

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 27日現在

機関番号：82641

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651051

研究課題名（和文）低線量率放射線による組織幹細胞への放射線障害蓄積性の時空間的解析手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of spatio-temporal analysis for low-dose-rate radiation-induced damage accumulation in tissue stem cells

研究代表者

大塚 健介（OTSUKA KENSUKE）

一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・主任研究員

研究者番号：50371703

研究成果の概要（和文）：発がんへの寄与が明らかとなっている腸管幹細胞（Lgr5 陽性細胞）に着目し、組織幹細胞とその子孫細胞を長期間追跡する手法を利用して、放射により誘発される腸管組織のターンオーバーを定量的に評価する方法を確立した。幹細胞の組織内動態の観察により、照射後に大腸幹細胞が顕著に減少し、その後新たに幹細胞が合成されることを見出した。この幹細胞を中心とした組織動態は放射線によるがん化過程の機構を知る上で重要である。

研究成果の概要（英文）：

Radiation-induced turnover of tissue stem cells was evaluated by genetic lineage tracing of intestinal tissue stem cells (Lgr5⁺ stem cells). X-rays induced loss of Lgr5⁺ stem cells and reduced Lgr5 gene expression in the colon but not in the duodenum. Loss of colonic Lgr5⁺ stem cells seemed to be compensated by de novo production of Lgr5⁺ stem cells. These findings are important evidences to understand radiation-induced carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線、組織・細胞、癌、発生・分化、遺伝子、幹細胞、低線量、腸管

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は組織を構成・維持する上で重要な細胞であり、その機能が減弱もしくは変化することは、組織として機能不全を起し、発がんのリスクを高めるために大きな問題である。幹細胞は、自己複製能や多分化能を有する細胞と定義されるが、細胞分裂によって自己複製能を失うと、幹細胞が枯渇してしまう。そのため、幹細胞はその機能を維持したまま、生体内で維持されなければならない。放射線の傷害が蓄積する標的であると考えら

れている。近年、幹細胞を標識する分子生物学的手法が発達し、幹細胞が生体内でどのような状態で維持されているかが次第に明らかにされている。特に Lgr5 を発現する腸管幹細胞に変異が起こることによって、がん化する報告がなされており、Lgr5 陽性の腸管幹細胞を標識し、その運命を追跡することで、放射線傷害の蓄積性とそのがんリスクを評価することが可能になると考えられた。放射線防護に取り入れられている生物学的知見は、高線量率放射線によるヒト疫学の結果と、

培養細胞による機構の提示が基本であるが、それらをつなぐ個体・組織レベルの応答、および低線量率放射線による情報が欠如しており、防護基準の考え方の課題のひとつとなっている。そのため、個体・組織レベルの幹細胞における放射線応答を理解することは、線量率による生物学的な影響の違いを理解し、最適な放射線防護の考え方に適用することに対して有用である。

2. 研究の目的

放射線に対する障害を、幹細胞を取り巻く組織動態の観点から定量的に解析する手法を確立することにより、発がんに至る組織レベルでの放射線傷害の蓄積性を明らかにし、これを低線量・低線量率放射線の個体レベルでのリスク評価に資することを目的とする。そのために以下の項目を行った。

- (1) Lgr5 陽性幹細胞の lineage tracing によるクリプト標識率の定量的評価
- (2) 放射線照射による標識クリプトの定量的な頻度の解析と、標識細胞のクリプト内動態の解析

3. 研究の方法

(1) 実験動物

米国ジャクソン研究所より、B6.129P2-Lgr5^{tm1(cre/ERT2)Cl_e/J} (#008875、以下、Lgr5-EGFP-creERT2)、レポーターマウスとして B6.129S4-Gt (Rosa)26Sor^{tm1Sor}/J (#003474、以下、ROSA-LacZ)、および B6.129S4-Gt (Rosa)26^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}/J (#007914、以下、ROSA-tdTomato) 系統を購入した。マウスは一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・放射線安全研究センターの動物飼育室にて維持・繁殖を行った。

(2) Lineage tracing

Lgr5-EGFP-creERT2 マウスとレポーターマウス (ROSA-LacZ もしくは ROSA-tdTomato) を交配させて得られた F1 マウスのうち、遺伝子タイピングで creERT2 を有する個体に対し、ヒマワリ種油に溶解させたタモキシフェン (4-hydroxytamoxifen, 4OHT) を 3 mg/40 g 体重、単回腹腔内投与した。

(3) 放射線照射

高線量率 X 線は、X 線照射装置 (MBR-320R) を 300 kVp, 10 mA, 1.0 mm Al + 0.5 mm Cu フィルタの条件 (線量率は 1.5 Gy/min) で行った。

(4) β-ガラクトシダーゼ染色

Rosa-LacZ レポーターを有するマウス腸管を摘出し、ホルマリンを含む固定液で固定後、常法により X-gal 染色液で β-ガラクトシダーゼ活性を可視化した。その後、パラフィン

包埋切片をクリプトの短軸方向が観察できるように作製した。カウンター染色をヘマトキシリン染色にて行った。

(5) フローサイトメトリー

Rosa-tdTomato レポーターを有するマウス腸管 (十二指腸および大腸) を摘出し、EDTA 溶液にてクリプトを単離した。これらをコラゲナーゼ/ディスパーゼで分散させ、細胞懸濁液を調製した。フローサイトメーター (EPICS XL) を用いて、EGFP および tdTomato の蛍光で細胞分布を評価した。

(6) 免疫組織化学染色

Lgr5-EGFP-creERT2 マウスの腸管 (十二指腸および大腸) を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋切片を作製した。Lgr5 幹細胞の存在を、ウサギ抗 EGFP 抗体 (Abcam) を用いて評価した。

(7) リアルタイム RT-PCR

Lgr5-EGFP-creERT2 マウスの腸管 (十二指腸および大腸) を液体窒素で凍結破砕し、total RNA を抽出・精製した。遺伝子発現は、TaqMan プローブを用いてリアルタイム RT-PCR (Applied Biosystems) により分析した。

4. 研究成果

(1) LacZ 標識効率の部位別の解析

まず、本研究において Lgr5-EGFP-creERT2 x ROSA-LacZ マウスを用いることで、腸管における LacZ の発色により Lgr5 幹細胞の lineage tracing が観察可能であることを確認した (図 1)。しかしながら、標識されるクリプトの頻度が低く (図 1 の右上)、またそれも部位によって異なることを明らかにした (図 2)。もっとも標識効率が高い部位は、十二指腸 (duodenum) であり、およそ 4 割のクリプトに LacZ を発現した細胞が見られた。大腸 (colon, rectum) では、クリプトのう

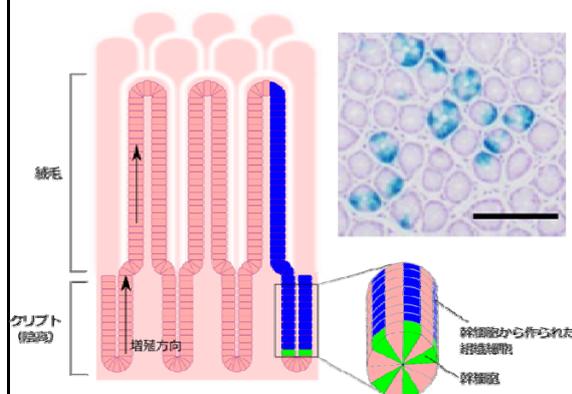


図 1 LacZ レポーターによる Lgr5 の lineage tracing

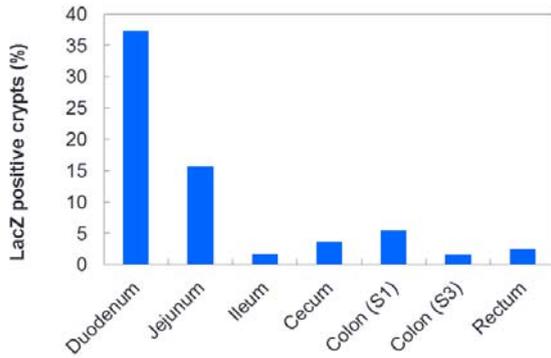


図2 腸管部位ごとの標識効率

ちおよそ 2%程度が標識されるのみであった。また、これらの標識効率は、特に大腸において時間と共に減少する傾向が認められた。したがって、放射線影響を定量的に評価する上で、これらの生理学的な変化が介入することを理解した上で実験を行うことが必要であることが明らかになった。本研究では、最も標識効率が高い十二指腸と、標識効率の低い大腸の2つの組織に着目し、それぞれの放射線照射後の標識クリプトの割合を求めたこととした。

(2) 高線量率・高線量放射線照射後の LacZ 標識効率

クリプトの標識効率の放射線による違いを明らかにするため、マウスに 4OHT を投与し、24 時間後に高線量率 X 線 (1.5 Gy/min) を 3 Gy 照射し、4OHT 投与後 10 日目における十二指腸 (duodenum) および大腸 (colon) の LacZ 陽性クリプトの割合を比較した (表 1)。十二指腸では、照射を行っても LacZ 陽性クリプトが残存し、放射線による影響が小さいことが明らかになったが、大腸の場合には、3 Gy を照射すると LacZ 陽性クリプトが消失することを見出した。これらの結果は、十二指腸に比べ、大腸の Lgr5 陽性幹細胞の放射線感受性が高いことを示唆しており、低線量・低線量率放射線の影響を評価するには、十二指腸よりも大腸の Lgr5 陽性幹細胞の方が適していると考えられた。

表 1 3 Gy 照射後の LacZ 標識クリプト

Group	Post 4OHT Induction (day)	%LacZ Crypts	
		Duodenum	Colon
0 Gy	0	0.0	0.0
	1	1.7	0.0
	3	34.4	0.0
	5	28.2	0.9
	14	21.4	4.8
3 Gy	0	20.6	1.5
	7	0.0	0.0
	30	18.4	0.0
		8.9	0.0

(3) 高線量率・低線量放射線照射後の LacZ 標識効率

3 Gy 照射では大腸の Lgr5 陽性幹細胞が激減することが明らかになったため、線量を下げて (1 Gy)、十二指腸と大腸の LacZ 標識効率を明らかにした。十二指腸は予想通り、非照射群 (0 Gy) と 1 Gy 照射群との間の標識効率に有意な差は認められなかった。一方、大腸の場合は、LacZ 標識クリプトの割合が、1 Gy 照射群で統計学的に有意な差をもって減少することが明らかになった (図 3)。以上より、高線量率放射線による大腸の Lgr5 陽性幹細胞の動態は、十二指腸よりも鋭敏に検出することが可能であり、低線量率放射線影響の評価に適していると考えられた。

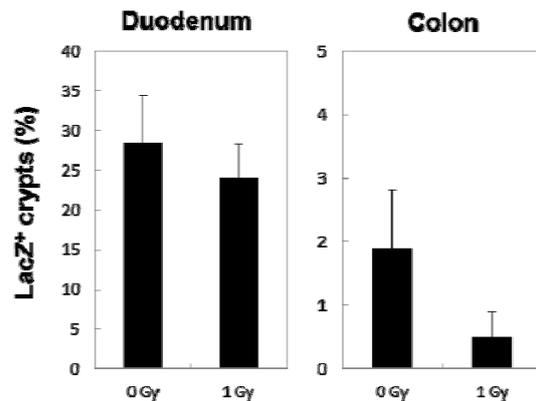


図3 1 Gy 照射後の LacZ 標識クリプト

(4) 照射したマウスにおける Lgr5 遺伝子の発現

高線量率放射線によって減少した LacZ 標識クリプトが、Lgr5 幹細胞の減少に伴って生じているのかを確認するために、Lgr5-EGFP-creERT2 マウスに X 線を照射し、免疫組織化学染色により幹細胞の存在を確認した。Lgr5 幹細胞の免疫染色は、検出可能な抗体がなかったため、EGFP の発現にて評価した (図 4)。

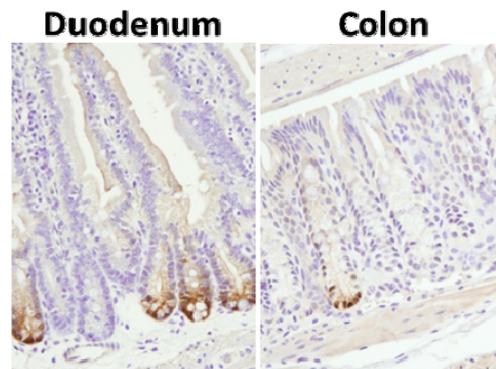


図4 Lgr5 (EGFP) の免疫組織化学染色像

その結果、1 Gy 照射後 24 時間で EGFP 陽性細胞が大腸で顕著に減少していることが分か

った(図5)。十二指腸と大腸組織のリアルタイム RT-PCR による遺伝子発現の定量的評価においても、Lgr5 遺伝子および EGFP 遺伝子が同様に大腸で減少し、十二指腸で顕著な差が認められないという結果が得られた(図6)。以上より、高線量率放射線は、大腸における Lgr5 幹細胞を減少させることで、その後の LacZ 陽性クリプトの割合を減少させていることが推察された。

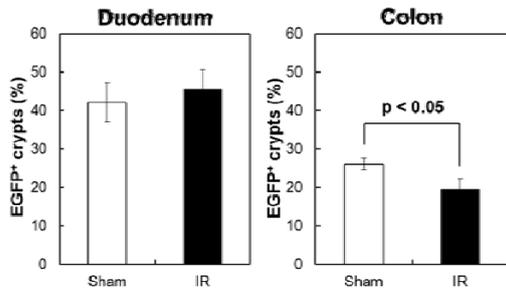


図5 照射後のEGFP陽性クリプト

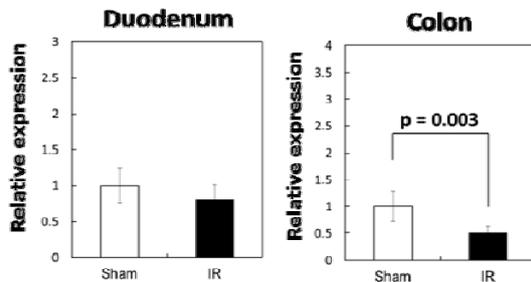


図6 照射後のLgr5遺伝子発現量

(5) tdTomato レポーターによる評価

照射後の Lgr5 幹細胞のクリプト内動態をより詳細に解析するために、Lgr5-EGFP-creERT2 x ROSA-tdTomato マウスを作製し、標識された細胞の蛍光をフローサイトメーターで解析することにより、照射の影響を評価する実験系を構築した。まず、ROSA-tdTomato レポーターマウスを用いることで、LacZ レポーターマウスと同様に Lgr5 幹細胞を標識することが可能であった(図7)。

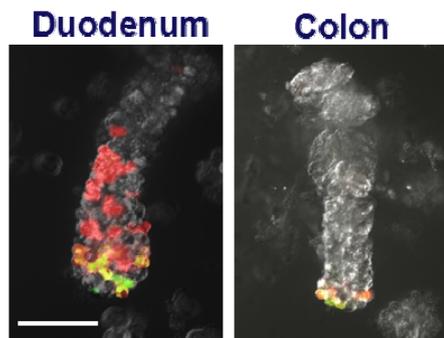


図7 tdTomato レポーターを用いたクリプトの lineage tracing(40HT 投与 2 日目) 緑:EGFP+, 赤:tdTomato+, 黄:EGFP+/tdTomato+

そこでクリプトを単一細胞懸濁液とし、EGFP と tdTomato の蛍光で発現分布を調べた。EGFP と tdTomato を両方発現する細胞 (EGFP⁺tdTomato⁺) は、標識された Lgr5 陽性幹細胞を意味し、それから作られた子孫細胞は tdTomato のみを発現し(EGFP⁻tdTomato⁺)、標識されなかった Lgr5 陽性幹細胞は、EGFP のみを発現 (EGFP⁺tdTomato⁻) する(図7)。40HT を投与して6週間後に1 GyのX線を照射し、10日目のクリプトのラベル効率を明らかにしたところ、十二指腸ではEGFP陽性細胞あたりのEGFP⁺tdTomato⁻分画は照射前と変化なかったが、大腸においては、EGFP⁺tdTomato⁻の割合が増加することが明らかになった(図8)。

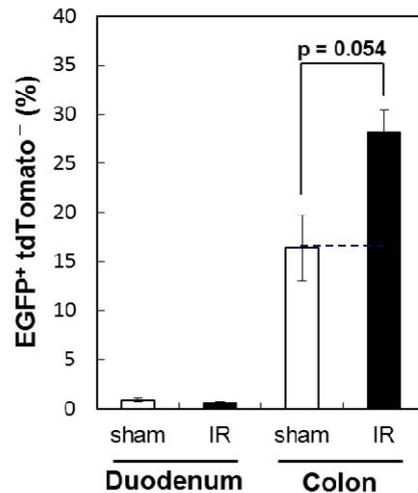


図8 EGFP⁺tdTomato⁻分画の割合

これは、照射することによって tdTomato で標識されていない細胞から、新たにEGFP⁺のLgr5陽性幹細胞が作られた結果を反映していると考えられた。大腸のLgr5陽性幹細胞が減少するという結果と合わせて考えると、大腸において照射によって減少した幹細胞を補う働きがあることを示唆しており、大腸においてはLgr5陽性幹細胞のターンオーバーが刺激されることが明らかになった。

以上の結果は、高線量率放射線は、Lgr5⁺のような増殖性の組織幹細胞の入れ替わり、特に増殖性の幹細胞でない細胞が、それに置き換わることを誘導している可能性を示唆している。一方、このような効果は十二指腸では小さく、放射線感受性と組織の発がん感受性(腸管のがんが大腸で起こりやすい)との関係を示唆する重要な知見であると考えられた。今後は、本研究で確立した大腸幹細胞の放射線誘発ターンオーバーが、低線量率・低線量放射線の場合にどの程度誘導されるのかを定量的に明らかにし、幹細胞ターンオーバーの誘発が放射線発がんリスクにおよぼす影響を評価する研究に発展させる予定である。

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1件)

- ① Kensuke Otsuka, Ionizing radiation leads to the replacement and de novo production of colonic Lgr5⁺ stem cells, Radiation Research 2013; DOI:10.1667/RR3253.1, 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Kensuke Otsuka, Evaluation of the radiation-induced turnover of intestinal stem cells, Annual Meeting of Radiation Research Society, 2012年10月1日, Rio Mar Resort Hotel (アメリカ)
- ② 大塚 健介, Evaluation of the radiation-induced turnover of intestinal stem cells, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月21日, ロイトン札幌 (北海道)
- ③ 大塚 健介, Evaluation of the radiation-induced turnover of intestinal stem cells by Lgr5 lineage tagging system, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月5日, 名古屋国際会議場 (愛知)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 健介 (OTSUKA KENSUKE)

一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・主任研究員

研究者番号：50371703