

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02955

研究課題名(和文) 低線量率放射線被ばくによる造血幹細胞障害とその分子基盤の解析

研究課題名(英文) Molecular and cellular analyses of hematopoietic stem cell damage induced by low dose-rate irradiation

研究代表者

瀧原 義宏 (Takahara, Yoshihiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・名誉教授

研究者番号：60226967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000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。細胞生物学的だけでなく単一細胞レベルで分子生物学的にも詳細に解析することによって、未分化上位造血細胞においてはゲノム修復が誘導されるが、アポトーシスや細胞分化も誘導されることが解った。これにより未分化上位造血細胞の特異的な減少が起こると考える。

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。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。本研究成果を基に、低線量率放射線被ばくによって造血幹細胞障害が引き起こされるメカニズムが更に明らかにされ、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. We then detailed the mechanism underlying the decrease at the molecular and cellular levels, further at the single cell level. Not only DNA repair responses against the genome damage but also apoptosis and cellular differentiation were induced in immature hematopoietic cells, which may give rise to specific reduction of immature hematopoietic cells.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：低線量放射線被ばく 造血幹細胞 長期骨髄再構築能 多分化能

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

### 1. 研究開始当初の背景

造血組織は放射線に対して高感受性であり、急性放射線障害においては、造血不全が致命傷となることも多い。一方で、福島原発事故を契機として、低線量・低線量率被ばくによる健康影響が危惧されるが、従来から放射線障害の研究は主に高線量率被ばくについて解析が進められて来ており、低線量・低線量率被ばくによる健康影響に対する知見は未だに乏しい。造血組織に対する被ばくの影響についても例外ではない。申請者の所属組織では、福島原発事故を契機として、平成 26 年度から低線量率被ばくによる生体影響について本格的に解析を進めるべく、文部科学省から支援を受けて、低線量率の放射線照射装置、自動 M 期染色体核型分析機や次世代シーケンサを導入し、低線量プロジェクトを立ち上げた。研究室では、従来から造血幹細胞の活性を制御する分子基盤の解析を進めている。そこで、本研究では研究室で培ってきた造血幹細胞の解析技術を駆使し、低線量率被ばくによる造血幹細胞に及ぼす影響とその分子基盤について詳細な解析を進め、低線量率被ばくによる造血幹細胞に対する影響を最低限に押さえるための理論的基盤の構築を目指すことを計画した。従来、造血幹細胞を頂点とした造血ヒエラルキーを構成する各細胞は、メチルセルロース法によるコロニーアッセイや同種骨髄移植法等によってレトロスペクティブにしか同定することができず、直接解析することは出来なかった。しかし、細胞表面抗原に対する抗体と細胞ソーターを駆使したプロスペクティブな方法により造血幹細胞や造血前駆細胞を分離同定することが可能となり、造血システムの解析は画期的な進歩を遂げた。そして、最近では造血幹細胞と造血前駆細胞における放射線感受性の差異やそれを規定する分子基盤についても明らかにされ始めている。つまり、被ばくによるゲノム障害に対する修復機構の違いやその結果として生じるゲノム異常の起こり具合にも差異があることが明らかにされつつある。しかし、これらはいずれも高線量率被ばくについて解析されたものであり、低線量率被ばくによる造血幹細胞に対する影響についての本格的な解析は、国内外とともにほとんどなされていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

研究室で調べたところ、比較的低線量率 (100 mGy/日) でマウスに放射線照射を試みても末梢血や造血前駆細胞においては軽度の変化しか認められなかった。一方、造血幹細胞においては顕著な低下が認められ、2 ヶ月間照射したものでは、未照射のものに比べ 20 分の 1 以下に低下していた。そこで、本研究ではまず造血幹細胞の低下を引き起こす被ばくによる閾値について、線量率と被ばく期間、そして累積線量の面から解析を進めた。そして、低線量率被ばくによって造血幹細胞が低下する機序について明らかにすべく造血幹細胞移植による造血幹細胞の機能解析を進めるとともに、ゲノム損傷の程度、損傷応答、その結果としてのアポトーシスの誘導状況について解析をした。更に、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を進め、造血幹細胞障害を引き起こされる分子基盤について詳細な解析を進めた。そして、低線量率被ばくによって引き起こされる造血幹細胞障害を防ぐための基盤理論について検討した。

### 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造血幹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ゲノム異常も含めた細胞障害を最低限に軽減する方法について模索した。具体的には、低線量率被ばくが造血幹細胞へ及ぼす影響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) 造血幹細胞の減少が引き起こされる線量率と照射期間を検討し、その閾値について解析した。
- (2) 100 mGy/日の低線量率での放射線照射を長期に渡って照射し、造血幹細胞が枯渇していくのかどうか、さらにその結果として造血不全が引き起こされるのかについて解析した。
- (3) 造血幹細胞数に及ぼす影響が低線量率での放射線照射と高線量率の放射線照射でどのように異なるかの比較検討を行った。
- (4) 100 mGy/日の低線量率で 1 ヶ月間または 2 ヶ月間に渡って放射線照射したマウスから造血幹細胞を単離し、低線量率での放射線被ばくを受けた造血幹細胞の造血機能について調べた。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致死的に放射線照射した同型マウスに移植し、長期骨髄再構築能を調べ、造血機能とともに自己複製能を評価した。蛍光色素 Kusabira Orange (KuO) を指標として 5 系統の血球細胞系譜を追跡できる KuO マウス (東大医科研中内教授より供与) を用いて行い、移植後の成熟血球の産生動態を詳細に追跡し、低線量率被ばくによる造血幹細胞の多分化能に及ぼす影響を調べた。
- (5) マウスに低線量率放射線照射 (100 mGy/日) を 1 ヶ月間だけ行った後に照射を中止し、1 年間に渡り造血幹細胞数の回復を追跡するとともに、造血幹細胞活性の推移を経時的に評価した。
- (6) 低線量率の放射線照射によって造血幹細胞が特異的に減少する分子基盤について解析を

進めた。ここでは、低線量率と高線量率の放射線照射を行ったマウスから造血幹細胞と造血前駆細胞を単離し、以下の項目について検討し、低線量率被ばくによる造血幹細胞障害の分子基盤の特性について考察した。

- A) ゲノム障害により細胞増殖の停止、あるいはアポトーシスが誘導されている可能性：アネキシンV 結合アッセイを行い検討した。さらに、単一細胞でアポトーシス関連遺伝子 ( bak, bax, bid, bim, noxa, puma ) 及び細胞生存シグナル関連遺伝子 ( bcl2, bcl-xl, mcl1, bcl2a1a ) の発現解析を行った。
- B) ゲノム障害の程度とそれに対するゲノム修復機転の誘導状況：抗体染色によるリン酸化ヒストン H2AX ( γ-H2AX ) の同定で調べるとともに、ゲノム損傷応答遺伝子 Trp53 の発現状態と p53 のリン酸化 ( Ser15 ) 状態とを抗体染色で調べた。さらに、二重鎖 DNA 切断に対する損傷応答として知られる、非相同末端結合修復や相同組換え修復のいずれが誘導されているかについてのそれぞれの指標である Rad51 や 53BP1 の核内での誘導状況を調べた。
- C) 造血幹細胞の分化が異常に誘導されている可能性：単一細胞遺伝子発現解析システム Biomark HD ( Fluidigm ) で細胞系譜の誘導を行う分化誘導遺伝子群 ( Gata1, Pu.1, CEBP、Pax5 等 ) や幹細胞性を支持する遺伝子群 ( Gata2, Myb, Myc, Geminin, p57 等 ) の発現解析を行った。
- D) 低線量率被ばくによって造血幹細胞の細胞周期が誘導され、それによって分化やアポトーシスが引き起こされいる可能性がある。そこで、腹腔内 BrdU 投与方法を用いて造血幹細胞の細胞周期を in vivo で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 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<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 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。

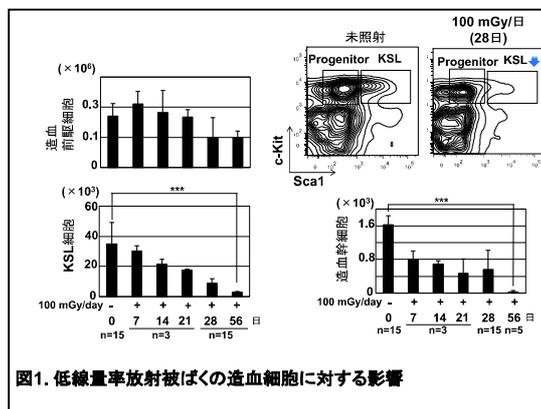


図1. 低線量率放射線被ばくの造血細胞に対する影響

(2) 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) 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)、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。

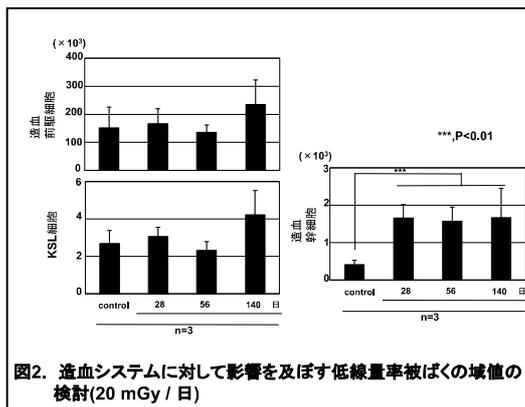


図2. 造血システムに対して影響を及ぼす低線量率被ばくの域値の検討(20 mGy / 日)

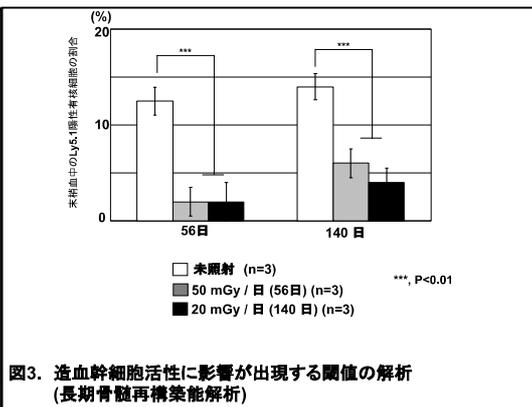


図3. 造血幹細胞活性に影響が出現する閾値の解析 (長期骨髄再構築能解析)

(3) 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。

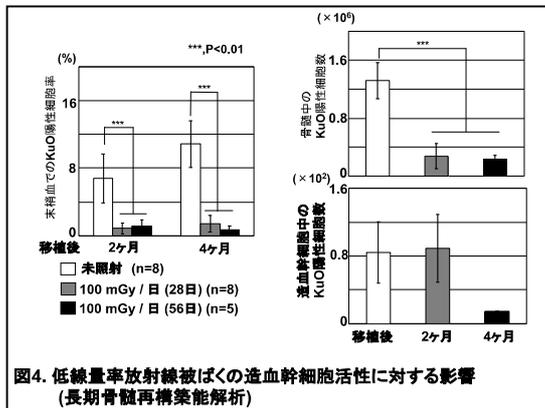


図4. 低線量率放射線被ばくの造血幹細胞活性に対する影響 (長期骨髄再構築能解析)

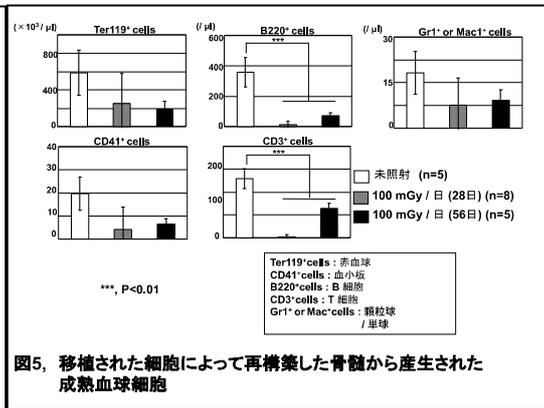


図5. 移植された細胞によって再構築した骨髄から産生された成熟血球細胞

(4) 低線量率放射線照射 (100 mGy/日) を1ヶ月間行った後に照射を中止し、1年間に渡り造血幹細胞などの造血細胞の回復について解析を行なった結果、高線量率では1ヶ月で造血幹細胞が回復傾向にあるのに対して、低線量率放射線被ばくでは3ヶ月に渡って回復してこないことが解った(図6)。また、低線量率放射線被ばくによって悪性血液疾患などの発症は認められなかった。

(5) 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7)。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(図8)。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とが解った(図9)。しかし、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、活性酸素種の発生について、今後詳細な解析を進めていく必要がある。低線量率被ばくによる造血幹細胞の細胞周期はやや誘導傾向にはあったものの、統計学的な有意差を得るまでには到っていない。更に厳密な解析をする必要があると考えられた。

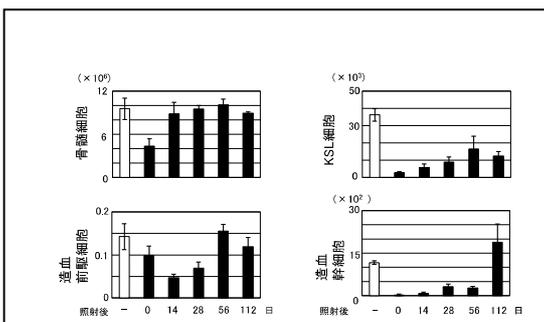


図6. 低線量率放射線被ばくのマウスにおける造血システムの回復

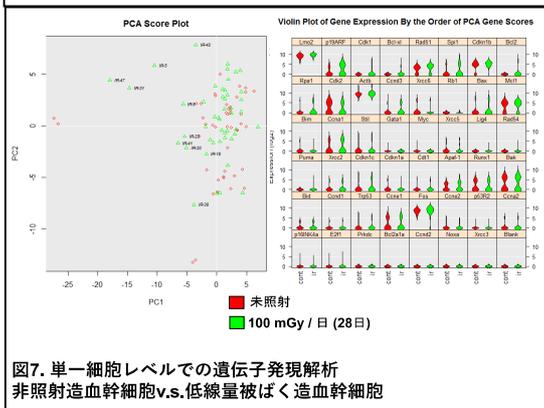


図7. 単一細胞レベルでの遺伝子発現解析 非照射造血幹細胞v.s.低線量被ばく造血幹細胞

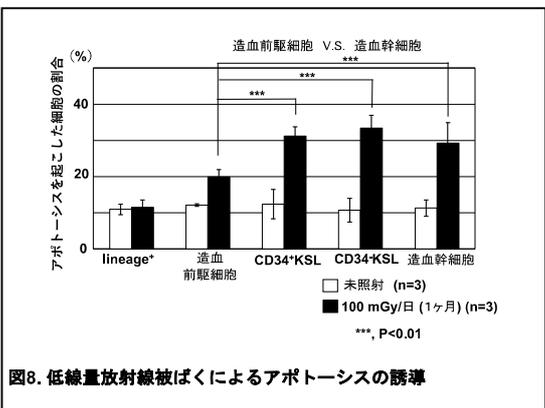


図8. 低線量放射線被ばくによるアポトーシスの誘導

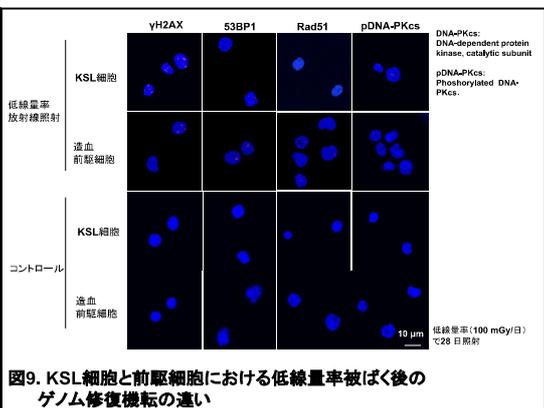


図9. KSL細胞と前駆細胞における低線量率被ばく後のゲノム修復機転の違い

・ まとめと展望

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造血細胞に対して特異的に影響を及ぼし減少させることが解った。さらに、移植実験によって、自己複製能も含めた造血幹細胞の活性が低下することも明らかになった。また、未分化造血細胞において分化やアポトーシス、ゲノム損傷修復が誘導されていた。これらの誘導が、未分化造血細胞の特異的な

減少や、造血幹細胞の活性低下の要因となっていることが示唆された。近年、造血幹細胞のゲノム損傷や分化誘導についてミトコンドリアの関与が指摘されており、低線量率放射線被ばくにおいてもミトコンドリアを介した影響やゲノム損傷を介さない細胞障害機構が関与している可能性についても解析を進める必要がある。

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、そのメカニズムを回避する方法を樹立することで、低線量率放射線被ばくに対する新たな防御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5件)

Sumide K, Matsuoka Y, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Asano H, Takahara Y, Sonoda Y. A revised map for the commitment of human CD34-negative hematopoietic stem cells. *Nat Commun* 2018 Jun 6;9(1):2202. 査読有り

Spaapen F, Eijssen L, Welting T, Prickaerts P, Salvaing J, Dahlmans V, Surtel D A M, Kruit F, Kuijter R, Takahara Y, Wouters B G, Vidal M, Voncken J.W. BMI1 controls transit amplification in chondrogenesis by preventing replication and transcription fork collision. *Epigenomes*, *in press*. 査読有り

Mihara K, Yoshida T, Takei Y, Sasaki N, Takahara Y, Kuroda J, Ichinohe T. T cells bearing anti-CD19 and/or anti-CD38 chimeric antigen receptors effectively abrogate primary double-hit lymphoma cells. *J Hematol Oncol*. 2017 Jun 8;10(1):116. 査読有り

大野 芳典、竹立 恭子、白須 直人、安永 晋一郎、瀧原 義宏 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) *放射線生物研究*, 2017, 52(4) 336-349. 査読有り

Yoshida T, Mihara K, Takei Y, Yanagihara K, Kubo T, Bhattacharyya J, Imai C, Mino T, Takahara Y, Ichinohe T. All-trans retinoic acid enhances cytotoxic effect of T cells with an anti-CD38 chimeric antigen receptor in acute myeloid leukemia. *Clin Transl Immunology*. 2016 Dec 9;5(12):e116. 査読有り

〔学会発表〕(計19件)

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、造血における低線量率放射線に対する分子応答、第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日~30日 横浜

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 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、第61回日本放射線影響学会大会 2018年11月7日~9日 長崎

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 Effect of low dose-rate irradiation on the hematopoietic stem cells. 第80回日本血液学会総会 2018年10月12-14日 大阪

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 低線量率放射線が造血幹細胞活性に与える影響 中国地区放射線影響研究会 2018年7月31日 広島

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 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 第22回 造血器腫瘍研究会 2018年1月26日 横浜

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 低線量率放射線が造血に与える影響 第40回日本分子生物学会年会 2017年12月6日~9日 神戸

竹立 恭子、大野 芳典、安永 晋一郎、大坪 素秋、瀧原 義宏 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 第40回日本分子生物学会年会 2017年12月6日~9日 神戸

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 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 第21回バイオ治療法研究会学術集会 2017年12月2日 福岡

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 造血幹細胞の細胞周期と分化を制御する中核因子 Geminin 第21回バイオ治療法研究会学術集会 2017年12月2日 福岡

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 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 第60回日本放射線影響学会学術集会 2017年10月25日~28日 千葉

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 Molecular responses for low dose-rate irradiation in the hematopoietic stem cells. 第79回 日本血液学会学術集会 2017年10月20日~22日 東京

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, 松浦 伸也, 瀧原 義宏 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 第 58 回原爆後障害研究会 2017 年 6 月 4 日 広島

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 Molecular response for low dose-rate irradiation in the hematopoietic system 第 15 回幹細胞シンポジウム 2017 年 5 月 26 日~27 日 東京

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 造血幹細胞の低線量率放射線被ばくに対する分子応答の解析 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日~2016 年 12 月 2 日 横浜

瀧原 義宏 造血システムに対する放射線被ばくの影響 日本放射線影響学会第 59 回大会 2016 年 10 月 26 日~10 月 28 日 広島

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 低線量率被ばくに対する造血幹細胞の分子応答の解析 日本放射線影響学会第 59 回大会 2016 年 10 月 26 日~10 月 28 日 広島

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 Low dose-rate irradiation specifically affects hematopoietic stem cells. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年 10 月 13 日~2016 年 10 月 15 日 横浜

Takahara Y, Ohno Y, Suzuki-Takedachi K, Santo M, Yasunaga S, Ohtsubo M, Naka K. Low dose-rate irradiation specifically affects hematopoietic stem cells. 45th Annual Scientific Meeting of the International Society of Experimental Hematology 2016 年 8 月 25 日~28 日 San Diego, USA

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 Effect of low dose-rate irradiation on the hematopoietic system. 第 14 回幹細胞シンポジウム 2016 年 5 月 26 日~27 日 淡路

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：安永 晋一郎

ローマ字氏名：Yasunaga Shin' ichiro

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：50336111

研究分担者氏名：大野 芳典

ローマ字氏名：Ohno Yoshinori

所属研究機関名：広島大学

部局名：原爆放射線医科学研究所

職名：助教

研究者番号(8桁)：10548986

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。