

令和元年6月13日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00556

研究課題名(和文)胎生期に被ばくしたマウス造血幹細胞の放射線感受性に関する研究

研究課題名(英文)A study for radiation-sensitivity in hematopoietic stem cells (HSCs) following fetal irradiation of mice

研究代表者

濱崎 幹也 (HAMASAKI, Kanya)

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物学部・研究員

研究者番号：80443597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかの報告で、マウス胎仔へのX線照射後に生まれた仔マウスが成体となった時点で、造血細胞に生じている転座型染色体異常の頻度を調べてきた。その結果成体時では被ばくの影響が残っていないことを報告してきた。本研究ではマウス胎仔造血細胞に生じた被ばくの影響がいつ消失するのかを調べる計画を立てた。その結果、造血幹(前駆)細胞集団では、胎内被ばく後2日(出生前)の時点では胎仔も母親と同様に被ばくによる転座を保持していることがわかったが、その転座は生後約2週までに観察されなくなるという結果を得た。また造血幹細胞レベルで詳細に調べるため、単一造血幹細胞由来コロニーの染色体核型を分析する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1950年代に英国で行われた大規模な胎内被ばく後の小児がん疫学調査(オックスフォード小児がん疫学調査)では低線量(約10ミリグレイ)の胎内被ばくでも生後の小児がんのリスクは増大することを示したが、原爆胎内被ばく者の疫学調査や動物胎仔を用いた発がん実験では必ずしもその結果が一致しないことから、胎児の放射線発がんへの感受性についてはまだ議論が続いている。本研究で示したような胎仔造血幹細胞の放射線感受性に関する結果等、胎児の基礎的な放射線生物応答に関する知見を多く蓄積することが胎内被ばく後の発がんリスクに関する議論の進展に重要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Using translocation assay as a indicator of radiation induced effects, we have previously shown that hematopoietic cells of mice irradiated as fetuses did not record radiation effects when examined after the animals reached adults. In this study, we planned to examine when the aberrant fetal hematopoietic cells induced by irradiation are eliminated. As a result, translocations induced in fetal hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) can persist for at least two days (before birth) following irradiation. However, we found that such translocations were not observed in mice at two weeks old. Furthermore, to study the radiation effects induced in hematopoietic stem cells (HSCs) but not HSPCs we established the method to examine chromosome karyotype of the proliferated colonies derived from single HSC.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：胎内被ばく 造血幹細胞 転座型染色体異常

1. 研究開始当初の背景

1950年代に英国で行われた大規模な小児がん疫学調査(症例対照調査:オックスフォード小児がん調査)は母親の妊娠時に腹部に受けた診断用X線被ばくと、生まれてきた子どもの小児がん発症のリスクとの間に関係があるというもので、この調査以降胎内被ばく集団の発がんに対する放射線高感受性が認識されるようになってきた。しかし、その後の放射線影響研究所の原爆胎内被爆者の疫学調査や動物胎仔を用いた研究では胎内被ばく後のがんリスクについて放射線被ばくとの関連を示す明確な情報は得られていない。それ故に胎内被ばくと生後の発がんリスクの因果関係の議論はまだ続いている。

我々の研究室ではこれまでに染色体異常頻度を指標にした胎内被ばくの放射線効果を調査してきた。原爆胎内被爆者の末梢血リンパ球をGバンド法により分析した調査では、転座型染色体異常頻度が被ばく線量の増加と共に増加する母親に対し、胎内被爆者では線量効果を示さない、すなわち持続性の転座型染色体異常がほとんど観察されないことを示した(検査時年齢40歳)。この事実はマウス造血細胞を用いた胎内被ばく調査でも確認された。一方、造血組織以外の組織(乳腺、甲状腺)では造血組織の結果と異なり、母親と同程度の持続性の転座型染色体異常が観察されたことから、胎内被ばくに起因する持続性の転座型染色体異常の出現は組織により異なることが明らかになった。さらにマウス甲状腺においては照射時期(器官形成期前後(胎生6.5日か15.5日))の違いによっても成体時での持続性の転座型染色体異常の頻度に大きな変化があることがわかった。これらの結果から、組織幹細胞が機能するための微小環境が整う(ニッチの確立)前か後かで放射線によって生じた染色体異常の残存の程度が大きく異なる可能性が示唆された。その理由としてマウス甲状腺では器官形成期前後(胎生6.5日か15.5日)の被ばくで転座頻度が大きく異なったのに対し、生後の骨髄で幹細胞ニッチが成立するとされる造血細胞ではいずれの照射時期(胎生6.5日か15.5日)でも染色体異常は観察されなかったからである。そこで我々は組織幹細胞ニッチ確立前の被ばくにより幹細胞に生じた異常は何らかの理由で淘汰されるため、結果として持続性の転座型染色体異常は観察されないが、ニッチ確立後の被ばくの場合は異常細胞が淘汰されることなく、永続的に残るという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究課題において上記の仮説を造血組織で検証することを考えた。前述した骨髄ニッチの確立が生後と考えられている造血組織において、仮説の検証の第一段階として、胎生期被ばくによって生じた異常が少なくとも生後早期までは保持されていることを確認しなければならない。その確認後、第二段階として骨髄ニッチ確立前後の時期の検証に移る。そのためにまずX線被ばくによってマウス胎仔造血幹細胞に生じた染色体異常が生後まで保持されているのかを調査することを最初の目標とした。そこでマウス造血幹細胞や造血前駆細胞集団において、胎内被ばく後すぐ(出生前)あるいは出生後において転座型染色体異常が残存しているかどうかを(2色あるいはマルチカラー)FISH法を用いて調査した。

3. 研究の方法

X線照射

B6C3F1 系統マウス雌雄を交配後、妊娠した雌マウスを妊娠 13 - 15 日目に種々の線量の X 線を全身照射した。X 線照射は、放射線影響研究所に設置されている Faxitron CP-160 machine (Faxitron)を用い、線量率 0.77 Gy/min で使用した。

造血幹(前駆)細胞の分取、培養、染色体分析

妊娠 13 - 15 日目で X 線(2 Gy あるいは 4 Gy)を全身照射した B6C3F1 雌マウスの照射 2 日後(出生前)や、また胎内被ばく後に生まれた仔マウス(生後数週)を安楽死させ、母親は骨髄から、胎子は肝臓から、新生仔マウス(生後 1 週以前)は脾臓から、生後 2 週以降のマウスは骨髄から、造血細胞の分化抗原(Ly-6G(Gr-1), CD11b, CD3e, CD45R(B220), TER119)陰性細胞集団を抗体と結合させた磁性ビーズによって分離後、造血幹(前駆)細胞由来である BFU-E、CFU-GM、CFU-GEMM といった骨髄系細胞の造血コロニーの生育に適した MethoCult GF M3434 培地(Stemcell technologies)で約 1 週間培養した。培養後、できるだけ多くの分裂期細胞を得るために紡錘糸形成阻害剤であるコルセミド処理を行った。その後集めた細胞を低張処理、カルノア固定後に染色体標本作製した。転座型染色体異常を正確に感度良く判別するために 2 色 FISH 法(マウス 1 番染色体を FITC、3 番染色体を Rhodamine で蛍光標識した DNA プローブ(Applied Spectral Imaging) 対比染色 DAPI)を用いた。1 サンプルにつき約 800 個の分裂期細胞について 1 番、3 番染色体に関わる転座型染色体異常を集計し、その頻度を求めた。

造血幹細胞の分取、培養、染色体分析

上記の造血幹(前駆)細胞よりもさらに厳密に定義された造血幹細胞集団についても検証するため、非常に数が少ない造血幹細胞を分取し、染色体核型を分析する方法を検討した。妊娠 13 - 15 日目で X 線を全身照射した B6C3F1 雌マウスから照射 1 日後、母親は骨髄から、胎子は肝臓から造血幹細胞を分取した。母親マウスの場合、分化抗原陰性細胞集団であり、かつ CD34 陰性/低発現、Sca1 陽性、c-kit 陽性、CD150 陽性、CD48 陰性分画細胞集団を、胎子については分化抗原(CD11b を除いた)陰性細胞集団であり Sca1 陽性、c-kit 陽性、CD150 陽性、CD48 陰性分画の集団をそれぞれ蛍光標識細胞表面抗原マーカーで染色後、セルソーターを用い、96 ウェルプレートに 1 細胞/1 ウェルで造血幹細胞として分取した。培地は造血幹(前駆)細胞の時と同様、MethoCult GF M3434 培地を用いた。培養後、単一造血幹細胞由来の増殖コロニーが確認されたウェルについて、集めた細胞の染色体標本作製後、マウスの各染色体を染め分けることが可能な DNA プローブ(21XMouse、MetaSystems)を用いたマルチカラー FISH 法(mFISH 法)を行った。Zeiss 製の蛍光顕微鏡、Ishis ソフトウェア(MetaSystems)にて染色体画像の取り込みならびに核型分析を行い、核型が正常であるかあるいは転座型染色体異常を有しているかを決定し、集計した。

4. 研究成果

まず造血幹（前駆）細胞集団において、胎内被ばく2日後（出生前）に胎仔造血幹（前駆）細胞に生じる染色体転座頻度（1番、3番染色体に関わる）を母親と胎仔とで比較した。X線照射2Gyでは、胎仔に生じる転座頻度は母親と比べ低い傾向ではあったが、母親、胎仔共に線量の増加に伴い転座頻度も上昇し、線量効果を確認することが出来た（図1）。このことから転座型染色体異常は被ばくによって母親と同様にいったん生じていることが考えられ、少なくとも2日（出生前）は異常が保持されていることを示唆している。引き続き行った2Gyの胎内被ばく後に生まれた種々の週齢の仔マウスについて同様の調査を行ったところ、出生前（胎内被ばく2日後）でいったん確認されていた転座頻度は生後2 - 3週の時点でほとんど観察されなくなったことがわかった（図2）。造血細胞の場合、骨髓内の造血幹細胞ニッチが確立するのは一般的な胎仔器官形成期ではなく、生後だと言われているので、出生まで保持されていた異常が生後に消失していくことと骨髓ニッチの成立に何らかの関連がある可能性が示唆された。

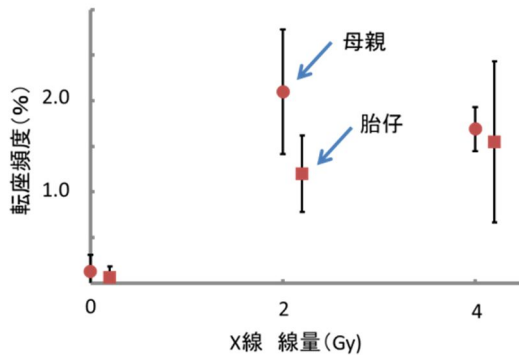


図1 造血幹(前駆)細胞集団における転座型染色体異常頻度とX線照射線量の関係

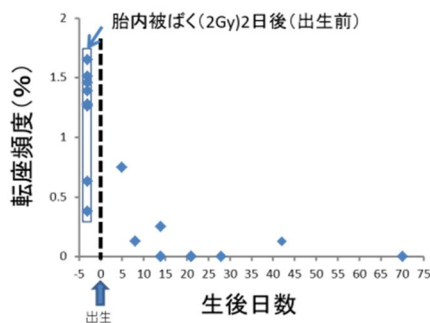


図2 胎内被ばく(2Gy)後に生まれた仔マウス(種々の週齢)に生じている転座型染色体異常

ただし、上記の結果は造血幹（前駆）細胞集団であって厳密な意味での造血幹細胞集団とは言えない。そこでより厳密な造血幹細胞集団による検討に移行した。前述のように、造血幹細胞は非常に数が少ないため分取および培養、染色体分析は容易ではない。そこで2Gyの胎内被ばく1日後（出生前）の時点において、セルソーターを用いて96ウェルプレートに1細胞/1ウェル

で胎子や母親の造血幹細胞を直接分取することを試みた。培地は MethoCult GF M3434 培地を用い、約 10 日間培養した。培養後に各ウェルで増えてくるコロニーの起源は 1 個の造血幹細胞であるためコロニーを構成する細胞集団の染色体核型は同一であると考えられる。それ故に各コロニーにつき数個の分裂期細胞を mFISH 法で核型分析することで、染色体核型を決定すること(転座型染色体異常の有無を調べること)が可能となった。本研究では実際この方法を用いて胎子、母親について転座型染色体異常の有無を調査している。現時点で、胎子で 23 コロニー中 6 個、母親の方で 20 コロニー中 9 個の転座型染色体異常を持つコロニーを観察することが出来た。今後、造血幹細胞分取時のソ - ティングの精度等の検証を行う必要があるが、今回の予備的なデータでは、胎子造血幹細胞においても被ばく後、最初から染色体異常が生じないというわけではなく、少なくとも胎内被ばく後 1 日の時点では母親と同様に染色体転座は生じているという可能性を示唆する結果となった。今後、分析数を増やしてさらなる仮説の検証を行っていききたい。また胎子造血幹細胞に生じた転座型染色体異常の消失のメカニズムについても考えていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Hamasaki K, Nakamura N, Effect of radiation exposures on fetal hematopoietic cells, Curr Stem Cell Rep, 査読有、2019、5(2)、92-9. DOI:org/10.1007/s40778-019-00159-w
濱崎幹也、染色体異常頻度から胎内被ばく影響を考える、広島医学、査読無、2018、71(4)、257-60.

Hamasaki K, Landes RD, Noda A, Nakamura N, Kodama Y, Irradiation at different fetal stages results in different translocation frequencies in adult mouse thyroid cells, Radiat Res, 査読有、2016、186(4)、360-6. DOI:10.1667/RR14385.1

[学会発表] (計 6 件)

濱崎幹也、野田朝男、児玉喜明、中村 典、マウス胎子照射後造血細胞に生じる転座型染色体異常の経時変化、第 60 回 日本放射線影響学会、千葉、2017 年 10 月 25 日-28 日

Hamasaki K, Noda A, Kodama Y, Nakamura N, Induction of translocations following fetal irradiation: The frequency declines in hematopoietic stem/progenitor cells after birth, while it persists in T-lymphocyte, 63rd Annual Meeting of the Radiation Research Society, Cancun, Mexico, 2017/10/15-18

濱崎幹也、野田朝男、児玉喜明、中村 典、胎子期に被ばくしたマウスの出生前や出生後に造血細胞に生じる転座型染色体異常、第 42 回 中国地区放射線影響研究会、広島、2017 年 7 月 27 日

濱崎幹也、染色体異常頻度から胎内被ばく影響を考える、第 58 回 原子爆弾後障害研究会、広島、2017 年 6 月 4 日

濱崎幹也、野田朝男、児玉喜明、中村 典、放射線被ばくによりマウス胎仔造血幹（前駆）細胞に生じる転座は成体時では消失しているが被ばく直後ではまだ残っている、第 59 回 日本放射線影響学会、広島、2016 年 10 月 26 日-28 日

Hamasaki K, Noda A, Kodama Y, Nakamura N、Fetal hematopoietic stem or progenitor cells can record radiation effects but fail to contribute to tissue formation in the mouse、62nd Annual Meeting of the Radiation Research Society、Waikoloa, Hawaii, USA、2016/10/16-19

6. 研究組織