

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293279

研究課題名(和文)放射線被ばくによる組織幹細胞への影響と非がん疾患リスク評価

研究課題名(英文) Radiation-induced injury in tissue-specific stem cells for evaluating non-cancer disease risks

研究代表者

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：50379997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、放射線被ばくによる心筋幹細胞への影響を調べ、その心筋幹細胞の量と質の変化が心血管疾患リスクの間接的な評価指標になり得るかどうかについて検証した。健康成獣マウスに3Gyの放射線を全身照射したことにより、心臓幹細胞の数に有意な減少、心臓幹細胞におけるtelomerase活性の低下とDNA傷害の増加、および心臓の自己再生修復機能の低下が認められた。特に、心臓幹細胞におけるtelomerase活性の低下とDNA傷害の増加は線量依存性に影響を示し、心血管疾患リスクを間接的に評価するパラメーターになり得ることを動物実験で証明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we experimentally investigated radiation-induced injuries of cardiac stem cells, which might indirectly indicate future cardiovascular disease risks. We found that the whole body exposure of healthy adult mouse to 3 Gy gamma ray significantly reduced the number, decreased telomerase activity, and increased DNA damage of cardiac stem cells, and also significantly impaired the self-regenerative potency of heart after injury. According to our data, radiation-induced changes on the c-kit expression, telomerase activity, and DNA damage of cardiac stem cells may serve as parameters for indirectly evaluating future cardiovascular disease risks.

研究分野：医歯薬学

キーワード：幹細胞 放射線 非がん疾患リスク

## 1. 研究開始当初の背景

福島原発事故を受け、低線量放射線被ばくによる人体影響への社会的関心が高まり、より科学的に検証することは緊急な課題となっている。

広島・長崎原爆被ばく者を対象とした疫学調査では、100mGy 以下の急性放射線被ばくによる発がんリスクの有意な増加は認められなかった。しかし、最近では、小児 CT スキャンによる骨髄と脳の累積被ばく線量がそれぞれ 50mGy と 60mGy を超えた場合に、白血病と脳腫瘍の発症が約 3 倍増加すると報告された(Lancet 2012;380:499)。低線量被ばくによるがんの誘発に関しては、未だにコンセンサスが得られていない。

一方、放射線被ばくによる非がん疾患リスクについては、原爆被ばく生存者の長期追跡調査で、0.5Gy 以上の被ばくによる心血管疾患リスクの増加が最近報告され (BMJ 2010;340:b5349)、大きく注目されている。これまでの低線量被ばく影響の研究は、発がんのことに集中していたため、非がん疾患リスクに関する詳しい検証が行われておらず、ほとんど不明である。

そもそも、低線量被ばくによる“確率的”影響は低い確率で表すため、通常の疫学調査や動物個体レベルでの研究では、検出感度に限界がある。また、単純な腫瘍形成の有無による発がん評価と違い、実験動物の心血管疾患などの発症に識別診断が困難であるため、非がん疾患リスクの検証には新たな研究アプローチの開拓が必要である。

近年、組織幹(前駆)細胞に関する研究が急激に進展してきた。これまでの研究で組織内に生息している数の少ない幹細胞は、組織臓器の再生修復や恒常性維持に中心的な役割を担っていることのみならず、がん発生の主な源であることも判明した(Nature. 2011;469:314)。さらに、成熟した組織細胞と比べ、幹細胞は放射線に高い感受性を示すことが知られている。よって、放射線被ばく影響、特に低線量被ばく遠隔期影響は成熟した組織細胞よりも未熟な幹細胞に起因していると考えられている。

以上のことから、組織幹細胞の数および機能の変化を調べることにより、低線量放射線被ばくによる非がん疾患リスクを的確に評価できると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、組織(心臓)幹細胞を研究ツールとし、以下の点を明らかにする。

- 放射線被ばくが組織(心臓)幹細胞の数、性質、機能に与える影響
- 放射線被ばくによる心臓幹細胞傷害の線量依存性と回復可能性
- 放射線被ばくによる心臓再生修復能への影響と心血管疾患リスクとの関連性

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物と放射線照射

12 週齢の健常マウス (C57BL/6) に 3 Gy の  $\gamma$  線 1 回、あるいは 0, 1, 50, 250 mGy/日) を 1 週間連続して全身照射 (累積線量は 0, 70, 350, 1750 mGy) を行う。

### (2) 心臓幹細胞の数、性質および機能の評価

放射線照射完了の 24 時間後、あるいは連続照射終了 1, 3 週間後に、マウスを犠牲死させ、心房組織を採取し、従来の方法より心房組織から心臓幹細胞を培養増殖した。培養 2 週間後に心臓幹細胞を収穫し、その細胞総数を定量評価する。また、培養した心臓幹細胞の性質と機能に関しては、以下のパラメーターを用いて評価する。

- 細胞の老化 (逆転写酵素 TERT の活性)
- 酸化ストレス (細胞内の活性酸素濃度)
- DNA 傷害 (53BP1 フォカス形成)
- 増殖機能 (Ki67 陽性細胞率)
- 臓器再生機能 (VEGF や IGF の産生)

### (3) 心血管再生修復機能の評価

マウスに 3 Gy の  $\gamma$  線 1 回全身放射線照射を行い、約 6 時間後に心筋梗塞モデルを作製し、細胞移植などの治療を一切行わず、傷害 2 週間後に心臓の自己再生修復について以下の通りで定量的に評価する。

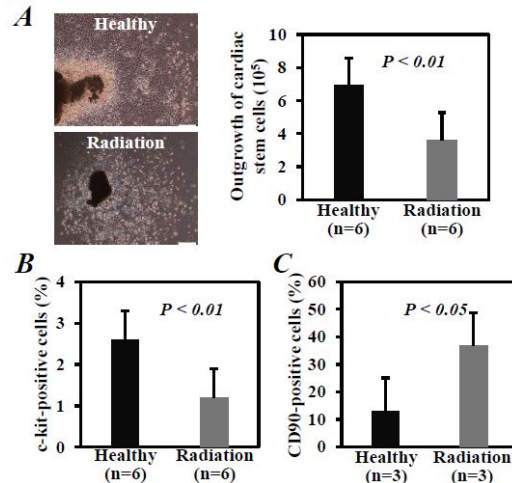
- 心筋血流と心機能 (PET-CT/SPECT-CT)
- 細胞増殖とアポトーシス (免疫染色)
- 幹細胞の局所集積 (免疫染色)
- 血管密度 (免疫染色)
- 線維化面積 (Masson's Trichrome 染色)

## 4. 研究成果

**結果その 1**：放射線被ばくによる心臓幹細胞の数、性質、機能への影響について

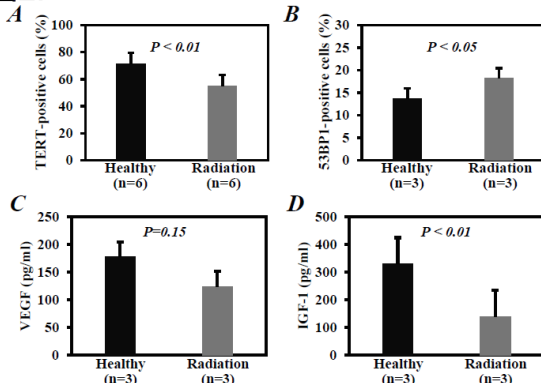
成獣マウスに 3Gy の  $\gamma$  線を全身照射し、24 時間後に心臓幹細胞の数と質の変化を調べた。健常マウスと比べ、全身照射による心臓幹細胞の数 (図 1A) および c-kit 陽性幹細胞の比率 (図 1B) は有意に減少し、CD90 陽性幹細胞の比率は有意な増加を認められた (図 1C)。

図 1.



また、健常マウス由来心筋幹細胞と比べ、全身照射したマウス由来の心筋幹細胞では、細胞老化(TERT 陽性、**図 2A**)および DNA 傷害(53-BP1 陽性、**図 2B**)が誘発され、IGF-1 の産生が有意に減少していた(**図 2D**)。しかし、VEGF の産生には有意な差が認められなかった(**図 2C**)。

図 2.

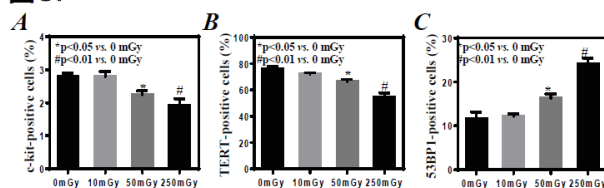


以上の結果から、放射線被ばくによる心臓幹細胞の数と質の低下が動物実験で初めて示された。

### 結果その 2 : 放射線被ばくによる心臓幹細胞傷害の線量依存性と回復可能性について

健常雄性成獣マウス(12 週齢 C57BL/6)に 0, 10, 50, 250 mGy/日の  $\gamma$  線を 1 週間連続で全身照射し(累積線量は 0, 70, 350, 1750 mGy)、照射終了の 24 時間後にマウスを犠牲死させ、心臓幹細胞の数と機能を様々なパラメータを用いて評価した。その結果、心臓幹細胞における c-kit の発現(**図 3A**)細胞老化 TERT 陽性(**図 3B**)、DNA 傷害(53-BP1 陽性、**図 3C**)は線量依存性に有意な傷害影響を示された。しかし、心臓幹細胞の数、CD90 の発現、および心臓幹細胞から VEGF や IGF-1 の産生については明らかな線量依存性傷害を検出できなかった。

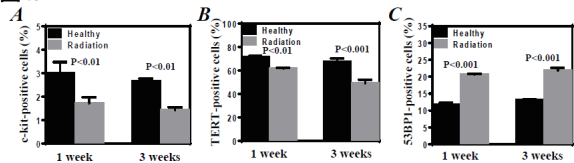
図 3.



また、健常成獣マウスに 3 Gy の  $\gamma$  線を全身照射し、照射終了 1, 3 週間後にマウスを犠牲死させ、心臓幹細胞の数と機能を様々なパラメータを用いて評価した。その結果、心臓幹細胞から VEGF や IGF-1 の産生機能は照射終了の 1 週間後に、また、心臓幹細胞の数および CD90 の発現にも照射終了の 3 週間後に、正常までに完全に回復した。一方、心臓幹細胞における c-kit の発現(**図 4A**)細胞老化(TERT 陽性、**図 4B**) DNA 傷害(53-BP1 陽性、**図 4C**)については、照射終了 3 週を経っても正常までに完全な回復が認められ

なかった。

図 4.

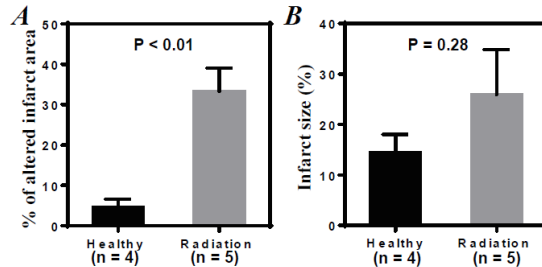


以上の研究結果から、放射線誘発心臓幹細胞障害は線量依存性と回復可能性を示し、逆転写酵素 TERT の活性や DNA 傷害は、放射線誘発心臓幹細胞障害の評価に敏感かつ安定的なパラメータであることを明らかにした。

### 実験その 3 : 放射線被ばくによる心臓再生修復能への影響について

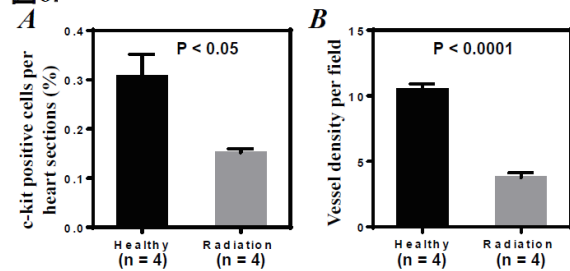
健常成獣マウスに 3Gy の  $\gamma$  線を全身照射し、その 6 時間後に心筋梗塞モデルを作製し、自己再生修復能を調べた。その結果、PET-CT 検査では全身照射したマウスは健常マウスと比べ、左心室の梗塞領域が有意に大きかったが(**図 5A**)組織学解析では群間に有意な差が認められなかった(**図 5B**)。

図 5.



また、全身照射したマウスは梗塞心筋境界領域に心臓幹細胞の数(**図 6A**)と血管密度が共に有意に低値であった(**図 6B**)。

図 6.



これらの結果から、3Gy の  $\gamma$  線照射による心臓自己再生修復機能の低下を示し、心血管疾患リスクになりうることを明らかにした。

組織内に生息している数の少ない幹細胞は、組織臓器の再生修復や恒常性維持に中心的な役割を担っているため、放射線後早期の心臓幹細胞の数および機能の変化から、将来の心血管疾患リスクを間接的に予測可能と思われる。

## 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 7 件)

1. Luo L, Nishi K, Urata Y, Yan C, Hasan AS, Goto S, Kudo T, Li ZL, Li TS. Ionizing radiation impairs endogenous regeneration of infarcted heart: an in vivo 18F-FDG PET/CT and 99mTc-tetrofosmin SPECT/CT study in mice. *Radiat Res*. 2017;187(1):89-97. doi: 10.1667/RR14543.1. (査読あり)
2. Luo L, Yan C, Urata Y, Hasan AS, Goto S, Guo CY, Zhang S, Li TS. Dose-dependency and reversibility of radiation-induced injury in cardiac explant-derived cells of mice. *Sci Rep*. 2017;7:40959. doi: 10.1038/srep40959. (査読あり)
3. Yan C, Luo L, Goto S, Urata Y, Guo CY, Doi H, Kitazato K, Li TS. Enhanced autophagy in colorectal cancer stem cells does not contribute to radio-resistance. *Oncotarget*. 2016;7(29):45112-45121. doi: 10.18632/oncotarget.8972. (査読あり)
4. Luo L, Urata Y, Yan C, Hasan AS, Goto S, Guo CY, Tou FF, Xie Y, Li TS. Radiation exposure decreases the quantity and quality of cardiac stem cells in mice. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0152179. doi: 10.1371/journal.pone.0152179. (査読あり)
5. Masuda S, Hisamatsu T, Seko D, Urata Y, Goto S, Li TS, Ono Y. Time- and dose-dependent effects of total-body ionizing radiation on muscle stem cells. *Physiol Rep*. 2015;3(4):pii:e12377. doi: 10.14814/phy2.12377. (査読あり)
6. Guo CY, Luo L, Urata Y, Goto S, Huang WJ, Takamura S, Hayashi F, Doi H, Kitajima Y, Ono Y, Ogi T, Li TS. Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Sci Rep*. 2015;5:8055. doi: 10.1038/srep08055. (査読あり)
7. Ali H, Galal O, Urata Y, Goto S, Guo CY, Luo L, Abdelrahim E, Ono Y, Mostafa E, Li TS. The potential benefits of nicaraven to protect against radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells with relative low dose exposures. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):548-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.112. (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

1. 羅蘭、西弘大、YAN CHEN、浦田芳重、工藤崇、李桃生。放射線被ばくによる心血管疾患リスクに関する実験的評価。第 59 回日本放射線影響学会 2016.10.26~28 JMS アステールプラザ(広島県・広島市)
2. 羅蘭、浦田芳重、後藤信治、小野悠介、李桃生。放射線被ばくによる心血管疾患リスクに関する実験的評価。第 56 回原子爆

弾後障害研究会 2015.6.7 広島国際会議場 (広島県・広島市)

3. Luo L, Urata Y, Goto S, Ono Y, Li TS. Radiation-induced damage of cardiac stem cells in quantity and quality. 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation of Radiation. 2015.5.25~29 国立京都国際会館(京都府・京都市)

[図書](計 0 件)

[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

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授  
研究者番号：50379997

(2) 研究分担者

工藤 崇 (KUDO, Takashi)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授  
研究者番号：20330300  
浦田 芳重 (URATA, Yoshishige)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：30185087  
後藤 信治 (GOTO, Shinji)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教  
研究者番号：50186889  
小野 悠介 (ONO, Yusuke)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師  
研究者番号：60601119

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし