

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16481

研究課題名（和文）クローン増殖能維持及び回復促進に帰す標的因子を探索する

研究課題名（英文）Explore target factors responsible for preservation and recovery of clonogenic potential

研究代表者

石川 純也（ISHIKAWA, Junya）

杏林大学・保健学部・助教

研究者番号：70707215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では，放射線による造血幹細胞のクローン増殖能喪失機構にどのような因子が関与するのか明らかにするために，酸化及び抗酸化応答ならびに細胞老化応答に着目して検討した．その結果，クローン増殖能喪失機構は複合的であるものの，酸化ストレス防御因子としてのNrf2やその標的遺伝子群，さらに抗炎症性因子がクローン増殖能喪失を妨げる標的候補となる可能性が考えられた．

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は，放射線による造血幹細胞のクローン増殖能維持及び回復促進に帰す標的として，抗酸化性因子や抗炎症性因子がその候補となる可能性を示した．致死的な線量の放射線を被ばくした個体の救命や放射線治療に伴う正常組織障害等から組織を再建するには，クローン増殖能の維持が欠かせない．これらの放射線障害の軽減あるいは早期治癒を目指す薬剤の開発等の一助となることが期待される．

研究成果の概要（英文）：In this study, to clarify factors that are involved in the mechanism of radiation-induced exhaustion of clonogenic potential in hematopoietic stem cells, we explored candidates by which focused on oxidative and anti-oxidative response as well as cellular senescence response. Although the mechanism of radiation-induced exhaustion of clonogenic potential is a complex event, Nrf2 which is a transcription factor regulating the expression of genes to protect against oxidative damage, its target genes that codes anti-oxidative factors, and anti-inflammatory factors are could be target candidates to prevent exhaustion of clonogenic potential.

研究分野：放射線生物学

キーワード：造血幹細胞 クローン増殖能 Nrf2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は生涯に渡り、全ての末梢血球を供給する。高線量の放射線被ばくは造血幹細胞の機能不全、即ちクローン増殖能の喪失をもたらす、末梢血球の供給が滞ることで個体死へと繋がる。造血幹細胞への放射線影響は、これまで細胞死に注目されてきた。しかし、放射線障害からの回復において重要なのは造血組織を再建することであり、これは造血幹細胞のクローン増殖能なくしては達成できない。放射線によりクローン増殖能が失われる機構は未だ明らかでなく、今日の被ばく医療を困難にしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線による造血幹細胞のクローン増殖能喪失機構にどのような因子が関与するのか明らかにすることである。そのために、マウス及びヒト造血幹/前駆細胞を用いて、クローン増殖能喪失と酸化及び抗酸化応答との関連性ならびに細胞老化応答との関連性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 生存細胞数及びクローン増殖能の評価

C57BL/6J マウスへ 0~6 Gy の X 線を全身照射し、3~24 時間後に大腿骨由来骨髓細胞より磁気ビーズ法を用いて Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (LSK) 細胞を単離した。これらの生細胞数をトリパンブルー色素排除法にて計数することで生存細胞数を、50 個以上の細胞からなるコロニーをメチルセルロース法にて計数することでクローン増殖能を、それぞれ評価した。

(2) 酸化及び抗酸化応答の評価

単離された LSK 細胞をそれぞれ酸化ストレス検出用蛍光試薬である HPF で染色し、フローサイトメトリー法にて蛍光強度を測定することで、細胞内に生じた活性酸素種 (ROS) を酸化応答として評価した。一方、Nrf2 は酸化ストレス防御遺伝子群などを統一的に発現誘導する転写因子であり、単離された LSK 細胞をそれぞれ Nrf2 抗体で免疫蛍光染色し、顕微鏡下でその核内移行を抗酸化応答として評価した。

(3) 細胞老化応答の評価

単離された LSK 細胞を SA-beta-Gal で染色し細胞老化を、酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG を用いて点突然変異頻度を、ELISA 法にてそれぞれ評価した。一方、ヒト CD34⁺細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析からアノテーション情報を利用した発現変動遺伝子の機能的特徴解析を実施した。

4. 研究成果

(1) X 線照射と生細胞数及びクローン増殖能の関連性

0, 2, 4, 6 Gy の X 線を全身照射したマウス的大腿骨由来 LSK 細胞の生存細胞数は、照射後 12 時間までに非照射群と比較し 30%程度にまで減少した。一方、生存細胞のクローン増殖能は、4 Gy 及び 6 Gy 照射群で照射後 3 時間までに非照射群と比較し 5%未満にまで急激に低下し、照射後 24 時間までに大きな変化は見られなかった。このとき、2 Gy 照射群は照射後 3 時間までに非照射群と比較し 70~80%程度のクローン増殖能を維持し、照射後 24 時間でも 60%程度を維持していた。放射線照射は 24 時間以内に LSK 細胞の生存細胞数減少をもたらすが、より早い時期に急激なクローン増殖能の低下を引き起こすことが明らかになった。また、2 Gy 照射群と 4 Gy 及び 6 Gy 照射群とはクローン増殖能低下の程度に違いがあり、2 Gy と 4 Gy との間にクローン増殖能が急激に失われる線量域が存在すると考えられた。

(2) クローン増殖能喪失と酸化及び抗酸化応答の関連性

X 線による生体影響は主に細胞内 ROS に関連していることがよく知られているため、照射による変化を評価したところ、クローン増殖能が急激に失われた照射後 3 時間において細胞内 ROS の急激な増加を認めた。同様に、Nrf2 の核移行も照射後 3 時間において非照射群と比較して増加しており、酸化ストレスに呼応する酸化ストレス防御遺伝子群の統一的発現増加を示唆していた。興味深いことに、Nrf2 の核移行はクローン増殖能を喪失した 4 Gy 及び 6 Gy 群にて照射後 24 時間まで非照射群と比較して高い状態を保っていたが、クローン増殖能の喪失がさほど生じなかった 2 Gy 照射群では、照射後 3 時間で一過性に増加したものの、その後は非照射群と同等のレベルであった。これらの結果は、一部で Nrf2 とその標的遺伝子群による抗酸化機能の亢進がクローン増殖能喪失の阻害に関与していることを示唆するものであり、Nrf2 やその標的遺伝子群がクローン増殖能喪失を妨げる標的候補となることが示された。

(3) クローン増殖能喪失と細胞老化応答の関連性

同様に、放射線による細胞老化マーカー発現を評価したところ、照射後 24 時間までに SA-beta-Gal 陽性細胞が非照射群と比較し増加していた。これらの結果は、放射線によるクローン増殖能喪失の一因として細胞老化が関与していることを示唆している。これまでに細

胞老化の要因として複製ストレスや炎症が関与すると報告されているため、照射後 6 時間における放射線応答遺伝子の機能的特徴を解析したところ、放射線照射により発現変動する遺伝子には炎症に関与する因子が多く含まれていた。これらの結果により、細胞老化が炎症や複製ストレスにより生じているかもしれず、抗炎症性因子もクローン増殖能喪失を妨げる標的候補となることが示された。

(4) 結論

放射線による造血幹/前駆細胞のクローン増殖能喪失は、速やかにかつ劇的に生じる。その機構は複合的であるものの酸化ストレス防御因子としての Nrf2 やその標的遺伝子群、さらに抗炎症性因子がクローン増殖能喪失を妨げる標的候補となると考えられる。今後はそれらの標的因子に作用する薬剤を探索、詳細な作用機序を解明し、被ばく医療の発展や放射線治療の副作用低減に資する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa J, Morisaki T	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of the long-term interaction between intracellular reactive oxygen species and oxidative DNA damage in murine Lin-/Sca-1+ cells exposed to ionizing radiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Physics, Clinical Engineering and Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 95～105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ijmpcero.2019.82009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 石川純也，梅木美和，菅原かや，三浦千尋
2. 発表標題 X線照射したヒト正常細胞株における抗炎症性化合物の作用に関する基礎的検討
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 Ishikawa J, Masaru Y, Yoshiaki S, Nishida T, Monzen S, Nakai Y, Kashiwakura I
2. 発表標題 The functional characteristics of radiation response genes in human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells
3. 学会等名 The International Congress of the Radiation Research 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川純也，山口平，佐藤嘉晃，西田晃規，門前暁，中井雄治，柏倉幾郎
2. 発表標題 ヒトCD34+造血幹/前駆細胞における放射線応答遺伝子の機能的特徴
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 第57回生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1．発表者名 石川純也
2．発表標題 放射線によるクローン増殖能喪失と酸化－抗酸化バランスとの関連性の分析
3．学会等名 日本保健物理学会 第51回研究発表会
4．発表年 2018年

1．発表者名 Ishikawa J, Mochizuki Z, Matsumura H, Takaboshi N, Kibe S, Fukushima T
2．発表標題 Characterize relevance between elimination of clonogenic potential and redox balance in X-irradiated mouse hematopoietic stem/progenitor cells
3．学会等名 The 64th Annual Meeting of Radiation Research Society (国際学会)
4．発表年 2018年

1．発表者名 石川純也，木部汐梨，福島妙恵華
2．発表標題 放射線による造血系細胞のクローン増殖能喪失とミトコンドリア損傷頻度の短期的解析
3．学会等名 日本放射線影響学会 第61回大会
4．発表年 2018年

1．発表者名 Ishikawa J
2．発表標題 Reconsideration for the target of hematopoietic reconstruction in radiation casualties
3．学会等名 The 8th Annual Meeting of the International Society of Radiation Neurobiology (国際学会)
4．発表年 2018年

1. 発表者名 石川純也, 望月善乃介, 高星徳寿, 松村青映
2. 発表標題 放射線照射したマウス造血幹/前駆細胞におけるクローン増殖能と酸化ストレス応答因子の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第60回大会
4. 発表年 2017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
研究協力者	柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA Ikuo)		
研究協力者	山口 平 (YAMAGUCHI Masaru)		
研究協力者	山内 可南子 (YAMANOUCHI Kanako)		