

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10463

研究課題名(和文)被ばく個体由来iPS細胞は放射線障害治療へ応用できるのか？

研究課題名(英文) Can iPS cells derived from exposed mice be applied to the treatment of radiation damage?

研究代表者

小原 千寿香(逸見千寿香)(Obara, Chizuka)

岡山理科大学・獣医学部・講師

研究者番号：90415977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、被ばくしたマウス個体由来線維芽細胞からiPS細胞を作製した。低線量照射群に比べ、2Gy照射群では、形成されるiPS細胞のコロニー数が減少することを明らかにした。また、作製した被ばく個体由来iPS細胞クローンのゲノム不安定性について明らかにするために、コントロール群(非照射群)と2Gy照射群の染色体本数を計測したが、異数性を示すiPS細胞の割合について大きな差は認められなかった。また、ゲノムの構造異常解析では、染色体1, 2, 3番の多色FISHを用いた解析を行ったが、対象とする染色体が1-3番のみでは、染色体異常の検出率が低いことが、今後の検討課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性放射線障害は、高線量の放射線被ばくにより組織幹細胞がダメージを受ける。幹細胞移植が効果を示す場合があるが、ドナー不足や拒絶反応などの課題が挙げられる。再生医療におけるiPS細胞最大の優位性は、拒絶反応の無い移植の実現であるが、被ばくした治療対象者本人由来の細胞から作製したiPS細胞の再生医療応用の可能性は未だ不明である。本研究では、被ばくマウスから分離した線維芽細胞を用いて、iPS細胞が作製可能であること、一方で線量に応じて樹立効率が減少することを明らかにした。さらにゲノム不安定性について検討を行う中で抽出された課題は、放射線障害治療分野における今後の研究に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated iPS cells from individual mouse fibroblasts that had been exposed to radiation. We found that the number of iPS cell colonies formed was reduced in the 2 Gy irradiation group compared to the low-dose irradiation group. In addition, in order to clarify the genomic instability of iPS cell clones derived from irradiated individuals, we examined the number of chromosomes in the control group (non-irradiated group) and the 2-Gy irradiation group. There was no significant difference in the percentage of iPS cells that showed aneuploidy. In addition, for the analysis of structural abnormalities in the genome, we used multicolor FISH for chromosomes 1, 2, and 3, but the detection rate of chromosome aberrations is low when chromosomes 1-3 are the only chromosomes of target, which is an issue for further study.

研究分野：再生医工学

キーワード：iPS細胞 放射線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高線量の放射線被ばくでは、DNA 損傷による組織幹細胞の障害が起こり、骨髄、消化管、皮膚等の細胞が再生されず、多量の輸血、骨髄や皮膚の移植が必要となる。造血幹細胞移植が奏功する場合はあるが、ドナー不足や移植後の拒絶反応により、治療の実施は困難であり、実施できたとしても成功率は極めて低い。申請者が所属する研究機関では、これまで放射線障害治療に対する再生医療用材料として、間葉系幹細胞や iPS 細胞の利用可能性に関する研究を行ってきた。

再生医療における iPS 細胞の最大の優位性は、拒絶反応の無い移植の実現であると考えられ、本人の iPS 細胞の移植利用に大きな期待がかけられている。

一方で、iPS 細胞樹立に用いる原料となる体細胞が被ばくしているため、ゲノム異常を有する確率が高いことが、想定される懸念の1つである。被ばく個体から樹立した iPS 細胞は高い頻度でゲノム異常が検出されることが予測され、これまで、被ばく細胞から iPS 細胞を樹立するという研究は現実的とは考えられなかった。しかしながら、先天的にゲノム異常を有する疾患由来細胞を用いた研究では、ゲノム異常を有する体細胞から iPS 細胞を作製した際に、染色体異常が検出されないケースが報告されており、大きなダメージを受けた細胞は iPS 細胞になることができない可能性がある。さらに、近年は、CT 検査やがん治療などの医療行為によって被ばくするケースが増え、被ばく細胞からの iPS 細胞への転換とその形質について、基礎的研究を行う必要があると考えた。我々の研究グループは、マウス線維芽細胞から iPS 細胞を作製する作業を日常的に行っており、山中 4 因子 (Oct4, Sox2, Klf4, C-myc) の遺伝子を細胞に導入し、最終的に iPS 細胞になることができる細胞は、全体のわずか 0.1% 程度の細胞である。放射線に被ばくした「病的状態」の細胞を用いることで、iPS 細胞へのリプログラミング過程を通過することのできる細胞がどのような細胞なのか、本研究では、被ばくマウス個体からも高品質な iPS 細胞を樹立することが可能かどうか、検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、被ばくした治療対象者本人由来の iPS 細胞の治療への応用の可能性について検討するため、被ばくマウス由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。

3. 研究の方法

1) X 線の照射線量の検討

個体への照射線量の増加に伴い、体細胞におけるゲノム異常の頻度が増えることが予想され、線量増加にしたがい、iPS 細胞の樹立効率や品質が低下すると推測されたため、0 Gy から 10 Gy の間で X 線によって被ばくしたマウスの尾から線維芽細胞の分離を行った。実験は、遺伝的バックグラウンドを揃えるため、すべて近交系 C57BL/6J のマウスを用いて行った。

2) iPS 細胞の作製

iPS 細胞の作製は、レトロウイルスベクターを用いて、iPS 細胞作製に必要な転写因子(4 F : Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を被ばく細胞に感染させて行った。コントロール群として、非被ばく細胞由来 iPS 細胞、実験群として、放射線被ばく細胞由来 iPS 細胞について、クローン株の樹立を試みた。

3) iPS 細胞のカリオタイプ解析

樹立した iPS 細胞について、カリオタイプの解析を行い、染色体異常について、検討を行った。

4. 研究成果

マウス個体に X 線を 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3Gy の線量で全身照射を行った後、X 線照射から 7 日後のマウス尾組織から線維芽細胞を採取し、培養を行った。各線量の X 線を単回照射したマウスは、被ばくから 7 日後まで全てのマウスが生存し、線維芽細胞を得ることが可能であった。一方で、非照射群に比べ、照射群では、尾から採取して増やした線維芽細胞の数に軽度な減少を認め、特に 3Gy 照射群から採取した線維芽細胞で顕著に少なかった。照射個体由来の線維芽細胞は、細胞増殖にも照射の影響を受けるため、マウス iPS 細胞を作製・樹立する際には、レトロウイルスベクターを用いて Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子に加えて dsRed2 を導入し、レトロウイルスベクターの感染効率をモニターしながら、マウス iPS 細胞の作製を行った。感染効率は、dsRed2 を用いて確認し、感染から 15 日目にアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行い、非照射群、照射群の線維芽細胞から ALP 陽性のマウス iPS 細胞コロニーを確認することが可能であった。非照射個体由来のコロニー、各線量で被ばくしたマウス由来 iPS 細胞のコロニーをピックアップし、それぞれの iPS 細胞クローン株を樹立する事が可能であった。さらに、コントロールに用いる iPS 細胞として、マウス尾由来細胞のみならず、マウス胎児由来線維芽細胞やヒト血液細胞からも iPS 細胞のクローン株を作製することができた。

コロニー形成数を感染効率で補正すると、0.1、0.5 Gy などの低線量照射群に比べ、2Gy 照射群では、形成されるコロニー数が減少した上、形成されたコロニーを拾い、iPS 細胞クローンの

樹立を行う過程では、1Gy、2Gy の被ばく個体由来 iPS 細胞クローンで、培養途中で死滅するなどの現象が生じる場合があることが明らかとなった。

樹立した被ばく個体由来 iPS 細胞クローンについて、ゲノム不安定性について検討するため、ゲノムの構造異常を解析するための方法として、染色体 1, 2, 3 番について、多色 FISH を用いて MEF (マウス胎児線維芽細胞) による条件検討を行った後、0 Gy, 2 Gy 照射個体由来 iPS 細胞について、染色体の本数および構造異常に関する解析を行った。染色体本数が正常、異数性を示す iPS 細胞の割合について検討した所、0 Gy と 2 Gy 照射個体由来 iPS 細胞について大きな差は認められなかった。また、多色 FISH を用いた検討では、0 Gy, 2 Gy 照射個体由来 iPS 細胞を合計 12 クローンについて解析を行った。それぞれ、染色体の構造異常を有する iPS 細胞クローンを 1 クローンずつ検出した。しかしながら、対象とする染色体が 1 - 3 番のみであることから、この方法単独での染色体異常の検出率が低いことが課題として明らかとなった。放射線被ばく個体由来 iPS 細胞のゲノム不安定性について明らかにするためには、更に詳細なゲノム解析を進める必要があることが、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Araki R, Hoki Y, Suga T, Obara C, Sunayama M, Imadome K, Fujita M, Kamimura S, Nakamura M, Wakayama S, Nagy A, Wakayama T, and Abe M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41467-019-13830-x	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上村 悟氏, 菅 智, 砂山 美里, 藤森(法喜) ゆう子, 小原 千寿香, 今留 香織, 藤田 真由美, 中村 美樹, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 Reprogrammed cellゲノムにおけるINDEL変異解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
連携研究者	安倍 真澄 (Abe Masumi) (00291104)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医学・医療部門放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・部長 (82502)	
連携研究者	荒木 良子 (Araki Ryoko) (40392211)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医学・医療部門放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・チームリーダー (82502)	
連携研究者	法喜 ゆう子 (Hoki Yuko) (50415402)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医学・医療部門放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・研究員 (82502)	