

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 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：2016～2017

課題番号：16H06611

研究課題名(和文)放射線ばく露ヒト造血幹細胞における放射線誘発白血病発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of radiation-induced leukemia on human hematopoietic stem cells

研究代表者

山口 平 (Yamaguchi, Masaru)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：00782822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では造血幹細胞としてヒト胎盤/臍帯血から高純度にCD34陽性細胞を分離精製し、ヒト造血幹細胞の放射線影響に関与する遺伝子及びその発現に至るシグナル伝達を明らかにすることを目的とした。造血サイトカイン非存在下では2 Gy X線照射後にRB/E2FやEst、p53などの発がんに関係した発現調節の他、C/EBPなどの発現に関連した発現調節経路が亢進していた一方で、放射線防護効果を発揮するサイトカインの組み合わせ(遺伝子組換えヒトTPO + IL3 + SCF)による培養では、CD44シグナル伝達の特異的な亢進が認められた。ヒト造血幹細胞の放射線応答に対するCD44シグナルの重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the nature of genes and related signaling pathways that contribute to the radiation-related leukemia on human hematopoietic stem cells (HSCs), we analyzed the gene expression profiles and its related signaling pathways detected in HSCs irradiated with 2 Gy X-rays before culture with or without an optimal combination of hematopoietic cytokines. In the absence of hematopoietic cytokines, expression control pathways related to carcinogenesis such as RB/E2F, Est and p53, and carcinogenesis such as C/EBP were enhanced after X-rays irradiation. On the other hand, culture with cytokine combination (recombinant human thrombopoietin plus interleukin-3 plus stem cell factor) that exerts radiation protection effect showed a specific enhancement of CD44 signaling pathways. It is suggested the importance of CD44 signaling pathway to the radiation response of human HSCs.

研究分野：放射線科学

キーワード：ヒト造血幹細胞 電離放射線 遺伝子発現解析 白血病

### 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の恒常性維持に必須の細胞であり、その高い増殖能と未分化性故に、造血幹細胞は典型的に放射線に対して高い感受性を示す細胞であるとされている。一方で生体内に極少数しか存在しない細胞である為、その損傷及び修復機構等感受性や放射線発がんに関する詳細、特に低線量ばく露や線量率効果については未解明なままである。放射線誘発急性骨髄性白血病 (rAML) は放射線発がん研究の草創期から行われている研究対象であり、その理由に原爆被ばく者と同じく短期間の潜伏期間の後に rAML を発症するモデルマウスがあることが挙げられる。これまでに得られた知見では、rAML を発症したマウスの約 90% で骨髄細胞の 2 番染色体上に欠失型異常と点突然変異が生じていること、骨髄細胞中に含まれる造血幹細胞、多能性前駆細胞、骨髄球系/赤血球系共通前駆細胞のうちいずれかが放射線ばく露後に白血病幹細胞になりうること、更にその細胞の周辺微小環境に放射線が影響を与えている可能性が示唆されているが、これらの異常がいつ、どのようなプロセスで生じているのかは未だ不明である。また、マウスの造血微小環境は骨髄及び脾臓に、ヒトの造血微小環境は骨髄に存在しており、それぞれの造血機構の違いからマウスで得られたデータをそのままヒトに適用することは多くの問題が残る。広島・長崎の被ばく者やチェルノブイリ事故での被災住民の白血病発症では放射線の寄与が高い事からも、ヒト造血幹細胞に対する放射線の影響研究は将来の発がんリスク評価にも直結する為極めて重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト胎盤/臍帯血から造血幹細胞として高純度の CD34 抗原陽性細胞を分離精製し、ヒト造血幹細胞の放射線影響に与する遺伝子及びそのシグナル伝達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細胞に X 線を照射し、その遺伝子発現及びそれに関連するシグナル伝達を網羅的に解析する。本研究の成果は、造血幹細胞への放射線被ばくがどの程度まで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確立への可能性が期待される。

### 3. 研究の方法

低線量から高線量放射線までばく露した造血幹細胞における遺伝子発現変化や細胞から放出される様々な液性因子や小胞粒子の解析により、ヒト白血病発症過程の解明を目的とし、本研究では、

#### 放射線ばく露ヒト造血幹細胞の遺伝子発現変化及びそれに関連するシグナル伝達の網羅的解析

を検討した。

ヒト胎盤/臍帯血から高純度の CD34 抗原陽性細胞を分離精製し、ヒト造血幹細胞として実験に用いた。無血清培地環境下で CD34 抗原陽性細胞に 2 Gy の X 線を照射し、各種造血サイトカインコンビネーション存在下又は非存在下で培養した。培養過程で一部の細胞を取り出し、曝露後早期 (~6 時間) の発現遺伝子を cDNA マイクロアレイによって解析し、得られたデータを最新論文から収集したコンテンツを基に、疾患メカニズム解析、創薬ターゲット探索や実験データ解析を可能にする生命情報統合プラットフォーム KeyMoInet を用いて発現遺伝子に関連するシグナル伝達の探索を行った。

### 4. 研究成果

#### 放射線ばく露ヒト造血幹細胞の遺伝子発現変化及びそれに関連するシグナル伝達の網羅的解析

分離精製した CD34 抗原陽性細胞に 2 Gy の X 線を照射し、曝露後早期 (~6 時間) の発現遺伝子を cDNA マイクロアレイによって解析し、得られたデータを最新論文から収集したコンテンツを基に、疾患メカニズム解析、創薬ターゲット探索や実験データ解析を可能にする生命情報統合プラットフォーム KeyMoInet を用いて発現遺伝子に関連するシグナル伝達の探索を行った。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造血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。放射線及び造血サイトカインによって変動した遺伝子に至るシグナル伝達を探索するため、

IR (+) Cyt (-) vs IR (-) Cyt (-)

IR (+) Cyt (+) vs IR (-) Cyt (+)

IR (+) Cyt (-) vs 0h (細胞分離直後)

上記 3 つの条件の間で発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナルを探索した。KeyMoInet 解析により、得られたネットワークに関連の深いパスウェイ、疾患、現象を関与度順にランキング表示し、score は統計学的手法 (超幾何分布) に基づいて、20 以上のものは統計的に有意と判断した。

表 1 から表 3 では、病態イベント: 造血+癌幹細胞を始点として、分子を 1 つ挟んで、IR (+) Cyt (-) vs IR (-) Cyt (-) で発現に差があった分子 (X 線の影響 (サイトカインなし)) を終点として制御関係を検索したところ、RB/E2F、Est-1/2、p53 など、癌に関与した発現調節の他、C/EBP など発生に関与した発現調節、NANOG/Oct-4/SOX2 による発現調節の関与が認められた。

表 1. IR (+) Cyt (-) vs IR (-) Cyt (-) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深いパスウェイ)

rank	name	score
1	RB/E2F による発現調節	69.1
2	C/EBP による発現調節	62.7
3	NANOG/Oct-4/SOX2 による発現調節	56.0
4	Est-1/2 による発現調節	36.8
5	p53 による発現調節	36.3

表 2. IR (+) Cyt (-) vs IR (-) Cyt (-) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深い疾患)

rank	name	score
1	慢性骨髄性白血病	74.9
2	急性リンパ性白血病	67.7
3	マンツル細胞リンパ腫	58.6
4	神経膠腫	56.6
5	多発性骨髄腫	53.9

表 3. IR (+) Cyt (-) vs IR (-) Cyt (-) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深い生体内現象)

rank	name	score
1	造血	143.1
2	癌	121.4
3	癌幹細胞	119.2
4	創傷修復	94.8
5	脂肪細胞生成	75.2

表 4 から表 6 では、病態イベント：造血+癌幹細胞を始点として、分子を 1 つ挟んで、IR (+) Cyt (+) vs IR (-) Cyt (+) で発現に差があった分子 (X 線の影響 (サイトカインあり)) を終点として制御関係を検索したところ、サイトカインなしの場合とほぼ同じ発現調節パスウェイの関与が認められたが、サイトカインありの場合には、CD44 シグナル伝達の関与が認められた。

表 4. IR (+) Cyt (+) vs IR (-) Cyt (+) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深いパスウェイ)

rank	name	score
1	RB/E2F による発現調節	69.7
2	Est-1/2 による発現調節	64.4
3	CD44 による発現調節	51.6
4	C/EBP による発現調節	38.6
5	NANOG/Oct-4/SOX2 による発現調節	37.6

表 5. IR (+) Cyt (+) vs IR (-) Cyt (+) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深い疾患)

rank	name	score
1	慢性骨髄性白血病	97.9
2	非小細胞癌	70.4
3	急性リンパ性白血病	67.4
4	神経膠腫	64.8
5	膀胱癌	63.4

表 6. IR (+) Cyt (+) vs IR (-) Cyt (+) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深い生体内現象)

rank	name	score
1	造血	163.8
2	癌幹細胞	143.4
3	癌	110.3
4	創傷修復	99.1
5	転移	98.4

表 7 から表 9 では、病態イベント：造血+癌幹細胞を始点として、分子を 1 つ挟んで、IR (+) Cyt (-) vs 0h (細胞分離直後) で発現に差があった分子 (X 線の影響 (サイトカインなし)) とインタクトな造血幹細胞を比較) を終点として制御関係を検索したところ、造血幹細胞の形成に関与している RUNX による発現調節、細胞分化や細胞寿命を調節している CDK inhibitor シグナル伝達、FOXO による発現調節などの関与が認められた。

表 7. IR (+) Cyt (-) vs 0h (細胞分離直後) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深いパスウェイ)

rank	name	score
1	RB/E2F による発現調節	80.3
2	RUNX による発現調節	46.4
3	C/EBP による発現調節	37.6
4	CDK inhibitor シグナル伝達	36.8
5	FOXO による発現調節	36.4

表 8. IR (+) Cyt (-) vs 0h (細胞分離直後) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深い疾患)

rank	name	score
1	慢性骨髄性白血病	95.1
2	成人 T 細胞リンパ腫/白血病	72.7
3	マンツル細胞リンパ腫	71.2
4	急性リンパ性白血病	63.6
5	大腸癌	55.2

表 9. IR (+) Cyt (-) vs 0h (細胞分離直後) の発現量比の平均値が変動した遺伝子に至るシグナル (関与の深い生体内現象)

rank	name	score
1	造血	178.6
2	癌幹細胞	138.5
3	癌	120.9
4	脂肪細胞生成	101.1
5	癌の転座	83.5

## 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 5 件)

1. Hitoshi Saito, Teruhiro Ito, Takakiyo Tsujiguchi, Masaru Yamaguchi, Ikuo

Kashiwakura, Characteristic of temporal resolution in 16- and 64-row computed tomography scanners Radiological Physics and Technology, *Radiological Physics and Technology*, 査読有, Vol.11, No.1, 2018, pp.100-108.  
DOI: org/10.1007/s12194-017-0436-z

2. Masaru Yamaguchi, Kazuki Nomura, Yasuyo Fukushi, Kasumi Mikami, Yoko Saito, Toshiya Nakamura, Report on the Third Exercise and Education of Radiation Emergency Medicine in Jeju, *Radiation Environment and Medicine*, 査読有, Vol.6, No.1, 2017, pp.39-45.  
[http://crss.hirosaki-u.ac.jp/wp-content/files\\_mf/14944007567\\_REMVol.61\\_MasaruYamaguchi.pdf#search=%27Report+on+the+Third+Exercise+and+Education+of+Radiation+Emergency+Medicine+in+Jeju%27](http://crss.hirosaki-u.ac.jp/wp-content/files_mf/14944007567_REMVol.61_MasaruYamaguchi.pdf#search=%27Report+on+the+Third+Exercise+and+Education+of+Radiation+Emergency+Medicine+in+Jeju%27)

3. Yusuke Matsuya, Takaaki Kimura, Ryota Yamada, Ryosuke Mori, Takakiyo Tsujiguchi, Masaru Yamaguchi, Ryo Saga, Yohei Fujishima and Hiroyuki Date, Educational Activity for the Radiation Emergency System in the Northern Part of Japan: Meeting Report on "The 3rd Educational Symposium on Radiation and Health (ESRAH) by Young Scientists in 2016", *Radiation Research*, 査読有, Vol.187, No.6, 2017, pp.641-646. DOI: 10.1667/RR14756.1.

4. Masaru Yamaguchi, Tokuhisa Hirouchi, Syuta Miura, Kengo Waga, Haruhiko Yoshioka, Jun Watanabe, and Ikuo Kashiwakura, Thrombopoietin-Receptor Agonist Romiplostim Attenuates Hematopoietic System Injury By Promoting the Recovery of Early Hematopoiesis and the Hematopoietic Environment in the Bone Marrow and Spleen of Mice Exposed to Lethal Total Body -Irradiation, *Blood*, 査読有, Vol.130, No.1, 2017, pp.1153.  
[http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl\\_1/1153](http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/1153)

5. Yukiko Okamura, Nobuko Yoshizawa, Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura, Application of Dual-Energy Computed Tomography for Breast Cancer Diagnosis, *International Journal of Medical Physics, Clinical Engineering and Radiation Oncology*, 査読有, Vol.5, 2016, pp.288-297.  
DOI: 10.4236/ijmpcero.2016.54029.

[学会発表](計 7 件)

1. Masaru Yamaguchi, Tokuhisa Hirouchi, Syuta Miura, Kengo Waga, Haruhiko Yoshioka,

Jun Watanabe, and Ikuo Kashiwakura. Thrombopoietin-Receptor Agonist Romiplostim Attenuates Hematopoietic System Injury By Promoting the Recovery of Early Hematopoiesis and the Hematopoietic Environment in the Bone Marrow and Spleen of Mice Exposed to Lethal Total Body -Irradiation. *59th American Society of Hematology Annual Meeting (8-12, December, 2017, Atlanta)*

2. Masaru Yamaguchi, Takakiyo Tsujiguchi, Ikuo Kashiwakura. The individual radio-sensitivity of human placental/umbilical cord blood hematopoietic stem cells focusing on the expression of Nrf2 target genes. *International workshop on natural radiation exposure to the public and its health effects (26-28, November, 2017, Yaoundé)*

3. Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura. Systemic circulated RNAs as potential biomarkers for the identification of individuals exposed to ionizing radiation. *2017 KIRAMS-Hirosaki university Joint Symposium (6, November, 2017, Soul)*

4. 山口平、廣内篤久、三浦柗太、柏倉幾郎. 致死線量放射線ばく露マウスに対するトロンボエチン受容体作動薬の放射線緩和効果. 日本放射線影響学会第60回大会(2017年10月25日~28日, 千葉市)

5. Masaru Yamaguchi, Tokuhisa Hirouchi, Syuta Miura, Haruhiko Yoshioka, Jun Watanabe, Ikuo Kashiwakura. Thrombopoietin-receptor agonist romiplostim attenuates hematopoietic system injury by promoting the recovery of early hematopoiesis and the hematopoietic environment in the bone marrow and spleen of mice exposed to lethal total body -irradiation. *4th Educational Symposium on Radiation and Health by young scientists (23-24, September, 2017, Hirosaki)*

6. 山口平、廣内篤久、横山昂生、千葉満、小村潤一郎、柏倉幾郎. 致死線量放射線ばく露マウスに対するトロンボエチン受容体作動薬の放射線緩和効果. 日本放射線影響学会第59回大会(2016年10月26日~28日, 広島市)

7. Masaru Yamaguchi, Koki yokoyama, Yuki Ito, Syuta Miura, Mitsuru Chiba, Ikuo Kashiwakura. The mitigative effects of Romiplostim, a recombinant c-mpl agonist,

on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation. *The 3rd Educational Symposium on Radiation and Health by young scientists (1-2, October, 2016, Sapporo)*

〔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/search?  
m=home&l=ja](http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/search?m=home&l=ja)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 平 (YAMAGUCHI, Masaru)

弘前大学大学院保健学研究科・助教

研究者番号: 00782822

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA, Ikuo)

蝦名 智子 (EBINA, Satoko)

廣内 篤久 (HIROUCHI, Tokuhisa)