

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 3 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業－

Establishing a New Evaluation System to Characterize Radiation Carcinogenesis by
Stem Cell Dynamics
(Contract Research)

-FY2021 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 2023

Japan Atomic Energy Agency

日本原子力研究開発機構

JAEA-Review

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。（<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>）
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（<https://www.jaea.go.jp>）
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
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).
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

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3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

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

(2022年10月12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3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始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」の令和元年度から令和3年度の研究成果について取りまとめたものである。本課題は令和3年度が最終年度となるため3年度分の成果を取りまとめた。

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とら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。

被ばく後の乳腺基底細胞と内腔細胞を観察したところ、どちらも時間と共に拡大するクローンサイズが被ばくにより減少し、特に内腔細胞では被ばく後12週において0.05 Gyで有意にクローンサイズの減少が観察された。被ばくにより細胞分裂速度が速くなり、かつ、クローンサイズの減少とともに細胞系譜追跡で観察された細胞老化や分化異常が引き起こされると仮定した場合に、マウス実験で見られる増加するクローンサイズの抑制を満たしながら、発がんリスクが上昇することを見出した。以上の結果から、低線量被ばくの影響をとらえる実験系が構築できたとと言える。また、放射線誘発乳がんリスクの増加は0.03 Gyと0.05 Gyの間にしきい線量があり、それ以上の線量でないと乳がんは増加しない可能性が示唆された。

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

Establishing a New Evaluation System to Characterize Radiation Carcinogenesis by Stem Cell Dynamics
(Contract Research)

— FY2021 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 12, 2022)

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 FY2021.

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 from FY2019 to FY2021. Since the final year of this proposal was FY2021, the results for three fiscal years were summarized.

In this study, we will use cell lineage tracing technology that can permanently label stem cells and their progenies to capture and mathematically model the long-term clonal proliferation of cells in mammary tissue after high to low dose radiation exposure to determine the origin of radiation carcinogenesis, the stem cells. The objective is to characterize radiation-induced breast cancer by its dynamics.

The observation of mammary basal and luminal cells after radiation exposure showed that the clonal proliferation with time was suppressed by exposure in both cases, especially in luminal cells, where a significant suppression of clone size was observed at 0.05 Gy at 12 weeks after exposure. Assuming that radiation exposure increases the rate of cell division and induces cellular senescence and abnormal differentiation observed in the above animal experiments, along with the suppression of clone size, we found that the risk of carcinogenesis is increased while satisfying the suppression of the clonal proliferation.

These results indicate that we have constructed an experimental model that can capture the effects of low-dose radiation exposure, and suggest that there is a threshold dose between 0.03 Gy and 0.05 Gy for radiation-induced breast cancer, and that breast cancer may not increase unless the dose is above this threshold.

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
5. 令和 3 年度 採択課題	10
付録 成果報告書	13

Contents

1. Outline of Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project	1
2. Accepted Proposal in FY2018.....	2
3. Accepted Proposal in FY2019.....	5
4. Accepted Proposal in FY2020.....	8
5. Accepted Proposal in FY2021.....	10
Appendix Result Report	13

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。

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	山崎 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
一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 (～R2. 3. 31) 大曲 新矢 (R2. 4. 1～)	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	渡邊 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 (～R3. 6. 30) 塚原 剛彦 (R3. 7. 1～)	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 (～R3. 3. 31) 岡山大学 (R3. 4. 1～)

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	浅間 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 (～R2. 3. 31) 竹下 健二 (R2. 4. 1～)	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

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 (～R4. 7. 31) 村上 健太 (～R4. 8. 1)	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	渡邊 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
マイクロ波重量 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

5. 令和3年度 採択課題

令和3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3年3月16日～令和3年5月17日（課題解決型）
令和3年4月13日～令和3年7月1日（国際協力型 日英共同研究）
令和3年7月12日～令和3年8月18日（国際協力型 日露共同研究）

課題数：12 課題

課題解決型廃炉研究プログラム 8 課題
国際協力型廃炉研究プログラム 2 課題（日英）、2 課題（日露）

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・日露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）会議及びステアリングコミッティでの審議を経て、採択課題を決定した。

令和3年度 採択課題一覧

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
建屋応答モニタリングと損傷イメージング技術を活用したハイブリッド型の原子炉建屋長期健全性評価法の開発研究	前田 匡樹	東北大学
燃料デブリ周辺物質の分析結果に基づく模擬デブリの合成による実機デブリ形成メカニズムの解明と事故進展解析結果の検証によるデブリ特性データベースの高度化	宇埜 正美	福井大学
ジオポリマー等による PCV 下部の止水・補修及び安定化に関する研究	鈴木 俊一	東京大学
世界初の同位体分析装置による少量燃料デブリの性状把握分析手法の確立	坂本 哲夫	工学院大学
アルファ微粒子の実測に向けた単一微粒子質量分析法の高度化	豊嶋 厚史	大阪大学

課題名	研究代表者	所属機関
連携計測による線源探査ロボットシステムの開発研究	人見 啓太郎	東北大学
中赤外レーザー分光によるトリチウム水連続モニタリング手法の開発	安原 亮	自然科学研究機構
福島原子力発電所事故由来の難固定核種の新規ハイブリッド固化への挑戦と合理的な処分概念の構築・安全評価	中瀬 正彦	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
福島第一原子力発電所の廃止措置における放射性エアロゾル制御及び除染に関する研究	Erkan Nejdet (～R4. 1. 31) 三輪 修一郎 (R4. 2. 1～)	東京大学
燃料デブリ取り出しのための機械式マニピュレータのナビゲーションおよび制御	浅間 一	東京大学

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
福島第一発電所 2、3 号機の事故進展シナリオに基づく FP・デブリ挙動の不確かさ低減と炉内汚染状況・デブリ性状の把握	小林 能直	東京工業大学
非接触測定法を用いた燃料デブリ臨界解析技術の高度化	小原 徹	東京工業大学

本報告書は、以下の課題の令和元年度から令和 3 年度の研究成果について取りまとめたものである。本課題は令和 3 年度が最終年度となるため 3 年度分の成果を取りまとめた。

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
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 3 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 R03I022)

成果報告書

令和 4 年 3 月

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

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」の令和元年度から令和3年度の研究成果を取りまとめたものです。

目次

概略	vii
1. はじめに	1. 1-1
2. 業務計画	2. 1-1
2.1 全体計画	2. 1-1
2.1.1 計画内容	2. 1-1
2.1.2 実施体制	2. 1-4
2.2 令和3年度の成果の目標及び業務の実施方法	2. 2-1
3. 実施内容及び成果	3. 1-1
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
3.1.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）	3. 1-1
3.1.2 令和3年度実施内容及び成果	3. 1-14
3.1.3 まとめ	3. 1-23
3.2 数理モデルによる幹細胞の動態解析	3. 2-1
3.2.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）	3. 2-1
3.2.2 令和3年度実施内容及び成果	3. 2-13
3.2.3 まとめ	3. 2-17
3.3 研究推進	3. 3-1
4. 結言	4-1
参考文献	5-1

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	本研究で用いるマウス.....	3. 1-3
表 3-2	本研究におけるタモキシフェン至適濃度.....	3. 1-23
表 3-3	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. 2-11
表 3-4	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. 2-11

図一覧

図 1-1	放射線発がんメカニズムについて	1. 1-1
図 1-2	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 1-3	本研究の仮説と目的	1. 1-2
図 2-1	実施体制図	2. 1-4
図 3-1	マウス乳腺模式図	3. 1-1
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	3. 1-2
図 3-3	K14-tdTomato マウスにおけるタモキシフェン濃度検討	3. 1-6
図 3-4	K8-Brainbow マウスにおけるタモキシフェン濃度検討	3. 1-7
図 3-5	K8-tdTomato マウスにおけるタモキシフェン濃度検討	3. 1-8
図 3-6	フローサイトメトリー法による解析結果の一例	3. 1-9
図 3-7	ガンマ線照射装置（ガンマセル）	3. 1-10
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. 1-11
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. 1-12
図 3-10	K14-tdTomato マウスにおけるクローンサイズの変化	3. 1-13
図 3-11	遺伝子型判定結果（一例）	3. 1-14
図 3-12	リアルタイム PCR を用いた遺伝子型判定結果（一例）	3. 1-15
図 3-13	解析用 F1 マウスの遺伝子型判定結果（一例）	3. 1-16
図 3-14	K8-Brainbow 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. 1-17
図 3-15	K8-Brainbow マウスにおけるクローンサイズの変化	3. 1-19
図 3-16	BALB/c 系統に置換した K8-Brainbow 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（一例）	3. 1-20
図 3-17	細胞老化と分化異常について	3. 1-22
図 3-18	同種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果	3. 2-3
図 3-19	同種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果（別 2 例）	3. 2-3
図 3-20	同種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果	3. 2-4
図 3-21	同種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果（別 2 例）	3. 2-5
図 3-22	2 種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果	3. 2-5
図 3-23	2 種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果（別 2 例）	3. 2-6
図 3-24	2 種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果	3. 2-6
図 3-25	2 種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果（別 2 例）	3. 2-7
図 3-26	平均クローンサイズ概念	3. 2-8
図 3-27	平均クローンサイズの変化	3. 2-9
図 3-28	実験データと平均クローンサイズの変化	3. 2-10
図 3-29	放射線照射効果を含めた平均クローンサイズの変化	3. 2-12
図 3-30	放射線効果の強さを变化させたシミュレーションによる平均クローンサイズの変化	3. 2-13

図 3-31	放射線効果に 3 つの仮説を考慮したシミュレーションによる平均クローンサイズの変化	3. 2-15
図 3-32	放射線効果に 3 つの仮説を考慮したシミュレーションによるクローンあたりの総細胞分裂数の変化	3. 2-15
図 3-33	広いパラメータ領域におけるシミュレーション結果と実験観察結果を満たすパラメータの領域	3. 2-16
図 4-1	仮説を含む放射線発がんの全体像と本研究の成果との関係.....	4-2

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)
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid	(エチレンジアミン四酢酸)
F1	: First filial generation	(雑種第一代)
FAM	: Fluorescein Phosphoramidite	
FUnGI	: Fructose, Urea, and Glycerol for Imaging	
LNT	: Linear Non-Threshold	(直線しきい値無し)
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 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積極的に行われている。高線量率で汚染されたエリアでの作業は、機器やロボットに依存するところが多く、廃炉の技術開発も積極的に行われている。しかしながら、現時点では作業者が現場に赴く場面が多くみられる。そのため、0.1 Gy 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。

放射線発がんは放射線による突然変異を起こした細胞が排除されず、その細胞や子孫細胞に追加の突然変異が加わることで引き起こされると考えられている。ここでいう突然変異はゲノムに生じるものを指すが、この突然変異は線量に相関するので、線量がどれだけ低くなっても発がんリスクがなくなる防護の考え方に繋がっている。しかしながら、この突然変異は次世代シーケンス技術を用いてもヒトや実験動物の一部の腫瘍でのみ検出されており、放射線の痕跡（Radiation Signature）は多くの腫瘍では明らかとなっていないのが現状である[1][2]。

そこで我々は遺伝子変異の視点ではなく、がんに至る細胞の変化に着目すべきと考えた。ここで言う細胞の変化とは細胞動態を指し、具体的には正常細胞からがん細胞が生まれそれが進展して行く細胞の変化を意味し、主に細胞死、細胞増殖、分化異常、細胞競合を介した細胞の質的、量的変化を意味する。

【目的】

本研究では仮説として遺伝子変異だけではなく、幹細胞の質的、量的変化とそれに続くクローン性増殖の細胞動態で低線量発がんを特徴付けられないかと考えた。目的は細胞系譜追跡技術を用い、低線量から高線量被ばく後の乳腺組織における幹細胞動態を数理モデル解析することにより、低線量発がんを特徴付ける実験系の確立である。

【実施内容】

(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

① 細胞系譜追跡実験系の構築

幹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かけあわせ、得られた仔マウスの遺伝子型を PCR 法にて判定し、目的の F1 マウスを得る。

目的の F1 マウスはタモキシフェンと呼ばれる薬剤を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)。このタモキシフェン投与量と投与時期について、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

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

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。照射線量に依存する形で推定された動態パラメータを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。

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】

「細胞系譜追跡実験系の構築」では、遺伝子改変マウスの維持・繁殖ならびに実験用のF1マウスの作出における遺伝子型の判定を行った。また、タモキシフェン投与により細胞系譜追跡が可能となるが、タモキシフェン量と初期の標識効率は相関するため、その濃度の検討を行い、K14-tdTomatoならびにK8-tdTomato F1雌マウスの本研究における至適な濃度を決定した。

令和2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。

「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」では、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、クローンサイズが有意に減少することを見出した。7週齢K8-Brainbow F1雌マウスにタモキシフェンを投与後、0.1 Gyまたは2 Gy照射した12週間経過後のマウス乳腺では、非照射群に比べ、クローンサイズが有意に減少することを見出した。さらに0.05 Gyでも有意に減少したが、0.03 Gyでは観察されなかった。さらに、被ばくによるクローンサイズの変化に加え、乳腺組織では分化異常と細胞老化が引き起こされていることが示唆された。

「2次元空間構造を含む乳腺組織動態の数理モデル構築」では、組織内の細胞の種類や空間上の配置を決め、幹細胞クローンの系譜をそれぞれ区別できるようにするために、2次元格子空間上で分裂、死亡、分化が確率性を持って継続的に引き起こされている乳腺組織をコンピュータ上に再現した。

「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」では「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」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、非照射群における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認した。

「推定パラメータを用いた発がん過程の解析」では放射線照射によって細胞分裂速度が速くなりかつ細胞老化や分化異常が引き起こされると仮定した場合に、マウス実験で見られる増加するクローンサイズの抑制を満たしながら、発がんリスクが上昇することを見出した。

以上のことから、細胞系譜追跡により 0.1 Gy で増加するクローンサイズの抑制、細胞老化、分化異常といった細胞動態に影響が観察された。特に内腔細胞では、0.05 Gy 照射で有意なクローンサイズの減少が観察された。数理モデル解析により細胞系譜追跡実験で観察された細胞老化と分化異常をパラメータとすることで増加するクローンサイズの抑制とそのような条件での一部クローンサイズの増加を見出した。動物実験と数理モデル解析の以上の結果から低線量被ばくの影響をとらえる実験系が構築できたと言える。また、放射線誘発乳がんリスクの増加は 0.03 Gy と 0.05 Gy の間にしきい線量があり、それ以上の線量でないと乳がんは増加しない可能性が示唆された。

本研究はこの事業により、実験系が構築され、細胞動態について興味深い知見が幾つも得られた。今後、この研究を発展させることで、LNT 仮説を覆すようなデータを出し、学術論文として国際機関への引用がなされること、またプレスリリースやホームページ等での情報発信を行うことで、廃炉作業者のリスク管理や不安対策につながると期待する。

前年度までの成果報告書：

- ・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
<https://doi.org/10.11484/jaea-review-2020-045>
- ・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 JAEA-Review 2021-052
<https://doi.org/10.11484/jaea-review-2021-052>

1. はじめに

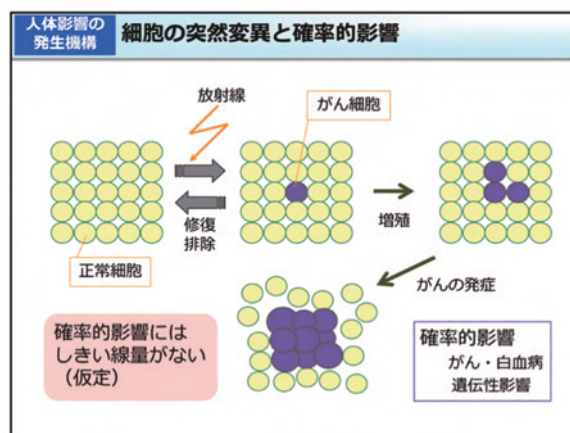
1F の廃炉に向けた取り組みが日々行なわれているが、廃炉作業の多くは依然として人による作業に依存しており、常に被ばくリスクがともなっていると言える。廃炉作業へのアンケート結果では不安の理由の第 1 位に被ばくによる健康への影響が挙げられており、100 mSv 以下の低線量被ばくによる発がんリスクは科学的に明らかにしなければならない重要な課題である[3]。福島原発事故後、低線量率被ばくによるがん死亡リスクの考え方が広く一般に示されているが、低線量発がんリスクは生活習慣によるがんリスクに比べて非常に小さいので、疫学研究で明らかにするには限界がある[4]。そのためには、飼育環境や実験条件が管理された動物実験が重要となる。

放射線発がんメカニズムは現在、図 1-1 のように理解されている。放射線による突然変異を起こした細胞が排除されず、その細胞や子孫細胞に追加の突然変異が加わることで引き起こされるとされている。突然変異は線量に相関するので、線量がどれだけ低くなっても発がんリスクがなくなる防護の考え方に繋がっている。しかしながら、この考え方には解明すべき点が多く残されている。現状、次世代シーケンス技術を用いて、ヒトや実験動物における放射線発がんの特徴的な変異パターンがいくつかの腫瘍で見つかっているが、多くの腫瘍では見つかっていない[1][2]。

■ 放射線発がんメカニズム

放射線による突然変異を起こした細胞が排除されず、がんになる
(下図の「がん細胞」)

突然変異は線量に相関するので、線量がどれだけ低くなっても発がんリスクがなくなる防護の考え方 (LNTモデル)につながる



環境省「放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料」

図 1-1 放射線発がんメカニズムについて

また、放射線発がんではがんの起源細胞の周囲環境の炎症性変化が発がん重要な役割を果たすことが近年提唱されるようになったが、低線量被ばくでのこれらの貢献度については全く明らかになっていない。

以上のことから、我々は遺伝子変異の視点ではなく、がんに至る細胞の変化に着目すべきと考えた。ここで言う細胞の変化とは細胞動態を指し、具体的には正常細胞からがん細胞が生まれ、

それが進展して行く細胞の変化を意味し、主に細胞死、細胞増殖、分化異常、細胞競合を介した細胞の質的、量的変化を意味する。

近年、幹細胞の空間的動態をとらえる手法として細胞系譜追跡技術が開発された。これはマウス体内のある細胞を、薬剤投与により細胞を光らせ、その子孫細胞も同様に光らせる手法であり、前述の細胞動態の検出可能な実験手法として知られている（図 1-2）。また、細胞系譜追跡で得られたデータを数理的に解析する研究が様々な臓器で行われている。

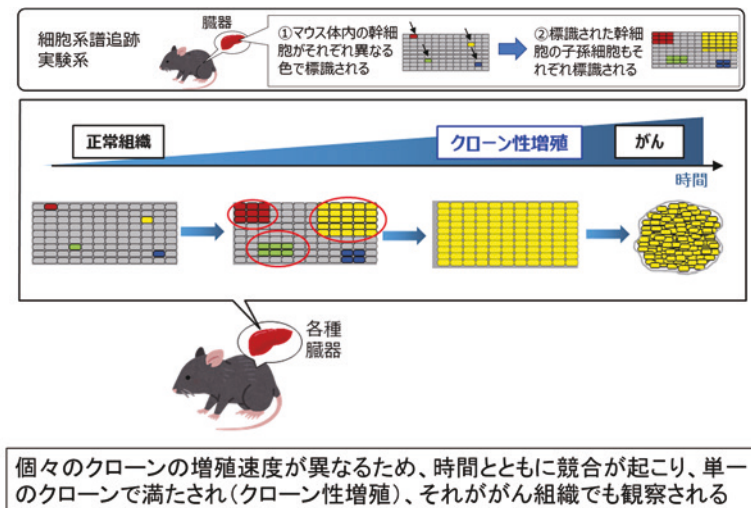
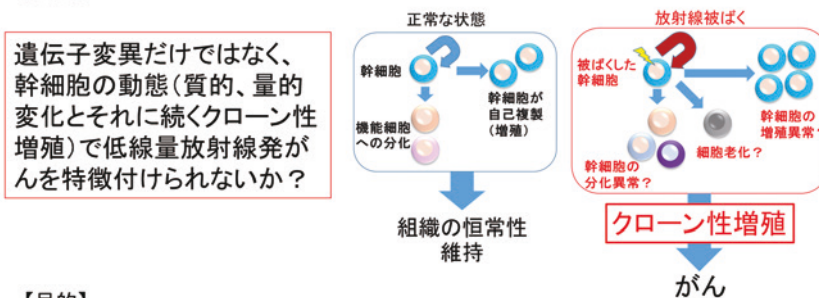


図 1-2 細胞系譜追跡によるがんに至るクローン性増殖について（模式図）
（文献[6]より引用）

【目的】

本研究では仮説として遺伝子変異だけではなく、幹細胞の質的、量的変化とそれに続くクローン性増殖の細胞動態で低線量発がんを特徴付けられないかと考えた。目的は細胞系譜追跡技術を用い、低線量から高線量被ばく後の乳腺組織における幹細胞動態を数理モデル解析することにより、低線量発がんを特徴付ける実験系の確立である（図 1-3）。

【仮説】



【目的】

細胞系譜追跡技術(後述)を用い、低線量～高線量放射線被ばく後の乳腺組織において、幹細胞動態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低線量放射線誘発乳がんを特徴付ける実験系の確立を目的としている。

図 1-3 本研究の仮説と目的

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。

表 2-1 本研究のタイムスケジュール

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	年度	令和元年度	令和2年度	令和3年度
(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				
①細胞系譜追跡実験系の構築		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
(2)数理モデルによる幹細胞の動態解析 (東京大学)				
①2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パラメータの推定			動態パラメータ推定	
③推定パラメータを用いた発がん過程の解析				推定パラメータ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・評価

申請者らの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、動物実験は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構（以下、「量研機構」という。）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）

① 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とら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）

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

最初に本事業で必要とされる解析環境の整備を行う。(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

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

本研究の実施体制図を図 2-1 に示す。

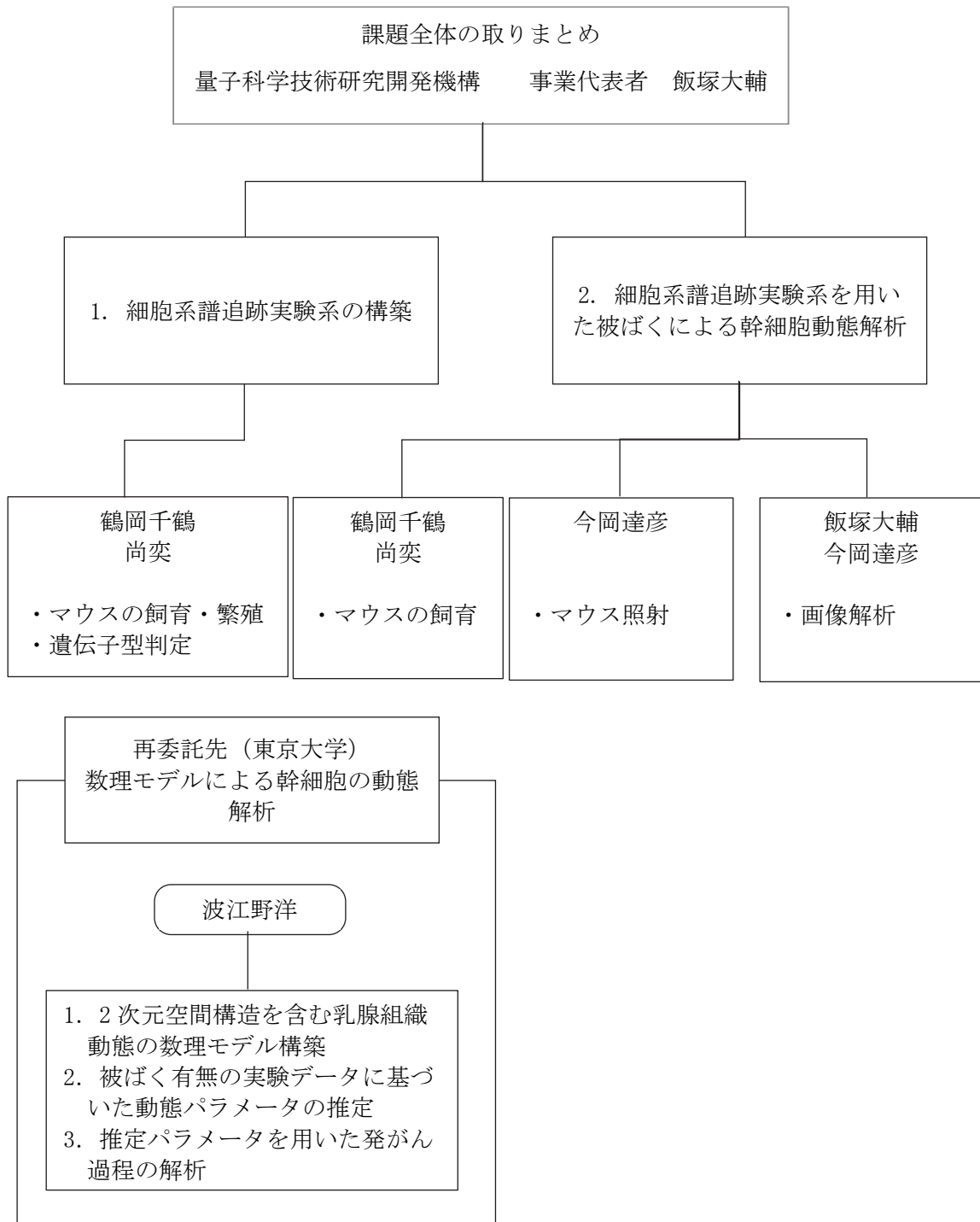


図 2-1 実施体制図

2.2 令和3年度の成果の目標及び業務の実施方法

令和3年度の成果の目標及び業務の実施方法については、以下のとおりである。

(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

① 細胞系譜追跡実験系の構築

令和2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。

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

令和2年度までに決定した条件でタモキシフェン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）

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、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。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。

(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. 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 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）

A) 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放射線発がんリスクの高い臓器であることが知られている。しかしながら、被ばくによる乳がん発生メカニズムについては不明な点が多く残されている。

マウスには片側に 5 つの乳腺が存在している。乳腺上皮細胞は思春期前においては乳腺原基と呼ばれる部位に存在しており、性成熟に伴うホルモンの影響を受け、乳管を伸長させ、成熟した乳腺となる。乳腺は妊娠期、出産期、退縮期と劇的に変化を遂げる臓器である。乳汁の産生と送達をつかさどる乳管は内腔細胞と基底細胞の 2 種類の上皮細胞から構成されており、乳がんはこの乳管を構成するこれらの上皮細胞から生じる。放射線誘発乳がんがどちらの上皮細胞由来なのかは明らかとされていない（図 3-1）。

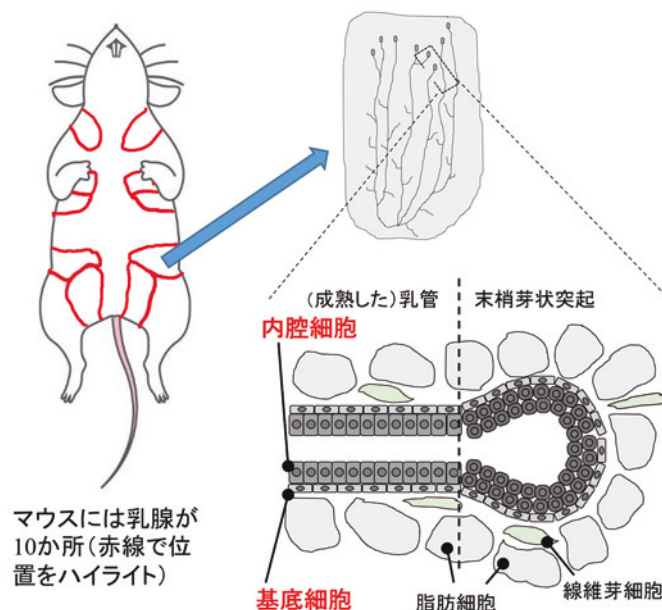


図 3-1 マウス乳腺模式図（図の一部は文献[6]より転載）

細胞系譜追跡実験とはマウス体内の細胞が薬剤投与により一部の細胞がそれぞれ異なる色で識別され、幹細胞が標識されると、細胞増殖にともない子孫細胞も同じ色で標識され同色のクローンとして観察することができる実験系である。具体的にはある遺伝子プロモーターの下流で核内に移行し機能するように改変した CreERT2 リコンビナーゼ遺伝子を発現するマウス（Cre マウス）と、CreERT2 が働くと不可逆的に子孫細胞においても蛍光タンパク質が発現し続けるレポーターマウスの仔マウスを用いる（図 3-2）。この実験系を用いることで、放射線被ばくによるがんに至る細胞動態を明らかにすることが可能となる。

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。

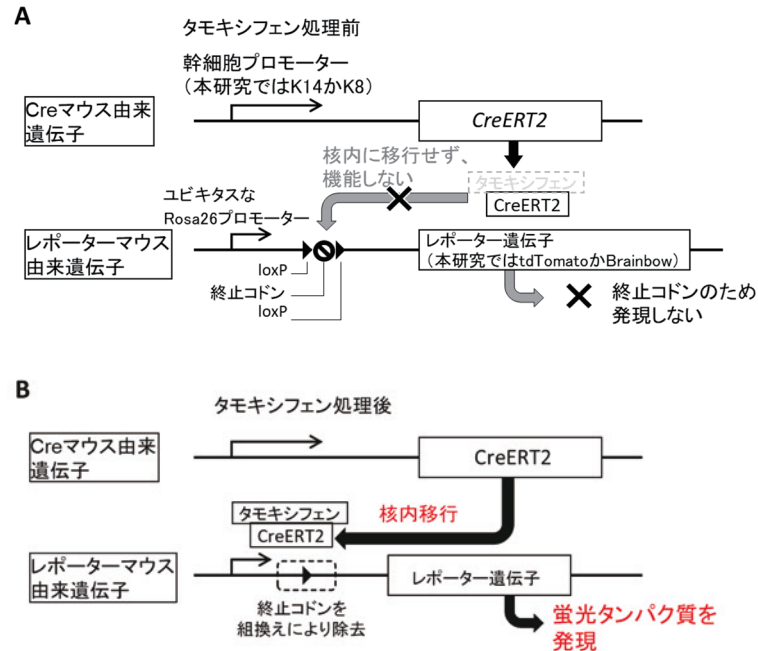


図 3-2 細胞系譜追跡解析を可能にするタモキシフェンの作用について
通常は終止コドンで翻訳が終結するため蛍光タンパク質は産生されないが（図 3-2A）、
Cre が働いて終止コドンが除去されると、その細胞及びその全ての子孫細胞で、
蛍光タンパク質が発現する（図 3-2B）。(文献[6]より引用)

(2) 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 量子生命・医学部門 放射線医学研究所 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 °C、湿度 $50 \pm 5\%$ 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（株式会社フナバシファーム）の自由給水・自由給餌にて行った。

用いたマウスは米国 Jackson Laboratory より導入した（表 3-1）。

表 3-1 本研究で用いるマウス

系統名	特徴
STOCK Tg(KRT14-cre/ERT)20Efu/J (K14 マウス)	ケラチン 14 (K14) を発現する細胞で CreERT2 タンパク質が発現するマウス。2 種類の乳腺上皮細胞のうち、基底細胞を追跡することができる。
STOCK Tg(Krt8-cre/ERT2)17Blpn/J (K8 マウス)	ケラチン 8 (K8) を発現する細胞で CreERT2 タンパク質が発現するマウス。乳腺内腔細胞を追跡することができる。
B6. Cg-Gt (ROSA) 26Sor ^{tm9 (CAG-tdTomato) Hze} /J (tdTomato マウス)	通常は tdTomato 赤色蛍光タンパク質を発現しないように同遺伝子配列上流に LoxP 配列に挟まれた STOP カセットが存在するマウス。タモキシフェンと結合した CreERT2 タンパク質が核内に移行すると、LoxP 配列の部分で DNA 配列が切断され、再結合されることで、tdTomato タンパク質が恒常的に発現するようになる。
B6. 129P2-Gt (ROSA) 26Sor ^{tm1 (CAG-Brainbow2.1) Cle} /J (Brainbow マウス)	上記の tdTomato マウスと同様の仕組みで蛍光タンパク質が発現するマウスであるが、特徴的なの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 (nGFP)、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点である。

② 遺伝子型の判定

遺伝子型の判定の詳細は以下のとおりである。遺伝子型を判定するマウスが生後 3 週齢になるまでに個体識別のための耳パンチを行うが、その際に得られた耳組織を主に用いた。DNA の抽出は以前に述べたとおり、Sodium Dodecyl Sulfate と Proteinase K を主に用いる方法と、Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (プロメガ株式会社) のどちらかを適宜選んで行った[6]。抽出した DNA を TE (Tris-EDTA) バッファーで希釈し、KAPA2G Fast PCR Kit (日本ジェネティクス株式会社) を用い、Veriti (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) サーマルサイクラーにて PCR 反応を行った。PCR 反応の組成、プライマー配列、PCR 反応条件については、以前に述べたとおりである[6]。

リアルタイム PCR は Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社) を用い、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。PCR 反応の組成、プライマー配列、PCR 反応条件については、以前に述べたとおりである[6]。

得られたデータを LightCycler®96 ソフトウェアにて解析し、内部標準である Cy5 と目的のトランスジーン FAM の Cq (Quantification cycle) 値を求め、 $\Delta\Delta C_t$ 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の調整、腹腔内投与、投与後の飼育ケージについては以前に述べたとおりである[6]。

④ 組織採取

タモキシフェン投与後、一定期間飼育の後、マウスから乳腺組織を採取した。その後、組織学的な解析では固定のため 10%ホルマリン溶液にて 1 時間処理した。

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 (サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社) にて 4 °C で一晩反応させた。

蛍光免疫染色を組み合わせる場合は、以前に述べた方法にて行った[5]。組織固定ならびに PBS での洗浄を行った後、ブロッッキング溶液で 4 °C、一晩反応させ、その後、希釈した 1 次抗体を、4 °C で 3 overnight 反応させ、PBS で 10 分間 3 回洗浄したのち、希釈した 2 次抗体で 2 overnight 反応させた。同時に DAPI 染色を行った。

PBS にて 10 分間 3 回洗浄したのち、組織透明化処理を以前に述べた方法で行った[6]。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 °C 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、クローンサイズを評価するために、画像解析ソフト Imaris (Bitplane AG) を用いて、Surface と呼ばれる解析法で、蛍光シグナルの表面積もしくは体積を算出した。

⑥ フローサイトメトリー法を用いたラベルされた細胞の同定

フローサイトメトリー法の詳細は以前に述べたとおりである[5]。採取した乳腺をハサミとメスで細かくし、Collagenase/hyaluronidase (STEMCELL Technologies)、Trypsin/EDTA Dispase (STEMCELL Technologies)、DNase そして Ammonium Chloride Solution (STEMCELL Technologies) を行うことで乳腺細胞を分離した。

乳腺組織には乳腺上皮細胞以外にも T 細胞、B 細胞、単球/マクロファージ、顆粒球、赤芽球などの細胞が混在している。これを除去するために、Lineage Cell Depletion Kit を用いた (Miltenyi Biotec)。そして細胞の濃度が一定となるように FACS Buffer を入れて、1:100 になるように希釈した抗体 (APC Anti-Mouse CD24 (BL101814)、APC/Cyanine7 Anti-Mouse/rat CD29 (BL102226)、PerCP-Cy5.5 Rat Anti-Mouse CD24 (BD、562360)、Milli-Mark Anti Mouse Integrin b1 (CD29)-FITC、clone MB1.2 (Millipore、FCMAB269F)) を氷上で 30 分間、反応させた。その後、10%ホルマリンで 10 分間固定したのち、マイクロキャピラリーフローサイトメトリーシステム Guava easyCyte (Luminex) にて解析した。

(3) 結果及び考察

(2)①で示した4種類の遺伝子組み換えマウスを実験に用いるために、それぞれのマウスを維持繁殖させ、適切にトランスジーンが引き継がれていることを確認する必要がある。出生したマウスの耳や尻尾を採取し、そこからDNAを抽出し、特異的なプライマーセットを用いたPCRにより判定した([5][6]参照)。

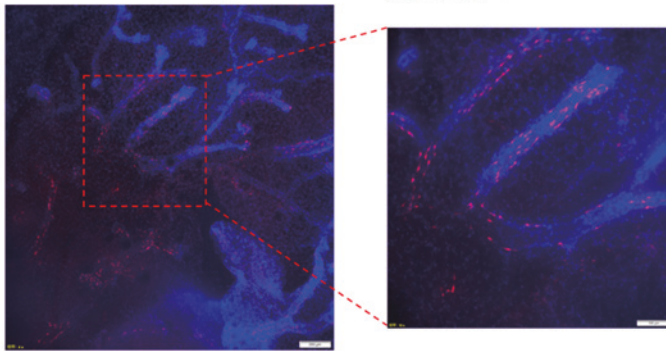
4種類の遺伝子組み換えマウスのうち、K14マウスとK8マウスはトランスジーンの部位と野生型の部位とに特異的なプライマーセットを設けているため、トランスジーンの有無(言い換えると野生型マウスとホモマウス)はPCR産物のアガロースゲル電気泳動法で区別が可能であるが、トランスジーンを両親から受け継いだホモと片親からのみ受け継いだヘテロを区別することはできない。そこで1コピーの差を検出する定量PCRを用いて判定した([5][6]参照)。

次に、(2)で述べたように、細胞系譜追跡を行うためには、特定のプロモーターの下流にCreERT2配列があり、そのプロモーター活性がある細胞でCreERT2が発現するCreマウスと、タモキシフェンと結合したCreERT2が核内に移行することで終止コドン除去し、蛍光タンパク質が恒常的に発現するレポーターマウスの、2種類のマウスの仔マウスを用いる必要がある。それぞれのトランスジーンが引き継がれていることを確認するために、出生したマウスの耳や尻尾を採取し、PCRにより判定した([5][6]参照)。

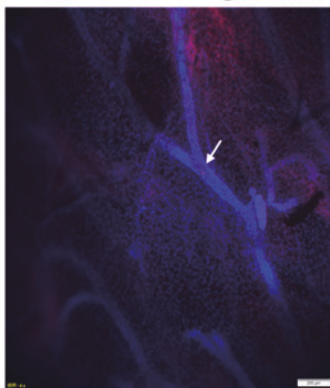
これらの確認は、マウスの維持繁殖を行う際に、随時行った。

次に、乳腺上皮細胞のうち、基底細胞を追跡可能なK14-tdTomato F1マウスについて、タモキシフェンの投与量を決定する実験を行った。11週齢のK14-tdTomato F1雌マウスに対し、体重25 gあたり4.5 mgまたは1.5 mgになるように調整したタモキシフェン溶液を腹腔内投与した。3日後、乳腺を採取し、ホルマリン固定後、核をDAPIで染色し、組織透明化を行い、IX-83共焦点顕微鏡システムにて観察した。その結果、体重25 gあたり4.5 mg投与したマウス乳腺では多数の赤色の蛍光を発する細胞が観察された。体重25 gあたり1.5 mg投与したマウス乳腺では4倍の対物レンズでの観察で一視野に全くもしくは1個しか観察されないことが多かった(図3-3)。また、これまでの観察ではタモキシフェン溶液の溶媒のピーナツ油を投与したコントロール群では蛍光を発する細胞は検出されなかった。この結果と、文献[7]から、K14-tdTomato F1雌マウスについては、体重25 gあたり1.5 mgを本研究の至適濃度と結論付けた。

K14-tdTomatoタモキシフェン4.5mg投与後3日



タモキシフェン1.5mg投与後3日



コントロール(ピーナッツ油投与)群

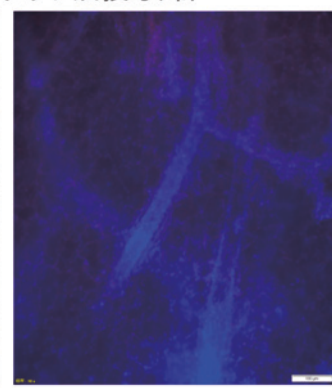
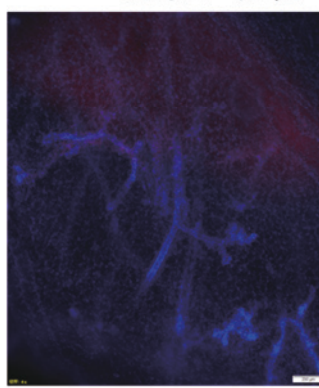
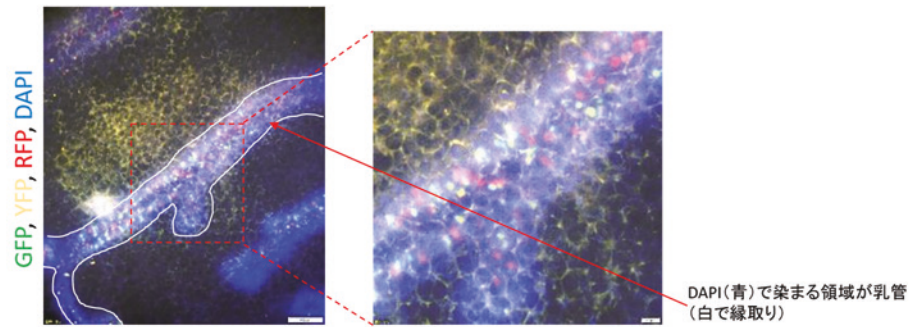


図 3-3 K14-tdTomato マウスにおけるタモキシフェン濃度検討

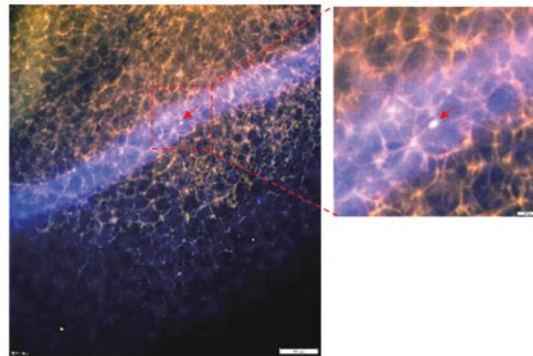
溶媒（ピーナッツ油）もしくはタモキシフェン投与後 3 日目で乳腺組織を採取した。赤が tdTomato 陽性細胞。乳管上皮細胞の核を DAPI 染色（青色）した。（文献[5]より引用）

同様に、乳腺上皮細胞のうち、内腔細胞を追跡可能な K8-Brainbow F1 マウスについて、約 7 週齢の K8-Brainbow F1 雌マウスに対し、体重 25 g あたり 1.5 mg または 0.2 mg になるように調整したタモキシフェン溶液を腹腔内投与した。3 日後、乳腺を採取し、K14-tdTomato F1 雌マウスと同様に IX-83 共焦点顕微鏡システムにて透明化した乳腺を観察した。その結果、体重 25 g あたり 1.5 mg 投与したマウス乳腺では多数の蛍光タンパク質を発現する細胞が観察された。一方で、体重 25 g あたり 0.2 mg 投与したマウス乳腺では 1 視野に全くもしくは 1 個しか観察されないことが多かった（図 3-4）。この結果から、K8-Brainbow F1 雌マウスについては、体重 25 g あたり 0.2 mg を本研究の至適濃度と結論付けた。

K8-Brainbowタモキシフェン1.5mg投与後3日



タモキシフェン0.2mg投与後3日



コントロール群

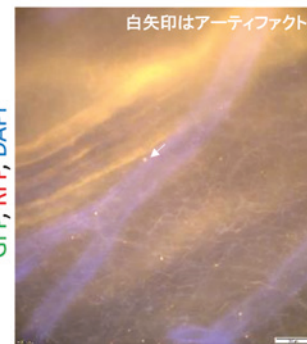
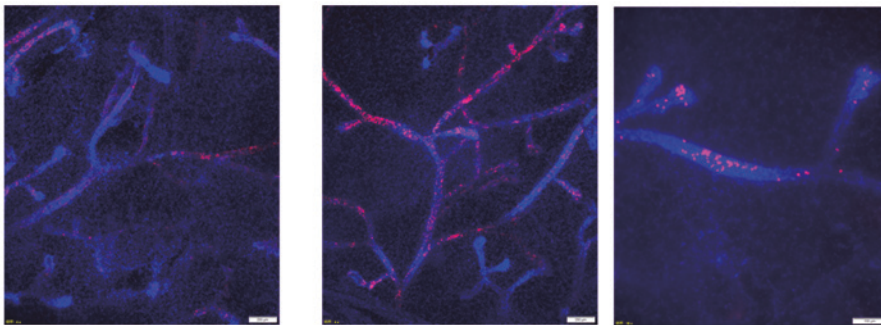


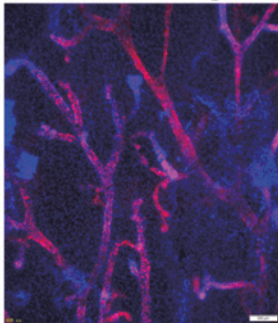
図 3-4 K8-Brainbow マウスにおけるタモキシフェン濃度検討
(文献[6]より引用)

一方で、K8-tdTomato F1 雌マウスにおけるタモキシフェン投与量の検討を行ったところ、タモキシフェン非投与群のマウスでも蛍光タンパク質を発現する細胞が多数観察された（図 3-5）。このことは、K8 陽性細胞において、タモキシフェンが存在しなくても tdTomato 遺伝子上流にある終止コドンが何らかの理由で外れてしまい、tdTomato 赤色蛍光タンパク質が発現していることを示唆している。いずれにせよ、K8-tdTomato F1 雌マウスは本研究に用いることができないと結論付けた。

K8-tdTomatoコントロール群



タモキシフェン0.1mg投与後3日



タモキシフェン2mg投与後3日

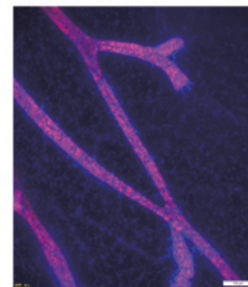
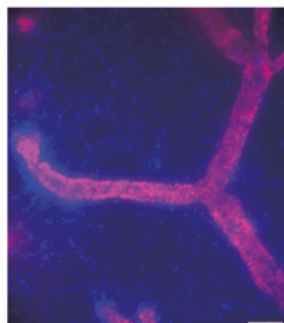


図 3-5 K8-tdTomato マウスにおけるタモキシフェン濃度検討
溶媒（ピーナッツ油）もしくはタモキシフェン投与後 3 日目で乳腺組織を採取した。

赤が tdTomato 陽性細胞。核を DAPI 染色（青色）した。

（文献[5]より引用）

また、K14-tdTomato F1 雌マウスと K8-tdTomato F1 雌マウスについては、フローサイトメトリー法による解析により、tdTomato タンパク質を発現する細胞がそれぞれ、基底細胞と内腔細胞に分別されることを確認した（図 3-6）。

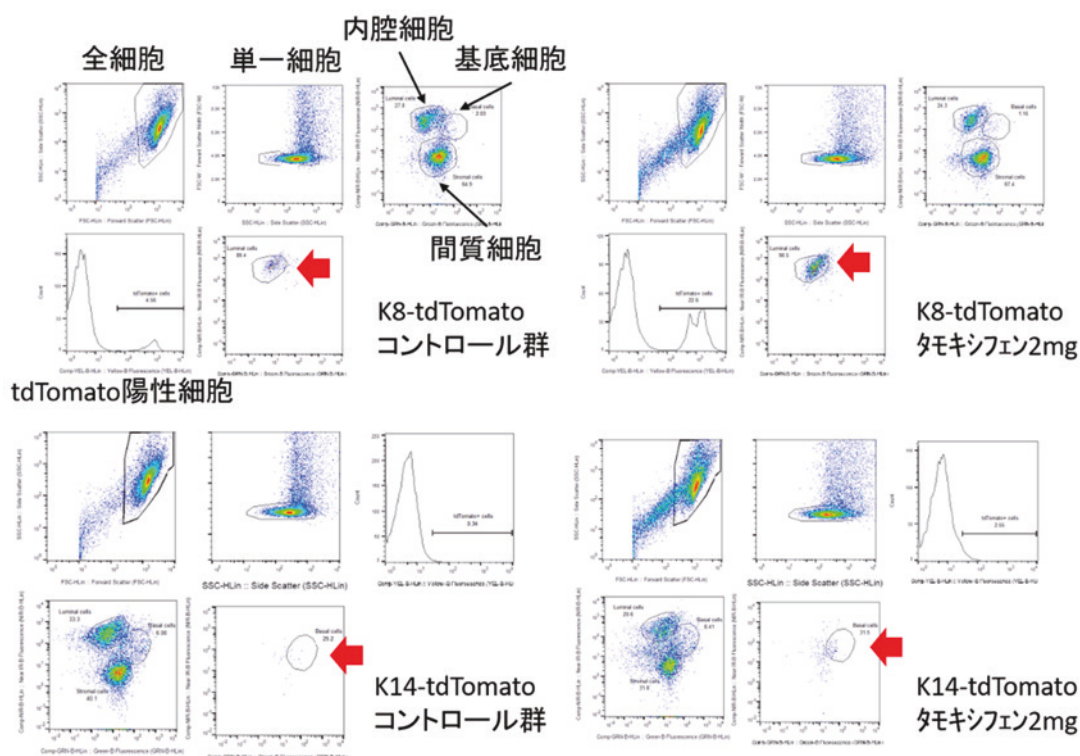


図 3-6 フローサイトメトリー法による解析結果の一例

赤矢印で示した細胞集団が tdTomato 陽性細胞。ゲーティングは、①全細胞集団、②単一細胞集団、③tdTomato 陽性細胞集団、④あらかじめ cd24 と cd29 染色をしてそれぞれの集団を把握したのち、③の細胞集団がどこに属するかを検討した。

(文献[5]より引用)

B) 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

A)で検討したタモキシフェン投与量を用い、K14-tdTomato F1 雌マウスならびに K8-Brainbow F1 雌マウスに対し、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。

(2) 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については、3.1.1で述べたとおりである。

放射線照射

タモキシフェンを投与し、1 日後にガンマセル (^{137}Cs 線源、Gammacell®40、Nordion) を用いたガンマ線照射を行った。専用の照射容器にマウスを入れ、2 Gy までの線量を照射した (図 3-7)。非照射群は照射を模擬するため、照射群と同様に照射容器に入れ、飼育ケージに戻した。

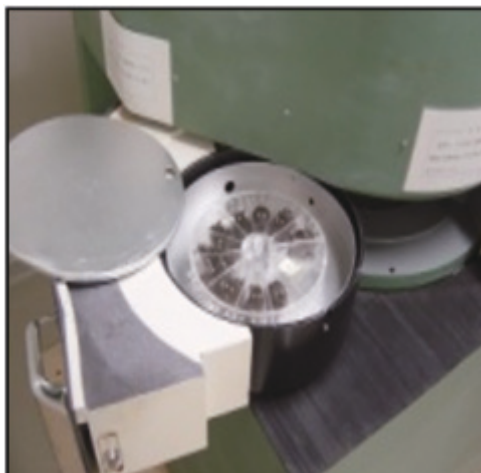


図 3-7 ガンマ線照射装置（ガンマセル）（文献[6]より引用）

(3) 結果及び考察

タモキシフェン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。基底細胞を追跡可能な 7 週齢 K14-tdTomato F1 雌マウスに対し、タモキシフェンを 25 g 体重あたり 1.5 mg で腹腔内投与し、翌日にガンマ線照射を行った。その後、飼育を続け、4 週、8 週、12 週後（マウスはそれぞれ 11 週齢、15 週齢、19 週齢となる時）に乳腺を採取した。組織をホルマリンで固定し、細胞核を DAPI で一晩染色し、FUnGI で乳腺組織の透明化を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

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、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）のサイズが増加していることがわかる。一方で 2 Gy 被ばく群では、被ばく後 8 週までクローンサイズが増加するものの、12 週後には増加したクローンサイズが抑制されることが明らかとなった（図 3-8、いずれも破線で囲まれた領域）。

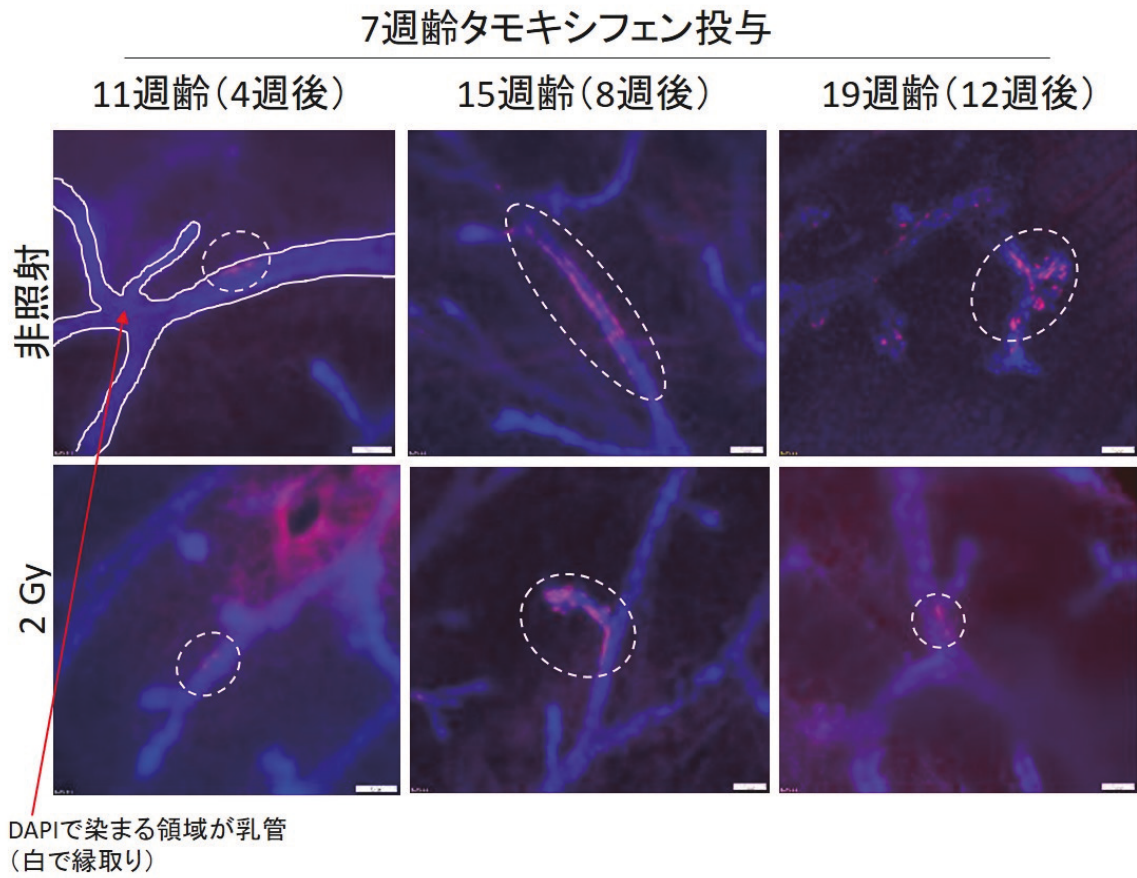


図 3-8 K14-tdTomato マウスを用いた非照射群（上段）と
2 Gy 被ばく群（下段）におけるクローンサイズの変化（典型例）
（文献[6]より引用）

定量的に解釈するために、得られた画像を用い、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。本研究では赤色蛍光シグナルについて、表面積を用いることにした。図 3-9 では実際に定量化した例を示す。図の右側の画像では、赤色蛍光シグナルを指標にソフトウェ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）。

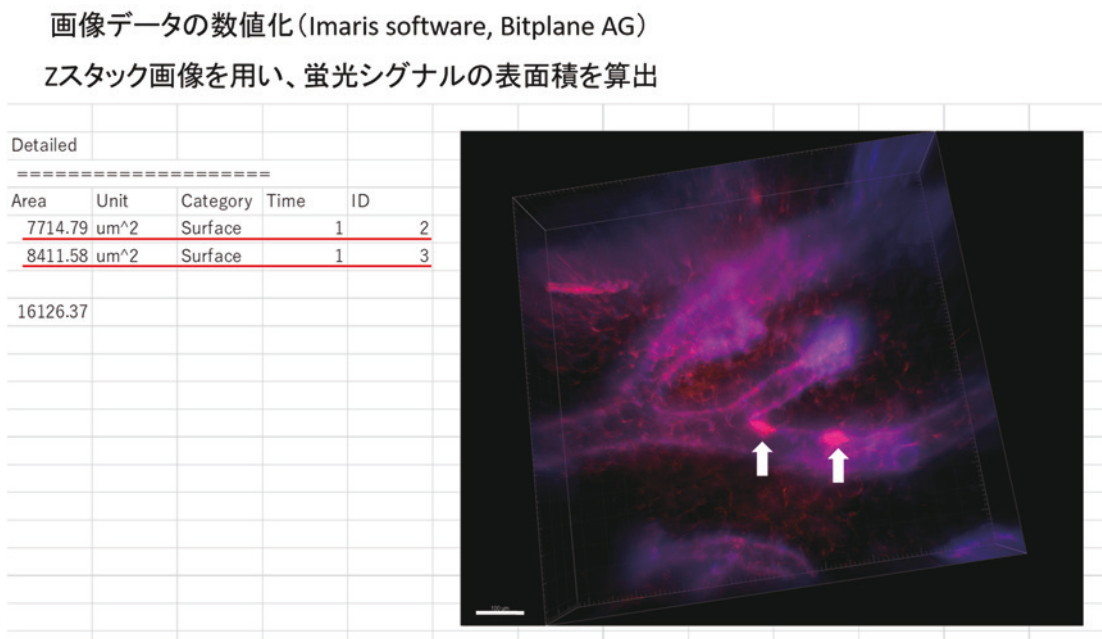


図 3-9 画像解析ソフト Imaris を用いた画像データの数値化（一例）
（文献[6]より引用）

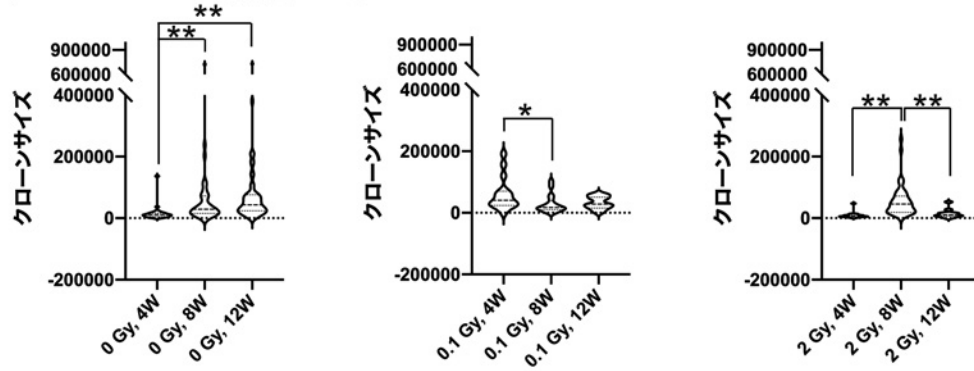
蛍光シグナルの表面積を算出し、バイオリン図としてプロットしたものを図 3-10 に示す。各線量、各サンプリング週において、それぞれ 2 匹のマウスを用い、両側の第 3 乳腺（合計 4 乳腺）で最低でも 10 か所の画像をランダムに取得し、解析した。バイオリン図は箱ひげ図と同様に、第 1 四分位点、中央値、第 3 四分位点があらわされるのと同時に、すべてのデータの分布データが示される。サンプルのバラツキをわかりやすく表示することができるグラフである。図 3-8 からわかるように、図 3-10 の 1) 左の非照射群の時間経過では、時間とともにクローンサイズが増加していることがわかる。その中でも 8 週から 12 週にかけては平均値の比較で約 1.17 倍とゆるやかに増加していた。2 Gy 被ばく群でも同様に、タモキシフェン投与後 8 週まではクローンサイズが増加していた。それが 12 週になると、クローンサイズが有意に減少していた。0.1 Gy 被ばく群は顕著な変化は見いだされなかった。

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サイズが増加していた。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サイズが減少していた。

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、有意にクローンサイズが増加していたが、マウス個体差に依存する可能性が示唆された。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。

クローンサイズの変化

1) Time course (線量ごと)



2) 線量依存性

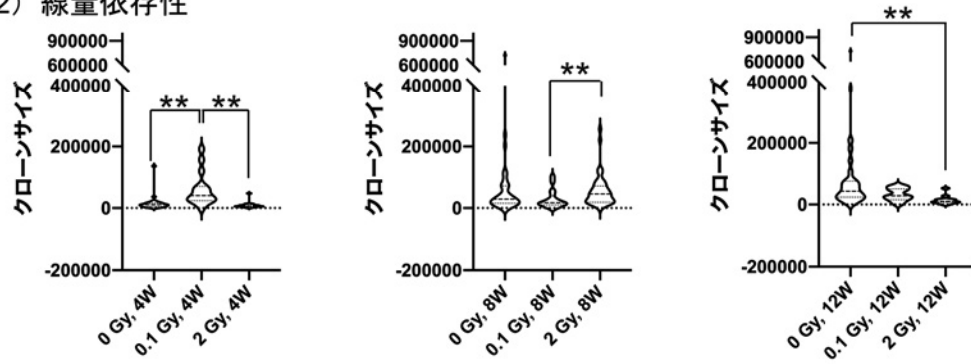


図 3-10 K14-tdTomato マウスにおけるクローンサイズの変化

1) 線量ごとの時間的变化、2) 時間ごとの線量依存性

Kruskal-wallis 検定、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ を示す。

3.1.2 令和3年度実施内容及び成果

A) 細胞系譜追跡実験系の構築

(1) 目的

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) 方法

マウスの維持、遺伝子型の判定は 3.1.1 で述べたとおりである。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。

(3) 結果

3.1.1 で示した 4 種類の遺伝子組み換えマウス (K14 マウス、K8 マウス、tdTomato マウス、Brainbow マウス) を実験に用いるために、それぞれのマウスを維持繁殖させ、適切にトランスジーンが引き継がれていることを確認する必要がある。出生したマウスの耳や尻尾を採取し、そこから DNA を抽出し、特異的なプライマーセットを用いた PCR を行った。ここでは Brainbow マウスの遺伝子型の判定例を示す (図 3-11)。このマウスでは PCR 反応産物について、アガロースゲル電気泳動を行うことにより、野生型だと 386 塩基対、ヘテロだと 300 と 386 塩基対の 2 種類、ホモだと 300 塩基対の電気泳動結果が得られる。既知のサンプルを用いたポジティブコントロール実験を同時に実施することで、確認したいマウスの遺伝子型が判別できる。

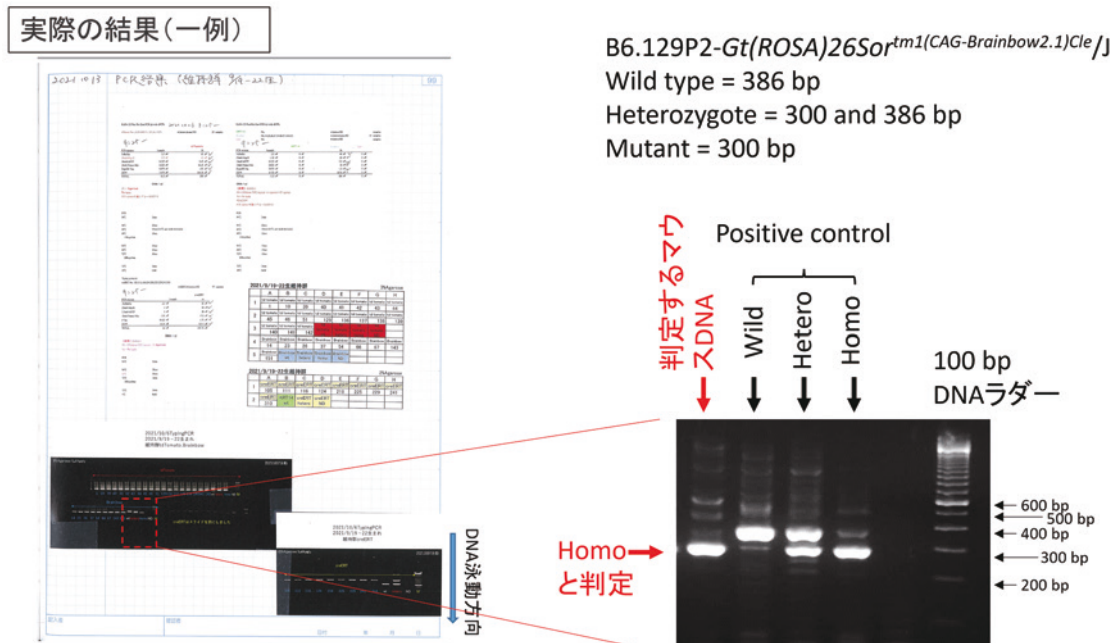


図 3-11 遺伝子型判定結果 (一例)

4 種類の遺伝子組み換えマウスのうち、K14 マウスと K8 マウスは、トランスジーンの一部と、野生型の部位とに特異的なプライマーセットを設けているため、トランスジーンの有無（言い換えると野生型マウスとホモマウス）は PCR 産物のアガロースゲル電気泳動法で区別が可能であるが、トランスジーンを両親から受け継いだホモと片親からのみ受け継いだヘテロを区別することはできない。そこで 1 コピーの差を検出する定量 PCR を用いた。図 3-12 に示すように、PCR 反応を行う際の DNA 量をそろえているために、野生型の PCR 産物はほぼ同程度の増幅曲線（このことは同程度の野生型の DNA 量が存在していたことを示す）が得られた状態で、トランスジーンはホモとヘテロで異なる増幅曲線が得られた。それを計算すると、ホモはヘテロの約 2 倍の遺伝子量を持つことがわかり、このことからマウスの区別が可能となる。

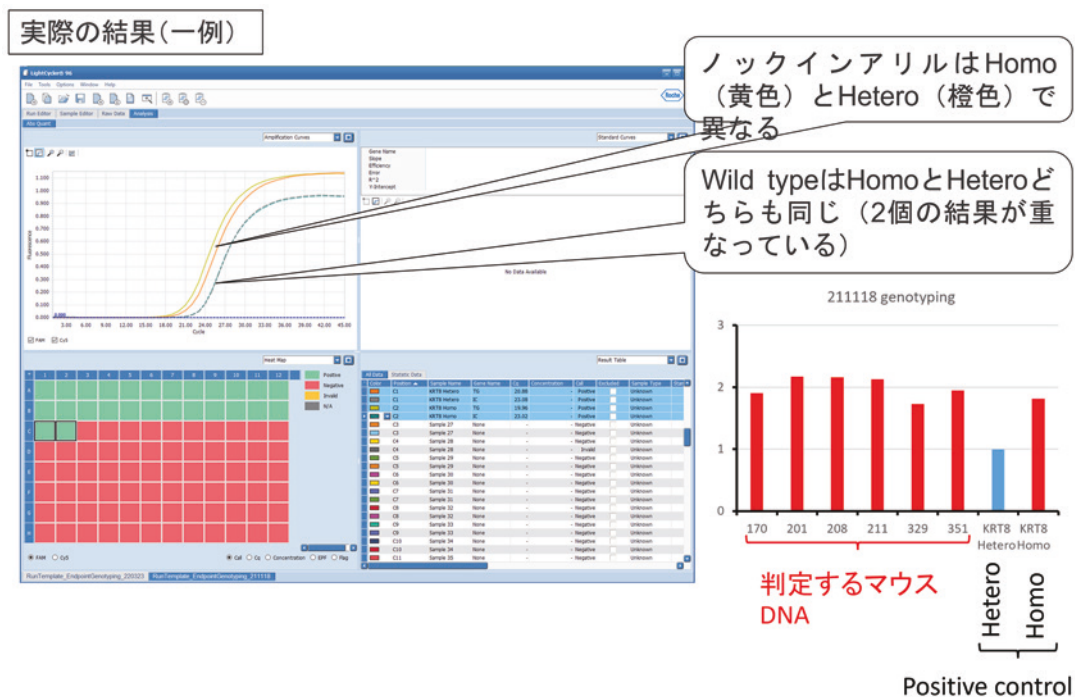


図 3-12 リアルタイム PCR を用いた遺伝子型判定結果（一例）

次に、前述のとおり、細胞系譜追跡を行うためには、特定のプロモーターの下流に CreERT2 配列があり、そのプロモーター活性がある細胞で CreERT2 が発現する Cre マウスと、タモキシフェンと結合した CreERT2 が核内に移行することで終止コドン除去し、蛍光タンパク質が恒常的に発現するレポーターマウスの、2 種類のマウスの仔マウスを用いる必要がある。それぞれのトランスジーンが引き継がれていることを確認するために、出生したマウスの耳や尻尾を採取し、そこから DNA を抽出し、特異的なプライマーセットを用いた PCR を行った。ここでは K8 と Brainbow のそれぞれのトランスジーンを受け継ぐ K8-Brainbow F1 マウスの例を示す（図 3-13）。8 匹のマウスから得られた DNA を使い、K8 と Brainbow マウ

それぞれに特異的なプライマーセットを用い PCR を行くと、どちらもヘテロの結果が得られ、これにより、以下の実験に用いることができるマウスが得られたことが確認できた。これらの確認は、事業期間を通し、随時行った。

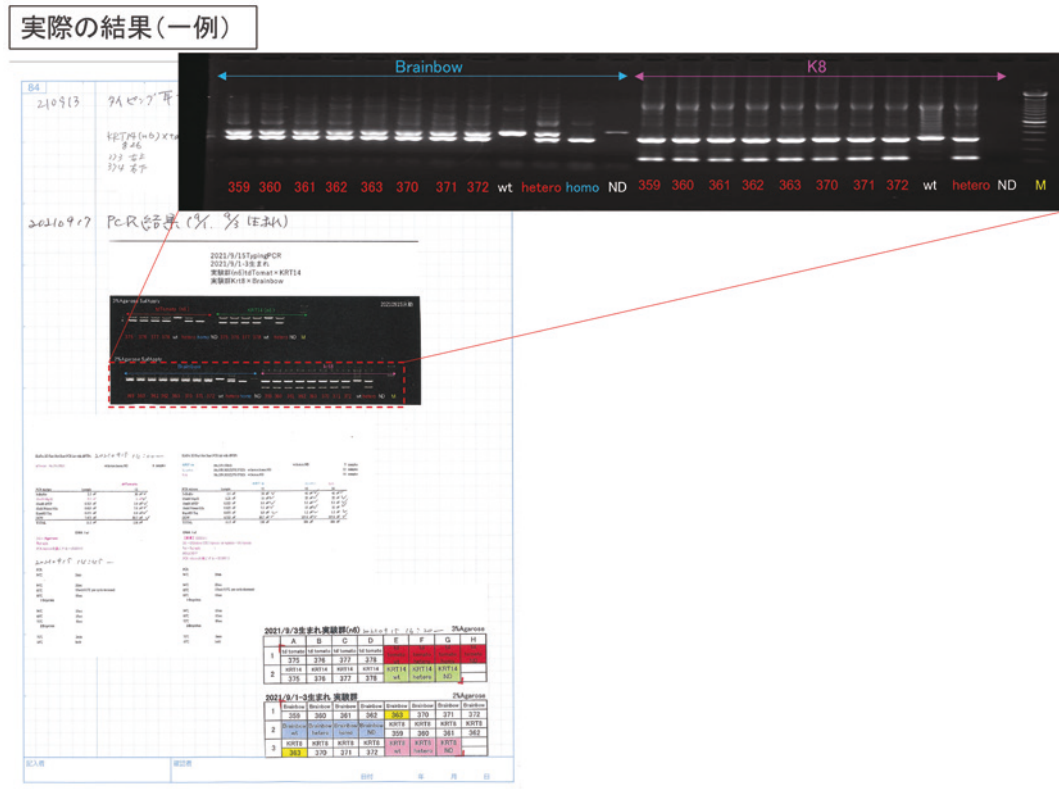


図 3-13 解析用 F1 マウスの遺伝子型判定結果 (一例)

B) 細胞系譜追跡技術を用いた被ばくによる幹細胞動態解析

(1) 目的

3.1.1 で検討したタモキシフェン投与量を用い、K8-Brainbow F1 雌マウスに対し、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。

(2) 方法

マウスの維持、遺伝子型判定、タモキシフェン投与、放射線照射、組織採取及び乳腺の内在性蛍光タンパク質は 3.1.1 で述べたとおりである。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。

(3) 結果及び考察

内腔細胞を追跡可能な7週齢 K8-Brainbow F1 雌マウスに対し、タモキシフェンを 25 g 体重あたり 0.2 mg で腹腔内投与し、翌日にガンマ線照射を行った。その後、飼育を続け、4週、8週、12週後に乳腺を採取した。3.1.1 で述べた K14-tdTomato F1 雌マウスと同様の処理を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

その結果、非照射群はタモキシフェン投与後、8週まで赤色または黄色のクローンサイズが増加していることがわかる。しかしながら、K14-tdTomato F1 雌マウスと異なり、投与後8週から12週にかけて、クローンサイズが減少することがわかった。これは既報にあるように、完全な内腔幹細胞を追跡しているのではなく、内腔前駆細胞を追跡していることが示唆された[8]。そのような条件でも 2 Gy 照射群では、照射後8週まで増加したクローンサイズが維持されるものの、12週後にはそれが減少することが明らかとなった（図 3-14、いずれも破線で囲まれた領域）。

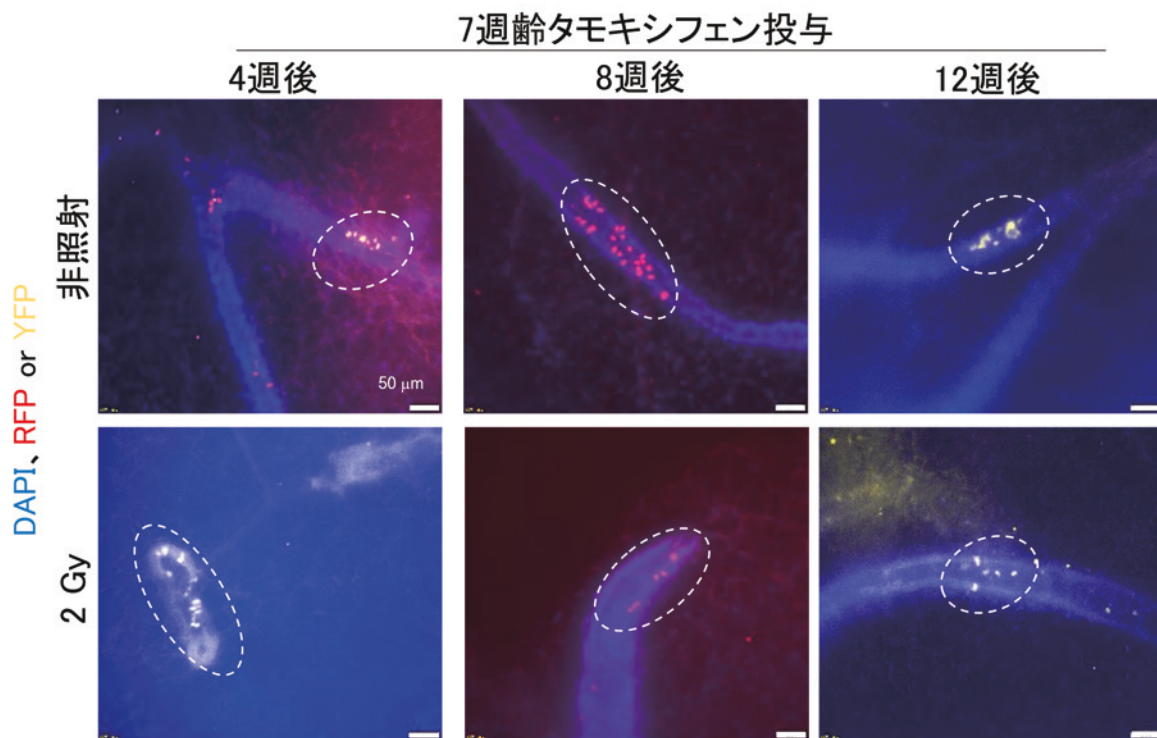


図 3-14 K8-Brainbow マウスを用いた非照射群（上段）と 2 Gy 被ばく群（下段）におけるクローンサイズの変化（典型例）

蛍光シグナルの表面積を算出し、バイオリン図としてプロットしたものを図 3-15 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 8 か所の画像をランダムに取得し、解析した。図 3-14 からわかるように、図 3-15 の 1) 左の非照射群の時間経過では、投与後、8 週までクローンサイズが

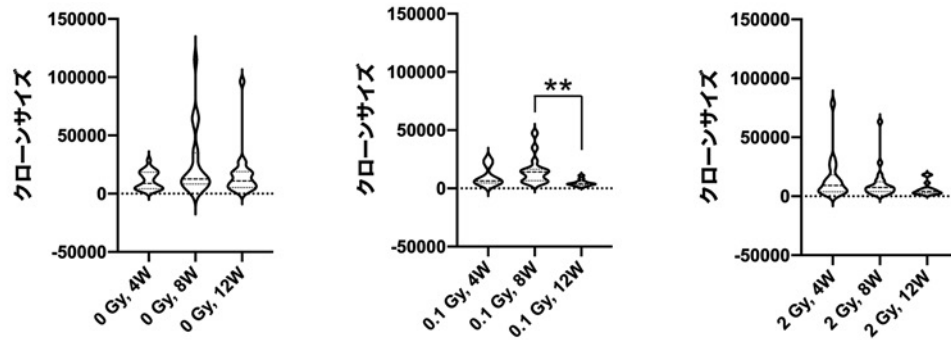
増加し、その後、減少しているのがわかる。0.1 Gy 照射群では、投与後、8 週までクローンサイズが増加し、その後、有意に減少していた。2 Gy 照射群では投与後、4 週以降は、増加したクローンサイズが抑制される傾向にあることがわかった。それが 12 週になると、クローンサイズが有意に減少していた。

同じ解析結果をタイムポイントごとに示したのが図 3-15 の 2) である。タモキシフェン投与後 4 週ではほとんど変化はなく、8 週では非照射群に比べ 2 Gy 被ばく群で有意に減少していた。12 週では、非照射群に比べ、0.1 Gy ならびに 2 Gy 被ばく群で有意にクローンサイズが減少していた。

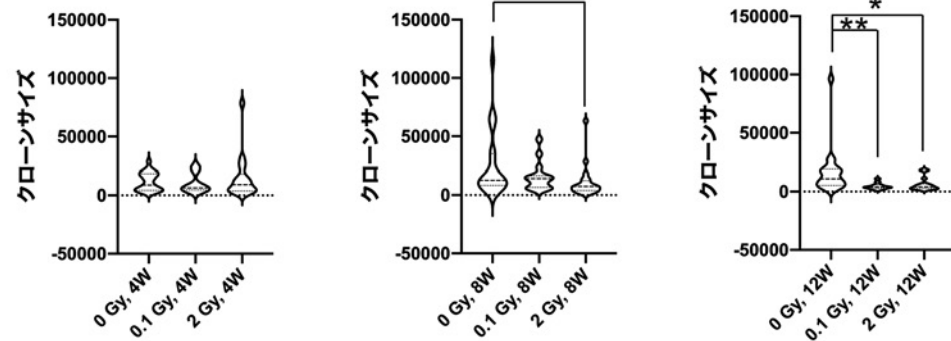
K8-tdTomato F1 雌マウスでは 0.1 Gy でも 12 週後に有意にクローンサイズが減少していたことから、さらに低線量について検討した。ここでは 4 匹のマウス両側の第 3 乳腺を用い、最低でも 49 か所の画像をランダムに取得し、解析した。その結果、非照射群と比較して、0.05 Gy 照射で有意なクローンサイズの減少が観察された。一方で 0.03 Gy 照射では有意な変化は観察されなかった (図 3-15 の 3))。この結論は現時点での検討結果から導き出されているため、今後の実験の反復回数によっては、必ずしも非照射群と 0.03 Gy 照射の間に違いがないとはいいきれないかもしれない。そもそも非照射 0 から 0.03 Gy と 0.05 Gy の間に生物学的に決定的な違いがあるのだろうか。非照射から線量が増えるごとに変わる線量依存的な現象である可能性も排除できないと考えられる。今後、さらなる生物学的な知見に加え、線量と DNA 損傷量、クローンサイズの動態との関係を数理モデルで解き明かす試みなどが求められると言える。

クローンサイズの変化

1) Time course (線量ごと)



2) 線量依存性



3) 線量依存性 (低線量域)

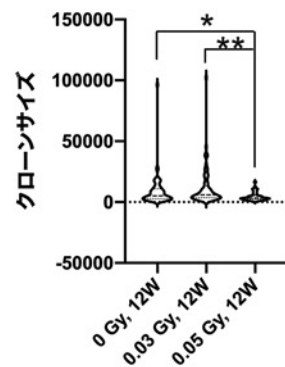


図 3-15 K8-Brainbow マウスにおけるクローンサイズの変化

1) 線量ごとの時間的变化、2) 時間ごとの線量依存性、

3) 低線量被ばく 12 週後の線量依存性

Kruskal-wallis 検定、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ を示す。

本研究で用いた遺伝子組み換えマウスは K14 マウスが ICR 系統、K8、Brainbow、tdTomato マウスが C57BL/6 系統で作られている。この ICR や C57BL/6 系統は、乳がんになりやすい系統ではない。そのため、これらマウス系統の F1 マウスでは、乳がんになりやすいとは想定されない。そこで、乳がんになりやすいことが知られている BALB/c マウスに戻し交配を行った。戻し交配とは異なる系統との雑種の子孫を、再び片方の親と同じ系統と掛け合わせることを指し、本研究では BALB/c の親とトランスジーンが引き継がれた子孫とを、繰り返し掛け合わせトランスジーン以外は BALB/c の遺伝的背景に置換する作業である。一般的に 10 世代を繰り返すとほぼ 100%、BALB/c に遺伝的背景が置換されるが、それには 3 年程度かかることが多い。そのため、理論的に約 94% が BALB/c に置換されたマウスを用い、K8-Brainbow F1 雌マウスを作出して、同様の実験を行ったところ、2 Gy 被ばく後 8 週と 12 週でクローンサイズが減少する傾向にあることが観察された (図 3-16)。以上のことから、乳がんになりやすい系統でも時間と共に増加するクローンサイズが被ばくにより抑制されることが示され、この現象の普遍性が示唆された。

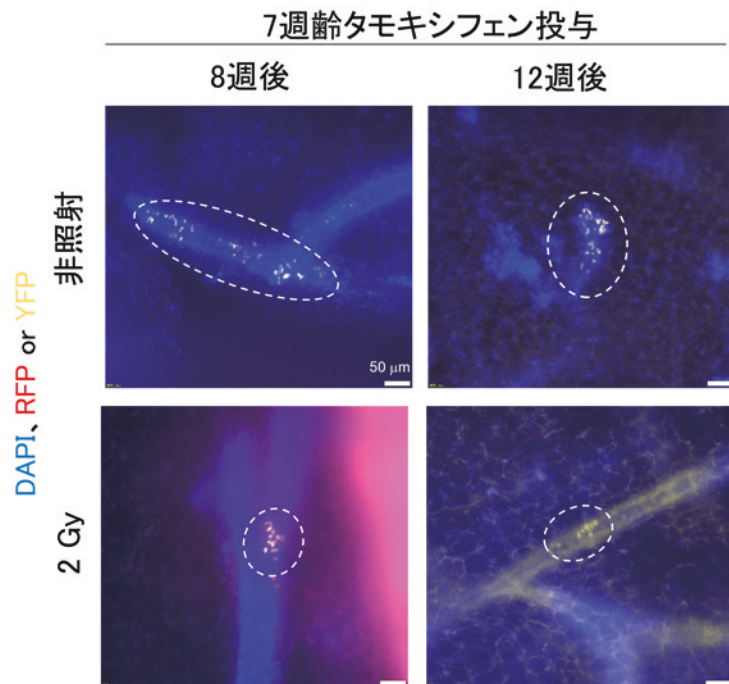


図 3-16 BALB/c 系統に置換した K8-Brainbow マウスを用いた非照射群 (上段) と 2 Gy 被ばく群 (下段) におけるクローンサイズの変化 (一例)

クローンサイズの動態以外にこの細胞系譜追跡では被ばくによる興味深い変化が観察された。1 つ目が分化異常である。組織は未分化な細胞 (幹細胞や前駆細胞を指す) が、機能的細胞 (例として乳腺における乳汁を産生する細胞など) に分化し、その恒常性を維持し

ている。その階層性は一般的には未分化から分化の一方向であるが、組織恒常性の破綻が起これと、その一方向性が乱れることが知られている。それを分化異常と呼ぶ。この場合、細胞が直接分化転換によって異なる細胞種になるのか、それとも現在よりも未分化な状態へ逆戻りしてから別の経路へと進むのかは、明らかとなっていない。

今回、K14-tdTomato F1 雌マウスを用いた基底細胞の追跡により、ごくまれに被ばく群で内腔細胞様の形態を示すことが明らかとなった（図 3-17 右、分化異常）。内腔細胞追跡に用いる K8 を免疫染色すると tdTomato 赤色蛍光タンパク質を発現する細胞とオーバーラップすることから、内腔細胞に分化異常していることが示された。これまでの解析では、非照射群では観察されず、0.1 Gy でも 2 Gy でも観察される傾向にあった。この分化異常については、シスプラチン投与で皮膚基底上層細胞が枯渇すると、炎症反応を惹起するためのたんぱく質複合体インフラマソームが周囲の線維芽細胞で活性化し、インターロイキン (IL)-1 β 分泌を通して、分化異常を引き起こすこと、さらに乳腺でも基底細胞が内腔細胞になることが報告されている [9]。シスプラチンは DNA 損傷を誘導する抗がん剤として知られているので、放射線でも同様のことが生じていることが示唆される。

2 つ目が細胞老化である。細胞老化とは増殖する細胞が増殖刺激に抗い、細胞周期が停止した状態が続くことを指す。加齢や放射線などのストレスが細胞老化を誘導し、組織中に「老化細胞」が生じる。老化細胞は炎症性サイトカインを多量に分泌することで慢性炎症を引き起こし、発がんの要因となると考えられている [10]。

前述のとおり、K14-tdTomato F1 雌マウスと K8-tdTomato F1 雌マウスで観察される、時間と共に増加するクローンサイズの被ばくによる抑制について、そのメカニズムを検討したところ、周期細胞の割合が被ばくにより減少する傾向にあることが明らかとなった。また、細胞老化のマーカーの 1 つである p16 タンパク質の蓄積を免疫染色で検討したところ、被ばく後 8 週でその発現が増加する傾向にあることが明らかとなった（図 3-17 左、細胞老化）。以上のことから、増加するクローンサイズの抑制は、一部細胞老化が関与している可能性が示唆された。

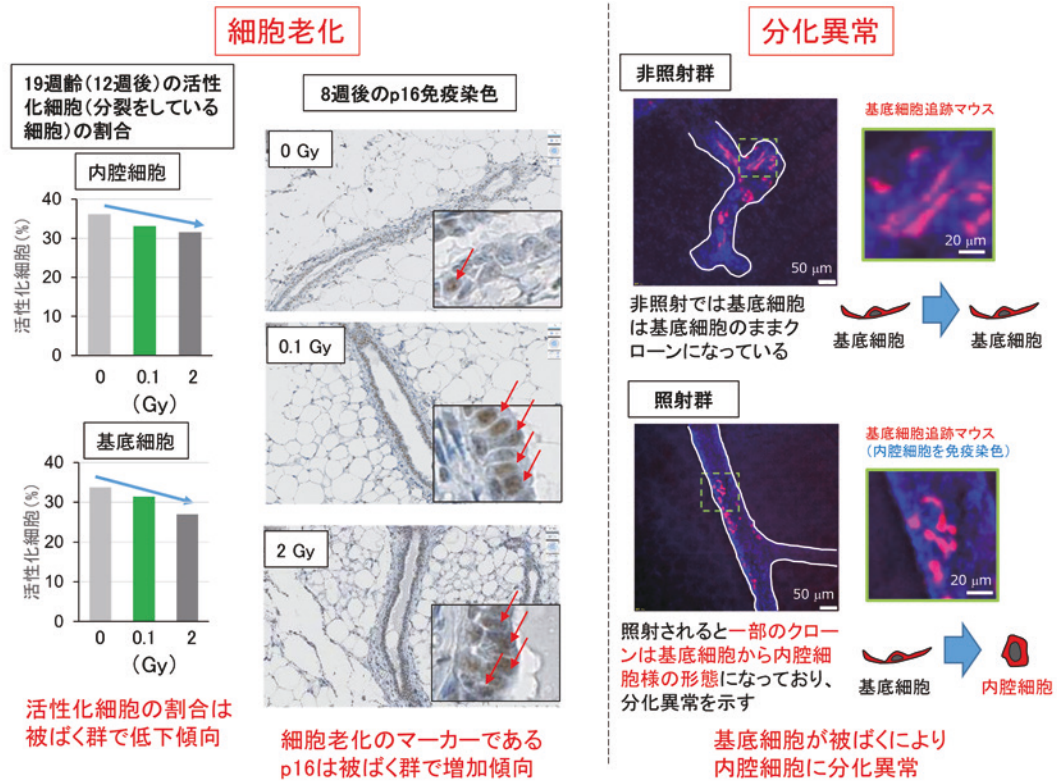


図 3-17 細胞老化と分化異常について

3.1.3 まとめ

本研究で用いた K14、K8、tdTomato、Brainbow の 4 種類のマウスについて、維持・繁殖させた。適宜、PCR 法で遺伝子型の確認を行った。同様に、K14-tdTomato F1 雌マウス、K8-tdTomato F1 雌マウス、K8-Brainbow F1 雌マウスについて、2 種類のトランスジーンが引き継がれていることを PCR 法で確認した。

上記の 3 種類の F1 雌マウスについて、タモキシフェン投与の至適濃度の検討を行ったところ、K14-tdTomato F1 雌マウスは体重 25 g あたり 1.5 mg、K8-Brainbow F1 雌マウスは体重 25 g あたり 0.2 mg がタモキシフェン至適濃度であることが明らかとなった（表 3-2）。

表 3-2 本研究におけるタモキシフェン至適濃度

系統名	至適濃度
K14-tdTomato F1 マウス	1.5 mg/25 g 体重
K8-tdTomato F1 マウス	－（タモキシフェン非投与でも赤色蛍光タンパク質が検出されたため）
K8-Brainbow F1 マウス	0.2 mg/25 g 体重

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、クローンサイズが有意に減少することを見出した。7 週齢 K8-Brainbow F1 雌マウスにタモキシフェンを投与後、0.1 Gy または 2 Gy 被ばくした 12 週間経過後のマウス乳腺では、非照射群に比べ、クローンサイズが有意に減少することを見出した。さらに 0.05 Gy でも有意に減少したが、0.03 Gy では観察されなかった。ここでは統計学的な有意差を示しているが、解析数には限りがあるため、結果の解釈には注意を要するとともに、さらなる検討が必要であると考えられる。本研究で明らかになったクローンサイズの被ばくによる減少は、現状では細胞系譜追跡実験系でないと観察することはできないと考えられる。同様の研究手法として、遺伝子バーコーディングと呼ばれる、マウス個体の細胞のゲノム DNA にさまざまな組換えを起こさせ、それを指標に解析する研究手法が知られている[11]。この遺伝子バーコーディングを用いることで、同じクローンは同一の組換えが起こった DNA 配列を指標に評価が可能のため、本研究で見出されたクローンサイズ減少が追試されることが期待される。

放射線は一般的に DNA に損傷を与えることで生物学的な作用を引き起こすため、線量に依存してその作用が大きくなることが考えられる。解析数には注意が必要であるが、K14-tdTomatoF1 雌マウスの実験では、被ばく後 12 週間経過では、2 Gy 被ばくが 0.1 Gy 被ばくよりも傾向としてよりクローンサイズが減少しているように見える。DNA 損傷量とクローンサイズの減少には相関があるのかもしれない。一方で、K8-Brainbow F1 雌マウスの実験では、0.1 Gy と 2 Gy 被ばくの間で大きな違いはないように見えるが、これは DNA 損傷が主にクローンサイズの変化を引き起こしていないことを示唆している。このような現象は放射線の非標的効果と呼ばれ、例えば周囲環境の炎症性変化がこのクローンサイズの変化に関

わっているのかもしれない[12]。いずれにしても、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

被ばくによるクローンサイズの変化に加え、被ばくにより乳腺組織では分化異常と細胞老化が引き起こされていることが示唆された。放射線被ばくした乳腺組織における分化異常については、これまで報告されておらず、細胞系譜追跡を用いたことによる貴重な成果と結論付けられる。現在、放射線誘発乳がんは基底細胞、内腔細胞どちらが起源細胞なのか証明されていないが、この細胞系譜追跡を乳がんが生じるまでの長期間にわたり解析することで、将来的に明らかにできると考える。

細胞老化と乳腺について、乳腺細胞は、間質の線維芽細胞よりも DNA 損傷などによる老化に感受性が高く、IL-6 や IL-8 を放出し、周囲微小環境の線維芽細胞を活性化させ、慢性炎症を引き起こし、乳がんの進展や悪性化に寄与していることが報告されている[13]。さらに放射線誘発ラット乳がんにおいて p16 遺伝子やそのタンパク質発現の亢進が見出されている[14]。今回、放射線被ばくにより引き起こされる増加するクローンサイズの抑制というイベントで、細胞老化の関与が示され、それががん化を促進する可能性が示唆された（図 3-16）。

3.2 数理モデルによる幹細胞の動態解析

3.2.1 令和2年度までの実施内容及び成果（概要）

A) 2次元空間構造を含む乳腺組織動態の数理モデル構築

(1) 目的

既存の知見及びすでに得られている予備的な細胞系譜追跡データを参考に、組織内の細胞の種類や空間上の配置を決め、幹細胞クローンの系譜をそれぞれ区別できるようにするために解析環境の整備を行い、2次元格子空間上で分裂、死亡、分化が確率性を持って継続的に引き起こされている乳腺組織をコンピュータ上に再現する。

(2) 方法

マウス実験による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次元格子空間をコンピュータ上に構築した。横長の空間構造になっており、上下は周期境界条件とすることによって、管の特性を考慮した。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。この細胞の入れ替わりを1単位時間とする。乳腺組織には複数種類の細胞が存在するが、本シミュレーションでは、乳管上皮細胞とその前駆細胞の2種類の細胞を細胞分裂速度が異なるものとして導入した。以上の条件で、組織の細胞が入れ替わり、クローン頻度に移り変わっていく様子を表すシミュレーションアルゴリズムを開発した。

実際のシミュレーションでは、はじめに50×100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した。擬似乱数によって死亡する細胞を決定し、例として、 (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、乳管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) の近傍の細胞が乳管上皮細胞1つ、前駆細胞3つの場合、乳管上皮細胞が選ばれる確率は $1/(1+3s)$ 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と言える。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と考えている。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変化する様子を調べることができる。

(3) 結果及び考察

はじめに、最も単純な条件として、50×100の空間に敷き詰められた同種の細胞が入れ替わりによって、それぞれのクローン頻度が変化していく様子をコンピュータシミュレーションによって計算した（図3-18）。時間は空間上の全ての細胞が入れ替わるまでの時間を1（シミュレーションの1ステップを1/5000）とした。図3-18(a)の色はそれぞれのクロー

ンの ID を表しており、初期細胞は全て別のクローンから始まるとした。図 3-18(a) で、時間と共に同じ色が固まっていく様子は同じ祖先のクローンが空間上で広がっていく様子を表している。また、クローン頻度の変化として、Simpson's index (D) を用いた。この指標は、 $D = 1 - \sum_i p_i^2$ として計算する。ここで、 p_i はクローン i の集団内頻度になる。集団内の全ての細胞が別クローンであれば、 p_i が非常に小さくなり、Simpson's index (D) が 1 に近づく。この指標は集団内の多様性を表しており、シミュレーションの初期条件として、全ての細胞を別クローンと考えるとすると、最初は Simpson's index が 1 に限りなく近い状態からスタートする (図 3-18(b))。その後、シミュレーションアルゴリズムに従って、2 次元格子空間上で細胞の入れ替わりが起こっていくと、確率的に、空間上で広がっていくクローンが出現し、その結果、集団上の多様性は減少する (図 3-18)。このシミュレーションは確率的な影響を受けるので、全く同じ条件でシミュレーションした別の 2 例も示す (図 3-19)。多様性の変化は 3 例とも減少傾向にあり、似たような時間変化を示した。

次に、細胞を 50×50 の空間に敷き詰め、その後細胞が残りの空間 (50×50) に向かって成長していく様子を表すシミュレーションを行った (図 3-20)。図 3-20(a) で、 $t=0$ のときに白くなっている空間が細胞の埋まっていない空間で、時間と共に近い細胞が空間に広がっていく。この場合、 $t=200$ の時点 (全細胞が 200 回入れ替わりを行った時点) で全ての空間を埋めていることがわかる。この例では、 $t=6500$ 前後で多様性の指標が 0 になっているので、その時点で空間を 1 つのクローンが埋めたことがわかる (図 3-20(b))。また、図 3-20(a) を見ると、成長した場所 (右側) に関しては、色が同一であることから、同じクローンが広がりやすくなっており、多様性が非常に低くなっていることがわかる。本条件でも確率的な影響を確認するために、同じ条件で 2 例行った結果を示す (図 3-21)。この結果を見ると、多様性が失われることが 2 例で確認されており、成長なし条件に比べて、多様性が失われやすい可能性を示唆している。

さらに、乳腺組織に 2 種類の細胞が存在しているとして、それらの細胞分裂頻度が異なるとした場合に、クローン頻度の動態に影響があるかを調べた (図 3-22)。本条件では、機能している乳管上皮細胞と未分化な前駆細胞の 2 種類を考慮し、前駆細胞は乳管上皮細胞よりも 1.5 倍細胞分裂速度が速いと仮定した。前駆細胞と乳管上皮細胞の初期存在比を 1:9 とした時の結果を示す (図 3-22)。細胞が死亡した場所に分裂する細胞は前駆細胞の方が確率的に高くなるので、1 種類の細胞の場合に比べて (図 3-18)、多様性が失われる速度が速いと考えられたが、本シミュレーションではその違いはそれほど大きくは見られなかった。また、この場合についても、確率的な影響を調べるために、同じ条件で 2 回シミュレーションを行った (図 3-23)。これまでとは異なり、多様性が単調に失われていくのではなく、ある時期にいったん多様性を取り戻すということも 2 例で確認された。

最後に、組織が成長する条件と細胞分裂速度の異なる 2 種類の細胞が存在する条件を合わせた場合のシミュレーションも行った (図 3-24)。組織が成長する効果としては、図 3-20 と図 3-21 から多様性が小さくなる傾向が挙げられる。細胞の種類が 2 種類ある効果としては、多様性が失われはじめてから、再び増大する傾向が挙げられる。これらの効果が合わさった結果として、図 3-24 では、比較的早い多様性の喪失が見られた。しかしながら、他 2 例を見てみると、1 例では早期の多様性喪失、1 例では、多様性の維持が見られ、確率的なばらつきが増大している可能性を示唆している (図 3-25)。

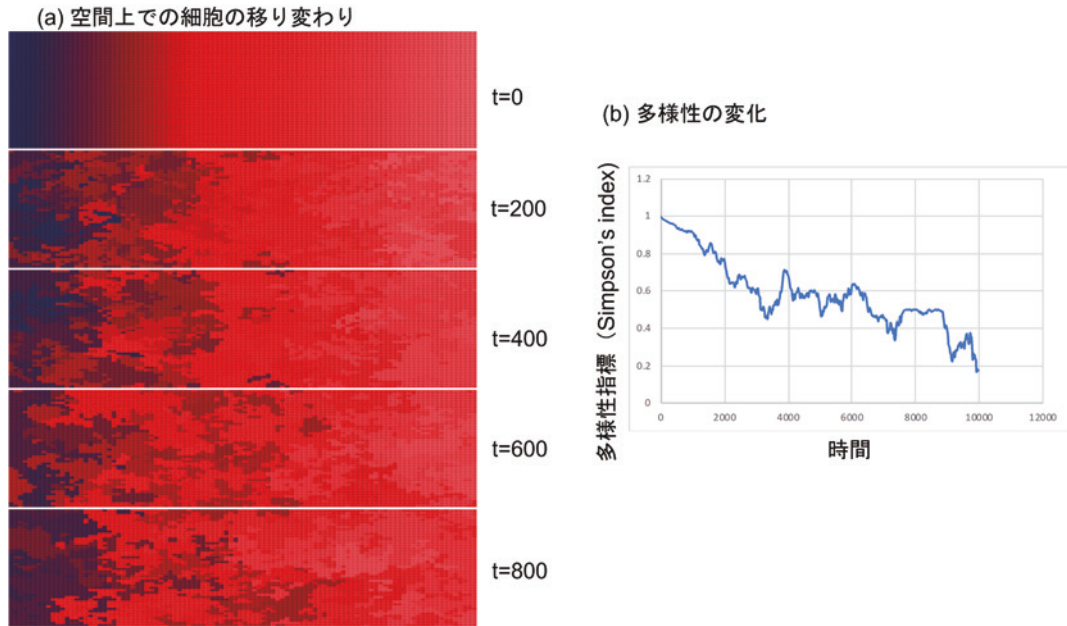


図 3-18 同種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果
(文献[5]より引用)

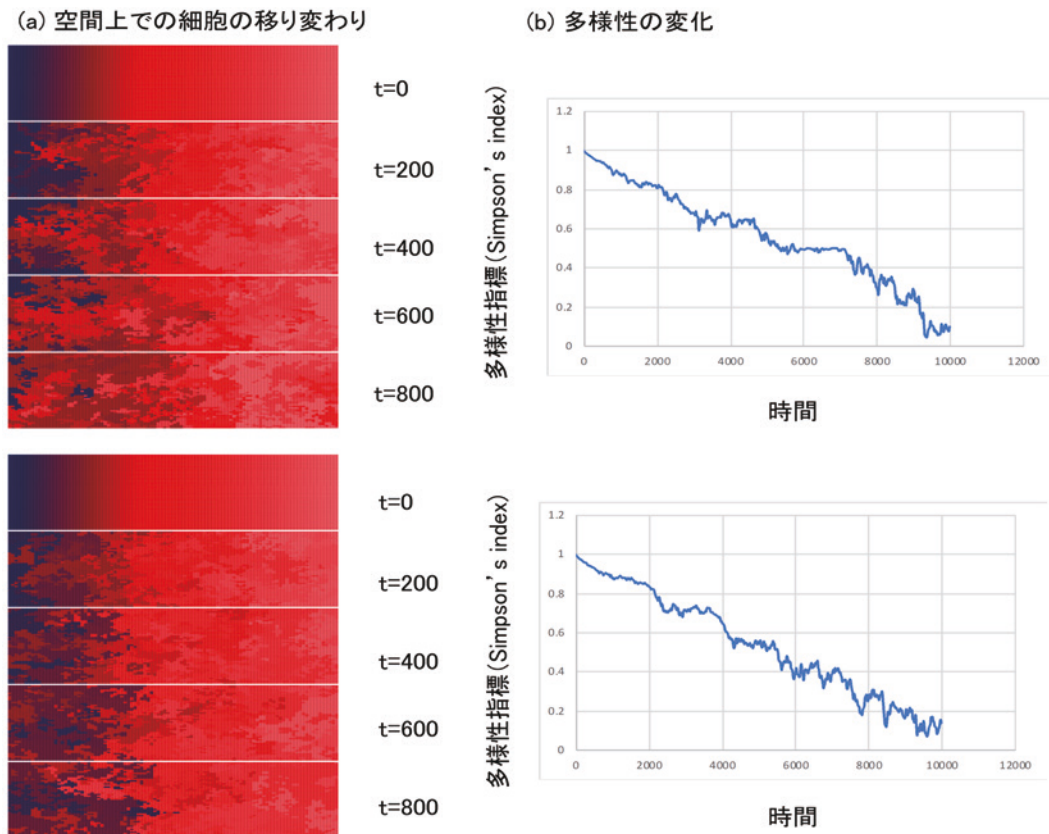


図 3-19 同種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果 (別 2 例)
(文献[5]より引用)

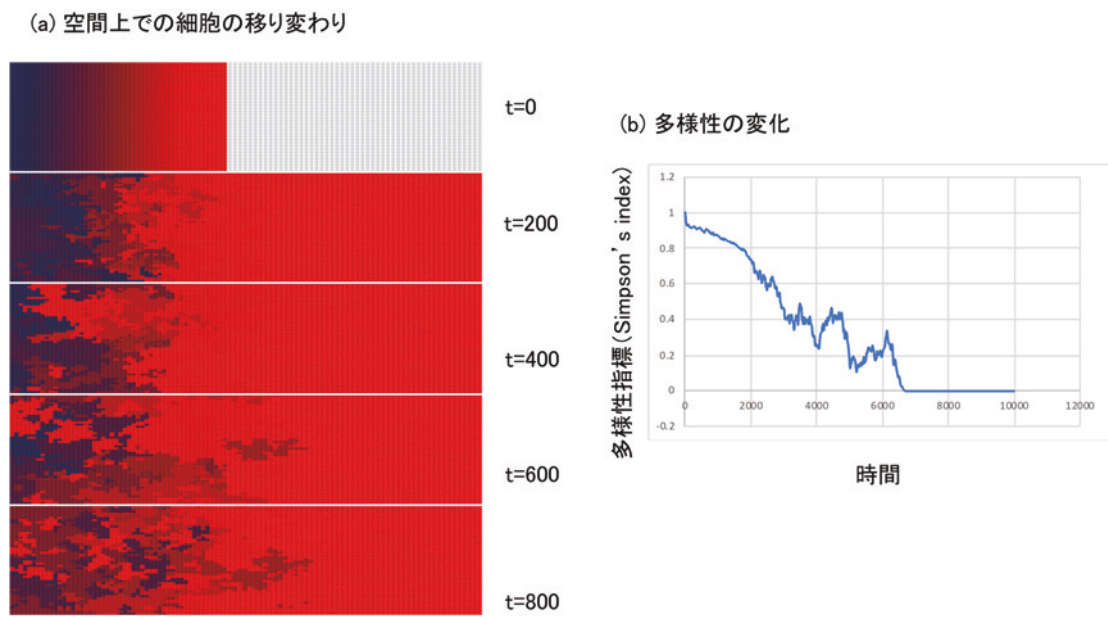


図 3-20 同種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果
(文献[5]より引用)

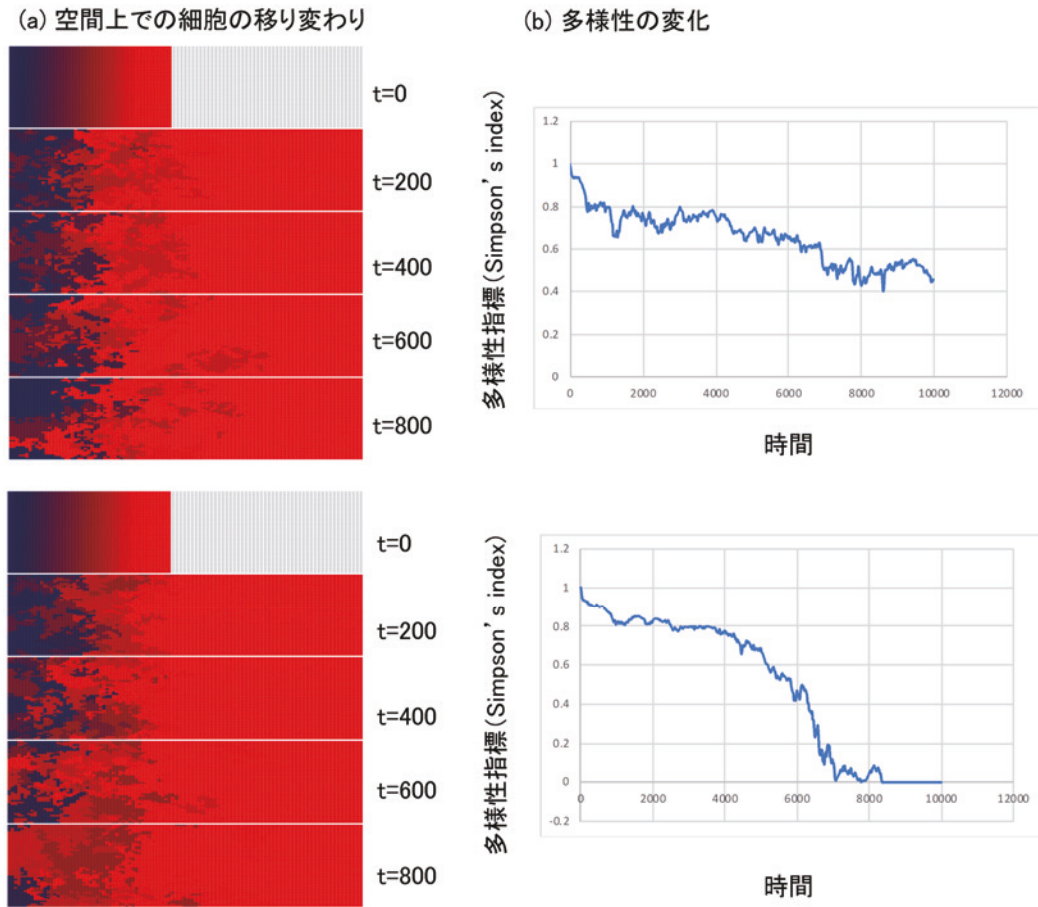


図 3-21 同種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果 (別 2 例)
(文献[5]より引用)

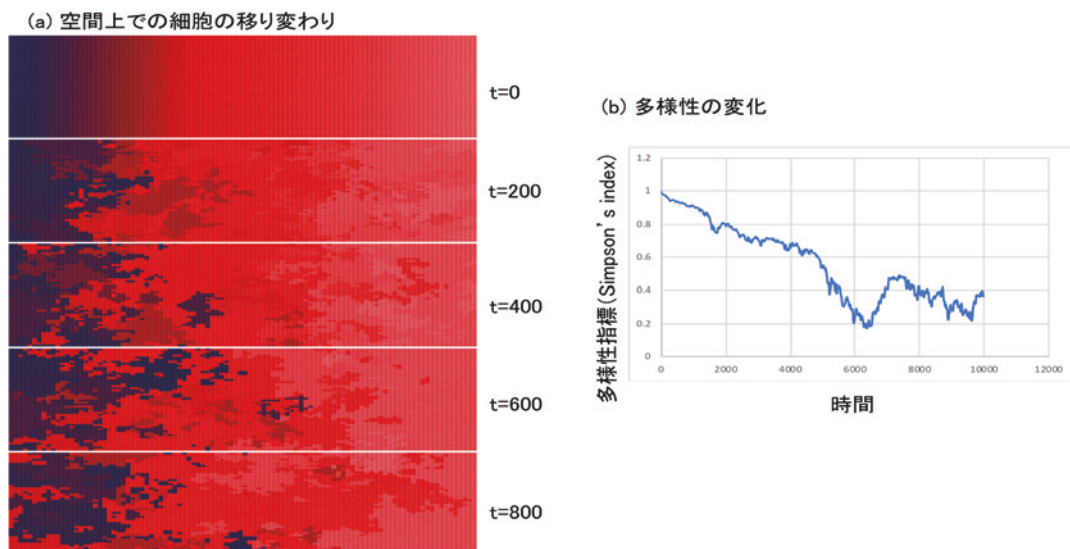


図 3-22 2 種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果
(文献[5]より引用)

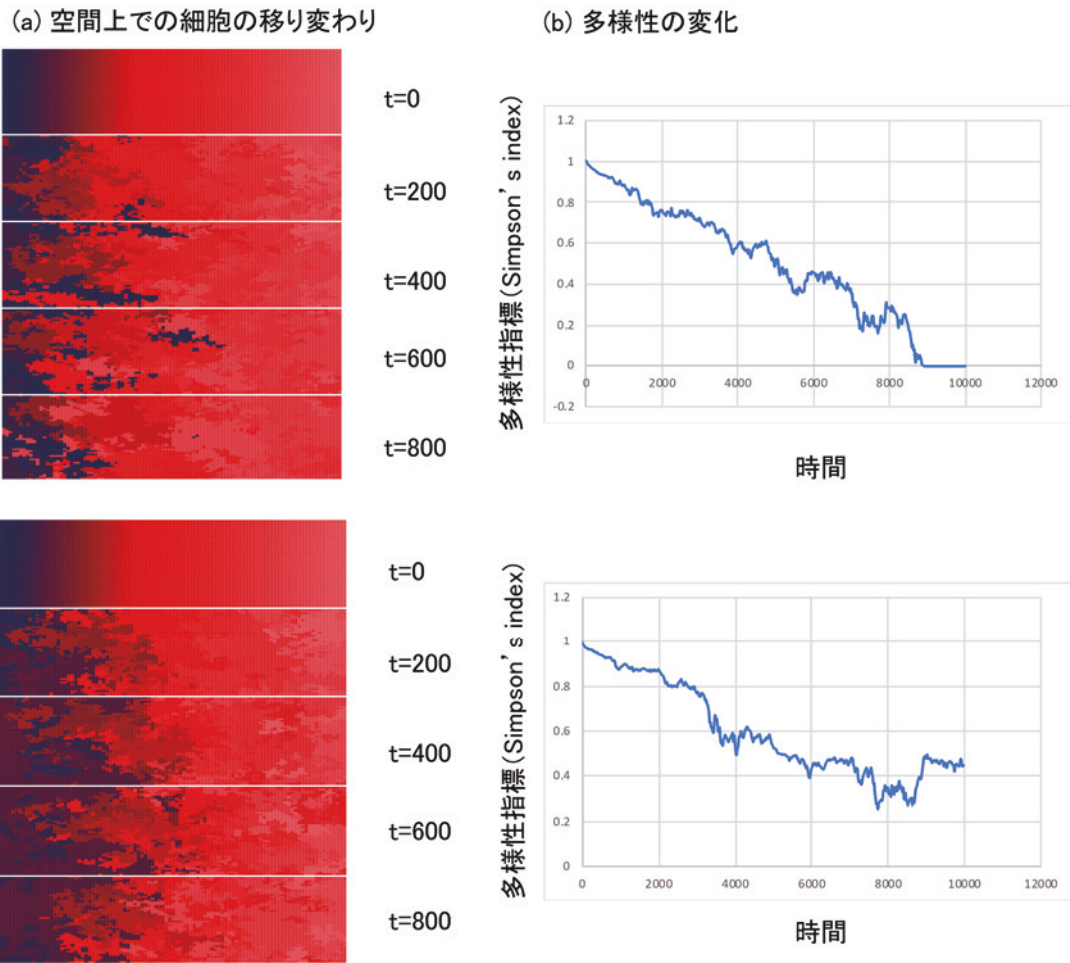


図 3-23 2 種細胞成長なし条件でのシミュレーション結果 (別 2 例)
(文献[5]より引用)

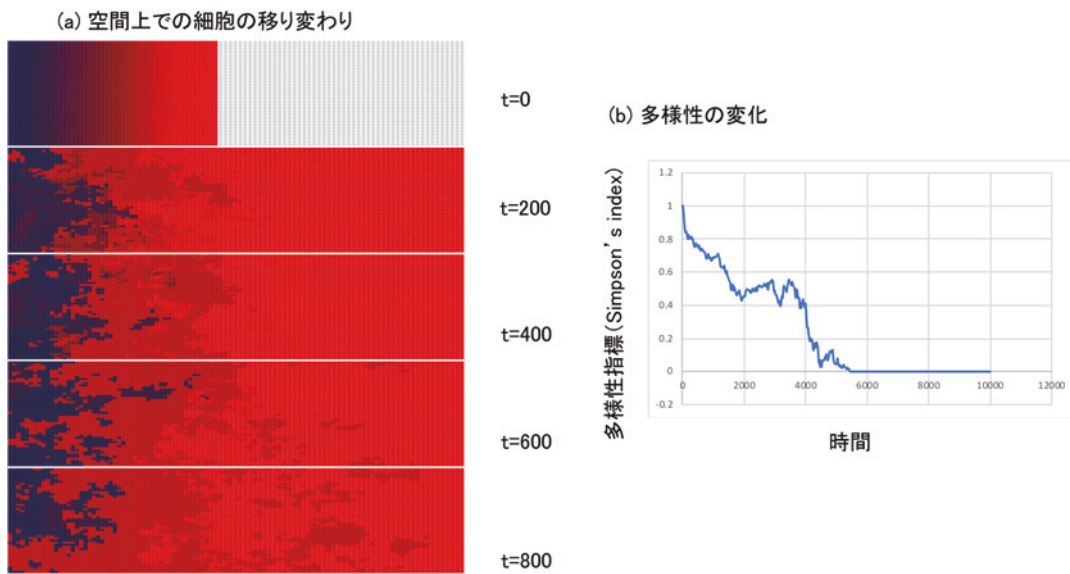


図 3-24 2 種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果
(文献[5]より引用)

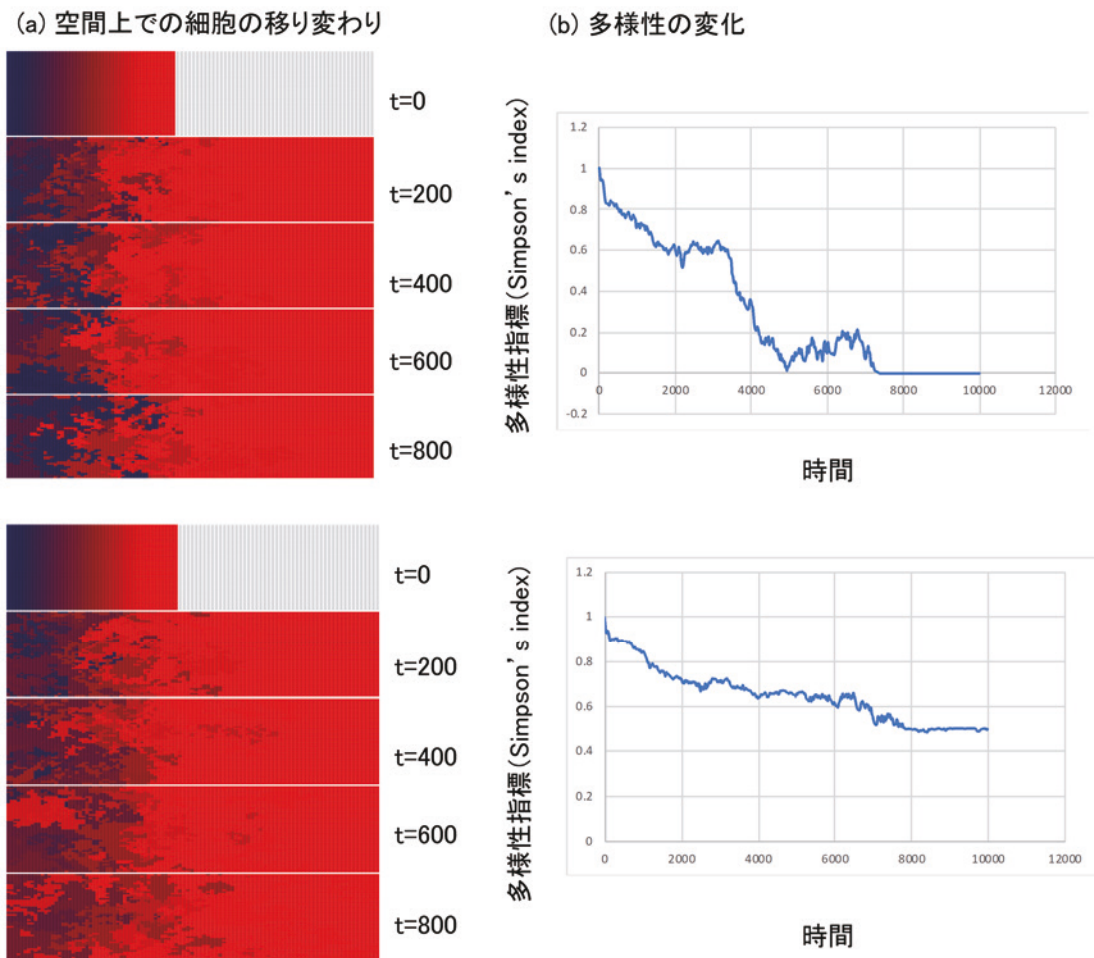


図 3-25 2 種細胞成長あり条件でのシミュレーション結果 (別 2 例)
(文献[5]より引用)

B) 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

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) 方法

① シミュレーションアルゴリズム

A) で構築した2次元格子空間のシミュレーションモデルを改めて簡単に説明する。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っている。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。

② 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) 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3-26）。

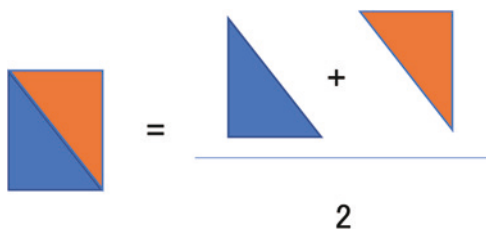


図 3-26 平均クローンサイズ概念
(文献[6]より引用)

例えば、図 3-26 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 3-27）。

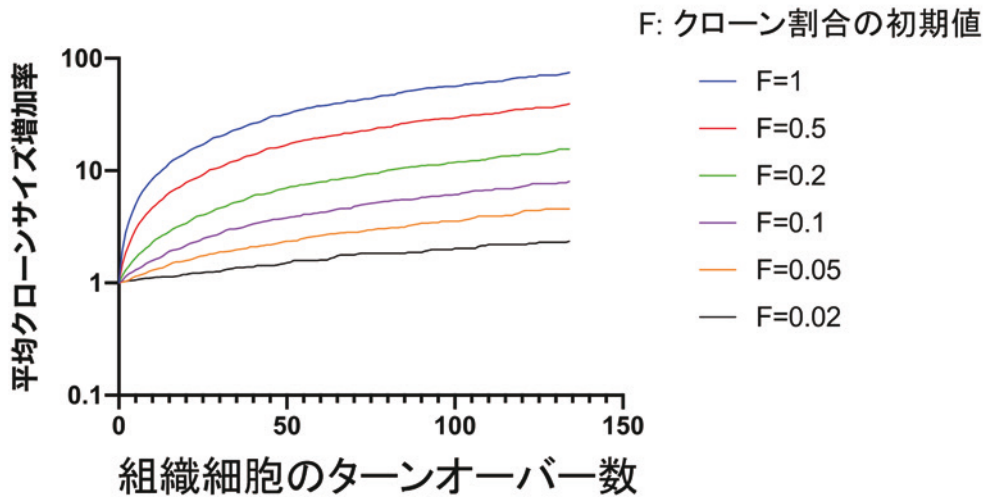


図 3-27 平均クローンサイズの変化（文献[6]より引用）

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 : F ）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 3-28）。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 3-28 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とき、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 3-28 黒線）。

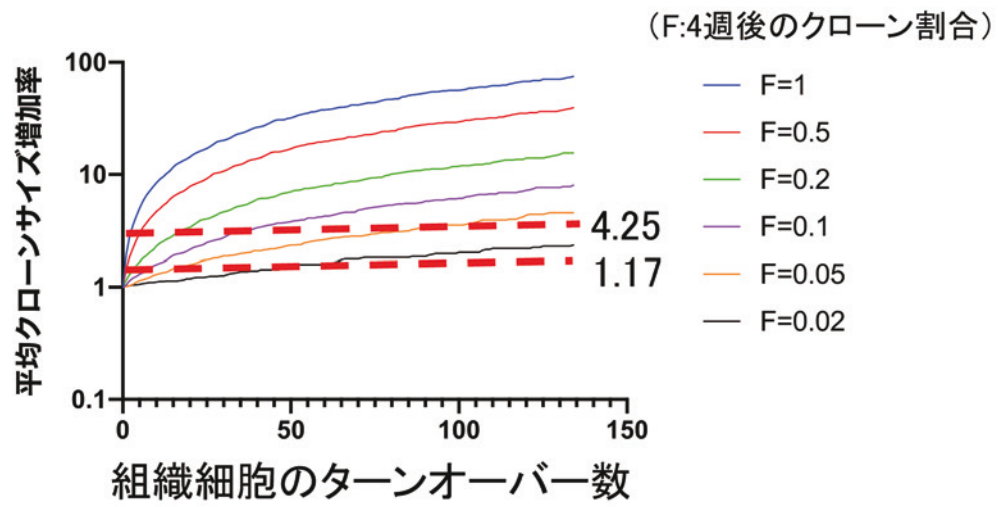


図 3-28 実験データと平均クローンサイズの変化
(文献[6]より引用)

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の取得方法を振り返ると、マウスの性成熟が終わる時期にタモキシフェンを投与し、細胞を識別する。その4週後、8週後、12週後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3-3）。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）を示すことが示された（表3-3）。

表 3-3 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
（文献[6]より引用）

	放射線照射なし	放射線 0.1 Gy	放射線 2 Gy
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3-28、表3-4）。

表 3-4 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（文献[6]より引用）

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
$F=1$	1/week	0.25/week
$F=0.5$	2.25/week	0.5/week
$F=0.2$	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3-4）。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 $1/5 \sim 1/4$ 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[15]。

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1）。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3-3）。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3-27）。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[16]、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3-29）。

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。

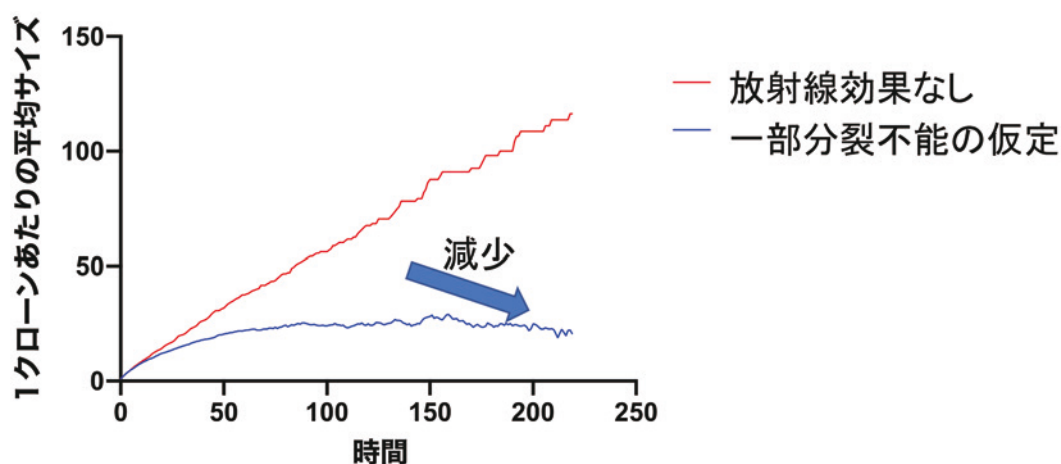


図 3-29 放射線照射効果を含めた平均クローンサイズの変化（文献[6]より引用）

3.2.2 令和3年度実施内容及び成果

A) 推定パラメータを用いた発がん過程の解析

(1) 目的

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、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。また、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) 方法

これまで構築した2次元格子空間のシミュレーションモデルを用いる。放射線照射によって“細胞老化様変化”が起こりやすくなると仮定し、“細胞老化様変化”によって分裂が起こりにくくなり、他組織からの分化によって細胞を補充するということが起こることを考慮し、発がんへの影響を調べた。

(3) 結果及び考察

はじめに、放射線の効果の強さを変化させシミュレーションを複数回実施し、平均クローンサイズの変化への影響を調べた(図3-30)。その結果、細胞老化様変化が起こりにくい場合はほぼ全ての試行で平均クローンサイズが増加し、細胞老化様変化が起こる頻度が増えると平均クローンサイズの減少が起こることがわかった(図3-30、aからd)。この中で、個々のシミュレーションが1個体内で起こっていることを表しているとする、細胞老化様変化が起こる頻度が高く、平均クローンサイズが減少する傾向がある条件で結果のばらつきが大きくなり、個別で見ると平均クローンサイズが増加する試行もあった(図3-30、eとf)。このことから、放射線効果の結果として平均クローンサイズが全体の傾向として小さくなるものの、一部の個体では平均クローンサイズの減少が見られない場合もあり、そのことががんの発生に関わっている可能性があることが示唆された。

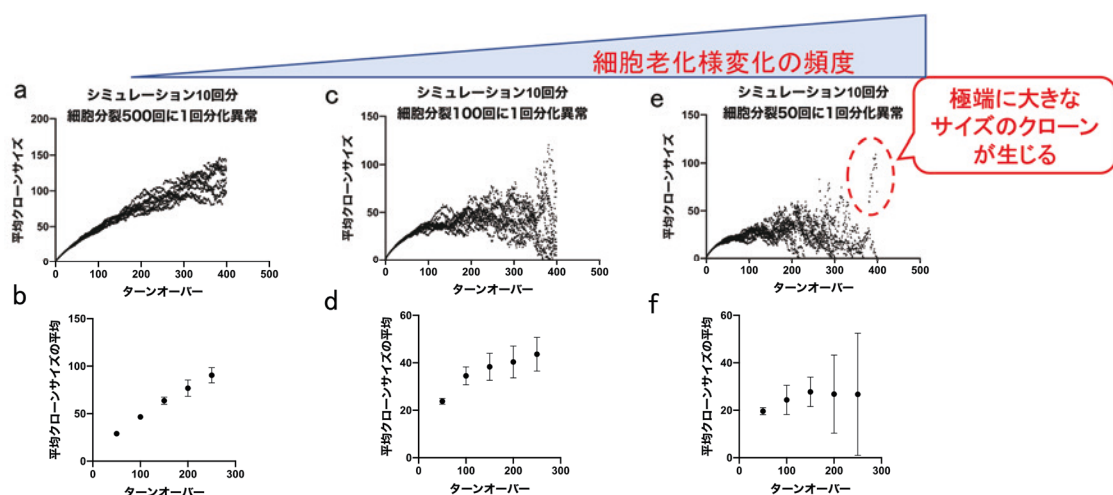


図 3-30 放射線効果の強さを変化させたシミュレーションによる平均クローンサイズの変化

また、3.2.1B)「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」での結果と合わせて、平均クローンサイズは、正常な細胞動態では増加し、細胞老化や分化異常によって組織中の細胞が分裂できなくなり別の組織から細胞が流入すると仮定した場合に減少する可能性があることを見出した(図 3-29)。一方で、放射線未照射マウスでは発がんはあまり起こらず、放射線を一定線量照射することによってがんが有意に増加することが知られており、放射線照射に起因した細胞老化や分化異常による平均クローンサイズの減少と、発がん確率の上昇を同時に満たす放射線の効果をシミュレーションによって調べた。放射線が細胞動態へ与える効果の仮説として、(i)細胞入れ替え速度が増加する、(ii)組織中の細胞分裂が起きにくくなり、別の組織から細胞が流入する、(iii)条件(i)と(ii)の両方が同時に起こるという3つを考慮し、これらを取り入れたシミュレーション解析によってがんの発生しやすさや平均クローンサイズの変化を調べた。その結果、仮説(ii)と仮説(iii)の場合に平均クローンサイズが減少することを見出した。また、発がん確率の指標として、それぞれのクローンが経験する総細胞分裂数の時間変化をプロットすると、仮説(i)と仮説(iii)の場合にクローンあたりの総細胞分裂数が増加することがわかった(図 3-31)。発がんに関わる突然変異は細胞分裂の際に起こることが主で、細胞分裂の回数が多いほどその機会が増えるため、発がん確率の指標として今回の指標を用いた。以上の結果から、放射線照射の効果が細胞の入れ替え率が高く別の組織からの細胞流入が起こるとするとこれまでの知見と実験を合わせたデータと整合性が取れることを見出した。次に、細胞の入れ替え率と別組織からの細胞流入確率について、広いパラメータ領域でシミュレーションを実施し、発がんが起こりやすく、平均クローンサイズの減少が見られる適切なパラメータ値の組み合わせを調べた(図 3-32)。細胞流入確率は、細胞の入れ替えが起こる際に別の組織から流入が起きる頻度を示しており、数値は10を底とする対数の値になっている。細胞入れ替え率は放射線未照射の条件での細胞入れ替え率との比率を表す。パラメータの組み合わせのうち、赤枠で囲ってある条件で、平均クローンサイズの減少とがん発生率の上昇を満たした(図 3-33)。面白いことに、細胞入れ替え率が高すぎる場合には条件を満たさなくなることがわかった。これは、分化異常による別組織からの細胞流入だけでがんが発生するわけではなく、元から存在していた細胞における変異の蓄積が重要であることを示唆している。さらに、低線量放射線の影響を考える場合、線量と本シミュレーションモデルにおける放射線効果が正の相関を示すと仮定すると、細胞入れ替え率や細胞流入頻度が小さい条件でのシミュレーション結果が重要になる。そのような条件では、発がんリスクの指標である総細胞分裂数の値が大きくなりやすく、発がんが起こりにくいことがわかる(図 3-33)。

以上の結果より、放射線照射によって細胞入れ替え率が上昇しかつ細胞老化や分化異常による別組織からの細胞流入が引き起こされると仮定した場合に、マウス実験で見られる増加するクローンサイズの抑制と、細胞分裂回数を指標とした発がんリスクの上昇を同時に満たすことを見出した。また、本シミュレーションモデルによる結果から、低線量放射線が細胞動態に影響を与えることによる発がんへの寄与は小さいことがわかった。

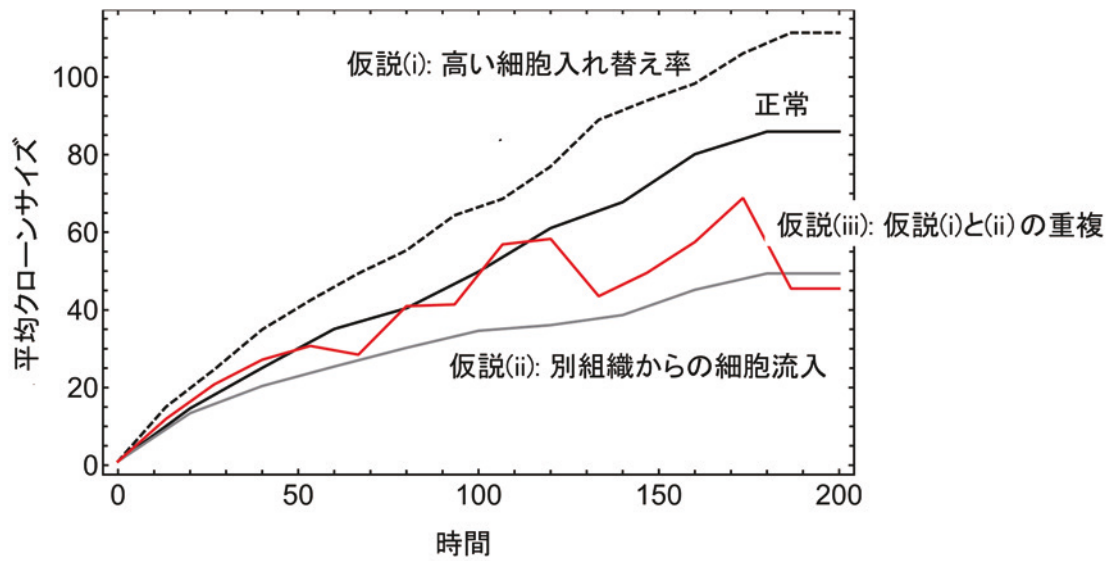


図 3-31 放射線効果に 3 つの仮説を考慮したシミュレーションによる平均クローンサイズの変化

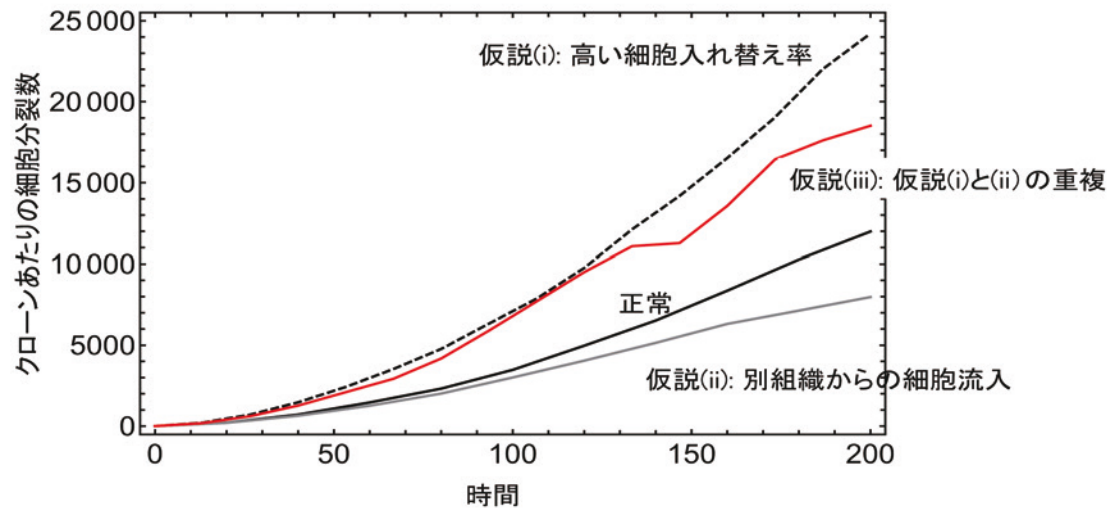


図 3-32 放射線効果に 3 つの仮説を考慮したシミュレーションによるクローンあたりの総細胞分裂数の変化

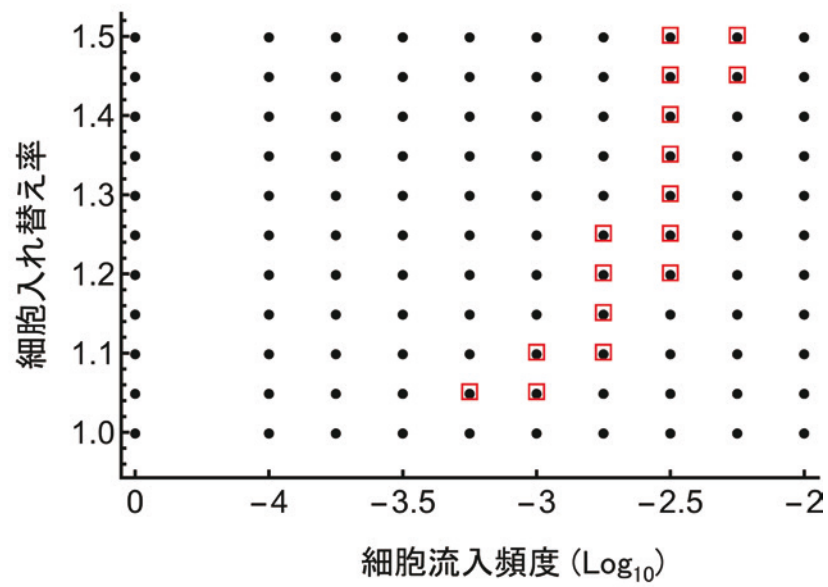


図 3-33 広いパラメータ領域におけるシミュレーション結果と
実験観察結果を満たすパラメータの領域（赤枠）

3.2.3 まとめ

「2次元空間構造を含む乳腺組織動態の数値モデル構築」では、組織内の細胞の種類や空間上の配置を決め、幹細胞クローンの系譜をそれぞれ区別できるようにするために、2次元格子空間上で分裂、死亡、分化が確率性を持って継続的に引き起こされている乳腺組織をコンピュータ上に再現した。

「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」では「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」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認した。K8-Brainbow F1 雌マウスのクローンサイズの変化(図 3-15)については、非照射群において 8 週から 12 週齢の間でクローンサイズの減少が見られた。これは、K8-Brainbow F1 雌マウス実験では、長期間分裂を行うことができない前駆細胞も標識されることが知られているため[8]、蛍光タンパク質を発現する細胞の割合が減少することが原因であると考えられる。また、放射線照射の場合には、K14-tdTomato F1 雌マウスの結果に比べクローンサイズの減少が顕著になっており、これは前述した実験的な理由の他に、放射線照射による細胞の分裂停止や別の層からの細胞流入も理由として考えられる。実際、内腔細胞は基底細胞に比べ被ばくにより細胞停止が起りやすいことが知られており[17]、この考え方は実験結果と合致する。

「推定パラメータを用いた発がん過程の解析」では放射線照射によって細胞分裂速度が速くなりかつ細胞老化や分化異常が引き起こされると仮定した場合に、マウス実験で見られる増加するクローンサイズの抑制を満たしながら、発がんリスクが上昇することを見出した。

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 3 年 10 月 27 日
研究打ち合わせ
方法：Microsoft Teams
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 10 月 29 日
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
- ・ 令和 3 年 12 月 17 日
研究打ち合わせ
方法：Microsoft Teams
参加機関：量研機構放射線医学総合研究所、東京大学
- ・ 令和 4 年 1 月 28 日
研究打ち合わせ
方法：Microsoft Teams
参加機関：量研機構放射線医学総合研究所、東京大学
- ・ 令和 4 年 2 月 9 日
研究打ち合わせ
方法：Microsoft Teams
参加機関：量研機構放射線医学総合研究所、東京大学
- ・ 令和 4 年 3 月 7 日
研究推進会議
方法：Microsoft Teams
参加機関：量研機構放射線医学総合研究所、東京大学
- ・ 令和 4 年 3 月 8 日
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

本研究では、放射線発がんの起源細胞と言われる幹細胞について、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、さまざまな線量の放射線照射後の乳腺組織において、クローン性増殖をとらえ、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た。

「細胞系譜追跡実験系の構築」では、遺伝子改変マウスの維持・繁殖ならびに実験用の F1 マウスの作出における遺伝子型の判定を行った。また、タモキシフェン投与により細胞系譜追跡が可能となるが、タモキシフェン量と初期の標識効率は相関するため、その濃度の検討を行い、K14-tdTomato ならびに K8-tdTomato F1 雌マウスの本研究における至適な濃度を決定した。

令和 2 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。

「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」では、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、クローンサイズが統計学的有意に減少することを見出した。7 週齢 K8-Brainbow F1 雌マウスにタモキシフェンを投与後、0.1 Gy または 2 Gy 被ばくした 12 週間経過後のマウス乳腺では、非照射群に比べ、クローンサイズが統計学的有意に減少することを見出した。また、0.05 Gy でも統計学的有意に抑制されたが、0.03 Gy では観察されなかった。さらに、被ばくによるクローンの変化に加え、被ばくにより乳腺組織では分化異常と細胞老化が引き起こされていることが示された。

「2 次元空間構造を含む乳腺組織動態の数理モデル構築」では、組織内の細胞の種類や空間上の配置を決め、幹細胞クローンの系譜をそれぞれ区別できるようにするために、2 次元格子空間上で分裂、死亡、分化が確率性を持って継続的に引き起こされている乳腺組織をコンピュータ上に再現した。

「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」では「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」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認した。

「推定パラメータを用いた発がん過程の解析」では放射線照射によって細胞分裂速度が速くなりかつ細胞老化や分化異常が引き起こされると仮定した場合に、マウス実験で見られる増加するクローンサイズの抑制を満たしながら、発がんリスクが上昇することを見出した。一見すると細胞分裂速度の上昇と細胞老化による細胞分裂停止が矛盾する現象に見えるが、放射線照射によって分裂停止した細胞が死亡し、その死亡した細胞の補填のために別の層から流入してくる細胞の分裂速度が速いか、同じ層内で分裂した細胞に分裂速度を速くする突然変異が起こった場合のみがんが起りやすくなるかもしれないと考えれば矛盾なく説明できる。

以上の結果から、放射線発がんの仮説を含む全体像と本研究で明らかにすることができたパラメータとの関係をまとめると、図 4-1 が考えられた。正常組織は被ばくの有無に関わらずある時点までクローンサイズが増加する。その後は 2 種類の状況が混在している可能性が示唆される。1 つは今回の細胞系譜追跡実験で観察された増加するクローンサイズの被ばくによる抑制である。これは内腔細胞では 0.05 Gy で統計学的有意に観察され、かつ、ここには細胞老化や分化

異常が一部関与していることが数理モデル解析からも示された。もう 1 つは数理モデル解析で示唆された被ばくしても増加を続けるクローンが存在する可能性である。これら 2 つの可能性のあるクローンの変化に対し細胞老化が一部関与する組織全体の慢性炎症に起因するクローン性増殖が生じ、時間を経て、がんに至るといことが考えられた。

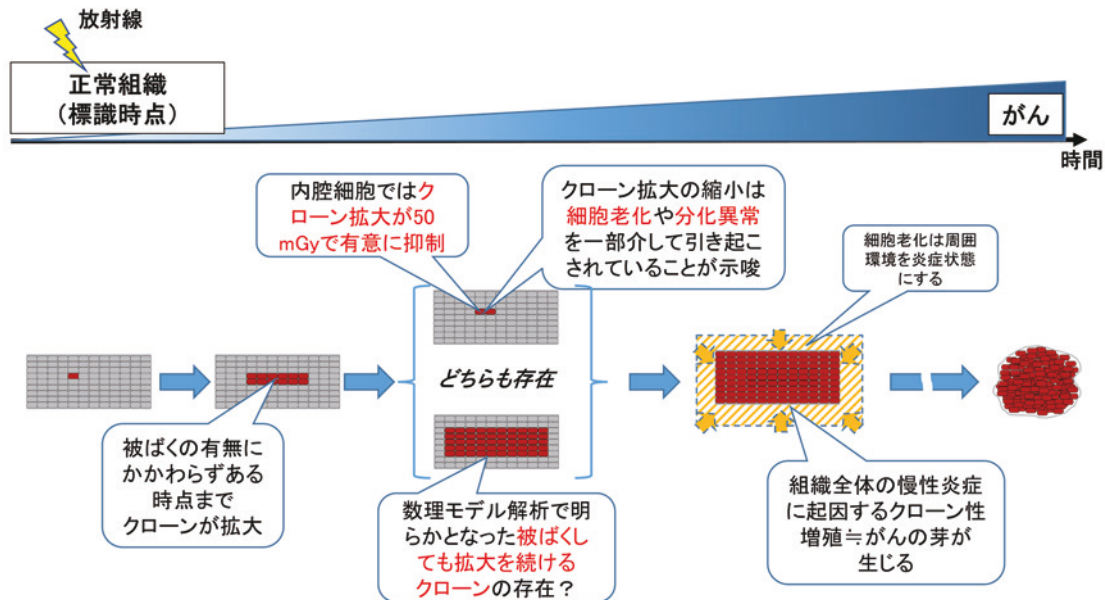


図 4-1 仮説を含む放射線発がんの全体像と本研究の成果との関係
赤字で示した箇所が今回の研究で明らかになった事象を指す。

まとめると、細胞系譜追跡により 0.1 Gy で増加するクローンサイズの抑制、細胞老化、分化異常といった細胞動態に影響が観察された。特に内腔細胞では、0.05 Gy 被ばくで統計学的に有意なクローンサイズの減少が観察された。数理モデル解析により細胞系譜追跡実験で観察された細胞老化と分化異常をパラメータとすることで増加するクローンサイズの抑制とそのような条件での一部クローンサイズの増加を見出した。動物実験と数理モデル解析の以上の結果から低線量被ばくの影響をとらえる実験系が構築できたとと言える。また、今回の解析数から推測すると、放射線誘発乳がんリスクの増加は 0.03 Gy と 0.05 Gy の間にしきい線量があり、それ以上の線量でないと乳がんは増加しない可能性が示唆されたが、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

最後に、本研究は令和元年から令和 3 年度にかけて実施されたが、この間、新型コロナウイルス感染症まん延のため、幾度も緊急事態宣言による出勤抑制が所属機関から要請された。そのため、緊急事態宣言発出時は実施している動物実験の維持に最大限のエネルギーを投入せざるを得ず、解析を十分に行うことはできなかった。緊急事態宣言が解除されていた期間に解析を最大限実施することで、本研究の目標は達成されたが、さらなる研究の進展が期待されていたはずであり、悔やまれるところである。いずれにせよ 3 年間という事業期間で目的の実験系が構築され、細胞動態について興味深い知見が幾つも得られた。今後、この研究を発展させることで、LNT 仮説を覆すようなデータを出し、学術論文として国際機関への引用がなされること、またプレスリリースやホームページ等での情報発信を行うことで、廃炉作業者のリスク管理や不安対策につながると期待する。

以上、3 カ年計画の業務項目を実施し、所期の目標を達成した。

参考文献

- [1] Moriyama, H., Daino, K., Ishikawa, A., Imaoka, T., Nishimura, M., Nishimura, Y., Takabatake, M., Morioka, T., Inoue, K., Fukushima, M., Shimada, Y., Kakinuma, S., Exome of Radiation-induced Rat Mammary Carcinoma Shows Copy-number Losses and Mutations in Human-relevant Cancer Genes., *Anticancer Res.*, vol.41, no.1, 2021, pp. 55-70.
- [2] Morton, L. M., Karyadi, D. M., Stewart, C., Bogdanova, T. I., Dawson, E. T., Steinberg, M. K., Dai, J., Hartley, S. W., Schonfeld, S. J., Sampson, J. N., Maruvka, Y. E., Kapoor, V., Ramsden, D. A., Carvajal-Garcia, J., Perou, C. M., Parker, J. S., Krznaric, M., Yeager, M., Boland, J. F., Hutchinson, A., Hicks, B. D., Dagnall, C. L., Gastier-Foster, J. M., Bowen, J., Lee, O., Machiela, M. J., Cahoon, E. K., Brenner, A. V., Mabuchi, K., Drozdovitch, V., Masiuk, S., Chepurny, M., Zurnadzhy, L. Y., Hatch, M., Berrington de Gonzalez, A., Thomas, G. A., Tronko, M. D., Getz, G., Chanock, S. J., Radiation-related Genomic Profile of Papillary Thyroid Carcinoma after the Chernobyl Accident, *Science*, vol.372, no.6543, 2021, p. eabg2538.
- [3] 東京電力ホールディングス株式会社, 労働環境の改善に向けたアンケート結果 (第 12 回) について,
<https://www.meti.go.jp/earthquake/nuclear/decommissioning/committee/osensuitaisakuteam/2022/01/3-8-3.pdf> (参照 : 2022 年 4 月 17 日) .
- [4] 環境省, 放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料 令和 2 年度版,
<http://www.env.go.jp/chemi/rhm/r2kisoshiryo.html> (参照 : 2022 年 4 月 17 日) .
- [5] 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, *JAEA-Review 2020-045*, 2021, 52p.
- [6] 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, *JAEA-Review 2021-052*, 2022, 52p.
- [7] 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.
- [8] Van Keymeulen, A., Rocha, A. S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., Blanpain, C., Distinct Stem Cells Contribute to Mammary Gland Development and Maintenance, *Nature*, vol.479, no.7372, 2011, pp. 189-193.
- [9] Seldin, L., Macara, I. G., DNA Damage Promotes Epithelial Hyperplasia and Fate Mis-specification via Fibroblast Inflammasome Activation, *Dev. Cell*, vol.55, no. 5, 2020, pp. 558-573.

- [10] Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M., Demaria, M., Cellular Senescence: Defining a Path Forward, *Cell*, vol.179, no.4, 2019, pp.813-827.
- [11] Zhang, Y., Zeng, F., Han, X., Weng, J., Gao, Y., Lineage Tracing: Technology Tool for Exploring the Development, Regeneration, and Disease of the Digestive System, *Stem Cell Res. Ther.*, vol.11, no.1, 2020, 438.
- [12] Kadhim, M., Tuncay Cagatay, S., Elbakrawy, E. M., Non-targeted Effects of Radiation: A Personal Perspective on the Role of Exosomes in an Evolving Paradigm, *Int. J. Radiat. Biol.*, vol.98, no.3, 2022, pp.410-420.
- [13] Al-Khalaf, H. H., Ghebeh, H., Inass, R., Aboussekhra, A., Senescent Breast Luminal Cells Promote Carcinogenesis through Interleukin-8-Dependent Activation of Stromal Fibroblasts, *Mol. Cell Biol.*, vol.39, no.2, 2019, e00359-18.
- [14] Iizuka, D., Imaoka, T., Takabatake, T., Nishimura, M., Kakinuma, S., Nishimura, Y., Shimada, Y., DNA Copy Number Aberrations and Disruption of the p16Ink4a/Rb Pathway in Radiation-induced and Spontaneous Rat Mammary Carcinomas, *Radiat. Res.*, vol.174, no.2, 2010, pp.206-215.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Kudo, K. I., Takabatake, M., Nagata, K., Nishimura, Y., Daino, K., Iizuka, D., Nishimura, M., Suzuki, K., Kakinuma, S., Imaoka, T., Flow Cytometry Definition of Rat Mammary Epithelial Cell Populations and Their Distinct Radiation Responses, *Radiat. Res.*, vol.194, no.1, 2020, pp.22-37.

