

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590946

研究課題名(和文)放射線腸炎に対する自家脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた再生治療

研究課題名(英文) Regenerative therapy using autogenic adipocyte-derived progenitor cells for radiation colitis

研究代表者

大津留 晶(Ohtsuru, Akira)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00233198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線腸炎は、放射線による晩期有害事象の一つで、難治例の治療が課題となっている。また東日本大震災後の原発事故において、高線量作業環境下の事故による急性放射線障害の発生に備えるため、再生治療の研究は重要である。本研究では、ヒト自家組織由来間葉系前駆細胞の初代細胞株が、無血清培養液環境下で、最終分化せずに前駆細胞機能と多分化能を維持したまま細胞分裂できることを明らかにした。一方、難治性放射線皮膚潰瘍や腸病変・瘻孔に対する自家間葉系前駆細胞を用いた治療例の比較解析も行った。原子力災害時に、放射線腸炎をはじめ確定的影響の可能性のある症例を、どのように迅速スクリーニング可能かも検討した。

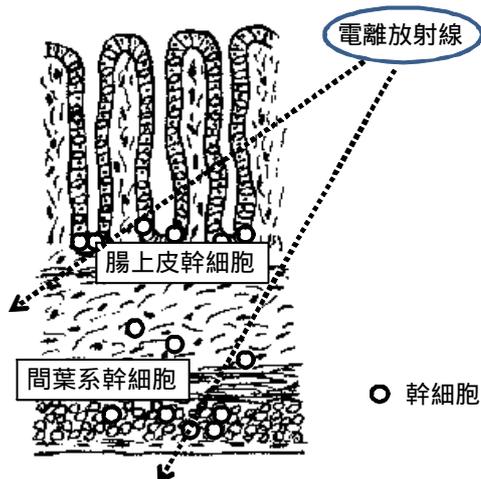
研究成果の概要(英文)：Radiation-induced intestinal and skin injury is one of the most life-threatening diseases in acute radiation syndrome. Although there is no patient of acute radiation syndrome in Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant (NPP) accident compared to past nuclear disaster, it is an important issue to discover how to reduce the radiation-induced skin and intestinal damage in preparation for accident medical responses in high dose circumstances for long-term reactor decommissioning. We have been developing a regenerative therapy system using non-cultured autologous adipose-derived stem cells. Furthermore, we have developed a novel system to generate multilineage progenitor cells from normal tissues. To establish a strategy for a rapid screening survey of surface contamination among a large number of people after NPP accidents, we analyzed the measured surface contamination of subjects. It is a strategy to screen a possible deterministic effect including radiation colitis.

研究分野：被ばく医療学

キーワード：放射線晩発性障害 スクリーニング 多分化能 再生阻害局所環境

## 1. 研究開始当初の背景

放射線による有害事象は、放射線障害早期に起こる急性反応と、放射線照射後6カ月から1年以降に出現する晩期有害事象に区別される。急性反応は、病理学的には粘膜の壊死、剥離、好酸球浸潤を伴う陰窩膿瘍などが中心で、これは粘膜上皮の幹細胞・前駆細胞に対する放射線の直接作用(アポトーシス誘導)が主な原因と考えられている。晩期反応の病理学所見は、粘膜下組織の線維化や虚血性変化が主体である。消化管に良性の潰瘍性病変ができた場合、炎症などが持続していなければ、消化管の安静にともない腸上皮再生治癒機構が働き、正常腸粘膜が再生する。新たな炎症性病変が出現しないかぎり、一度再生が完了した正常粘膜の易出血、線維化、狭窄などを生じることはないと考えられていた。しかし、臨床上みる放射線腸炎は、照射後かなりの年月が経ってからも認められる場合がある。我々は放射線腸炎の根本原因は、急性期に見られる腸粘膜上皮幹細胞の放射線ダメージだけでなく、晩期反応は粘膜下の間葉系幹細胞に放射線のダメージが蓄積していて、放射線腸炎を生じるのではないかと考えた(下図)。そこで、放射線治療の放射線ダメージのない皮下脂肪組織の間葉系幹細胞もしくは前駆細胞を多く含む再生細胞分画を、病変粘膜下に細胞移植し、安全性確認と放射線腸炎の病態が回復するかどうかの臨床研究を行うことが本研究の当初の目標であった。



## 2. 研究の目的

(1) 原発事故や放射線治療において生じた放射線腸炎などの症例において、ヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞が、多分化能をもち、

腸管の間葉系組織の再構築を促すことで、放射線腸炎の組織再生が可能かどうか検討する。

(2) 実際の放射線腸炎は、長い経過の中で症状が発現しなければ、その病態がどのようになるか分からない。医療被ばくでは線量再構築による予測も可能かもしれないが、原子力災害のような急性期においては、スクリーニングが重要となる。その方法も検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 原発事故や放射線治療において生じた放射線腸炎などの症例において、ヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞が、多分化能をもち、腸管の間葉系組織に分化できるかを、培養系で検討する。

(2) 放射線腸炎動物モデルで、治療法の検討を行う。本治療法の効果機序を、各種cDNAマイクロアレイを用いて抗線維化、抗炎症、血管新生因子解析を中心に検討する。

(3) 外科的な治療の適応がなく、対症的な絶食・輸液などの消化管安静療法や、内視鏡下の狭窄に対するバルーン拡張術、出血に対するアルゴンプラズマレーザー凝固術などの内科的治療に抵抗性の放射線腸炎に対して、自家脂肪組織由来間葉系前駆細胞(ADRC)を用いた消化管組織再生治療のエントリーをめざし、本治療法の安全性と治療効果を検討する。

尚、本研究は倫理委員会の承認、対象者への書面によるインフォームド・コンセントを得て実施した。

(4) 原子力災害時の、放射能スクリーニングは、全身の32ポイントを5cmの距離にて、時定数10秒にして各々の部位を測定した。もし必要なケースであれば、距離を1cmに近づけて正確な値を測定した。対象者一人あたりの測定時間は、約10分であり、除染後の再測定値は、本解析では除外した。これらの結果の解析は、倫理委員会に申請し、承諾を得て実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 初代培養細胞における結果

ヒト自家組織由来間葉系前駆細胞の初代細胞株が、ES細胞用の無血清培養液環境下で、最終分化せずに前駆細胞機能と多分化能を維持したまま細胞分裂できることを明らかにした(図1)。多分化能は、脂肪分化(図2)以外にも、神経や筋肉や骨軟骨への分化も見

られた。またそれは、他の組織例えば甲状腺組織由来の初代培養系でも同様な現象を観察できた ( 図 3 . Suzuki K et.al. Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. PLoS ONE 27;6: e19354, 2011 )

図 1 . 脂肪幹細胞の ex vivo での増殖 ( 培養 9 日目と 16 日目 )

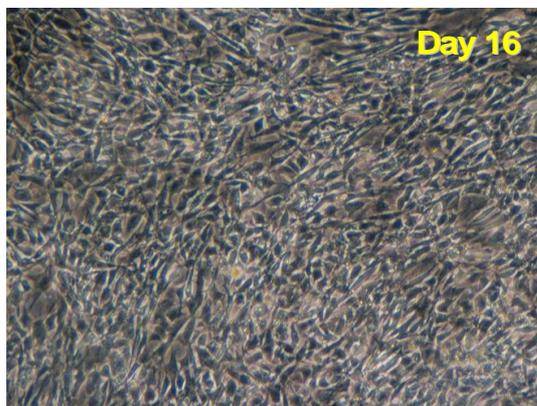
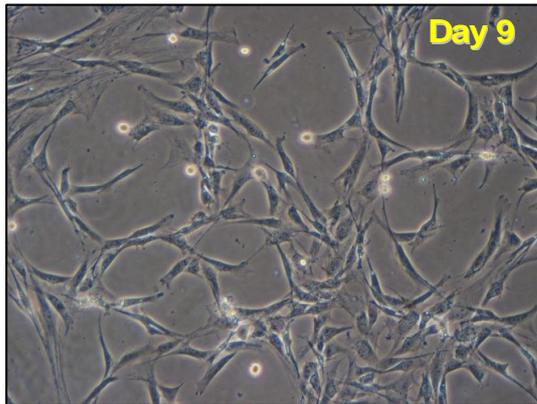


図 2 . 脂肪幹細胞の ex vivo での脂肪への分化 ( 分化培地で 1 週間、DMEM/F12+IBMX, Insulin, Indometacin, Dexamethasone )

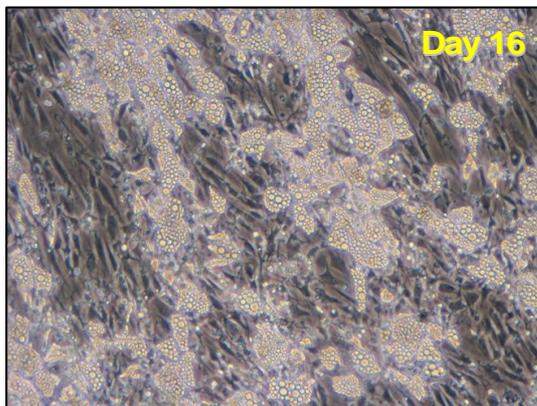
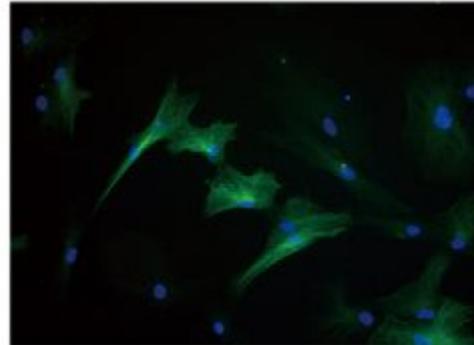


図 3 . 神経細胞への分化 ( Anti-b-III tubulin



antibody was included in Human Neural Stem Cell Functional Identification Kit)

### ( 2 ) 晩発性放射線障害の年齢の要素

放射線腸炎をはじめとする晩発性障害は、初めに述べたように、長期間後に突然現れることがある。これには年齢的な要素により、間葉系幹細胞のレパトリーの減少が関与しているのかもしれない。またアポトーシスが年齢で高くなると増える可能性もある。そこで胸腺と甲状腺に対する放射線照射の年齢の要素をみると、胸腺のアポトーシスには年齢関係なく初期に著明で、甲状腺は年齢に関係なく放射線によるアポトーシスは見られなかった。一方、autophagy の発現は、年齢依存性が見られた。

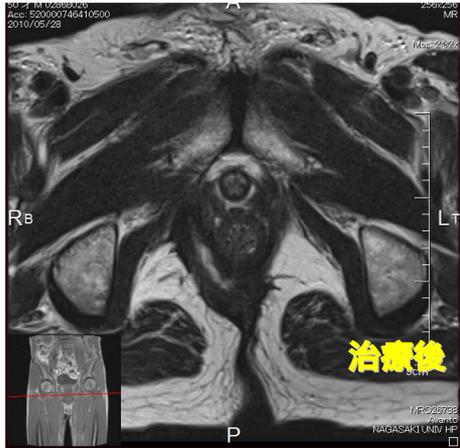
### ( 3 ) 臨床症例における分析

今回の原子力災害では、幸いに急性放射線症候群の症例はなく、放射線腸炎を来す人はいなかったが、今後の高線量作業中の事故でそのような可能性は皆無ではない。そこで、クローン病の瘻孔に対する再生治療を行った。

図 4 . 治療前の状態 ( MRI )



図7 . 治療後の状態 (MRI)



少数例であるが、ろう孔は閉塞し、臨床的には痛みが劇的に改善し、鎮痛剤や麻薬の使用が不要となった。これらより消化管の粘膜への再生作用を有する可能性が示唆された。

#### (4) 動物モデルにおける検討

間葉系の前駆細胞が障害部位に生着するためには、高線量放射線照射による組織弾力性低下・瘢痕化、前駆細胞の定着阻害、血流低下などの再生を阻害する局所環境の改善が重要である。そのため、FGFを用いた治療も動物モデルにて検討した (Wound Repair Regen 21:141-154, 2013)。

#### (5) 原子力災害におけるスクリーニングのあり方について

2011年3月の東日本大震災に引き続き原発事故では、比較的高線量の被ばくをした作業員などでも急性放射線症候群は認めなかった。しかし今後の備えとして再生治療を検討する必要がある。また例えば、1987年のブラジルのゴイアニアの放射線事故では、11万人にスクリーニングが行われ、151人にある程度の高線量の汚染が認められ、46人がプルシアンブルーによるキレート剤治療が行われた。4名が死亡した。急性期に再生治療が必要か否かは不明であるが、現実問題として大多数の被災者がいる原子力災害では、医療介入が必要な確定的影響が出る可能性のある被災者のスクリーニングが必要である。しかし、医療需要と供給のバランスが崩れている災害時の迅速スクリーニングの方法論がまだ確立していなかった。そこで、代表研究者が福島県立医大に異動したので、その点も

加えて検討した。

原子力災害のような大規模な住民に対処する迅速な放射能表面汚染スクリーニングの方法としては、本研究において、手・足2か所、左右どちらかを測定することで、全身の放射能汚染検査と同等の情報を把握できる可能性が示された。さらに、同じ避難経路をとってきた人々のうち、代表者一名の測定値によって、同一グループの他の構成員の放射能汚染状況を把握できることも示唆された。本報告で考案した迅速放射能表面汚染スクリーニング方法は、短時間で行えるにもかかわらず、簡易で高い正確度を維持した方法であり、本研究は大規模放射線災害における住民の放射線防護とその他の健康影響のバランスを考えたとき、極めて重要なオプションを、提供するのではないかと考えられた。

#### 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)

[論文](計 8件)

1. Matsu-Matsuyama M, Shichijo K, Okaichi K, Kurashige T, Kondo H, Miura S, Nakashima M. Effect of age on the sensitivity of the rat thyroid gland to ionizing radiation. J Radiat Res. 2015 May;56(3):493-501. doi: 10.1093/jrr/rrv003. Epub 2015 Feb 16.

2. T. Ohba, M. Miyazaki, H. Sato, A. Hasegawa, M. Sakuma, T. Yusa, F. Shishido, A Ohtsuru. A strategy for a rapid radiological screening survey in large scale radiation accidents: a lesson from our individual survey after the Fukushima Daiichi nuclear power plant accidents. Health Physics 107(1):10-17, 2014. DOI: 10.1097/HP.0000000000000044

3. Morita N, Miura M, Yoshida M, Kumagai A, Ohtsuru A, Usa T, Kudo T, Takamura N, Yamashita S, Matsuda N. Spatiotemporal characteristics of internal radiation exposure in evacuees and first responders after the radiological accident in Fukushima. Radiat Res 180(3):299-306, 2013. doi: 10.1667/RR3372.1.

4. Hamuy R, Kinoshita N, Yoshimoto H, Hayashida K, Houbara S, Nakashima M, Suzuki K, Mitsutake N, Mussazhanova Z, Kashiya K, Hirano A, Akita S. One-stage, simultaneous skin grafting with artificial dermis and basic

fibroblast growth factor successfully improves elasticity with maturation of scar formation. Wound Repair Regen. 2013 Jan-Feb;21(1):141-54. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00864.x.

5. N. Matsuda, A. Kumagai, A. Ohtsuru, N. Morita, M. Miura, M. Yoshida, T. Kudo, N. Takamura, S. Yamashita. Assessment of internal exposure doses in fukushima by a whole body counter within one month after the nuclear power plant accident. Radiat Res 179(6):663-668, 2013. doi: 10.1667/RR3232.1.

6. S. Akita, H. Yoshimoto, K. Akino, A. Ohtsuru, K. Hayashida, A. Hirano, K. Suzuki, S. Yamashita. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. Clin Plast Surg 39(3):281-92, 2012.

7. S. Akita, H. Yoshimoto, A. Hirano, A. Ohtsuru, S. Yamashita. Autologous adipose-derived regenerative cells are effective for chronic intractable radiation injuries. Radiat Protec Dpsimetry 151(4):656-60, 2012.

8. K. Suzuki\*, N. Mitsutake\*, V. Saenko, M. Matsuse, A. Ohtsuru, A. Kumagai, T. Uga, H. Yano, Y. Nagayama, S. Yamashita: Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. PLoS ONE 27;6(4): e19354, 2011.

〔総説〕(計 2件)

1. Matsuda N, Yoshida K, Nakashima K, Iwatake S, Morita N, Ohba T, Yusa T, Kumagai A, Ohtsuru A. Initial activities of a radiation emergency medical assistance team to fukushima from nagasaki. Radiat Meas 55:22-25, 2013.

2. Miyazaki M, Ohtsuru A, Ishikawa T. An overview of internal dose estimation using whole-body counters in Fukushima prefecture. Fukushima J Med Sci 60(1):95-100, 2014.

〔図書〕(計 1件)

1. A. Ohtsuru, S. Akita, A. Kumagai, H. Isomoto, T. Usa, K. Suzuki, A. Hirano, S. Yamashita. Development of novel

treatments for radiation-related diseases in nuclear power plant accident. A New Challenge of Radiation Health Risk Management M. Nakashima, et.al.(Eds) Nagasaki Newspaper Publish 181-191, 2012.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大津留 晶 (OHTSURU Akira)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00233198

(2)研究分担者

磯本 一 (ISOMOTO Hajime)  
長崎大学・大学病院・准教授  
研究者番号：90322304

中島 正洋 (MAKASHIMA Masahiro)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授  
研究者番号：50284683

吉本 浩 (YOSHIMOTO Hiroshi)  
長崎大学・大学病院・助教  
研究者番号：90513309