

令和 2 年 9 月 2 日現在

機関番号：82602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19944

研究課題名（和文）放射線によるがん関連線維芽細胞の形成と放射線発がんへの関与

研究課題名（英文）Role of the tumor microenvironment on radiation-induced carcinogenesis

研究代表者

志村 勉（Shimura, Tsutomu）

国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官

研究者番号：40463799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：がんは、がん細胞が単独で存在するのではなく、様々な間質細胞と相互作用している。がん組織に存在する線維芽細胞はがん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts:CAF)と呼ばれ、がん細胞の増殖や浸潤に関わっている。我々は、放射線発がんにおけるがん微小環境の役割を解析し、放射線がヒト正常線維芽細胞からCAFを誘導し、放射線誘発CAFの原因が、ミトコンドリアから発生する活性酸素であることを明らかにした。本研究のがんの微小環境の解析により、従来の方法では解析困難であった放射線によるがんの発症メカニズムの解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線被ばくによって将来がんになる不安や子孫への遺伝的影響への懸念など被ばくによる精神的ストレスが原因となる二次的な健康影響が問題となっている。放射線による健康影響について、継続して適切な情報を発信することが重要である。本研究の成果は、福島事故後に問題となっている低線量放射線発がんの機序解明の一端となり得るものである。我々は、放射線発がんには、単にがん細胞の遺伝子変異の蓄積だけでなく、がん微小環境の形成が重要であると考え、本申請研究の成果により、放射線発がんリスク評価の根拠となる科学的知見の蓄積が期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are an activated form of fibroblasts in tumor tissues. CAF release paracrine factors that promote tumor growth and cancer cell aggressiveness. We investigated the association between oxidative stress and the formation of tumor microenvironments during the development of radiation-related tumors. Reactive Oxygen Species (ROS) play a pivotal role in the process of fibroblasts activation in normal tissue injury. Recovery of damaged cells from radiation is essential for CAF clearance, which restores stromal cell dormancy and prevents tumor microenvironment formation. However, remaining ROS maintained CAF persistence which led to facilitated tumor microenvironment formation. Alterations in stromal cells can contribute to radiation-related tumors. Radiation affects malignant cancer cells directly and indirectly via the tumor stroma.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発がん がんの微小環境 ミトコンドリア 活性酸素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線は、医療、工業、農業などの幅広い分野で利用され、我々に多くの利益を与え市民生活に不可欠である。一方で、医療被ばく、職業被ばく、原発事故等の様々な放射線被ばくでは、健康被害を起こすリスクがあることを想定して管理と防護が必要である。医療技術が発達した恩恵で日本人の平均寿命は諸外国と比べ長いことが知られている。しかし、放射線診療や診断による被ばく線量は、海外平均と比較して高く、医療行為による有益性を考慮した上で、放射線被ばくによる不安対策は喫緊に重要な課題である。

放射線不安では、特に、子孫への遺伝的影響や放射線の晩発性の身体的影響である発がんが懸念されている。広島・長崎原爆被ばく者集団の疫学調査から、放射線の被ばく量に比例してがんの罹患率が増加することが報告されている。しかし、100mSv以下の低線量放射線では、疫学調査によって放射線による発がんリスクがあるかどうかを判断することは困難である。福島原発事故以降、低線量放射線影響研究の重要性が再認識され解析が進められているが、反応が小さいことから低線量放射線による影響の検出は困難で、いまだに低線量放射線の発がんリスクは解明されていない。

がんはがん細胞と様々な間質組織で構成されている。間質細胞の主体は線維芽細胞で、がん組織に含まれる線維芽細胞はがん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts:CAF)と呼ばれ、腫瘍の生着、増殖、浸潤などの発がん過程に深く関与している。これまで、放射線発がんにおけるがん細胞と間質細胞との相互作用(がん微小環境)の役割については、十分に解析が進められていない。

### 2. 研究の目的

酸化ストレスは、老化に伴う様々な疾病(発がん、糖尿病、メタボリックシンドローム、心疾患、神経疾患など)の原因となる。特に、生体内の酸化還元(レドックス)制御異常は、発がんに関与することが報告されている(Cancer Cell 17, 135-147, 2010, BMC Medicine 20119:62 DOI: 10.1186/1741-7015-9-62)。我々はヒト正常線維芽細胞を用いた解析から、放射線が酸化ストレスを誘導すること、酸化ストレスはミトコンドリアから発生する活性酸素が原因であることを明らかにした。以上の知見を踏まえて、本研究では、放射線の発がん影響について、酸化ストレスとがんの微小環境の役割に焦点を当て解析を進めた。放射線によるミトコンドリア酸化ストレスががんの微小環境の形成に寄与するかどうかを明らかにすることを研究目的とする。

### 3. 研究の方法

1. ヒト細胞と培養条件：ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 MRC-5 と TIG-3 は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入し、細胞培養用 T25 フラスコ内で、10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) 培養液を用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養した。細胞は、飽和状態になる前に PBS(-)で洗浄した後に、トリプシンで処理してはがした。一部の細胞を新しいフラスコにまいて希釈して維持した。

2. マウスの飼育：BALB/c ノードマウス 5 週齢(オス、体重 24-27g) は日本エスエルシーより購入した。マウスは専用の飼育ケージで、気温 23±1℃、相対湿度 50±5%、明暗が 12 時間ごとに調節される環境で飼育した。動物実験は国立保健医療科学院の動物実験委員会で承認を得たのちに倫理指針を遵守して行った。

3. 照射条件：X 線照射装置(日立、MBR-1505R2)を用いて、高線量率(0.7Gy/min)の急性照射(0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10Gy)と長期分割照射(1回当たり 0.05Gy の照射を週に 5 日間 1 か月間：累積線量 2.3Gy)を行った。マウスへの照射は、X 線照射装置(Faxitron Bioptics LLC, a Faxitron CP-160)を用いて、線量率 0.6Gy/min で、0.1~5Gy の照射を行った。

4. alpha-SM の発現解析：照射から 24 時間後に細胞を固定して、alpha-SMA の抗体(シグマ社)を用いて蛍光免疫染色を行い、陽性細胞を定量した。蛍光免疫染色したスライドグラスは、キーエンス社 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X700 で 100 個以上の細胞を観察し、alpha-SMA で染色される陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。また、CCD カメラで 1 つのスライドに対して無作為に蛍光画像を 5 枚取得し、キーエンス社の解析ソフト Hybrid Cell Count software を用いて、画像解析を行った。しきい値を設定して染色される領域を決定し、同じ解析条件で全ての画像を自動で解析し、alpha-SMA の輝度を測定した。細胞核の染色で細胞数を求め、1 細胞当たりの alpha-SMA の輝度の総量を計測した。

### 5. ヒト腫瘍片の作成と腫瘍体積の測定：

ヒト子宮頸部がん細胞株 HeLa と正常線維芽細胞を混合し、ノードマウス脊部皮下にヒト腫瘍移植片を作成した。コントロール(がん細胞のみ)、がん細胞 + 非照射線維芽細胞、がん細胞 + 放射線照射線維芽細胞を同一のマウスに移植し、31 日間腫瘍体積を測定した。腫瘍体積  $V(\text{mm}^3) = 0.5 \times (\text{縦の長さ} \times \text{幅の 2 乗})$  の式から求めた。腫瘍の増殖曲線から、CAF によるがん細胞の増殖能の亢進を評価した。

6. 統計処理：グラフのエラーバーは標準偏差を示す。全ての実験は、少なくとも3回以上の独立した試料を用いて繰り返し実験を行った。エクセル統計 2012 解析ソフトを用いて、一元配置 ANOVA 後に、Dunnett 法を用いて多重比較検定を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1. 放射線による CAF の誘導

ヒト正常線維芽細胞 MRC-5、TIG-3 細胞を用いて放射線で誘発される CAF のしきい線量を検討した。alpha-SMA の蛍光免疫染色で CAF 細胞を検出し、X 線の急性照射、または分割照射を行い、放射線の照射条件を変えて線量応答関係を検討した。図 1 に示すように、正常線維芽細胞では、放射線照射で、平べったい扁形の形態が変化して大きな細胞が出現し、そのような細胞では CAF の指標である平滑筋用のアクチン alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) が発現していることを明らかにした。急性照射では、5Gy 以上の照射で非照射コントロールと比べ統計的に優位に、alpha-SMA 陽性の CAF が増加することを明らかにした。その後 CAF 細胞は、照射 7 日以降には消失した。一方、分割照射では、照射期間 21 日目以降に alpha-SMA 陽性細胞が検出され、急性照射よりも低い累積線量（1 回あたり 0.05Gy の 21 日間で 2Gy）で CAF が誘導されることを明らかにした。

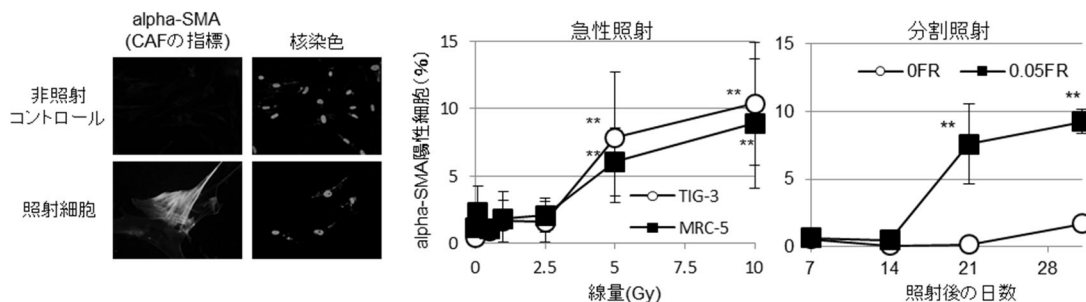


図1 X線照射によるCAFの誘導

##### 2. 放射線誘発CAFによる腫瘍増殖の亢進

放射線で誘発されるCAFが腫瘍細胞の増殖に影響するかどうかを検討するため、ヌードマウスの皮下にヒト子宮頸がん HeLa 細胞と混合して移植し、ヒト腫瘍片を作成した。移植後1月間腫瘍体積を測定して、腫瘍の増殖能を解析した。図2の丸印のがん細胞単独や四角印のがん細胞と非照射線維芽細胞の混合移植と比べ、三角印で示すがん細胞に放射線照射した繊維芽細胞を加えて移植した場合には、腫瘍体積が顕著に増加し、放射線誘発CAFががん細胞の増殖能を亢進することを明らかにした。

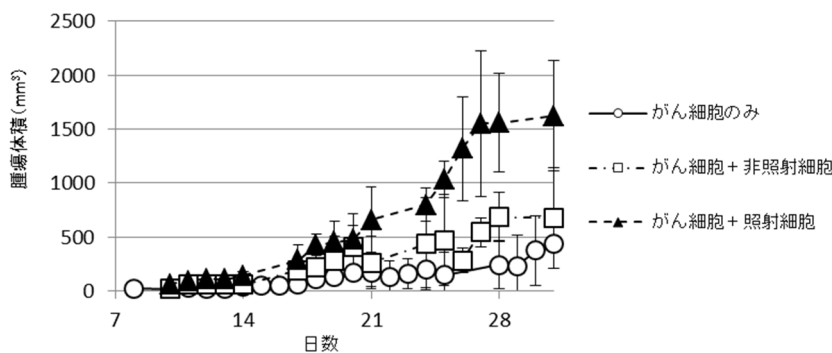


図2 放射線誘発CAFによる腫瘍増殖の亢進

##### 3. 放射線誘発CAFの分子機構

放射線による酸化ストレスは、ミトコンドリアからエネルギー産生の副産物として発生する活性酸素が関与している。活性酸素はトランスフォーミング増殖因子- (TGFbeta) シグナル経路を活性化して下流の alpha-SMA の発現を誘導し、CAF を形成することが考えられる。我々は、ヒト正常線維芽細胞を用いて放射線により活性酸素が増加すること、また、TGFbeta シグナル経路が活性化されることを明らかにした。さらに、細胞内の抗酸化物質グルタチオンを増加させる N-アセチルシステインを事前処理すると、放射線による活性酸素量の増加と TGFbeta シグナル経路の活性化を抑制し、CAF の形成が抑制されることを明らかにした。

以上より、放射線誘発CAFは、ミトコンドリアから発生する活性酸素が細胞外に放出され、TGFbeta を活性化し、細胞膜受容体に結合して、TGFbeta シグナル経路を活性化することで線維芽細胞を活性化して周辺部の細胞の増殖を促進すると考えられる。活性化した線維芽細胞から放出される増殖因子は、繊維芽細胞だけでなく、がん細胞の増殖を促進することで、ガン微小環境を形成すると考えられる (図3)。

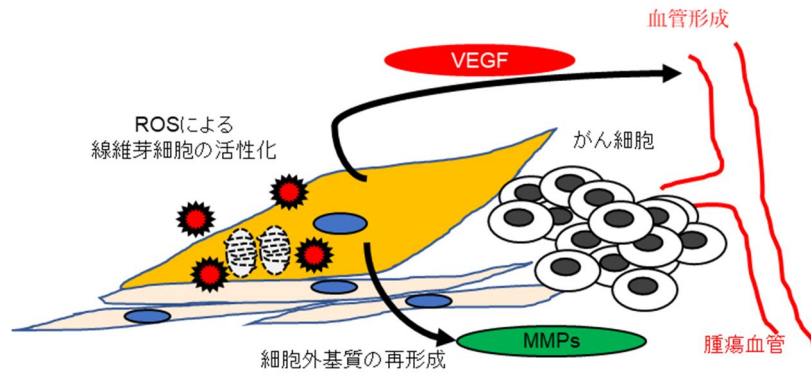


図3 放射線誘発CAFの形成機構

#### IV. 考察

がん組織には、がん細胞と非がん細胞が存在し、相互作用してがん微小環境を形成している。がん細胞は、TGFbeta や血小板由来成長因子 (PDGF) を放出して、CAF の形成を制御している。一方、CAF からは、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) が放出され、がん細胞の増殖や浸潤などのガンの発達を促進することが報告されている。これまで放射線発がんにおけるがん微小環境の役割については、未解明であった。本研究では、放射線発がんに関わる放射線の悪影響を明らかにするため、がん細胞だけでなく、腫瘍組織の周辺部の細胞の放射線影響に着目して結合組織を構成するヒト線維芽細胞の解析を行った。放射線照射後、活性酸素は、放射線応答によるミトコンドリアのエネルギー産生の活性化により副産物として発生する。CAF の誘導には活性酸素による TGFbeta シグナル経路の活性化が必要で、活性酸素は、急性照射に比べて長期間の分割照射ではより低い線量で誘導される。このため、急性照射では CAF の誘導に 5Gy 以上の照射線量が必要であるが、分割照射や慢性照射では、より低い線量で CAF が誘導されることが考えられる。

細胞内の抗酸化物質グルタチオンを増加させる N-アセチルシステインを事前処理すると、放射線による活性酸素量の増加と TGFbeta シグナル経路の活性化を抑制し、CAF の形成が抑制されることを明らかにした。さらに、茶葉に含まれるエピカテキンは、放射線によるミトコンドリア損傷を防護し、酸化ストレスの誘導を抑えることをマウスでの動物実験で報告している。以上の結果から、抗酸化剤は放射線の晩発影響である発がんの発症を抑制する防護効果を持つことが考えられる。本研究の成果は、放射線発がんの機序解明の一端となりうる。科学的根拠に基づき、低線量・低線量率放射線発がんリスクの解明が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N.	4. 巻 16
2. 論文標題 Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGFbeta Signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular cancer research	6. 最初と最後の頁 1676-1686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-18-0321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kunoh T, Shimura T, Kasai T, Matsumoto S, Mahmud H, Khayrani A, Seno M, Kunoh H, Takada J.	4. 巻 30
2. 論文標題 Use of DNA-generated gold nanoparticles to radiosensitize and eradicate radioresistant glioma stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6528/aaedd5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 1) Tsutomu Shimura, Mao Koyama, Daiki Aono, Naoki Kunugita	4. 巻 in press
2. 論文標題 Epicatechin as a Promising Agent to Countermeasure Radiation Exposure by Mitigating Mitochondrial Damage in Human Fibroblasts and Mouse Hematopoietic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB J	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1096/fj.201802246RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimura Tsutomu, Sasatani Megumi, Kawai Hidehiko, Kamiya Kenji, Kobayashi Junya, Komatsu Kenshi, Kunugita Naoki	4. 巻 16
2. 論文標題 ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 2345 ~ 2354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1080/15384101.2017.1387697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasatani Megumi, Xi Yang, Kajimura Junko, Kawamura Toshiyuki, Piao Jinlian, Masuda Yuji, Honda Hiroaki, Kubo Kei, Mikamoto Takahiro, Watanabe Hiromitsu, Xu Yanbin, Kawai Hidehiko, Shimura Tsutomu, Noda Asao, Hamasaki Kanya, Kusunoki Yoichiro, Zaharieva Elena Karamfilova, Kamiya Kenji	4. 巻 38
2. 論文標題 Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 570 - 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1093/carcin/bgw208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kunugita Naoki, Shimura Tsutomu, Terada Hiroshi, Yamaguchi Ichiro.	4. 巻 67
2. 論文標題 Tokyo Electric Power Company Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident and public health.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the National Institute of Public Health	6. 最初と最後の頁 2-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terada Hiroshi, Yamaguchi Ichiro, Shimura Tsutomu, Svendsen Erik.R., Kunugita Naoki.	4. 巻 67
2. 論文標題 Regulation values and current situation of radioactive materials in food.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the National Institute of Public Health	6. 最初と最後の頁 21-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Ichiro, Shimura Tsutomu, Terada Hiroshi, Svendsen Erik.R., Kunugita Naoki	4. 巻 67
2. 論文標題 Lessons learned from radiation risk communication activities regarding the Fukushima nuclear accident.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the National Institute of Public Health	6. 最初と最後の頁 93-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimura Tsutomu, Yamaguchi Ichiro, Terada Hiroshi, Kunugita Naoki.	4. 巻 67
2. 論文標題 Lessons learned from radiation biology: Health effects of low levels of exposure to ionizing radiation on humans regarding the Fukushima accident.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the National Institute of Public Health	6. 最初と最後の頁 115-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimura Tsutomu	4. 巻 93
2. 論文標題 Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 381 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/09553002.2016.1257832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 志村勉、樺田尚樹	4. 巻 52
2. 論文標題 ミトコンドリアの放射線応答と放射線発がんへの影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 183-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shimura T, Koyama M, Aono D, Kunugita N.
2. 発表標題 Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells.
3. 学会等名 第62回日本放射線影響学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、小林純也、小松賢志、櫻田尚樹
2. 発表標題 放射線誘発がん関連線維芽細胞は、活性酸素によるTGFbeta;シグナリング経路の活性化を介してがんの増殖を促進する
3. 学会等名 第61回日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimura Tsutomu and Kunugita Naoki
2. 発表標題 Radiation-induced mitochondrial damage in neural progenitor stem cells and differentiated cells.
3. 学会等名 The 8th Annual Meeting of the International Society of Radiation Neurobiology. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimura Tsutomu, Sasatani Megumi, Kawai Hidehiko, Kamiya Kenji, Kunugita Naoki.
2. 発表標題 A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells.
3. 学会等名 The 1st international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、小林純也、小松賢志、櫻田尚樹
2. 発表標題 ATMが制御する核とミトコンドリアの放射線応答
3. 学会等名 第60回日本放射線影響学会
4. 発表年 2017年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shimura T, Yamaguchi I, Kunugita N	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 10
3. 書名 Encyclopedia of Environmental Health, 2nd Edition.	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----