

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790874

研究課題名 (和文) 造血幹細胞未分化制御因子による放射線感受性調節機構の解明

研究課題名 (英文) Correlation of cell surface antigens with individual differences in radiosensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells.

研究代表者

高橋 賢次 (TAKAHASHI KENJI)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：00400143

研究成果の概要 (和文)：本研究課題は、血液の源である造血幹細胞における放射線防護の基礎研究である。この造血幹細胞の放射線感受性が個体間で異なることに着目した。特に造血幹細胞の未分化であることの指標に着目し、その関連性を明らかにすると共に分子生物学的レベルにおける放射線抵抗性メカニズムを明らかにすることを目的としている。

研究成果の概要 (英文)：To characterize the differences in the radiosensitivity of individual populations of human hematopoietic stem/progenitor cells, we examined the relationship among cell surface antigens, clonogenic potential and radiation survival.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：放射線，細胞・組織，再生医学，シグナル伝達，生体分子

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、生涯において血球を産生し続け、数日から数十日しか機能しない成熟血球を常に維持する生体には欠かすことのできない細胞である。

また、造血幹細胞は、未分化であることと

高い増殖能により典型的な放射線高感受性を示す。

この高い放射線感受性は、事故・災害時の被ばくにより生命の危険を引き起こすばかりか、がん治療においても治療の制限になり得る。更には、放射線と同様に細胞の DNA に

損傷を引き起こす化学療法においても造血幹細胞の高い感受性は治療効果の阻害因子になっている。

このように、「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。

我々はこれまでに、成人の末梢血に含まれる造血幹／前駆細胞における放射線感受性には大きな個体差が存在することを明らかにした (J. Radiat. Res. 49: 113-121, 2008)。

一方、この造血幹細胞の仕組みについては数十年に渡り研究が精力的に行われ、ニッシュと呼ばれる幹細胞を維持する環境が形成されていることが数多く報告されてきた。

このニッシュでは、造血幹細胞は骨表面を覆う骨芽細胞に包まれた状態で未分化性が保たれていた。造血幹細胞はこの骨芽細胞との様々な分子による相互作用によって機能調節を受けているが、この一つに tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2 (Tie-2) という分子が存在している。

Tie-2 は造血幹細胞に発現する細胞表面リセプターであり、骨芽細胞が産生するそのリガンドである angiopoietin-1 (Ang-1) により、造血幹細胞の未分化維持に機能していると考えられている。また、ヒト臍帯血中の造血幹／前駆細胞の一つの集団である CD34 陽性細胞において、Tie-2 分子が発現している細胞ほど未分化性を保持しており、増殖能が高いことは Yuasa らのグループにより報告されている (BBRC. 298: 731-737, 2002)。

しかしながら、放射線感受性との関連については全く報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、Tie-2 分子をはじめとした造血幹細胞を特徴づける分子に着目し、造血幹細胞の放射線感受性と関連性がないかどうか、更にはそれらの分子が放射線感受性に作用するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

これらの成果は、個体の放射線感受性を特

徴づける因子を明らかにできる可能性があり、がん治療における放射線および化学療法の際の患者の感受性を調べるうえでも応用できることが考えられる。また、臨床応用以外の分野においても、核関連施設での就業や宇宙空間での作業への応用も可能である。

3. 研究の方法

(1) 試料及び試薬

遺伝子組換えヒト幹細胞因子 (SCF)、ヒトインターロイキン-3 (IL-3) は Biosource (東京) から購入した。顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) およびエリスロポエチン (EPO) は協和発酵キリン株式会社から購入した。ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は PeproTech (NJ, USA) から購入した。Ang-1 は R&D Systems (MN, USA) から購入した。甲状腺ホルモン (T3) はシグマアルドリッチジャパン (東京) から購入した。蛍光標識モノクローナル抗体 (MAbs) である, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD34, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD38, PE-cyanin-5-forochrome tandem (PC5)-conjugated anti-human CD45 各抗体は Beckman Coulter Immunotech (Marseille, France) より購入した。PE-conjugated Tie-2 抗体は R&D Systems (MN, USA) から購入した。アイソタイプコントロールである FITC-IgG₁, PE-IgG₁ 各抗体は Beckman Coulter Immunotech より購入した。

(2) 臍帯血由来 CD34 陽性細胞の分離・精製

本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行なった。母親からインフォームド・コンセントが得られた正期産、正常妊娠分娩を対象とした。東京臍帯血バンクのガイドラインに基づいて、独立行政法人国立病院機構弘前病院 (弘前) にて娩出後の胎盤及び臍帯から、抗凝固剤 citrate-phosphate-dextrose 液入りの採取バッグ (CBC-20, ニプロ, 大阪) を用いて採取した。

採取後 24 時間以内の臍帯血を 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) -phosphate buffered saline (PBS) を用い

て約2倍に希釈後、リンホセパールI (1.077 g/ml, 免疫生物研究所, 高崎) を用いて比重遠心法により有核細胞を分離し、磁気ビーズ法 (EasySep®, StemCell Technologies Co., Ltd., Vancouver, Canada) によりCD34陽性細胞を分離・精製した。CD34細胞陽性率は、80–95%であった。

(3) CD34陽性細胞への放射線照射

CD34陽性細胞へのX線照射は、X線発生装置 (MBR-1520R, 日立メディコ, 東京) にて管電圧150 kV, 管電流を20 mA, 照射距離を45 cm, 0.5 mm Al–0.3 mm Cuのフィルターをセットし、吸収線量率を約80.0 cGy/minの条件とした。

(4) 造血前駆細胞数の解析

それぞれの条件で処理された造血幹・前駆細胞由来コロニー形成能を測定することで造血前駆細胞数を計数した。白血球前駆細胞 (CFU-GM), 赤血球前駆細胞 (BFU-E)、混合系前駆細胞 (CFU-Mix) の数は、メチルセルロースを用いたコロニーアッセイ法により評価した。CFU-GM, BFU-Eはそれぞれ顆粒球・マクロファージ, 赤血球へと分化する前駆細胞である。CFU-Mixはこれらの前駆細胞よりも更に未熟な前駆細胞に位置付けられ、全ての細胞へ分化する。メチルセルロース培地には、G-CSF (10 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml), IL-3 (100 ng/ml), EPO (4 units/ml) を添加し、24ウェルマルチプレートへ0.5 ml/ウェルとなるように細胞を播種し14日間培養後、顕微鏡にてコロニーを計数した。

(5) フローサイトメーター解析

CD34陽性細胞に、FITC-CD34, PE-CD38, PC5-CD45, PE-Tie-2抗体を添加し、4°C, 暗所にて20分間インキュベート後、PBSを用いて洗浄し、PBSで再懸濁後、フローサイトメーター (Beckman-Coulter, Epics XL, CA, USA) を用いて細胞表面抗原発現の解析を行った。

(6) 統計解析

得られた各群の結果より棄却検定を行い、

5%レベルにおいて棄却した。コントロール群と各処理群間の有意差検定は、Studentのt検定でおこなった。

4. 研究成果

(1) 各個体の前駆細胞数とTie-2陽性率

本研究は、20検体の臍帯血から得られたCD34陽性細胞を用いて解析を行った。Tie-2の陽性率は、平均値が7.27%であり、1.60–15.09%の値を示した。CFU-GM, BFU-e, CFU-Mixを合わせた総前駆細胞数 (CFCs) との相関性はなく、Tie-2分子と前駆細胞数の関連性は見出せなかった (図1)。

(2) 各個体の放射線感受性とTie-2陽性率

CD34陽性細胞に2 GyのX線を照射し、その後生存した前駆細胞を測定し、各個体の放射線感受性を評価した。2 Gyの照射により、非照射群と比べて、21.7%まで生存率が低下したが、11.1–36.2%までの幅広い個体間の差異が見られた。この生存率とTie-2陽性率の相関性を調べたところ正の相関が見られ、CD34陽性細胞のTie-2陽性率が高くなるとともに放射線に対して抵抗性を現すことが示唆された (図2)。

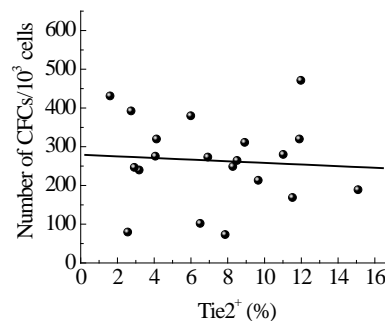


図1 Tie-2陽性率と前駆細胞数の関係

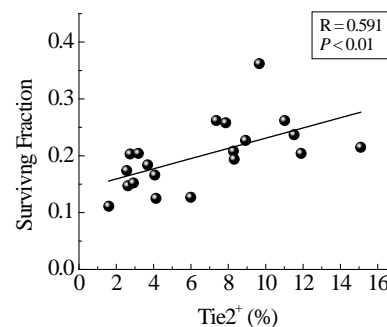


図2 Tie-2陽性率と2 Gy照射後の生存率の関係

(3) Ang-1の放射線防護効果

Tie-2分子を発現していることが放射線抵抗性を引き起こす可能性があることから、Tie-2分子を介した調節機構が何らかの作用を生み出していることが考えられた。Tie-2分子は、細胞表面のリセプターであり、このリガンドにはAng-1が知られている。そこで、次にAng-1でTie-2分子を刺激した時の放射線感受性の変動を検証した。しかしながら、Ang-1 (200 ng/ml) は放射線感受性には影響しなかった (図3)。

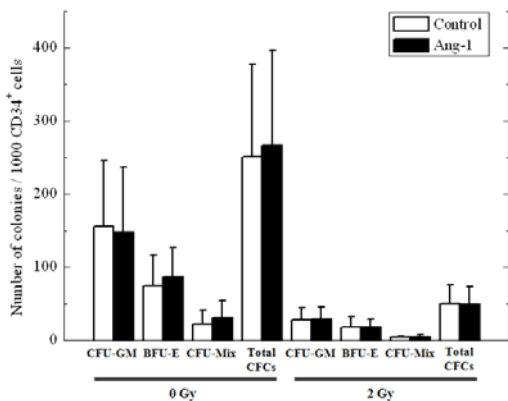


図3 放射線抵抗性における Ang-1 の効果

(4) 放射線感受性に対する甲状腺ホルモンの効果

Tie-2分子のリガンドであるAng-1の効果が見られなかったことから、Tie-2分子への直接的な刺激が放射線感受性に作用するわけではなかった。しかしながら、Tie-2分子が発現誘導されると放射線抵抗性を生み出す可能性は残されており、Tie-2分子と共に発現変動するような分子が造血幹/前駆細胞の放射線感受性に影響を与えると次なる仮説を立てた。そこで、Tie-2分子の発現を誘導することが報告されている甲状腺ホルモンを用いて放射線感受性への効果を試験した。

造血幹/前駆細胞は、3~3000 pg/mlの甲状腺ホルモンで3日間培養した。その後2 GyのX線を照射し、コロニーアッセイ法で評価した。その結果、300 pg/mlで刺激した造血幹/前駆細胞の生存率は優位に増加された。しかしながら、甲状腺ホルモンによるTie-2分子の発現誘導の違いは見られず、甲状腺ホルモン刺激は造血幹/前駆細胞の放射線感受性を変動さ

せるものの、今回着目したTie-2分子との関連性は認められなかった。

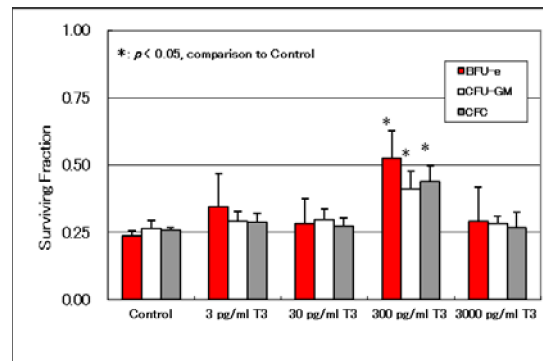


図4 放射線抵抗性に対する甲状腺ホルモン (T3) の効果

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 17 件)

- ① Kato K., Takahashi K., Kashiwakura I. (7名中2番目), Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in human hematopoietic stem cells. Radiation Research, 査読有, 印刷中
- ② Takahashi K., Monzen S., Hayashi N., Kashiwakura I. Correlations of cell surface antigens with individual differences in radiosensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. Radiation Research, 査読有, 173, 2010, 184-190
- ③ Monzen S., Takahashi K., Kashiwakura I. (6名中5番目), Radiation sensitivities in the terminal stages of megakaryocytic maturation and platelet production. Radiation Research, 査読有, 172, 2010, 314-320 [学会発表] (計 4 件)
- ① 加藤健吾, 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, 2009年11月, 広島
- ② Takahashi K. Effects of LET-radiation on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. ISEH 37th Annual Scientific Meeting, July 9-12, 2008, Boston, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 賢次 (TAKAHASHI KENJI)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：00400143

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：