

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20455

研究課題名（和文）乳腺オルガノイドでヒトと実験動物の放射線影響研究をつなぐ

研究課題名（英文）Application of mammary organoids in the investigation of radiation effects on humans and laboratory animals

研究代表者

工藤 健一（Kudo, Ken-ichi）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00805799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題はヒトおよび実験動物の放射線応答解析をするため、*in vitro*実験のツールとしての乳腺オルガノイドを開発することを目的とする。Sprague Dawleyラット雌から採取した乳腺基底細胞をセルソーティングにより取得し、これをコラーゲンゲル内に包埋して培養することで*in vivo*乳腺様構造のオルガノイドの発生を確認した。また、ヒト乳腺上皮細胞を同様に培養し、管腔構造を持つヒト乳腺オルガノイドを作成した。フローサイトメトリーおよび免疫染色解析の結果、これらのオルガノイドは部分的に*in vivo*乳腺と共通する性質をもち、これらを組織する各細胞はそれぞれ特有の放射線応答を示すことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な臓器を対象として動物実験による放射線影響解析が進められているが、ヒトと動物の架け橋となる研究手法は見つかっていない。また、古くから放射線誘発がんの起源細胞は組織幹細胞だと考えられているが、幹細胞の科学技術が進展し、放射線生物学の分野でも幹細胞操作技術を応用した研究を展開する素地が整っている（ICRP Publication 131）。本課題はそのような背景をもとに放射線感受性が高い臓器である乳腺から*in vitro*環境で*in vivo*に近い性質を示すオルガノイドを作成し、低線量影響研究へ応用することでより効率的かつ迅速に放射線影響解析を行う基礎の作成を試みた。

研究成果の概要（英文）：The objective of this project is to develop mammary organoids as a tool for *in vitro* experiments to analyze radiation response in humans and experimental animals. The development of organoids with *in vivo* mammary-like structures was confirmed by culturing these cells embedded in collagen gels. Human mammary epithelial cells were also cultured in the same way to generate human mammary organoids with luminal structures. Flow cytometry and immunostaining analysis revealed that these organoids partially shared characteristics with the *in vivo* mammary gland, and that each cell organizing them showed a specific radiation response.

研究分野：放射線生物学

キーワード：オルガノイド 乳腺 ラット ヒト 幹細胞 放射線 放射線影響

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な臓器を対象として動物実験による放射線影響解析が進められているが、ヒトと動物の架け橋となる研究手法は見つかっていない。また、古くから放射線誘発がんの起源細胞は組織幹細胞だと考えられているが、幹細胞の科学技術が進展し、放射線生物学の分野でも幹細胞操作技術を応用した研究を展開する素地が整った(Niwa et al. ICRP Publication 131 2015)。特に、培養下で幹細胞系を保持したまま組織を培養するオルガノイド培養技術は、様々な生命科学に応用できる技術である。

低線量被ばくの研究では、放射線応答を含む反応が微小なため、有意な結果を得るために非常に多くの検体が必要となる。そのため、大量に作製可能なオルガノイドの有用性は高い。乳がんは、原爆被爆者集団に発生したがんの中で最もリスクが高い (Preston et al. 2007)。ラットの乳がんはマウスのそれよりヒト乳がんによく、放射線発がん実験に用いられてきた。ラットの乳腺オルガノイドの報告例はまだない。またヒト乳腺細胞は市販されており入手しやすい実験材料である。

2. 研究の目的

本研究は、野生型の Sprague-Dawley (SD)ラット雌乳腺細胞からオルガノイドを作製し、形態的特徴及び放射線応答の特徴を生体の乳腺と比較して、実験モデルとして有用であるかどうかを検証する。また、ヒト乳腺細胞からオルガノイドを作成し、放射線発がんプロセス解明のための in vitro 実験系に応用できるかどうかを追究する。

3. 研究の方法

乳腺は乳管と終末乳管小葉単位 (Terminal Ductal Lobular Unit, 以下 TDLU)から成り、それらは基底細胞と内腔細胞で構成され、その周囲を間質が覆っている (図1)。本研究ではヒト乳腺に形状的に近い性質を示す Sprague-Dawley (SD)ラット雌の乳腺より細胞を採取し、コラーゲンゲル内に包埋後3次元培養を行って、生成したオルガノイドを免疫化学染色法によって基底細胞や内腔細胞のマーカー(サイトケラチン、CD49f 等)を染色し、顕微鏡下で観察する。また、オルガノイドの各細胞をフローサイトメトリーで解析し、放射線応答の定量的探索を行う。ラット乳腺由来オルガノイド作成手法の樹立後、ヒト乳腺細胞を購入し、同様の手法でオルガノイド作成を試みる。

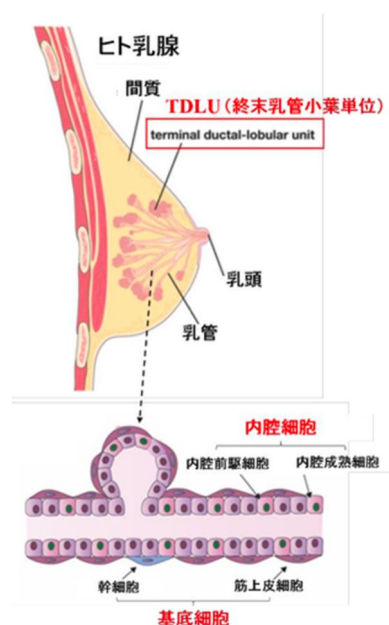


図1 乳腺組織の内部構造 (Visvader 2012 の図を改変)

1. フローサイトメトリーを用いてセルソーティングした各種乳腺細胞を、ラットコラーゲンIを含む EpiCult-B medium (STEMCELL Technologies) と氷上で素早く混合し、超低付着性 24 ウェルプレートにプレーティングして 37°C、5%CO₂ の条件でインキュベートし、コラーゲンをゲル化させた。1 時間後、5%FBS、組換えラット EGF、組換えラット FGF、Y-27632、forskolin、および corticosterone を含む培地をウェルに加え、10-14 日間培養する。培養後、ゲルを 5%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、通常のパラフィン包埋またはホルマウント免疫蛍光染色のために処理した。
2. ゲル中に生成したオルガノイドを回収するため、コラゲナーゼ処理を行ってゲルを溶解し、トリプシンとディスパーゼ処理によって細胞凝集体を単一細胞に分散させた。単一になったことは顕微鏡で確認した。得られた細胞の表面抗原を CD49f、CD24 など標的とした抗体で標識し、続いて DNA 損傷マーカーの γ H2AX 抗体と増殖マーカーのエチルデオキシウリジン(EdU)によって DNA 損傷量と細胞増殖活性をフローサイトメトリーにて解析した。

4. 研究成果

● 乳腺細胞由来オルガノイドの作成

2006 年 Stingl らはマウス乳腺細胞をセルソーティングして幼齢期マウスの mammary fat pad に移植し、再生乳腺を作成することで乳腺細胞のどの細胞種に乳腺幹細胞が基底細胞中に含まれているかを明らかにした (Stingl et al. 2006)。また、乳腺オルガノイドの研究は 1980 年ころ他の臓器に比べて早くはじめられたが、当時は ExtraCellular Matrix としてマ

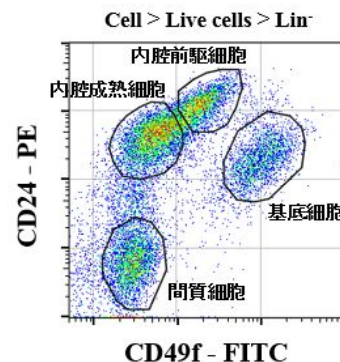


図2 フローサイトメトリーによるラット乳腺細胞の解析結果

トリゲルではなくコラーゲンが用いられており、Linnemannらはヒト乳腺細胞をコラーゲンゲル包埋培養することでヒト乳腺に類似したTDLU様構造を含むオルガノイドの作成に成功した (Linnemann et al. 2015)。このような背景から、本研究ではラット乳腺基底細胞をセルソーティングしてコラーゲンゲルで包埋培養し、ラット in vivo 乳腺に近いオルガノイドの作成を試みた。

ラット乳腺細胞のフローサイトメトリーによる結果を図2に示す。解析の結果、得られた乳腺細胞には典型的に基底細胞 10-20%、内腔細胞 30-40%、間質細胞 30-40%が含まれていることがわかった。このうち基底細胞と間質細胞の画分をセルソーティングによってチューブに分取し、一定比率でコラーゲンゲルに包埋して培養したところ、図3、4に示す直径1mm大のTDLU様構造を含むオルガノイドが検出された。オルガノイドの発生割合は間質細胞と共培養しなかった場合は1%程度に留まったが、間質細胞の割合を増やすと10%程度まで増加を示した(図5)。このことから、乳腺幹細胞は乳腺細胞中に1-2%の割合で存在していると考えられた。また、マクロファージやリンパ球などの血球、および脂肪細胞等はラット乳腺の細胞分散およびフローサイトメトリーによる画分によって除外されているため (Kudo et al. 2020)、このことは間質細胞中に主に含まれる線維芽細胞が乳腺幹細胞の組織化に関与しているとするZhaoらの主張に一致するものであり (Zhao et al. Science 2017)、さらにRT-PCRによってZhaoらが主張する*Gli2*発現が間質細胞に認められたことから、この結果は線維芽細胞が乳腺幹細胞のニッチを形成することを示唆していると考えられた。この結果は研究代表者がZhaoらの報告から着想した独創的な成果であり、報文としてKudo et al. 2020に掲載した。

ラット乳腺細胞由来オルガノイドの作成手法を確立したあと、基底細胞様の性質を示すヒト乳腺細胞をThermoFisher Scientificより購入し、同様にしてコラーゲンゲル包埋培養を行った。その結果、図6に示すTDLU様構造をもつオルガノイドの発生を確認した。この構造物は明瞭な管腔構造を形成し、管腔外側に強いCD49fおよびp63

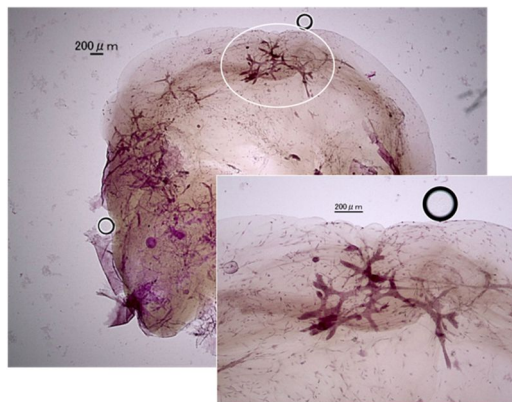


図3 乳腺基底細胞を培養した後、カーミン染色でコラーゲンゲル全体を観察した

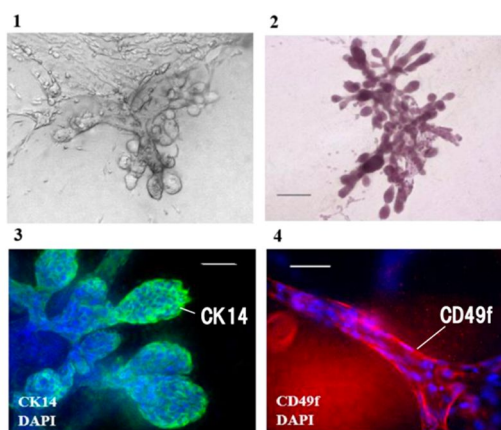


図4 ラット乳腺基底細胞と間質細胞をコラーゲンゲル中で共培養したところ、TDLU様構造をもつオルガノイドの発生が確認された。1. 明視野像、2. カーミン染色像、3. CK14/DAPI染色、4. CD49f/DAPI染色。Scale bar: 50μm

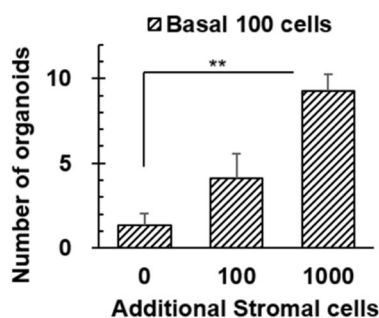


図5 ラット乳腺基底細胞を100細胞に対し、乳腺間質細胞の混入数に比例してオルガノイドの発生割合は増加した。データは3回実験の平均値±SE。

の発現を示し、in vivo 乳腺と同じ性質を示した。しかしin vivo 乳腺に特有の内腔細胞の発生が認められず単層構造を示した。このことは内腔細胞の発生には特有の条件が必要であることを示唆している。本実験ではエストロゲン・プロゲステロンといった乳腺に影響あるホルモンを使用しなかったが、前立腺オルガノイド研究などで見るように、ホルモンが内腔細胞の発生に必要なかもしれない。

このように内腔細胞の発生やミルク産生能のような臓器特異的な性質についての課題は残るものの、本研究によってラットおよびヒト乳腺幹細胞を繊維芽細胞分泌物で刺激することで組織化を促し、in vivo 乳腺に類似したTDLUおよび管腔構造を再現する一定の成果が得られた。

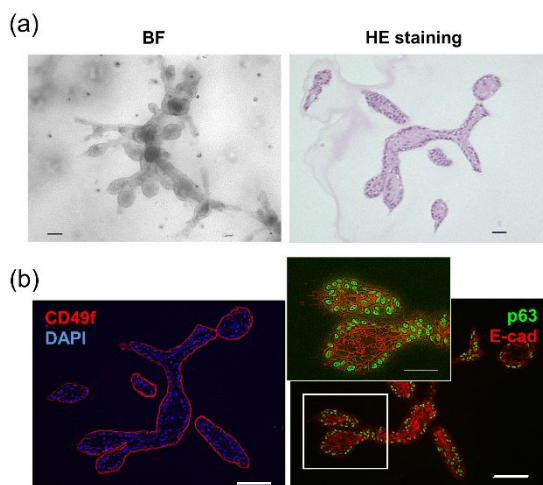


図6 ヒト乳腺由来細胞から作成したオルガノイド例。(a) 明視野像とHE染色像、(b) 免疫蛍光染色。Kudo et al. 2022より抜粋

● フローサイトメトリーによる乳腺オルガノイドの解析

コラーゲンゲル中に生成したラット乳腺オルガノイドをコラゲナーゼ処理によって抽出し、これをトリプシンで細胞分散してシングルセルを得た。これを図2と同様にCD49fとCD24の標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析したところ、図7の結果が得られた。プロットからオルガノイドには基底細胞画分が20-30%、間質細胞画分が40%、そのほか内腔細胞に高発現するCD24陽性画分(Unknown、CD24+)が30%程度含まれていることがわかった。オルガノイドの培養はあらかじめ基底細胞と間質細胞を共培養しているため、両細胞の性質を示す画分ができることは自明だが、CD24陽性画分の発生は乳腺幹細胞が内腔様細胞に分化したことを示唆していると考えられる。また、間質細胞も本来はCD49fに対して陰性だが、培養後は若干の陽性反応を示している。このような結果は一部の間質細胞が培養中に通常とは異なる状態に変化していることを示している。

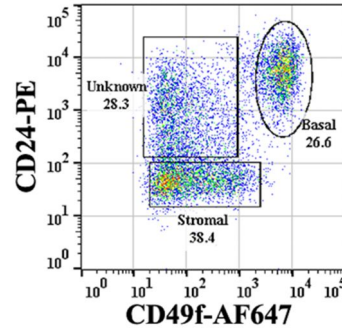


図7 ラット乳腺オルガノイドのフローサイトメトリー解析結果。Basal: 基底細胞、Stromal: 間質細胞

また、 γ 線2Gyを照射したラット乳腺オルガノイドに γ H2AX抗体を処理してDNA損傷を定量したところ、図8の結果が得られ、基底細胞画分よりも間質細胞画分およびCD24+において γ H2AX陽性率が高いことがわかった。ラット乳腺においても放射線照射後の γ H2AX陽性頻度は基底細胞より内腔細胞で顕著に高い(Kudo et al. 2020)。さらに、照射後のオルガノイドにEdU処理をして各画分の細胞増殖活性を評価したところ、CD24+では基底細胞に比べて細胞増殖活性が顕著に低いことがわかった(図9)。基底細胞の細胞増殖活性は内腔細胞よりも高く、このことはCD24+が内腔細胞に関係する画分であることを示唆している。今後はRNA-seqなどを行ってin vivo乳腺細胞との比較を行っていきたいと考えている。

結論として、本研究は放射線影響研究におけるスクリーニング手法の開発のため、ラット乳腺細胞よりin vitro環境でオルガノイドを作成し、放射線応答解析の是非について議論した。本研究によって乳腺細胞から幹細胞を抽出し、そこからある程度in vivo乳腺に近い構造をもったオルガノイドを発生させることができ、さらにフローサイトメトリー解析によって画分によって異なる放射線応答を示すことが確認された。今後は内腔細胞の発生や臓器特異的機能の確認といった問題に対応するため、エストロゲン等ホルモンを添加した培養法の確立、各画分のRNA-seq解析などによる評価を行って、よりin vivoに近い乳腺オルガノイドの確立に取り組んでいきたい。

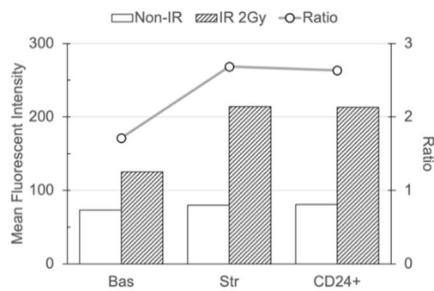


図8 γ 線2Gy照射1時間後の γ H2AX平均蛍光強度。データは独立した2回実験の平均値を示す。Bas: 基底細胞、Str: 間質細胞

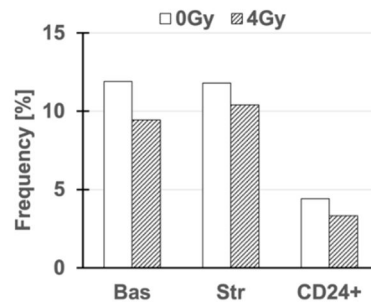


図9 γ 線4Gy照射24時間後のEdU取込頻度。データは独立した2回実験の平均値を示す。Bas: 基底細胞、Str: 間質細胞

参考文献

- Kudo KI, Takabatake M, Nagata K, et al. Flow cytometry definition of rat mammary epithelial cell populations and their distinct radiation responses. *Radiat Res.* 2020;194:22-37.
- Kudo KI, Tsuyama N, Nagata K, et al. Δ Np63 α transcriptionally represses p53 target genes involved in the radiation-induced DNA damage response. *Radiat Oncol.* 2022;17:183-198.
- Linnemann JR, Miura H, Meixner LK, Irmler M, Kloos UJ, Hirschi B, et al. Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* 2015; 142:3239-51.
- Niwa O, Barcellos-Hoff MH, Globus RK, Harrison JD, Hendry JH, Jacob P, et al. ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection. *Ann ICRP* 2015; 44:7-357.
- Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, Mabuchi K, Kodama K, Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998, *Radiat Res.* 2007;168:1-64.
- Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, et al. Purification and unique properties of

- mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006; 439:993–7.
- Zhao C, Cai S, Shin K, Lim A, Kalisky T, Lu WJ, et al. Stromal Gli2 activity coordinates a niche signaling program for mammary epithelial stem cells. *Science* 2017; 356.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kudo Ken-Ichi, Takabatake Masaru, Nagata Kento, Nishimura Yukiko, Daino Kazuhiro, Iizuka Daisuke, Nishimura Mayumi, Suzuki Keiji, Kakinuma Shizuko, Imaoka Tatsuhiko	4. 巻 194
2. 論文標題 Flow Cytometry Definition of Rat Mammary Epithelial Cell Populations and Their Distinct Radiation Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 22～22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1667/RR15566.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 工藤健一、今岡達彦	4. 巻 10
2. 論文標題 乳腺オルガノイドでヒトと実験動物の放射線影響研究をつなぐ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest 45号	6. 最初と最後の頁 30-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo Ken-ichi, Tsuyama Naohiro, Nagata Kento, Imaoka Tatsuhiko, Iizuka Daisuke, Sugai-Takahashi Misaki, Muramatsu Moe, Sakai Akira	4. 巻 17
2. 論文標題 Np63 transcriptionally represses p53 target genes involved in the radiation-induced DNA damage response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 183-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13014-022-02139-7	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 5件）

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Naohiro Tsuyama, Kento Nagata, Tatsuhiko Imaoka, Miwa Fukami, Misaki Sugai-Takahashi, Yusuke Azami, Moe Muramatsu, Akira Sakai
2. 発表標題 Np63 TRANSCRIPTIONALLY REPRESSES P53-TARGET GENES IN RADIATION-INDUCED DNA DAMAGE RESPONSE.
3. 学会等名 2022 ISSCR Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤健一, 津山尚宏, 今岡達彦, 飯塚大輔, 永田健斗, 坂井晃
2. 発表標題 ヒト乳腺オルガノイドを用いた放射線応答における Np63 の影響解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Naohiro Tsuyama, Kento Nagata, Tatsuhiko Imaoka, Miwa Fukami, Misaki Sugai-Takahashi, Yusuke Azami, Moe Muramatsu, Akira Sakai
2. 発表標題 Np63 transcriptionally represses p53-target genes in radiation-induced DNA damage response
3. 学会等名 The 6th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Naohiro Tsuyama, Kento Nagata, Tatsuhiko Imaoka, Miwa Fukami, Misaki Sugai-Takahashi, Yusuke Azami, Moe Muramatsu, Akira Sakai
2. 発表標題 放射線誘発DNA傷害応答へのp53ファミリー Np63 の影響
3. 学会等名 第64回日本放射線影響学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Kento Nagata, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Mayumi Nishimura, Daisuke Iizuka, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands
3. 学会等名 The 63rd JRRS Annual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Kento Nagata, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Mayumi Nishimura, Daisuke Iizuka, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 DISTINCT DIFFERENCE OF RADIATION RESPONSE BETWEEN LUMINAL AND BASAL CELLS IN RAT MAMMARY GLANDS
3. 学会等名 2020 ISSCR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今岡達彦, 工藤健一, 鈴木啓司, 西村まゆみ, 臺野和広, 柿沼志津子
2. 発表標題 放射線誘発ラット乳腺発がんモデルにおける正常上皮細胞集団間のバランス
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Kento Nagata, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Mayumi Nishimura, Daisuke Iizuka, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Kento Nagata, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands
3. 学会等名 The 19th Congress of the Japanese Society for Regeneration Medicine
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Radiation response of mammary stem and progenitor cells in the radiation carcinogenesis model of female Sprague-Dawley rats
3. 学会等名 The 62nd Japanese Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Radiation response of mammary stem and progenitor cells in the radiation carcinogenesis model of female Sprague-Dawley rats
3. 学会等名 The 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Ayaka Hosoki, Mayumi Nishimura, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Radiation response of mammary stem and progenitor cells of Sprague-Dawley rats as a potential target of radiation-induced carcinogenesis
3. 学会等名 The 17th Stem Cell Research Symposium Information
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Kento Nagata, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2020 VIRTUAL (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Kento Nagata, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands
3. 学会等名 The 63rd Japanese Radiation Research Society
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がん治療のための放射線増感剤	発明者 工藤健一	権利者 公立大学法人福 島県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-142009	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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