

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00552

研究課題名(和文)造血システムの低線量率放射線被ばくに対する防護法の開発

研究課題名(英文) Development of protection method against low dose rate radiation exposure of hematopoietic system

研究代表者

大野 芳典 (Ohio, Yoshinori)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：10548986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：造血組織は放射線に対して高感受性であり、造血不全だけでなく晩発性影響においては白血病などが危惧される。本研究では、知見の乏しい低線量率被ばくの造血組織への影響について解析し、それを防御するための基盤理論の確立に貢献することを目指した。その結果、低線量率被ばくが造血幹細胞を含む未分化上位造血細胞を特異的に減少させ、造血幹細胞の活性を低下させることが解った。さらに、その原因がミトコンドリアから産生されるROSであることを明らかにした。そして、ミトコンドリアを標的とした新たな防護法が有効であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、今まで充分には明らかにされて来なかった低線量率放射線被ばくの造血システムへの影響について細胞レベルから分子レベルまで詳細に解析した。さらに、その低線量率放射線の影響を軽減されることが出来る新たな防護法を見出した。原発作業や宇宙開発などの環境下では、長期間に渡る低線量率放射線被ばくが生ずることが危惧され、本研究で明らかにしたように造血幹細胞の特異的な減少や機能障害によって造血不全や免疫不全が引き起こされる危険性が考えられる。そして、本研究結果によって、新たな防御法の開発に道が開かれることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic tissues are highly sensitive to radiation and prone to radiation injury. It is feared that hematopoietic failure develops and, as a result of the later effects, hematopoietic abnormalities such as leukemia could be induced. We have analyzed effects of low dose-rate radiation exposure on hematopoietic tissues, that have largely remained elusive, and aimed to contribute for establishing a basic theory for preventing the adverse effects of low dose-rate exposure. We found that low dose-rate radiation exposure specifically decreased the number and activity of immature hematopoietic cells including hematopoietic stem cells. Furthermore, it was clarified that the cause was ROS produced from mitochondria. And we found that a new protection method targeting mitochondria is effective.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：低線量率放射線 造血幹細胞 ミトコンドリア ROS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血システムは放射線に対して感受性が高く、急性放射線障害においては造血不全が問題となり、晩発性放射線障害では白血病や骨髄異形成症候群などの発症が危惧される。そのため、従来から造血システムに対する被ばくの影響について多くの解析がされており、造血システムについての放射線感受性を規定する分子基盤についてマウスやヒトで明らかにされてきた。さらに、被ばくによるゲノム障害の程度やそれに対する修復機構などこれまで多くの解析が進められて来たが、その多くが高線量・高線量率被ばくによる造血システムに対する影響であった。福島原発事故をはじめとする多くの被ばくが低線量・低線量率被ばくによるものであるが、低線量・低線量率被ばくによる造血システムにおけるその影響については十分な解析が行われていなかった。申請者の所属する研究所では、福島原発事故を契機として、平成 26 年度より低線量プロジェクトを本格的に立ち上げ、低線量・低線量率の影響を本格的に解析するシステムを導入したが、造血システムにおける低線量・低線量率被ばくに対する影響について解析できていなかった。そこで、申請者が培ってきた造血幹細胞の解析技術を駆使し、本研究では特に低線量率に注目して造血システムにおける被ばくの影響を解析する本研究を計画した。

2. 研究の目的

すでに申請者は予備的な解析を行い、比較的低線量率(100mGy/日)でマウスに1ヶ月から2ヶ月間照射することで、造血前駆細胞や末梢血に軽度の変化しか見られなかったのに対して、造血幹細胞を含む上位未分化造血細胞(KSL細胞)において顕著な減少が見られることを突き止めている(図1)。2ヶ月間照射したものは、未照射の個体と比較して20分の1に減少していた。そこで、本研究ではまず造血幹細胞の減少を引き起こす被ばくの閾値について、線量率と被ばく期間、累積線量について解析を行う。そして、低線量率被ばくにおける造血幹細胞の減少の機序について造血幹細胞移植による造血機能解析や、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を解析し、その上位未分化造血細胞の減少の要因を明らかにする。そして、その結果をもとに低線量率放射線に対する新たな防護法の樹立を試みる

3. 研究の方法

マウスにおいてまず、どの程度の低線量率被ばくによって上位未分化造血細胞の減少が起こるかについて調べた。次に、低線量率被ばくを受けた造血幹細胞について、幹細胞活性の変化とそれに至る機序を細胞生物学的に詳細に解析するとともに、単一細胞レベルでの遺伝子発現の変化について調べた。つまり、低線量率被ばくによって造血幹細胞が低下する分子基盤についてアポトーシス関連遺伝子や細胞生存シグナル関連遺伝子の発現を単一細胞レベルで調べるとともに、その際に引き起こされるゲノム障害と修復機転について評価した。そして、これらの解析結果を基に低線量率被ばくによって引き起こされる上位未分化造血細胞の減少の決定因子を探る。そして、導き出した決定因子を検証し、これを標的として新たな低線量率放射線被ばくに対する新たな防護法になりうるかどうかを検討する。具体的には、低線量率被ばく造血システムへ及ぼす影響とその要因について細胞レベルから分子レベルまでの以下の研究を行った。

(1) 低線量率被ばくが造血システムに障害を引き起こす閾値の同定

すでに100mGy/日の低線量率での放射線照射で1ヶ月から2ヶ月で造血システム、特に上位未分化造血細胞に異常をきたし、造血幹細胞が減少することを予備的実験で明らかにしている。そこで、この造血システムの異常が引き起こされる線量率と照射期間を検討し、高線量率放射線被ばくと比較しながら、低線量率被ばくが造血システムに障害を引き起こす閾値を明らかにした。

(2) 低線量被ばくを受けた造血システムの障害の検討

低線量被ばくを受けた造血システムの異常を、造血幹細胞の造血機能について詳細に検討した。まず、メチルセルロース法を用いてコロニー形成能を観察するとともに、一定数の造血幹細胞をマウスに移植し、長期骨髄再構築能を調べた。そして、自己複製能をもつ造血幹細胞数を評価した。この時使用するマウスは蛍光色素クサビラオレンジ (Ku0)を発現するマウスを用いて、移植後の成熟血球の産生動態も追跡評価した。

(3) 低線量率被ばくによる造血システム障害の機序の解明

低線量率被ばくによる造血幹細胞に障害を及ぼす機序を解明するために、低線量率照射マウスより造血幹細胞を分取し、単一細胞レベルでの遺伝子発現を解析した。(Biomark HD)さらに、低線量率放射線影響の大きな要因と考えられる活性酸素種(ROS)の発生やゲノム損傷(二本鎖切断やゲノム酸化など)について解析を行った。

(4) 低線量率被ばくによる造血システム障害の機序を標的とした防護法の検討

低線量率被ばくによってミトコンドリアからのROSの産生増加とそれによるゲノム損傷(ゲノム酸化亢進)が上位未分化造血細胞の減少の決定因子であることが明らかになったので、ミトコンドリアとゲノム損傷を標的とした新たな防護法について検討した。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で、高線量率放射線(900mGy/分で累積線量 2.8Gy)の被ばくは造血細胞全体を減少させるのに対して、低線量率では、未分化造血細胞を多く含む c-Kit⁺Sca-1⁺ Lineagemarker⁻(KSL)細胞が、照射後28日(100 mGy/日で累積線量 2.8Gy)で特異的に減少することを明らかにした(図1)。さらに、造血幹細胞(CD150⁺ CD48⁻ CD34⁻ KSL 細胞)では、照射後7日(100 mGy/日で累積線量 0.7 Gy)で半数まで減少し、56日目(100 mGy/日で累積線量 5.6 Gy)ではほぼ枯渇することを明らかにした(図1)。また、前駆細胞は照射後28日で半数程度まで減少するが、上位未分化造血細胞で見られるほど顕著な減少は見られなかった。この結果から、低線量率放射線被ばくは上位未分化造血細胞に対してより特異的に影響を及ぼすことが解った。そこで、低線量率放射線被ばくの影響の起こる閾値を同定するために、放射線量を20mGy/日に引き下げて5ヶ月間照射(累積線量 2.8Gy)した。すると、特異的な細胞表面抗原をマーカーとして同定した造血幹細胞数に大きな変化は見られなかったが(図2)、上位未分化造血細胞の集団であるKSL細胞を移植して長期骨髄再構築能を検証した。その結果、20mGy/日の線量率でも長期骨髄再構築能が低下しており(図3)、造血幹細胞障害が引き起こされる閾値は20mGy/日以下であることが解った。

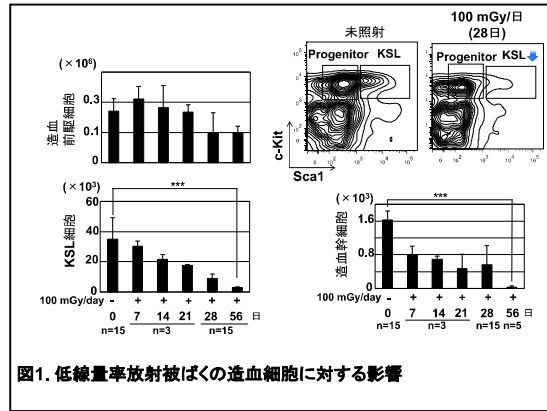


図1. 低線量率放射線被ばくの造血細胞に対する影響

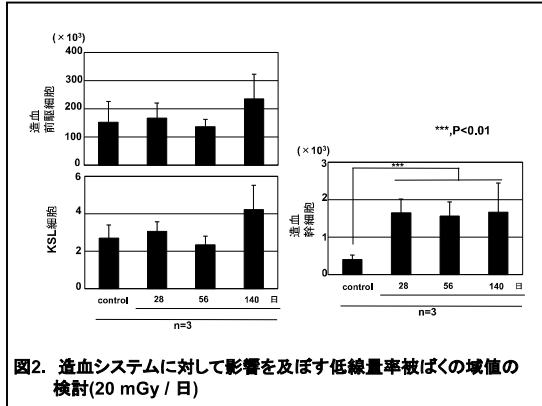


図2. 造血システムに対して影響を及ぼす低線量率被ばくの閾値の検討(20 mGy / 日)

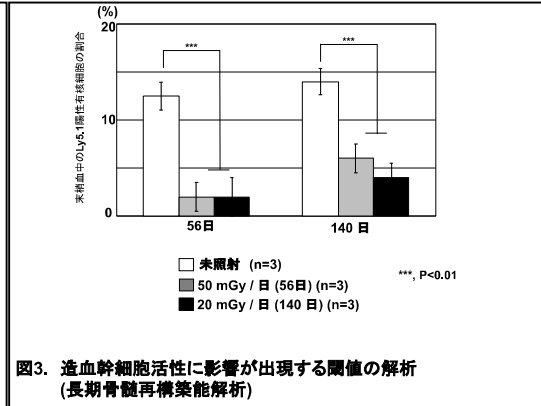


図3. 造血幹細胞活性に影響が出現する閾値の解析(長期骨髄再構築能解析)

(2) 低線量率での放射線被ばくを受けた造血細胞では、コロニー形成能を持つ細胞数が減少することが明らかとなった。さらに、骨髄移植による解析結果から、低線量率放射線被ばくによって造血幹細胞の長期骨髄再構築能が低下していることが解った(図4、5)。また、Ku0マウスを用いた解析から、低線量率放射線被ばくした造血幹細胞においてはリンパ球系への分化能が特に低下していた。従って、低線量率被ばくによって免疫担当細胞の産生が選択的に減少し免疫不全状態が引き起こされる可能性が危惧される。

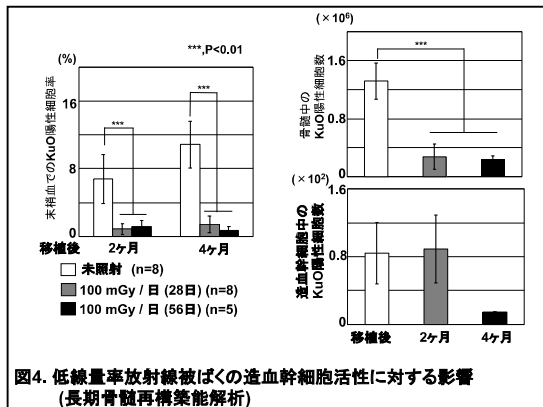


図4. 低線量率放射線被ばくの造血幹細胞活性に対する影響(長期骨髄再構築能解析)

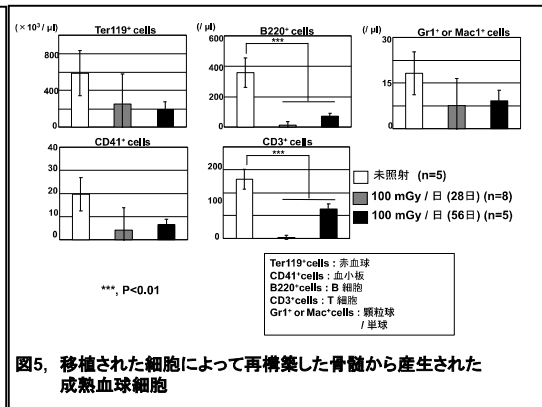


図5. 移植された細胞によって再構築した骨髄から産生された成熟血球細胞

(3) 単一細胞遺伝子発現解析システムを用いた解析によって低線量率放射線被ばくによって造血幹細胞分画の細胞に分化誘導遺伝子群の発現に影響が起きていることが解った。また、老化関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などの発現に変化があった(図6)。そこで、アネキシンV結合アッセイを行なってアポトーシスの誘導について調べたところ、上位未分化造血細胞においてアポトーシス細胞の顕著な増加が検出された。さらに、ゲノム障害と修復機転の誘導状況を解析するために、非相同末端結合修復や相同組換え修復について免疫染色解析によって調べた結果、造血幹細胞を含む未分化造血細胞において、非相同末端結合修復が起きているこ

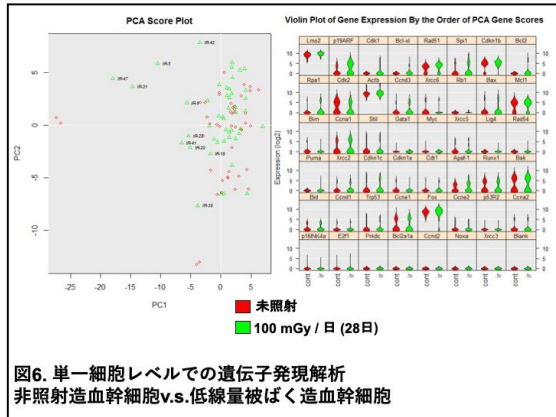


図6. 単一細胞レベルでの遺伝子発現解析
非照射造血幹細胞v.s.低線量被ばく造血幹細胞

とが解ったが、検出頻度は低かった。低線量率放射線では直接作用でゲノムの損傷が起き難いとされているため、活性酸素種 (ROS) の発生について、解析を進めたところ、上位未分化造血細胞において細胞内の ROS の増加が見られた。さらに、この ROS の発生源を調べたところ、ミトコンドリアに由来するものであることが明らかとなった。そして、低線量率放射線照射中のマウスに ROS の除去剤である N-アセチルシステイン (NAC) を投与することで、上位未分化造血細胞の数と活性の低下を防ぐことができることを明らかにした。つまり、ROS の増加が低線量率放射線被ばくの造血シ

ステムに対する影響の決定因子となることを証明した。また、ミトコンドリアの膜電位を解析しミトコンドリアの活性を検討したところ、低線量率放射線被ばくによって上位未分化造血細胞のミトコンドリアの異常な活性化を見出した。これらの結果から、ミトコンドリアの異常な活性化とそれによる ROS の産生が上位未分化造血細胞の数と活性の低下の引き金となっていることが考えられた。

(4) 低線量率放射線被ばくによる上位未分化造血細胞の減少が、ミトコンドリアの異常な活性化とそれによる ROS の産生によるものであることが明らかとなった。また、この産生された ROS によってゲノムの酸化損傷も起きていることが示された。そこで、このミトコンドリアと酸化損傷ゲノムを標的として防護法が確立できないかどうかを検討した。まず、ミトコンドリアを低下させるために脱共役剤として [Ppc1] を防護剤の候補として選択した。さらに、ゲノムの修復を誘導することで知られているサイトカイン TPO のアゴニスト [ロミプロスティム] を選択した。そしてそれぞれを、低線量率放射線照射下で飼育するマウスに腹腔内投与することで防護できるかどうかを検討した。その結果、Ppc1 とロミプロスティム単剤でもやや効果を上げることができたが、両剤を同時に投与することで上位未分化造血細胞の減少と活性を完全に防護することに成功した。また、低線量率放射線照射被ばくした KSL 細胞を脱共役剤 [FCCP] と TPO で共培養することで造血幹細胞活性を回復させることに成功した。これらの結果から、ミトコンドリアとゲノム修復を標的とした防護法が低線量率放射線被ばくに対して有効であることを証明した。

本研究結果から、低線量率放射線被ばくが造血幹細胞を含む未分化上位未分化造血細胞に対して特異的に影響を及ぼし減少させるとともに、自己複製能も含めた造血幹細胞の活性が低下させることを明らかにした。さらに、低線量率放射線によるミトコンドリアの活性異常とそれによる ROS の産生がゲノムの酸化損傷を誘発し、これが低線量率放射線影響の決定因子となっていることを導き出した。また、ミトコンドリアとゲノム損傷修復を標的とすることが低線量率放射線被ばくに対する防護法として有効であることを証明した。

原発作業や宇宙開発などの環境では、低線量率放射線による長期被ばくの可能性が考えられ、それによる造血幹細胞の特異的な減少や分化誘導による造血不全や免疫不全が引き起こされる危険性がある。研究を更に進め、低線量率放射線被ばくによる造血幹細胞の放射線障害を起こすメカニズムを明らかにし、今回確立した防護法を詳細に検討することで、低線量率放射線被ばくに対する新たな防護法の開発に道が開かれるのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大野 芳典	4. 巻 93
2. 論文標題 低線量率放射線被ばくの造血システムに対する放射線障害の解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 長崎医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 334-336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏	4. 巻 71
2. 論文標題 低線量放射線被ばくに対する造血システムの分子応答	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 広島医学	6. 最初と最後の頁 361-363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 白須 直人, 安永 晋一郎, 瀧原 義宏	4. 巻 52(4)
2. 論文標題 骨髄の組織反応（特集 放射線生物学と放射線防護を繋ぐ組織反応研究）	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 336-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 低線量率放射線が造血幹細胞活性に与える影響
3. 学会等名 中国地区放射線影響研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 Effect of low dose-rate irradiation on the hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 第80回日本血液学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 山藤 幹茂子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 低線量率放射線による造血幹細胞の機能低下とその分子機序
3. 学会等名 第61回日本放射線影響学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 山藤 幹茂子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 造血における低線量率放射線に対する分子応答
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 Molecular response for low dose-rate irradiation in the hematopoietic system
3. 学会等名 第15回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 低線量率放射線被ばくに対する造血システムの分子応答
3. 学会等名 第58回原爆後障害研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 Molecular responses for low dose-rate irradiation in the hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 第79回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 低線量率放射線照射環境下における造血システムへの影響とその分子応答
3. 学会等名 第60回 日本放射線影響学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 造血幹細胞の細胞周期と分化を制御する中核因子Geminin
3. 学会等名 第21回バイオ治療法研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹立 恭子、大野 芳典、白須 直人、安永 晋一郎、大坪 素秋、瀧原 義宏
2. 発表標題 膜透過型ペプチドを用いた幹細胞活性制御因子Gemininの発現制御法の開発
3. 学会等名 第21回バイオ治療法研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹立 恭子、大野 芳典、白須 直人、安永 晋一郎、大坪 素秋、瀧原 義宏
2. 発表標題 造血幹細胞の細胞周期制御と分化制御における分子機能
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 芳典、竹立 恭子、郭 芸、菅野 雅元、白須 直人、安永 晋一郎、大坪 素秋、瀧原 義宏
2. 発表標題 低線量率放射線が造血に与える影響
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 芳典、竹立 恭子、白須 直人、安永 晋一郎、大坪 素秋、瀧原 義宏
2. 発表標題 幹細胞活性制御因子Gemininの白血病の病態制御における役割
3. 学会等名 第22回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohno Y, Suzuki-Takedachi K, Guo Y, Kanno M, Shirasu N, Yasunaga S, Ohtsubo M, Takihara Y.
2. 発表標題 Molecular responses for low dose-rate irradiation in the hematopoiesis
3. 学会等名 放射線災害・医科学研究拠点 第4回国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹立 恭子、大野 芳典、白須 直人、大坪 素秋、瀧原 義宏、安永 晋一郎
2. 発表標題 幹細胞活性制御の中核因子Gemininを標的とした白血病幹細胞制御法の開発
3. 学会等名 第23回バイオ治療法研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 芳典、竹立 恭子、郭 芸、菅野 雅元、白須 直人、大坪 素秋、瀧原 義宏、安永 晋一郎
2. 発表標題 低線量率放射線被ばくは造血幹細胞活性を低下させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹立 恭子、大野 芳典、白須 直人、大坪 素秋、瀧原 義宏、安永 晋一郎
2. 発表標題 Gemininは造血幹細胞と白血病幹細胞の幹細胞性を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹立 恭子, 大野 芳典, 山藤 幹茂子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 Analysis of the molecular response for low dose-rate irradiation in the hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 Low dose-rate irradiation promotes down-regulation of hematopoietic stem cell activity
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 芳典, 竹立 恭子, 郭 芸, 菅野 雅元, 白須 直人, 安永 晋一郎, 大坪 素秋, 瀧原 義宏
2. 発表標題 Low dose-rate irradiation preferentially affects hematopoietic stem cell activity.
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 芳典
2. 発表標題 低線量率放射線による造血幹細胞の活性低下とその分子機序
3. 学会等名 基研研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	安永 晋一郎 (Yasunaga Shinichiro) (50336111)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	