

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19970

研究課題名（和文）放射線による炎症反応が引き起こす組織微小環境の変化は、乳腺の発がんに影響するか？

研究課題名（英文）Do changes in the tissue microenvironment induced by radiation-induced inflammatory responses affect mammary carcinogenesis?

研究代表者

永田 健斗（Nagata, Kento）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線影響研究部・研究員

研究者番号：00867236

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）：本研究では、放射線による炎症反応が引き起こす組織微小環境の変化は、乳腺の発がんに影響するか否かを検討した。

炎症細胞が多く存在する間質組織と乳腺上皮をラット乳腺の組織切片および透明化組織により区別する手法を確立し、炎症細胞（CD68陽性マクロファージ）は乳腺間質に存在することを確認した。放射線被ばく後の分子メカニズム解明のためRNAシーケンスを行い、放射線照射は乳腺上皮細胞の分化を抑制する他、炎症系因子を活性化させることを示唆するデータを得た。今後、放射線によって誘導される炎症と乳腺上皮細胞の分化異常の関連性、さらにそれが発がんにどのように寄与するのかを検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、放射線被ばく後の数週間以内の乳腺において細胞の分化や炎症について検討した。RNAシーケンスから得られたデータは放射線が乳腺上皮細胞の分化抑制、炎症反応の増大を引き起こす可能性を示唆するものであり、放射線被ばく後数週の乳がん発症前の発がんメカニズムの解明等のつながる基礎的な知見を創出した。今後のさらなるメカニズム研究により、放射線被ばく防護剤、乳がん患者に対する標的分子治療薬の開発等、社会実装に向けた基礎研究となりうる。

研究成果の概要（英文）：This study examined whether changes in the tissue microenvironment induced by radiation-induced inflammatory responses affect mammary carcinogenesis.

We established a method to distinguish mammary epithelium cells from stromal tissue, where inflammatory cells are abundant, by using tissue sections and tissue-clearing specimens of rat mammary glands, and confirmed that inflammatory cells (CD68-positive macrophages) are present in the mammary stroma. RNA sequencing was performed to elucidate the molecular mechanisms after radiation exposure, and the data suggest that irradiation suppresses mammary epithelial cell differentiation and activates inflammatory factors. In the future, we will examine the relationship between radiation-induced inflammation and abnormal differentiation of mammary epithelial cells and how it contributes to carcinogenesis.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ラット 乳がん 放射線 幹細胞 組織微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般的には、放射線は DNA に損傷を与える。細胞は DNA 損傷を修復、排除する機構を持ち、DNA 損傷による変異細胞の誘発を未然に防いでいる。誤修復による変異の蓄積は発がんにつながる。哺乳類のモデル生物であるラットでは、放射線により乳がんが誘導され、その発生リスクは低線量率放射線の影響が高線量率よりも低くなる (Imaoka et al., 2019 Radiat Res)。発がんメカニズムの解明のため、乳腺細胞の放射線応答、とくに DNA 損傷を起因とした発がんを想定した研究がなされている。

一方で、炎症等の組織微小環境の変化は発がんを誘導する (Landskron et al., 2014, J Immunol Res)。例えば、放射線により誘導された炎症反応は発がんを促すという説もあるが、乳腺における発がんとの炎症反応の関与は未解明な部分が多い。マクロファージ等の炎症系細胞が死細胞排除に寄与する一方で、慢性的な炎症反応は DNA 損傷修復を妨げる効果を持つ一酸化窒素等の分子を誘導し、変異細胞の発生を促す。しかし、ラット乳腺における発がんとの炎症反応の関与は未解明な部分が多い。

### 2. 研究の目的

本研究は、放射線による発がんが低線量率では高線量率よりも顕著に低くなるメカニズムを、炎症等の組織微小環境の変化に注目して解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 放射線照射実験

先行研究 (Imaoka et al., 2019 Radiat Res) で得られている発がんリスクの線量率依存性を炎症反応との関連を説明するため、SPF 環境下において雌ラット (Sprague Dawley 系統) に合計線量 2 Gy のガンマ線を 5 週齢時 (高線量率単回照射、線量率 24 Gy/h) もしくは 3-5 週齢時 (低線量率連続照射、線量率 6 mGy/h) に全身照射した。また、別に放射線を照射していない動物も用意した。放射線照射 4 週間後 (解剖時は 9 週齢) 解剖しラット乳腺を採材した。

#### (2) パラフィン切片の作製と抗体染色

上記 (1) で採材した乳腺組織を一晚以上、ホルマリン固定を行い、パラフィン包埋を実施した。乳腺組織を 3  $\mu\text{m}$  厚に連続的に薄切した切片からパラフィン除去後に抗原の賦活化処理を行い、一次抗体 (抗 CD68 抗体、抗サイトケラチン 14 抗体、抗サイトケラチン 8+18 抗体等を使用) を 4 度にて一晚反応させ、その後一次抗体に対応する蛍光標識二次抗体を室温で 1 時間反応し、蛍光褪色防止封入剤によって封入した。

#### (3) 透明化組織標本の作製と抗体染色

上記 (1) で採材した乳腺組織の一部について、一晚以上 4% パラホルムアルデヒドで化学固定を行い、SHIELD Buffer および SHIELD Epoxy Solution (LifeCanvas Technologies 社) による処理を実施した。化学固定したサンプルを SmartClear 高速組織透明化システム (LifeCanvas Technologies 社) を用いて脱脂し、SmartLabel 高速免疫染色システム (LifeCanvas Technologies 社) を用いて抗サイトケラチン 14 抗体、抗サイトケラチン 8/18 抗体を一次抗体として使用した乳腺組織の免疫染色を行った。その後、屈折率調整試薬に浸漬し、透明化組織標本とした。

#### (4) 画像の取得、画像解析

画像の観察・取得には、ディスク走査型共焦点顕微鏡システム (DSU-IX81、オリンパス株式会社) を、画像解析ソフトウェアとして ImageJ (米国国立衛生研究所) をそれぞれ使用した。

#### (5) RNA シーケンス解析

上記 (1) で採材した乳腺組織の一部について、RNA 抽出キット (RNeasy, キアゲン社) を用いて total RNA を抽出した。遺伝子発現解析はアゼンタ株式会社に委託し、取得したデータを用いてサンプル間の遺伝子発現変動比較、主成分解析を行った。また、個々の遺伝子の機能については、データベースを通じて検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) パラフィン標本作製による、2次元レベルでの乳腺組織観察

放射線非照射のラット乳腺組織を用いて、乳腺上皮細胞の局在についてパラフィン切片を用いて検討した。Anti-CK14 抗体によってラベルされる細胞は基底細胞であり、乳管の最外層を標識することができた。また、Anti-CK8+18 抗体によってラベルされるのは、CK14 陽性の基底細胞よりも内側に配置される多層化した細胞集団であり、これを内腔細胞とした。乳腺間質は、基底細胞よりも外側の領域であり、本研究では CK14 陽性細胞よりも外側の領域を乳腺間質とした。

次に、マクロファージのマーカーである CD68 の抗体を用いた免疫染色の条件を決定した。放

放射線非照射の乳腺組織において anti-CD68 抗体による免疫染色を実施したところ、CD68 陽性細胞の大部分は乳腺の間質組織に存在するが、一部は乳腺上皮細胞にも存在することが分かった。放射線非照射のサンプルにおいても乳腺間質に多く CD68 陽性のマクロファージが存在しているのは、乳腺構造の伸長・発達、乳管の分岐の際にマクロファージが寄与している (Jennifer and Zena 2010 Dev Biol) ためであり、本研究において検出されたマクロファージは乳腺の発達に寄与するものと想定される。今後は、放射線によってマクロファージの数や、その活性が増加するか否かを検討する。

### (2) 透明化組織標本作製による、三次元レベルでの乳腺組織観察法の実験系確立

乳腺組織は、複雑な立体構造をとる組織で、乳腺上皮細胞で構成される末梢芽状突起、乳管や腺房は脂肪の中に位置する。本研究では、複雑な立体構造の中で乳腺上皮細胞や間質細胞の炎症細胞がどのように配置されるか、「組織丸ごと」観察する実験系の確立を目指し、組織透明化システムを用いた。また、前項(1)で確認した乳腺上皮細胞(基底細胞、内腔細胞)を識別できる抗体を用いて、組織レベルで免疫染色を可能とする実験系の確立を目指した。

まず、ラット乳腺組織の最適な固定条件(4%パラホルムアルデヒドによる化学固定)を決定し、SmartClear 高速組織透明化システムによる SDS 電気泳動を用いた脂肪の脱脂、および SmartLabel 高速免疫染色システムによる多重蛍光免疫染色の条件設定を終了した。共焦点顕微鏡により z スタック方向に透明化組織標本の撮影を行い、画像解析ソフトによってそれら画像を 3D に復元した(図 1A)。Anti-CK14 により 1 層の基底細胞を、anti-CK8/18 により複数層の内腔細胞で構成された乳管構造確認し、透明化した組織によっても免疫染色できることを確認した(図 1B-E)。この実験系の確立により、組織丸ごと複数の抗体で免疫染色することが可能となり、今後はこの実験系を用いて炎症動態の局在解析を行う。

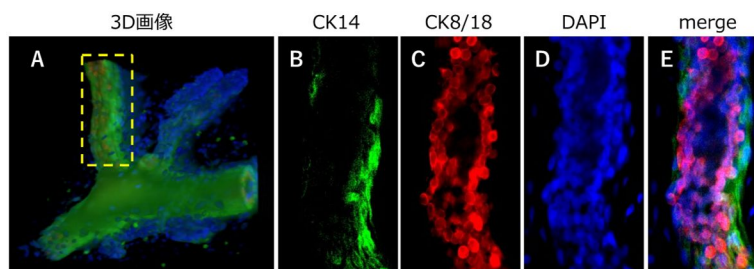


図 1. 基底細胞マーカー(CK14)および内腔細胞マーカー(CK8/18)による透明化組織の蛍光免疫染色の結果。B から D は、A の黄色波線枠の立体構造の 1 断面で、E は B、C、D を重ね合わせたものである。

### (3) 放射線被ばくした乳腺組織の遺伝子発現解析

本研究で設定した 3 群(非照射、低線量率連続照射、高線量率急性照射)の RNA シーケンス解析データを用いて、主成分解析を実施したところ、照射群(高線量率群と低線量率群)は非照射群と異なる遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった。さらに 2 群間で遺伝子発現量が有意に異なる遺伝子(Differentially Expressed Genes: DEG)については、FDR(False Discovery Rate)値が 0.05 以下であるものを有意とし、遺伝子発現に変動が認められた個々の DEG について、次のように機能を確認した。

第一に、乳成分の生成に関連する遺伝子群(Csn2 等)は、放射線照射によって、非照射に比べてその遺伝子発現が抑制された。乳腺上皮細胞の分化停止の際に、乳成分生成に関連する遺伝子の発現が抑制される(Visvader 2009 Genes Dev)ことから、放射線は乳腺上皮細胞の分化が抑制することが本研究によって見出された。

第二に、炎症関連遺伝子(Lilrb3a 等)は放射線照射によって、非照射に比べてその遺伝子発現が促進された。遺伝子の機能について文献検索等で確認したところ、それら遺伝子は乳腺組織に存在するマクロファージと関係することが判明した。つまり、放射線被ばく 1 か月後において、マクロファージを介した炎症反応が生じていることが示唆された。

以上のことから、放射線照射は乳腺正常組織における乳腺上皮の分化抑制を引き起こす他、間質に多く存在するマクロファージが関連する炎症反応の遺伝子発現を変動させることが明らかとなった。

今後は、放射線被ばくが引き起こす乳腺上皮細胞の分化抑制と、乳腺間質における炎症動態の相互作用について検討し、発がんにつながる初期の細胞動態の解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kento Nagata, Yukiko Nishimura, Yuya Hattori, Ritsuko Watanabe, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Dynamics of DNA double-strand break repair in progenitor and mature cells of the rat mammary gland
3. 学会等名 第18回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kento Nagata, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Yukiko Nishimura, Yuya Hattori, Ritsuko Watanabe, Akinari Yokoya, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Histological analysis of DNA double-strand break repair in progenitor and mature cells in rat mammary gland
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kento Nagata, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Daisuke Iizuka, Yukiko Nishimura, Yuya Hattori, Ritsuko Watanabe, Akinari Yokoya, Keiji Suzuki, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka
2. 発表標題 Radiation-induced DNA Double-strand Break Repair of Progenitor Cells in Rat Mammary Gland
3. 学会等名 Institute for Environmental Sciences 30th Anniversary International Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田健斗, 西村まゆみ, 臺野和広, 飯塚大輔, 西村由希子, 服部佑哉, 横谷立子, 横谷明德, 柿沼志津子, 今岡達彦.
2. 発表標題 Radiation inhibits differentiation of luminal cells in the rat mammary gland in a dose-rate-dependent manner.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永田健斗, 西村まゆみ, 臺野和広, 飯塚大輔, 西村由希子, 服部佑哉, 横谷立子, 横谷明德, 柿沼志津子, 今岡達彦.
2. 発表標題 放射線はラット乳腺内腔細胞の分化を線量率依存的に抑制する
3. 学会等名 アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagata Kento, Nishimura Mayumi, Daino Kazuhiro, Iizuka Daisuke, Nishimura Yukiko, Hattori Yuya, Yokoya Ritsuko, Yokoya Akinari, Kakinuma Shizuko, Imaoka Tatsuhiko
2. 発表標題 Persistent suppression of the luminal progenitor cell differentiation precedes radiation-induced rat mammary carcinogenesis.
3. 学会等名 第19回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagata Kento, Nishimura Mayumi, Daino Kazuhiro, Iizuka Daisuke, Nishimura Yukiko, Hattori Yuya, Yokoya Ritsuko, Yokoya Akinari, Kakinuma Shizuko, Imaoka Tatsuhiko
2. 発表標題 Cellular dynamics of luminal cells in rat mammary gland after exposure to low dose-rate radiation
3. 学会等名 International Mini Workshop on Low Dose and Low Dose-Rate Radiation Research -Current Status and Future Prospects- (国際学会)
4. 発表年 2022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

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
---------	---------