

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390336

研究課題名（和文）

ヒト造血幹細胞の放射線感受性の個体差を規定する因子の探索とその応用

研究課題名（英文）The identification of factor(s) which regulate individual radiosensitivity of human hematopoietic stem/progenitor cells and its application.

研究代表者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA IKUO)

弘前大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：00177370

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、ヒト造血幹細胞の放射線感受性の個体差と細胞に発現する表面抗原、増殖能及び遺伝子の特徴との関連を解明し、個々の感受性を規定する因子は何であることを解明する事にある。3年間の研究により以下の点を明らかにした。

1. ヒト造血幹・前駆細胞の放射線感受性は、総前駆細胞数と逆相関し、特に未熟細胞のTie-2発現との相関が示唆された。
2. ヒトCD34陽性細胞に発現するNrf2関連遺伝子の多くは放射線によって上昇し、さらにそのうちのNQO1の初期発現はその個体の放射線感受性と有意に相関する事が明らかとなった。
3. ヒト末梢血由来造血前駆細胞の放射線感受性と性別及び年齢との関連性を検討したところ、前駆細胞数と放射線感受性との間に正の相関を認めた。また、男女間に放射線感受性の差は認められなかったが、0.5 Gy照射の場合の前駆細胞の生存率は年齢と共に低下した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to clarify the individual radiosensitivity of human hematopoietic stem/progenitor cells and the relation between the characters of cell surface antigens, proliferative potentials and gene expressions, thus identifying what is the factor(s) to regulate the individual radiosensitivity of human hematopoietic stem cells. The following points were revealed.

1. It suggest that the radiosensitivity of individual hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) is related to the number of progenitor cells in the CD34⁺ cells especially dependent on the presence of immature HSPCs such as Tie-2⁺ cells.
2. The mRNA expression of Nrf2 target genes such as HO-1, FTH1, NQO1, GSR and TXNRD1 was significantly increased after 2 Gy X irradiation. A statistically significant negative correlation was observed between the surviving fraction of HSPCs and the intrinsic NQO1 mRNA expression, indicating that HSPCs in which NQO1 mRNA levels are low may also be radioresistant. The present results suggest that the antioxidant system associated with Nrf2 is involved in the radiosensitivity of HSPCs.
3. A significant correlation was observed between the surviving fraction of hematopoietic progenitor cells obtained after 0.5 Gy irradiation and the age of the blood donors. In particular, this correlation was more evident in males, with a correlation coefficient of -0.318 ($P=0.043$). A correlation between the individual responsiveness of hematopoietic progenitor cells to ionizing irradiation, particularly to a low-dose of irradiation (such as 0.5 Gy), and aging has been established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	8,400,000	2,520,000	10,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：造血幹細胞・放射線・遺伝子・個体差

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、数日から数十日しか機能しない成熟血球を生産に渡って産生し続ける生体には必須の細胞である。こうした高い増殖能と造血幹細胞の未分化性故に、放射線生物学の観点から、造血幹細胞は典型的な高い放射線感受性を示す細胞である事が知られている[1]。これは、放射線事故・災害時の被ばくにより生命の危険を誘発するばかりか、放射線がん治療や同様のDNA損傷を引き起こす化学療法においても、造血幹細胞の感受性は治療効果の制限因子になっている。放射線生物学の基礎となっている1906年に発表されたバルゴニー・トリポンドーの法則では、①分裂頻度が高い細胞、②将来長期にわたって分裂する細胞、③形態的あるいは機能的に未分化である細胞ほど放射線感受性が高い、とされている[2]。造血幹細胞はこれらの条件を全て満たす細胞であり、「造血幹細胞は放射線感受性が高い」という現象は良く知られているように見られがちであるが、一転「個体としての感受性の多様性」に関しては実際のところあまり知られておらず、その要因に至ってはほとんど明らかにされていない。これまで我々はヒト末梢血及び臍帯血中の造血幹細胞の放射線感受性とサイトカインの作用について報告してきた[3]。然しながら「より未分化であるはずの造血幹・前駆細胞は放射線抵抗性を示す」というこの法則とは背反する結果を多く得ており[2]、放射線生物学的にも解明すべき重要な点である。特に造血幹細胞は成熟機能細胞に比べ細胞内レドックス状態が異なると共に、ミトコンドリアやataxia telangiectasia mutated (ATM)分子が少ないと言われているが[4, 5]、放射線感受性との関連を含めた詳細の多くは未解明なままである。

2. 研究の目的

放射線に対して感受性が高い造血システムを評価モデルとして、標的となるヒト造血幹細胞の

発現因子及び遺伝的特徴を解明し、これらが個体差感受性とどう関わっているか、個々の感受性を左右する因子は何であるかを解明し、最終的には放射線感受性の予測診断や新たな治療方法への応用へと繋げる。

3. 研究の方法

本計画では、ヒト造血幹細胞に発現する表面抗原、増殖能や細胞内酸化応答システム等の造血幹細胞の特性及び遺伝的特徴と放射線感受性との関連を解明し、個々の感受性を規定する因子を解明する。この目的達成のために克服すべき研究課題として次の3つが挙げられる。研究課題1：ヒト造血幹細胞の発現抗原、増殖因子受容体、増殖能、細胞内酸化システム、細胞内アポトーシス関連分子等の特性と放射線感受性との関連性解明、研究課題2：ヒト造血幹細胞の遺伝的特徴と放射線感受性との関連性解明、研究課題3：放射線感受性個体差診断方法の開発に向けた検討。

- [1] E.J. Hall. *Radiobiology for the Radiologist* (5th Edition). Lippincott Williams & Wilkins, P347-349 (2000).
- [2] E.J. Hall. *Radiobiology for the Radiologist* (5th Edition). Lippincott Williams & Wilkins, P339-340 (2000).
- [3] I. Kashiwakura et al. *Radiat Res*, 168: 545-51 (2007), 164:10-6 (2005), 158:202-9 (2002), 153:144-52 (2000).
- [4] C. Piccoli, R. Ria et al. *J Biol Chem*. 280: 26467-76 (2005).
- [5] Nick Lane. *Oxygen: The molecule that made the world*. 東海大学出版会, P373-417 (2006).

4. 研究成果

- (1) ヒト CD34⁺細胞表面の CD38 と CD45RA 及び CD110 と Tie2 発現には有意な相関が認められ、巨核球系前駆細胞数は Tie2 発現と逆相関し、総前駆細胞の放射線感受性は Tie2 発現と相関が認められた。

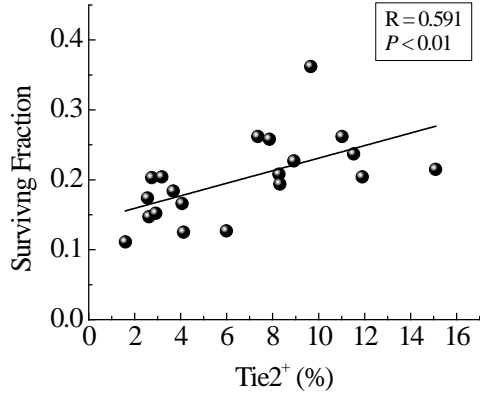


FIG. 1. The relationship between the expression of Tie-2 and the surviving fraction of the surviving fraction of total hematopoietic progenitor CFCs (n=20).

- (2) ヒト造血幹細胞への重粒子線照射では、酸化ストレス応答関連遺伝子のうち Nrf2 ファミリーに属する HO1 及び NQO1 遺伝子に有意な発現増加が観察され、巨核球分化初期過程における遺伝子発現の変動作用が示された。
- (3) ヒト CD34 陽性細胞に発現する Nrf2 関連遺伝子の多くは放射線によって上昇し、さらにそのうちの NQO1 の初期発現はその個体の放射線感受性と有意に相関する事が明らかとなった。

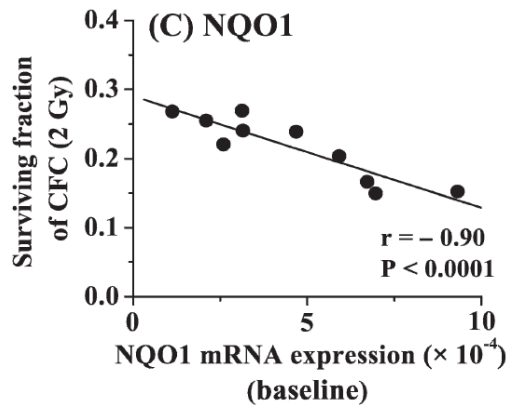


FIG. 2. Relationship between the surviving fraction of total hematopoietic progenitor CFCs and Nrf2 target gene NQO1 mRNA expression.

- (4) ヒト成熟巨核球は放射線感受性が高いが、その感受性は巨核球成熟の最終段階、特に proplatelet 形成が開始された成熟巨核球では低下する。

- (5) 遺伝子組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子の臨床製剤 3 種類の作用を比較検討し、低濃度でのヒト造血前駆細胞に対する作用や成熟好中球からの活性酸素生成に差を認めた。
- (6) ヒト末梢血由来造血前駆細胞の放射線感受性と性別及び年齢との関連性を検討したところ、前駆細胞数と放射線感受性との間に正の相関を認めた。また、男女間に放射線感受性の差は認められなかったが、0.5 Gy 照射の場合の前駆細胞の生存率は年齢と共に低下した。

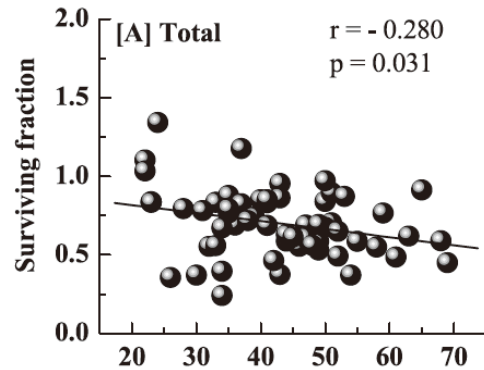


FIG. 3. The relationship between the age of the blood donors and the 0.5 Gy-surviving fraction of total hematopoietic progenitor CFCs.

- (7) 重粒子線照射ヒト造血幹細胞からの巨核球成熟及び血小板造血過程について検討したところ、生存した細胞から正常な巨核球成熟が認められ、生成した血小板機能も非照射コントロールのものとの間に有意な差は観察されなかった。さらに成熟巨核球中の Tie-2 分子の mRNA 発現の上昇に加え、PECAM1, SELP, CD44 といった接着因子の発現上昇が観察された。

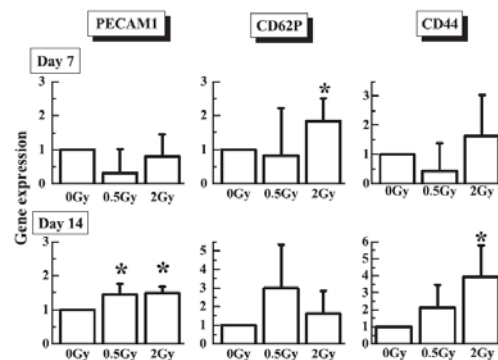


FIG. 4. Behavior of platelet aggregation-related genes after exposure to heavy ions. mRNA expression was analyzed using real-time RT-PCR. The values are the means \pm SD of four separate experiments. * $P < 0.01$ by the Tukey-Kramer test.

- (8) X線曝露ヒト造血幹細胞を、サイトカイン存在下で巨核球・血小板造血への分化増殖過程を解析したところ、細胞数は非照射コントロールに比べて低下するものの、残存細胞からの巨核球・血小板造血はコントロールとの間に差は認められなかった。さらに、培養過程で初期造血に関与する遺伝子である *FLI1* や *HOXB4*, 酸化ストレス関連遺伝子である *NQO1* や *HO1* 発現の有意な増加が認められ、X線による巨核球・血小板造血の促進作用が示唆された。
- (9) 2 Gy 及び 4 Gy 照射ヒト造血幹細胞での活性酸素種 (ROS) 産生は、サイトカイン刺激下で 6 時間後に非照射コントロールに比べ有意に増加するが、サイトカイン非存在下では差はなかった。この時細胞内 ROS 及びミトコンドリア量と生存率との間に関連性は認められず、照射直後の ROS は個体差感受性との関連性は低い可能性が示唆された。
- (10) 放射線がパターン認識受容体発現及びそのリガンドである病原菌関連分子に対する応答性に影響する事を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- (1) N. Hayashi, S. Monzen, K. Ito, T. Fujioka, Y. Nakamura and I. Kashiwakura. Effect of ionizing radiation on differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into the three germ layers. *J Radiat Res*, 53(2):195–201 (2012).
- (2) K. Kato, M. Kuwabara and I. Kashiwakura. The influence of gender- and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. *J Radiat Res*, 52(3):293–299 (2011).
- (3) S. Monzen, K. Takahashi, H. Yoshino, K. Kasai-Eguchi and I. Kashiwakura. Terminal maturation of megakaryocytes and platelet production derived from hematopoietic stem cells irradiated to heavy-ion beams. *Radiat Res*, 176(1):8–16 (2011).
- (4) M. Hosoda, S. Tokonami, A. Sorimachi, S. Monzen, M. Osanai, M. Yamada, I. Kashiwakura, S. Akib. The time variation of dose rate artificially increased by the Fukushima nuclear crisis. *Scientific Reports* 1, Article number: 87 (2011).
- (5) Y. Kaneyuki, H. Yoshino and I. Kashiwakura. Involvement of intracellular reactive oxygen species and mitochondria in the radiosensitivity of human hematopoietic stem cells. *J Radiat Res*, 53(1):145–50 (2011).
- (6) S. Monzen, E. Tashiro and I. Kashiwakura. Megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis in hematopoietic stem cells exposed to ionizing radiation. *Radiat Res*, 176(6): 716–724 (2011).
- (7) S. Monzen, M. Hosoda, M. Osanai, H. Yoshino, S. Tokonami, Y. Hosokawa, M.A. Yoshida, M. Yamada, Y. Asari, K. Satoh and I. Kashiwakura. Individual radiation exposure dose due to support activities at safe shelters in Fukushima Prefecture. *PLoS One*, 6(11):e27761 (2011).
- (8) N. Hayashi, K. Takahashi, Y. Abe and I. Kashiwakura. The effects of X-irradiation on ex vivo expansion of cryopreserved human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiat Res*, 51(2): 137–144 (2010).
- (9) K. Takahashi, S. Monzen, N. Hayashi and I. Kashiwakura. Correlations of cell surface antigens with the individual differences of radio-sensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Radiat Res*, 173(2):184–90 (2010).
- (10) K. Kato, K. Takahashi, S. Monzen, H. Yamamoto, A. Maruyama, K. Ito and I. Kashiwakura. Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in human hematopoietic stem cells. *Radiat Res*, 174 (2): 177–184 (2010).
- (11) S. Monzen, K. Ohsuda, Y. Miyazaki, N. Hayashi, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Radiation sensitivities on the terminal maturation of megakaryocytes and thrombopoiesis. *Radiat Res*, 172(3): 314–320 (2009).
- (12) S. Monzen, H. Yoshino, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Heavy ion beam irradiation regulates the mRNA expression in megakaryocytopoiesis from human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiat Res*, 50(5): 477–486 (2009).
- (13) T. Katsumori, H. Yoshino, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Inductive potential of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor to mature neutrophils from X-irradiated human peripheral blood hematopoietic progenitor cells. *Biol Pharm Bull*, 32(11): 1849–1853 (2009).

[学会発表] (計 28 件)

- (1) K. Kato and I. Kashiwakura. Radiosensitivity of human hematopoietic stem/ progenitor cells. *International Symposium on Natural Radiation Exposure and Low Dose Radiation Epidemiological Studies* (Hirosaki, Japan, Feb 29 – Mar 3, 2012), Abstract.
- (2) S. Monzen and I. Kashiwakura. The

- radioprotection effects of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on the human erythrocyte/granulocyte lineages. *International Symposium on Natural Radiation Exposure and Low Dose Radiation Epidemiological Studies* (Hirosaki, Japan, Feb 29 – Mar 3, 2012), Abstract.
- (3) H. Yoshino, T. Kiminarita, Y. Matsushita and I. Kashiwakura. Response of the Nrf2 protection system in human monocytic cells after ionizing irradiation. *International Symposium on Natural Radiation Exposure and Low Dose Radiation Epidemiological Studies* (Hirosaki, Japan, Feb 29 – Mar 3, 2012), Abstract.
- (4) 吉野浩教, 柏倉幾郎. 放射線照射細胞における Nrf2 生体防御システムの関与 (PB-6). 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月, 神戸市), 講演要旨集 P151.
- (5) 山口平, 門前暁, 柏倉幾郎. ヒト造血幹細胞の放射線応答におけるミトコンドリアの関与 (PB-16). 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月, 神戸市), 講演要旨集 P155.
- (6) 門前暁, 吉野浩教, 笠井 (江口) 清美, 柏倉幾郎. ヒト骨髄系造血の分化・増殖に与える電離放射線の影響 (PB-17). 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月, 神戸市), 講演要旨集 P155.
- (7) 石川純也, 吉野浩教, 門前暁, 柏倉幾郎. 高線量放射線ばく露個体の治療に関する基礎的検討 (PF-4). 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月, 神戸市), 講演要旨集 P167.
- (8) H. Yoshino and I. Kashiwakura. The effects of ionizing radiation on pattern recognition receptors. *14th International Congress of Radiation Research* (Warsaw, Poland, August 28 - September 1, 2011), Abstract
- (9) S. Monzen, T. Nakamura and I. Kashiwakura. Characteristic analysis of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by hematopoietic stem cells exposed to ionizing radiation. *14th International Congress of Radiation Research* (Warsaw, Poland, August 28 - September 1, 2011), Abstract
- (10) M. Hosoda, S. Tokonami, A. Sorimachi, S. Monzen, M. Osanai, I. Kashiwakura and S. Akiba. Time variation of ambient dose rate artificially increased by Fukushima Daiichi nuclear power station accident. *14th International Congress of Radiation Research* (Warsaw, Poland, August 28 - September 1, 2011), Abstract
- (11) 林直樹, 柏倉幾郎. サイトカイン非存在下における造血幹/前駆細胞の放射線影響 (PB-2). 日本放射線影響学会第 53 回大会 (2010 年 11 月, 京都市), 講演要旨集 P139.
- (12) 門前暁, 高橋賢次, 林直樹, 柏倉幾郎. ヒト造血幹細胞の表面抗原の発現と放射線個体差感受性の関連性 (PB-16). 日本放射線影響学会第 53 回大会 (2010 年 11 月, 京都市), 講演要旨集 P144.
- (13) N. Hayashi, K. Takahashi, S. Monzen, T. Fujioka, Y. Nakamura and I. Kashiwakura (MS207) Effect of ionizing radiation on the differentiation responsible for transforming mouse iPS cells into the three germ layers. *56th Annual Meeting Radiation Research Society* (September 25-29, 2010, Grand Wailea Resort Hotel and Spa, Maui, Hawaii), ABSTRACT, P37.
- (14) N. Hayashi, K. Takahashi, S. Monzen, T. Fujioka, Y. Nakamura and I. Kashiwakura (PS3.16) Effect of ionizing radiation on the differentiation responsible for transforming mouse iPS cells into the three germ layers. *56th Annual Meeting Radiation Research Society* (September 25-29, 2010, Grand Wailea Resort Hotel and Spa, Maui, Hawaii), ABSTRACT, P101.
- (15) Yukiko Kaneyuki, Kenji Takahashi and Ikuo Kashiwakura (PS3.46) Involvement of mitochondrial function in radiosensitivity of human hematopoietic stem cells. *56th Annual Meeting Radiation Research Society* (September 25-29, 2010, Grand Wailea Resort Hotel and Spa, Maui, Hawaii), ABSTRACT, P109. (2010 被ばく-4)
- (16) M. Kuwabara, K. Kato and I. Kashiwakura. (PS3.50) Individual Differences in the Radiosensitivity of Hematopoietic Progenitor Cells Detected in Steady-State Human Peripheral Blood. *56th Annual Meeting Radiation Research Society* (September 25-29, 2010, Grand Wailea Resort Hotel and Spa, Maui, Hawaii), ABSTRACT, P110.
- (17) S. Monzen, K. Takahashi, K. Eguchi-Kasai and I. Kashiwakura (PS4.06) Heavy ion beam irradiation regulates mRNA expression and cell surface antigens during maturation of megakaryocytes and thrombopoiesis. *56th Annual Meeting Radiation Research Society* (September 25-29, 2010, Grand Wailea Resort Hotel and Spa, Maui, Hawaii), ABSTRACT, P114.
- (18) H. Yoshino, K. Takahashi and I. Kashiwakura (PS4.08) Stimulation type-dependent dendritic cells maturation from human monocytes after X-irradiation. *56th Annual Meeting Radiation Research Society* (September 25-29, 2010, Grand Wailea Resort Hotel and Spa, Maui, Hawaii), ABSTRACT, P114. (2010 被ばく-7)

- (19) S. Monzen, K. Takahashi, N. Hayashi and I. Kashiwakura. Correlations of cell surface antigens with the individual differences of radio-sensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *2010 ISEH 39th Annual Scientific Meeting of the ISEH--Society for Hematology and Stem Cells* (September 15-18, 2010, Melbourne Convention & Exhibition Centre, Melbourne, Australia). *Exp Hematol*, 38 (9): Supple. 1, P078, S11 (2010).
- (20) 門前暁, 高橋賢次, 柏倉幾郎. ヒト白血病細胞 K562 の巨核球分化誘導に対する放射線の影響. 第 49 回日本医学放射線学会生物部会学術大会(2010年7月9日, 札幌市), 講演要旨集 P30.
- (21) 林直樹, 門前暁, 藤岡剛, 中村幸夫, 柏倉幾郎. iPS 細胞の初期分化に及ぼす放射線の影響. 第 49 回日本医学放射線学会生物部会学術大会(2010年7月9日, 札幌市), 講演要旨集 P31.
- (22) 金行由樹子, 門前暁, 高橋賢次, 柏倉幾郎. ヒト造血前駆細胞の放射線感受性に及ぼすミトコンドリアの関与. 日本放射線影響学会第 52 回大会 (広島, 2009 年 11 月), P2-80
- (23) 加藤健吾, 高橋賢次, 門前暁, 丸山敦史, 伊東健, 柏倉幾郎. ヒト造血幹細胞の放射線感受性における酸化ストレス応答機構の関与. 日本放射線影響学会第 52 回大会 (広島, 2009 年 11 月), P2-87.
- (24) S. Monzen, K. Osuda, Y. Miyazaki, N. Hayashi, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Radiation Sensitivities in the Terminal Stages of Megakaryocytic Maturation and Platelet Production. *2009 ISEH 38th Annual Scientific Meeting*. (September 9-12, 2009 - Hotel Divani Caravel - Athens, Greece). *Exp Hematol*, 37(9): Supple. 1, P101, S69 (2009).
- (25) N. Hayashi, K. Takahashi, Y. Abe and I. Kashiwakura. Placental/umbilical cord blood- derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34⁺ cells. *2009 ISEH 38th Annual Scientific Meeting*. (September 9-12, 2009 - Hotel Divani Caravel - Athens, Greece). *Exp Hematol*, 37(9): Supple. 1, P108, S73 (2009).
- (26) S. Monzen, N. Hayashi, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Correlations of cell surface antigens with the individual differences of radio-sensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *The 1st International Symposium on Radiation Emergency Medicine in Hirosaki University*. (Aug 1, 2009, Hirosaki). P11.
- (27) 門前暁, 高橋賢次, 吉野浩教, 笠井一江口清美, 柏倉幾郎. 重粒子線照射ヒト造血

幹・前駆細胞からの初期造血における発現遺伝子の変化. 第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会. (2009 年 7 月 10 日、富山)、講演要旨集 P6.

- (28) 吉野浩教, 高橋賢次, 柏倉幾郎. ヒト末梢血単球由来樹状細胞の分化誘導における放射線の影響. 第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会. (2009 年 7 月 10 日、富山)、講演要旨集 P14.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~kashiwakura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA IKUO)
弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：00177370

門前 暁 (MONZEN SATORU)
弘前大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号：20514136

吉野 浩教 (YOSHINO HIRONORI)
弘前大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号：10583734

(3) 連携研究者

阿部 由直 (ABE YOSHINAO)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10167950

近藤 隆 (KONDO TAKASHI)
富山大学・医学部・教授
研究者番号：40143937

高橋 賢次 (TAKAHASHI KENJI)
鳥取大学・農学部獣医学科・准教授
研究者番号：00400143