であり、組織幹細胞が存在するとすれば、極少数の、サイログロブリン陰性細胞がその候補になると考えられる。そこで、サイログロブリンを検出する蛍光免疫染色の条件を最適化した(図4)。一方で、組織幹細胞は、放射線照射等により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、増殖細胞において特異的に取り込まれるチミジン類似体(Edu)を検出する条件を最適化した。

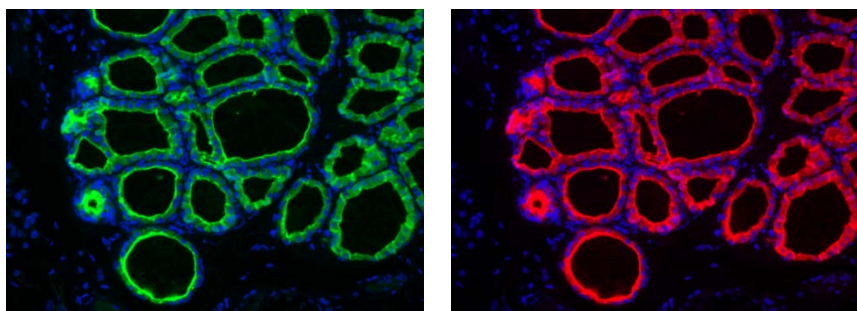


図4 蛍光免疫染色によるサイログロブリン発現の検出

ラット甲状腺組織から作成した組織切片でサイログロブリンの発現を検討した。左は抗サイログロブリン抗体クローン 2H11、右は同クローン EPR9730 による染色結果。

4. シミュレーションによる線量率効果の解析

本研究では、放射線照射に対する幹細胞系の細胞数等の時空間的な動態変化を推定する数理モデルを構築する。シミュレーション結果と実験結果の比較解析により、線量率の違いによる幹細胞の動態変化を理解し、幹細胞の動態と発がんとの関係性を評価する基礎とする。

幹細胞系の実例として、成長期の乳腺の先端に存在する末梢芽状突起(terminal end bud)を取り上げ、先行研究を参考にして、細胞レベルの2次元の空間的モデルを構築した。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、それぞれの細胞種への前駆細胞・成熟細胞へと分化、移動することとし、放射線が照射されていない通常の状態での各細胞の状態変化を仮定した(図5)。これを数理モデル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。しかし、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、簡略化と必要なデータの収集が検討課題として抽出された。また、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を設計した。

研究の成果は学会で報告した(服部他、日本放射線影響学会第60回大会)。

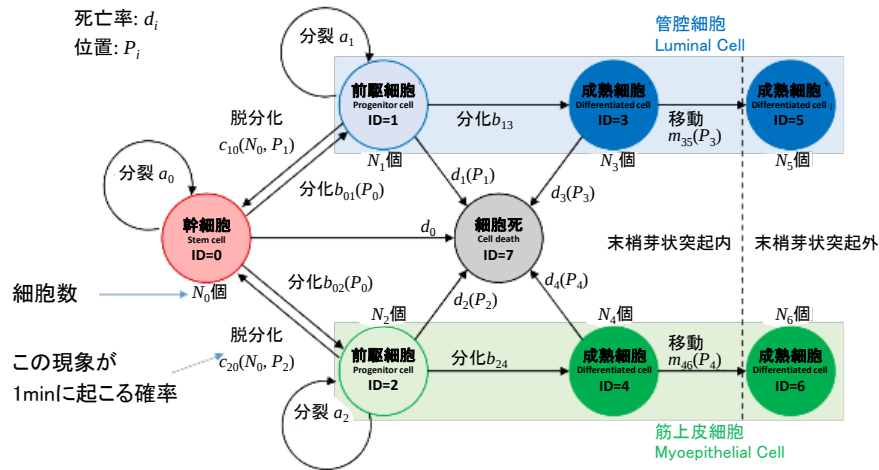


図5 乳腺幹細胞系の動態モデル構築例

ID は各細胞の状態を示す。各状態の細胞の個数 (N_i 個) は、分裂・分化の過程で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を反映する場合があるとした。

5. 今後の研究

幹細胞生物学的実験については、幹細胞系の動態評価の構築を進め、異なる線量率で照射した後の動態を評価していく。すなわち、乳腺については、放射線照射後の DNA 損傷、増殖等の動態を評価する実験系を検討し、異なる線量率で照射した後の動態評価を行う。また、照射された細胞とされない細胞の間に競合が検出されるかどうかを、組織透明化の実験系を用いて検討する。消化管については、細胞周期を評価する実験系を構築し、照射後の細胞周期変化を検討する。甲状腺については、DNA 損傷と細胞増殖の解析条件を最適化し、照射後の動態を検討する。

シミュレーション研究については、乳腺モデルのパラメータ数を減らす簡略化の検討とデータ収集、放射線応答に対するモデル化を進める。DNA 損傷モデルのパラメータの探索と決定・モデルの改良を進め、線量率と線量の影響の計算に適用する。

6. 参考文献

- (1) Imaoka T., Hisatsune H., Sakanishi Y., Nishimura Y., Nishimura M. and Shimada Y. Progesterone stimulates proliferation of a long-lived epithelial cell population in rat mammary gland. J. Endocrinol. Invest., 35, 828 (2012).
- (2) K. Otsuka, N. Hamada, J. Magae, H. Matsumoto, Y. Hoshi, T. Iwasaki. Ionizing radiation leads to the replacement and de novo production of colonic Lgr5⁺ stem cells. Radiat. Res. 179, 637-646 (2013).
- (3) Suzuki K., Mitsutake N., et al. Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. PLoS One, 6, e19354 (2011).
- (4) Y. Hattori, A. Yokoya, R. Watanabe. Cell Automaton Based Model for Radiation-Induced Bystander Effect. BMC Sys. Biol. 9p. 90 (2015).