

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893007

研究課題名(和文) ヒト造血幹/前駆細胞における放射線感受性関与遺伝子の探索

研究課題名(英文) Expression analyzing of radiation responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells

研究代表者

辻口 貴清 (Tsujiuchi, Takakiyo)

弘前大学・保健学研究科・助手

研究者番号：90737454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：全ての血球を産生する造血幹細胞は、多分化能と自己複製能を有する生体の恒常性において極めて重要な細胞であり、その高い増殖能ゆえに放射線の標的細胞となる。ヒト造血幹/前駆細胞に2GyのX線を照射し、遺伝子プロファイルを網羅的に調べたところ、非照射群に対し照射群ではMyc遺伝子の発現が上昇していると予測された。また照射・非照射群間では、EIF4G1遺伝子、PNO1遺伝子の発現が上昇していた。これら二つの遺伝子はMyc遺伝子の下流遺伝子に属し、細胞死に関与している。Myc遺伝子、EIF4G1遺伝子、PNO1遺伝子は造血幹/前駆細胞の放射線感受性に深く関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the nature of genes that contribute to the radiosensitivity of human hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), we analyzed the gene expression profiles detected in HSPCs irradiated with 2 Gy X-rays after culture with or without an optimal combination of hematopoietic cytokines. A comprehensive genetic analysis to search for genes associated with cellular radiosensitivity was undertaken, and we found that the expressions of the downstream genes of MYC oncogene increased after X-irradiation. In fact, the activation of MYC was observed immediately after X-irradiation, and was the only gene still showing activation at 6 h after irradiation. Activated gene regulator function of MYC due to irradiation was suppressed by culturing the HSPCs with combinations of cytokines, which exerted radioprotective effects. MYC was strongly associated with the radiosensitivity of HSPCs.

研究分野：放射線科学

キーワード：造血幹細胞 放射線 網羅的遺伝子解析 放射線感受性

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わたって産生し続ける生体の恒常性維持に必須の細胞である。高い増殖能と未分化性ゆえに、放射線生物学の観点から、造血幹細胞は典型的に高い放射線感受性を示す細胞であるとされている。放射線生物学の基礎となっているベルゴニー・トリボンドーの法則では、分裂頻度が高い細胞、将来長期にわたって分裂する細胞、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。造血幹細胞はこれらの条件を全て満たす細胞であるが、一方で生体内に少数しか存在しない細胞の為、その損傷及び修復機構等感受性や細胞死に関する詳細、特に低線量暴露や線量率効果については未解明なままである

2. 研究の目的

本研究は、ヒト造血幹/前駆細胞の放射線感受性に関する遺伝子の特徴を明らかにすることを目的とした。具体的には造血サイトカインで処理・未処理のヒト造血幹/前駆細胞に X 線を照射し、その遺伝子を網羅的に解析する。本研究の成果は、造血幹/前駆細胞への被ばくがどのように造血系へのリスクとなるかを含めた、各個体のリスク評価の指標の確立に繋がる。

3. 研究の方法

本研究では、造血幹細胞の放射線感受性遺伝子の探索、放射線暴露による分化・増殖能への影響解明を目的とし、

放射線暴露ヒト造血幹細胞の細胞生物学的、分子生物学的解析

放射線暴露ヒト造血幹細胞の網羅的遺伝子解析

の 2 課題を検討した。

ヒト臍帯血より高度に分離精製した CD34 抗原陽性細胞をヒト造血幹細胞として実験に用いた。研究課題 1 では、CD34 抗原陽性細胞に X 線を照射し、暴露後早期 (~6 時間) の段階での発現遺伝子を cDNA マイクロアレイによって解析し、得られたデータを分子間ネットワーク/パスウェイデータベース IPA を用いて遺伝子発現量の比較解析を行い、放射線感受性遺伝子の探索を行った。研究課題 2 では各種サイトカインコンビネーション刺激下ヒト造血幹細胞の培養を行い、培養過程で一部の細胞を取り出し、各段階の細胞について細胞生物学的及び、分子生物学的に検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト造血幹/前駆細胞における 2GyX 線暴露後の動態

分離精製した CD34 抗原陽性細胞に 2Gy の X 線を照射し、14 日後の骨髓系造血前駆細胞由来コロニーの生存率を観察した (Fig.1,

Table.1)。生存率は非照射コントロール群の約 20-30%程度まで減少しており、造血幹/前駆細胞は放射線に対し、高い感受性を有していることが確認された。

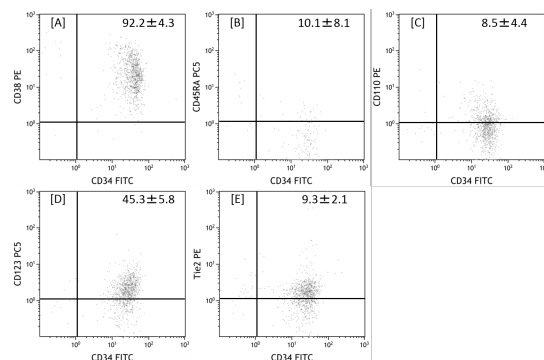


Figure 1. Representative cell surface antigen profiles of CD34+ cells just after purification from placental/umbilical cord blood. The purified CD34+ cells were counter-stained for the following eight antigens: CD38 [A], CD45RA [B], CD110 [C], CD123 [D] and Tie-2 [E]. These panels indicated that HSPCs were enriched in the purified CD34+ cells.

Table 1. The surviving fractions of progenitor cells in irradiated HSPCs

Dose (Gy)	number of progenitors (/10 ⁵ CD34 ⁺ cells)				Surviving fraction of CFCs
	CFU-GM	BFU-E	CFU-Mix	CFCs	
0Gy	150	90	26	266	-
2Gy	31	33	12	76	0.284 ± 0.016

(2) ヒト造血幹/前駆細胞における 2GyX 線暴露後の網羅的遺伝子解析

続いて、CD34 抗原陽性細胞に 2Gy の X 線を暴露後早期 (6 時間以内) の段階での発現遺伝子を cDNA マイクロアレイによって解析した。X 線照射した場合を IR(+), 非照射の場合を IR(-)、放射線防護効果を示すサイトカインコンビネーションを加えた場合を Cyt(+), 加えなかった場合を Cyt(-)とした。放射線によって変動した遺伝子を探すために、

IR(+)/Cyt(+) vs **IR(-)/Cyt(+)**

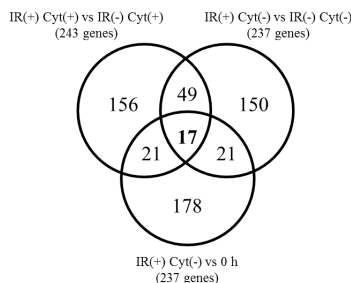
IR(+)/Cyt(-) vs **IR(-)/Cyt(-)**

IR(+)/Cyt(-) vs **0h (細胞分離直後)**

上記 3 つの条件の間で二倍以上発現が変動している遺伝子を探した。

Fig.2 に、変動していた遺伝子数を示す。それぞれの条件間で、2 倍以上変動している遺伝子の数は 200 遺伝子以上あった。各条件間で抽出された遺伝子の中から、さらに共通している遺伝子を抽出したところ、17 遺伝子が確認された。つまりサイトカインコンビネーション存在・非存在に関わらず、照射・非照射によって 17 遺伝子の発現が大きく変動するということが確認された。また、同様にサイトカイン存在・非存在下で発現量に違いの

ある遺伝子を抽出したところ、36 遺伝子が確認された。



Radiation-responded genes (A) (17 genes) Radiation and cytokine-responded genes (B) (36 genes)

Fig. 3. Venn diagrams of 17 radiation-responding genes and 36 radiation and cytokine-responding genes.

Figure 2. The numbers of radiation-responsive and radiation- and cytokine-responsive genes obtained by comparing the gene expression levels between two experimental groups. Five experimental groups were classified according to the irradiation condition (IR(+) or IR(-)) cytokine treatment (Cyt(+) or Cyt(-)) and cultivation (6 h or not). The group named “0 h” were nonirradiated HSPCs without cultivation.

次いで、up-stream regulator (最上流の遺伝子)を調べたところ、非照射群に対し照射群では比較した全ての条件間で *Myc* 遺伝子の発現が上昇していると予測された (Table.2)。

Table 2. Effects of X-irradiation and cytokine treatment on MYC expression

Group A	Group B	Up-stream regulator		Expression change	
		Predicted activation state	z-score ^a	Fold Change	p-value
0h	IR(+) Cyt(-)	Activated	3.07	2.13	0.28
0h	IR(+) Cyt(+)	Activated	2.74	3.29	0.11
IR(-) Cyt(-)	IR(+) Cyt(-)	Activated	4.81	1.48	0.62
IR(-) Cyt(-)	IR(+) Cyt(+)	Activated	2.81	1.18	0.69
IR(-) Cyt(+)	IR(+) Cyt(+)	Activated	3.54	1.32	0.85

先ほどの解析で示された 17 及び 36 遺伝子の中にはどちらにも *EIF4G1* 遺伝子、*PNO1* 遺伝子が存在しており、これら二つの遺伝子は *Myc* 遺伝子の下流遺伝子に属し、アポトーシスやオートファジーなどの細胞死に関与している。さらに造血サイトカインで処理をした群ではこれらの遺伝子の発現上昇率は少なくなっていることから、*Myc* 遺伝子、*EIF4G1* 遺伝子、*PNO1* 遺伝子は造血幹 / 前駆細胞の放射線感受性に深く関与している可能性が示唆された (Table.3, Fig.3)。

Table 3. Relationship of radiation-responding and radiation and cytokine-responding genes with MYC genes.

Symbol	Down-stream of <i>Myc</i>	Entrez Gene Name	Groups
<i>EIF4G1</i>	Positive	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	A ^a and B ^b
<i>GART</i>	Positive	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase	A
<i>HLA-E</i>	Positive	major histocompatibility complex, class I, E	B
<i>MDM2</i>	Positive	MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	B
<i>PNO1</i>	Positive	partner of NOB1 homolog	A and B
<i>TIMP2</i>	Positive	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	B

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 3 件)

1. Takakiyo Tsujiguchi, Tokuhisa Hirouchi, Satoru Monzen, Yoshiaki Tabuchi, Ichiro Takasaki, Takashi Kondo and Ikuo Kashiwakura. Expression analysis of radiation-responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells. **Journal of Radiation Research**. 2016 Jan; 57(1): 35-43 査読有 doi: 10.1093/jrr/rrv071

2. Masaru Yamaguchi, Tokuhisa Hirouchi, Mitsuru Chiba, Satoru Monzen, Hironori Yoshino, Junya Ishikawa, Takakiyo Tsujiguchi, Ayaka Nishiyama, Sho Murakami, Junichiro Komura, Ikuo Kashiwakura. Thrombopoietin-Mimetic Romiplostim Confers the Complete Survival Rate to Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation. **Blood**. 2015. 126. 2390. 査読有 URL: <https://ash.confex.com/ash/2015/webprogram/Paper82353.html>

3. Murakami S, Yoshino H, Ishikawa J, Yamaguchi M, Tsujiguchi T, Nishiyama A, Yokoyama K and Kashiwakura I. Effects of ionizing radiation on differentiation of murine bone marrow cells into mast cells. **Journal of Radiation Research**. 2015 Nov;56(6):865-71 査読有 doi: 10.1093/jrr/rrv061

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Masaru Yamaguchi, Tokuhisa Hirouchi, Mitsuru Chiba, Satoru Monzen, Hironori Yoshino, Junya Ishikawa, Takakiyo Tsujiguchi, Ayaka Nishiyama, Sho Murakami, Junichiro Komura, Ikuo Kashiwakura. Thrombopoietin-Mimetic Romiplostim Confers the Complete Survival Rate to Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation. **ASH2015, December 5-9, 2015, Orland, USA**

2. M Yamaguchi, T Hirouchi, M Chiba, S Monzen, H Yoshino, J Ishikawa, T Tsujiguchi, A Nishiyama, S Murakami, J Komura and I Kashiwakura. Effects of a c-Mpl Agonist on

Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation. *2nd Educational Symposium on Radiation and Health by young scientists (ESRAH2015), May 23-24, 2015, Hirosaki University (Hirosaki, Aomori)*

3. K Yokoyama, A Nishiyama, T Tsujiguchi, S Murakami, M Yamaguchi, I Kashiwakura. EXPRESSION ANALYSIS OF C-MYC IN BONE MARROW CELLS OF MICE EXPOSED TO IONIZING RADIATION. *2nd Educational Symposium on Radiation and Health by young scientists (ESRAH2015), May 23-24, 2015, Hirosaki University (Hirosaki, Aomori)*

4. 山口 平, 廣内 篤久, 石川 純也, 辻口 貴清, 西山 彩香, 村上 翔, 小村 潤一郎, 柏倉 幾郎. 致死放射線ばく露マウスに対する c-Mpl 作動薬の作用. **日本放射線影響学会第 57 回大会 (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島県鹿児島市, かごしま県民交流センター)**

5. 西山 彩香, 辻口 貴清, 山口 平, 村上 翔, 柏倉 幾郎. 致死放射線ばく露マウスに対する c-Mpl 作動薬の作用. **日本放射線影響学会第 57 回大会 (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島県鹿児島市, かごしま県民交流センター)**

6. M. Yamaguchi, T. Hirouchi, M. Chiba, S. Monzen, H. Yoshino, J. Ishikawa, T. Tsujiguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, J. Komura, I. Kashiwakura. Effects of a c-mpl receptor agonist on mice exposed to lethal ionizing radiation. *The 9th International Symposium on the Natural Radiation Environment (NRE-IX), 22-26, September, 2014, Hotel New Castle (Hirosaki, Aomori)*

7. Ayaka Nishiyama, Masaru Yamaguchi, Takakiyo Tsujiguchi, Sho Murakami and Ikuo Kashiwakura. Evaluation of oxidative stress markers in plasma derived from individuals exposed to ionizing radiation. *1st Educational Symposium on Radiation and Health by young scientists (ESRAH2014), September 22-23, 2014, Hotel New Castle (Hirosaki, Aomori)*

8. Takakiyo Tsujiguchi, Tokuhisa Hirouchi, Satoru Monzen, Yoshiaki Tabuchi, Ichiro Takasaki, Takashi Kondo and Ikuo Kashiwakura. Expression analysis of radiation responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *1st Educational Symposium on Radiation and Health by young scientists (ESRAH2014), September 22-23, 2014, Hotel New Castle (Hirosaki, Aomori)*

〔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

弘前大学研究者総覧:

http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/html/100000850_ja.html?k

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻口 貴清 (Tsujiguchi Takakiyo)

弘前大学大学院保健学研究科・助手

研究者番号: 90737454

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし