

乳腺上皮組織塊を得、さらにトリプシン及びDNアーゼIにより単一細胞に解離した。

細胞凝集塊の形成の評価：乳腺上皮細胞にガンマ線を非照射もしくは100mGy～8Gyで急照射(0.5Gy/分、室温)した。100mGyに関しては低線量率照射(1mGy/分、100分、室温)も行った。照射後、マンモスフィア形成条件にて1週間培養して一次細胞凝集塊を得、ウェル全体の画像上で数を測定した。一部の実験ではこの間、増殖評価のため5-ブromo-2'-デオキシウリジン(BrdU, 10μM)を培地に添加した。一次細胞凝集塊を再度トリプシン処理して単一細胞に解離し、マンモスフィア形成条件でさらに1週間培養し、二次細胞凝集塊の形成を評価した。

細胞凝集塊の分化能の評価：一次細胞凝集塊を分化誘導条件に移してさらに1週間培養し、固定した細胞でサイトケラチン14及び18の蛍光免疫染色を行った。

移植再生能の評価：3週齢ラットの下腹部乳腺脂肪体から未成熟な乳腺原基を廓清し、残った脂肪体に50%マトリゲルとともに細胞を注入した。3週間後に脂肪体ホルマウント標本を作製し、再生組織の有無を実体顕微鏡によって観察した。

(倫理面への配慮) 実験動物の使用に関しては、放射線医学総合研究所動物実験委員会にて承認された計画に基づき、動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所諸規程・基準を遵守して実施した。

### III 研究結果

#### 1. DNA 損傷細胞の追跡実験

ラットを用いてDNA損傷細胞を追跡する実験の予備検討を行った。特定の細胞周期にある細胞のみを評価することを避ける観点からEdUを1日に3回投与したが、顕著な毒性が観察されなかった点で、今回の投与量は適切であると考えられた。また、照射後のラットから経時的に採取した組織について、91枚のHE染色標本電子画像及び240枚の未染色標本を作製して、長崎大学に提供した。今後、EdU、DNA損傷、アポトーシスの検出を行い、適切な解析数を検討する。

細胞凝集塊中の幹細胞でDNA損傷を追跡する計画に関しては、今年度は次項の解析を行い、今後の方針を考察の節に記載した。

#### 2. 細胞凝集塊の特徴解析

細胞凝集塊の形成過程で培地に添加したBrdUは7割程度の細胞に取り込まれたが、取り込まない細胞も一定程度必ず含まれていたため、細胞凝集塊の形成には細胞増殖とともに凝集も関与していると考えられた。サイトケラチン14及び18は、組織標本ではそれぞれ筋上皮細胞及び管腔細胞に存在した。細胞凝集塊ではほとんどの細胞が筋上皮様(サイトケラチン14のみ陽性)で、一部がサイトケラチン14及び18両陽性を示し、管腔様細胞(サイトケラチン18のみ陽性)は非常に少なかった。両陽性細胞は、筋上皮及び管腔細胞に分化可能な両能性細胞であると推定される。分化誘導条件に置かれた細胞凝集塊では、筋上皮様細胞ばかりでなく管腔様細胞も生成された。このことは、細胞凝集塊中に管腔細胞への分化能を有する細胞が存在することを支持しており、両陽性細胞が両能性を有するという推定と整合する。一方、移植再生能を指標とした場合、乳腺上皮細胞を100個移植した部位では9部位中に8部位、300個移植した9部位中では7部位で再生が見られたが、細胞凝集塊から単離した細胞を100個移植した9部位中では0部位、300個移植した11部位中では5部位に再生が見られた。すなわち、細胞凝集塊には高い移植再生能を示す細胞(幹細胞)は濃縮されていないと考えられる。以上の結果から、細胞凝集塊は幹細胞が増殖して形成されたクローンではなく、筋上皮細胞と移植再生能の低い両能性細胞(ここでは両能性前駆細胞と呼ぶことにする)が増殖しながら凝集して形成されたものであると考えられる。

#### 3. 照射後の細胞凝集塊形成

昨年度の結果では、100mGy～8Gy照射した乳腺上皮細胞から一次細胞凝集塊が形成される効率は

照射によりあまり低下しない（すなわち照射による細胞致死効果は低い）ことが示された。本年度はこれを反復して、同一の結果が得られることを確認した。非照射の場合を1とした相対的な細胞凝集塊形成率  $S$  は線量  $D$  の関数  $S = e^{-\alpha D}$  ( $\alpha = 0.04 \pm 0.01$ , 平均±標準誤差) で近似された。細胞凝集塊の大きさは照射の影響を受けなかった。100mGy の効果は線量率に依存しなかった。また、こうして形成された細胞凝集塊を分散し、再度培養することで形成された二次細胞凝集塊の大きさは、一次細胞凝集塊よりも小さかった。二次細胞凝集塊の形成効率についても、100mGy～8Gy の照射による顕著な変化は認められなかった ( $S = e^{-\alpha D}$ ,  $\alpha = 0.05 \pm 0.06$ )。100mGy の効果は線量率に依存しなかった。以上のように、100mGy～8Gy の照射は筋上皮細胞と両能性前駆細胞の生存及び凝集効率を大きく低下させず、二次細胞凝集塊の形成に対する放射線の遅延的影響の証拠は得られなかった。

#### 4. 照射後の細胞凝集塊の分化能

非照射もしくは100mGy から8Gy 照射した乳腺上皮細胞から作成した細胞凝集塊を分化誘導条件に1週間置き、回収した。今後、サイトケラチン14及び18の免疫染色を実施する予定である。

### IV 考察

本年度は個体におけるDNA損傷細胞の追跡実験を新たに立ち上げた。細胞凝集塊は、移植再生能を有する幹細胞がクローナルに増殖した細胞集団ではなく、筋上皮細胞と両能性前駆細胞が増殖しながら凝集して形成されたものであることが示唆された。一次細胞凝集塊の形成は照射によってわずかに低下し、生存した細胞による二次細胞凝集塊の形成において照射の影響は残存していなかった。

今回得られた結果は、細胞凝集塊が、増殖及び凝集を経た筋上皮細胞及び両能性前駆細胞であることを示唆した。放射線誘発ラット乳がんの多くは筋上皮細胞と管腔細胞の両者を含むことから<sup>7)</sup>、両能性を有する細胞が発がんの標的細胞であると考えられる。細胞凝集塊を研究対象とする場合は、幹細胞についての情報を得るためのモデルではなく、両能性前駆細胞のモデルとして扱う必要がある。

今回、一次及び二次細胞凝集塊の形成を指標とすると、照射の影響はほとんど見られなかった。これに対し、個体への移植再生能を指標とすると照射の影響は顕著である（文献<sup>8)</sup>及び未発表データ）。細胞凝集塊の形成において幹細胞以外の細胞が凝集していることを考えると、その形成に照射が大きく影響しないことは不思議でない。今後、照射後に形成された細胞凝集塊の性質（分化能等）が非照射の場合と異なるかどうかを検討する必要がある。

DNA損傷細胞の運命を追跡する実験系としては、個体における細胞追跡の実験系のほか、細胞凝集塊中の幹細胞を可視化して追跡する実験系を計画していた。今回、細胞凝集塊内に幹細胞系のターンオーバーが存在するとは考えにくいことが明らかになった。細胞追跡の実験系としては個体を用いるのが適切と判断される。

### V 結論

損傷細胞の追跡実験を立ち上げた。乳腺上皮細胞凝集塊モデルは、筋上皮細胞と両能性前駆細胞が増殖しながら凝集したものであることが示唆された。一次細胞凝集塊の形成は照射によってあまり低下せず、生存した細胞による二次細胞凝集塊の形成も照射の影響を受けなかった。今後、照射後に形成された細胞凝集塊の性質（分化能等）が非照射の場合と異なるかどうかを検討すること、個体内でDNA損傷細胞を追跡することが必要である。

### VI 次年度以降の計画

次年度は、個体の実験系でDNA損傷細胞の運命を追跡する。また、照射後に形成された細胞凝集塊の分化能を評価する。これまで得られた情報をもとに、細胞のターンオーバー変化が変異細胞数の

線量効果関係に及ぼす影響を数理的に解析する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

細木彩夏、今岡達彦、小川真里、西村由希子、山田裕、島田義也 ラット乳腺未分化細胞評価系の構築～低線量率放射線被ばくの影響解明に向けて～ 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸市、2013 年 12 月。

引用文献

- 1) International Commission on Radiological Protection. The 2007 Recommendation of the International Commission on Radiological Protection, *Annals of ICRP* 2007; 35
- 2) International Commission on Radiological Protection. Low-dose Extrapolation of Radiation-related Cancer Risk, *Annals of ICRP* 2005; 35
- 3) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work, United Nations, 2012
- 4) National Council on Radiation Protection and Measurements. Uncertainties in the estimation of radiation risks and probability of disease causation, NCRP Report No. 171, 2012
- 5) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiation Research* 2010; 174: 833-839
- 6) Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells, *Genes and Development* 2003; 17: 1253-1270
- 7) Imaoka T, Nishimura M, Iizuka D, et al. Pre- and postpubertal irradiation induces mammary cancers with distinct expression of hormone receptors, ErbB ligands, and developmental genes in rats. *Molecular Carcinogenesis* 2011; 50: 539-552
- 8) Gould MN and Clifton KH. The survival of mammary cells following irradiation in vivo: a directly generated single-dose-survival curve, *Radiation Research* 1977; 72: 343-352

# Evaluation of accumulation of low dose/low dose rate radiation effects on mammary stem cells

Tatsuhiko Imaoka<sup>\*1</sup>, Ayaka Hosoki<sup>\*1</sup>, Kazuhiro Daino<sup>\*1</sup>, Isao Kawaguchi<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>*National Institute of Radiological Sciences*

*Keywords:* Tissue stem cells; Mammary gland; Cellular radiation effect; Turnover

## **Abstract**

The Fukushima Daiichi nuclear power plant accident has provoked nationwide concern about the health risks of radiation. The goal of the present project is to offer a novel scientific basis for improvement of radiation risk estimation, and specifically, the study aims at evaluating radiation effects on tissue stem cells. This year, the mammosphere model, which is generally regarded as stem/progenitor cells of the mammary gland, was characterized further and used for evaluation of radiation effects on its formation. Our results suggest that the mammosphere was not a colony of mammary stem cells but rather an aggregation of cells containing proliferating cells and bipotent progenitors. Irradiated cells did not show substantial reduction in their ability to form mammospheres. These mammospheres consisted of cells that show unaffected capacity to form secondary mammospheres. Furthermore, a new experiment was started to track tissue cells having DNA damages. The subsequent year will be devoted to completion of this new experiment, to evaluation of radiation effects on the differentiation potential of the cells consisting mammospheres formed from irradiated cells, and further, to mathematical analysis of results hitherto obtained.

# 研究課題名 「低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の放射線障害の蓄積に関する研究」

## 研究項目名 「消化管幹細胞に対する放射線応答の線量率効果の評価」

大塚 健介

一般財団法人電力中央研究所 原子力技術研究所 放射線安全研究センター 主任研究員

### 研究要旨

低線量率放射線被ばくによるがんリスクの推定は、高線量率放射線のがんリスクをもとに推定せざるをえないが、生物学的には同じ集積線量でも線量率が異なれば生物効果が異なる「線量率効果」が知られており、そのため低線量率・低線量放射線による発がんリスクを考えるにあたっては、発がんの標的細胞における線量率効果の機構を生物学的に理解することが必要である。近年、発がんの標的が組織幹細胞であることが報告されたことから、本研究では、組織幹細胞に対する線量率効果を、幹細胞への障害の蓄積性の観点から明らかにすることを目的とした。消化管幹細胞マーカーとして知られる *Lgr5* 幹細胞と、その子孫細胞を標識させる幹細胞系譜追跡法を用いて同じ集積線量 (1 Gy) を照射したマウスにおいて、*Lgr5* 幹細胞ターンオーバー誘発に対する高線量率 (30 Gy/時) および低線量率放射線 (0.003 Gy/時) による影響を調べた。その結果、高線量率放射線照射で観察されたターンオーバーの誘発が、低線量率放射線照射では検出されず、線量率効果が観察された。幹細胞における線量率効果の機構を探るために、組織幹細胞における放射線誘発 DNA 損傷の蓄積の有無を DNA 二本鎖切断部位への 53BP1 タンパクの集積により評価した。このとき、DNA 損傷を有した幹細胞が入れ替わるかを確認するために、EdU による細胞標識を組み合わせて行った。本年度は、EdU 標識によって DNA 損傷を有した幹細胞の入れ替わりや、幹細胞への DNA 損傷の残存を評価するための実験条件の確認を行った。

キーワード: 低線量率、線量率効果、消化管、組織幹細胞、DNA 損傷、EdU

### I. 研究目的

低線量率放射線被ばくによる発がんリスクの推定は、疫学単独では統計学的な制約から限界があるため、高線量率放射線のがんリスクをもとに推定せざるをえない。しかしながら、生物学的には同じ集積線量でも線量率が異なれば生物効果が異なる「線量率効果」があることが知られている。そのため、低線量率・低線量放射線による発がんリスクを推定する際には、(1) 発がんの標的細胞に対して線量率効果が観察されるのかを確認すること (2) 線量率効果が観察される場合にはその機構を生物学的に理解することが重要な課題である。近年、固形がんが突然変異を起こした正常な組織幹細胞に由来すること、すなわち、発がんの標的細胞が組織幹細胞であることが報告された<sup>1)</sup>。また、組織幹細胞は組織細胞を維持するために生涯にわたって組織に存在するため、組織幹細胞に対して放射線障害がどの程度蓄積するのか、そして蓄積しない場合に放射線障害が組織からどのように排除され補われるのかを明らかにすることが、放射線発がんのリスクを評価するための直接の指

標になると考えられる<sup>2)</sup>。そこで、本研究では、組織幹細胞に対する線量率効果を、幹細胞への障害の蓄積性の観点から明らかにすることを目的とした。

## II. 研究方法

### 供試動物

組織幹細胞に対する放射線影響を評価するために、消化管幹細胞マーカーとして知られる *Lgr5* 幹細胞において、タモキシフェン (4OHT) の投与に依存して時期特異的に組換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子 (*LacZ*) で標識させる幹細胞系譜追跡法 (Lineage tracing) が適用可能なマウス (*Lgr5-creERT2* x *ROSA26-LacZ* マウス, 以下 LRZ マウス)<sup>3)</sup>を用いた (図 1A)。マウスはイノケージを用いた飼育環境で繁殖を行った。10~14 日齢の LRZ マウスに対し、10 mg/ml の 4OHT (Sigma, #H6278) を 3 mg/40g 体重になるように単一腹腔内投与した。離乳時に耳片を採取し、ゲノム DNA を抽出してジェノタイプピングを行い、ノックインアリルを有する個体のみをターンオーバーの評価実験に用いた。

### 高線量率 X 線照射および低線量率ガンマ線照射

動物への高線量率放射線照射は、X 線照射装置 (Hitachi, MBR-320R) を用いて行った。260 kV, 4.5 mA, 0.5 mm Al + 0.3 mm Cu フィルタの条件で照射し、照射位置線量率は 30 Gy/時であった。マウスは専用のアクリルホルダーに収容して照射を行った。同じホルダーに収容して偽照射を行ったマウスを対照群とした。

動物への低線量率放射線照射は、電力中央研究所放射線安全研究センターが保有する低線量率ガンマ線長期照射施設 (137Cs 線源) にて実施した。低線量率放射線の線量測定は、蛍光ガラス線量計素子 GD-301 (旭テクノグラス株式会社) を用いて行った。線量率は、あらかじめ照射条件と同じマウスケージ (前後左右、合計 4 か所) にガラス線量計を貼り付け、照射後の線量計の読み値からマウスケージ中心の空間線量率が平均 0.003 Gy/時になる場所を照射位置とした。いずれの照射群も、照射期間が異なるため、それぞれに対照群を置いた。低線量率長期照射群の対照群は、同じ長期照射施設線源の背後で、さらに 60cm の鉛コンクリートで遮蔽した場所に置いたラック (線量率はバックグラウンド相当) にて同期間飼育したものとした。

### LacZ 発現を指標としたターンオーバー誘発割合の評価法

LRZ マウスから大腸を摘出して切開し、固定した大腸組織を、X-gal 染色液にて一晩発色させて *LacZ* 発現クリプトを染色した。再固定後にパラフィン包埋し、クリプトの伸長方向と垂直になるように組織切片を作製した (図 1B)。切片はエオシン染色により対比染色を行った。スライド中の測定した全クリプトのうち、*LacZ* 標識されたクリプトの割合を求めた。対照群と比較して、照射によって *LacZ* 陽性クリプトが統計学的有意に減少した場合にターンオーバーの誘発が起こったものと評価した。

### 蛍光抗体染色

マウスの十二指腸および大腸を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンブロックに包埋した後、組織切片を作製した。また、組織単位の細胞動態を詳細に解析するために、50mM EDTA/PBS 溶液に 30 分浸漬させ、クリプトのみを単離してホールマウント試料

とした。蛍光抗体染色のために、抗 GFP 抗体 (Abcam, Chicken anti-GFP antibody)、抗 53BP1 抗体 (Bethyl, anti-53BP1 antibody) を用いた。

#### EdU を用いた細胞標識法

組織細胞への DNA 損傷の蓄積と、細胞のターンオーバー動態を評価するために細胞標識実験を行った。細胞標識には、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Life Technologies, #E10187) を用いた。EdU は PBS にて 3 mM の濃度に調製し、マウス当たり 350 $\mu$ l ずつ単一腹腔内投与した。EdU により標識したマウス組織切片もしくはホールマウント組織は、Click-iT EdU Imaging Kit (Life Technologies) により蛍光標識し、レーザー共焦点顕微鏡 (Nikon, C1) を用いて蛍光画像を取得した。

#### 統計処理

LacZ 陽性クリプトの割合は、各群の個体ごとに得たクリプト数を合算し、対照群と照射群との間で、カイ二乗検定を行った ( $\alpha=0.05$ )。その他の 2 群間の検定には、Student の t 検定を用いた ( $\alpha=0.05$ )。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、当所が開催した動物実験委員会で定める「動物実験および実験動物取扱規則」に基づき動物愛護の観点から審査が行われ、研究計画の承認をもって実施した。

### III. 研究結果

LRZ マウス (1 週齢) に 4OHT 投与 1 か月後に、1 Gy の高線量率 (30 Gy/時) 照射を約 2 分間、もしくは低線量率 (0.003 Gy/時) ガンマ線を約 14 日間 (330 時間) 照射し、照射終了から 2 週間後の大腸組織の幹細胞ターンオーバー頻度を測定した。結果を表 1 に示す。高線量率照射群における対照群マウス ( $n=6$ ) では、LacZ 陽性クリプト割合が  $2.23 \pm 0.74\%$  となり、これまでの実験結果とほぼ同じ値を示した。一方、1 Gy 照射マウス ( $n=7$ ) の LacZ 陽性クリプト割合は、 $1.70 \pm 0.44\%$  となった。群内の全クリプト数と群内の全 LacZ 陽性クリプト数に対して、カイ二乗検定を行ったところ、カイ二乗値が 9.43 で、統計学的有意差は、 $p=0.002$  となったため、照射によって LacZ 陽性クリプト数が有意に減少することが明らかになった。

一方、低線量率照射群における対照群マウス ( $n=6$ ) では、LacZ 陽性クリプト割合が  $2.11 \pm 0.81\%$  となり、高線量率の対照群とほぼ同じ値を示した。この低線量率ガンマ線を 1 Gy 連続照射したマウス ( $n=15$ ) では、LacZ 陽性クリプト割合が  $1.97 \pm 0.79\%$  となり、LacZ 陽性クリプト割合に若干の低下傾向が認められた。群内の全クリプト数と群内の全 LacZ 陽性クリプトの間でカイ二乗検定を行ったところ、カイ二乗値が 0.25 で、統計学的有意差は、 $p=0.61$  となり、低線量率放射線の場合にはターンオーバーの誘発に有意な差が認められなかった。

低線量率放射線の照射後のターンオーバー遅延を観察するために、0.003 Gy/時のガンマ線を 2 週間照射し、照射終了直後 (0 日目) の LacZ 陽性クリプト割合を求めた。5 匹のマウスから測定した全クリプトは 12,158 個であり、そのうち LacZ 陽性クリプトは 241 個であった ( $2.08 \pm 0.70$ )。照射終了後 2 週間経過したマウスの LacZ 陽性クリプト割合とのカイ二乗値は 0.48 であり、統計学的有意差は認められなかった ( $p=0.49$ )。

次に、幹細胞における DNA 損傷修復動態を明らかにするために、DNA 損傷修復タンパクの一つである 53BP1 に着目した。53BP1 は DNA 損傷部位に集積（フォーカス形成）して、損傷修復後に消失する（修復されるまで細胞に残存する）ため、組織細胞における DNA の修復能を反映する良い指標であることが報告されている<sup>4)</sup>。本年度は、クリプトにおける Lgr5 陽性幹細胞（EGFP 発現細胞）において細胞あたりの 53BP1 のフォーカスがどれくらい変化するかを確認した。1 Gy の X 線を照射 1, 1.5, 2, 3, 6 時間後に解剖し、ホールマウント染色したクリプトで、EGFP を発現する細胞における 53BP1 フォーカス数を調べた（図 2A）。対照群マウスの場合、EGFP を発現する Lgr5 陽性細胞においてバックグラウンドレベルの 53BP1 フォーカスは観察されなかった。1 Gy を照射すると、クリプト内のすべての細胞にほぼ均一に 53BP1 フォーカスが観察された。EGFP を発現する Lgr5 陽性幹細胞では、照射 60 分後では核あたり  $2.1 \pm 1.8$  個のフォーカスが存在した（図 2B）。照射 90 分後では  $4.0 \pm 1.4$  個に増加したが、照射から 120 分後では  $2.3 \pm 2.1$  個と減少した。その後、3 時間後でも  $2.3 \pm 0.8$  個と変わらず、6 時間後でも  $1.8 \pm 0.4$  個とフォーカスの残存が認められた。

次に、EdU による細胞標識によって DNA 損傷の修復と幹細胞ターンオーバーの関係を評価するための実験を行った。最初に、EdU を単一腹腔内投与（パルスラベル）することで、腸管のどの位置の細胞が標識されるかを投与から時間を追って検討した。EdU 投与から、8 時間、24 時間、44 時間後に解剖し、組織切片を用いて十二指腸、大腸で EdU 標識細胞の位置を確認したところ、標識から 8 時間後ではクリプト底部よりもクリプト上部の細胞が多く標識された（図 3）。EdU 標識された細胞は、24 時間、44 時間と時間が経過するにつれて、クリプトから離れた位置で観察された。クリプト内の EdU 標識細胞の位置を詳細に観察するために、クリプトのホールマウント染色を行った。クリプトでは EdU 投与 4 時間後から EdU 陽性細胞が検出可能であった。図 4 には EdU 投与 4 時間後に解剖し、クリプトにおける Lgr5 陽性幹細胞を抗 GFP 抗体にて標識したものと、EdU 発色を行った蛍光画像を示す。十二指腸の場合、クリプトあたりの Lgr5 陽性幹細胞数は  $9.0 \pm 1.6$  個であった（ $n = 5$ ）。EdU 標識された細胞のうち、EGFP を発現していたものは 1.8% であり、Lgr5 幹細胞のうち EdU 標識された細胞は 6.7% であった。大腸の場合、クリプトにあたりの Lgr5 陽性幹細胞数は  $4.8 \pm 3.0$  個であった（ $n = 6$ ）。EdU 標識された細胞のうち、EGFP を発現していたものは 8.7% であり、Lgr5 幹細胞のうち EdU 標識された細胞は 37.9% であった。

#### IV. 考察

我々は、LRZ マウスを用いたこれまでの研究で、1 Gy の高線量率 X 線照射によって大腸幹細胞が消失し、その後、新しい Lgr5 幹細胞が作られる（すなわち、ターンオーバーが誘発される）ことを見出した<sup>5)</sup>。これまでは、統計学的検出精度を優先した実験条件としてきたが、本年度は、長期間におよぶ低線量率照射実験を見据えて、長期間経過後もラベル効率が安定して評価できる条件で実験を行った。さらに、低線量率放射線によるターンオーバーの誘発が照射直後から時間が経過することで生じるかを明らかにするため、1 Gy の連続照射（約 2 週間）の照射直後と 2 週間後を観察したが、2 週間経過による LacZ 陽性クリプトの減少割合は 5%（ $1.97/2.08$ ）程度であり、統計学的な有意差は認められなかったため、ターンオーバー誘発の遅延を考慮する必要はなさそうであった。一方、我々は LRZ マウスに 1 週齢で 4OHT を投与することで、200 日間の長期にわたって LacZ 陽性クリプトが一定レベル（約 2%）のまま推移することも明らかにしている<sup>6)</sup>。これらの知見を総合的に勘案して、我々は 4OHT をマウス 1 週齢にて投与し、投与から 1 か月後に照射を行い、照

射終了後から2週間後に解剖する実験条件で研究を進めることとした。

高線量率放射線と比べて、低線量率放射線では大腸幹細胞のターンオーバーが誘発されにくく、明確な線量率効果が観察された。本研究結果が示唆するように、低線量率放射線が消化管幹細胞のターンオーバーを刺激せずに幹細胞プールを維持することは、低線量率連続被ばくによって組織幹細胞にDNA損傷が蓄積するかを評価することが重要であることを意味する。クリプト細胞のDNA損傷修復動態については、Huaらが高線量照射後の回復として詳細に観察している<sup>7)</sup>。γ-H2AXのフォーカス数を指標として、12 Gy照射後の数を調べると、Lgr5幹細胞(CBC)では、照射直後から増加し、60分後にフォーカス数のピークが観察されている。その後、急速に減少したが、DNA二本鎖切断修復タンパク(BRCA1, RAD51)のフォーカス形成は照射後1~2時間でピークを維持してから、数十時間をかけて減少した<sup>7)</sup>。一方、前駆細胞(TA)では、フォーカスの消長が幹細胞(CBC)に比べて遅れて生じており、DNA損傷修復効率が低いことが知られている<sup>7)</sup>。本研究で得られた53BP1フォーカス数で評価した予備的な結果では、90分をピークにフォーカス数の減少傾向が認められた。現段階では1つのクリプト内での評価のみであるため、今後、測定するクリプト数を増やし、TA細胞のDNA損傷修復動態と比較するとともに、さらに長期的に観察する必要がある。

EdUはDNAのチミジンアナログであり、検出の簡便性から近年よく用いられる細胞標識薬剤である<sup>8)</sup>。これを用いて標識された細胞のDNA損傷が残存するかを評価することが可能である。EdUをパルスラベルした場合に取り込まれる細胞の大部分は、十二指腸の場合はLgr5を発現する幹細胞以外の細胞であったが、これはパルスラベルの場合に幹細胞よりも細胞周期の早いTAに選択的に取り込まれるためと考えられた。一方、大腸ではEGFP陽性幹細胞でEdUの取り込みを起こすものが十二指腸に比べて多かった。大腸ではクリプトあたりのLgr5幹細胞数が少ないために、バックグランドレベルで細胞に増殖刺激が働いている可能性があるかもしれない。大腸幹細胞ターンオーバーの機構を明らかにする上で、EdUで標識される細胞が大腸で多いという結果は、EdU標識された細胞を追跡するという点で好都合であると考えられる。大腸ではEGFP陽性幹細胞を有するクリプトの頻度が極めて低い(約1%程度)のために、本研究では、十二指腸の幹細胞でのみDNA損傷修復動態を評価したが、今後は大腸の幹細胞においても同様に検証することで、低線量率・低線量放射線の組織への蓄積度を定量的に評価できるものと期待される。

## V. 結論

本研究により、幹細胞ターンオーバーの線量率効果があることが明らかとなり、その機構としてDNA損傷の蓄積を指標とした解析が可能になった。線量率が異なる場合に幹細胞の放射線発がんリスクへの寄与を推定できれば、高線量被ばくの外挿で放射線発がんリスクを推定することの正当性に対する問いかけとなり、また、100 mGyを下回る低線量域での最適な放射線防護を考えることに役立つことが期待される。

## VI. 次年度以降の計画

本年度の成果をもとに、次年度は幹細胞ターンオーバー誘発の機構として、幹細胞におけるDNA損傷の修復動態をEdU標識と組み合わせて評価する。これによって、幹細胞に対する障害蓄積性を明らかにする。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

1. Otsuka K Iwasaki T. Dose-rate Effect on Radiation-induced Turnover of Intestinal Stem Cells Determined by Lgr5 Lineage Tracing. *Submitted*.
2. Yamauchi M, Otsuka K, Kondo H, et al. A novel in vitro survival assay of small intestinal stem cells after exposure to ionizing radiation. *J Radiat Res in press*.
3. Otsuka K Hamada N Magae J, et al. Ionizing radiation leads to the replacement and *de novo* production of colonic Lgr5<sup>+</sup> stem cells, *Radiat Res* 2013; 179: 637-646.
4. Takahashi M Tsujimura N Otsuka K, et al. Comprehensive evaluation of leukocyte lineage derived from human hematopoietic cells in humanized mice, *J Biosci Bioeng* 2012; 113: 529-535.
5. Hamada N Maeda M Otsuka K, et al. Signaling pathways underpinning the manifestations of ionizing radiation-induced bystander effects, *Curr Mol Pharmacol* 2011; 4: 79-95.
6. Matsumoto H Tomita M Otsuka K, et al. Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses, *Curr Mol Pharmacol* 2011; 4: 126-134.
7. Otsuka K Hirabayashi Y Tsuboi I, et al. Regeneration capability of Lin<sup>-</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> cells with or without radiation exposure for repopulation of peripheral blood in lethally irradiated mice monitored using Ly5.1 isotype on days 35, 90, and 270 after transplantation, *Exp Hematol* 2010; 38: 417-425.
8. Matsumoto H Tomita M Otsuka K, et al. A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam research, *J Radiat Res* 2009; 50(Suppl.A): 67-80.
9. Jeong JH Nakajima H Magae J, et al. Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents, *Int J Cancer* 2009; 124: 2797-2803.
10. Matsumoto H Tomita M Otsuka K, et al. A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam research, *J Radiat Res* 2009; 50(suppl. A): 67-80.
11. Tomita M Morohoshi F Matsumoto Y, et al. Role of DNA double-strand break repair genes in cell proliferation under low dose-rate irradiation conditions, *J Radiat Res* 2008; 49(5): 557-564.
12. Otsuka K Koana T Tomita M, et al. Rapid myeloid recovery as a possible mechanism of wholebody radioadaptive response, *Radiat Res* 2008; 170: 307-315.

引用文献

- 1) Barker N Ridgway RA, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer, *Nature* 2009; 457: 608-611.
- 2) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiat Res* 2010; 174: 833-839.
- 3) Barker N van Es JH Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*, *Nature* 2007; 449: 1003-1007.
- 4) Suzuki K Nakashima M Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue, *Radiat Res* 2010; 174: 415-423.
- 5) Otsuka K Hamada N Magae J, *et al.* Ionizing radiation leads to the replacement and de novo production of colonic *Lgr5*<sup>+</sup> stem cells, *Radiat Res* 2013; 179: 637-646.
- 6) Otsuka K Iwasaki T. Dose-rate Effect on Radiation-induced Turnover of Intestinal Stem Cells Determined by *Lgr5* Lineage Tracing. Submitted.
- 7) Hua G Thin TH et al. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology* 2012; 143: 1266-1276.
- 8) Salic A Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2008; 105: 2415-2420.

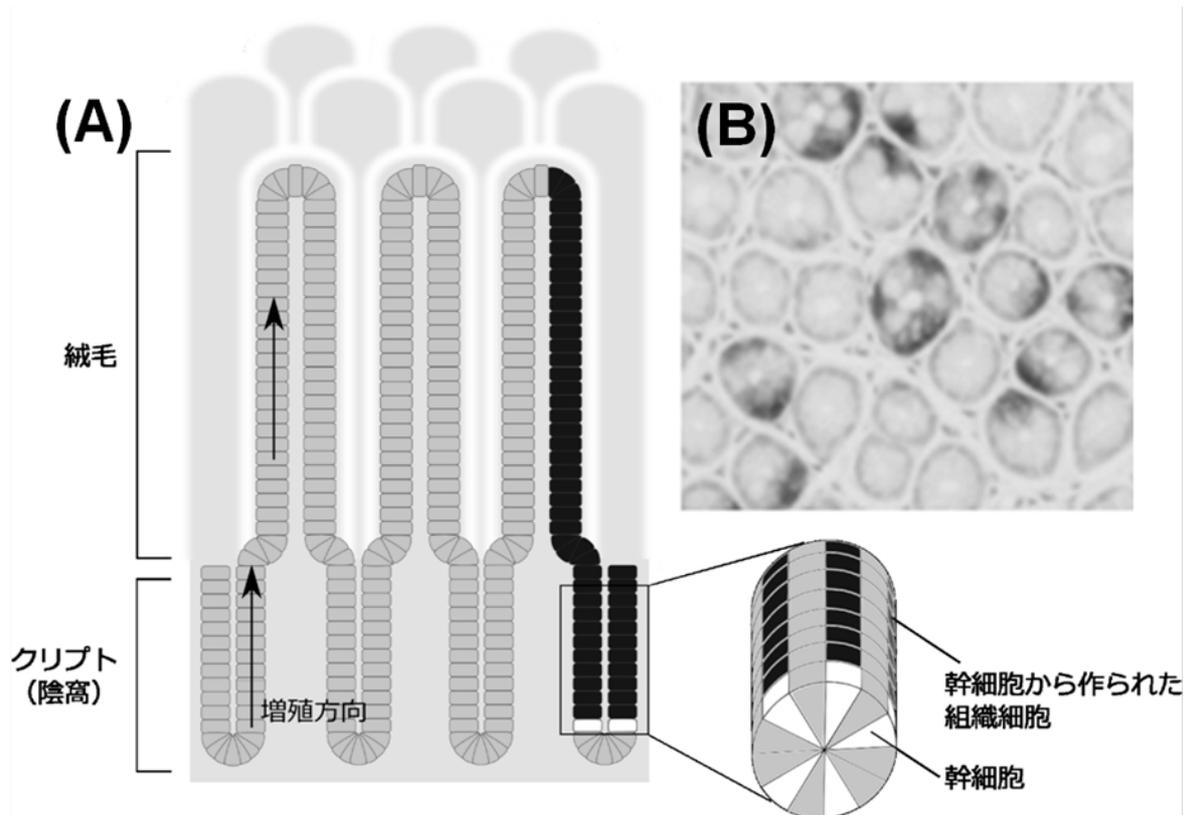


図1 消化管幹細胞ターンオーバーの解析方法

(A) 消化管構造の模式図。消化管は栄養や水分を吸収する役割の絨毛（小腸のみ）と、絨毛細胞を常に供給しているクリプト（陰窩）から構成される。消化管組織は入れ替わり（ターンオーバー）が早いため、クリプトでの細胞増殖は著しい。クリプト底部には、組織細胞を供給する幹細胞が存在し、ターンオーバーの早い組織を支持している。消化管幹細胞は *Lgr5* タンパクを有しているが、*Lgr5* を持つ細胞で *EGFP* が発現する遺伝子組換えマウスを用いて幹細胞の場所を特定することが可能である。また、*Lgr5* を持つ細胞でタモキシフェンの投与に依存してレポーター遺伝子の発現を誘導することができる遺伝子組換えマウスを用いると、幹細胞で組換えを起こした子孫細胞すべてにレポーター遺伝子が発現するため、幹細胞由来であることを追跡して可視化できる。本研究では、*X-gal* の発色によって組織中で青く染まる *LacZ* 遺伝子をレポーターとして導入したマウスを使用しており、組換えを起こした幹細胞とその子孫細胞が青くラベルされる。(B) クリプトの円周方向に組織を薄切すると（円形をしているのが各クリプト断面）、*LacZ* の発現でラベルされたクリプトが可視化できる（図中の濃い色）ため、*LacZ* で標識されたクリプトの頻度を指標に、幹細胞のターンオーバーを評価することが可能である。

表 1 Lgr5 幹細胞の細胞系譜標識法による LacZ 陽性割合の線量率効果

線量率 (Gy/時)	線量 (Gy)	測定 クリプ ト数	LacZ 陽性 数	LacZ 陽性 クリプト 割合	LacZ 陽性 割合 (平均±標準偏差)	群内 全 LacZ 陽性数	群内 全クリ プト数	$\chi^2$	p 値
30	0	1,591	24	1.51	2.23 ± 0.74	310	14,040	9.43	0.002
		1,739	40	2.30					
		1,353	47	3.47					
		4,089	87	2.13					
		2,951	73	2.47					
		2,633	39	1.48					
	1	1,948	25	1.28	1.70 ± 0.44	331	19,053		
		3,443	57	1.66					
		3,495	78	2.23					
		2,511	31	1.23					
		2,179	35	1.61					
		3,961	61	1.54					
		1,849	44	2.38					
		0.003	0	762					
966	15			1.55					
804	12			1.49					
652	24			3.68					
2,100	38			1.81					
1,693	32			1.89					
1	943		10	1.06	1.97 ± 0.80	604	32,011		
	1,579		29	1.84					
	2,534		29	1.14					
	1,707		52	3.05					
	2,359		49	2.08					
	3,213		38	1.18					
	2,829		67	2.37					
	2,050		35	1.71					
	1,866		56	3.00					
	1,561		21	1.35					
	2,078		33	1.59					
	1,693		59	3.48					
	1,349		38	2.82					
	3,680		44	1.20					
	2,658		44	1.66					

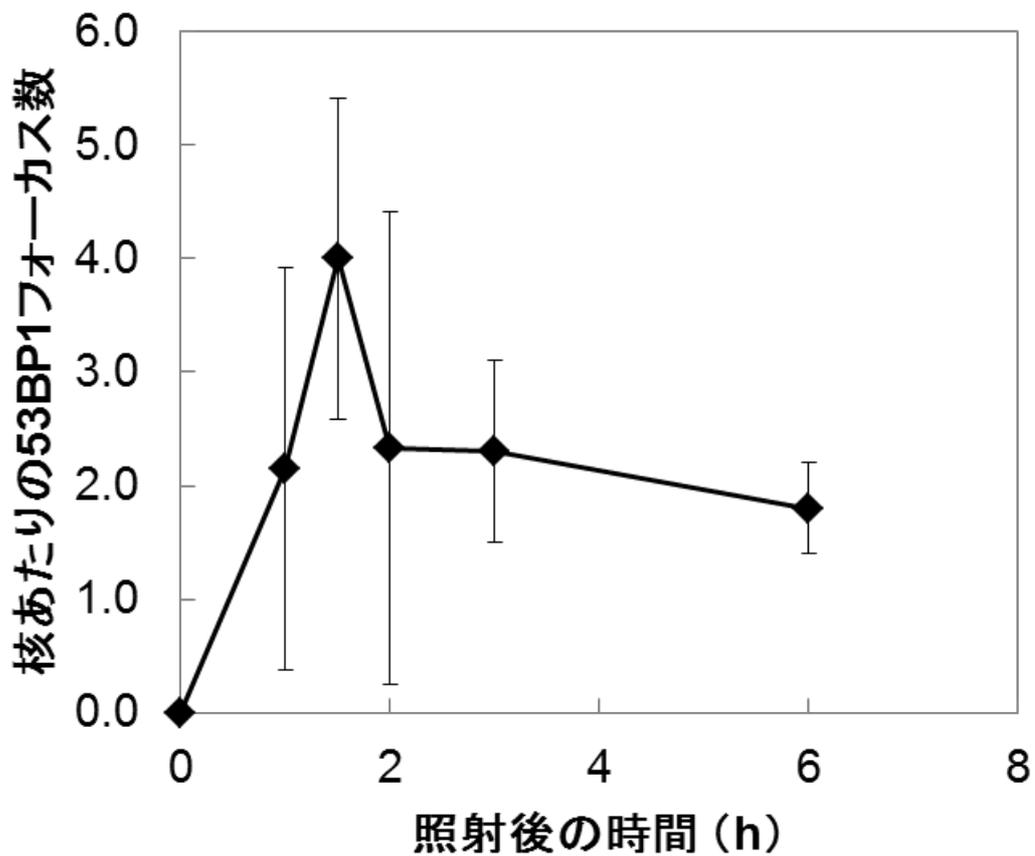
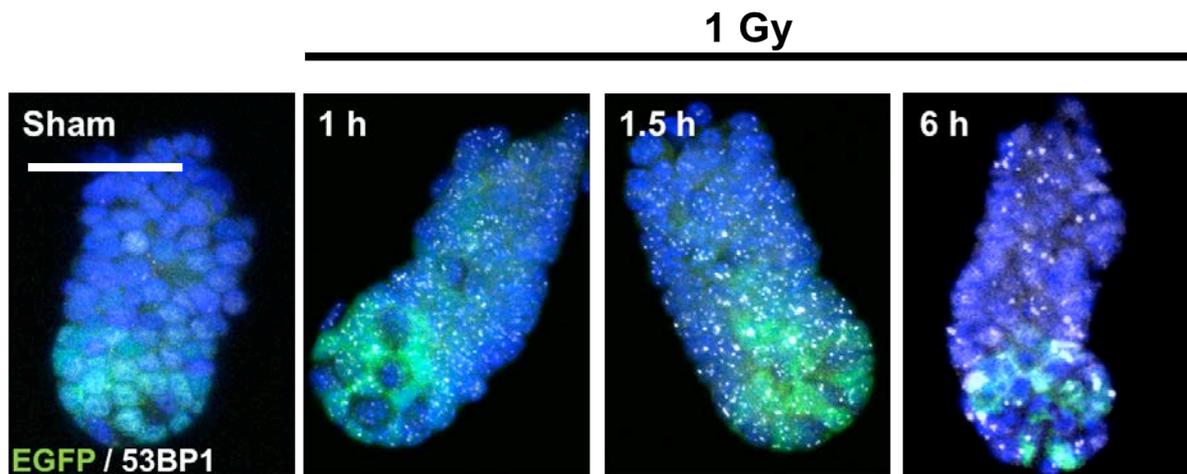


図2 幹細胞における DNA 損傷修復動態

1 Gy の X 線 (30 Gy/時) を照射後、1, 1.5, 2, 3, 4 時間後に解剖して十二指腸クリプトのホルマウント蛍光染色を行った (上段、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す)。核あたりの 53BP1 フォーカス数を測定した (下段)。

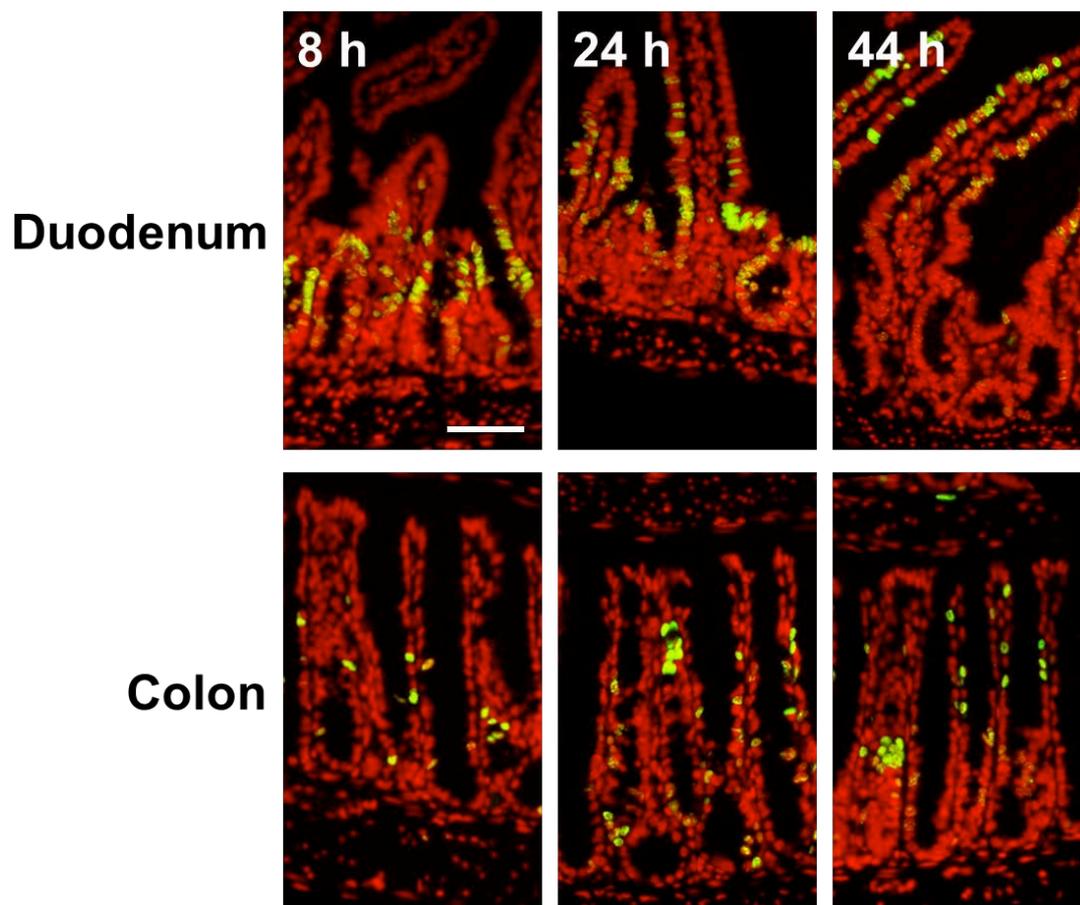
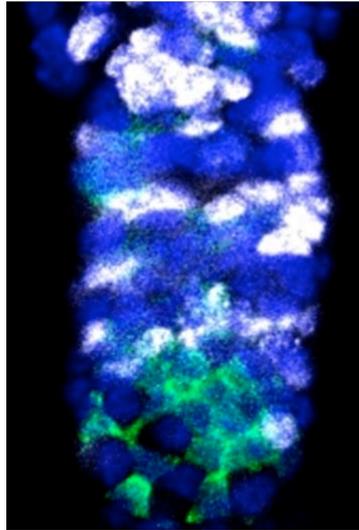


図3 EdU取り込みの部位別標識位置と標識後の時間経過

EdUを単一腹腔内投与し、8, 24, 44時間後に解剖して、十二指腸 (duodenum) と大腸 (colon) を摘出して組織切片を作製し、EdUの蛍光免疫染色を行った。EdU (緑)、核 (赤)。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ を示す。

### 十二指腸



Hoechst34580  
EGFP  
EdU

### 大腸

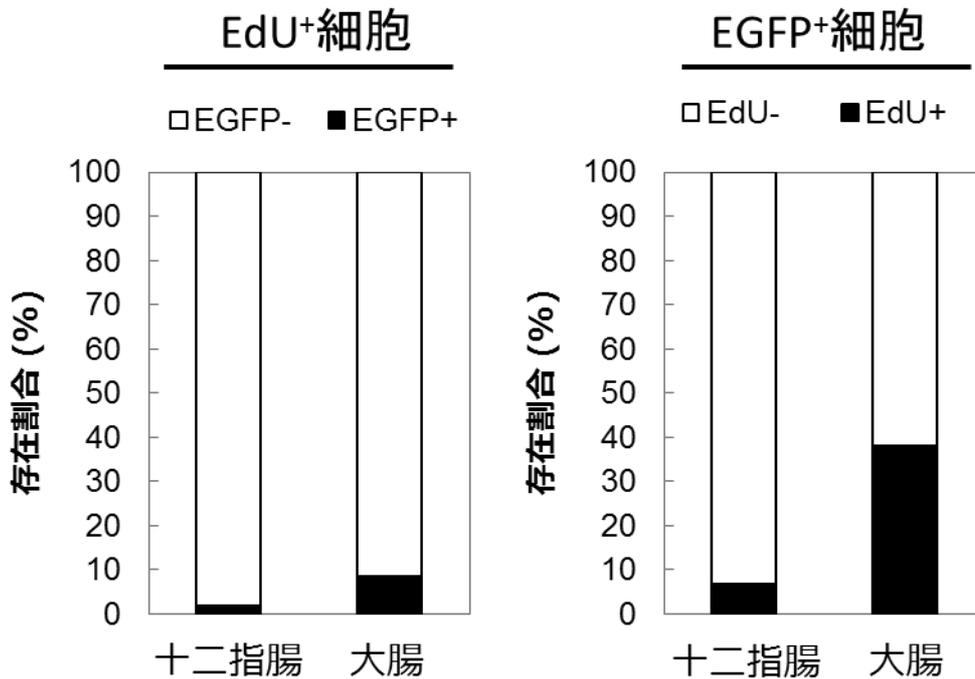
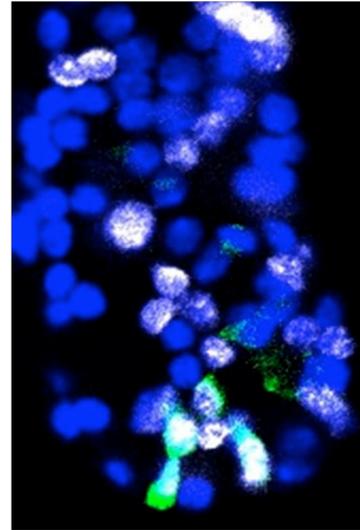


図4 EdU 標識細胞と EGFP 発現細胞のクリプト内の比較

EdU を単一腹腔内投与し、4 時間後に解剖してクリプトを単離し、Lgr5 陽性細胞 (EGFP)、EdU の蛍光抗体染色を行った (核を Hoechst34580 で染色) (上段、スケールバーは 50  $\mu$ m)。十二指腸と大腸とで、クリプト内に EdU が取り込まれた細胞の存在割合を幹細胞 (EGFP+) とそれ以外の細胞 (EGFP-) とで比較した。また、EGFP+細胞のうち、EdU に標識された細胞の存在割合を評価した (下段)。

# Evaluation of dose-rate effects on turnover and DNA damage repair in intestinal stem cells

Kensuke Otsuka

*Radiation Safety Research Center, Nuclear Technology Research Laboratory, Central Research Institute  
of Electric Power Industry*

*Keywords:* Low-dose-rate; Dose-rate effect; Intestine; Tissue stem cell; DNA damage; EdU

## **Abstract**

The risk of cancer induced by low-dose-rate radiation is estimated on the basis of the frequencies induced by high-dose-rate radiation. However, it is well known that the biological consequences after irradiation depend on the dose-rate (Dose-rate effects). To estimate the risk of cancer induced by low-dose-rate or low-dose radiation, it is important to understand the biological mechanisms of the dose-rate effects on the cell-of-origin of cancer. Recent studies demonstrated that the tissue stem cells (Lgr5-positive cells) can develop into cancer using Lgr5-dependent lineage tracing system. Using the lineage tracing system, we evaluated the turnover rate of the intestinal stem cells after low-dose-rate and high-dose-rate irradiation. In this study, we optimized our experimental protocol for evaluating the effect of low-dose-rate radiation. Under this revised condition, we found that 1 Gy of low-dose-rate (0.003 Gy/h) gamma-rays did not induce turnover of Lgr5<sup>+</sup> stem cells, whereas high-dose-rate (30 Gy/h) induce radiation-induced turnover. We also observed decrease of DNA double-strand breaks in irradiated Lgr5<sup>+</sup> stem cells after irradiation. To chase labeled cells in crypts, we injected ethynyl-deoxyuridine (EdU) intraperitoneally. We found that duodenal Lgr5<sup>+</sup> stem cells were hardly labeled with EdU. However, 40% of colonic Lgr5<sup>+</sup> stem cells were labeled with EdU. These findings would be useful for understanding the difference of radiosensitivity between duodenal and colonic stem cells.

研究課題名  
低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の  
放射線障害の蓄積に関する研究

研究項目名  
低線量被ばくによる神経幹細胞に蓄積する放射線損傷の影響

研究分担者 白石一乗 大阪府立大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻・放射線生物学・助教

研究要旨

幹細胞は個体内で生涯維持されるという特性を持つ。このことから、低線量放射線の長期被ばくに対して、幹細胞では、その損傷が蓄積される可能性がある。しかしながら、低線量放射線曝露後の幹細胞への影響はほとんど明らかにされていない。本研究項目では組織幹細胞の一つである、神経幹細胞を用いて、低線量被ばく影響を検討した。昨年度の研究成果により、脳組織中神経幹細胞の DNA 損傷を評価することが可能となった。本年度はこの手法を用いて、低線量率被ばく影響を検討した。線量率 1.75m Gy/min での 3Gy 照射により神経幹細胞中の DNA 損傷が観察された。また、2Gy の急性照射(0.5Gy/min)において、成体と胎児の神経幹細胞ではゲノム損傷応答性に違いがあることが明らかにされた。

キーワード：神経幹細胞、 $\gamma$ -H2AX フォーカス、染色体異常

研究協力者 児玉靖司 大阪府立大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻・放射線生物学・教授

I 研究目的

組織幹細胞は個体の恒常性を維持するために必須であり、生涯、生体中に保持される。放射線影響を考える上で、幹細胞研究は 2 つの重要な意味を持つ。1 つは生涯維持される幹細胞は、長期低線量率放射線の標的となる可能性があることである。もう一つは、幹細胞をがん細胞の起源とする「がん幹細胞起源説」の存在である。本研究の目的は低線量放射被ばくで、神経幹細胞に、1) 放射線損傷が蓄積するのか、2) 染色体構造異常が出現するのか、である。これらの成果は幹細胞、特に神経系組織への低線量（率）放射線影響を明らかにする上で重要な知見となる。さらに、放射線による神経系組織への影響は、放射線被ばくによる脳機能障害や知能障害発症の分子基盤となるため、福島での原子力被災者などの健康管理・健康不安対策に資する学術的な基盤を提供できると期待される。

II 研究方法

大阪府立大学・地域連携研究機構の所有する 60Co ガンマ線照射施設にて、B6C3F1 マウス（6 週齢）に照射を行った。マウスを安楽死させた後、全脳組織を回収し大脳側脳室下帯より神経幹細胞を含む領域を回収した。酵素処理により単個細胞化した後、6% percol を含む緩衝液に重層、遠心処理によってミエリンを分離した。さらに、神経幹細胞マーカー CD133 陽性細胞抗体を用いたポジティブセレクションを行った。DNA 損傷については  $\gamma$ -H2AX を指標とした。この細胞はフローサイトメトリー法により放射線損傷を評価された。また、一部の細胞は免疫染色法によって損傷評価された。染色異常については 1 番、3 番染色体をプローブとした Whole chromosome (WCP) FISH を指標とした。

(倫理面への配慮)

実験動物の取扱において「大阪府立大学実験動物指針」に則って行った。

### III 研究結果

#### 1) 神経幹細胞における低線量率放射線被ばくでのゲノム損傷評価

昨年度の成果により、脳組織中の神経幹細胞が、細胞培養系を介することなく、直接、評価できるようになった。今回、DNA 損傷の指標として  $\gamma$ -H2AX のフォーカス、神経幹細胞マーカとして CD133 を用いた。また観察に用いた蛍光色素は、それぞれ Alexa488、PE とした。Alexa488 の PE 側の検出器への漏れ込みが 20% 程度生じていた (図 1. 左)。60Co ガンマ線源による 1.75mGy/min の低線量率照射を行い、神経幹細胞の DNA 損傷を評価した (図 1. 右)。総線量 2~3Gy では神経幹細胞中での DNA 損傷を観察できた。しかしながら、総線量 1Gy では未照射群との差が認められなかった。

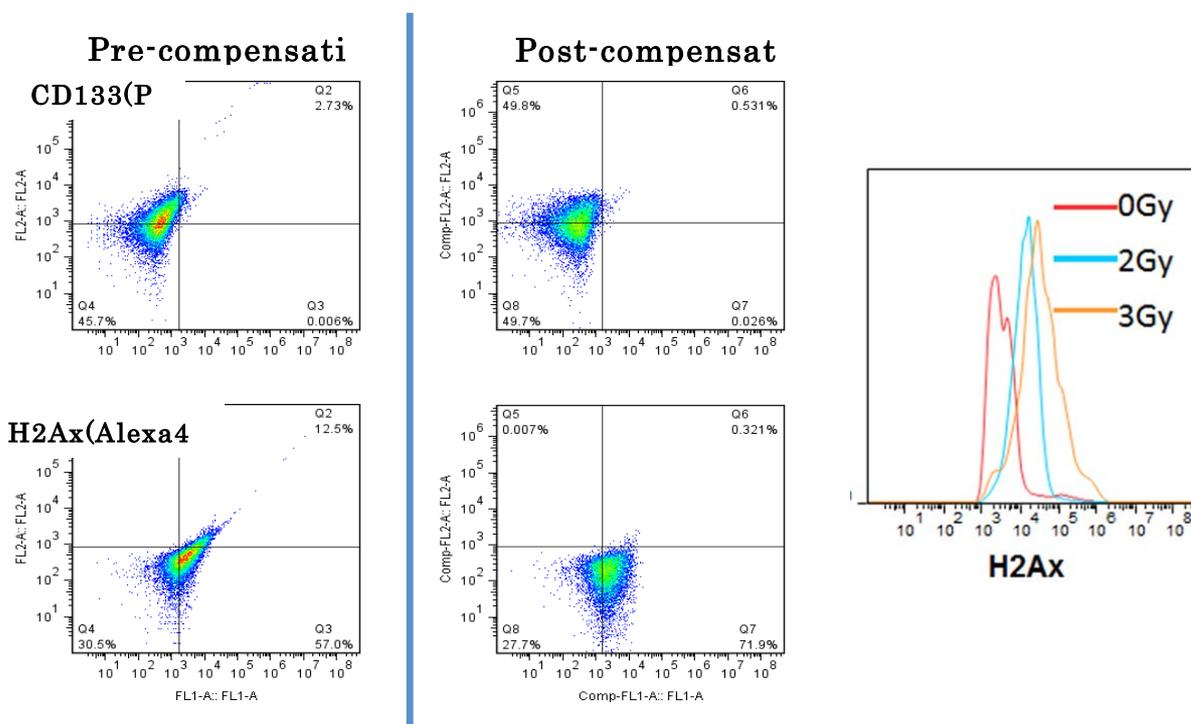


図 1. 左：幹細胞マーカーCD133 と DNA 損傷マーカー $\gamma$ -H2AX に用いた色素の重なり。Alexa488 の蛍光が PE 側に漏れ込んでいる。右：1.75mGy/min 線量率照射による神経幹細胞中の DNA 損傷評価。

#### 2) 胎児および成体マウスでの $\gamma$ -H2AX による DNA 損傷評価

胎齢 14.5 日の B6C3F1 マウスに 2Gy (0.5Gy/min) の X 線を照射した。直後に採取した胎児由来神経幹細胞、生後 6 週齢の時点で採取した成体由来神経幹細胞、およびその母親由来の成体神経幹細胞をそれぞれ回収した。三種類の神経幹細胞について、 $\gamma$ -H2AX フォーカスを免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察することで DNA2 重鎖切断(DSB)数を計測した。被ばく直後には胎児、成体由来細胞どちらもフォーカス数の上昇が有為に認められた (図 2. 左)。また、妊娠時に被ばくした雌マウスでは 6 週間後でもフォーカス数の上昇が認められた。一方、体内被ばくした 6 週齢仔マウスではフォーカス数の上昇が認められなかった (図 2. 右)。さらに、本実験では体内被ばくしたマウスの 20% 以上に水頭症が発生し、その神経幹細胞中のフォーカス数は未照射群と比較して有為に少なかった。

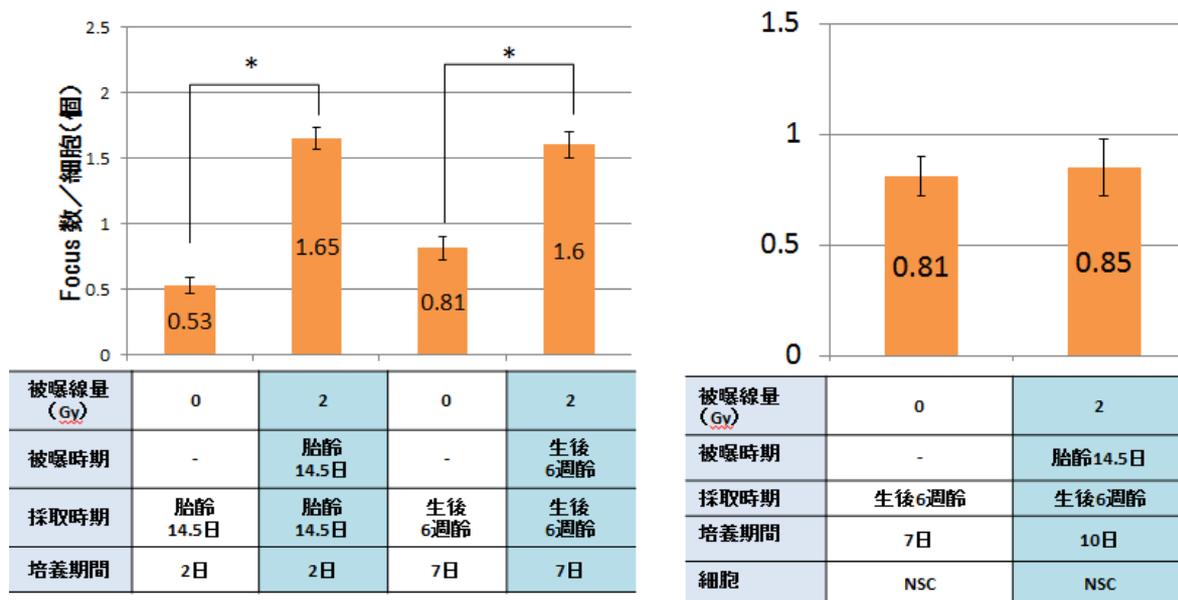


図 2. 被ばく時期の異なる神経幹細胞中の DNA 損傷。左：被ばく直後にみられる DNA 損傷。右：胎児被ばく後、6 週齢のマウスでの DNA 損傷。

### 3) WCP FISH による染色体安定性評価

染色体安定性を評価するために、1 番、3 番染色体をプローブとした WCP FISH を行った。妊娠 14.5 日の雌マウス全身に 2Gy 照射し、6 週間後に神経幹細胞中の染色体異常を測定した (表 1.)。母体マウスでは、転座および 2 動原体染色体が検出された。水頭症のマウスからは染色体異常が少数観察された。

表 1. 被ばく時期の違いによる染色体異常の頻度の差

マウス	匹数	細胞	転座数/数えた細胞数	二動原体染色体数/数えた細胞数	転座数/100細胞
母	2	リンパ球	7 / 638	3 / 638	1.11
子(水頭症)	2	リンパ球	1 / 659	0 / 659	0.15

## IV 考察

昨年度、生体内の神経幹細胞中に生じる DNA 損傷を評価する方法を構築した。この方法を用いて、今回、低線量率における DNA 損傷蓄積が生じるか否かを検証した。1.75mGy/min の線量率場において、2~3Gy 照射により DNA 損傷を確認できた。1Gy 以下では確認できなかった。本研究では CD133 幹細胞マーカーとの 2 重染色による幹細胞特異的な損傷を解析している。DNA 損傷マーカーと幹細胞マーカーに用いた両者の蛍光波長の領域が重なるため、微量な DNA 損傷の差を検出できない可能性がある。今後は、蛍光色素を変えることと、染色法を工夫することで、検出力を高めていく。

妊娠マウスに照射した実験により、 $\gamma$ -H2AX フォーカス形成、染色体異常ともに、母体マウスでは損傷が保持されるのに対して、胎児被ばくマウスでは損傷が抑えられていた。このことは、胚 (ある