

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340024

研究課題名(和文) 乳腺微小環境から見た低線量・低線量率放射線による乳がんリスク解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of low dose, low dose-rate radiation induced mammary cancer through the interaction between mammary stem cells and their microenvironment

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・主任研究員(定常)

研究者番号：00455388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線発がんリスクの高い乳腺においても、低線量・低線量率の被ばくによる乳がん発生の分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では乳がんの起源となる乳腺幹細胞とその周囲を取り巻く乳腺微小環境への放射線被ばくの影響を包括的に解析することを目的としている。低線量被ばくによる乳腺幹細胞への影響について、幼若期被ばくによる乳腺幹細胞の増加に閾値の存在が示唆されること、線量率効果が存在する事、さらに系統差が存在することを見出した。微小環境のみの被ばくによる乳腺発がんを検出できる実験系を導入した結果、高線量被ばく群はコントロール群と比べて、がんの増殖速度が高まることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies have suggested that the risk of breast cancer incidence in A-bomb survivors is higher than any other sites. The molecular mechanisms of low dose, low dose-rate radiation induced breast cancer have not been clearly demonstrated yet. Tissue stem cells are one of critical target for carcinogenesis. To clarify the molecular mechanisms of low dose, low dose-rate radiation induced breast cancer, we focused on the interaction between mammary stem cells and their microenvironment after radiation exposure.

We observed here that mammary stem cells were increased in a strain- and dose-rate- dependent manner when mammary gland was irradiated at 4 weeks of age. We also observed the increase of tumor growth rate in radiation chimera model, which recapitulate the direct effect of tumor induction by irradiated mammary microenvironment.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線誘発乳がん 乳腺微小環境 乳腺幹細胞

### 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高い臓器の一つとして報告されている。また、低線量放射線の発がんリスクは飲酒・喫煙などに比べると相対的に低いにもかかわらず、2011年に発生した東京電力福島第一原子力発電所事故後、低線量長期被ばくによる発がんリスクに注目が集まった。これらの低線量かつ長期間にわたる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。

我々はこれまでラット放射線誘発乳がんモデルを用い、被ばく時年齢による乳がん発生リスクの変化 (Imaoka et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2013) やマイクロアレイを用いたゲノムコピー数異常 (Iizuka et al., *Radiat. Res.*, 2010) 遺伝子発現異常 (Imaoka et al., *Mol. Carcinog.*, 2011) マイクロ RNA 発現異常 (Iizuka et al., *Radiat. Res.*, 2013) を明らかにしてきた。これらの網羅的解析を通し、放射線誘発乳がんに関連する遺伝子等が同定された一方で、未だ発がんメカニズムの全貌をとらえていないため、多面的な研究アプローチが求められている。さらに低線量率放射線による乳がん発生リスクも明らかになっていない。

近年、組織における微小環境が組織恒常性の維持とともに、発がんにも寄与することが明らかにされた。微小環境を構成する間質には線維芽細胞をはじめ、炎症や免疫をつかさどる細胞、血管やリンパ管、これらの細胞の間に存在するコラーゲンなどからなる結合組織が存在して特徴的な構造を形作っている。乳がん組織片を他個体の正常微小環境内 (乳腺周囲脂肪組織) に移植すると正常組織が発生すること (Maffini et al., *J Cell Sci*, 2004; *Am J Pathol*, 2005) 通常は造腫瘍性を持たない乳腺細胞株 (もしくは正常乳腺組織片) が、放射線被ばくを受けた動物個体の乳腺周囲脂肪組織に移植されると、腫瘍を生じる (Barcellos-Hoff, et al., *Cancer Res*, 2000, Nguyen et al., *Cancer Cell*, 2011) ことから微小環境の恒常性維持とその修飾はがん化に加え、がんの維持・増殖において重要な役割を演じていることがわかる。

数十年前に造血幹細胞の概念が提唱されてから、多くの組織でそれ固有の幹細胞が発見されてきた。乳腺では古くから幹細胞の存在が示唆されていたが、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。近年、乳腺幹細胞と乳がんの関連性について多くの報告がなされている。乳腺では遺伝子変異やエピジェネティックな変化が引き起こされた同一の標的細胞から (変異の種類に応じて) 腫瘍の亜型ができるという古典的な考え方とは異なり、組織中の異なる細胞がそれぞれの腫瘍の亜型の起源になると考える

「cell-of-origin」仮説が強く支持されるようになった (Visvader et al., *Nature*, 2011) 。この中でも組織幹細胞はそれ自身のターンオーバーが遅いので、発がんの引き金となる遺伝子変異が蓄積しやすいこと、組織幹細胞の数やその分裂回数と発がんとは関連があると言われていること (Ginestier et al., *Breast Cancer Res*, 2007, Tomasetti et al., *Science*, 2016) から乳腺幹細胞が乳がんの重要な起源細胞として考えられている。

前述の通り、放射線による微小環境の修飾が乳がん発生リスクを上昇させていることが言われているため、放射線誘発乳がんリスクを考える上で、乳がんの起源細胞である上皮細胞の被ばくに加え、周辺の微小環境の被ばくによる影響も含めた形での検討が必要となっている。本研究では、乳腺微小環境の変化による乳腺幹細胞への影響の解析を中心に、低線量・低線量率放射線被ばくによる乳がん発生メカニズム解明を目指す。

### 2. 研究の目的

前述の通り、組織幹細胞やその周辺の微小環境が発がんにおいて重要な役割を演じていることが知られるようになった。放射線被ばくした組織幹細胞ならびに乳腺微小環境と発がんとの関係はほとんど明らかにされていない。本研究では組織幹細胞の被ばくによる動態を明らかにするとともに、微小環境の影響を検討するモデルを用い、特に乳腺微小環境の変化による乳腺幹細胞への影響の解析等を通し、低線量・低線量率放射線による乳がん発生メカニズム解明をすすめることを目的としている。

### 3. 研究の方法

1) Radiation chimera model を用いた被ばくした微小環境が発がんに対する影響解析

全ての動物実験は広島大学動物実験ならびに遺伝子組み換え実験の承認を受けた。本研究では Barcellos-hoff らが提唱する Radiation chimera model を用いた実験を行う。この実験系では p53<sup>-/-</sup> マウスから得られた乳腺組織片を移植するため、あらかじめ10週齢雌 p53<sup>-/-</sup> マウスを安楽死させ、第4乳腺を採取し、リンパ節を除去した後約 1mm × 1mm になるようにメスで細切し、凍結保存する。Radiation chimera model は3~4週齢野生型 Balb/c 雌マウスの乳腺上皮細胞を含む脂肪体 (fat pad) の一部を外科的に切除し、10週齢まで飼育ののち、線 (Gammacell 40 Exactor, Best Theratoronics) を用いて50、100、1,000 mGy のガンマ線全身照射を行い、照射後3日目に、前述の p53<sup>-/-</sup> マウスから得られた乳腺組織片を解凍し、前述の fat pad に移植し、移植後200日前後より定期的な触診ならびにサイズ計測を行った。

2) 被ばくした乳腺幹細胞の動態解析

被ばくした乳腺幹細胞の動態解析には複

数の評価法を用いる。乳腺幹細胞を含む細胞集団が特異的に持つ表面抗原を認識する抗体 (Lin<sup>-</sup>CD24<sup>med</sup>CD49f<sup>high</sup>、もしくは Lin<sup>-</sup>/CD29<sup>high</sup>/CD24<sup>+</sup>/CD61<sup>+</sup>) を用いた FACS による評価を行った (Shackleton et al., Nature, 2006, Lim et al., Breast Cancer Res, 2010)。Mammosphere 培養法は、非接着の球状細胞集団として培養する近年確立された培養法で、mammosphere を形成できるのは乳腺幹細胞であると理解されている (Frances et al., and Lauren et al., J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2012)。乳腺上皮細胞を上皮成長因子 (Epidermal growth factor) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast growth factor) を含む特殊な培地で段階希釈後、低吸着プレートにて約 1 週間培養を行い、各希釈段階での mammosphere 構造体の有無で最終判定した。

#### 4. 研究成果

最初に、乳腺幹細胞を含む細胞集団を同定できる細胞表面マーカーを用いた FACS 解析の立ち上げを行った。マウス乳腺に対し、コラゲナーゼなどの複数の酵素処理を行うことで、乳腺細胞を分離し、血球細胞、免疫細胞などの Lineage 細胞を除いたのち、前述の表面抗原を認識する蛍光ラベルされた抗体と反応させ、FACS にて解析を行った。その結果、これまで報告のある FACS プロファイルと類似するパターンを得ることができた。また、Mammosphere 培養法についても、既報に従い予備的検討を行ったところ、Mammosphere 形成を確認することができた。

低線量被ばくによる乳腺幹細胞への影響について、これまで報告されている幼若期被ばくによる乳腺幹細胞の増加 (Nguyen et al., Cancer Cell, 2011) が 50 mGy 被ばくでは引き起こされないこと、総線量 100 mGy において線量率を下げると、高線量率で見られる幹細胞の増加が観察されなくなること、さらにこの現象に系統差が存在することを見出した。これらの現象には幾つかの幹細胞性に関する遺伝子の変化が関与していることが遺伝子発現や免疫組織学的解析で示唆された。一方で Mammosphere 培養法では、前述の FACS で観察された幼若期被ばくによる乳腺幹細胞の増加を捉えることができなかった。このことは、Mammosphere 培養法が放射線被ばくによる幹細胞への影響を評価する実験系に適していない可能性を示唆している。

p53<sup>-/-</sup>雌マウスより得られた乳腺組織片を移植することによる Radiation Chimera model による発がん実験を行った。線量については、1 Gy 被ばくをポジティブコントロールと位置づけ、100 mGy ならびに 50 mGy 被ばくによる微小環境への影響を検討した。その結果、1 Gy 被ばく群のみコントロール群と比べて、がんの増殖速度が高まることを見出した。一方で 100 mGy 以下ではコントロール群と有意な違いは見いだされなかった。病理学

的には Solid タイプの乳がんなどいくつかの種類のがんが発生していた。

これらのことから、被ばくした乳腺幹細胞の動態は、被ばく時期、被ばく線量、その線量率に加え、系統が影響することが強く示唆された。これらの条件は一般に乳がんリスクを修飾することが言われているので、幹細胞の挙動が、被ばくによる乳がんリスクを反映することが期待される。また、Radiation chimera model を使った発がん実験では、1 Gy の被ばくでのみ、がんの増殖速度が高まっていた。予備検討の段階であるが、Radiation chimera model と同様に、幼若期で微小環境にのみ被ばくさせた後、被ばくしていない上皮細胞を移植し、幹細胞の変化を見たところ、1 Gy では幹細胞が増加傾向にあるが、それ以下では、そのような傾向は見られなかった。このことは微小環境の被ばくは確かにそれ自身が幹細胞動態に影響を及ぼすことが出来ることを示している。今後は、さらにこの微小環境と幹細胞動態との相互作用による乳がん発生メカニズムの解明に取り組みたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Iizuka D, Sasatani M, Barcellos-Hoff MH, Kamiya K. Hydrogen peroxide enhances TGF- $\beta$  mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human mammary epithelial MCF-10A cells. Anticancer Research. 37:987-995, 2017. 査読有 doi: 10.21873/anticancer.11408
2. 今岡達彦, 高島賢, 鶴岡千鶴, 西村由希子, 飯塚大輔, 柿沼志津子: 乳腺の幹細胞系: 細胞表面マーカーと細胞系譜追跡の研究から. 乳癌基礎研究会. 25:15-26, 2016. 査読有 リンク: <http://www.nyugan-kisokenkyukai.com/wp-content/uploads/2017/11/0457deb626e381803609bf71e14105ed.pdf>
3. Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L, Tateishi S, Shimura T, Li J, Iizuka D, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Kamiya K. RAD18 Activates the G2/M Checkpoint through DNA Damage Signaling to Maintain Genome Integrity after Ionizing Radiation Exposure. PLoS One. 10:e0117845, 2015. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0117845
4. Cao L, Kawai H, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F. A novel ATM/TP53/p21-mediated checkpoint only activated by chronic  $\gamma$ -irradiation. PLoS One. 9:e104279, 2014. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0104279

5. Imaoka T, Okutani T, Daino K, Iizuka D, Nishimura M, Shimada Y. Overexpression of NOTCH-regulated ankyrin repeat protein is associated with breast cancer cell proliferation. *Anticancer Research*. 34:2165-71, 2014. 査読有 doi:なし

[学会発表](計 22 件)

1. Iizuka D. Strain differences in response of mouse mammary stem cells to low dose radiation exposure. RERF WORKSHOP “ Filling a gap between epidemiology and biology -Biologically-based modeling of radiation-induced carcinogenesis- ”, Hiroshima, 2018.
2. 飯塚大輔 私がこれまで取り組んできた放射線生物学の課題と今後の展望～放射線誘発乳がんメカニズム研究と放射線被ばくのバイオマーカー研究～. 2018 年東京 RBC 新春放談会, 東京, 2018.
3. 飯塚大輔, 今岡達彦, 笹谷めぐみ, 西村由希子, 神谷研二, 柿沼志津子: 乳腺幹細胞の三次元組織学的観察法の確立とそれを用いた低線量被ばく影響解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸, 2017.
4. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, Barcellos-Hoff Mary Helen, 神谷研二: 過酸化水素による TGF- $\beta$  を介した上皮間葉転換促進現象とそのメカニズムについて. 日本放射線影響学会第 60 回大会, 千葉, 2017.
5. Iizuka D, Sasatani M, Barcellos-Hoff M.H., Kamiya K: Strain dependent sensitivity of mammary microenvironment contributes to the radiation-induced increase of mammary stem cell frequency. 63rd Annual International Meeting Radiation Research Society, Cancun, 2017.
6. Iizuka D, Sasatani M, Kamiya K: Involvement of mammary stem cells and their microenvironment in radiation-induced mammary carcinogenesis. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017.
7. Iizuka D, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K: Stem cells and their microenvironment as a candidate target of radiation-induced mammary carcinogenesis. 第 15 回幹細胞シンポジウム. 東京, 2017.
8. 飯塚大輔 放射線誘発乳がんメカニズム研究. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 広島, 2016.
9. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 神谷研二: 低線量被ばくによる乳腺幹細胞頻度の増加に關与する遺伝子群の同定. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 広島, 2016.
10. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 神谷研二: 過酸化水素による TGF- $\beta$  を介した上皮間葉転換促進メカニズム. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 2016.
11. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 神谷研二: 放射線被ばくによる乳腺幹細胞への影響解析 - 低線量被ばくでの乳腺幹細胞頻度の増加には系統差が見られる -. 第 41 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2016.
12. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺微小環境への影響を通じた放射線誘発乳がん研究. 第 25 回乳癌基礎研究会, 奈良, 2016.
13. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 過酸化水素による TGF- $\beta$  を介した EMT 促進現象とそのメカニズムについて. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会 (BMB2015), 神戸, 2015.
14. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量被ばくで増加する乳腺幹細胞頻度の系統差とそのメカニズム. 第 1 回放射線ワークショップ「未来に繋ぐ放射線研究」, 富山, 2015.
15. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 放射線を受けた乳腺における幹細胞の動態は系統により異なる. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 十和田, 2015.
16. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺幹細胞頻度増加の系統差. 第 24 回乳癌基礎研究会, いわき, 2015.
17. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 低線量放射線被ばくによる乳腺への影響とそのメカニズムについて. 第 56 回原子爆弾後障害研究会, 広島, 2015.
18. Iizuka D, Sasatani M, Barcellos-Hoff M.H., Kamiya K: The Strain-dependence of the Increase of Mammary Stem Cell Self-renewal by Radiation Exposure. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, 2015.
19. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺幹細胞における低線量放射線被ばく影響解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 鹿児島, 2014.
20. Iizuka D, Sasatani M, Barcellos-Hoff M. H., Kamiya K: Radiation exposure increases mammary stem cell self-renewal in Balb/c mice. 60th Annual International Meeting Radiation Research Society, Las Vegas, 2014.
21. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺幹細胞頻度から見た乳がんリスク評価の試み. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 札幌, 2014.

22. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 乳腺幹細胞を用いた放射線誘発乳がんリスク評価の試み. 第 39 回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2014.

〔図書〕(計 1 件)

1. 飯塚大輔 新版 放射線医科学 - 生体と放射線・電磁波・超音波 - 2.2 放射線の晩発影響 大西武雄監修、医療科学社(分担執筆) ISBN978-4-86003-481-8、pp.55-57、2016 .

#### 6 . 研究組織

##### (1)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・主任研究員  
研究者番号：00455388

##### (2)研究分担者

神谷 研二 ( KAMIYA KENJI )  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：60116564

笹谷 めぐみ ( SASATANI MEGUMI )  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授  
研究者番号：80423052