

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11652

研究課題名(和文) 乳腺幹細胞の時空間的動態把握に基づく放射線誘発乳がんメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of radiation-induced mammary carcinogenic mechanism by capturing spatiotemporal dynamics of mammary stem cells

研究代表者

飯塚 大輔 (IIZUKA, Daisuke)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・研究統括(定常)

研究者番号：00455388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：低線量被ばくによる発がんリスクは科学的に明らかにしなければならない重要な課題である。幹細胞は放射線発がんの起源細胞と考えられるため、本研究では、幹細胞とその子孫細胞を追跡できる細胞系譜追跡実験を立ち上げ、組織透明化により実現する三次元免疫組織学的解析法を確立した。それらの技術を用い、放射線被ばく後、比較的初期の細胞動態を観察したところ、標識された幹細胞の存在や、その細胞が増殖しているかどうかの評価ができ、乳腺幹細胞の放射線被ばくによる影響を観察できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では放射線誘発乳がんメカニズムを明らかにするために、放射線発がんの起源細胞と考えられる幹細胞に着目し、解析するための技術を導入した。これにより、放射線被ばくしてがんに至る幹細胞の動態を動物実験で明らかにすることが可能となった。将来的には福島原発事故で露呈した、100 mGy以下の被ばくによる発がんリスクを科学的に明らかにすることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carcinogenic risk from low-dose radiation exposure is an important issue that must be scientifically clarified, and stem cells are considered to be the origin of radiation carcinogenesis. Therefore, in this study, we set up a cell lineage tracing experiment that can trace stem cells and their progenies and a three-dimensional immunohistochemical analysis in combination with tissue clearing. Using these techniques, we observed relatively early cell dynamics after radiation exposure. We could evaluate the presence of labeled stem cells and whether they were proliferating or not. This suggests the possibility of observing the effects of radiation exposure on mammary stem cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発がん 乳腺 幹細胞 三次元免疫組織学的解析 細胞系譜追跡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

原爆被爆者の疫学調査において、乳腺は発がんリスクの最も高い臓器の一つである。東京電力福島第一原子力発電所事故後、低線量被ばくによる発がんリスクについて注目が集まった。100 mGy 以下の被ばくによる発がんリスクは科学的に明らかにしなければならない重要な課題である。

近年、発がん起源細胞としての組織幹細胞の重要性が提唱されている。組織幹細胞は、それ自身のターンオーバーが遅く、遺伝子変異が蓄積しやすいことから、重要な発がんの起源細胞である。国際放射線防護委員会 (ICRP) 出版物 131 (2015 年)「放射線防護の発がん諸側面に関連する幹細胞生物学」において、幹細胞生物学の研究推進によって低線量・低線量率放射線発がんリスクの外挿に有用な知見が得られる可能性について言及していることから、その重要性がわかる。

乳腺幹細胞は、特定の細胞表面マーカーで分取される集団に乳腺を再構築できる細胞が含まれること (Shackleton et al., Nature, 2006) で、その存在が証明された。しかしながら、その集団には他の細胞も含まれることや、個々の研究者が別種のマーカーを用いた解析を行っている等のため、コンセンサスが得られていない。

これまでに我々は乳がんになりやすいマウス系統でのみ、低線量被ばくによる乳腺幹細胞数の変化をある種の細胞表面マーカーを用いて検出している (未発表データ)。このことから、放射線誘発乳がんリスクを幹細胞数で説明できる可能性がある。

しかし、低線量被ばくによる乳腺幹細胞増加メカニズムは不明な点が多い。この幹細胞数増加に加え、その周囲の環境 (微小環境) 変化の影響も受け、被ばくにより幹細胞やその子孫細胞に増殖速度、細胞死、自己複製能などの変化が引き起こされていることが考えられるが、これらの動態を正確に捉える必要があると考えられた。近年、空間的な幹細胞の動態を捉える手法として、細胞系譜追跡技術が開発された。幹細胞系譜追跡技術とはマウスにおける分裂能力をもつ細胞 (= 幹細胞や前駆細胞) に薬剤投与により永続的に「ラベル (= 蛍光タンパク質を発現)」することで、その子孫細胞も同様にラベルされるという実験手法であり、幹細胞の増殖速度、自己複製能、細胞競合ならびにクローン性増殖などの幹細胞の動態研究に広く用いられている。

また、前述の低線量被ばくによる幹細胞数の変化には、被ばく後の性成熟による乳腺の発達に関わることが示唆されていることから、この発達過程に影響が出ていると考えられるが、その解析には困難が伴う。すなわち、発達期では終蕾 (terminal end bud, TEB) と呼ばれる管腔の末端部に幹細胞が多く存在しており、管腔の増殖に重要な役割を演じているが、その観察はこれまで組織切片という平面的な観察にとどまっており、立体的な動態を解明することは困難であった。

近年、組織透明化処理により、脳などの幾つかの組織で、立体構造を維持したままの免疫組織学的な蛍光観察が可能となった (Ke et al., Nat Neurosci, 2013 等)。これを乳腺にも適用することにより詳細かつ包括的な形態学的変化を観察することが可能となる。

## 2. 研究の目的

細胞系譜追跡技術ならびに組織透明化処理による三次元免疫組織学的解析技術が発達し、幹細胞を蛍光標識することで、幹細胞とその子孫細胞をマウス体内で空間的に追跡できるようになった。本研究ではこれらの解析技術を用い、放射線被ばくによる細胞動態を時空間的に捉えることを目的としている。最終的には、低線量放射線誘発乳がんメカニズムを明らかにすることを目標としている。

## 3. 研究の方法

### 【細胞系譜追跡実験】

前述の通り、細胞系譜追跡は細胞を標識し、その子孫細胞をマウス体内で追跡する実験手法である。Cre リコンビナーゼ遺伝子を誘導するシステム (Cre マウス) と、標識された細胞を検出するためのレポーター遺伝子を持つマウスを交配して、両者の性質を持つマウスを作製して利用する。Cre リコンビナーゼは LoxP 配列を認識し、二つの LoxP 配列の間の DNA 配列を切り出す作用を持つ。Cre マウスには、特定の細胞で発現するマーカー遺伝子の転写プロモーターの下流に核内に移行し機能するように改変した CreERT2 リコンビナーゼを組み込んである。タモキシフェンを投与すると、マーカー遺伝子を発現する細胞でのみ、発現した CreERT2 リコンビナーゼが機能する。細胞系譜追跡解析では、いったん誘導されると子孫細胞においても発現し続ける、不可逆的なレポーターシステムが用いられる。通常は前述の LoxP 配列には含まれた終止コドンで翻訳が終結するため蛍光タンパク質は産生されないが、Cre が働いて終止コドンが除去されると、その細胞及びその全ての子孫細胞で、蛍光タンパク質が発現する。

本研究では乳腺幹細胞を追跡するプロモーターとして、ケラチン 14 を用いる。ケラチン 14 は乳管を形成する内腔細胞と基底細胞の二種類の上皮細胞のうち、主に基底細胞で発現しており、基底細胞層の幹細胞が両可能性を示すこと (Rios et al, Nature, 2014) が知られている。またレポーターマウスに、tdTomato 赤色蛍光タンパク質発現マウスを使用する。

### 【組織透明化処理による三次元的免疫組織学的解析法】

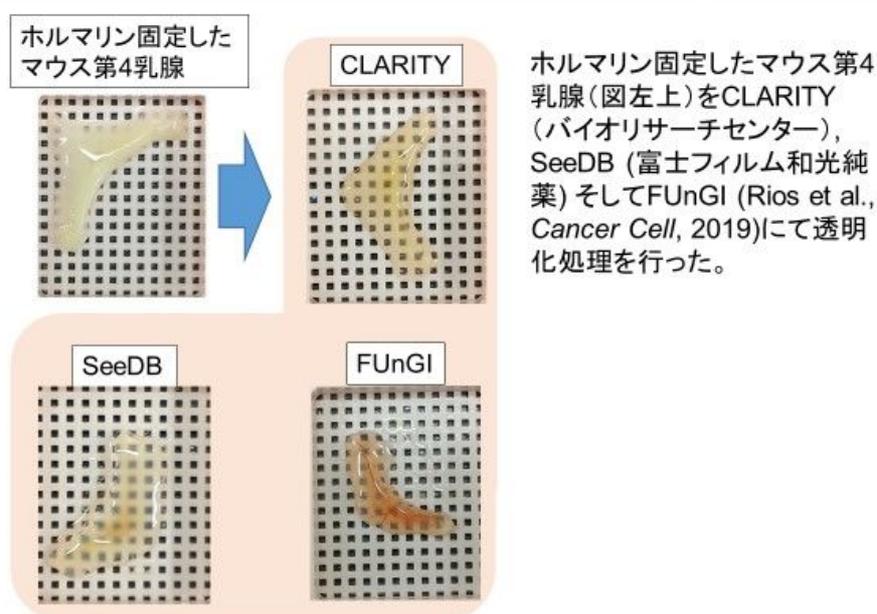
マウス乳腺組織を用いた組織透明化法ならびに免疫組織化学染色は Davis らの報告に準ずる

(Nat Commun, 2016 ; SeeDB 法)。SeeDB (富士フィルム和光純薬) は、乳腺組織をホルマリンで固定後、20 w/v%、40 w/v%、60 w/v%、80 w/v%及び100 w/v% Fructose Solution に順次、一定期間浸漬させることで、組織内の溶媒の屈折率を統一させることで透明化を実現する方法である。CLARITY (バイオリサーチセンター) は Clear Lipid exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging / Immunostaining / in situ-hybridization-compatible Tissue Hydrogel の略称であり、アクリルアミドベースのハイドロゲルを使い組織を透明化する技術である。さらに、本課題が採択された後で報告された (Rios et al., Cancer Cell 2019) FUnGI クリアリング溶液 (50% グリセロール (vol / vol) 2.5 M フルクトース、2.5 M 尿素、10.6 mM Tris Base、1 mM EDTA) も同様に用いた。50 µg/ ml アスコルビン酸、0.05 ng / ml L-グルタチオンを含む FUnGI クリアリング溶液にホルマリン固定した乳腺組織を添加し、4 °C で一晚以上 (暗所で) 反応させることで透明化処理を行った。

#### 4. 研究成果

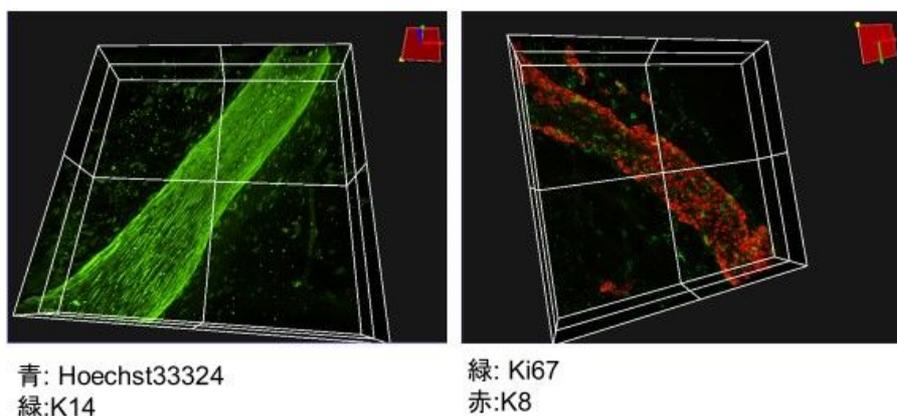
組織透明化については、研究の方法で述べたように、Clarity、SeeDB、FUnGI の手法を用い、マウス乳腺組織を透明化することができた (図1)。FUnGI は、透明化処理にかかる時間が他の方法に比べ短いことから、有用な方法であると考えられた。

図1 マウス乳腺の三次元解析に必要な組織透明化処理



次にこれらの組織透明化を組み合わせた三次元免疫組織学的解析について、マウス乳腺組織におけるケラチン 14 やケラチン 8 などを行い、共焦点蛍光顕微鏡で画像取得し、三次元再構成

図2 マウス乳腺における三次元免疫組織学的解析例



三次元免疫組織学的解析では、Davisら (Nat Commun, 2016) の方法に準じ、乳腺基底細胞で発現するケラチン14 (K14) と細胞核 (Hoechst33324) (図左)、乳腺内腔細胞で発現するケラチン8 (K8) と細胞増殖マーカー Ki67 (図右) で染色し、取得した画像を三次元再構成した。

することができた(図2)。

これらの観察技術を用い、放射線被ばく後の乳腺の状態を観察した。具体的には二種類の乳腺上皮細胞のうち、基底細胞で主に発現するケラチン 14 のプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼが発現するマウスと、赤色蛍光たんぱく質 tdTomato レポーターマウスの F1 マウスに対し、7 週齢でタモキシフェンを投与し、放射線照射を行った。2 Gy のガンマ線を照射し、1 週間後の乳腺において、組織透明化処理し共焦点顕微鏡で観察した。その結果、tdTomato タンパク質を発現する基底細胞を観察することができた。細胞増殖マーカー Ki67 染色を行ったところ、tdTomato タンパク質を発現する細胞では、現時点で Ki67 陽性細胞を見出すことはできていない。同じ個体から得られた乳腺組織から、酵素処理により乳腺細胞を分離し、特異的な表面抗原マーカーを用いたフローサイトメトリー解析を行ったところ、照射により、基底細胞の割合が減少する傾向を見出した。また、これら細胞集団の細胞周期解析により、細胞周期が回っている細胞を示す、S 期と G2/M 期細胞が被ばくにより減少する傾向を示した。タモキシフェンはエストロゲン受容体拮抗薬であり、乳腺細胞の増殖などに影響を与える( Shehata et al. Breast Cancer Research 2014, 16:411 ) 等により、結果の解釈に注意を要するが、成体期での放射線照射により、乳腺組織では基底細胞でその割合が減少し、かつ、増殖細胞が減少する傾向にあることが示唆された。引き続き本研究を推進し、低線量被ばく後のがんに至る詳細な細胞動態を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daisuke Iizuka, Chiuru Tsuruoka, Masaaki Sunaoshi, Mayumi Shinagawa, Tatsuhiko Imaoka, Shizuko Kakinuma.
2. 発表標題 Evaluation of low-dose radiation effect on tissue stem cells using three-dimensional histology method.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Iizuka, Chizuru Tsuruoka, Masaaki Sunaoshi, Mayumi Shinagawa, Tatsuhiko Imaoka, Shizuko Kakinuma.
2. 発表標題 Establishment of three-dimensional histological analysis method for elucidating tissue dynamics after low-dose radiation exposure.
3. 学会等名 65th Annual International Meeting Radiation Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Iizuka, Tatsuhiko Imaoka, Yukiko Nishimura, Shizuko Kakinuma.
2. 発表標題 Evaluation of low-dose radiation effect on mammary stem cells using three-dimensional immunohistochemical analysis.
3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------