

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：82641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K16196

研究課題名（和文）腸管オルガノイドを用いた放射線誘発細胞競合とその線量率効果への寄与の解明

研究課題名（英文）Evaluation of radiation-induced cell competition using intestinal organoids and their contribution to dose rate effects

研究代表者

藤通 有希 (Fujimichi, Yuki)

一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・主任研究員

研究者番号：80638023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：放射線の生物影響は総線量が同じでも線量率が低くなると小さくなること（線量率効果）が知られており、その機構仮説として細胞競合が着目されている。低線量率照射を模擬するため、照射幹細胞と非照射幹細胞を混合してオルガノイド培養をしたところ、照射幹細胞は有意に増殖しにくいことが明らかになった。照射幹細胞を単独培養しても、オルガノイド形成効率とオルガノイド中の幹細胞数は非照射幹細胞を単独培養した場合と有意差はなかったため、放射線誘発細胞競合が生じていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線影響研究における古典的パラダイムである「線量率効果」について、最先端のオルガノイド形成法・セルソーティング技術を用いて、新しい概念である「細胞競合」という観点からアプローチした。本研究により、「放射線誘発幹細胞競合」の存在可能性が確認された。線量率効果を科学的根拠をもって説明することは、一般公衆に対する放射線影響を議論・説明するためにも重要である。また、線量率効果の存在を生物学的に示すことは、現状の放射線防護が十分安全側であることを示すこと、または、次のICRP勧告策定への議論のためのデータとなることから、放射線生物学だけでなく、放射線防護の観点からも重要であり、学際的な研究といえる。

研究成果の概要（英文）：It has been known that the biological effect of radiation was smaller when the dose rate was lower even if the total dose is the same (dose rate effect), and cell competition is focused as one of mechanism hypotheses of dose rate effect. To simulate low-dose-rate irradiation, irradiated stem cells were mixed with non-irradiated stem cells and cultured to form a mixed organoid, and it was revealed that irradiated stem cells had disadvantage of proliferation significantly in the mixed organoid. Even when irradiated stem cells were cultured alone, the organoid-forming efficiency and the number of stem cells in the organoids were not significantly different from the cases where non-irradiated stem cells were cultured alone, suggesting that radiation-induced cell competition occurred.

研究分野：放射線影響

キーワード：放射線 低線量率 幹細胞 オルガノイド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

総線量が同じでも線量率が低くなると放射線の生物影響が小さくなることもあり、この現象は線量率効果と呼ばれているが、発がんのターゲットとされる組織幹細胞への線量率効果は十分に解明されていない。本研究において着目した腸管は、クリプト構造を成しており、クリプト基底部に幹細胞集団が存在する。この幹細胞集団は定常状態では一定の数に保たれており、一定数を越えた幹細胞は集団から排除され、分化して柔毛部へ移行すると考えられている。幹細胞集団から排除される際に、放射線により損傷を受けた幹細胞が優先的に排除されるという「競合」の概念が Niwa (Radiat Res 2010) によって示された。高線量率・高線量照射では全ての幹細胞に放射線が照射されるが、低線量率・低線量照射では放射線が照射された幹細胞と照射されていない幹細胞が同時に存在するため、「放射線誘発幹細胞競合」は線量率効果を説明可能な機構仮説の 1 つといえる。変異細胞が正常細胞に囲まれた場合に排除されやすいことはすでに報告されているが、放射線防護における主要な臓器の 1 つである腸管の幹細胞において放射線を被ばくして損傷した細胞と被ばくしていない細胞との間で細胞競合が生じるかどうかは報告されていない。この仮説を検証するため、細胞培養系でありながら組織構造を観察できるオルガノイドに着目し、本研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、照射幹細胞と非照射幹細胞を 3 次元培養 (オルガノイド形成) し、臓器と類似した構造をもつオルガノイドにおいて幹細胞競合が観察されるかどうかを評価することにより、線量率効果の生物学的側面について検討する。また、変異幹細胞と正常幹細胞を用いて同様の実験を行うことにより、本実験系の有効性の担保、および一般的な細胞競合と放射線誘発細胞競合を比較検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

*Lgr5-EGFP-IRES-Cre<sup>ERT2</sup>* マウスと *ROSA26-LSL-tdTomato* マウスを掛け合わせたマウス (以下、LRT マウス)、および、*Lgr5-EGFP-IRES-Cre<sup>ERT2</sup>* マウスと *LSL-K-ras G12D* マウスを掛け合わせたマウス (以下、Kras マウス) を用いた。マウスの維持・繁殖は一般財団法人 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の動物飼育室にて行った。本研究は、所属機関の遺伝子組換え生物等実験委員会および動物実験委員会の審査・承認を受けて実施した。

#### (2) 放射線照射

マウスに X 線照射する際は、X 線照射装置 (MultiRad 350, Faxitron) を用い、0.5 Gy/min の線量率で照射した。細胞に X 線照射する際は、X 線照射装置 (MBR-1520R4, 日立) を用い、0.6 Gy/min の線量率で照射した。

#### (3) オルガノイド培養

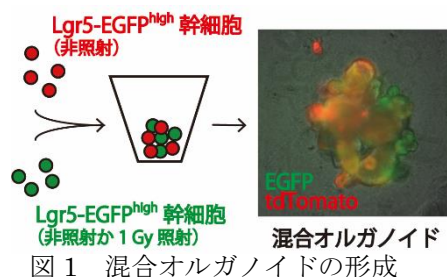
マウスの小腸から細胞を単離し、セルソーター (MoFlo Astrios EQ、ベックマン・コールター) を用いて分取した *Lgr5-EGFP<sup>high</sup>* 幹細胞を 3 次元培養することにより、オルガノイドを作成した。照射オルガノイドは、マウスに X 線照射してから 1-2 週間後に解剖し、オルガノイドを作成、もしくは非照射マウスを解剖し、培養容器に播種直後に照射し、オルガノイドを作成した。変異オルガノイド形成では、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集にて、正常幹細胞に Kras G12D 変異を導入してオルガノイド形成を試みた。次に、それぞれのオルガノイドの細胞構成やマウス体内のクリプト細胞における細胞構成を解析し、特徴を明らかにした。競合を考える際に重要な分裂速度を評価するため、オルガノイドの面積を指標として測定した。細胞競合は、照射細胞と非照射細胞、または、変異細胞と正常細胞をある割合で混合して播種することにより評価した。照射細胞と非照射細胞の混合割合の変化は線量率の変化を模擬したものである。

### 4. 研究成果

#### (1) 高効率な小腸オルガノイド形成と幹細胞競合の可視化・定量化

マウスの小腸から採取した *Lgr5-EGFP<sup>high</sup>* 幹細胞を、3 次元培養の足場となるマトリゲルを含む培地を入れた平底の 96 穴プレートに直接ソーティングし、約 30% の効率でオルガノイドを作成可能な実験系を構築した。この実験方法ではウェル内のオルガノイドの密度に形成効率が依存することが明らかとなった。これを解決するため、V 字型の 96 穴プレートに 1 cell/well で幹細胞をソーティングしてオルガノイドを形成する方法を開発した。この方法でも 1 個の幹細胞から 20~30% の効率でオルガノイドを作成できた。

次に、培地中のマトリゲル濃度を調整することにより、複数の幹細胞から約 1 個のオルガノイドを形成する手法を開発した。lineage tracing 法を用いて、tdTomato の発現の有無により、あらかじめ照射・非照射幹細胞を区別できるようにし、混合オルガノイドを



形成した (図 1)。本手法ではウェルに直接ソーティングするため、正確な数の幹細胞を播種することが可能である。混合オルガノイド形成後、混合オルガノイド構成幹細胞の内、tdTomato 発光幹細胞数の比と培養開始時に混ぜた tdTomato 発光幹細胞数の比から、幹細胞競合を評価する技術を確立した。本手法および後述の非照射幹細胞間で幹細胞競合が生じている可能性について報告した (Fujimichi *et al.*, Sci. Rep. 2019)。

### (2) 幹細胞への遺伝子組換えとオルガノイド形成

CRISPR-Cas9 システムを用いて、mRuby3 遺伝子のみ、および、Kras G12D 遺伝子と mRuby3 遺伝子の融合遺伝子の導入実験を進めた。遺伝子変異オルガノイド作成のための条件検討を進め、最適と思われるエレクトロポレーション条件を決定した。NIH3T3 細胞株を用いた mRuby3 遺伝子の導入は成功したが、Lgr5-EGFP<sup>high</sup> 幹細胞に由来する変異導入オルガノイドの樹立には至らなかった。そのため、LSL-K-ras G12D マウスを導入して Lgr5-EGFP-IRES-cre<sup>ERT2</sup> マウスと掛け合わせることで、4-hydroxy Tamoxifen (4OHT) 投与により幹細胞に Kras 変異を導入可能なマウス系統を用意した。

### (3) 照射幹細胞と変異幹細胞の特徴比較

LRT マウスの小腸から取り出した Lgr5-EGFP<sup>high</sup> 幹細胞を *in vitro* で 1 Gy 照射 (0.6 Gy/min) すると、オルガノイド形成効率はやや低下傾向を示したが有意差は認められなかった (Fujimichi *et al.*, Sci. Rep. 2019)。混合オルガノイド形成法により、照射幹細胞単独でオルガノイドを形成させ、非照射幹細胞単独培養時のオルガノイド構成幹細胞数と比較した場合も有意差は認められなかった (Fujimichi *et al.*, Sci. Rep. 2019)。

解剖 1 週間前に 0.5 Gy/min で 1 Gy 照射したマウスでは、回収した小腸基底部の細胞中の幹細胞割合が低下するが、オルガノイド形成効率は低下しない傾向を示した (Fujimichi *et al.*, 投稿準備中)。照射のタイミングによらず、オルガノイドのサイズには大きな違いは観察されなかった (図 2)。

Kras マウスに対して、4OHT を離乳前に腹腔内投与して変異型 Kras の発現を誘導すると、7~12 週齢で解剖した際に Lgr5-EGFP<sup>high</sup> 幹細胞はほとんど存在しなくなることを明らかにした。解剖の 2 週間前に 4OHT を投与した場合は、離乳前投与した場合よりは Lgr5-EGFP<sup>high</sup> 幹細胞が存在していたものの、野生型と比較すると大きく減少していた。この Lgr5-EGFP<sup>high</sup> 幹細胞を培養すると、野生型マウスのオルガノイド形成効率と大きな差は認められなかったが、巨大化したオルガノイドが多く観察された (図 3)。この巨大化は照射幹細胞では観察されなかった。

### (4) 混合オルガノイド形成法による細胞競合の観察

*in vitro* で 1 Gy 照射した幹細胞 (tdTomato<sup>-</sup>) と非照射幹細胞 (tdTomato<sup>+</sup>) から混合オルガノイドを形成させ、照射幹細胞由来の幹細胞数を調べた。その結果、非照射幹細胞存在下では、いずれの混合割合においても、照射幹細胞単独での培養時と比較して、照射幹細胞の増殖が抑制されることが明らかになった (図 4)。照射幹細胞単独培養では非照射幹細胞単独培養と比較して有意差は認められなかったが、混合培養下では照射幹細胞の増殖が抑制されたことから、低線量率被ばくを模擬した環境では、がんの起源となる照射細胞は増殖しにくいことが示唆された (Fujimichi *et al.*, Sci. Rep. 2019)。

異なる照射条件、および、Kras 変異/正常幹細胞と照射幹細胞/非照射幹細胞の比較については、さらなる詳細検討を進めたうえで成果を取りまとめる。これらの成果取りまとめや、本手法のさらなる活用により、放射線誘発細胞競合にしきい線量・しきい線量率が存在するか否かの考察や、腸管に対する低線量・低線量率放射線影響の評価につながるものと考えられる。

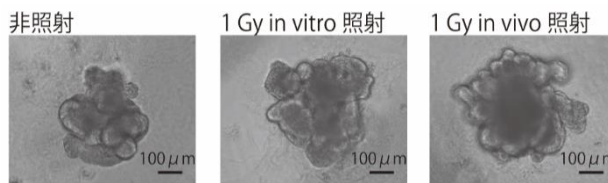


図 2 小腸オルガノイド解剖後に *in vitro* 照射、または、解剖 1 週間前に *in vivo* 照射。V 型 96 穴プレートに 1 cell/well で培養後 2 週間目のオルガノイド。

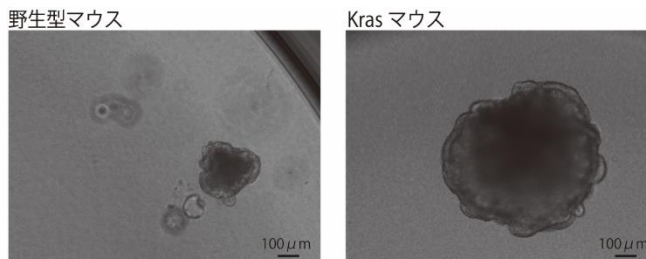


図 3 野生型と Kras マウスにおける小腸オルガノイド解剖 2 週間前に 4OHT 投与。平底 96 穴プレートに 100 cells/well で培養後 8 日目のオルガノイド。

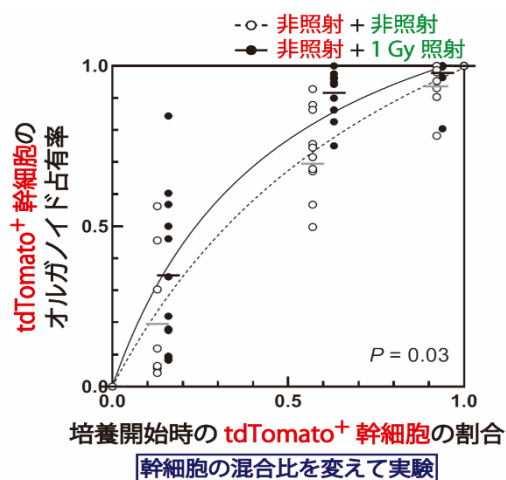


図 4 オルガノイド構成幹細胞の由来同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuki Fujimichi, Kensuke Otsuka, Masanori Tomita & Toshiyasu Iwasaki	4. 巻 9
2. 論文標題 An Efficient Intestinal Organoid System of Direct Sorting to Evaluate Stem Cell Competition in Vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55824-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤通有希	4. 巻 61
2. 論文標題 低線量率放射線影響における幹細胞競合の重要性 腸管オルガノイドを用いた幹細胞競合研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本原子力学会誌ATOMO	6. 最初と最後の頁 788-792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3327/jaesjb.61.11_788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介
2. 発表標題 腸管幹細胞の動態と線量率効果
3. 学会等名 茨城大学理学部 公開シンポジウム（第13回 Quantum Medicine 研究会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤通有希
2. 発表標題 オルガノイド形成法を用いた低線量率放射線影響の解明に向けた取り組み
3. 学会等名 日本原子力学会 創立60周年シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 腸管オルガノイドを用いた線量率効果の機構解明にむけて
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第61回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Fujimichi, Kensuke Otsuka, Masanori Tomita, Toshiyasu Iwasaki
2. 発表標題 ORGANOID FORMATION FOLLOWING A PATTERN OF NEUTRAL DRIFT IN MOUSE DUODENAL STEM CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research Annual Meeting (ISSCR 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 オルガノイド形成法を用いた放射線誘発幹細胞競合の解析
3. 学会等名 若手放射線生物学研究会 平成29年度専門研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 オルガノイド形成法を用いた腸管幹細胞に生じる低線量率放射線影響の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第60回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 オルガノイド形成法を用いた放射線誘発幹細胞競合の評価
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 小腸オルガノイドを用いた放射線誘発幹細胞競合の評価
3. 学会等名 第6回 細胞競合コロキウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 幹細胞競合による線量率効果機構仮説の成立性の検討
3. 学会等名 第6回低線量放射線影響研究交流会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 腸管オルガノイドによる放射線誘発細胞競合実験系の構築
3. 学会等名 平成28年度 若手放射線生物学研究会 専門研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 小腸オルガノイドにおける放射線誘発細胞競合の評価
3. 学会等名 日本放射線影響学会第59回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤通有希、大塚健介、富田雅典、岩崎利泰
2. 発表標題 小腸オルガノイドを用いた放射線誘発細胞競合の解析
3. 学会等名 第39回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>電力中央研究所 Annual Report 2017 細胞競合のメカニズムに基づき線量率効果を検証 (p.22) <a href="https://criepi.denken.or.jp/intro/info/2017annual_report.pdf?v4">https://criepi.denken.or.jp/intro/info/2017annual_report.pdf?v4</a></p> <p>電中研TOPICS 低線量率放射線影響の解明に向けた挑戦 <a href="https://criepi.denken.or.jp/research/topics/pdf/201810vol126.pdf">https://criepi.denken.or.jp/research/topics/pdf/201810vol126.pdf</a></p> <p>(プレスリリース) 低線量率被ばくでは発がんリスクが上がらない仕組みの解明に近づく <a href="https://criepi.denken.or.jp/press/pressrelease/2020/01_20.html">https://criepi.denken.or.jp/press/pressrelease/2020/01_20.html</a></p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考