

令和 3 年 8 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02963

研究課題名(和文) 幹細胞消耗性病態の機能回復を目的とした肥沃化再生医療の開発

研究課題名(英文) Development of fertilization therapy for functional recovery of stem cells-wasting pathology

研究代表者

吉村 浩太郎 (Yoshimura, Kotaro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60210762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：培養幹細胞では2Gyまでの照射では照射量に依存して、幹細胞が死滅する。しかし、2 Gyを超える照射では照射量による影響はなかった。すなわち、照射影響は、細胞の周期による影響が大きく、分裂期にある細胞が選択的に影響を受けることがわかった。動物実験では2 Gy以上の1回照射量であれば、総照射線量ではなく、照射回数が多いほど、放射線障害による機能低下が大きいことが明らかになった。この結果は、今後最適な放射線治療プロトコルを確立するために重要であり、がん治療効果との関連に基づき、確立できるものと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、放射線障害の本質は幹細胞死であり、幹細胞枯渇による組織の機能低下であることがわかった。その障害は進行性に増悪するものであり、放射線障害を改善するための、照射プロトコルの開発や予防法の開発に大きく貢献できるものである。

研究成果の概要(英文)：In vitro study using cultured human ASCs found that a single dose of irradiation resulted in a dose-dependent cytotoxicity, but only up to a 2-Gy dose, suggesting the cell cycle stage is critical for determination of susceptibility of stem cells to radiation. The animal study revealed that, in contrast to acute radiation injury, chronic radiation damage-associated wound healing capacity was not proportional to the individual dose or the total irradiation dose received, but appeared to be highly influenced by the number of and the interval between irradiations, if each dose was more than 2 Gy. After radiation exposure, the tissue functions, including vascularity and wound healing capacity, were impaired progressively over time. This result indicated that the tissue devitalization did not result directly from the acute injury; it resulted from the stem cell depletion that was a progressive consequence from repeated irradiation.

研究分野：形成外科

キーワード：放射線障害 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

放射線照射による組織障害の病態は複雑であり、DNA 損傷修復、細胞死、炎症、血管新生、細胞外マトリクスの再構築など多くの異なるメカニズムが関わっている。慢性障害の病態及び治療は急性障害よりもさらに複雑であるが、組織に含まれる幹細胞が、放射線照射による組織の慢性障害の程度ととくに密接に関わることを示唆する知見が得られている。組織損傷からの回復過程はこのように複雑な組織・細胞間の連携により制御されているため、最適な分割照射条件の決定には *in vivo* での検討が不可欠である。

2. 研究の目的

以上の背景から、我々は、幹細胞は 10 Gy 程度の高線量には抵抗性があり、高線量かつ少数回の照射によって組織への障害を最小限にできるとする仮説を立てた。この仮説を検証するため、本研究では、上記のマウスモデルを用い、無処置群を対照群として、高線量・少数回及び低線量・多数回の実験群を設定した。以前の研究では、マウス皮膚に放射線を照射してから 4 週間以内に観察される急性効果のみを対象としたが [20]、本研究では、培養 ASCs による *in vitro* の検討とマウス皮膚を用いた *in vivo* の検討を組み合わせ、慢性的影響を調べることにした。

3. 研究の方法

(1) 細胞の単離及び培養

ヒト大腿部から吸引した脂肪組織より単離した ASCs を実験に用いた。提供者は body mass index (BMI) 22.6 kg/m² の 43 歳女性で、自治医科大学に書面によるインフォームドコンセントを提出済みである。ASCs は既報の論文に従って単離した。すなわち、吸引脂肪をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) で洗浄し、その後 0.2% コラゲナーゼを含む PBS 中、37°C で 30 分間振盪した。次いで 800 × g、5 分間の遠心分離により、成熟脂肪細胞及び結合組織を ASCs が含まれる遠心沈渣から取り除いた。実験に用いた ASCs は、フローサイトメトリーにて細胞表面マーカー CD34 陽性かつ CD31 及び CD45 陰性の細胞が 90% 以上であることを確認している。

(2) ヒト ASCs への *in vitro* 放射線照射

培養したヒト ASCs に、卓上型 X 線照射装置 MX-80Labo (mediXtec Japan Corp., Chiba, Japan) を用いて 0 (コントロール)、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0 及び 10.0 Gy の放射線を一回照射した (図 1)。放射線照射から 6 時間後に Hoechst 33342/propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO) 及び Annexin V Alexa Fluor™ 647 Ready Flow Conjugate stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で細胞を染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞生存率を測定した。さらに、放射線照射した細胞を 6 日間培養し、LUNA-FT™ Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems) により生細胞数を測定した。培養したヒト ASCs に 0 から 10 Gy までの放射線を照射した。6 時間後に細胞の生存率を、6 日後に生細胞数をそれぞれ測定した。

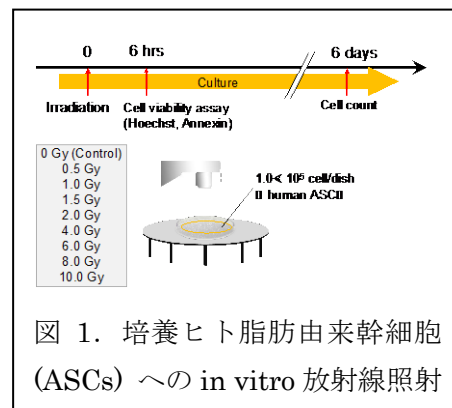


図 1. 培養ヒト脂肪由来幹細胞 (ASCs) への *in vitro* 放射線照射

(3) マウス背部皮膚への *in vivo* 放射線照射

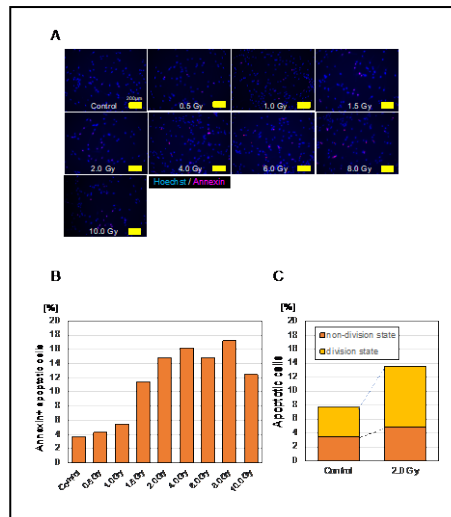
7 週齢の BALB/cfc3H マウスを実験に用いた。マウスは以下の 4 群に無作為に割り付けた (N = 4-5/群)。1) 放射線照射を受けない無処置群、2) 2 Gy/日の照射を 20 日受ける群、3) 10 Gy/週 (隔週) の照射を 4 回受ける群、及び 4) 10 Gy/月 (隔 4 週) の照射を 4 回受ける群。放射線照射を行わない無処置群を対照群とし、3 つの異なる分割照射条件 [2 Gy/日 × 20 日照射、10 Gy (隔週) × 4 回照射及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射] の影響を検討した。マウスは 4 群のいずれかに無作為に割り付けた (N = 4-5/群)。最後の照射から 6 ヶ月後に、全ての群で皮下酸素分圧、ヘモグロビン (Hb) 酸素飽和度及び皮膚粘弾性を測定し、さらに創傷治癒実験を行なった。治癒の程度は、各群の代表的な個体に皮膚パンチバイオプシーを実施し、顕微鏡で観察すること

により判断した。無処置群及び2 Gy/日 × 20 日群では、照射から1及び3ヶ月後にも皮下酸素分圧、Hb 酸素飽和度及び皮膚粘弾性を測定した。

4. 研究成果

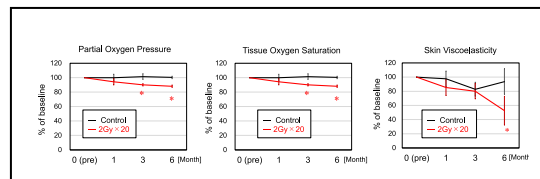
(1) ヒト ASCs への *in vitro* 放射線照射の影響

0.5~2.0 Gy 程度までは照射線量の増加に伴う幹細胞死が確認されたが、2 Gy 以上の線量においては、照射線量増加による細胞死への影響はほとんどみられなかった。放射線照射から6日後の ASCs 生細胞数にも、上記の細胞生存率の結果と同様の傾向を認めた (図 4)。0~2.0 Gy 程度までは照射線量の増加に伴い生細胞数が減少したが、2.0 Gy 以上の線量では著明な差を認めなかった。



(2) *In vivo* 放射線照射後のマウス背部皮膚の生理的変化

マウス背部皮膚に図 2 の条件で放射線を照射し、無処置群及び2 Gy × 20 日間照射群の皮膚及び皮下組織の経時的な変化を調査した。その結果、2 Gy × 20 日間照射群において、放射線照射後



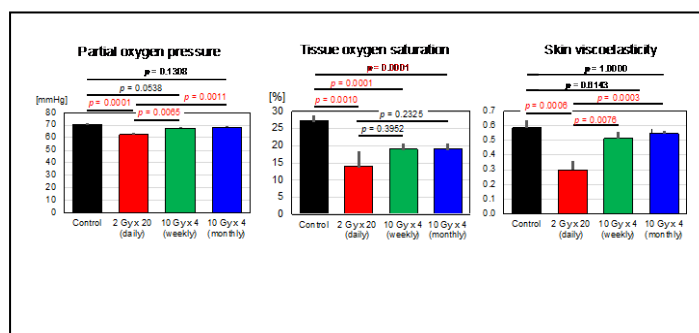
6ヶ月時点で、皮下酸素分圧、Hb 酸素飽和度、皮膚粘弾性のいずれにおいても無処置群と比して有意な低下がみられた (図 5; $p < 0.05$)。皮下酸素分圧および Hb 酸素飽和度は約 10%、皮膚粘弾性は 40%以上も低下した。以上のような生理的変化の兆候は放射線照射後 1 ヶ月から認められ、皮下酸素分圧及び Hb 酸素飽和度の差は照射後 3 ヶ月時点で既に有意であった ($p < 0.05$)。

(3) 分割照射条件がマウス背部皮膚の生理的変化に及ぼす影響

放射線照射 6 ヶ月時点で、皮下酸素分圧、Hb 酸素飽和度、皮膚粘弾性のいずれにおいても、2 Gy/日 × 20 日照射群が最も低い傾向を認めた。無処置群との差はいずれも有意であった (皮下酸素分圧 $p = 0.0001$; Hb 酸素飽和度 $p = 0.0010$; 皮膚粘弾性 $p = 0.0006$)。

皮下酸素分圧及び皮膚粘弾性においては、10 Gy (隔週) × 4 回照射群及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射群の値が 2 Gy/日 × 20 日照射群のそれよりも有意に高かった (皮下酸素分圧 $p = 0.0065$ 及び 0.0011 ; 皮膚粘弾性 $p = 0.0076$ 及び 0.0003)。Hb 酸素飽和度においても、その差は有意でないものの、10 Gy (隔週) × 4 回照射群及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射群の値が高い傾向が認められた。以上の結果は、低線量・多数回の照射よりも、寡分割照射の方が組織への障害が少ないことを示している。

実際に、10 Gy (隔週) × 4 回照射群及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射群の皮下酸素分圧及び皮膚粘弾性では、無処置群との有意な差を認めなかった。



(4) 分割照射条件がマウス背部皮膚の組織学的変化に及ぼす影響

放射線照射 6 ヶ月時点で皮膚の肥厚及び皮下脂肪組織の萎縮が確認され、それらは 2 Gy/日 × 20 日照射でとくに著明であった (図 7)。無処置群と比較して、2 Gy/日 × 20 日照射群の表皮及び真皮は有意に肥厚しており (p = 0.0092 及び 0.0097)、皮下脂肪組織の厚さは有意に減少していた (p < 0.0001)。

10 Gy (隔週) × 4 回照射群及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射群も同様の傾向を示したが、全ての指標において変化の度合いは 2 Gy/日 × 20 日照射群よりも小さかった。表皮厚には有意差を認めず、真皮厚では 10 Gy (隔週) × 4 回照射群のみ無処置群との有意差を認めた (p = 0.0026)。皮下脂肪組織の厚さは無処置群のそれと有意に異なっていた (p < 0.0001 及び p = 0.0097)。

(5) 分割照射条件がマウス背部皮膚の創傷治癒過程に及ぼす影響

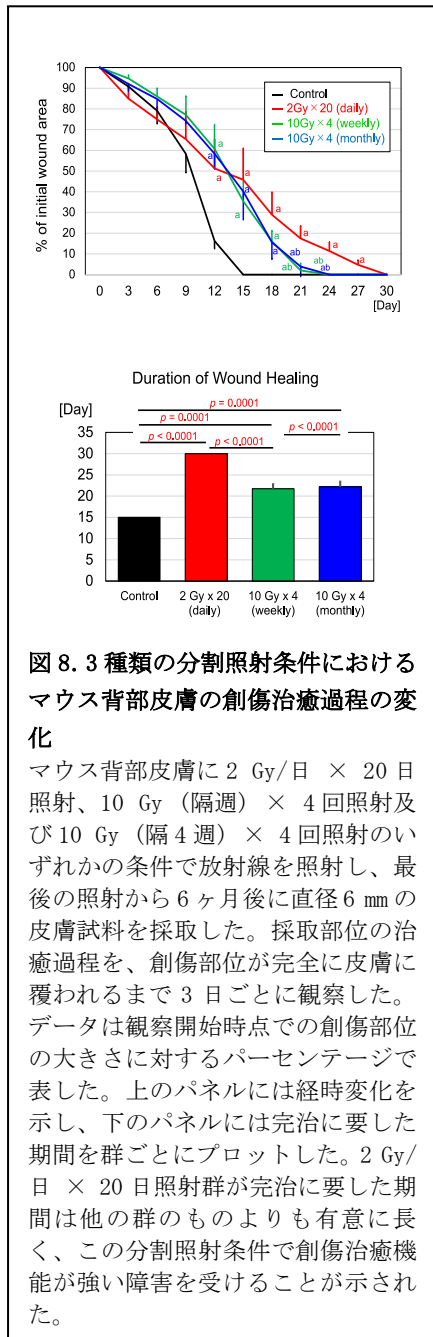


図 8. 3 種類の分割照射条件におけるマウス背部皮膚の創傷治癒過程の変化

マウス背部皮膚に 2 Gy/日 × 20 日照射、10 Gy (隔週) × 4 回照射及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射のいずれかの条件で放射線を照射し、最後の照射から 6 ヶ月後に直径 6 mm の皮膚試料を採取した。採取部位の治癒過程を、創傷部位が完全に皮膚に覆われるまで 3 日ごとに観察した。データは観察開始時点での創傷部位の大きさに対するパーセンテージで表した。上のパネルには経時変化を示し、下のパネルには完治に要した期間を群ごとにプロットした。2 Gy/日 × 20 日照射群が完治に要した期間は他の群のものよりも有意に長く、この分割照射条件で創傷治癒機能が強い障害を受けることが示された。

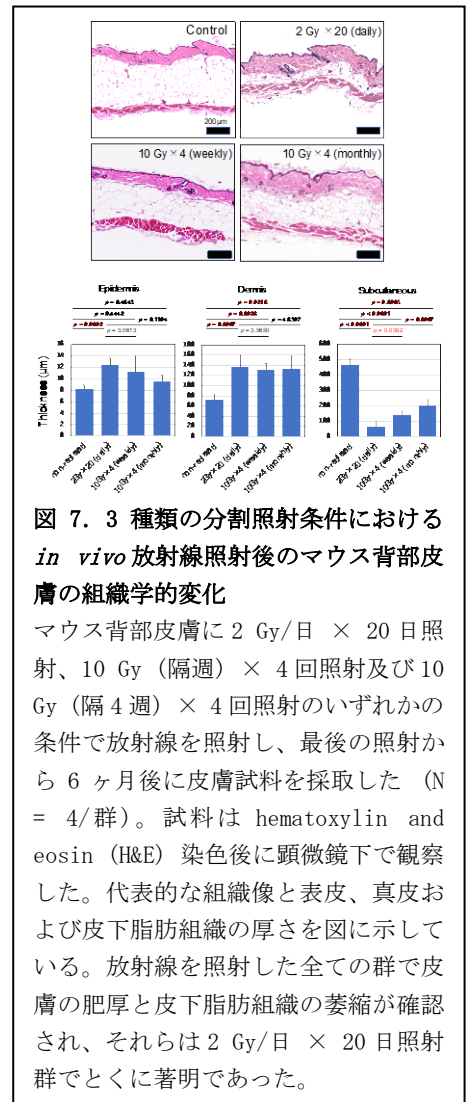


図 7. 3 種類の分割照射条件における *in vivo* 放射線照射後のマウス背部皮膚の組織学的変化

マウス背部皮膚に 2 Gy/日 × 20 日照射、10 Gy (隔週) × 4 回照射及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射のいずれかの条件で放射線を照射し、最後の照射から 6 ヶ月後に皮膚試料を採取した (N = 4/群)。試料は hematoxylin and eosin (H&E) 染色後に顕微鏡下で観察した。代表的な組織像と表皮、真皮および皮下脂肪組織の厚さを図に示している。放射線を照射した全ての群で皮膚の肥厚と皮下脂肪組織の萎縮が確認され、それらは 2 Gy/日 × 20 日照射群でとくに著明であった。

放射線照射 6 ヶ月時点で、マウス背部皮膚から上記のように組織を採取し、さらに採取部位の創傷治癒過程を記録した (図 8; 詳細なデータは補足図 1 に示した)。創傷治癒は 2 Gy/日 × 20 日照射群で著明に阻害され、無処置群においては治癒に平均 15 日要したのに対して、2 Gy/日 × 20 日照射群においては平均 30 日間を要した。

10 Gy (隔週) × 4 回照射群及び 10 Gy (隔 4 週) × 4 回照射群においても、創傷治癒期間は無処置群よりも有意に長かった (いずれも p = 0.0001)。しかしながら、それらは 2 Gy/日 × 20 日照射群の創傷治癒期間よりは有意に短く (いずれも p < 0.0001)、また両者間には有意差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------