

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25740022

研究課題名(和文) 組織幹細胞の放射線応答動態から捉えた低線量放射線影響の発現機構の解明

研究課題名(英文) Quantitative evaluation of radiation-induced response on tissue stem cells

研究代表者

大塚 健介 (Kensuke, Otsuka)

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

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)：組織を維持する幹細胞の遺伝子変異が原因で発がん過程に進展すると考えられている。放射線は細胞に確率的に突然変異をもたらすため、がん化を促進する要因となりうる。しかし、低線量率被ばくは、疫学研究からも発がんリスクの増加が認められず、傷ついた幹細胞が少ないことを反映していると考えられた。そこで、本研究は、がんの標的となる組織幹細胞に着目し、放射線応答動態の指標として幹細胞におけるDNA損傷修復動態や増殖活性を評価した。組織構造を維持したまま、DNA損傷や細胞動態を評価する実験系を構築して放射線応答を調べたところ、組織幹細胞ではDNA損傷が効率的に修復されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of DNA damage in the intestinal stem cells may be crucial for the development of cancer initiating cells. Therefore, it is important to understand the kinetics of DNA repair and tissue response, which is involved in the elimination of damaged cells and tissue injury repair, in response to irradiation. In this study, DNA damage response and cellular dynamics on intestinal stem cells was determined by quantitative protocols through whole-mount single crypt immunofluorescent and flow cytometry. DNA damage repair and the elimination of damaged cells were quantified by measuring the 53BP1 and gamma-H2AX foci formation. Tissue proliferative response was evaluated by population of EGFP-positive cells and determining the EdU incorporating cells. The result indicated that radiation-induced DNA damage was repaired efficiently in Lgr5+ stem cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：組織幹細胞 DNA損傷 腸管 低線量放射線 細胞動態

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、外的・内的要因により幹細胞の機能が修飾されたり、あるいは幹細胞の遺伝子変異したりすることで、その組織の正常な維持機能不全が生じ、発がん過程に進展すると考えられている。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、生涯にわたってその機能を正常に保持したまま維持されなければならないため、生体内での正常な幹細胞ターンオーバーはがん化や発がんの抑制と密接に関係している [1]。放射線を受けた細胞には確率的に突然変異が生じることが知られているため、放射線はがん化を促進する要因となりうる [2]。一方、本申請者らは、放射線を受けた幹細胞と受けていない幹細胞を同時に移植すると、線量依存的に損傷を受けた幹細胞が選択的に排除されることを報告し [3]、同じ現象が p53 依存的に生じること報告されている [4]。このような照射細胞と非照射細胞の混在状態は、単位時間あたりの放射線ヒット数で考えると、低線量「率」放射線の被ばく形態であるとみなすことができる。低線量率放射線被ばくでは、疫学研究からも発がんリスクの増加が認められず [5]、傷ついた幹細胞が少ないことを反映していると考えられた。すなわち、幹細胞への障害蓄積性を決定づける放射線損傷の動態を明らかにすることは、放射線発がんのリスク発現機構を解明する上での喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

本研究は、放射線を受けた組織のなかで、がんの標的となる組織幹細胞に着目し、放射線により傷ついた幹細胞が組織から排除されるか蓄積するかを明らかにするため、放射線応答動態の指標として様々な状態の幹細胞における DNA 損傷修復動態や増殖活性を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

米国ジャクソン研究所より導入した、*B6.129P2-Lgr5^{tm1(Cre/ERT2)Clx}/J* (#008875) 系統を用いた。実験に用い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。組換え動物を用いた動物実験を行うにあたり、遺伝子組換え生物等実験委員会および動物実験委員会の審査・承認を受けた。

(2) 放射線照射

高線量率 X 線は、X 線照射装置 (MBR-320R、日立製) を 260 kVp、4.5 mA、0.5 mm Al + 0.3 mm Cu フィルタの条件 (線量率は 30 Gy/h) で行った。

(3) EdU 投与

マウスに 50 mg/kg 体重の、

5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を単一腹腔内投与した。EdU の染色には、Click-iT EdU および Click-iT EdU plus Imaging Kit (Invitrogen) を用いた。

(4) 単一クリプトホルマウント免疫染色

マウスを解剖し、小腸 (十二指腸) および大腸を採材した。絨毛をそぎ落とした小腸および大腸を、4 の 50 mM EDTA/PBS でインキュベートし、ピペティングによりクリプト単位に分散させた。37 の中性緩衝ホルマリン中で 10 分インキュベートし、その後 4 の 70% エタノール中に 1 時間、そして 4 の 0.5% TritonX-100 中で 30 分間インキュベートした。抗体染色には、抗 53BP1 抗体 (Bethyl)、抗 EpCAM 抗体 (eBioscience)、抗 EGFP 抗体 (Abcam) を用いた。

(5) フローサイトメトリー

マウスから採材した小腸および大腸クリプトから、37 の TripLE Express (Invitrogen) 中で 30 分間インキュベートする処理などの方法により単一細胞を調製した。細胞懸濁液は、MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter) を用いて測定した。

4. 研究成果

最初に、腸管組織におけるさまざまな幹細胞の発現分布を *in situ hybridization* により評価する計画を立てたが、腸管組織の切片は構造が極めて緻密であり、遺伝子発現量の少ない細胞を評価する上で個々の細胞構造が明確に観察しにくかったため、組織のホルマウント染色による観察手法やフローサイトメーターを用いた定量的な細胞の解析を検討してきた。組織における細胞個々の DNA 損傷や動態を、幹細胞や増殖細胞などさまざまな細胞を区別して評価するため、赤外線レーザーユニットを追加実装した共焦点レーザー顕微鏡を用いて 4 種類の蛍光を同時に観察できる実験環境を整えた。これらにより、組織レベルで幹細胞とその他の細胞の立体構造を観察するクリプトのホルマウント蛍光免疫染色法を確立した (図 1)。

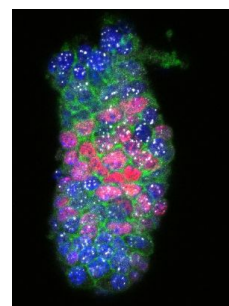


図1 クリプトのホルマウント免疫染色像。解剖の 4 時間前に EdU を投与し、1 Gy の放射線を照射し 30 分後に採材したマウス腸管クリプトを下記に示す蛍光で 4 重染色した。
青：核 (Hoechst34580)
緑：EpCAM (FITC)
赤：EdU (Alexa555)
白：53BP1 (Alexa647)

DNA 合成期に取り込まれる EdU を持つ細胞はクリプトの中央部分に集中しており、細胞分裂が活性化した前駆細胞によく取り込まれていることが分かった。また、DNA 二本鎖切

断修復タンパクである 53BP1 タンパクの局在（フォーカス）は放射線照射直後のクリプト全体に観察された。

次にクリプトに一定数存在する腸管幹細胞に対する放射線影響を評価するために、クリプトあたりの EGFP^{high} 細胞の存在割合をフローサイトメーターにより解析した。まず、さまざまな線量率で被ばくした際には被ばく期間に長短が生じることから、非照射マウスにおける EGFP 陽性細胞の割合の週齢による違いを明らかにした。その結果、6 週齢から 50 週齢の間では、EGFP^{high} 細胞の割合に顕著な差は認められなかった(図 2)ことから、EGFP^{high} 細胞に対する放射線の影響は長期間にわたって評価できると考えられた。

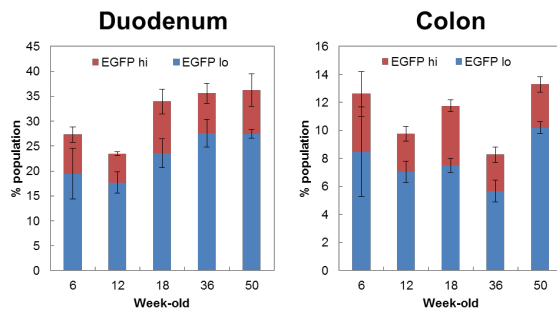


図 2 幹細胞割合の週齢による違い

マウス十二指腸 (Duodenum) および大腸 (Colon) におけるクリプトあたりの EGFP 高発現細胞 (赤) および EGFP 低発現細胞 (青) の週齢による違いを示す。

次に、マウスに 1 Gy の高線量率 X 線を急性照射して 6, 24, 48, 72 時間後に EGFP を高発現する集団の割合を十二指腸と大腸とで比較したところ、十二指腸では細胞集団が照射 24 時間で減少したが、照射 48 時間以降でプールの回復が認められた。一方、大腸では、照射後 72 時間が経過しても幹細胞集団の回復は小さかった (図 3)。

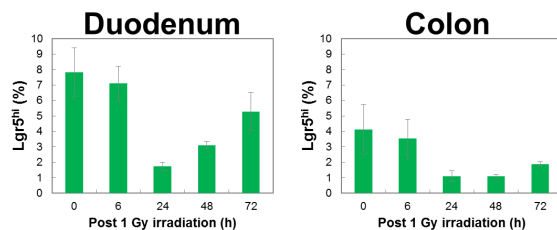


図 3 Lgr5 高発現細胞割合の放射線照射後動態

マウス十二指腸 (Duodenum) および大腸 (Colon) におけるクリプトあたりの EGFP 高発現細胞の 1 Gy 照射から 6~72 時間後の割合を示す。

これらの知見は、本申請者らがこれまでに得ていた大腸の Lgr5 陽性幹細胞の放射線高感受性と相関しており [6]、大腸における幹細胞プール補充の引き金になる可能性がある。また、本申請者らは、細胞増殖のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 (PH3) のクリプト内の分布を放射線誘発による影響の指標として評価したところ、1 Gy の放射線によ

って照射直後の PH3 の出現が照射 6 時間後に一時的に消失することを見出した (論文投稿中)。

この結果から、放射線照射された幹細胞では、増殖が一時的に停止し、その後、幹細胞プールの動態に変化が起こることが推察された。DNA に生じる二本鎖切断のような DNA 損傷は、細胞周期を停止させ DNA 修復の時間を確保することがよく知られている [7]。そこで、腸管幹細胞における DNA 損傷の修復動態を明らかにするため、1 Gy の放射線を照射した EGFP^{high} 細胞における DNA 損傷修復動態を調べた。ここで、幹細胞における DNA 損傷を定量的かつ高速で評価するために、DNA 二本鎖切断部位に集積するリン酸化タンパク γ -H2AX を指標にフローサイトメーターにより解析する手法を検討した。EGFP^{high} 細胞のうち蛍光強度が高い分画をソーティングして細胞像を画像解析したところ、実際に細胞核内の DNA 二本鎖切断部位にフォーカスが形成されていることが確認できた。このことから、フローサイトメーターによって幹細胞の DNA 二本鎖切断を検出することが可能となった (図 4)。

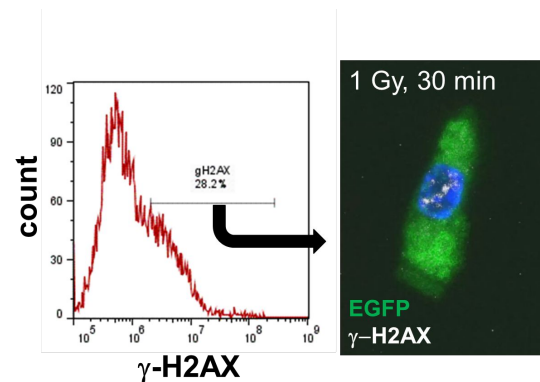


図 4 フローサイトメーターによる幹細胞の DNA 二本鎖切断の定量

マウスに 1 Gy を照射し、30 分後にクリプトを単離・固定した。抗 γ -H2AX 抗体で蛍光免疫染色してフローサイトメーターにて解析した (図 4 左)。蛍光強度の高い分画をソーティングしたところ、細胞核 (青) 内に γ -H2AX のフォーカスが確認された (図 4 右)。

そこで、1 Gy 照射から 0~12 時間後に固定した EGFP^{high} 細胞の DNA 二本鎖切断修復動態を評価したところ、照射直後に増加した DNA 二本鎖切断が時間とともに減少することが分かり、照射後 12 時間後にはほぼバックグラウンドレベルに戻っていることが明らかとなった (図 5)。

これらの成果から、マウス腸管における組織幹細胞では、放射線によって DNA 二本鎖切断が生じて、細胞増殖を停止させてそれを速やかに修復すると考えられる。一方、修復が十分でない幹細胞については、DNA 損傷修復プロセスの後に、分化や細胞死などの幹細胞プールからの消失が生じると推察された。

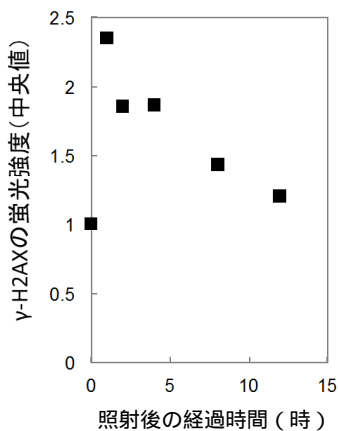


図5 Lgr5 幹細胞の DNA 二本鎖切断の修復動態
マウスに 1 Gy を照射し、1, 2, 4, 8, 12 時間後にクリプトを単離・固定した。抗 γ -H2AX 抗体で蛍光免疫染色してフローサイトメーターにて EGFP 陽性細胞分画における γ -H2AX 蛍光強度分布の中央値をプロットした。

興味深いことに、腸管幹細胞が示すこの放射線応答現象は、低線量 (0.1 Gy) では顕著に誘導されず (論文投稿中)、線量依存的であることが分かった。今後は、本研究で確立した手法を低線量・低線量率放射線影響の評価に拡張することで、腸管幹細胞に生じる放射線影響動態の詳細な解明につながるものと考えられる。

<引用文献>

1. Niwa O. Radiat Res (2010)
2. ICRP. Publication 103 (2007)
3. Otsuka K et al. Exp Hematol (2012)
4. Bondar T et al. Cell Stem Cell (2010)
5. Nair et al. Health Phys (2009)
6. Otsuka K et al. Radiat Res (2013)
7. Suzuki K et al. Jpn J Clin Oncol (2012)

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2件)

Otsuka K, Iwasaki T, Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing, Journal of Radiation Research、査読有、vol.56, No.4, 2015, pp.615-622
DOI:10.1093/jrr/rrv012

Sakamaki A, Otsuka K, et al. Bcl11b SWI/SNF-complex subunit modulates intestinal adenoma and regeneration after -irradiation through Wnt/ -catenin pathway, Carcinogenesis、査読有、vol.36, No.6, 2015, pp.622-631
DOI: 10.1093/carcin/bgv044

[学会発表](計8件)

大塚健介、山内基弘、富田雅典、松本英樹、鈴木啓司、岩崎利泰、腸管幹細胞の細胞死と組織維持機構、第56回日本放射線影響学会、2013年10月18日~20日、クラウンパレス青森(青森県)

大塚健介、富田雅典、山内基弘、鈴木啓司、岩崎利泰、放射線による腸管幹細胞へのDNA損傷と幹細胞ターンオーバー動態の評価、第36回日本分子生物学会、2013年12月3日~6日、神戸国際会議場(兵庫県)

Otsuka K, Tomita M, Iwasaki T, Dose-rate effect on the turnover of colonic stem cells evaluated by Lgr5-lineage tracing, 第6回国際システム放射線生物学ワークショップ(招待講演)、2014年3月5日~6日、放射線医学総合研究所(千葉県)

大塚健介、富田雅典、山内基弘、鈴木啓司、岩崎利泰、異なる放射線下で腸管幹細胞へのDNA損傷と幹細胞ターンオーバー動態の評価、第57回日本放射線影響学会、2014年10月1日~3日、かごしま県民交流センター(鹿児島県)

Otsuka K, Tomita M, Iwasaki T, Dose-rate effect on the turnover of colonic stem cells evaluated by Lgr5-lineage tracing, 41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 2014年9月14日~19日、Aldemar Paradise Mare(ギリシア)

Otsuka K, Tomita M, Suzuki K, Iwasaki T, Yoshida K, Radiation response of intestinal stem cells under different dose rates, 15th International Congress of Radiation Research (招待講演)(国際学会)、2015年5月26日、京都国際会館(京都府)

Otsuka K, Tomita M, Iwasaki T, Suzuki K, Live-cell imaging of 53BP1 foci during cell competition(国際学会)、2015年6月1日、若狭湾エネルギー研究中心(福井県)

Otsuka K, Tomita M, Suzuki K, Iwasaki T, Replenishment of intestinal stem cells as a mechanism of dose-rate effect, Stem cell and radiation carcinogenesis workshop(招待講演)(国際学会)、2015年5月25日、京都国際会館(京都府)

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