

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00553

研究課題名(和文) 小腸腫瘍幹細胞モデルを用いた低線量(率)放射線発がん研究

研究課題名(英文) Mechanism of low dose(rate) radiation induced tumor development by using intestinal stem cell organoid system

研究代表者

笹谷 めぐみ(豊島めぐみ)(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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：放射線発がんリスクには年齢依存性があることが知られている。近年、放射線発がんリスクの標的として組織幹細胞が挙げられており、組織幹細胞の動態に着目した放射線発がん分子機構解明が重要となっているが、現状ではその機構についてほとんど解明されていない。そこで本研究では、消化管モデルマウスを用いた被ばく時年齢依存性の解明を行うとともに、小腸幹細胞の放射線応答と照射時年齢が発がんに及ぼす影響について解析した。その結果、モデルマウスにおいても被ばく時年齢依存性があることが示された。更に、小腸形態形成と放射線発がんリスクに何らかの関係があることが考えられる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

福島原発事故後、胎児期・小児期被ばくにおける発がんリスクの増加が懸念されている。しかしながら、放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の有無とその分子メカニズムについては未だ未解明の部分が多い。そのため、本研究は、動物モデルを用いて放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の機構解明に関する新規知見が得られており、学術的に重要といえる。また、各年齢における放射線発がんリスクとその分子機構が解明されれば、放射線発がんリスク評価のみならず放射線防護体系の基盤確立に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that radiation-induced cancer risk in childhood is higher than in adulthood in human. Thus, age at exposure is a major effect modifier of radiation-induced cancer. Given that the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident in Japan is reviving concern about cancer risk at low radiation doses, especially in childhood, clarifying the mechanism of susceptibility for radiation-induced carcinogenesis in childhood needs to be investigated in each organ. The application of animal models might be useful for understanding the mechanism of age-dependent cancer risk. Here, we elucidated the age dependence of the exposure in model mice of intestinal tumors, and analyzed the effects of radiation response and age on irradiation on carcinogenesis, including cell competition of small intestinal stem cells. And our results suggest that there is the relationship between intestinal morphogenesis and radiation-induced cancer risk.

研究分野：放射線発がん

キーワード：放射線 発がん 低線量(率) 幹細胞 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界で最も信頼性の高い広島、長崎原爆被ばく者の寿命調査において、放射線は白血病や様々な固形がんのリスクを増加することが示されている(Preston DL et al, *Radiat Res*, 2012)。さらに、放射線発がんリスクには年齢依存性があり、一般的に、全固形がんにおける放射線発がんリスクは、小児期で高い。また、胎児期被ばくにおける発がんリスクは小児期と同じ程度か低いと考えられているが、最終的な結論には至っていない。実際に、福島原発事故後、胎児期・小児期被ばくにおける発がんリスクの増加が懸念されており、放射線発がん年齢依存性の有無とその分子メカニズム解明は、喫緊の課題といえるが、各年齢別、臓器別の発がんリスクは未だ明らかにされていない部分が多い。これらのことから、放射線発がん年齢依存性の分子メカニズム解明は、放射線発がんリスク評価のみならず放射線防護体系の基盤確立に貢献できることが期待される。

原爆被ばく者の疫学研究調査において、大腸は放射線による発がんリスクが高い臓器である。腸管上皮は絨毛と呼ばれる腸管内腔に突出した分化細胞からなる組織構造と、主に未分化細胞からなる陰窩の二つのコンパートメントに分けられる。近年、分子生物学的解析の発展により幹細胞研究が急速に進歩してきた。中でも、*Lgr5* 遺伝子は、陰窩基底部に強く発現し、*Lgr5* 発現細胞は全ての腸管上皮細胞に分化することがら、*Lgr5* 陽性細胞が腸管幹細胞であると考えられている(Barker N et al, *Nature*, 2007)。さらに、*Lgr5* 発現細胞でのみ *Apc* 遺伝子に変異をおこすと腫瘍になるが、腸管上皮の分化細胞で *Apc* 変異が生じても腫瘍を形成しないことが報告された(Barker N et al, *Nature*, 2009)。この結果は、*Lgr5* 幹細胞が腫瘍始原細胞 (tumor initiating cells) となることを示唆する重要な知見といえる。

我々は、ヒト大腸がんのモデルマウス(*Apc^{Min/+}*マウス)に着目し、放射線発がん研究を行ってきた。*Apc^{Min/+}*マウスは、*Apc* 遺伝子が正常に機能する正常側アリルと変異をもつ *Min* アリルを有し、正常側アリルに生じた 1 ヒット (変異) で多数の腫瘍を自然発症する。さらに、放射線照射により腫瘍数が増加することが報告されている。*Apc^{Min/+}*マウスに多発する小腸腫瘍は、各自が独立した事象であることが報告されているため、少数のマウスで多数の腫瘍サンプルを採取できるという利点がある。さらに、*Apc^{Min/+}*マウスは、放射線に特有の遺伝子変異 (放射線の爪痕) を検出できるという利点を有する。これらの結果から、*Apc^{Min/+}*マウスは、放射線発がんリスクの分子機構解明に適した実験マウスモデルといえる。

2. 研究の目的

近年、放射線発がんリスクの標的として組織幹細胞が挙げられており、組織幹細胞の動態に着目した放射線発がん分子機構解明が重要となっているが、現状ではその機構についてほとんど解明されていない。また、放射線発がんにおける被ばく時年齢の関与は重要な課題といえる。そこで本研究では、*Apc^{Min/+}*マウスを用いた被ばく時年齢依存性の解明を行うとともに、*Apc* 遺伝子を欠損した小腸幹細胞の細胞競合を始めとした放射線応答と照射時年齢が発がんに及ぼす影響について解析する。最終的には、低線量・低線量率発がんリスク評価の基礎基盤に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

繁殖に適した 8 週齢以上の *Apc^{+/+}*マウスメスと *Apc^{Min/+}*マウスオスを準備し掛け合わせを行った。妊娠が判別できた後、別ケージに移し毎日観察することにより、出産日の確認を行った。週齢の異なる *Apc^{Min/+}*マウスを準備し、ガンマ線照射を行った。ガンマ線照射には、ガンマセル

(Gammacell 40 Exactor、Best Theratronics 社)を用いた。その後、一定期間マウスを飼育し、小腸腫瘍数の計測を行った。また、各週齢のマウス小腸の組織切片を作成し、ヘマトキシリンエオシン染色を行った。

次に、遺伝子改変マウスのかけあわせを行い、小腸幹細胞をラベルし、照射後の挙動を標識する lineage tracing study の樹立を試みた。目的の遺伝子改変マウスを掛け合わせることでより得られたマウスモデルを用いて、異なる週齢時に、様々な量のタモキシフェンを腹腔内投与し、*Apc* 遺伝子欠損の誘導を介した発がん実験を行った。更に、小腸幹細胞における放射線応答を解析するために、マウス小腸を単離し、そこから小腸オルガノイド培養系を用いた実験を行った。

本研究では、安全面および倫理面の審査を受け、承認された方法によって実施した。また、動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等に従い、承認を得て実施した。また、本研究には放射性同位元素を使用する実験が含まれているため「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づき承認を得て行った。

4 . 研究成果

週齢の異なる *Apc*^{Min/+}マウスにガンマ線照射を行い、発がん実験を行い、マウス小腸腫瘍数の計測を行った。その結果、若年期の被ばくは、成体期の被ばくと比較して発がんリスクが高いという結果が再現された。

成体の小腸では、絨毛が存在し、絨毛を通して栄養などを吸収している。絨毛を構成する細胞は、陰窩にある幹細胞から作られている。また、陰窩には幹細胞の他にパネート細胞が存在する。そこで、各週齢におけるマウス小腸を採取し、組織切片を作成し形態学的変化の観察を行った。その結果、成体期で観察される陰窩は、生後 1 日目では存在せず、生後 11 日目以降に観察された。また、パネート細胞も同様の結果が得られた。また絨毛については、生後 1 日目から観察され、絨毛に胚細胞の存在も確認された。このように、生後から 2,3 週齢までにマウス小腸において形態形成がおこることから、これらと放射線発がんリスクに何らかの関係があるのではないかと考えられる。

次に、遺伝子改変マウスのかけあわせを行い、小腸幹細胞をラベルし、照射後の挙動を標識する lineage tracing study の樹立を試みた。目的の遺伝子改変マウスを掛け合わせることでより得られたマウスモデルを用いて、異なる週齢時に、様々な量のタモキシフェンを腹腔内投与し、タモキシフェンの濃度検討を行った。次に、*Apc* 遺伝子欠損の誘導を介した発がん実験を行った結果、成体期よりも若年期の方が有意な腫瘍の増加が観察された。

以上の結果から、*Apc*^{Min/+}マウスを用いて、放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析を行った結果、被ばく時年齢依存性があること、さらに若年期の被ばくは、成体期の被ばくと比較して発がんリスクが高いことが明らかにされた。また、形態学的解析から、生後約 2 週齢までに成体期様陰窩が形成され、それが増殖するという結果が得られた。これらの形態形成と放射線発がんリスクに何らかの関係があることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N	4. 巻 16(11)
2. 論文標題 Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGF Signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1676-1686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-18-0321.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N	4. 巻 16(24)
2. 論文標題 ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell cycle	6. 最初と最後の頁 2345-2354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15384101.2017.1387697.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morita A, Takahashi I, Sasatani M, Aoki S, Wang B, Ariyasu S, Tanaka K, Yamaguchi T, Sawa A, Nishi Y, Teraoka T, Ujita S, Kawate Y, Yanagawa C, Tanimoto K, Enomoto A, Nenoï M, Kamiya K, Nagata Y, Hosoi Y, Inaba T	4. 巻 17(2)
2. 論文標題 A Chemical Modulator of p53 Transactivation that Acts as a Radioprotective Agonist	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 432-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-16-0554.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva EK, Kamiya K	4. 巻 38(5)
2. 論文標題 Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 570-578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgw208.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura F, Inaki M, Katafuchi A, Abe Y, Tsuyama N, Kurosu Y, Yanagi A, Higuchi M, Muto S, Yamaura T, Suzuki H, Noji H, Suzuki S, Yoshida MA, Sasatani M, Kamiya K, Onodera M, Sakai A	4. 巻 7(1)
2. 論文標題 Establishment of induced pluripotent stem cells from normal B cells and inducing AID expression in their differentiation into hematopoietic progenitor cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-01627-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笹谷めぐみ, 土居主尚, 神谷研二
2. 発表標題 動物モデルを用いた低線量・低線量率発がんリスク評価
3. 学会等名 第3回 放射線災害・医科学研究拠点カンファランス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 土居主尚, 神谷研二
2. 発表標題 放射線発がん到高感受性であるApcMin/+マウスを用いた低線量放射線発がんリスク評価
3. 学会等名 原子爆弾後障害研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹谷めぐみ, 神谷研二
2. 発表標題 ApcMin/+マウスを用いた放射線誘発小腸腫瘍形成の機構解明
3. 学会等名 第31回夏の学校
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 河合秀彦, Zaharieva Elena, 神谷研二
2. 発表標題 Apc Min/+マウスを用いた放射線誘発腫瘍における遺伝子変異解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹谷めぐみ, 土居主尚, 飯塚大輔, 神谷研二
2. 発表標題 Apc Min/+マウスを用いた低線量放射線発がんリスク評価
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Megumi Sasatani, Daisuke Iizuka, Hidehiko Kawai, Elena Zaharieva, Kenji Kamiya,
2. 発表標題 Estimation of radiation-induced cancer risk at low doses and low dose rates using ApcMin/+ mice
3. 学会等名 3rd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 河合秀彦, Zaharieva Elena, 神谷研二
2. 発表標題 放射線発がん高感受性マウスを用いた低線量・低線量率発がんリスク評価
3. 学会等名 第2回 放射線災害・医科学研究拠点カンファランス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 河合秀彦, Zaharieva Elena, 神谷研二
2. 発表標題 遺伝的背景が放射線発がん高感受性モデルマウスの腫瘍形成に与える影響について
3. 学会等名 第58回 原子爆弾後障害研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹谷めぐみ
2. 発表標題 発がん高感受性マウスを用いた化学発がん、放射線発がんの機構解明
3. 学会等名 平成29年度日本環境変異原学会 公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹谷 めぐみ、飯塚 大輔、河合 秀彦、Zaharieva Elena、神谷 研二
2. 発表標題 マウス個体を用いた低線量率放射線被ばくの生物影響について
3. 学会等名 第42回中国地区放射線影響研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Megumi Sasatani, Daisuke Iizuka, Kenji Kamiya
2. 発表標題 Genetic mutation analysis in ionizing radiation (IR)-induced adenoma in ApcMin/+ mice
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹谷 めぐみ、飯塚 大輔、河合 秀彦、Zaharieva Elena、神谷 研二
2. 発表標題 Apc Min/+マウスを用いた低線量、低線量率放射線発がんリスク評価
3. 学会等名 第60回日本放射線影響学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹谷 めぐみ、飯塚 大輔、河合 秀彦、Zaharieva Elena、神谷 研二
2. 発表標題 Apc Min/+マウスを用いた放射線誘発腫瘍における遺伝子変異の検出
3. 学会等名 日本環境変異原学会第46回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹谷めぐみ、飯塚大輔、河合秀彦、Elena Zaharieva、神谷研二
2. 発表標題 ApcMin/+マウスを用いた低線量、低線量率放射線発がんリスク評価の試みとその腫瘍解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017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
研究分担者	河合 秀彦 (Kawai Hidehiko) (30379846)	広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	神谷 研二 (Kamiya Kenji) (60116564)	広島大学・医療政策室・特任教授 (15401)	