JAEA-Review 2021-052 DOI:10.11484/jaea-review-2021-052



# 幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける 新たな評価系の構築 (委託研究)

ー令和 2 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業ー

Establishing a New Evaluation System to Characterize Radiation Carcinogenesis by Stem Cell Dynamics (Contract Research) -FY2020 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project-

福島研究開発部門 福島研究開発拠点 廃炉環境国際共同研究センター 量子科学技術研究開発機構

> Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science, Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development National Institutes for Quantum Science and Technology

January 2022

Japan Atomic Energy Agency

日本原子力研究開発機構

本レポートは国立研究開発法人日本原子力研究開発機構が不定期に発行する成果報告書です。 本レポートはクリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 ライセンスの下に提供されています。 本レポートの成果(データを含む)に著作権が発生しない場合でも、同ライセンスと同様の 条件で利用してください。(<u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja</u>) なお、本レポートの全文は日本原子力研究開発機構ウェブサイト(<u>https://www.jaea.go.jp</u>) より発信されています。本レポートに関しては下記までお問合せください。

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 JAEA イノベーションハブ 研究成果利活用課 〒 319-1195 茨城県那珂郡東海村大字白方 2 番地 4 電話 029-282-6387, Fax 029-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

This report is issued irregularly by Japan Atomic Energy Agency. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en</u>). Even if the results of this report (including data) are not copyrighted, they must be used under

the same terms and conditions as CC-BY.

For inquiries regarding this report, please contact Institutional Repository and Utilization Section, JAEA Innovation Hub, Japan Atomic Energy Agency.

2-4 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1195 Japan

Tel +81-29-282-6387, Fax +81-29-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

© Japan Atomic Energy Agency, 2022

幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける新たな評価系の構築 (委託研究)

-令和2年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業-

日本原子力研究開発機構 福島研究開発部門 福島研究開発拠点 廃炉環境国際共同研究センター

量子科学技術研究開発機構

(2021年10月29日受理)

日本原子力研究開発機構(JAEA)廃炉環境国際共同研究センター(CLADS)では、令和2年度英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業(以下、「本事業」という)を実施している。

本事業は、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所の廃炉等をはじめとした 原子力分野の課題解決に貢献するため、国内外の英知を結集し、様々な分野の知見や経験を、従 前の機関や分野の壁を越えて緊密に融合・連携させた基礎的・基盤的研究及び人材育成を推進す ることを目的としている。

平成 30 年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省から JAEA に移行することで、JAEA とア カデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続 的に実施する体制を構築した。

本研究は、研究課題のうち、令和元年度に採択された「幹細胞動態により放射線発がんを特徴 付ける新たな評価系の構築」の令和2年度の研究成果について取りまとめたものである。

本研究では放射線発がんの起源細胞である幹細胞について、幹細胞とその子孫細胞を永続的に ラベルできる細胞系譜追跡技術を用い、高線量~低線量放射線被ばく後の乳腺組織において、細 胞の長期にわたるクローン性増殖を捉えそれを数理モデル解析することにより、被ばくした幹細 胞の動態で放射線誘発乳がんを特徴付けることを目的としている。

令和2年度は、放射線発がんリスクの高い乳腺を構成する基底細胞の細胞系譜を追跡できるマ ウスモデルにおいて、非照射群では蛍光タンパク質を発現するクローンの拡大が時間経過ととも に観察されるが、7週齢での放射線被ばくにより、途中まで拡大したクローンが縮小することを 見出した。数理モデル解析を行うことで、この縮小は細胞の分裂停止と組織外からの細胞の流入 によって説明出来た。

この研究の最終目標は、未だに見つかっていない「放射線の痕跡」を幹細胞動態で特徴付ける ことのできる新規評価系の開発である。

本報告書は、日本原子力研究開発機構の英知事業における委託業務として、量子科学技術研究開 発機構が実施した成果を取りまとめたものである。

廃炉環境国際共同研究センター:〒979-1151 福島県双葉郡富岡町大字本岡字王塚 790-1

i

# Establishing a New Evaluation System to Characterize Radiation Carcinogenesis by Stem Cell Dynamics

(Contract Research)

- FY2020 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project -

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science, Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development Japan Atomic Energy Agency Tomioka-machi, Futaba-gun, Fukushima-ken

National Institutes for Quantum Science and Technology

(Received October 29, 2021)

The Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science (CLADS), Japan Atomic Energy Agency (JAEA), had been conducting the Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project (hereafter referred to "the Project") in FY2020.

The Project aims to contribute to solving problems in the nuclear energy field represented by the decommissioning of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station, Tokyo Electric Power Company Holdings, Inc. (TEPCO). For this purpose, intelligence was collected from all over the world, and basic research and human resource development were promoted by closely integrating/collaborating knowledge and experiences in various fields beyond the barrier of conventional organizations and research fields.

The sponsor of the Project was moved from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to JAEA since the newly adopted proposals in FY2018. On this occasion, JAEA constructed a new research system where JAEA-academia collaboration is reinforced and medium-to-long term research/development and human resource development contributing to the decommissioning are stably and consecutively implemented.

Among the adopted proposals in FY2019, this report summarizes the research results of the "Establishing a new evaluation system to characterize radiation carcinogenesis by stem cell dynamics" conducted in FY2020.

In this study, the long-term clonal expansion of mammary stem cells after high- to low-dose radiation exposure was investigated using stem-cell lineage tracing technology that can permanently label stem cells and their progenies. The purpose of this study is to characterize radiation-induced breast cancer based on the dynamics of radiation-exposed stem cells by capturing proliferation and analyzing it using a mathematical model.

We used a mouse model that can trace the cell lineage of basal cells of mammary gland. In this mouse, expansion of clones expressing fluorescent protein was observed over time in the non-irradiated group, but it was found that the clones that expanded halfway shrank due to radiation exposure at 7 weeks of age. Mathematical modeling of mammary gland dynamics could explain this clone reduction by introducing cell division arrest and cell influx from outside the tissue as the effect of radiation exposure.

The goal of this study is to develop a new evaluation system that can characterize previously undiscovered "radiation signatures" by stem cell dynamics.

Keywords: Radiation Carcinogenesis, Stem Cells, Lineage Tracing, Mathematical Model, Radiation Signatures

This work was performed by National Institutes for Quantum Science and Technology under contract with Japan Atomic Energy Agency.

### 目次

1.	英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要	1
2.	平成 30 年度 採択課題	2
3.	令和元年度 採択課題	5
4.	令和2年度 採択課題	8
付	録 成果報告書	11

### Contents

1.	Outline of Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project	5
	1	l
2.	Accepted Proposal in FY2018	2
3.	Accepted Proposal in FY2019	5
4.	Accepted Proposal in FY2020	3
App	endix Result Report	1

This is a blank page.

1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要

文部科学省では、「東京電力(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等研究開発の加速プラン(平 成26年6月文部科学省)」等を踏まえ、平成27年度から「英知を結集した原子力科学技術・人材 育成推進事業」(以下、「本事業」という。)を立ち上げ、「戦略的原子力共同研究プログラム」、「廃 炉加速化研究プログラム」及び「廃止措置研究・人材育成等強化プログラム」を推進している。

具体的には、国内外の英知を結集し、国内の原子力分野のみならず様々な分野の知見や経験を、 機関や分野の壁を越え、国際共同研究も含めて緊密に融合・連携させることにより、原子力の課 題解決に資する基礎的・基盤的研究や産学が連携した人材育成の取組を推進している。

一方、日本原子力研究開発機構(以下、「JAEA」という。)では、平成27年に廃炉国際共同研究 センター(以下、「CLADS」という。現:廃炉環境国際共同研究センター)を組織し、「東京電力ホ ールディングス(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等に向けた中長期ロードマップ」等を踏 まえ、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所廃炉(以下、「1F廃炉」という。) に係る研究開発を進めている。

また、平成 29 年 4 月に CLADS の中核拠点である「国際共同研究棟」の運用を開始したことを踏 まえ、今後は CLADS を中核に、廃炉の現場ニーズを踏まえた国内外の大学、研究機関等との基礎 的・基盤的な研究開発及び人材育成の取組を推進することにより、廃炉研究拠点の形成を目指す ことが期待されている。

このため、本事業では平成 30 年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省から JAEA に移行 することで、JAEA とアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成 をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築することとし、従来のプログラムを、①共通基盤 型原子力研究プログラム、②課題解決型廃炉研究プログラム、③国際協力型廃炉研究プログラム、 ④研究人材育成型廃炉研究プログラム(令和元年度より新設)に再編した。

- 1 -

### 2. 平成 30 年度 採択課題

平成30年度採択課題については以下のとおりである。

課題数:19課題

共通基盤型原子力研究プログラム	11 課題	(若手研究6課題、	一般研究5課題)
課題解決型廃炉研究プログラム	6 課題		
国際協力型廃炉研究プログラム	2 課題	(日英共同研究)	

### 平成 30 年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
被災地探査や原子力発電所建屋内情報収集のための 半自律ロボットを用いたセマンティックサーベイマ ップ生成システムの開発	河野 仁	東京工芸大学
汚染土壌の減容を目的とした重液分離による放射性 微粒子回収法の高度化	山﨑 信哉	筑波大学
ラドンを代表としたアルファ核種の吸入による内部 被ばくの横断的生体影響評価	片岡 隆浩	岡山大学
炉心溶融物の粘性及び表面張力同時測定技術の開発	大石 佑治	大阪大学
iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変 異計測系の確立	島田 幹男	東京工業大学
レーザー共鳴イオン化を用いた同位体存在度の低い ストロンチウム 90 の迅速分析技術開発	岩田 圭弘	東京大学

共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
放射性核種の長期安定化を指向した使用済みゼオ ライト焼結固化技術の開発	新井 剛	芝浦工業大学
燃料デブリ取り出しを容易にするゲル状充填材の 開発	牟田 浩明	大阪大学
レーザー蛍光法を用いた燃料デブリ変質相の同定	斉藤 拓巳	東京大学
過酷炉心放射線環境における線量測定装置の開発	岡本 保	木更津工業 高等専門学校
レーザー加工により発生する微粒子の解析と核種 同定手法の開発	長谷川 秀一	東京大学

## 課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
合金相を含む燃料デブリの安定性評価のための基 盤研究	桐島 陽	東北大学
ガンマ線画像スペクトル分光法による高放射線場 環境の画像化による定量的放射能分布解析法	谷森 達	京都大学
燃料デブリ取出し時における放射性核種飛散防止 技術の開発	鈴木 俊一	東京大学
アルファダストの検出を目指した超高位置分解能 イメージング装置の開発	黒澤 俊介	東北大学
ナノ粒子を用いた透明遮へい材の開発研究	渡邊 隆行	九州大学
先端計測技術の融合で実現する高耐放射線燃料デ ブリセンサーの研究開発	萩原 雅之	高エネルギー 加速器研究機構

国際協力型廃炉研究プログラム(日英共同研究)

課題名	研究代表者	所属機関
放射性微粒子の基礎物性解明による廃炉作業リスク 低減への貢献	五十嵐 康人	茨城大学
放射線耐性の高い薄型 SiC 中性子検出器の開発	三澤 毅	京都大学

### 3. 令和元年度 採択課題

令和元年度採択課題については以下のとおりである。

課題数:19課題

共通基盤型原子力研究プログラム7 課題(若手研究2課題、一般研究5課題)課題解決型廃炉研究プログラム4 課題国際協力型廃炉研究プログラム4 課題(日英共同研究2課題、日露共同研究2課題)研究人材育成型廃炉研究プログラム4 課題

### 令和元年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
ウラニル錯体化学に基づくテーラーメイド型新規海 水ウラン吸着材開発	鷹尾 康一朗	東京工業大学
動作不能からの復帰を可能とする多連結移動ロボッ トの半自律遠隔操作技術の確立	田中 基康	電気通信大学

共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
ー次元光ファイバ放射線センサを用いた原子炉建 屋内放射線源分布計測	瓜谷 章	名古屋大学
低線量・低線量率放射線被ばくによる臓器別酸化ス トレス状態の検討	鈴木 正敏	東北大学
単一微粒子質量分析法に基づくアルファ微粒子オ ンラインモニタリングに向けた基礎検討	豊嶋 厚史	大阪大学
幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける新た な評価系の構築	飯塚 大輔	量子科学技術 研究開発機構
耐放射線性ダイヤモンド半導体撮像素子の開発	梅沢 仁 <sup>(令和元年度まで)</sup> 大曲 新矢	産業技術総合 研究所

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
Multi-Physics モデリングによる福島 2・3 号機ペデ スタル燃料デブリ深さ方向の性状同定	山路 哲史	早稲田大学
燃料デブリ取出しに伴い発生する廃棄物のフッ化 技術を用いた分別方法の研究開発	渡邉 大輔	日立 GE ニュークリ ア・エナジー
アパタイトセラミックスによる ALPS 沈殿系廃棄物 の安定固化技術の開発	竹下 健二	東京工業大学
拡張型スーパードラゴン多関節ロボットアームに よる圧力容器内燃料デブリ調査への挑戦	高橋 秀治	東京工業大学

国際協力型廃炉研究プログラム(日英共同研究)

課題名	研究代表者	所属機関
高い流動性および陰イオン核種保持性を有するア ルカリ刺激材料の探索と様々な放射性廃棄物の安 全で効果的な固化	佐藤 努	北海道大学
再臨界前の中性子線増に即応可能な耐放射線 FPGA システムの開発	渡邊 実	静岡大学 <sup>(令和2年度 まで)</sup> 岡山大学

国際協力型廃炉研究プログラム(日露共同研究)

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取出し臨界安全技術の高度化	小原 徹	東京工業大学
微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に 関する評価研究	金井 昭夫	慶應義塾

研究人材育成型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取り出し時における炉内状況把握のた めの遠隔技術に関する研究人材育成	淺間 一	東京大学
化学計測技術とインフォマティックスを融合した デブリ性状把握手法の開発とタイアップ型人材育 成	高貝 慶隆	福島大学
放射線・化学・生物的作用の複合効果による燃料デ ブリ劣化機構の解明	大貫 敏彦 <sup>(平成 30 年度まで)</sup> 竹下 健二	東京工業 大学
燃料デブリ分析のための超微量分析技術の開発	永井 康介	東北大学

JAEA-Review 2021-052

### 4. 令和2年度 採択課題

令和2年度は、2つのプログラムにおいて、研究課題の採択を決定した。 公募の概要は以下のとおりである。

公募期間: 令和2年3月17日~令和2年5月14日(課題解決型) 令和2年5月13日~令和2年7月15日(国際協力型)

課題数:10課題

課題解決型廃炉研究プログラム	8 課題	(若手研究2課題、	一般研究6	課題)
国際協力型廃炉研究プログラム	2 課題	(日英共同研究)		

これらの提案について、外部有識者から構成される審査委員会において、書面審査及び面接審査、日英共同研究については二国間の合同審査を実施し、採択候補課題を選定した。

その後、PD(プログラムディレクター)・PO(プログラムオフィサー)会議での審議を経て、採 択課題を決定した。

### 令和2年度 採択課題一覧

課題解決型廃炉研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリにおける特性の経年変化と環境劣化割れ の調査	楊 会龍	東京大学
健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の 分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発	岡本 章玄	物質・材料 研究機構

課題解決型廃炉研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
遮蔽不要な臨界近接監視システム用ダイヤモンド 中性子検出器の要素技術開発	田中 真伸	高エネルギー 加速器研究 機構
α / β / γ 線ラジオリシス影響下における格納 容器系統内広域防食の実現:ナノバブルを用いた 新規防食技術の開発	渡邉 豊	東北大学
β、γ、X線同時解析による迅速・高感度放射性核 種分析法の開発	篠原 宏文	日本分析 センター
合理的な処分のための実機環境を考慮した汚染鉄 筋コンクリート長期状態変化の定量評価	丸山 一平	東京大学
溶脱による変質を考慮した汚染コンクリート廃棄 物の合理的処理・処分の検討	小崎 完	北海道大学
マイクロ波重畳 LIBS によるデブリ組成計測の高 度化と同位体の直接計測への挑戦	池田 裕二	アイラボ

国際協力型廃炉研究プログラム(日英共同研究)

課題名	研究代表者	所属機関
革新的水質浄化剤の開発による環境問題低減化技 術の開拓	浅尾 直樹	信州大学
無人航走体を用いた燃料デブリサンプルリターン 技術の研究開発	鎌田 創	海上・港湾・ 航空技術 研究所

本報告書は、以下の課題の令和2年度の研究成果を取りまとめたものである。

共通基盤型原子力研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける 新たな評価系の構築	飯塚 大輔	量子科学技術 研究開発機構

研究成果を取りまとめた成果報告書を付録として添付する。

# 付録

# 成果報告書

This is a blank page.

# 令和2年度

日本原子力研究開発機構

英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける 新たな評価系の構築 (契約番号 R021036)

# 成果報告書

# 令和3年3月

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 JAEA-Review 2021-052

本報告書は、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構の 「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」によ る委託業務として、国立研究開発法人量子科学技術研究開 発機構が実施した「幹細胞動態により放射線発がんを特徴 付ける新たな評価系の構築」の令和2年度の研究成果を取 りまとめたものです。

# 目次

概略v.
1. はじめに1.1-
2. 業務計画       2. 1-         2. 1 全体計画       2. 1-         2. 1.1 計画内容       2. 1-         2. 1.2 実施体制図       2. 1-         2. 2 令和2年度の成果の目標及び業務の実施方法       2. 2-
<ul> <li>3. 令和2年度の実施内容及び成果</li></ul>
4. 結言
参考又献5-

### 執筆者リスト

事業代表者 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 研究統括 飯塚大輔

再委託先担当者 国立大学法人東京大学 特任准教授 波江野洋

## 表一覧

表 2-1	本研究のタイムスケジュール	2.1 $-1$
表 3-1	PCR 反応液の組成(1 サンプルあたり)	3.1-4
表 3-2	各マウスの PCR に用いるプライマー一覧	3.1-4
表 3-3	PCR 反応条件の詳細	3.1-5
表 3-4	リアルタイム PCR 反応液の組成(1 サンプルあたり)	3.1-5
表 3-5	リアルタイム PCR 反応条件の詳細	3.1-6
表 3-6	モデルパラメータ推定に使用した平均クローンサイズ変動データまとめ	3.2-3
表 3-7	放射線照射なしデータを説明するクローン割合とターンオーバー率の組み	
	合わせ	3.2-4

### 図一覧

図 1-1	細胞系譜追跡によるがんに至るクローン性増殖について(模式図) 1.1-2
図 1-2	本研究の目的 1.1-2
図 2-1	実施体制図 2.1-3
図 3-1	マウス乳腺模式図 3.1-1
図 3-2	幹細胞系譜追跡解析を可能にするタモキシフェンの作用について 3.1-2
図 3-3	遺伝子型判定結果(一例) 3.1-7
図 3-4	リアルタイム PCR を用いた遺伝子型判定結果(一例) 3.1-8
図 3-5	解析用 F1 マウスの遺伝子型判定結果(一例) 3.1-9
図 3-6	K8-Brainbow マウスにおけるタモキシフェン濃度検討 3.1-10
図 3-7	ガンマ線照射装置(ガンマセル) 3.1-11
図 3-8	K14-tdTomato マウスを用いた非照射群(上段)と 2 Gy 被ばく群(下段)
	におけるクローンサイズの変化(典型例) 3.1-12
図 3-9	画像解析ソフト Imaris を用いた画像データの数値化(一例) 3.1-13
図 3-10	K14-tdTomatoマウスにおけるクローンサイズの変化 3.1-14
図 3-11	平均クローンサイズの概念 3.2-2
図 3-12	平均クローンサイズの変化 3.2-2
図 3-13	実験データと平均クローンサイズの変化 3.2-3
図 3-14	放射線照射効果を含めた平均クローンサイズの変化 3.2-5

### 略語一覧

Cq	:	Quantification cycle		
creERT	:	Cre recombinase fused to modified estrogen receptor		
Cy5	:	Cyanine 5		
DAPI	:	4',6-diamidino-2-phenylindole		
DNA	:	Deoxyribonucleic acid	(デオキシ!	リボ核酸)
dNTP	:	Deoxyribonucleotide triphosphate	(デオキシ!	リボヌクレオチド三リン酸)
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid	(エチレン:	ジアミン四酢酸)
EtBr	:	Ethidium bromide	(臭化エチ:	ジウム)
F1	:	First filial generation	(雑種第一位	(4
FAM	:	Fluorescein Phosphoramidite		
LoxP	:	Locus of crossing (X) over P		
mCFP	:	membrane-tethered Cyan Fluorescent	Protein	(膜標的青色蛍光タンパク質)
MCMC	:	Markov Chain Monte Carlo		(マルコフ連鎖モンテカルロ)
nGFP	:	nuclear-localized Green Fluorescent	t Protein	(核局在緑色蛍光タンパク質)
PBS	:	Phosphate Buffered Saline		(リン酸緩衝液)
PCR	:	Polymerase Chain Reaction		(ポリメラーゼ連鎖反応)
RFP	:	Red Fluorescent Protein		(赤色蛍光タンパク質)
SPF	:	Specific Pathogen Free		(特定病原体不在)
YFP	:	Yellow Fluorescent Protein		(黄色蛍光タンパク質)
1F	:	東京電力ホールディングス株式会社福,	島第一原子ス	力発電所
量研機構	:	国立研究開発法人量子科学技術研究開	発機構	

概略

【背景・解決すべき課題】

東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所(以下、「1F」という。)の廃炉に向 けた取り組みが「福島第一原子力発電所の廃止措置等に向けた中長期ロードマップ」に基づき行 われている[1]。様々な機器・ロボットなどによる作業が計画されているものの、多くは現場での 作業に依存している。中でも特定高線量作業従事者にはこれまで累積で100 mSv を超える被ばく をしているケースもある。そのため、100 mGy やそれ以下の被ばくによる発がんリスクは科学的 に明らかにしなければならない重要な課題である。

放射線発がんのメカニズムについて、大きく2つの考え方に基づく議論が行われている。一方 は放射線発がん特有の遺伝子変異が引き起こされる考え方である。他方は、自然発生がんの発生 を早めるだけであり、放射線被ばく特有の傷はないという考え方である。

その答えを得るために放射線の痕跡(Radiation Signatures)の探索が多くの研究グループに より行われているが、乳がんを含む多くの腫瘍ではRadiation Signatures は見つかっていない。 しかしながら、それらの腫瘍でも放射線被ばくによる発生率の増加や、がんの増殖速度の増加が 観察され、がん遺伝子・がん抑制遺伝子の変異などのゲノム異常では単純に規定されない、放射 線発がん特有のイベントが起こっていることが示唆される。

近年、発がん起源細胞としての組織幹細胞の重要性が提唱されている。組織幹細胞は、それ自 身のターンオーバーが遅く、遺伝子変異が蓄積しやすいことから、重要な発がんの起源細胞であ る。がん化の初期過程ではある種の変異を持った幹細胞やその子孫細胞がクローン性に増殖する とされている。

近年、空間的な幹細胞の動態を捉える手法として、細胞系譜追跡技術が開発された。細胞系譜 追跡解析とはある細胞を標識し、その子孫細胞をマウス体内で追跡する実験手法であり、幹細胞 の増殖速度、自己複製能、細胞競合ならびにクローン性増殖などの幹細胞の動態研究に広く用い られている。さらに細胞系譜追跡技術を用いた組織幹細胞の生体内での動態データを数理学的に 解析する研究は腸管組織・造血組織で近年行われ注目されている。

#### 【目的】

本研究では「遺伝子変異ではなく、幹細胞の動態(数的、質的変化とそれに続くクローン性増 殖)で低線量放射線発がんを特徴付けられないか」という仮説のもと、その最初の取り組みとし て細胞系譜追跡技術を用い、放射線発がんリスクの最も高い臓器の1つである乳腺に関し、高線 量~低線量放射線被ばく後の乳腺組織において、細胞の長期にわたるクローン性増殖を捉えそれ を数理モデル解析と組み合わせることにより、被ばくした幹細胞の動態で低線量放射線誘発乳が んを特徴付けることを目的としている。

組織内での細胞数の変化を細胞分裂・細胞死・分化の積み重ねとして数理的に記述し、イメー ジング解析による定量的データにフィッティングすることによって、分裂速度・死亡率・分化率 といった組織内細胞動態を支配するパラメータの推定を行う。低線量被ばくの条件による動態パ ラメータの比較を行い、低線量被ばくによる影響を定量的に示す。

本研究の最終目標は、未だに見つかっていない「放射線の痕跡」を幹細胞動態で特徴付けるこ とのできる新規評価系の開発とそれを用いた低線量被ばくによる発がんリスク評価体系のさらな る合理化である。

【実施内容】

実施項目 1. 細胞系譜追跡技術を用いた低線量被ばく後の幹細胞動態解析(量研機構)

[研究目標]

細胞系譜追跡技術を用いた乳腺幹細胞の動態変化に関する定量的データを実験によって取得する。

[方法]

細胞系譜追跡実験系の構築

量研機構放射線医学総合研究所の動物実験施設で維持されている、幹細胞で主に発現する遺伝 子のプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼが組み込まれた遺伝子改変マウスと、Cre リコン ビナーゼが働くと蛍光タンパク質を発現するようになる遺伝子改変マウスをかけあわせ、目的の F1 マウスを作出する。その際には PCR 法を用いた遺伝子型の確認により、それぞれの性質が適切 に F1 マウスに引き継がれていることを確認する。

目的の F1 マウスは通常飼育下では、Cre リコンビナーゼが機能しない。タモキシフェンと呼ば れる薬剤を個体に投与することにより Cre リコンビナーゼが初めて機能を発揮する。予備的検討 としてこのタモキシフェン投与量と投与時期について、それぞれ至適な条件を投与したマウス個 体から得られる乳腺などの組織を用い、病理組織学的解析やフローサイトメトリー法などにより 決定する。

細胞系譜追跡実験系を用いた被ばくによる幹細胞動態解析

①で決定した条件でタモキシフェンを投与したマウスに対し、0~2 Gy の放射線を照射し、経時的に乳腺を摘出し、病理組織学的観察やフローサイトメトリー法などで蛍光タンパク質を発現する細胞の空間的な配置に加え、蛍光タンパク質を発現する細胞集団のクローンサイズを計測し、さらにそれらの細胞数を把握する。これらの実験において、放射線の顕著な影響が捉えられない可能性も否定できないため、その場合は、必要に応じて化学発がん物質による乳腺発がんモデルでも同様の実験を行うことにより、得られたデータの相違や実験系の妥当性を検証する。

③ まとめ

すべての実施項目で得た、画像データ解析と数理モデル解析の結果を統合し、幹細胞動態と発 がんとの関連を評価する。

実施項目 2. 数理モデルを用いた低線量被ばく後の幹細胞動態解析(東京大学)

[研究目標]

乳腺組織動態の数理モデルを構築し被ばくが動態パラメータに与える影響を定量化する。

[方法]

2次元空間構造を含む乳腺組織動態の数理モデル構築

最初に本事業で必要とされる解析環境の整備を行う。実験項目1 で取得する細胞系譜追跡デー タに合わせるように、幹細胞クローンの系譜をそれぞれ区別できるようにして、2 次元格子空間 上で分裂・死亡・分化を繰り返す乳腺組織をコンピュータ上に再現する。組織内の細胞の種類や 空間上の配置は既存の知見とイメージングデータに基づく。

② 被ばく有無の実験データに基づいた動態パラメータの推定

方法①で構築した 2 次元格子空間上のシミュレーションモデルに対して放射線被ばくの効果を 含める。被ばくは主に分裂・死亡・分化という細胞動態パラメータに影響を与えると仮定し、細 胞 系譜追跡データによる細胞数やクローン数の変化にフィッティングさせることで細胞動態パラメ ータを推定する。推定方法は繰り返しシミュレーション解析による細胞動態の計算方法と相性の 良いマルコフ連鎖モンテカルロ(MCMC)法を想定している。照射線量に依存する形で推定された 動態パラメータが既知の細胞培養実験等で得られる結果と比較することによって、推定値の検証 を行う。放射線被ばくの効果がサイトカインの産出等の細胞動態以外にも関わることも想定して おく。

③ 推定パラメータを用いた発がん過程の解析

推定された細胞動態パラメータを用いたシミュレーション解析によって、幹細胞クローンが時間とともに選択されていき、集団として広がっていく様子を調べる。低線量領域で照射線量に依存して発がんが進んでいくかどうか理論的示唆を与える。

【成果】

乳腺上皮細胞で発現する遺伝子のプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼが組み込まれた遺 伝子改変マウスと、Cre リコンビナーゼが働くと蛍光タンパク質を発現するようになる遺伝子改 変マウスを維持・繁殖させるとともに、それらのマウスをかけあわせ、目的の雑種第一代(F1) マウスを2系統作出した。その際には PCR 法を用いた遺伝子型の確認により、それぞれの性質が 適切に F1 マウスに引き継がれていることを確認した。さらに、K8-Brainbow F1 雌マウスについ て、タモキシフェン投与量の検討を行った。

令和元年度に決定した条件でタモキシフェンを投与したマウスに対し、0~2 Gy の範囲から選 んだ線量で放射線を照射し、摘出した乳腺において、蛍光タンパク質を発現する細胞の動態を計 測した。7 週齢 K14-tdTomato F1 雌マウスに 25 g 体重あたり 1.5 mg のタモキシフェンを腹腔投 与したのち、2 Gy 照射し、12 週間経過後のマウス乳腺では、非照射群に比べ、蛍光たんぱく質を 発現する細胞集団(クローンサイズ)が有意に減少することを見出した。

令和元年度に構築した2次元格子空間上のシミュレーションモデルに対して放射線被ばくの効 果を適用し、MCMC法等を用いて細胞系譜追跡データにフィッティングさせることにより、細胞動 態パラメータを推定した。また、パラメータ推定値の検証のため、既知の細胞培養実験等との比 較を行った。

実施項目1で得られた成果のうち、非照射群において、細胞系譜追跡データとのフィッティン グにより、11から15週齢と15から19週齢では組織のターンオーバー率が約1/4に減少するこ とが示唆された。また、放射線照射によって起こる組織内での平均クローンサイズの減少は、細 胞の分裂停止と組織外からの細胞の流入によって説明できた。加齢とともにターンオーバー率が 減少することと、放射線照射による細胞の分裂停止について、既存の報告と合致することを確か めた。

【令和3年度の見通し】

令和2年度は細胞系譜追跡実験系の確立とその実験系における放射線照射の影響について検討 するとともに、被ばくの効果を適用した数理モデル解析を行った。令和3年度はK14-tdTomatoに おける解析をさらに進めるとともに、基底細胞ではなく、内腔細胞を追跡するK8-Brainbowマウ スを用いた被ばくによる幹細胞動態解析を進める予定である。数理モデル解析では、令和2年度 の成果をもとに、様々な線量で照射後に幹細胞クローンが時間とともに選択されていき、集団と して広がっていく様子を調べる予定である。最後には低線量領域で照射線量に依存して発がんが 進んでいくかどうかの理論的示唆を与える予定である。 1. はじめに

平成23年3月11日に発生した東北地方太平洋沖地震による地震・津波の影響により、IF事故 が起こって、令和3年3月で10年が経過した。10年経った今も、帰還困難区域が設定され、多 くの人が戻れずにいる。幸いなことに、一般住民に障害が現れるような被ばくは起こらなかった と結論付けられている[2]。一方で、廃炉に向けた作業は未だ道半ばであり、今後数十年かかるも のと推測される。その中で、すべてがロボットでの作業で対応ができず、ヒトによる高線量下で の作業が必要なケースも生じる可能性が高い。そのため、作業者にはこれらの作業による健康障 害についての懸念がつきまとう。この健康障害でもっとも懸念されるのが発がんである。現在の 放射線防護では、がんリスクについては、直線しきい値なし仮説が採用されており、ごく微量な 被ばくでもその発がんリスクが上昇するという考えが採用されている。低線量被ばくの発がんり スク解明については、疫学でのアプローチも行われているが、実験動物を用いた研究が不可欠で ある。

放射線発がんのメカニズムについて、大きく2つの考え方に基づく議論が行われている。一方 は放射線発がん特有の遺伝子変異が引き起こされる考え方である。他方は、自然発生がんの発生 を早めるだけであり、放射線被ばく特有の傷はないという考え方である。後者は Vogelstein らが 古くから提唱しているがんの多段階発がんにおいて、放射線は1つのステップでしかないことを 意味している[3]。

その答えを得るために放射線の痕跡(Radiation Signatures)の探索が多くの研究グループに より行われ、胸腺リンパ腫のIkaros遺伝子、甲状腺がんのCLIP2遺伝子などが発見された[4][5]。 一方で、その他の乳がんを含む多くの腫瘍ではRadiation Signaturesは見つかっていない。しか しながら、それらの腫瘍でも放射線被ばくによる発生率の増加や、がんの増殖速度の増加が観察 され、ゲノムの異常では規定されない、放射線発がん特有のイベントが起こっていることが示唆 される。特に低線量被ばくでは高線量に比べ、引き起こされる DNA 損傷量が少ないため、相対的 にゲノム変異をきっかけとするよりもがんの起源細胞の動態への影響の寄与が大きいものと考え られる。

近年、発がん起源細胞としての組織幹細胞の重要性が提唱されている。組織幹細胞は、それ自 身のターンオーバーが遅く、遺伝子変異が蓄積しやすいことから、重要な発がんの起源細胞であ る。がん化の初期過程ではある種の変異を持った幹細胞やその子孫細胞がクローン性に増殖する とされている。Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection[13]において、幹細胞生物学の研究推進によって低線量・低線量率放射線発がんリス クの外挿に有用な知見が得られる可能性について言及していることからも、その重要性がわかる。

近年、空間的な幹細胞の動態を捉える手法として、細胞系譜追跡技術が開発された。細胞系譜 追跡解析とはある細胞を標識し、その子孫細胞をマウス体内で追跡する実験手法であり(図1-1)、 幹細胞の増殖速度、自己複製能、細胞競合ならびにクローン性増殖などの幹細胞の動態研究に広 く用いられている。さらに細胞系譜追跡技術を用いた組織幹細胞の生体内での動態データを数理 学的に解析する研究は腸管組織・造血組織で近年行われ注目されている[6][7]。



について(模式図)

### 【目的】

本研究では「遺伝子変異ではなく、幹細胞の動態(数的、質的変化とそれに続くクローン性 増殖)で低線量放射線発がんを特徴付けられないか」という仮説のもと、その最初の取り組み として細胞系譜追跡技術を用い、放射線発がんリスクの最も高い臓器の1つである乳腺に関し、 高線量~低線量放射線被ばく後の乳腺組織において、細胞の長期にわたるクローン性増殖を捉 えそれを数理モデル解析組み合わせることにより、被ばくした幹細胞の動態で低線量放射線誘 発乳がんを特徴付けることを目的としている(図1-2)。



図 1-2:本研究の目的

組織内での細胞数の変化を細胞分裂・細胞死・分化の積み重ねとして数理的に記述し、イメ ージング解析による定量的データにフィッティングすることによって、分裂速度・死亡率・分 化率といった組織内細胞動態を支配するパラメータの推定を行う。低線量被ばくの条件による 動態パラメータの比較を行い、低線量被ばくによる影響を定量的に示す。 本研究の最終目標は、未だ見つかっていない「放射線の痕跡」を幹細胞動態で特徴付けるこ とのできる新規評価系の開発とそれを用いた低線量被ばくによる発がんリスク評価体系のさら なる合理化である。

- 2. 業務計画
- 2.1 全体計画
  - 2.1.1 計画内容

本研究のタイムスケジュールを表 2-1 に示す。

題目 「幹細胞動態により放射	線発がんを特徴付ける新	たな評価系の構築」	年度別全体計画
項目	令和元年度	令和2年度	令和3年度
<ul> <li>(1)細胞系譜追跡技術を用いた低線</li> <li>量被ばく後の幹細胞動態解析</li> <li>①細胞系譜追跡実験系の構築</li> </ul>	解析系の立ち上げ	解析系の立ち上げ	解析系の精緻化及び評価まとめ
②細胞系譜追跡実験系を用いた 被ばくによる幹細胞動態解析		データ収集	データ収集及び評価まとめ
<ul> <li>(2)数理モデルによる幹細胞の動態</li> <li>解析</li> <li>(東京大学)</li> </ul>			
① 2次元空間構造を含む乳腺組 織動態の数理モデル構築	数理モデル構築 ◀   ▶		
②被ばく有無の実験データに基 づいた動態バラメータの推定	•	動態パラメーター推定	
③推定バラメータを用いた発が ん過程の解析			推定バラメーターによる 発がん過程解析
(3)研究推進	研究推進会議の開催	研究推進会議の開催	研究推進会議の開催
	まとめ・評価	まとめ・	評価 まとめ・評1

表 2-1:本研究のタイムスケジュール

最終的な研究目的は、未だ見つかっていない「放射線の痕跡」を幹細胞動態で特徴付ける ことのできる新規評価系の開発とそれを用いた低線量被ばくによる発がんリスク評価体系の さらなる合理化である。

なお、動物実験は量研機構動物実験委員会により安全面及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。

- (1) 細胞系譜追跡技術を用いた低線量被ばく後の幹細胞動態解析(量研機構)
  - 細胞系譜追跡実験系の構築

量研機構放射線医学総合研究所の動物実験施設で維持されている、幹細胞で主に発現す る遺伝子のプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼが組み込まれた遺伝子改変マウスと、 Cre リコンビナーゼが働くと蛍光タンパク質を発現するようになる遺伝子改変マウスをか けあわせ、目的の F1 マウスを作出する。その際には PCR 法を用いた遺伝子型の確認によ り、それぞれの性質が適切に F1 マウスに引き継がれていることを確認する。

目的の F1 マウスは通常飼育下では、Cre リコンビナーゼが機能しない。タモキシフェン と呼ばれる薬剤を個体に投与することにより Cre リコンビナーゼが初めて機能を発揮する (図 3-2)。予備的検討としてこのタモキシフェン投与量と投与時期について、それぞれ至 適な条件を投与したマウス個体から得られる乳腺などの組織を用い、病理組織学的解析や フローサイトメトリー法などにより決定する。

② 細胞系譜追跡実験系を用いた被ばくによる幹細胞動態解析

①で決定した条件でタモキシフェンを投与したマウスに対し、0~2 Gy の放射線を照射 し、経時的に乳腺を摘出し、病理組織学的観察やフローサイトメトリー法などで蛍光タン パク質を発現する細胞の空間的な配置(乳管は2種類の上皮細胞から構築されるので、そ のどちらなのか)に加え、蛍光タンパク質を発現する細胞集団のクローンサイズを計測し、 さらにそれらの細胞数を把握する。これらの実験において、放射線の顕著な影響が捉えら れない可能性も否定できないため、その場合は、必要に応じて化学発がん物質による乳腺 発がんモデルでも同様の実験を行うことにより、得られたデータの相違や実験系の妥当性 を検証する。

③ まとめ

すべての実施項目で得た、画像データ解析と数理モデル解析の結果を統合し、幹細胞動 態と発がんとの関連を評価する。

(2) 数理モデルを用いた低線量被ばく後の幹細胞動態解析(東京大学)

2次元空間構造を含む乳腺組織動態の数理モデル構築

最初に本事業で必要とされる解析環境の整備を行う。実験項目1 で取得する細胞系譜追 跡データに合わせるように、幹細胞クローンの系譜をそれぞれ区別できるようにして、2 次 元格子空間上で分裂・死亡・分化を繰り返す乳腺組織をコンピュータ上に再現する。組織 内の細胞の種類や空間上の配置は既存の知見とイメージングデータに基づく。

② 被ばく有無の実験データに基づいた動態パラメータの推定

①で構築した2次元格子空間上のシミュレーションモデルに対して放射線被ばくの効果 を含める。被ばくは主に分裂・死亡・分化という細胞動態パラメータに影響を与えると仮 定し、細胞系譜追跡データによる細胞数やクローン数の変化にフィッティングさせること で細胞動態パラメータを推定する。推定方法は繰り返しシミュレーション解析による細胞 動態の計算方法と相性の良い MCMC 法を想定している。照射線量に依存する形で推定された 動態パラメータが既知の細胞培養実験等で得られる結果と比較することによって、推定値 の検証を行う。放射線被ばくの効果がサイトカインの産出等の細胞動態以外にも関わるこ とも想定しておく。 ③ 推定パラメータを用いた発がん過程の解析

推定された細胞動態パラメータを用いたシミュレーション解析によって、幹細胞クローンが時間とともに選択されていき、集団として広がっていく様子を調べる。低線量領域で 照射線量に依存して発がんが進んでいくかどうか理論的示唆を与える。

2.1.2 実施体制図

本研究の実施体制図を図 2-1 に示す。



図 2-1: 実施体制図

2.2 令和2年度の成果の目標及び業務の実施方法

令和2年度の成果の目標及び業務の実施方法については、以下の通りである。

- (1) 細胞系譜追跡技術を用いた低線量被ばく後の幹細胞動態解析
  - 細胞系譜追跡実験系の構築

令和元年度に引き続き、遺伝子改変マウスを維持し、それらのマウスをかけあわせ、目 的の F1 マウスを作出する。また、PCR 法を用い、遺伝子型を適宜確認する。

タモキシフェン投与量と投与時期について、それぞれ至適な条件を、投与したマウス個 体から得られる乳腺等の組織を用い、病理組織学的解析やフローサイトメトリー法等によ り検討する。

② 細胞系譜追跡実験系を用いた被ばくによる幹細胞動態解析

①で検討した条件でタモキシフェンを投与したマウスに対し、0~2 Gy の範囲から選ん だ線量で放射線を照射し、摘出した乳腺において、蛍光タンパク質を発現する細胞の動態 を計測する。放射線の顕著な影響が捉えられない場合は、必要に応じて、比較のための化 学発がん物質等による乳腺発がんモデルで同様の実験を行う。

- (2) 数理モデルによる幹細胞の動態解析(再委託先:東京大学)
  - ① 被ばく有無の実験データに基づいた動態パラメータの推定

令和元年度に構築した 2 次元格子空間上のシミュレーションモデルに対して放射線被ば くの効果を適用し、MCMC 法等を用いて細胞系譜追跡データにフィッティングさせることに より、細胞動態パラメータを推定する。また、パラメータ推定値の検証のため、既知の細 胞培養実験等との比較を行う。

(3) 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間ならびに廃炉環境国際共同研究センター(CLADS)等との 連携を密にして、研究を進める。また、研究実施計画を推進するための打合せや会議等を 開催する。

- 3. 令和2年度の実施内容及び成果
  - 3.1 細胞系譜追跡技術を用いた低線量被ばく後の幹細胞動態解析
    - 3.1.1 細胞系譜追跡実験系の構築
    - (1) 目的

原爆被爆者の疫学調査から、乳腺は最も発がんリスクの高い臓器の1つとして報告されて いる[8]。乳腺は、分岐しながら広がった管状の上皮細胞からなる器官で、母乳を作る能力を 持つ内腔上皮細胞と、それを裏打ちし収縮能力を持つ筋上皮(基底)細胞の、2種類の細胞か らなる(図3-18)。乳腺細胞はもともと出生時には乳腺原基に存在し、思春期まで静止してい る。思春期の女性ホルモンに応答し、乳腺上皮細胞は乳管を構成し、脂肪体に広がっていく (図3-1A)。その端には、非常に増殖性の高い多層の末梢芽状突起があり、脂肪体の中を伸長 していく。成体の未経産マウスの乳腺は、成熟後、必要に応じて妊娠~退縮サイクルが生じ る。



図 3-1:マウス乳腺模式図

細胞系譜追跡は、ある細胞を標識し、その子孫細胞をマウス体内で追跡する実験手法であ る(図1-1)。Creリコンビナーゼ遺伝子を誘導するシステム(Creマウス)と、標識された細 胞を検出するためのレポーター遺伝子を持つマウス(レポーターマウス)を交配して、両者 を持つマウスを作製して利用する。Creリコンビナーゼは特定のDNA 配列である LoxP(Locus of crossing (X) over P、バクテリオファージP1のゲノム中にある 34 塩基)配列を認識し、 2 つの LoxP 配列の間の DNA 配列を切り出す作用を持つ。Creマウスには、特定の細胞で発現 するマーカー遺伝子の転写プロモーターの下流に核内に移行し機能するように改変した CreERT2 リコンビナーゼを組み込んである。実験者が意図したタイミングでタモキシフェン を投与すると、幹細胞でのみ、発現した CreERT2 リコンビナーゼが機能する。細胞系譜追跡 解析では、いったん誘導されると子孫細胞においても発現し続ける、不可逆的なレポーター システムが用いられる。通常は終止コドンで翻訳が終結するため蛍光タンパク質は産生され ないが(図 3-2A)、Cre が働いて終止コドンが除去されると、その細胞及びその全ての子孫細 胞で、蛍光タンパク質が発現する(図 3-2B)。



図 3-2:細胞系譜追跡解析を可能にするタモキシフェンの作用について

本研究の目的は細胞系譜追跡解析実験系に係る遺伝子組換えマウスの維持と実験に用いる F1マウスの作出、そのための遺伝子型の判定と、タモキシフェン投与量や投与時期の検討で ある。

(2) 試験方法

動物実験は量研機構動物実験委員会により安全面及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。

① マウスの維持

本研究で用いる遺伝子組換えマウスは量研機構量子医学医療部門放射線医学総合研究所 低線量影響実験棟 SPF 動物実験施設にて飼育及び繁殖を行った。飼育施設は温度 23 ± 1 ℃、湿度 50 ± 5 %に設定され、12 時間ごとに照明を切り替えた。週1回のケージ交換 を行うとともに、高塩素塩酸水とガンマ線滅菌飼料 MBR-1(船橋ファーム)の自由給水・自 由給餌にて行った。

本研究で用いた遺伝子組み換えマウスは以下の通りである。

・STOCK Tg(KRT14-cre/ERT)20Efu/J(米国ジャクソン研究所、以下同様)

このマウスは、ヒトケラチン14(K14)プロモーターによって駆動されるタモキシフェン誘導性 Cre 媒介組換えシステムを持っている。2種類の乳腺上皮細胞のうち、基底細

### - 31 -

胞で発現する遺伝子である。loxP 配列を持つマウス系統と交配すると、仔マウスを使用 して、タモキシフェン誘発性、Cre 媒介性の K14 活性を持つ細胞で特異的な遺伝子欠失 を引き起こすことができる。

• STOCK Tg(Krt8-cre/ERT2)17B1pn/J

このマウスは、K14マウスと同様に、マウスケラチン8(K8)プロモーターの制御下で Cre-ERT2融合遺伝子を発現する。2種類の乳腺上皮細胞のうち、内腔細胞で発現する遺 伝子である。

• B6. Cg-Gt (ROSA) 26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J

このマウスは、CAG プロモーター駆動型赤色蛍光タンパク質変異体(tdTomato)の転写 を防ぐ loxP 配列に挟まれた STOP カセットを持つように設計された Cre レポーターマウ スであり、Gt (ROSA) 26Sor (Rosa26) 遺伝子座に挿入されている。上記のマウスと交配 して得られるマウスにタモキシフェンを投与すると、基底細胞と内腔細胞の一部で、 tdTomato タンパク質が恒常的に発現する。

• B6. 129P2-Gt (ROSA) 26Sor<sup>tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle</sup>/J

R26R-Confetti コンディショナル対立遺伝子には、tdTomato マウスと同様に CAG プロ モーターとそれに続いて loxP 配列に挟まれた STOP カセットがあり、Brainbow 2.1 コン ストラクトは Rosa26 遺伝子座に挿入されている。R26R-Confetti 対立遺伝子は、単一の ゲノム遺伝子座からの複数の蛍光タンパク質(核に局在する緑色蛍光タンパク質(GFP)、 細胞質黄色蛍光タンパク質(YFP)、細胞質の赤色蛍光タンパク質(RFP)、膜結合シアン 蛍光タンパク質(mCFP))のうち、確率的に1つ発現するように設計されている。

これらのマウスはそれぞれのマウス系統で維持するとともに、以下の実験では、STOCK Tg(KRT14-cre/ERT)20Efu/JとB6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>/JのF1雌マウス(K14tdTomatoマウス)と、STOCK Tg(Krt8-cre/ERT2)17B1pn/JとB6.129P2-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle</sup>/JのF1雌マウス(K8-Brainbowマウス)を作出した。適宜、以下の方法で遺伝 子型の判定を行った。

- ② 遺伝子型の判定
- 遺伝子型を判定するマウスについては、令和元年度同様に行った。マウスが3週齢 になり離乳する時のケージ分けの際に、個体識別のための耳パンチで得られた組織を 主に用いた。DNAの抽出は Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (プロメガ株式 会社)もしくは以下の方法で採取した。

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (pH 8.0)、0.1 % Sodium Dodecyl Sulfate から構成される Lysis buffer 100 µl に前 述の組織を加え、95 ℃、10 分加温した。そこに 2 µl Proteinase K を添加し、55 ℃、 60 分反応させ、さらに 95 ℃、10 分加温した。その後、DNA を TE (Tris-EDTA) バッフ ァーに希釈した。 前述の希釈した DNA と KAPA2G Fast PCR Kit (日本ジェネティクス株式会社)を用い、表 3-1の組成で、Veriti (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)にて PCR 反応を行った。

PCR mixture	l sample (µl)
5×Buffer	5
$25 \text{ mM MgC}1_2$	2.5
10 mM dNTP	0.65
10 µM Primer Mix (і)	1.25
KapaHS Taq	0.15
DDW	14.45
TOTAL	24

表 3-1: PCR 反応液の組成(1 サンプルあたり)

表 3-2: 各マウスの PCR に用いるプライマー一覧

tdTomato マウス

プライマーNo.	配列(5'から3'方向)	
oIMR9020	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	
oIMR9021	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC	
oIMR9103	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	
oIMR9105	CTGTTCCTGTACGGCATGG	
Brainbow マウス		
11341	GAATTAATTCCGGTATAACTTCG	
oIMR8545	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	
oIMR8916	CCAGATGACTACCTATCCTC	
K8 マウス		
oIMR1084	GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC	
oIMR1085	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT	
oIMR7338	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	
oIMR7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	
K14 マウス		
24964	CGCATCCCTTTCCAATTTAC	
oIMR1374	GGGTCCATGGTGATACAAGG	
oIMR7338	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	
oIMR7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	

 <sup>(※)</sup> プライマーはマウス系統ごとに表 3-2 のプライマー10 µM を含む Primer Mix を作成し、使用した。

Veritiサーマルサイクラーでは表 3-3の温度設定で PCR 反応を行った。

温度	時間(サイクル数)	
94 °C	2 min	
94 °C	20 sec	
65 °C	15 sec(-0.5 $^{\circ}$ C per cycle decrease)	10 cycles
68 °C	10 sec	
94 °C	15 sec	
60 °C	15 sec	28 cycles
72 °C	10 sec	
72 °C	2 min	
10 °C	hold	

表 3-3: PCR 反応条件の詳細

リアルタイム PCR は Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社)を用い、表 3-4の組成 で LightCycler®96 (ロシュ・ダイアグノスティック株式会社)を用い実施した。事前に 抽出した DNA は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ株式会社)を用い て精製し、DNA 濃度を NanoDrop One (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) にて測定し、あらかじめ 5 µl あたり 100 ng になるように調整した。

表 3-4: リアルタイム PCR 反応液の組成(1 サンプルあたり)

PCR mixture	1 sample (µl)
10 μM oIMR1084	0.08
10 μM oIMR1085	0.08
10 μM oIMR1544	0.08
10 μM oIMR3580	0.08
PrimeTime1 (🔆1)	0.03
PrimeTime2 (🔆2)	0.03
Premix Ex Taq	10.00
DDW	4.62
TOTAL	15.00

(※1) PrimeTime qPCR Probes1 : FAM- AAA CAT GCT TCA TCG TCG GTC CGG-BHQ1
 (※2) PrimeTime qPCR Probes2 : Cy5- CCA ATG GTC GGG CAC TGC TCA A-BHQ2
 どちらも Integrated DNA Technologies 株式会社にて合成したものを使用した。

上記の mixture と 5 µl あたり 100 ng の DNA を混ぜ、表 3-5 の条件でリアルタイム PCR を行った。

温度	時間(サイクル数)	
95 ℃	30 sec	
95 ℃	5 sec	45avalos
60 °C	30 sec	40090188

表 3-5: リアルタイム PCR 反応条件の詳細

得られたデータを LightCycler®96 にて解析し、内部標準である Cy5 と目的のトランス ジーンの FAM の Cq (Quantification cycle) 値を求め、 $\Delta \Delta$ Ct 法で発現量を算出し、ホ モかヘテロかを判定した。

③ タモキシフェン投与

タモキシフェン溶液は1~20 mg/ml で調整した。タモキシフェン(シグマ株式会社)に エタノール(富士フイルム和光純薬株式会社)をピーナッツ油に対し1:39 添加し、ボルテ ックスにて撹拌後、あらかじめ加温したピーナッツ油(シグマ株式会社)を加え、溶ける まで撹拌した。

投与するマウスはあらかじめ当日までに体重を測定しておき、マウス体重 25 g あたり 0 から 4.5 mg の濃度で、マウスが 4 週齢または 7 週齢で腹腔内投与した。タモキシフェンは 体内で 4 ヒドロキシタモキシフェンに代謝されるため、投与後は 1 週間、ディスポーザブ ルケージ (イノケージ、オリエンタル技研工業株式会社)で飼育したのち、通常のケージ に戻した。使用したディスポーザブルケージは実施機関の廃棄区分に従って廃棄した。

④ 組織採取

タモキシフェンを投与し、一定期間の後、マウス個体から乳腺組織を採取した。その後、 組織学的な観察では10%ホルマリン溶液にて1時間処理し、組織を固定した。

⑤ 乳腺の内在性蛍光タンパク質検出

マウス体内で生じた蛍光タンパク質を検出する実験では、乳腺組織固定後、リン酸緩衝液 (PBS) で 10 分間 3 回洗浄したのち、DAPI (サーモフィッシャーサイエンティフィック 株式会社) にて 4 ℃で一晩反応させた。PBS にて 10 分間 3 回洗浄したのち、以下の組織透 明化処理を Rios らの方法に従って行った[9]。組織透明化は FUnGI クリアリング溶液 (50 % グリセロール (vol/vol)、2.5 M フルクトース、2.5 M 尿素、10.6 mM Tris Base、1 mM EDTA) を次のように段階的に調製して行った:フルクトース 100 g を 23.3 ml Tris-EDTA pH 8.0 (100 mM Tris Base、10 mM EDTA (シグマ株式会社)) 及び 110 ml のグリセロール に室温で溶解した。続いて、33.1 g の尿素を加え、溶液が均一になるまで室温で攪拌した。

組織標本の透明化処理は、固定組織サンプルを15 ml コニカルチューブに入れた50 µg/ml アスコルビン酸、0.05 ng/ml L-グルタチオンを含む FUnGI クリアリング溶液に添加し、 4 ℃で一晩以上(暗所で)反応させた。

透明化した乳腺組織は FUnGI クリアリング溶液とともに封入した (See Through Chamber、 富士フイルム和光純薬株式会社)。画像は IX-83 共焦点顕微鏡システム (オリンパス株式会 社) で取得した。 取得した画像から、クローン拡大を評価するために、画像解析ソフト Imaris (Bitplane AG)を用いて、Surface と呼ばれる解析法で、tdTomato に由来する赤色光における表面積 もしくは体積を算出した。

(3) 試験結果及び考察

3.1.1(2)①で述べたように、本研究では令和元年度に引き続き、K14-tdTomato 雌マウス と K8-Brainbow 雌マウスを作出するために、それぞれの遺伝子改変マウスを維持した。具 体的には、STOCK Tg(KRT14-cre/ERT) 20Efu/J、B6. Cg-Gt(ROSA) 26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J、STOCK Tg(Krt8-cre/ERT2) 17B1pn/J、B6. 129P2-Gt(ROSA) 26Sor<sup>tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle</sup>/Jの4系統につい て、それぞれ8週齢以降で兄妹交配を行い、得られた仔マウスについて、前述の方法で遺 伝子型判定を行った。その一例を以下に示す。



図 3-3:遺伝子型判定結果(一例)

図 3-3 では B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J 系統ならびに B6.129P2-Gt (ROSA) 26Sor<sup>tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle</sup>/J 系統の遺伝子型の判定を行っており、拡大した部分には 後者の系統の遺伝子型判定結果を示した。図中に示すように、野生型マウスでは PCR で増 幅される遺伝子断片が 386 bp となるが、ヘテロマウスでは野生型の遺伝子断片の 386 bp に加え、変異型の遺伝子断片の 300 bp も同時に検出される。これは、片親から変異した遺 伝子を引き継ぎ、もう片親からは正常の遺伝子を引き継ぐことに寄る。ホモマウスでは正 常の遺伝子が存在しないので、変異型の遺伝子断片のみ検出されている。 令和元年度の報告書[14]でも述べたように、STOCK Tg(KRT14-cre/ERT)20Efu/Jならびに STOCK Tg(Krt8-cre/ERT2)17B1pn/Jマウスについては、前述のアガロースゲル電気泳動に よる遺伝子型の判定では、野生型かどうかの判定は可能であるが、ヘテロマウスかホモマ ウスかの判定は不可能である。そのため、必要に応じて野生型をアガロースゲル電気泳動 で判定し、その後、定量 PCR による遺伝子型の判定を行った。一例を以下に示す。



図 3-4: リアルタイム PCR を用いた遺伝子型判定結果(一例)

図 3-4 左はLightCycler®96 での解析結果である。2 サンプルについて、目的のノックイ ンアリルと野生型のアリルの増幅曲線をそれぞれ示している。令和元年度の報告書[14]で 詳細を述べたように、定量 PCR は、サイクルごとにその遺伝子量を蛍光量としてモニタリ ングすることで検出する方法である。ノックインアリルを Fluorescein Phosphoramidite (FAM) 結合プローブ、野生型のアリルを Cyanine 5 (Cy5) 結合プローブで PCR 反応により 増幅させ、それぞれの蛍光量をモニターする。ノックインアリルが1本 (ヘテロ)に比べ、 2本(ホモ)の場合は、元の DNA 配列が2倍存在するために、PCR サイクルがより少ない段 階で蛍光量の増加が観察される(増幅曲線は左にシフトする)。野生型のアリルはホモ・ヘ テロどちらでも同じ増幅曲線であるが、ノックインアリルは黄色で示されるサンプルはホ モであり、橙色はヘテロである。この曲線から Cq 値が得られるため、それをもとに解析し た結果を右のグラフに示す。陽性対照のホモとヘテロの結果をもとに、判定するマウスの 結果を照らし合わせた。

本研究に用いる K14-tdTomato 雌マウスと K8-Brainbow 雌マウスは、それぞれ STOCK Tg(KRT14-cre/ERT)20Efu/J 雌マウスと、B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J 雄マウス及 び、STOCK Tg(Krt8-cre/ERT2)17B1pn/J 雄マウスと、B6.129P2-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle</sup>/J 雌マウスをかけあわせることで作出した。すべての親マウスはホモマウスを

3.1-8

用いたため、生まれた仔マウスは理論上、すべてがヘテロとなるが、確認のために、同様 に PCR により遺伝子型の判定を行った(図 3-5)。

実際の結果(一例)	
2010 10 13 000 0974住 PC民務果	21
$\begin{array}{cccc} FAA3 Dealed sub r C3 Bards arms \\ Fabra res (a) \\ \hline \\ Fabra res (b) \\ \hline \\ \hline \\ Fabra res (b) \\ \hline \\ $	DB0107       SVAN D5 hum Ha hum CN Lia uni entry.       Damage     NL3-20003       Damagee     NL3-20003       Damagee
$\frac{100}{1000} = \frac{1000}{10000} = \frac{10000}{10000} = \frac{10000}{100000} = \frac{10000}{1000000000000000000000000000000$	TTC index TRC index TC index TC index M R7 R3 R2 R5
	Na Kill 建石子座 M 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 hetero wt

図 3-5:解析用 F1 マウスの遺伝子型判定結果(一例)

次に作出したマウスを用いて、令和元年度に引き続きタモキシフェン投与量や投与時期 等について検討を行った。K14-tdTomato 雌マウスについては、文献[10]と令和元年度の検 討結果から、タモキシフェン量は体重 25 g あたり 1.5 mg を本研究での指摘濃度とした。 K8-Brainbow 雌マウスについての検討を以下に示す。具体的には約 7 週齢の K8-Brainbow 雌マウスに対し、あらかじめ体重を測定しておき、25 g あたり 0.2 mg または 1.5 mg を腹 腔内投与した。3 日目に解剖し、乳腺を採取した。ホルマリン固定後、核を DAPI 染色し、 組織透明化を行い、共焦点顕微鏡にて観察を行った。その結果、K14-tdTomato 雌マウスの 指摘濃度の体重 25 g あたり 1.5 mg では、多くの上皮細胞で蛍光タンパク質が発現してい た。一方で 0.2 mg では 1 視野で 1 個程度の蛍光タンパク質を発現する細胞が観察された (図 3-6)。これらのことから、K8-Brainbow 雌マウスでは体重 25 g あたり 0.2 mg を本研 究での指摘濃度とすることとした。



K8-Brainbowタモキシフェン1.5mg投与後3日

図 3-6: K8-Brainbow マウスにおけるタモキシフェン濃度検討

(4) まとめ

2 種類の F1 マウスのうち、K8-Brainbow F1 雌マウスについて、タモキシフェン投与量の 検討を行った。その結果、体重 25 g あたり 0.2 mg が本マウスにおけるタモキシフェン指 摘濃度であることが明らかとなった。 3.1.2 細胞系譜追跡実験系を用いた被ばくによる幹細胞動態解析

(1) 目的

3.1.1 及び令和元年度までに検討したタモキシフェン投与量と投与時期を用い、0~2 Gy の 範囲から選んだ線量で放射線を照射し、摘出した乳腺において、蛍光タンパク質を発現する 細胞の動態を計測する。

(2) 試験方法

試験方法のうち、マウスの維持、遺伝子型判定、タモキシフェン投与、組織採取及び乳腺の内在性蛍光タンパク質及び蛍光免疫染色については、3.1.1 で述べたとおりである。

① 放射線照射

タモキシフェンを投与した翌日に、ガンマ線照射を行った。専用の照射容器にマウスを 入れ、ガンマセル(<sup>137</sup>Cs線源、Gammacel1®40、Nordion)にて、2 Gy までの線量を照射した (図 3-7)。非照射群は照射群と同様に照射容器に入れ、飼育ケージに戻した。



図 3-7:ガンマ線照射装置(ガンマセル)

(3) 試験結果及び考察

次にタモキシフェンを投与したマウスに対し、0~2 Gy の範囲から選んだ線量で放射線を 照射し、摘出した乳腺において、蛍光タンパク質を発現する細胞の動態を計測した。7 週齢の K14-tdTomato 雌マウスに対し、あらかじめ体重を測定しておき、25 g あたり 1.5 mg を腹腔 内投与した。投与翌日に、ガンマセルにてガンマ線を 0.1 Gy または 2 Gy 照射し、飼育を継 続した。照射後、4 週、8 週、12 週(マウスはそれぞれ 11 週齢、15 週齢、19 週齢となる時) で解剖し、乳腺を採取した。ホルマリン固定後、核を DAPI 染色し、組織透明化を行い、共焦 点顕微鏡にて観察を行った。

その結果、非照射群はタモキシフェン投与後、8 週から12 週にかけては、あまり変化の程度は大きくないが、時間とともに赤色蛍光タンパク質を発現する細胞集団(クローン)が拡大していることがわかる。一方で、2 Gy 被ばく群では、タモキシフェン投与後8週までは非照射群同様にクローン拡大が観察されたが、12 週ではクローンが縮小していることが見いだされた(図 3-8、いずれも破線で囲まれた領域)。



DAPIで染まる領域が乳管 (白で縁取り)

> 図 3-8: K14-tdTomatoマウスを用いた非照射群(上段)と 2 Gy 被ばく群(下段)におけるクローンサイズの変化(典型例)

得られた画像について、3 次元画像解析ソフト Imaris により赤色蛍光シグナルを定量化した。赤色蛍光シグナルについて、今回は表面積を算出した。図 3-9 では実際に定量化した例を示す。図の右側の画像には、赤色蛍光シグナルをソフトウエアで認識させたエリアを矢印で表しており、その数値化の結果が図の左側に示されている(赤線)。

画像データの数値化(Imaris software, Bitplane AG) Zスタック画像を用い、蛍光シグナルの表面積を算出



蛍光シグナルの表面積を算出し、箱ひげ図としてプロットしたものを図 3-10 に示す。各線 量、各サンプリング週において、それぞれ 2 匹のマウスを用い、両側の第 3 乳腺(合計 4 乳 腺)で最低でも 10 か所の画像をランダムに採取し、解析した。箱ひげ図は、最小値、第 1 四 分位点、中央値、第 3 四分位点、最大値を用いて、サンプルのバラツキをわかりやすく表示 することができるグラフである。各グラフ上方に丸で示されるのははずれ値である。また、 統計解析は SPSS (IBM)を用い、Kruskal-wallis検定にて行った。P<0.05を有意(\*)とし、 図 3-10 中に示した。図 3-10 からもわかるように、図 3-10 の 1 左の非照射群の時間経過で は、タモキシフェン投与後 8 週から 12 週にかけてはその変化量は小さくなっているが、時間 とともにクローンが拡大していることがわかる。2 Gy 被ばく群では、タモキシフェン投与後 8 週までは非照射群と同様にクローンが拡大していた。それが 12 週になると、クローンが有 意に縮小していることがわかる。0.1 Gy 被ばく群ではタモキシフェン投与後 4 週から 8 週に かけて減少しているが、大きくは変化していない。

同じ解析結果をタイムポイントごとに示したのが図 3-10 の 2 である。タモキシフェン投与後 4 週では 0.1 Gy 被ばく群のみ有意にクローンが拡大していた。8 週では顕著ではなく、12 週になると、非照射群に比べ、2 Gy 被ばく群で有意にクローンが縮小していた。

0.1 Gy については、タモキシフェン投与後4週で他の群に比べ、有意にクローンが拡大していたが、マウスの個体差に依存する可能性もあり、現在、詳細な解析を進めているところである。タモキシフェン投与後12週では、非照射群に比べ、有意ではないものの、減少傾向にあった。長期的には非照射群との違いが現れるのか、現在、検討を進めている。

令和2年度タモキシフェン投与条件を決定した K8-Brainbow マウスについては、現在、放 射線被ばく後の動態を検討しているところである。



(1)線量ごとの時間的変化(2)時間ごとの線量依存性 \*は P<0.05 を示す。

(4) まとめ

7 週齢 K14-tdTomato F1 雌マウスにタモキシフェンを投与後、2 Gy 照射し、12 週間経過後のマウス乳腺では、非照射群に比べ、蛍光たんぱく質を発現する細胞集団(クローンサイズ) が有意に減少することを見出した。 3.2 数理モデルによる幹細胞の動態解析(再委託先:東京大学)

- 3.2.1 被ばく有無の実験データに基づいた動態パラメータの推定
- (1) 目的

令和元年度に構築した2次元格子空間のシミュレーションモデルを用い、マウス実験デー タを再現できる細胞動態パラメータの推定を行う。

- (2) 試験方法
- ・シミュレーションアルゴリズム

令和元年度に構築した 2 次元格子空間のシミュレーションモデルを改めて説明する。シ ミュレーションモデルは乳腺組織のイメージデータを想定して、50 細胞×100 細胞の 2 次 元格子空間構造になっており、上下を周期境界条件にすることによって管の特性を考慮し ている。シミュレーションアルゴリズムは、空間上に配置された細胞の中で、確率的に死 亡する細胞が選ばれ、その後近接する細胞が分裂して、細胞の入れ替わりが起こるとして いる。この細胞の入れ替わりを 1 単位時間として組織の細胞が入れ替わり、クローン頻度 が移り変わっていく様子を記録する。

50 細胞×100 細胞の 2 次元格子空間上に 5000 細胞を仮想的に配置し、それぞれ異なるクローン番号を付与する。擬似乱数によって死亡する細胞を決定し、(*j、k*) という空間に存在する細胞が死亡すると選ばれた場合、そのノイマン近傍の(*j+1、k*)、(*j-1、k*)、(*j、k+1*)、(*j、k-1*)の 4 地点から分裂し穴埋めをする細胞が選ばれるとしている。*j* 方向に関して

は、周期境界条件を仮定しており、*j*-0、 *j*-49 の細胞が死亡に選ばれた場合、それぞれ、 *j*-49、 *j*-0 の空間に存在する細胞も分裂候補になる。一方、*k*方向に関しては、吸収境界 条件を仮定しており、*k*=0、*k*=99 の細胞が死亡に選ばれた場合、3 近傍から細胞が分裂して 穴埋めをすることになる。細胞の選ばれやすさは、乳腺上皮細胞と前駆細胞で*s*倍異なる と仮定しており、例として、(*j*, *k*)の近傍の細胞が乳腺上皮細胞1つ、前駆細胞3つの場 合、乳腺上皮細胞が選ばれる確率は1/(1+3*s*)と表される。分裂する細胞を選ぶ際にも新た に擬似乱数を用いる。このように、死亡する細胞と分裂する細胞を確率的に選び、細胞の 入れ替えを行う。これがシミュレーション上での1ステップになる。この手法は集団遺伝 学で使われる Moran モデルに空間構造を含めたアルゴリズムになっている。シミュレーシ ョンで組織中の細胞すべてが入れ替わるステップ数の期待値である 5000 ステップが、現実 での組織細胞の入れ替わりにかかる時間に相当する。細胞の入れ替わりを実行しながら、 常に細胞のクローン番号の消失や広がりを追跡することによって、空間上でのクローン頻 度が時間とともに変化する様子を調べることができる。

・モデルパラメータ推定

上のシミュレーションモデルに対して、放射線照射を実施した群と実施していない群の 細胞系譜追跡実験による細胞クローンサイズの変動データ(図3-10)を用い、データにフ ィッティングさせることで細胞動態パラメータを推定した。また、推定された動態パラメ ータの検証のため、既知の細胞培養実験等で得られる結果との比較を行なった。

(3) 試験結果及び考察

シミュレーションアルゴリズムを実行することによって、仮想的な乳腺組織における平均 クローンサイズの変化を調べた。ここでクローンサイズとは、時刻0における細胞をそれぞ れ別のクローンとして識別し、それぞれの細胞由来の細胞群の大きさとする。すなわち、1つ の細胞由来の細胞群の数が0になるとクローンの数が減り、他のクローンサイズが大きくなる。また、平均クローンサイズとは、組織内におけるクローンサイズをクローン数で割った 指標とする(図 3-11)。



図 3-11: 平均クローンサイズの概念

例えば、図 3-11 では、組織中に青で表された細胞群と橙で表された細胞群の2つのクローンが存在している時、平均クローンサイズは青のクローンサイズと橙のクローンサイズを加え2で割った値になる。シミュレーションの結果、放射線効果を含まない細胞の入れ替わりの条件では、時間と共に平均クローンサイズが増加することがわかった(図 3-12)。



図 3-12: 平均クローンサイズの変化

さらに、時刻 0 における細胞を全て別のクローンとするのではなく、組織内のクローン数 (クローン割合: A)を変化させて、クローン割合が多い状態と少ない状態でシミュレーショ ンを始めた場合における、平均クローンサイズの増加率を調べた(図 3-12)。クローン割合 (F)はクローン総数を細胞総数で割ったものとする。その結果、初めにクローン割合が多い 時(F=1)、すなわち細胞が全て別のクローンとして識別される時、平均クローンサイズの増 加率が高くなることがわかった(図 3-12 青線)。一方で、クローン割合が少ない時、すなわ ち既に大きなクローンが組織中に存在している時、平均クローンサイズの増加率が小さくなることがわかった(図 3-12 黒線)。



図 3-13:実験データと平均クローンサイズの変化

次に、細胞系譜追跡実験の結果に基づいて実験データを説明するモデルパラメータの推定 を行った。細胞系譜追跡実験のデータ(図 3-10)の取得方法を振り返ると、マウスの性成熟 が終わる7週齢でタモキシフェンを投与し、細胞を識別する。11週齢(以下、4週目)、15週 齢(同8週目)、19週齢(同12週目)に標識された細胞群からクローンサイズのデータを得 る。その結果、放射線照射なしの場合、平均クローンサイズは単調に増加していることが示 された(表 3-6)。また、0.1 Gy、2 Gy 照射の場合、平均クローンサイズが単調ではない振る 舞い(減少後増加または増加後減少)をすることが示された(表 3-6)。

表 3-6:モデルパラメータ推定に使用した平均クローンサイズ変動データまとめ

	放射線照射なし	放射線 0.1Gy	放射線 2Gy
4週	15696.1	63417.0	9281.9
8週	66642.5	30108.8	56871.7
12週	77887.4	34422.7	16372.7

はじめに、放射線照射なしの平均クローンサイズの変動データを説明するパラメータ推定 を行った。実際のフィッティングでは、4週目から8週目に増加した割合(4.25倍)と8週 目から12週目に増加した割合(1.17倍)をデータとして使用した。さらに、図3-12のシミ ュレーション結果によると、平均クローンサイズの増加率はクローン割合の初期値(4週目で の組織中のクローン数)に依存して変わることから、様々なクローン割合を想定して、4.25 倍の平均クローンサイズの増加を実現できる組織細胞のターンオーバー数を推定した(図 3-13、表 3-7)。

> 表 3-7:放射線照射なしデータを説明するクローン割合と ターンオーバー率の組み合わせ

#### 4週目クローン割合 4週から8週のターンオーバー率 8週から12週のターンオーバー率

<i>F</i> =1	1/week	0.25/week
F=0.5	2.25/week	0.5/week
<i>F</i> =0.2	6.75/week	1.5/week

以上の結果から、タモキシフェン投与後4週目のクローン割合が1の場合、4週目から8週 目までの組織ターンオーバー率が週に1回、4週目のクローン割合が0.5の場合、週に2.25 回、0.2の場合、週に6.75回となることがわかった。4週目から8週目までのターンオーバ ー率が決まると、8週目におけるクローン割合も決定されるので、8週目から12週目までの クローンサイズ変化データに基づいて、8週目から12週目までのターンオーバー率も決定さ れる(表 3-7)。ちなみに、ターンオーバー数が週に7回の場合、平均して細胞が1日に1回 分裂していることを意味している。タモキシフェン投与後4週経って全てのクローンが残っ ていること(F=1)は考えにくく、F=0.5やF=0.2におけるターンオーバー率の推定値が実際 の値に近いと考えられる。また、Fの値を1から0.2まで変化させても、4週から8週のター ンオーバー率と8週から12週のターンオーバー率の比が1/5~1/4の狭い領域に収まること がわかった。このことから、組織のターンオーバー率は4週から8週に比べて時間が経った 8週から12週で4倍から5倍遅くなることが示された。このことは乳腺組織の拡大率が4週 目から8週目の方が8週目から12週目よりも大きいというこれまでの知見と一致した[11]。

次に、放射線照射した群の平均クローンサイズ変動データを説明できる細胞動態パラメー タの推定を行った。タモキシフェン投与後4週後から8週後の平均クローンサイズの増加率 は、0.1 Gy 照射の場合0.47倍の減少、2 Gy 照射の場合6.12倍の増加となったことがわかっ た(表3-6)。また、タモキシフェン投与後8週後から12週後は0.1 Gy で1.14倍の増加、2 Gy で0.29倍の減少となったことがわかった(表 3-6)。これまでのシミュレーション結果か ら、単純な細胞の入れ替わりでは平均クローンサイズの減少を説明することができないこと が示されている(図3-12)。そこで、平均クローンサイズの減少を説明できる放射線効果につ いて尤もらしい仮定を見出した。その仮定とは、放射線照射を受けた細胞は一定の確率で細 胞老化様変化を起こすとし[12]、その細胞は分裂が不可能になり、脱落した場合には隣接す る組織から細胞が流入されるというものである。そのシミュレーションの結果、平均クロー ンサイズが減少することを示した(図3-14)。



図 3-14: 放射線照射効果を含めた平均クローンサイズの変化

以上の結果によって、放射線照射によって起こる組織内での平均クローンサイズの減少は、 細胞の分裂停止と組織外からの細胞の流入によって説明できた。

(4) まとめ

3.1.2 (3) で得られた K14-tdTomato F1 雌マウスのクローンサイズの変化のうち、非照射 群において、細胞系譜追跡データとのフィッティングにより、タモキシフェン投与後、4 から 8 週と 8 から 12 週齢では組織のターンオーバー率が約 1/4 に減少することが示唆された。ま た、放射線照射によって起こる組織内での平均クローンサイズの減少は、細胞の分裂停止と 組織外からの細胞の流入によって説明できた。加齢とともにターンオーバー率が減少するこ とと、放射線照射による細胞の分裂停止について、既存の報告と合致することを確かめた。 3.3 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間ならびに CLADS 等との連携を密にして、研究を進めた。また、 研究実施計画を推進するための打合せや会議等を開催した。

・令和2年10月30日(金)
 研究打ち合わせ
 方法:Webex
 参加機関:量研機構放射線医学総合研究所、東京大学

・令和2年12月7日(月)
 研究打ち合わせ
 方法:Webex
 参加機関:量研機構放射線医学総合研究所、東京大学

• 令和3年2月26日(金)
 研究推進会議
 方法:Webex
 参加機関:量研機構放射線医学総合研究所、東京大学

・令和3年3月9日(火)
 情報共有
 方法:メール
 参加機関:量研機構放射線医学総合研究所、CLADS

- 4. 結言
- (1) 細胞系譜追跡技術を用いた低線量被ばく後の幹細胞動態解析
  - 細胞系譜追跡実験系の構築

令和元年度に引き続き、遺伝子改変マウスを維持し、それらのマウスをかけあわせ、目的の F1 マウスを作出した。また、PCR 法を用い、遺伝子型を適宜確認した。タモキシフェン投与量 と投与時期について、それぞれ至適な条件を、投与したマウス個体から得られる乳腺等の組織 を用い、病理組織学的解析やフローサイトメトリー法等により検討した。K8-Brainbow F1 雌マ ウスについて、タモキシフェン投与量の検討を行ったところ、体重 25 g あたり 0.2 mg が本マ ウスにおけるタモキシフェン指摘濃度であることが明らかとなった。

② 細胞系譜追跡実験系を用いた被ばくによる幹細胞動態解析

①で検討した条件でタモキシフェンを投与したマウスに対し、0~2 Gy の範囲から選んだ線 量で放射線を照射し、摘出した乳腺において、蛍光タンパク質を発現する細胞の動態を計測し た。7 週齢 K14-tdTomato F1 雌マウスにタモキシフェンを投与後、2 Gy 照射し、12 週間経過後 のマウス乳腺では、非照射群に比べ、蛍光たんぱく質を発現する細胞集団(クローンサイズ) が有意に減少することを見出した。なお、放射線の影響が捉えられていたため、比較のための 化学発がん物質等による乳腺発がんモデルで同様の実験は実施しなかった。

- (2) 数理モデルによる幹細胞の動態解析(再委託先:東京大学)
  - ① 被ばく有無の実験データに基づいた動態パラメータの推定

令和元年度に構築した 2 次元格子空間上のシミュレーションモデルに対して放射線被ばくの 効果を適用し、MCMC 法等を用いて細胞系譜追跡データにフィッティングさせることにより、細 胞動態パラメータを推定した。また、パラメータ推定値の検証のため、既知の細胞培養実験等 との比較を行った。4(1)②で得られた K14-tdTomato F1 雌マウスのクローンサイズの変化のう ち、非照射群において、細胞系譜追跡データとのフィッティングにより、タモキシフェン投与 後、4 から 8 週と 8 から 12 週齢では組織のターンオーバー率が約 1/4 に減少することが示唆さ れた。また、放射線照射によって起こる組織内での平均クローンサイズの減少は、細胞の分裂 停止と組織外からの細胞の流入によって説明できた。加齢とともにターンオーバー率が減少す ることと、放射線照射による細胞の分裂停止について、既存の報告と合致することを確かめた。

### 参考文献

- [1] 廃炉・汚染水対策関係閣僚等会議,東京電力ホールディングス(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等に向けた中長期ロードマップ,2019, https://www.meti.go.jp/earthquake/nuclear/pdf/20191227.pdf(参照:令和3年4月19日).
- [2] The UNSCEAR 2020 Report (Levels and Effects of Radiation Exposure due to the Nuclear Accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station: Implications of information published since the UNSCEAR 2013 Report,

https://www.unscear.org/unscear/en/fukushima.html(参照:令和3年4月19日).

- [3] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., Bos, J. L., Genetic Alterations during Colorectal-tumor Development, N. Engl. J. Med., vol. 319, no. 9, 1988, pp. 525-532.
- Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M., Shiroishi, T., Clifton, K. H., Wakana, S., Radiation-associated Loss of Heterozygosity at the Znfn1a1 (Ikaros) Locus on Chromosome 11 in Murine Thymic Lymphomas, Radiat. Res., vol.154, no.3, 2000, pp. 293-300.
- [5] Hess, J., Thomas, G., Braselmann, H., Bauer, V., Bogdanova, T., Wienberg, J., Zitzelsberger, H., Unger, K., Gain of Chromosome Band 7q11 in Papillary Thyroid Carcinomas of Young Patients is Associated with Exposure to Low-dose Irradiation, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., vol.108, no.23, 2011, pp.9595-9600.
- [6] Sánchez-Danés, A., Hannezo, E., Larsimont, J. C., Liagre, M., Youssef, K. K., Simons, B. D., Blanpain, C., Defining the Clonal Dynamics Leading to Mouse Skin Tumour Initiation, Nature, vol. 536, no. 7616, 2016, pp. 298-303.
- [7] Guiu, J., Hannezo, E., Yui, S., Demharter, S., Ulyanchenko, S., Maimets, M., Jørgensen, A., Perlman, S., Lundvall, L., Mamsen, L. S., Larsen, A., Olesen, R. H., Andersen, C. Y., Thuesen, L. L., Hare, K. J., Pers, T. H., Khodosevich, K., Simons, B. D., Jensen, K. B., Tracing the Origin of Adult Intestinal Stem Cells, Nature, vol. 570, no. 7759, 2019, pp. 107-111.
- [8] Ozasa, K., Shimizu, Y., Suyama, A., Kasagi, F., Soda, M., Grant, E.J., Sakata, R., Sugiyama, H., Kodama, K., Studies of the Mortality of Atomic Bomb Survivors, Report 14, 1950-2003: An Overview of Cancer and Noncancer Diseases, Radiat. Res., vol. 177, no. 3, 2012, pp. 229-243.
- [9] Rios, A. C., Capaldo, B. D., Vaillant, F., Pal, B., van Ineveld, R., Dawson, C. A., Chen, Y., Nolan, E., Fu, N. Y., 3DTCLSM Group, Jackling, F. C., Devi, S., Clouston, D., Whitehead, L., Smyth, G. K., Mueller, S. N., Lindeman, G. J., Visvader, J. E., Intraclonal Plasticity in Mammary Tumors Revealed through Large-Scale Single-Cell Resolution 3D Imaging, Cancer Cell, vol. 35, no. 4, 2019, pp. 618-632.
- [10] Rios, A. C., Fu, N. Y., Lindeman, G. J., Visvader, J. E., In Situ Identification of Bipotent Stem Cells in the Mammary Gland, Nature, vol. 506, no. 7488, 2014, pp. 322-327.

- [11] Burgess, S. J., Gibbs, H., Toomes, C., Coletta, P. L., Bell, S. M., The Role of Csmd1 during Mammary Gland Development, Genes (Basel), vol. 12, no. 2, 2021, p. 162.
- [12] Agami, R., Bernards, R., Distinct Initiation and Maintenance Mechanisms Cooperate to Induce G1 Cell Cycle Arrest in Response to DNA Damage, Cell, vol.102, no.1, 2000, pp.55-66.
- [13] Niwa, O., Barcellos-Hoff, M. H., Globus, R. K., Harrison, J. D., Hendry, J. H., Jacob, P., Martin, M. T., Seed, T. M., Shay, J. W., Story, M. D., Suzuki, K., Yamashita, S., ICRP., ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection, Ann. ICRP., vol.44, no.3-4, 2015, pp.7-357.
- [14] 廃炉環境国際共同研究センター,量子科学技術研究開発機構,幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける新たな評価系の構築(委託研究);令和元年度英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業,JAEA-Review 2020-045, 2021, 52p., https://doi.org/10.11484/jaea-review-2020-045.