

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791382

研究課題名（和文）ヒト造血幹細胞の放射線障害におけるサイトカインによる修復機構の解明

研究課題名（英文）The functional analysis of cell repair system by cytokines on human CD34⁺ hematopoietic stem cells irradiated to ionizing radiation.

研究代表者

門前 暁（MONZEN SATORU）

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：20514136

研究成果の概要（和文）：

未分化である造血幹細胞の骨髄系分化増殖には、サイトカインの役割が大きく関与しており、これら細胞の成熟過程において、放射線は線質及び線量依存的な細胞増殖抑制及び遺伝子発現レベルで分化系特異的な変動を示したが、表面抗原タンパク発現レベルでは影響がほとんどみられなかった。また、骨髄系分化に関わるサイトカイン刺激によって直接または間接的に DNA 損傷を修復すること、また生残細胞は放射線線質特異的に成熟が誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Exposure of hematopoietic stem/progenitor cells to ionizing radiation causes a marked suppression of mature functional blood cell production in a linear energy transfer - and/or dose-dependent manner. With the aim of characterizing the effects of different types of linear energy transfer radiations on human myeloid hematopoiesis under the cytokine stimuli, hematopoiesis of human CD34⁺ cells exposed to carbon-ion beams or X-rays was compared in vitro. The culture medium included appropriate cytokine combinations (TPO, IL-3, SCF, EPO, G-CSF and GM-CSF). The surviving fractions of total myeloid progenitors exposed to carbon-ion beams were significantly lower than those of cells exposed to X-rays, indicating that these cells are more sensitive to carbon-ion beams than the case of X-rays. Similar sensitivities were observed in granulocyte-macrophage and erythroid progenitors, respectively. In liquid culture for 14 days, no significant difference in total numbers of mononuclear cells was observed between non-irradiated control culture and cells exposed to 0.5 Gy X-rays, whereas 0.5 Gy carbon-ion beams suppressed cell proliferation to 4.9% of the control, a level similar to that for cells exposed to 1.5 Gy X-rays. Cell surface antigens associated with terminal maturation, such as CD13, CD14, and CD15, on harvest from the culture of X-ray-exposed cells were almost the same as those from the non-irradiated control culture. X-rays increased the CD235a⁺ erythroid-related fraction, whereas carbon-ion beams increased the CD34⁺CD38⁻ primitive cell fraction and the CD13⁺CD14^{+/-}CD15⁻ fraction. In the CD41⁺CD45⁺ megakaryocytes fraction, although there was no significant difference in this fraction in comparison to the non-irradiated control, the early hematopoiesis-related genes FLI1, HOXB4, and Tie-2, the cytokine receptor genes KIT and IL-3RA, and the oxidative stress-related genes HO1 and NQO1 were up-regulated on day 7. These responses by radiation exposure may be involved in cell repair system directly or indirectly by cytokine stimuli.

These results suggest that carbon-ion beams inflict severe damage on the clonal growth of myeloid hematopoietic progenitors, although the expression of cell surface antigens by mature myeloid cells derived from HSPCs exposed to each type of radiation was similar to that by controls.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：放射線生物学

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：造血幹細胞、放射線障害、サイトカイン、細胞修復

1. 研究開始当初の背景

放射線は、医療分野における画像診断、がん治療、また工業分野における非破壊検査など多方面から有効な手段として利用されている。近年、地球温暖化対策の一つとしてCO₂ガス排出がほとんどない原子力エネルギーが次世代エネルギーとして注目され開発が世界的に進み、放射線がより身近になることは間違いない。しかしながら、万一の放射線事故や核テロリズムといった危機に直面した場合、高エネルギー放射線は生体組織に大きなダメージを与え生命の危険を与える可能性があることから、これら緊急対応の準備は必須である。放射線による生物学的障害の頻度及び重篤度は、放射線のエネルギーに依存することが知られているが、生体組織に対する放射線影響の詳細の全ては未だ解明されていない状況である。

未分化である造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を有することで幹細胞を枯渇せず次々と成熟血球を作り出す必須な細胞である。それらはサイトカインというタンパク性の生理活性因子によって造血のバランスが制御されている。また造血幹細胞は、骨髄内でニッチという環境で細胞が維持されるが、この部位でも骨髄ニッチから供給されるサイトカインによって制御される (Winkler et al, *Blood*, 2010.)。これら環境下での造血幹細胞は放射線高感受性であることが知られているが、外的酸化ストレスである放射線に曝された場合、造血幹細胞内ではどのような損傷が発生し、修復していくは不明な点が多い。本研究代表者が参加する研究グループでは、X線や重粒子線という線質の異なった放射線を用いて、ヒト造血幹細胞から骨髄系造血の分化・増殖に与える影響評価を進めてきた。これまでに、血小板の源である巨核球前駆細胞が放射線高感受性であることを明らかにした (*Radiat Res.*, 2007 and 2009.)。その際、造血前駆細胞の生存率低下の回復には複数のサイトカインを組み合わせることが有効であった。

2. 研究の目的

本研究は、造血前駆細胞よりも更に未熟な段階で放射線に曝された造血幹細胞がどのような損傷を示し修復していくのか、またどのように細胞は死んでいくのか、またサイトカインが修復機構または細胞死抑制へどのように作用するかを分子生物学的レベルで解析することで緊急放射線被ばく医療における救命に重要な治療標的因子を解明す

ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行するために使用するヒト造血幹細胞は、協力病院において医師から提供者及びその家族に対し、臍帯血採取に関するインフォームドコンセントを行い、分娩後安全に採取可能な場合に限った臍帯血から分離・精製した。これら実験の全ては弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の管理下において実施した。本研究は以下の4点が重要な課題となる。

- 造血幹細胞の各分化系における放射線感受性の解明
- 放射線曝露造血幹細胞における損傷修復機構にサイトカインが及ぼす作用の解明
- 放射線によって造血幹細胞レドックス制御はどのような変化があるのか
- デスシグナルはどのように働いているのか

これらの課題を解決するために、骨髄系造血である巨核球系、白血球系、赤血球系について注目した放射線による分化・増殖への影響、発現タンパクへの影響、発現遺伝子への影響、及び細胞死シグナルの応答について解析をおこなった。

4. 研究成果

●巨核球造血に対する放射線の影響

平成23年度は、ヒト造血幹細胞の骨髄造血、特に巨核球・血小板造血の分化増殖に対する電離放射線の影響について解析を行った (雑誌論文2)。X線2Gyを曝露した造血幹細胞をinterleukin-3及びthrombopoietin存在下で無血清培地下で培養すると、血小板産生期である14日目において、造血幹細胞数は非曝露に比べ2.4%と有意に減少した(Fig. 1)。

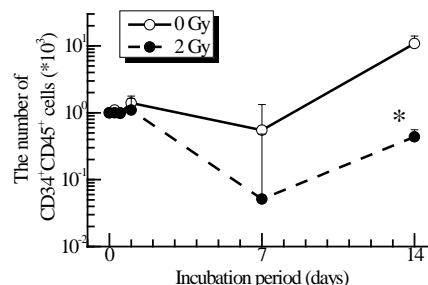


Fig. 1. 巨核球血小板造血時における X 線照射後の造血幹細胞数の応答。* $P < 0.05$ in comparison to 0 Gy - day 14 by the Tukey-Kramer test.

また巨核球数は、巨核球産生期である培養 7 日目から 14 日にかけて、非曝露に比べ有意に減少していたものの (Fig. 2)、巨核球特異的細胞表面抗原である CD41⁺細胞率に、X 線の影響はみられなかった。

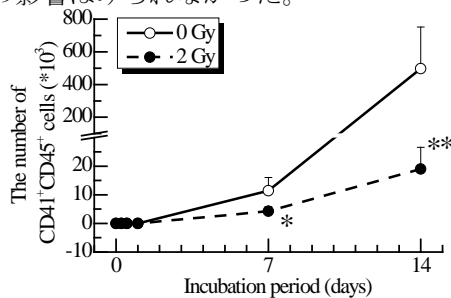


Fig. 2. X 線照射巨核球造血誘導後における巨核球数の変化。* $P < 0.05$ in comparison to 0 Gy - day 7 and ** $P < 0.05$ in comparison to 0 Gy - day 14 by the Tukey-Kramer test.

一方、接着因子である Tie-2 は、放射線曝露条件下で培養 7 日目の CD41⁺細胞において有意に発現上昇した。産生血小板において、凝集因子刺激は放射線曝露に関わらず応答したものの、X 線曝露はより高い凝集活性を誘導した。これら細胞増殖及び抗原発現の変化は、遺伝子レベルの変化が影響している可能性があるとして推測し、早期造血関連、サイトカインレセプタ関連、巨核球造血関連及び酸化ストレス関連の mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。その結果、FLI1, HOXB4, Tie-2, KIT, IL3RA, HO1, NQO1 遺伝子において X 線曝露は有意な発現上昇を誘導した。一方、MPL, CSF2RA 及び GP1BA において放射線曝露は発現を有意に抑制した。

以上のことから、造血幹細胞への X 線曝露は、これら造血の分化から成熟までの一連の流れにおいて様々な機能へ影響を与える事が明らかとなった (Fig. 3)。

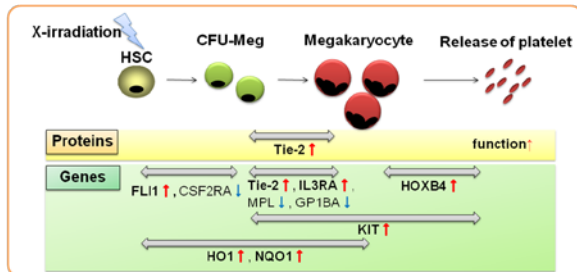


Fig. 3. X 線照射造血幹細胞から巨核球・血小板造血に対するタンパク・遺伝子発現の変動のまとめ

● 白血球系造血及び赤血球系造血に対する

放射線の影響

白血球系及び赤血球系の各分化系に対する X 線及び重粒子線の影響について解析を行った (雑誌論文 11)。白血球前駆細胞 (CFU-Meg)、赤血球系前駆細胞 (BFU-E) 及び総前駆細胞 (Total CFC) いずれも、X 線より重粒子線に感受性であることが分かった (Fig. 4)。

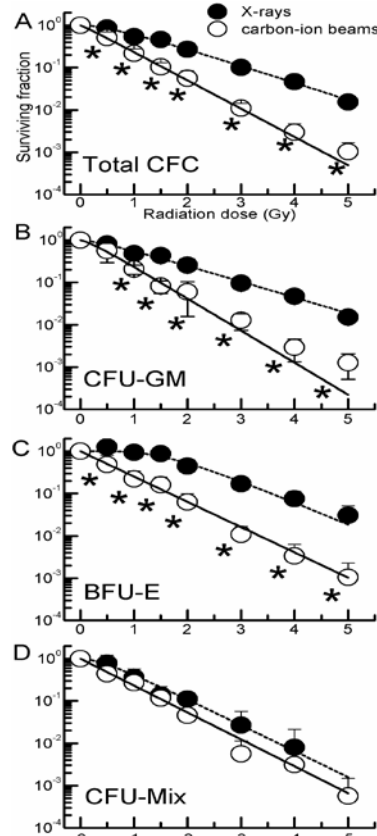


Fig. 4. ヒト骨髄前駆細胞における放射線生存曲線。* $P < 0.05$ vs. X-rays.

骨髄系造血前駆細胞がおおよそ 37%の生存率となる放射線量(平均致死線量)は、X 線及び重粒子線量においてそれぞれ 1.07 ± 0.05 グレイ、 0.65 ± 0.04 グレイと、X 線よりも炭素イオン線に対して感受性であることが明らかとなった (Table 1)。

Table 1. ヒト骨髄系造血前駆細胞の平均致死線量(グレイ)

	CFU-GM	BFU-E	CFU-Mix	Total CFC
X-rays	1.15	0.83	0.71	1.07
Carbon-ion beams	0.57	0.73	0.64	0.65
RBE _{10%}	2.07	2.12	1.31	1.94

DNA2 本鎖切断の修復マーカーである Histon

H2AX のリン酸化は、2 グレイ X 線曝露後 2 時間で最も多く観察されたが (68 foci/cell)、骨髄系分化増殖を促進するサイトカイン (G-CSF, SCF, GM-CSF, EPO, IL-3) 含有無血清液体培養にて 24 時間後には 35 (foci/cell) と、サイトカイン非添加条件よりも低下した。また、培養 14 日目における成熟有核細胞数は、0.5 グレイの X 線曝露と非照射コントロールが同程度だった一方、0.5 グレイの炭素イオン線は、1.5 グレイの X 線に相当する細胞増殖抑制がみられた (非照射コントロールと比較しておよそ 50%) (Fig. 5)。

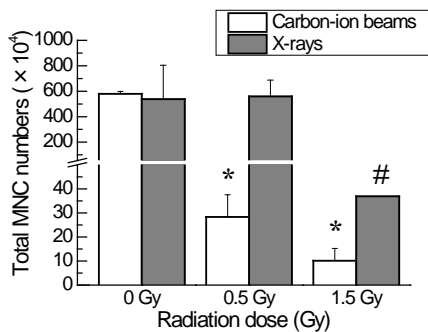


Fig. 5. 異なる線質に曝された造血幹細胞から骨髄系分化・増殖の特徴。* $P < 0.05$ vs. heavy-ion beam-nonirradiated control, and # $P < 0.05$ vs. X-rays nonirradiated control.

培養 14 日目の有核細胞に含まれる HSPCs のうち、より未熟な分画である CD34⁺CD38⁺CD45⁺細胞は、炭素イオン線曝露時に有意に多く含まれていた。更に、炭素イオン線曝露時によって好塩基球系分画が約 2 倍程度に上昇することや X 線曝露によって赤血球系成熟分画が約 1.5 倍に上昇するなど、線質特異的な変動がみられた。

●結論

本研究課題遂行の結果、ヒト造血幹・前駆細胞に対するサイトカイン刺激による分化誘導と放射線感受性には特徴がみられ、特に骨髄系分化関連サイトカインの刺激によって直接または間接的に DNA 損傷を修復すること、また生残細胞は放射線線質特異的に成熟が誘導されることが明らかとなった。

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 1 1 件)

国際原著論文

1) Monzen S, Yoshino H, Kasai-Eguchi K,

Kashiwakura I. Characteristics of myeloid differentiation and maturation pathway derived from human hematopoietic stem cells exposed to different linear energy transfer radiation types. *PLoS One*. 8: e59385, 2013. (査読有)

doi: 10.1371/journal.pone.0059385.

2) Hirose K, Monzen S, Yoshino H, Sato H, Aoki M, Hatayama Y, Kawaguchi H, Sato M, Narita Y, Takai Y, Kashiwakura I. Effects of radiation on the maturation of megakaryocytes. *J Radiat Res*. 54: 447-452, 2013. (査読有)

doi: 10.1093/jrr/trs127.

3) Hirose K, Monzen S, Sato H, Sato M, Aoki M, Hatayama Y, Kawaguchi H, Narita Y, Takai Y, Kashiwakura I. Megakaryocytic differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells induced by ionizing radiation in combination with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Radiat Res*. 54: 438-446, 2013. (査読有)

doi: 10.1093/jrr/trs125.

4) Monzen S, Kashiwakura I. Radioprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human erythrocyte/granulocyte lineages. *Radiat Prot Dosimetry*. 152: 224-228, 2012. (査読有)

doi: 10.1093/rpd/ncs226.

5) Hazawa M, Hosokawa Y, Monzen S, Yoshino H, Kashiwakura I. Regulation of DNA damage response and cell cycle in radiation-resistant HL60 myeloid leukemia cells. *Oncol Rep*. 28: 55-61, 2012. (査読有)

doi: 10.3892/or.2012.1771.

6) Hayashi N, Monzen S, Ito K, Fujioka T, Nakamura Y, Kashiwakura I. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells. *J Radiat Res*. 53: 195-201, 2012. (査読有)

doi:10.1269/jrr.11138.

7) Hosoda M, Tokonami S, Sorimachi A, Monzen S, Osanai M, Yamada M, Kashiwakura I, Akiba S. The time variation of dose rate artificially increased by the Fukushima nuclear crisis. *Sci Rep*. 1: 87, 2011. (査読有)

doi: 10.1038/srep00087.

8) Chiba M, Miura T, Kasai K, Monzen S, Kashiwakura I, Yasue H, Nakamura T. Identification of up-regulated and down-regulated cis-natural antisense transcripts in the human B lymphoblastic cell line IM-9 after X-ray irradiation. *Mol Med Rep*. 5: 1151-1157, 2012. (査読有)

doi: 10.3892/mmr.2012.787.

- 9) **Monzen S**, Hosoda M, Tokonami S, Osanai M, Yoshino H, Hosokawa Y, Yoshida MA, Yamada M, Asari Y, Satoh K, Kashiwakura I. Individual radiation exposure dose due to support activities at safe shelters in Fukushima Prefecture. *PLoS One*. 6: e27761, 2011. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0027761.
- 10) **Monzen S**, Tashiro E, Kashiwakura I. Megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis in hematopoietic stem cells exposed to ionizing radiation. *Radiat Res*. 176: 716-724, 2011. (査読有)
DOI: 10.1667/RR2725.1.
- 11) **Monzen S**, Takahashi K, Yoshino H, Kasai-Eguchi K, Kashiwakura I. Terminal maturation of megakaryocytes and platelet production by hematopoietic stem cells irradiated with heavy-ion beams. *Radiat Res*. 176: 8-16, 2011. (査読有)
DOI: 10.1667/RR2392.1.

[学会発表] (計5件)

- 1) **門前暁**, 木下智子, 柏倉 幾郎. 電離放射線の分割曝露がヒト造血幹細胞から骨髄系分化に与える影響. *日本放射線影響学会第55回大会*. 講演要旨集 P144, 仙台市, 2012年9月6-8日.
- 2) **門前暁**, 木下智子, 柏倉 幾郎. 放射線分割曝露がヒト造血幹細胞からの骨髄系分化に与える影響. *第50回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会*. 講演要旨集 P61, 沖縄県宜野湾市, 2012年6月30日.
- 3) **Monzen S**, Kashiwakura I. The radioprotection effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on the human erythrocyte/granulocyte lineages. *International Symposium on NATURAL RADIATION EXPOSURES and low dose radiation epidemiological studies*. proceedings: P195, Hirosaki, February 29 - March 3, 2012.
- 4) **門前暁**, 吉野浩教, 笠井清美, 柏倉幾郎. ヒト骨髄系造血の分化・増殖に重粒子線が与える影響. *日本放射線影響学会第54回大会*. 講演要旨集 P155, 神戸市, 2011年11月17-19日.
- 5) **Monzen S**, Nakamura T, Kashiwakura I. Characteristic analysis of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by hematopoietic stem cells exposed to ionizing radiation. *14th International Congress of Radiation Research.*, abstracts: P240(POS25-11), Warsaw, Poland, August 28 - September 1, 2011.

[その他]

個人ホームページ・データベース

<http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/view?l=ja&u=100000121&a2=0000027&k=%E9%96%80%E5%89%8D&kc=1&o=namea&pp=10&sm=affiliation&sl=ja&sp=1>

6. 研究組織

(1)研究代表者

門前 暁 (MONZEN SATORU)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：20514136

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし