

- 12) Suraweera N, Meijne E, Moody J, et al. Mutation of the PU.1 Ets domain are specifically associated with murine radiation-induced, But not human therapy-related, acute myeloid leukaemia. *Oncogene*, 2005; 24: 3678-3683.
- 13) Hirouchi T, Takabatake T, Yoshida K, et al. Upregulation of c-myc gene accompanied by PU.1 deficiency in radiation-induced acute myeloid leukemia in mice. *Exp Hematol*, 2008; 36: 871-885.
- 14) Hayata I. Leukemogenesis and chromosomal abnormalities:experimental animals. *Acta Haematol Jpn*, 1985; 48: 1857-1863.
- 15) Ban N, Kai M, Kusama T. Chromosome aberrations in bone marrow cells of C3H/He mice at an early stage after whole-body irradiation. *J Radiat Res*, 1991; 38: 219-231.
- 16) Ullrich LR, Ponnaiya B. Radiation-Instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int J Radiat Biol*, 1998; 74: 747-754.
- 17) Morgan WF. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 1996; 146: 247-258.
- 18) Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 397-404.
- 19) Rithdech K, Bond VP, Cronkite EP, et al. Hypermutability of mouse chromosome 2 during the development of X-ray-induced murine myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 1152-1156.
- 20) Bouffler SD, Meijne EI, Huiskamp R, et al. Chromosomal abnormalities in neutron-induced acute myeloid leukemias in CBA/H mice. *Radiat Res*, 1996; 146: 349-352.
- 21) Ban N, Kai M. Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *Br J Cancer*, 2009; 101: 363-371.
- 22) Ban N, Adachi N, Kai M. Long-term radiation effects on hematopoiesis in mice. *Proceedings of The Second Asian and Oceanic Congress for Radiation Protection (AOCRP-2)*, 2006.
- 23) Olga AS, Hirokawa I, Drazen BZ. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 2004; 6: 168-170.
- 24) Sohal RS, Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann NY Acad Sci*, 1992; 663: 74-84.
- 25) Garcia de la Asuncion J, Millan A, Pla R, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J*, 1996; 10: 333-338.
- 26) Kominami R, Niwa O. Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. *Cancer Sci*, 2006; 97: 575-581.
- 27) Suzuki K, Yamashita S. Low-dose radiation exposure and carcinogenesis. *Jpn J Clin Oncol*, 2012; 42: 563-568.
- 28) Hirouchi T, Akabane M, Tanaka S, et al. Cells surface marker phenotypes and gene expression profiles of murine radiation-induced acute myeloid leukemia stem cells are similar to those of common myeloid progenitors. *Radiat Res*, 2011; 176: 311-322.
- 29) Naka K, et al. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 2008; 10: 1883-1894.
- 30) Takubo K, et al. Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell*, 2010; 7: 391-402.
- 31) Pietras EM, et al. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol*, 2011; 195: 709-720.

- 32) Tothova Z, et al. FoxO are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiological oxidative stress. *Cell*, 2007; 128: 325-339.
- 33) Ito K, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2004; 431: 991-1002.
- 34) Barzilai A, et al. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA repair (Amst)*, 2002; 1: 3-25.
- 35) Jang YY, et al. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cell that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 2007; 110: 3056-3063.
- 36) Owusu-Ansah E, et al. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 2009; 461: 537-541.
- 37) Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal*, 2008; 10: 1923-1940.
- 38) Ito K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2006; 12: 446-451.
- 39) Indo HP, et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 2007; 1-2: 106-118.
- 40) Bar-Peled O, et al. Constitutive overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase exacerbates kainic acid-induced apoptosis of transgenic-Cu/Zn superoxide dismutase neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 8530-8535.
- 41) Hayflick L, et al. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961; 25: 585-621.
- 42) Shibata KR, et al. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells*, 2007; 25: 2371-2382.
- 43) Sedelnikova OA, et al. Senescing human cells and aging mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 2004; 2: 168-170.
- 44) Chen J. Hematopoietic stem cell development, aging and functional failure. *Int J Hematol*, 2011; 94: 3-10.
- 45) Pang WW, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-bias with age. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 20012-20017.
- 46) Rube CE, et al. Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PLoS One*, 2011; 6: e17487.
- 47) Okazaki R, et al. Dynamics of delayed p53 mutations in mice given whole-body irradiated in 8 weeks. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011; 79: 247-254.
- 48) Sohal RS, et al. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev*. 1994; 76: 215-224.
- 49) de la Asuncion JG, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J*, 1996; 10: 333-338.
- 50) Hardwick RJ, et al. Age-related accumulation of mutations supports a replication-dependent mechanism of spontaneous mutation at tandem repeat DNA loci in mice. *Mol Biol Evol*, 2009; 26: 2647-2654.

- 51) Xu G, et al. Ionizing radiation-induced mutant frequencies increase transiently in male germ cells of older mice. *Mutat Res.* 2012; 744: 135-139.
- 52) Chambers SM, et al. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 2007; 8: e201.
- 53) Goff JP, et al. Effects of recombinant cytokines on colony formation by irradiated human cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Radiat Res.* 1997; 147: 61-66.
- 54) Takahashi K, et al. Correlations of cell surface antigens with individual differences in radiosensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Radiat Res.* 2010; 173: 184-190.
- 55) Kaneyuki Y, et al. Involvement of intracellular reactive oxygen species and mitochondria in the radiosensitivity of human hematopoietic stem cells. *J Radiat Res.* 2012; 53: 145-150.
- 56) Yamaguchi M, et al. Role of reactive oxygen species in the response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One.* 2013; 8: e70503.
- 57) Wang Y, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48: 348-356.
- 58) Li H, et al. Mn(III) meso-tetrakis-(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin mitigates total body irradiation-induced long-term bone marrow suppression. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 30-37.
- 59) Wang Y, et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood.* 2006; 107: 358-366.
- 60) Seol MA, et al. Prolonged expression of senescence markers in mice exposed to gamma-irradiation. *J Vet Sci.* 2012; 13: 331-338.
- 61) Miraki-Moud F, et al. Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: 13576-13581.
- 62) Pazhanisamy SK, et al. NADPH oxidase inhibition attenuates total body irradiation-induced hematopoietic genomic instability. *Mutagenesis.* 2011; 26: 431-435.

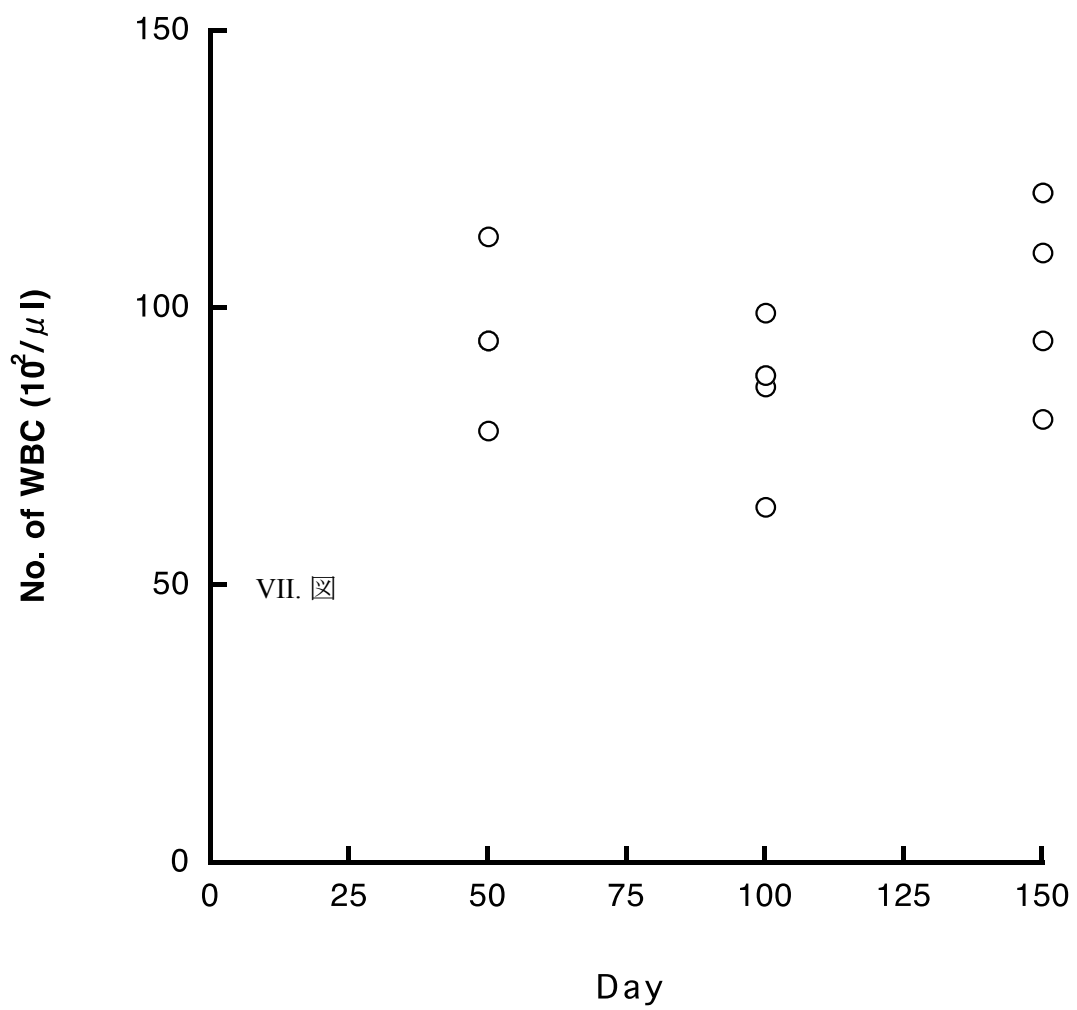


図1. 非照射群におけるWBC数の経時的変化

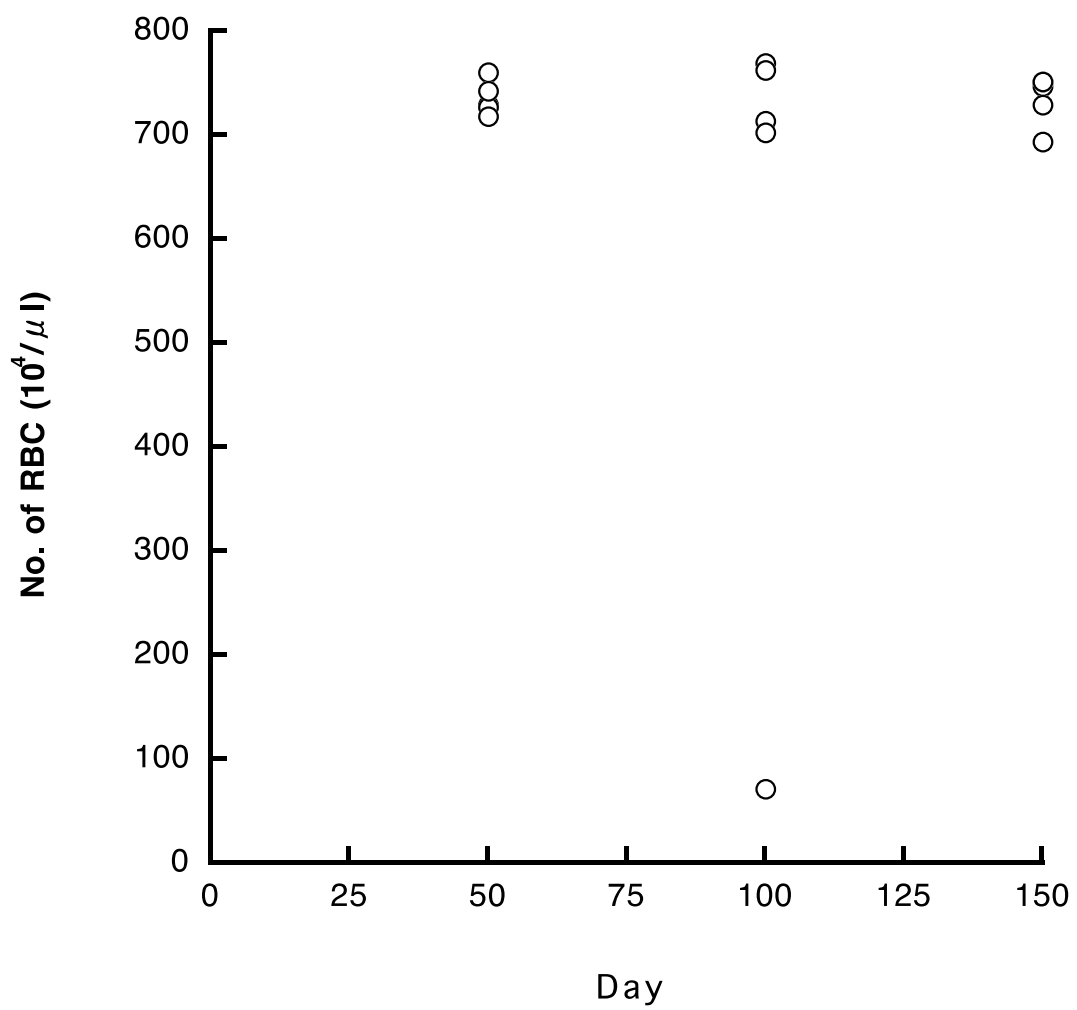


図2. 非照射群におけるRBC数の経時的変化

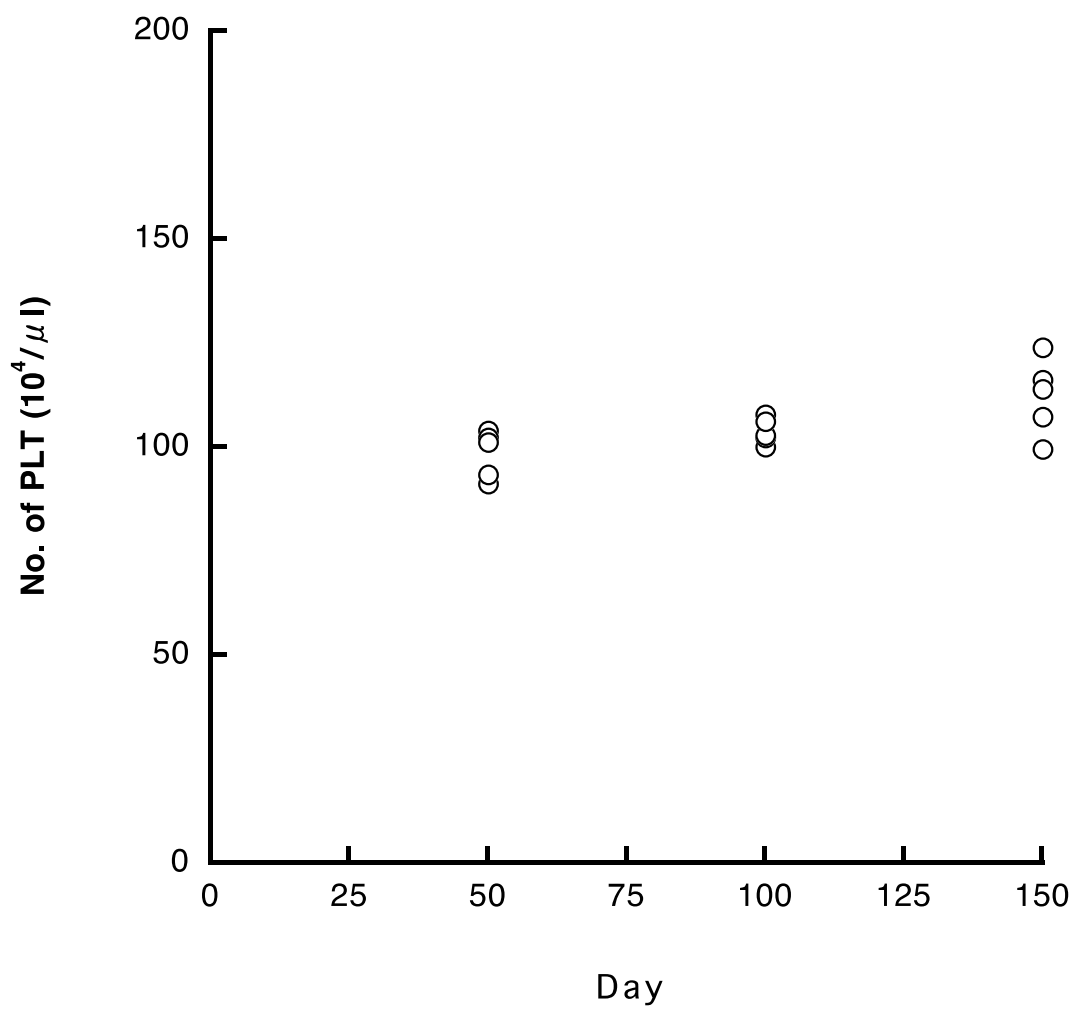


図3. 非照射群におけるPLT数の経時的変化

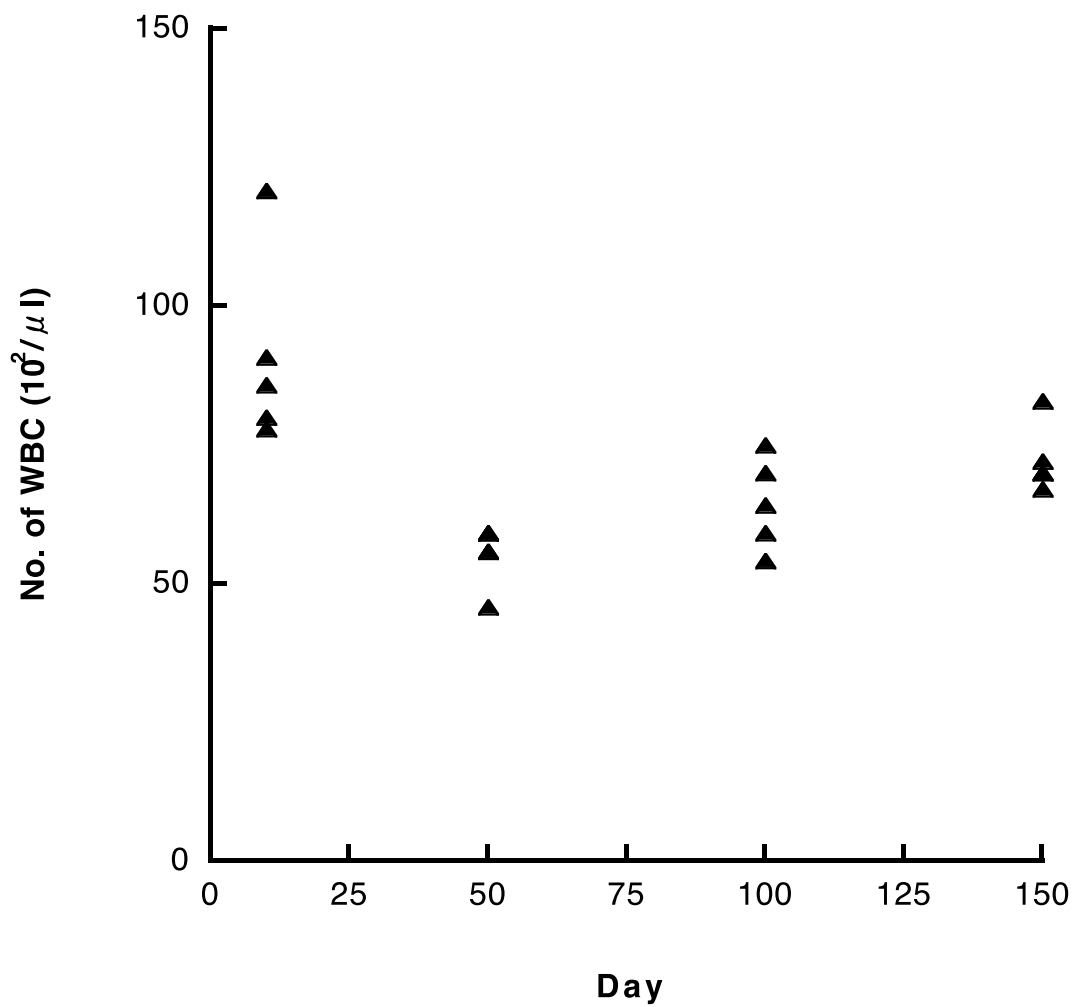


図4. 20mGy/day 群における WBC 数の経時的変化





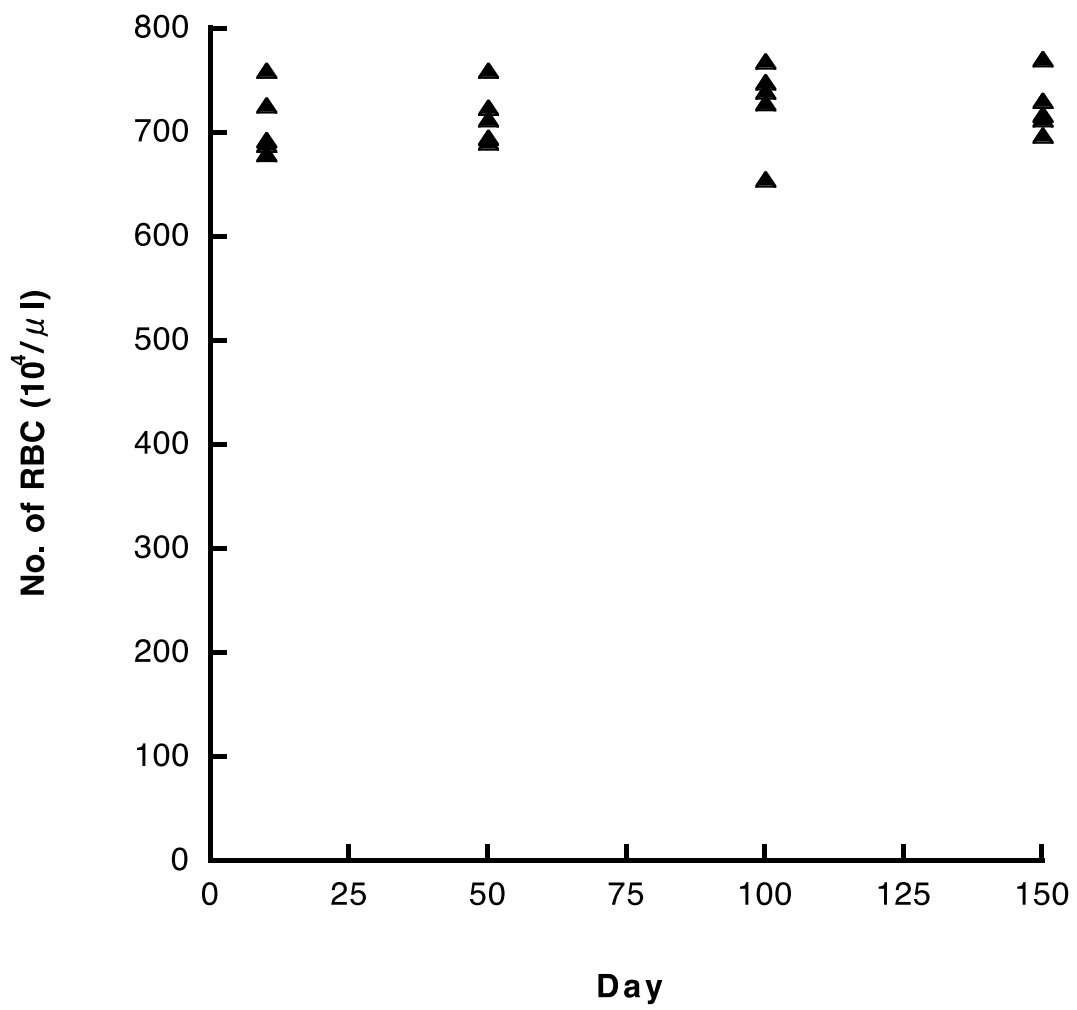


図5. 20mGy/day 群における RBC 数の経時的変化

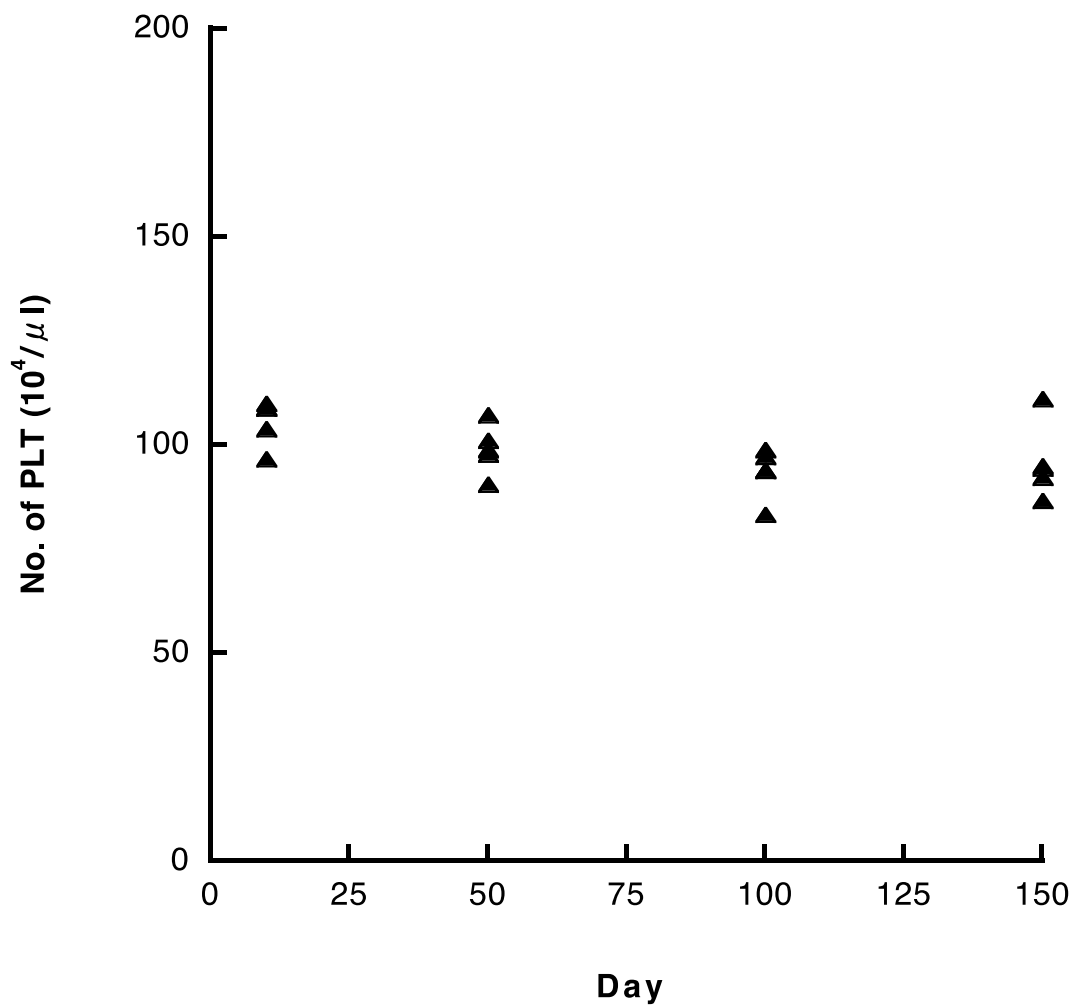


図6. 20mGy/day 群における PLT 数の経時的変化

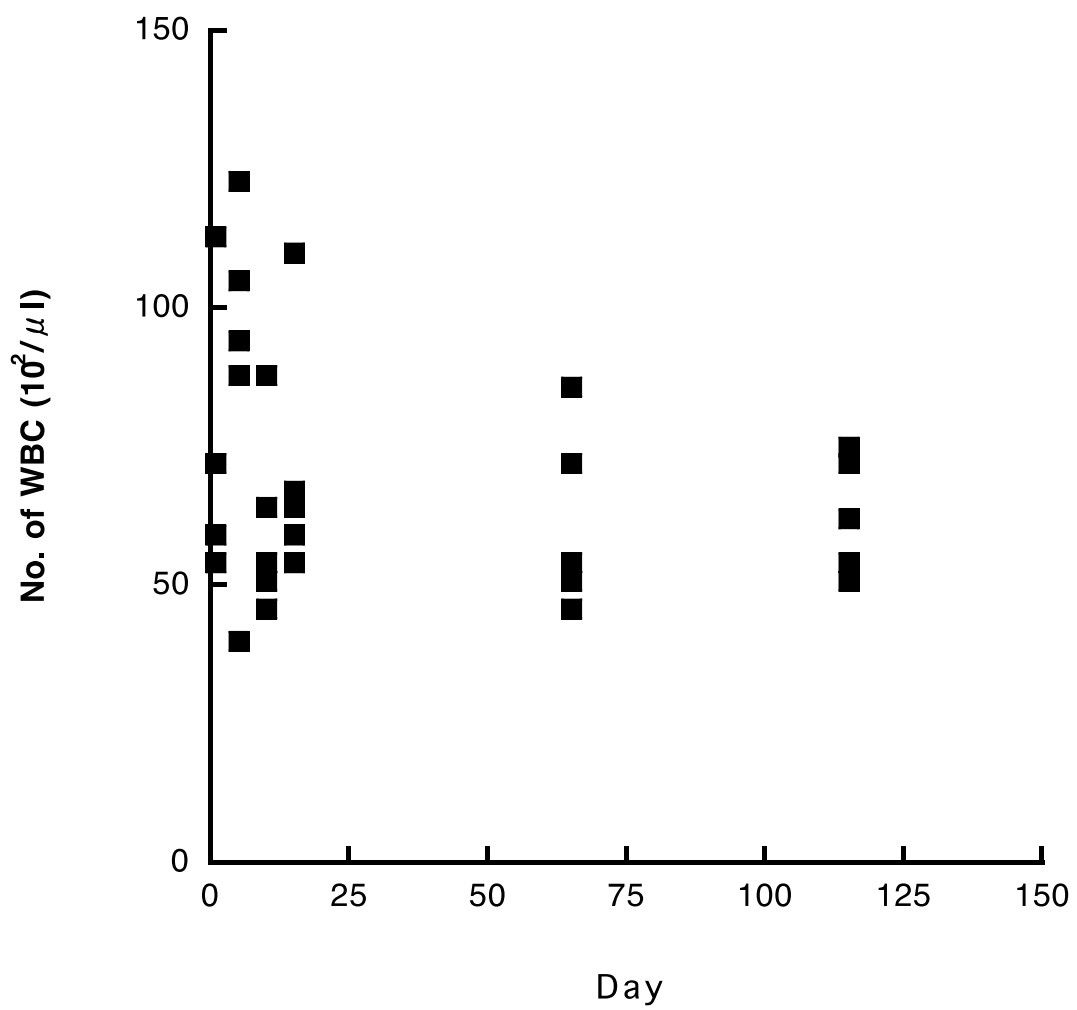


図7. 200mGy/day群における WBC 数の経時的変化

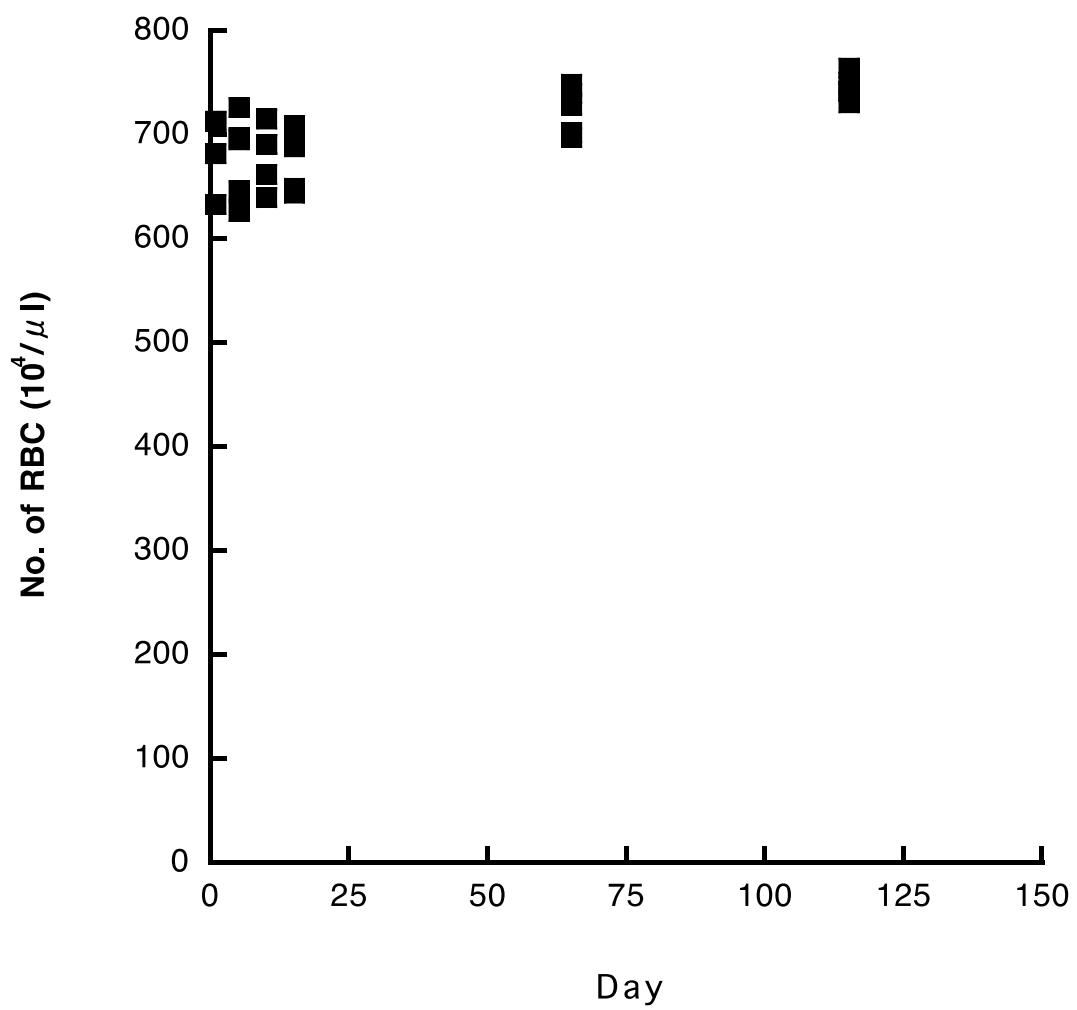


図8. 200mGy/day群における RBC 数の経時的変化

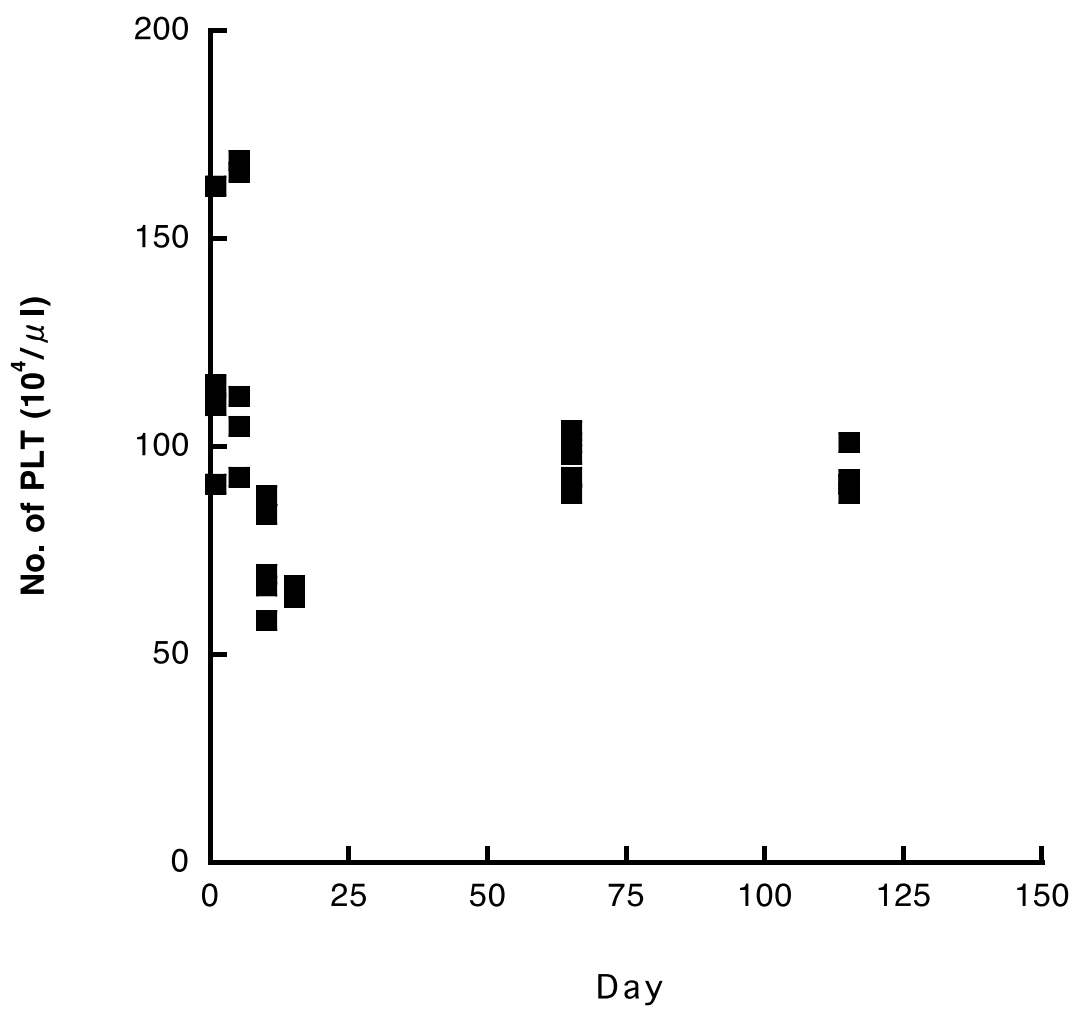


図9. 200mGy/day群における PLT 数の経時的変化

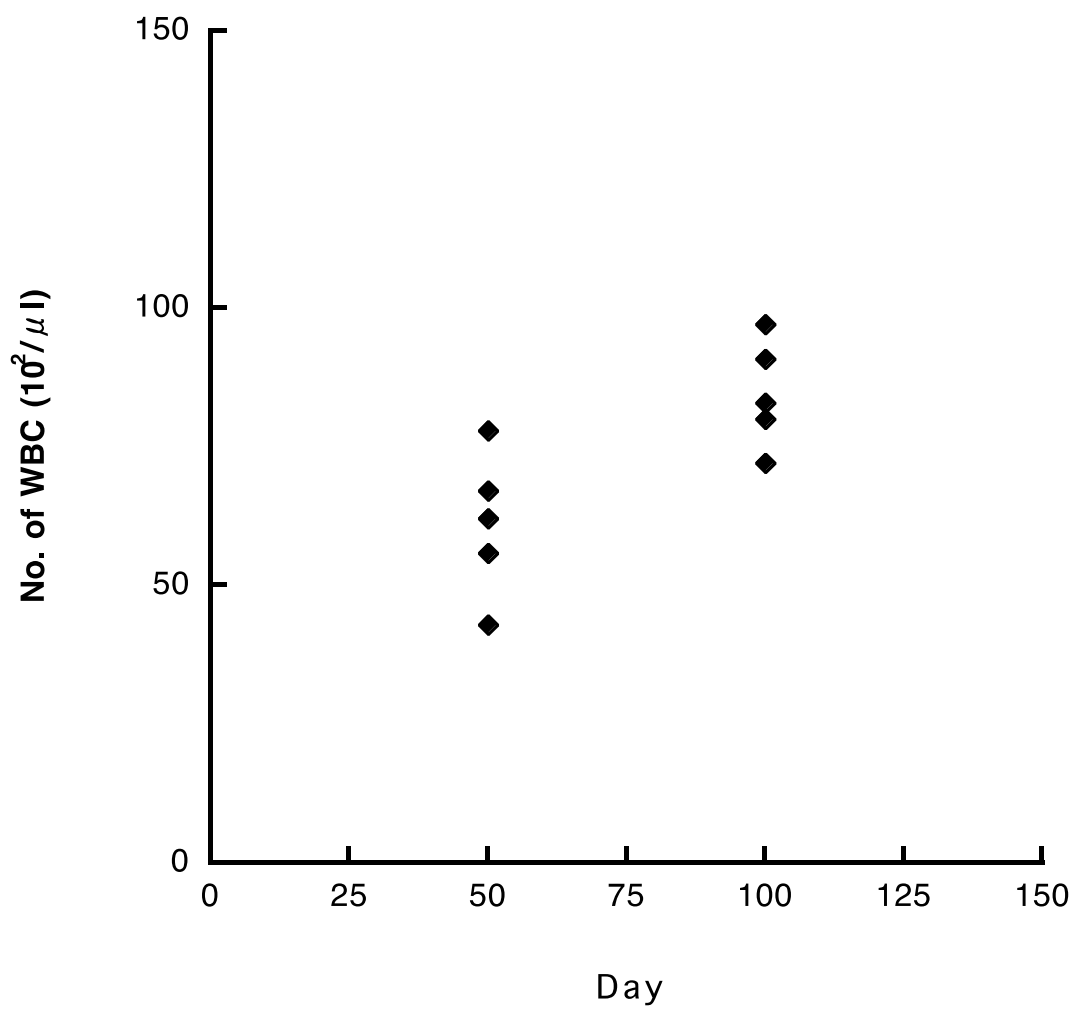


図10. 1Gy/min群における WBC 数の経時的変化

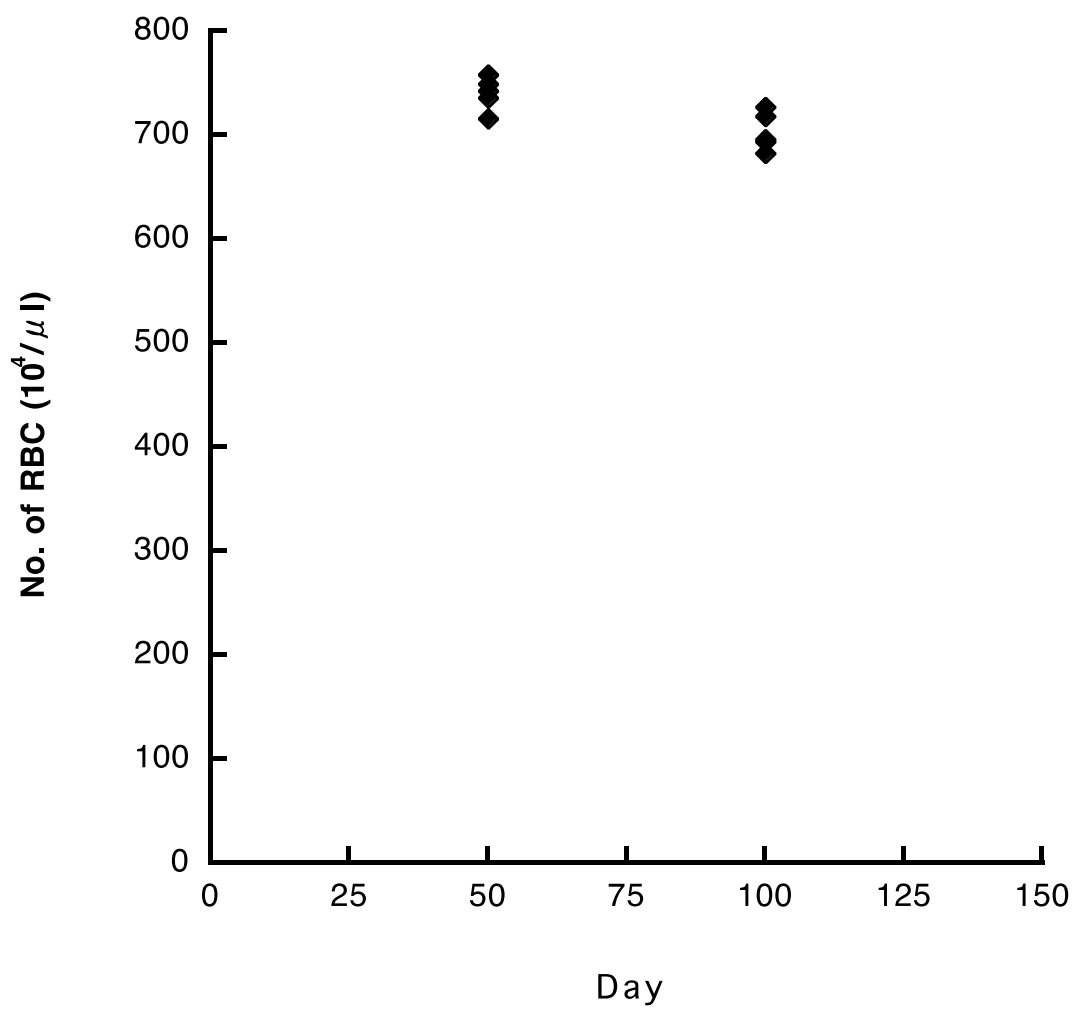


図11. 1Gy/min群における RBC 数の経時的変化

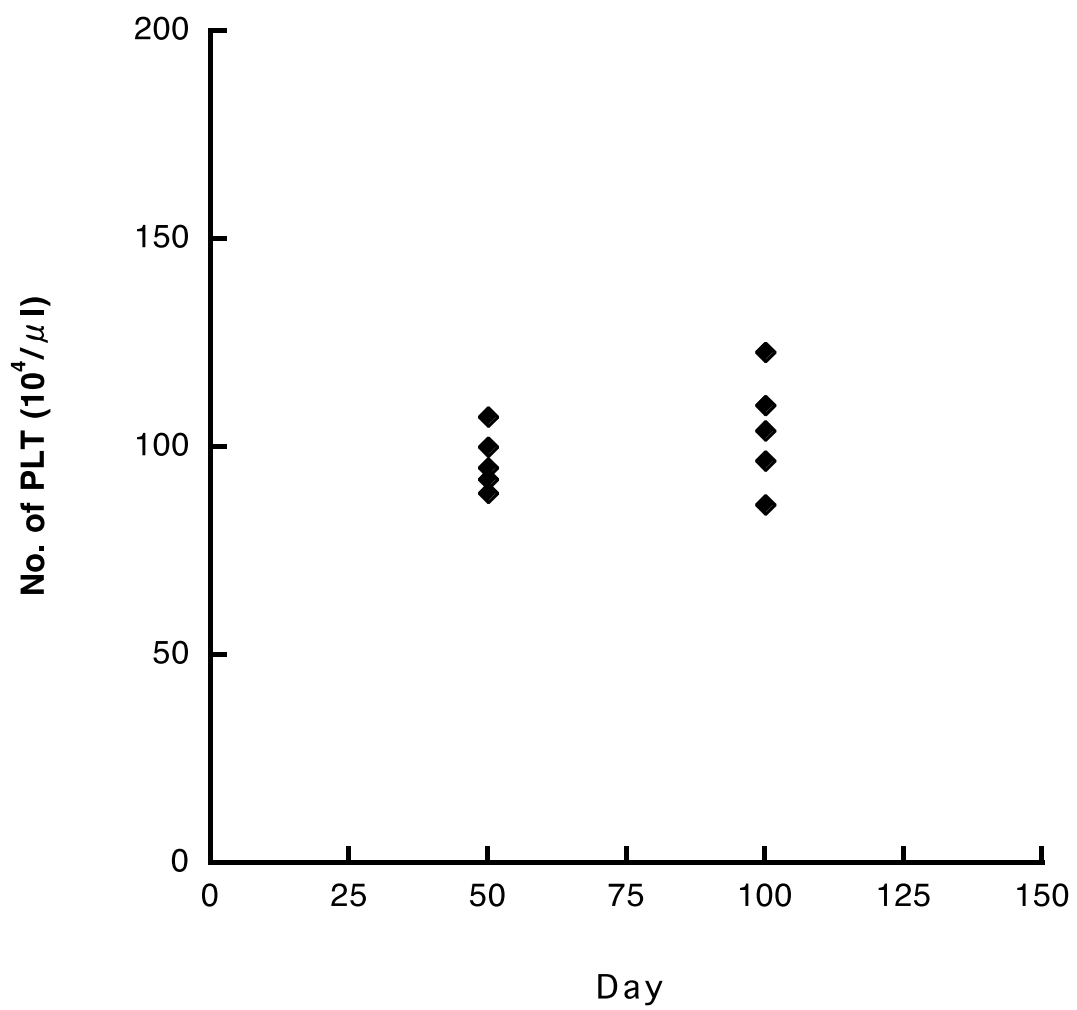


図12. 1Gy/min群における PLT 数の経時的変化



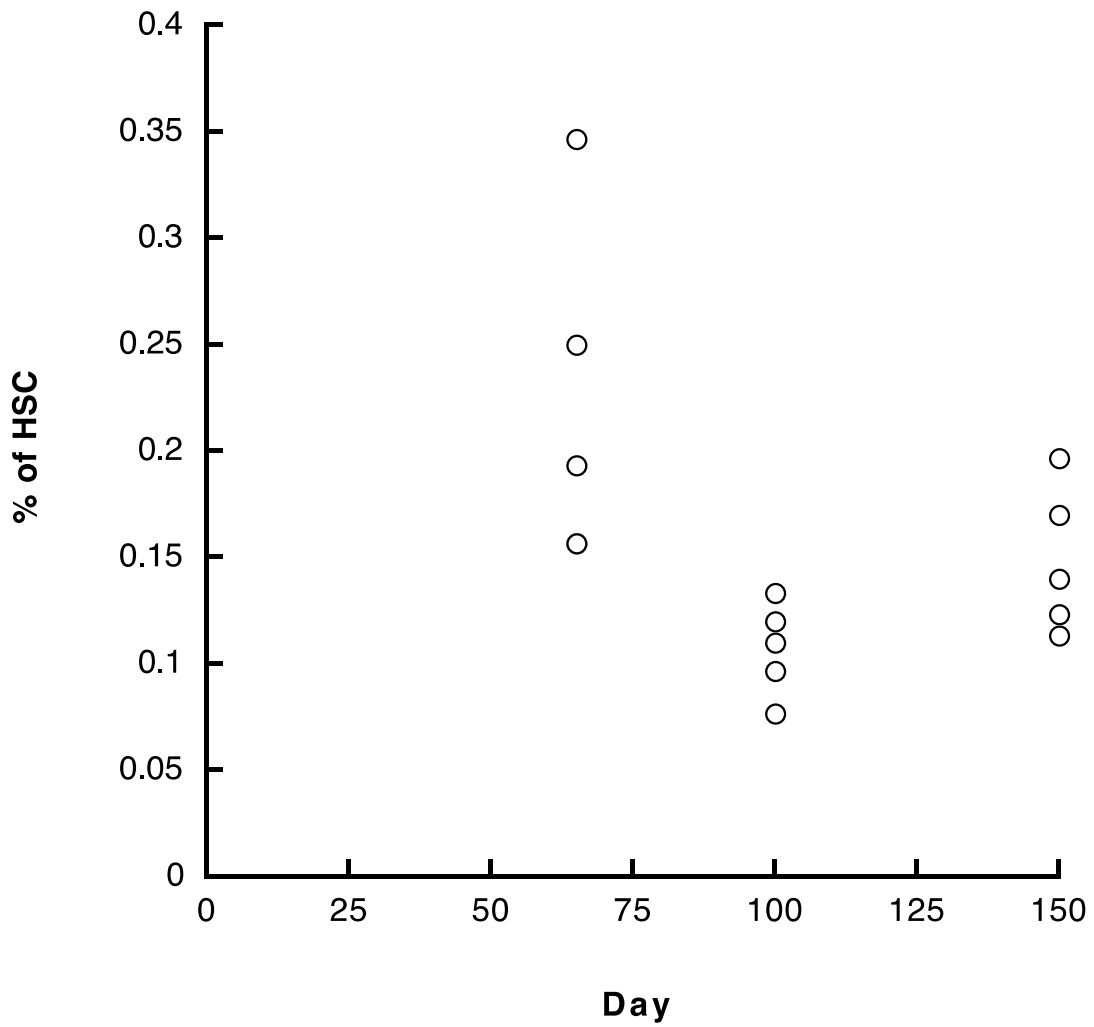


図13. 非照射群における HSC の存在割合の経時的変化

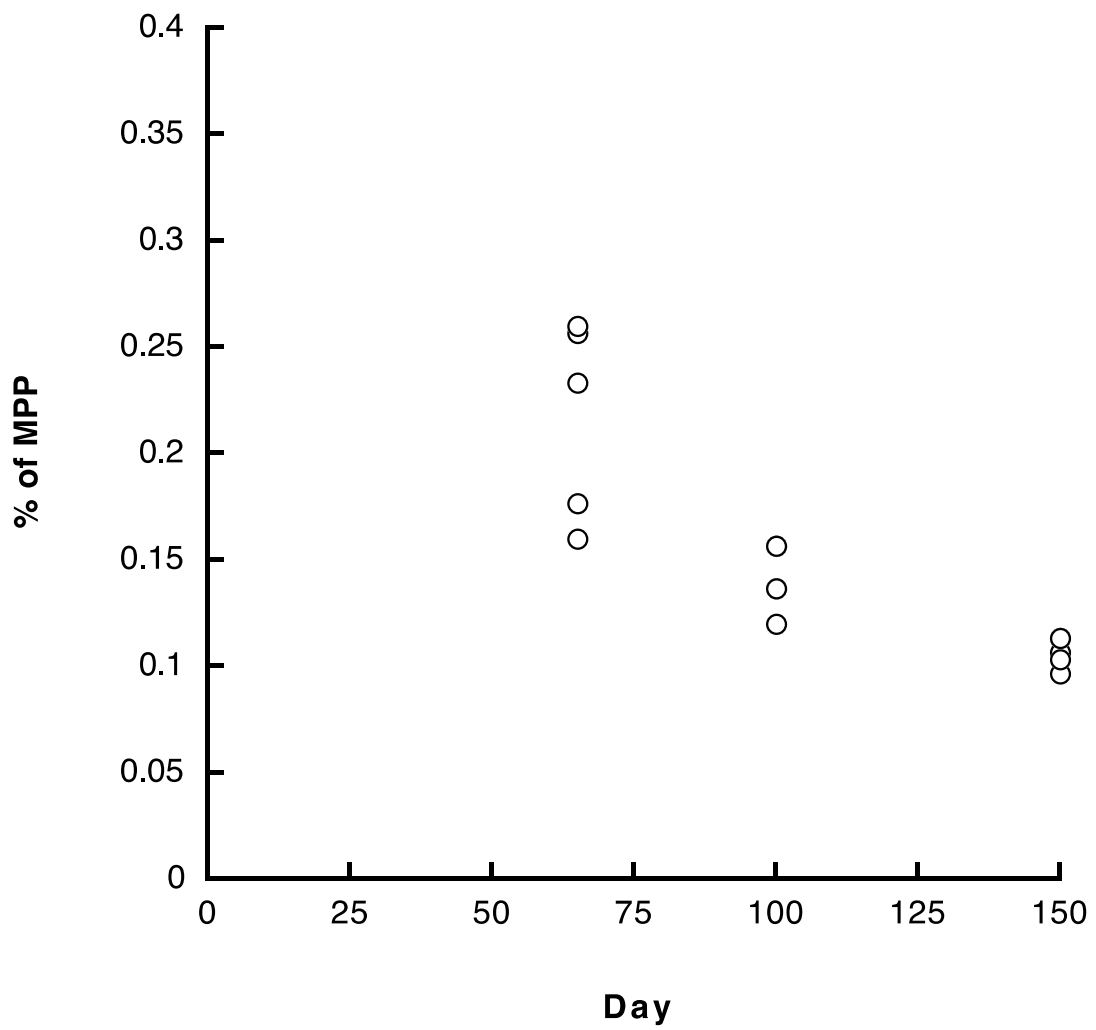


図14. 非照射群における MPP の存在割合の経時的変化

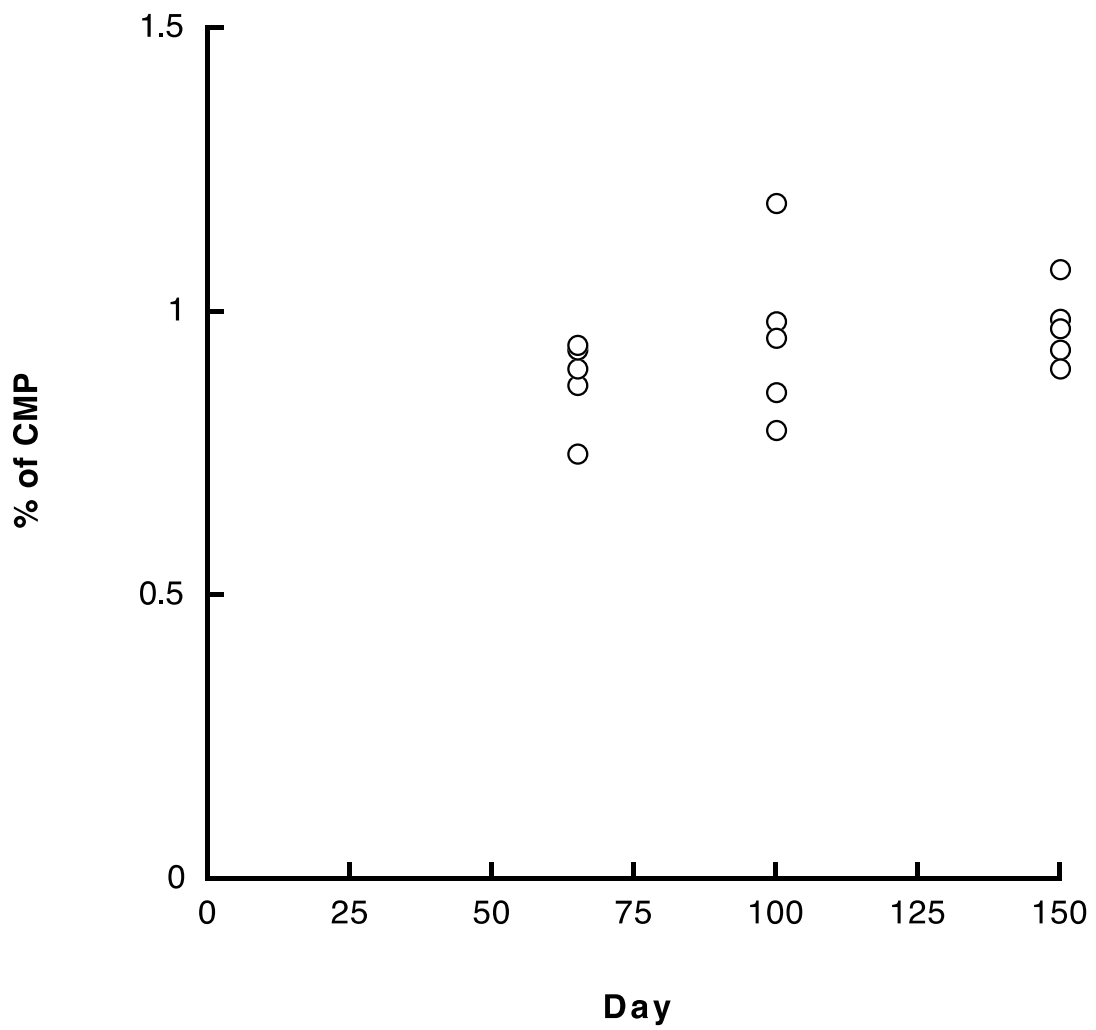


図15. 非照射群における **CMP** の存在割合の経時的変化

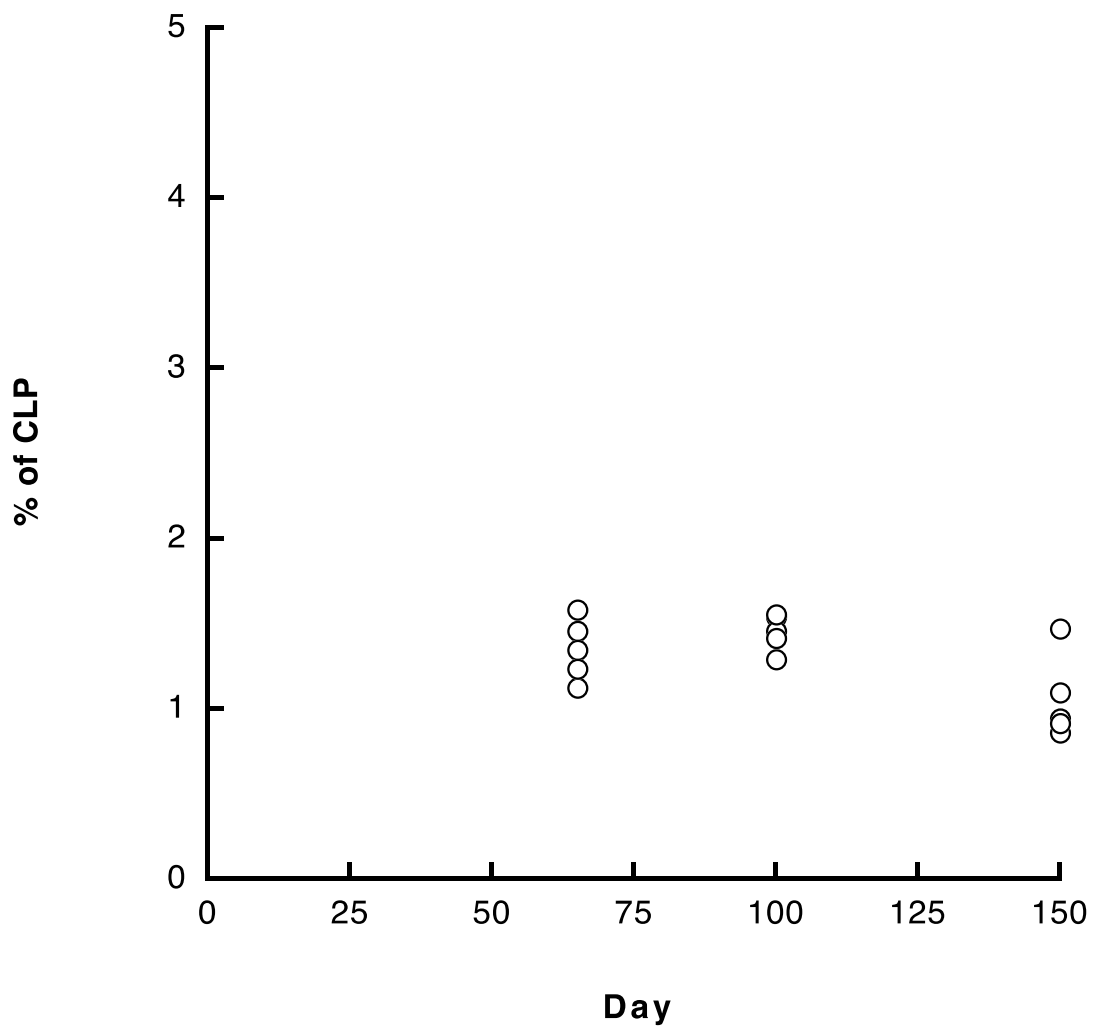


図16. 非照射群における CLP の存在割合の経時的変化

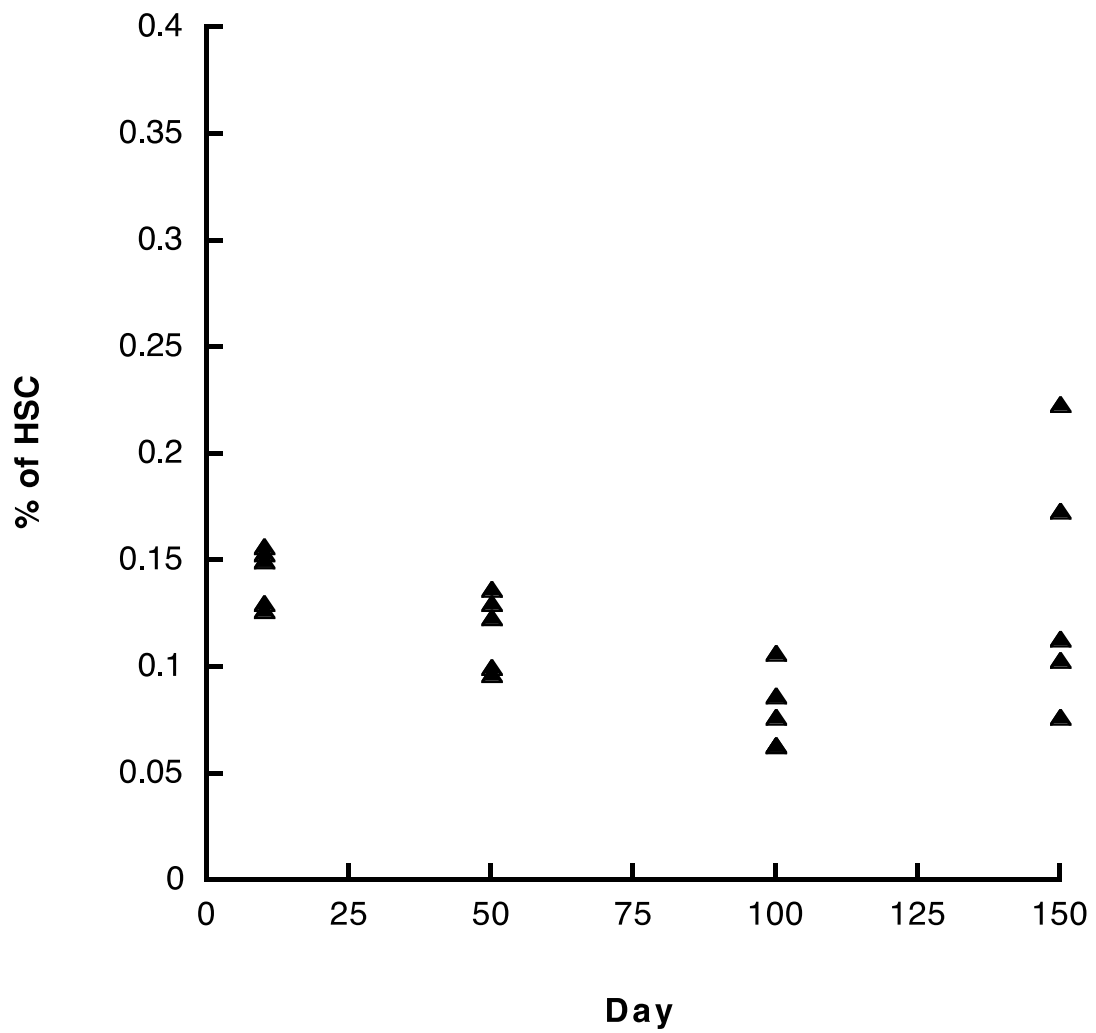


図17. 20mGy/day群における HSC の存在割合の経時的変化

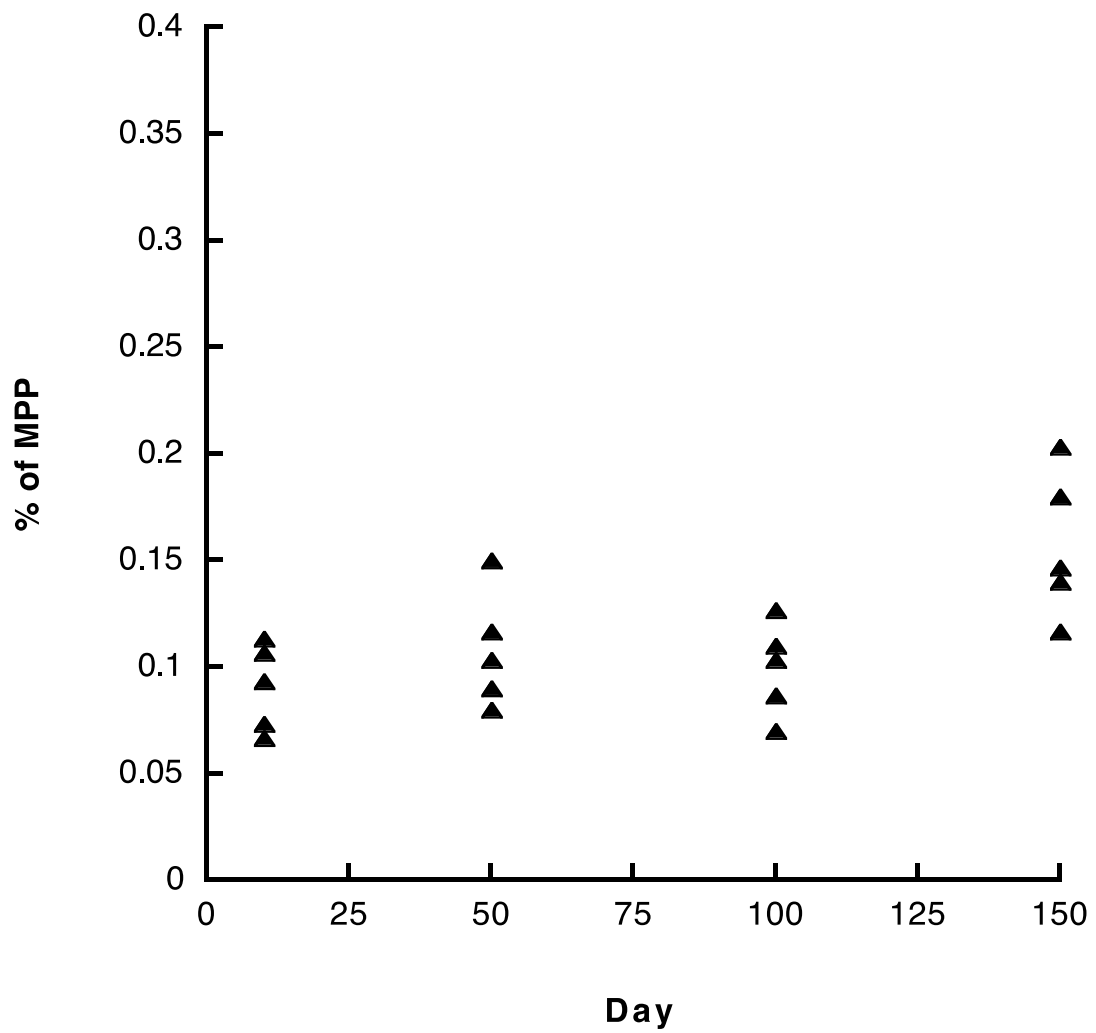


図18. 20mGy/day群における MPP の存在割合の経時的変化

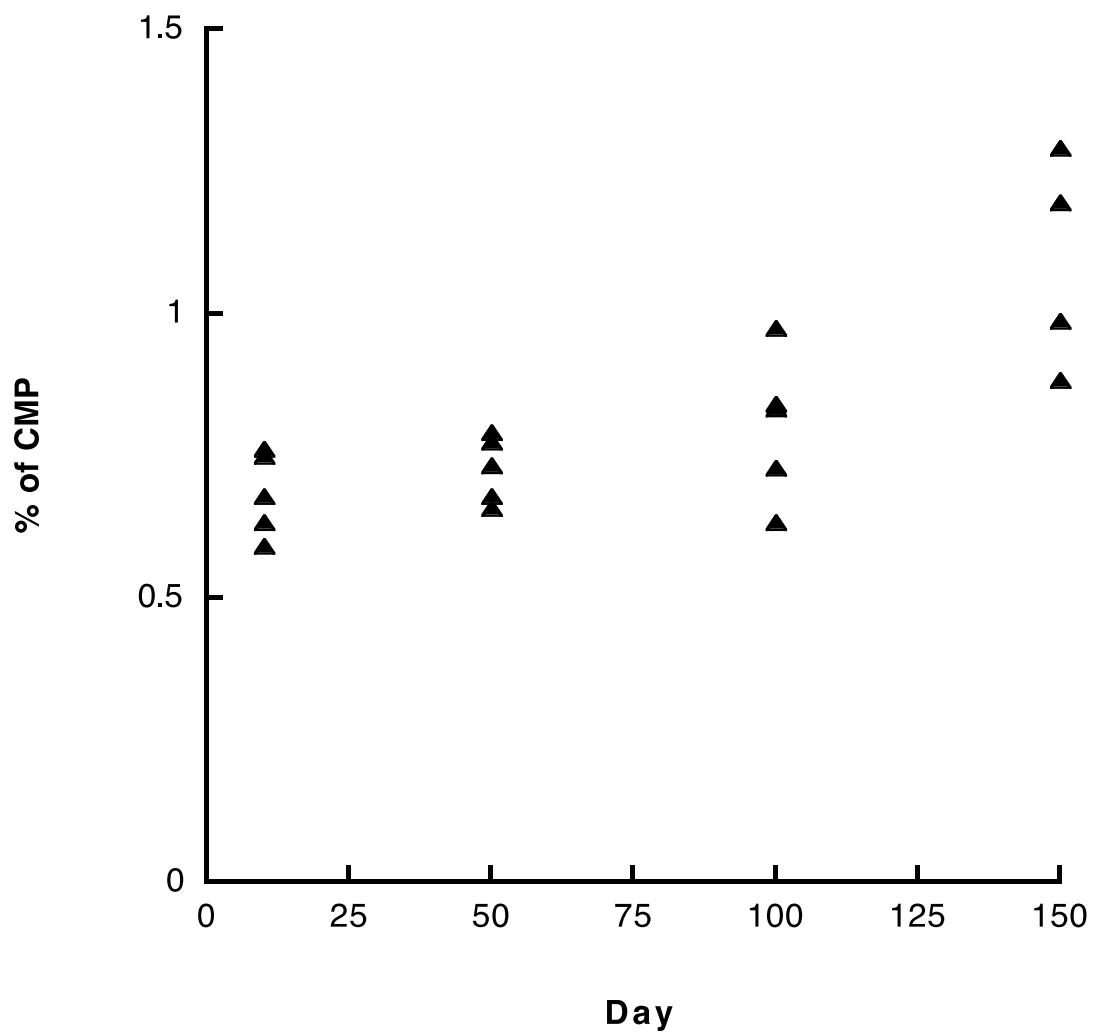


図19. 20mGy/day群における **CMP** の存在割合の経時的変化

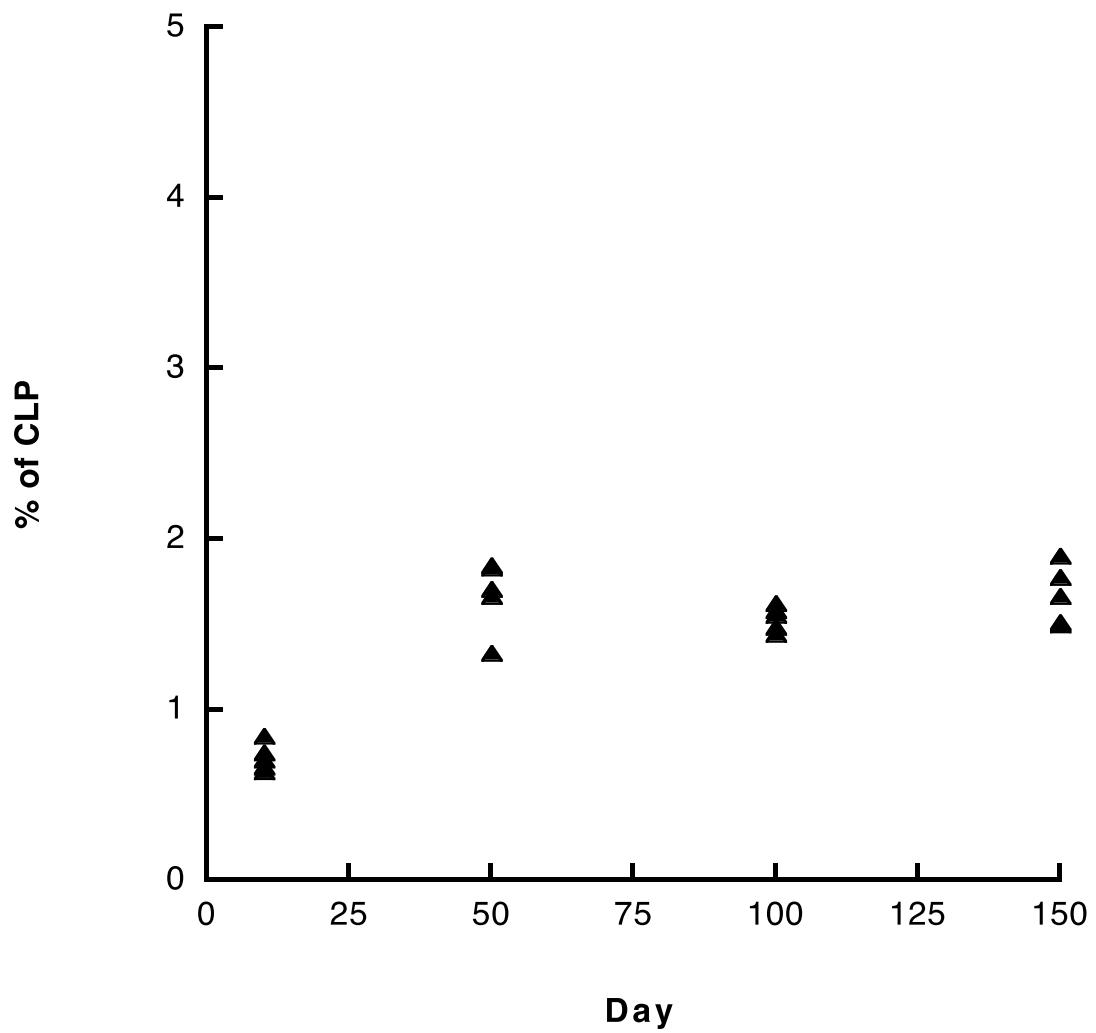


図20. 20mGy/day群における CLP の存在割合の経時的変化



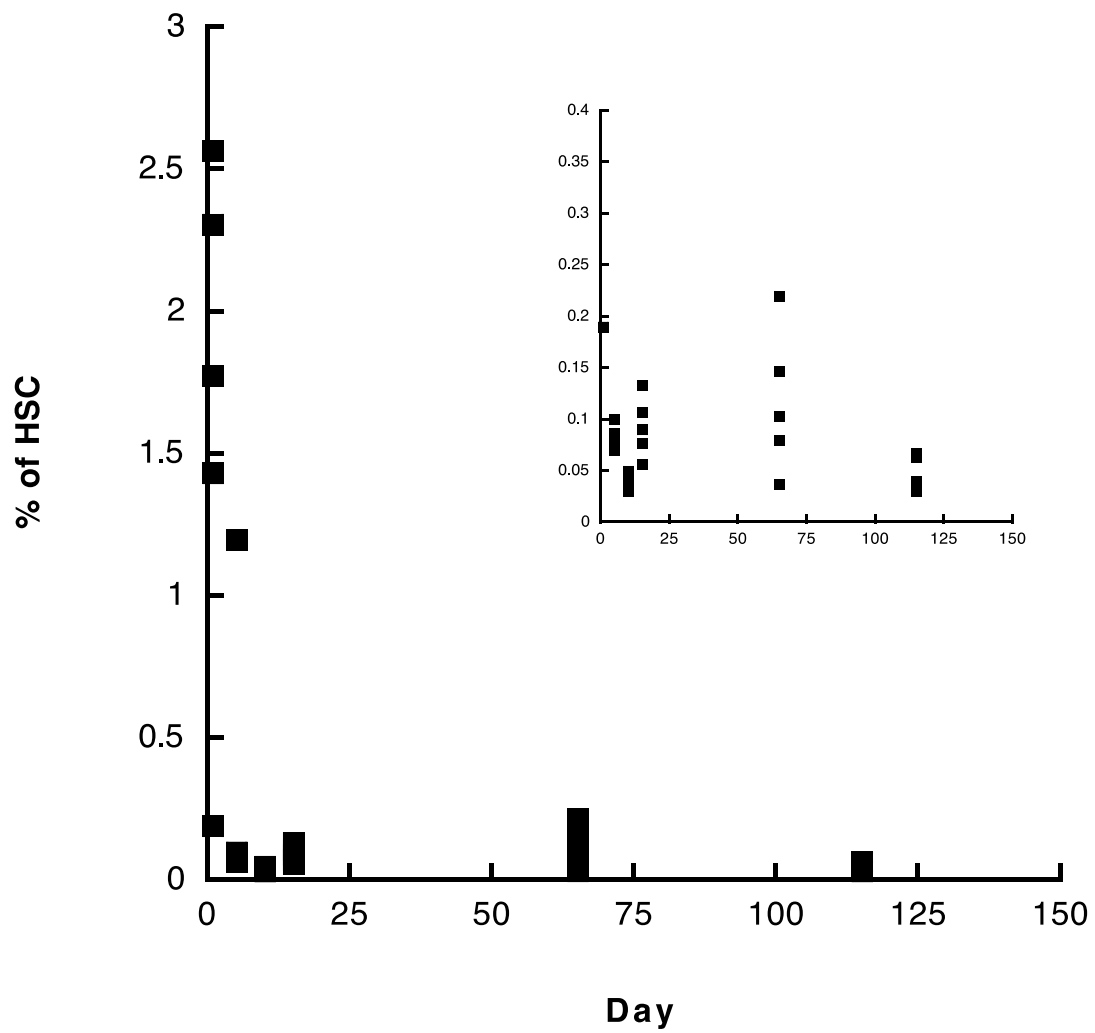


図21. 200mGy/day群における HSC の存在割合の経時的変化

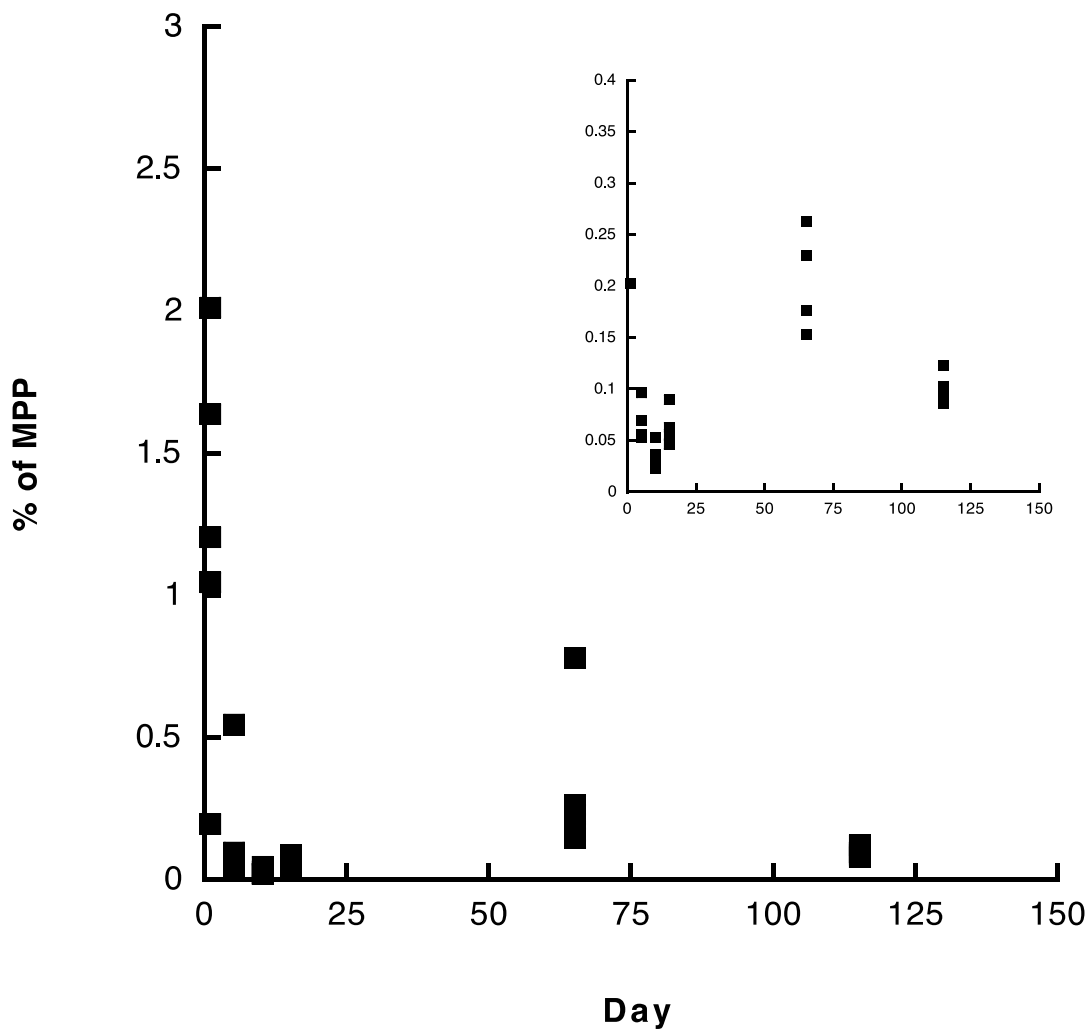


図22. 200mGy/day群における MPP の存在割合の経時的変化

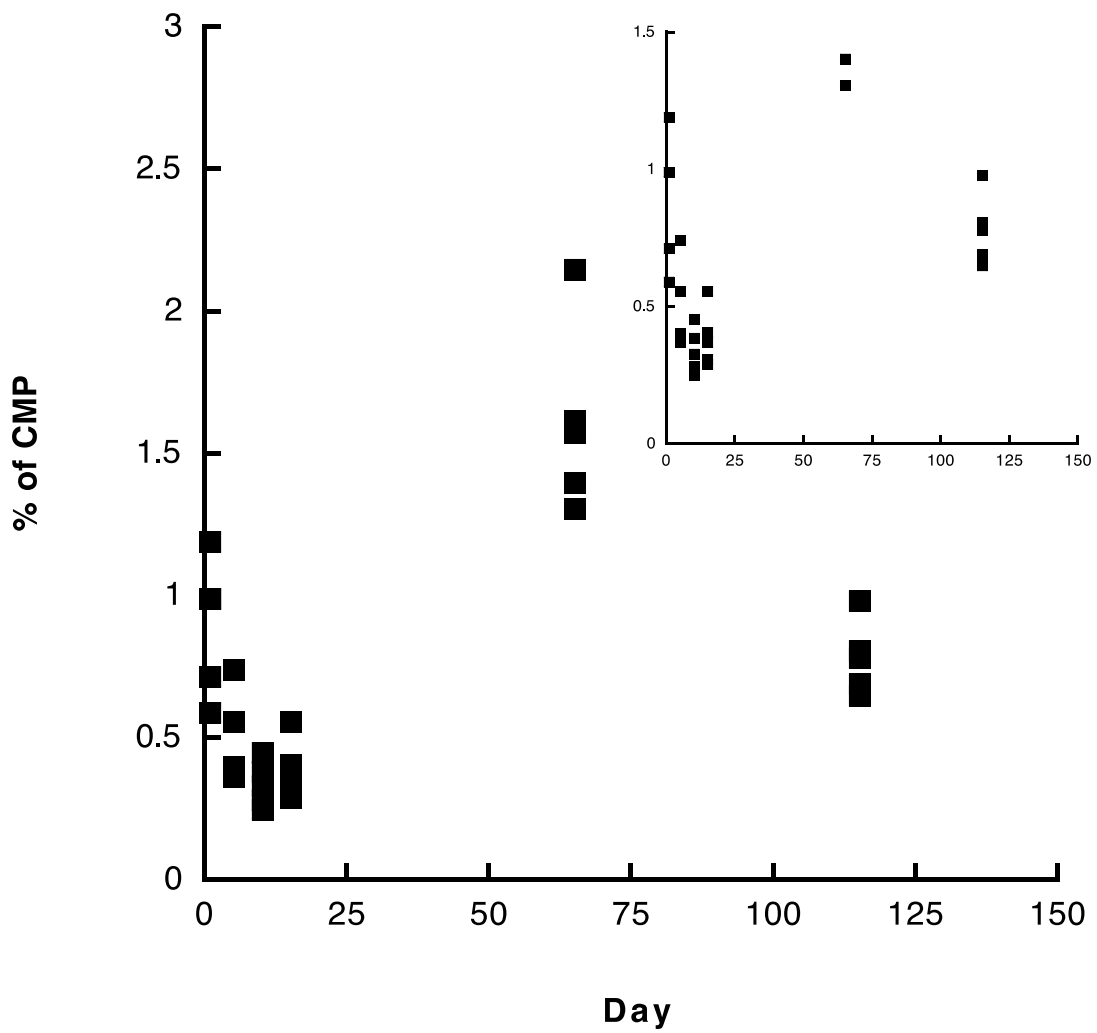


図23. 200mGy/day群における **CMP** の存在割合の経時的変化

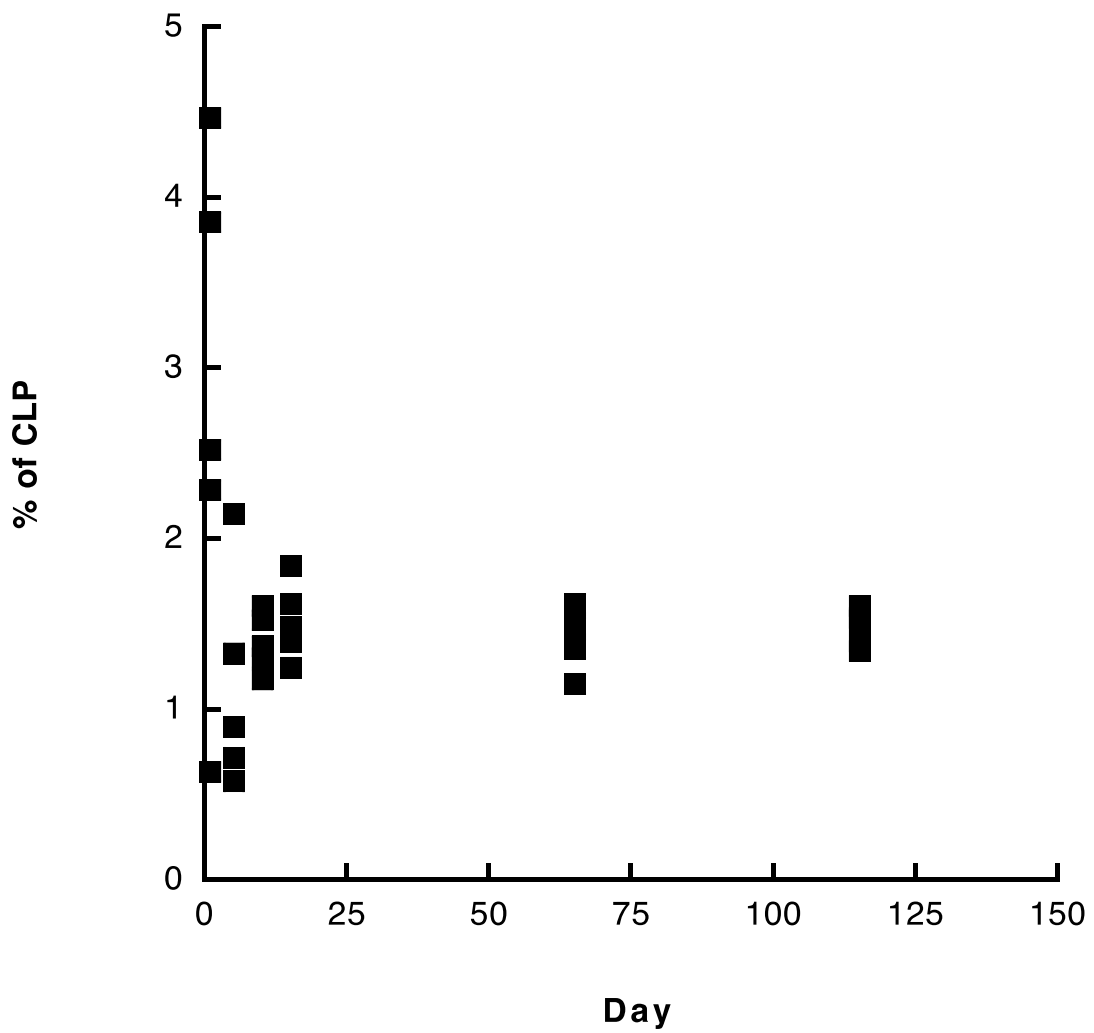


図24. 200mGy/day群における CLP の存在割合の経時的変化

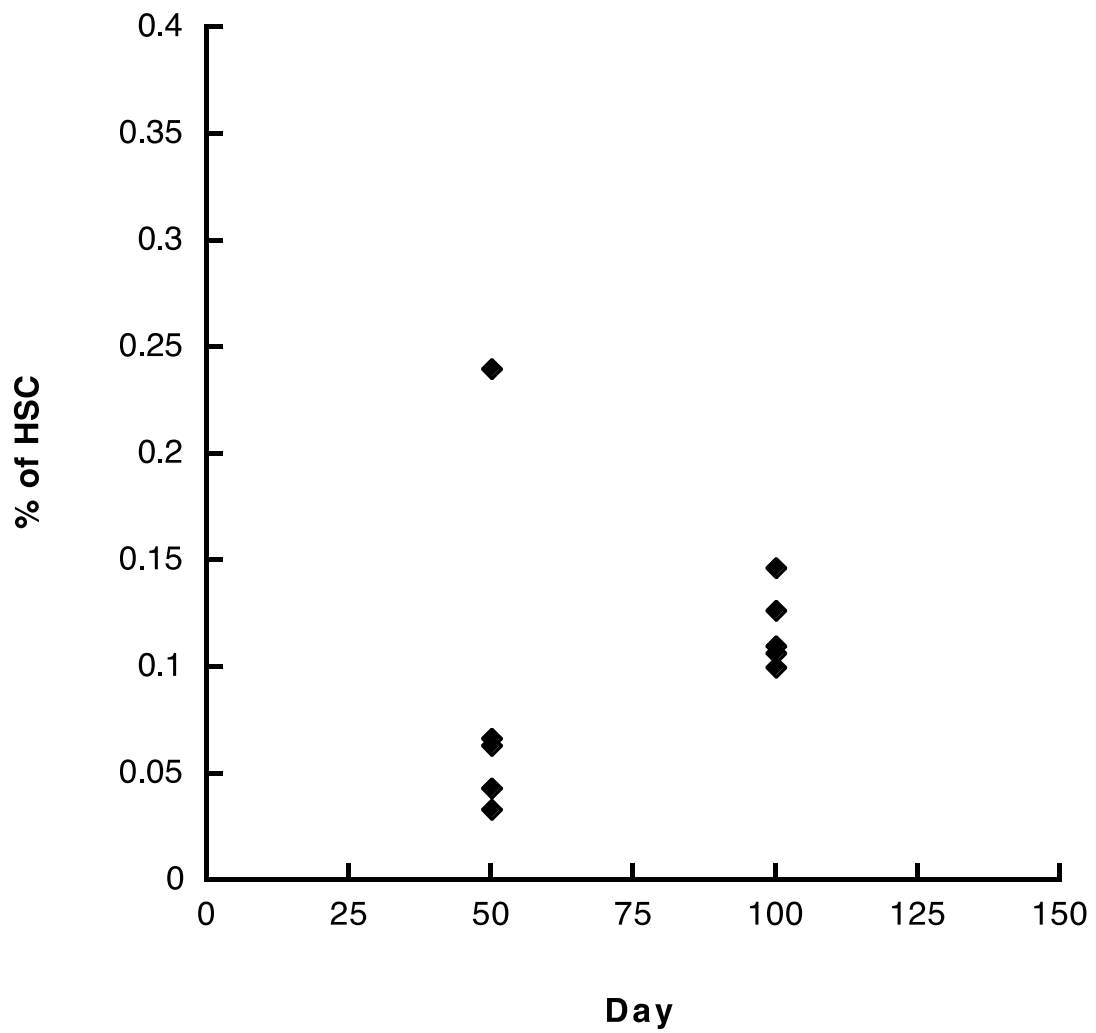


図25. 1Gy/min群における HSC の存在割合の経時的変化

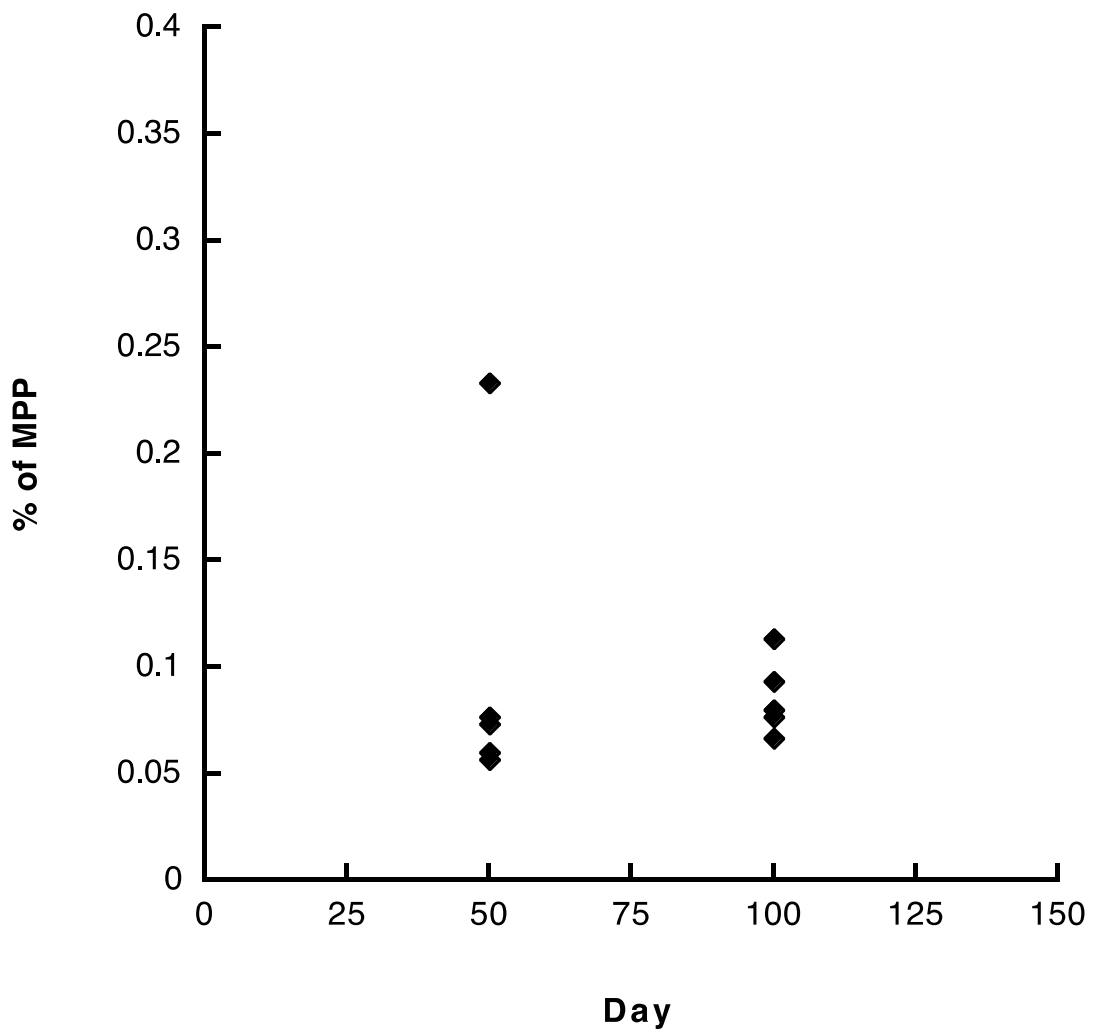


図26. 1Gy/min群における MPP の存在割合の経時的変化

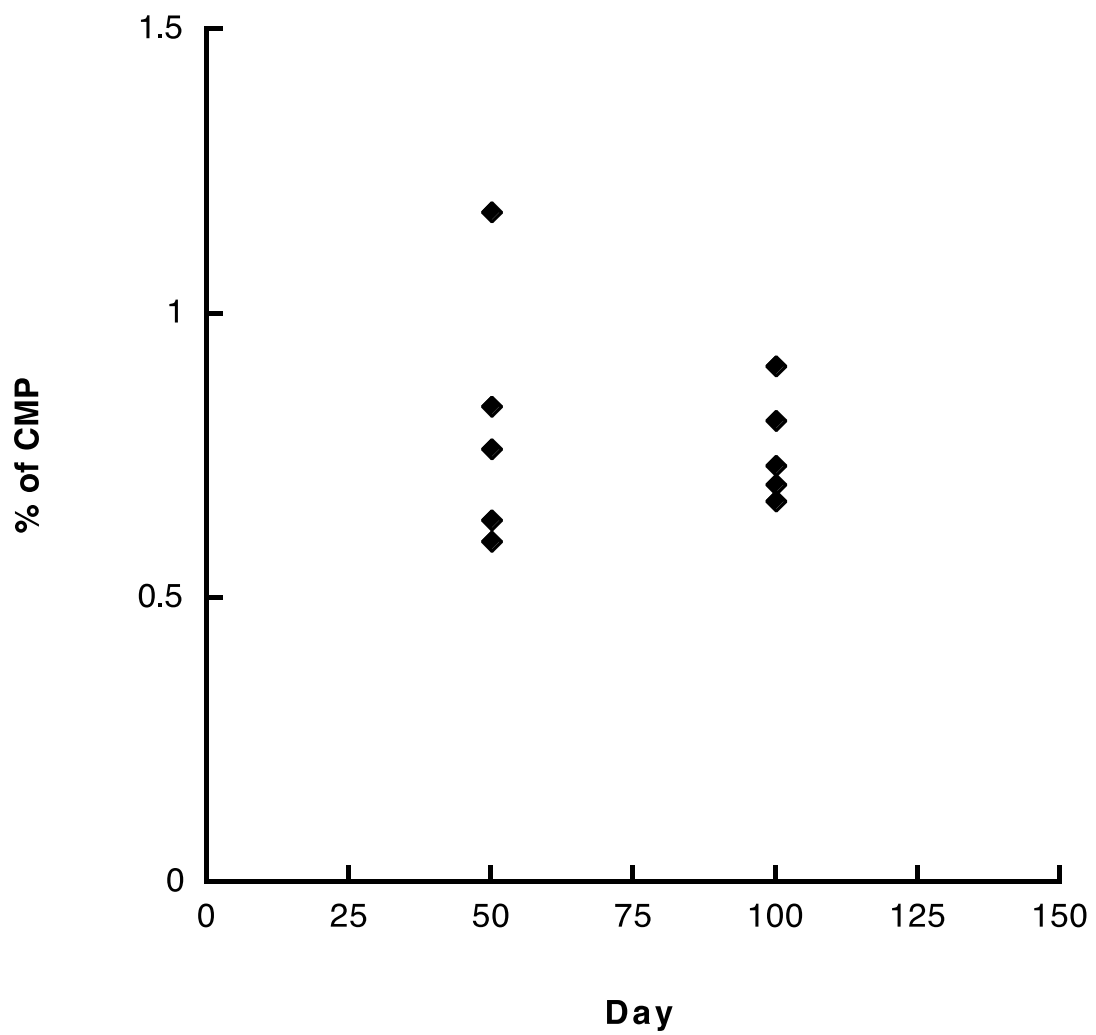


図27. 1Gy/min群における **CMP** の存在割合の経時的変化

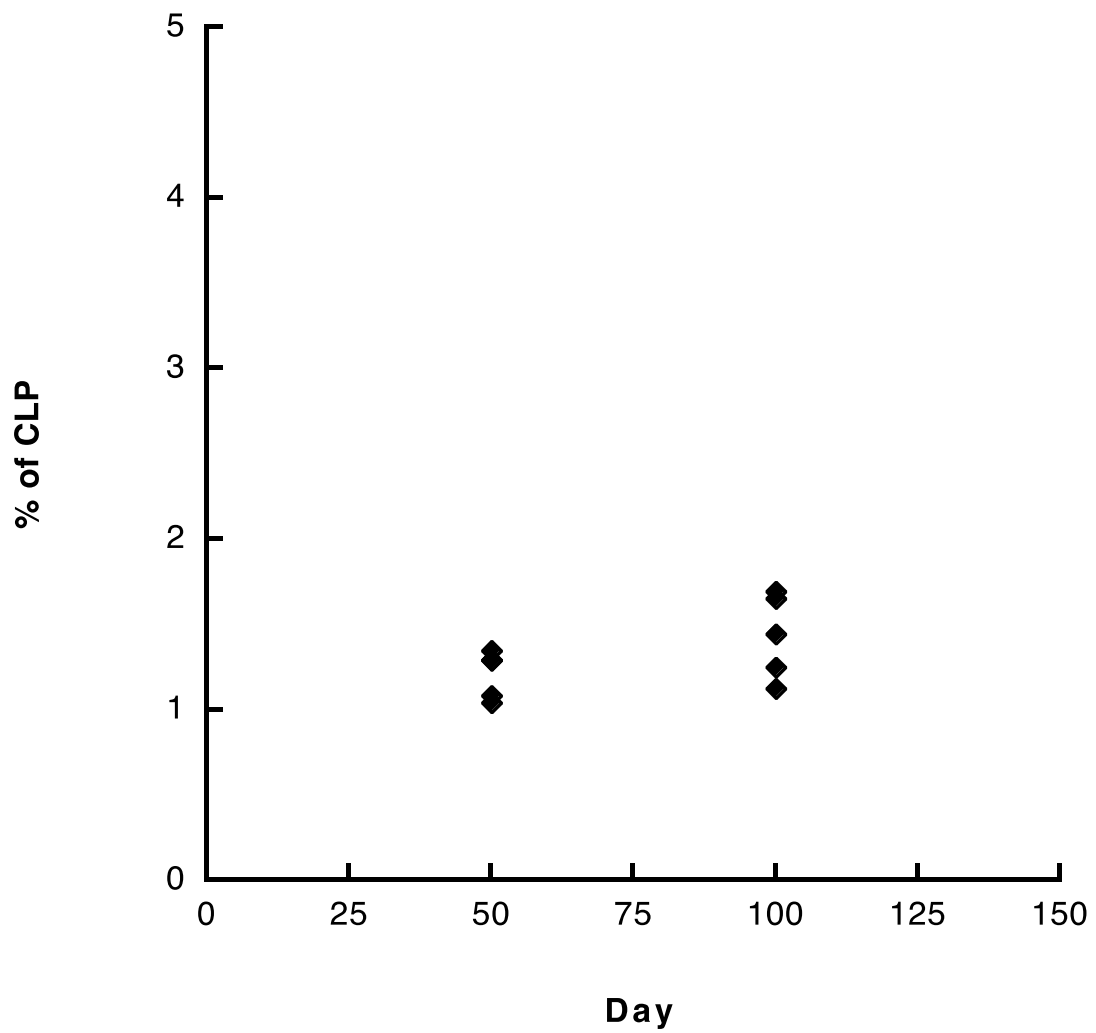


図28. 1Gy/min群における CLP の存在割合の経時的変化



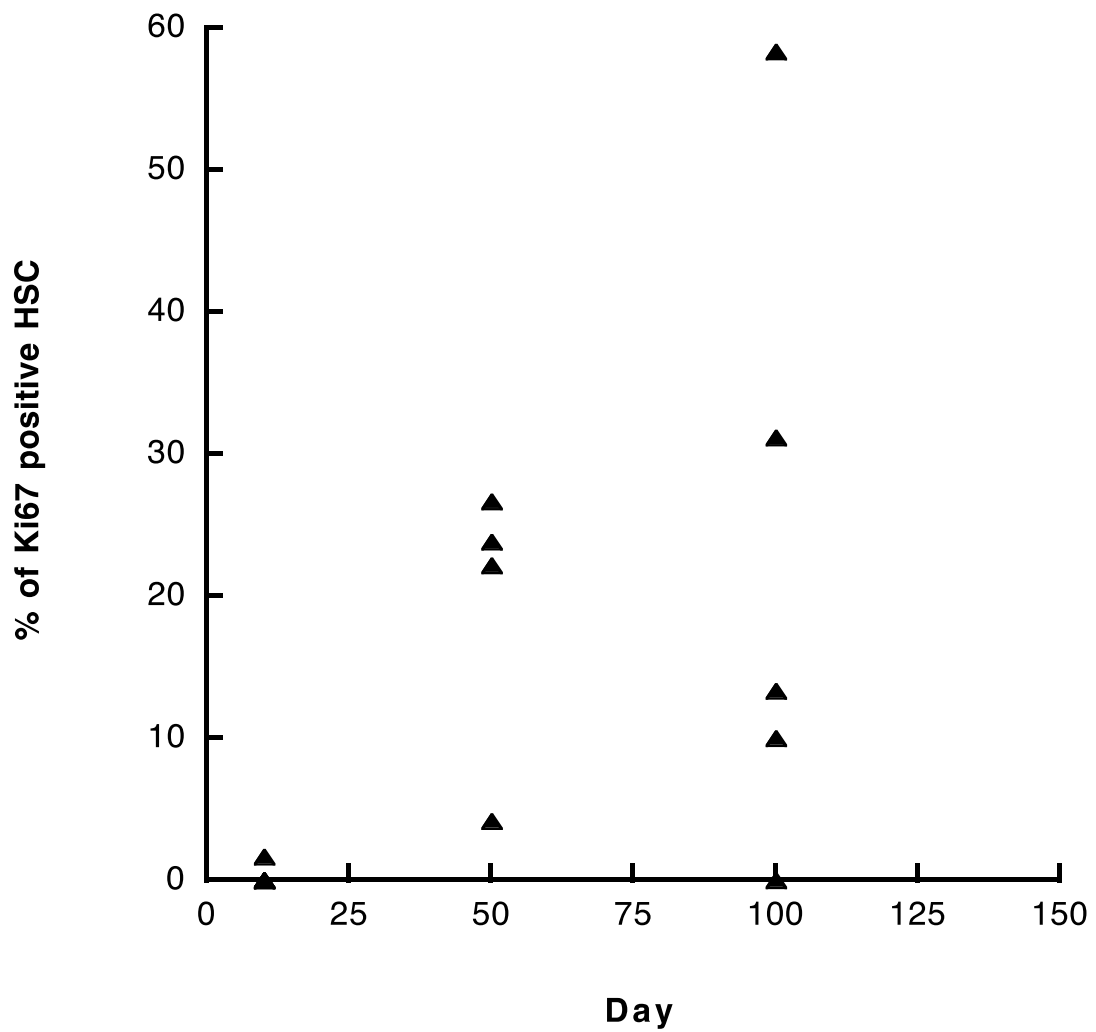


図29. 20mGy/min群における Ki67 発現 HSC の割合の経時的変化

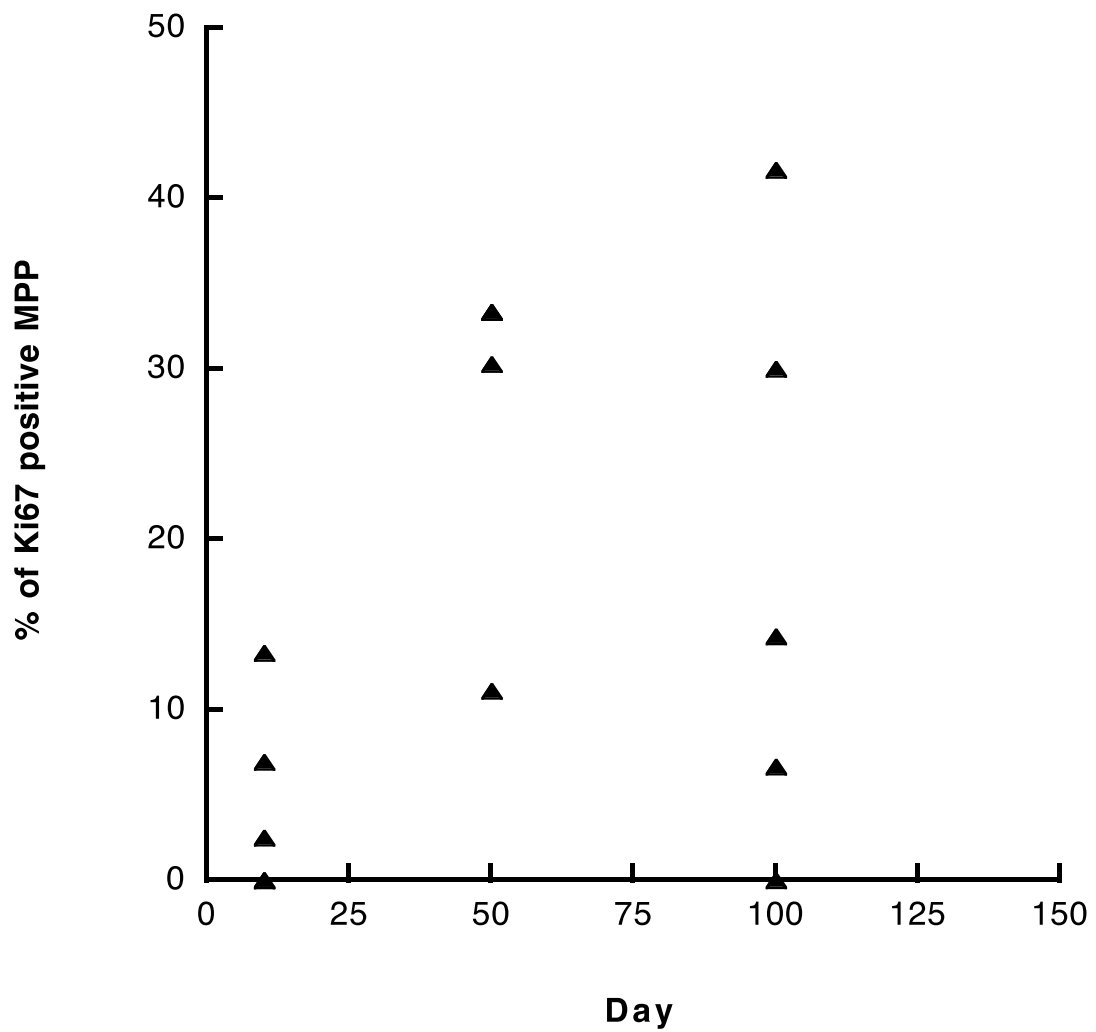


図30. 20mGy/min群における **Ki67** 発現 **MPP** の割合の経時的変化

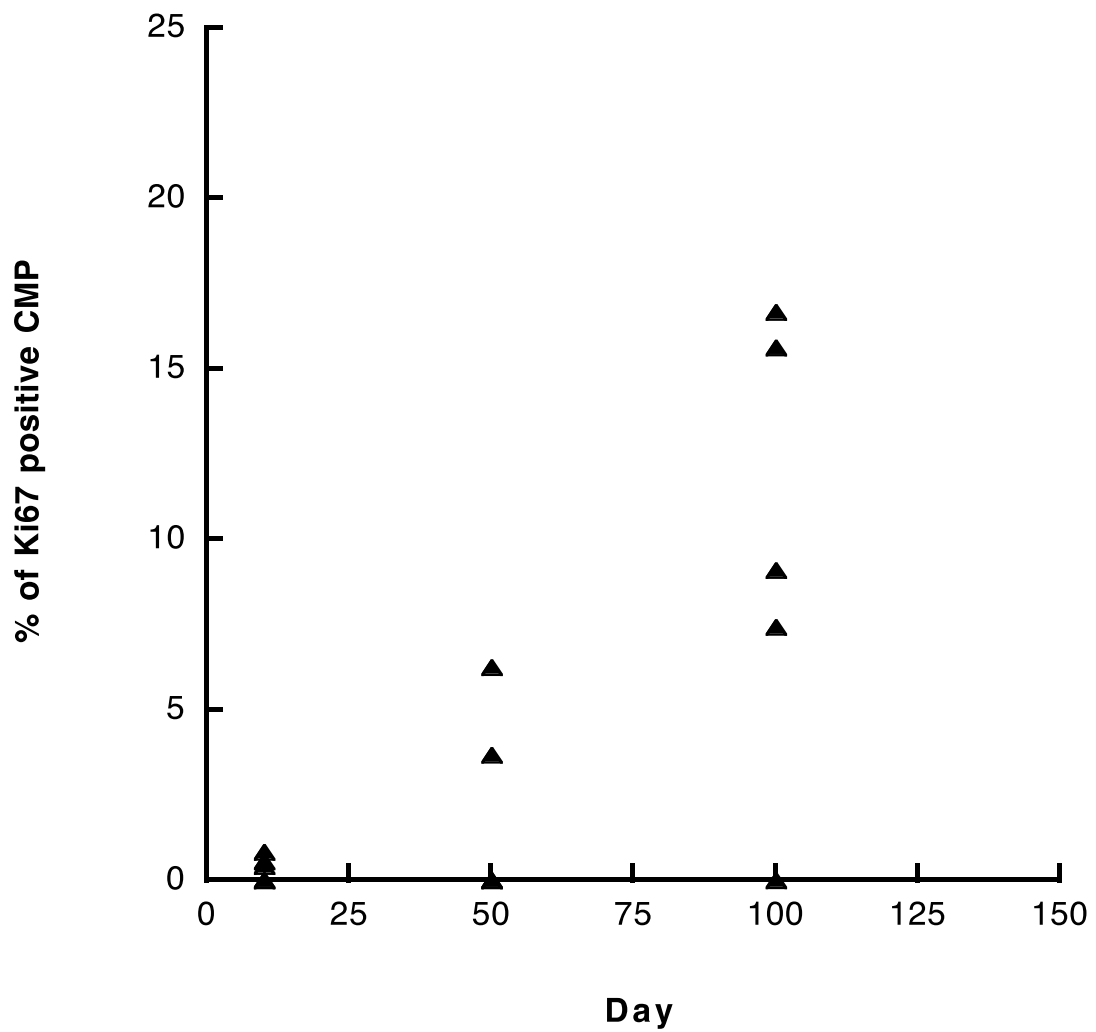


図31. 20mGy/min群における **Ki67** 発現 **CMP** の割合の経時的変化

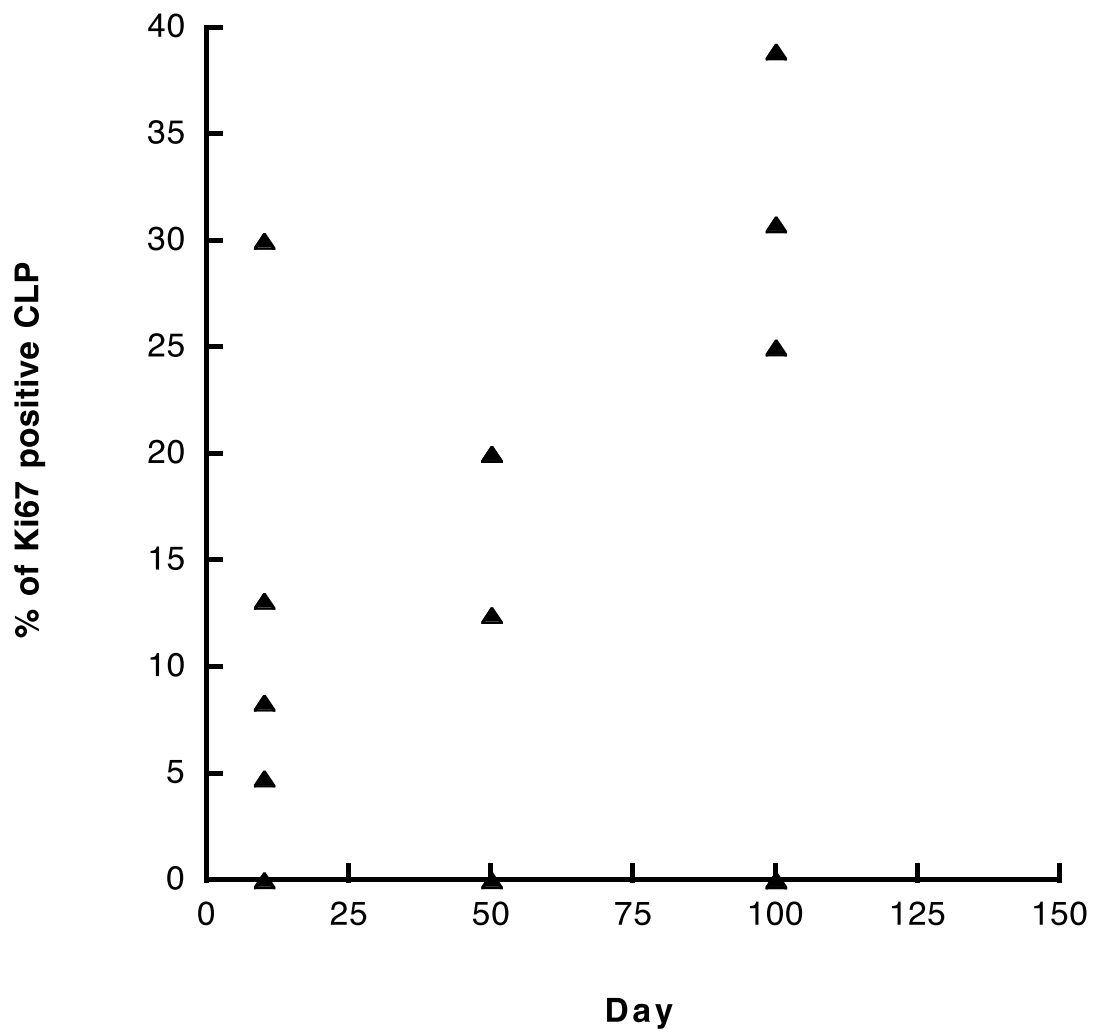


図32. 20mGy/min群における Ki67 発現 CLP の割合の経時的変化

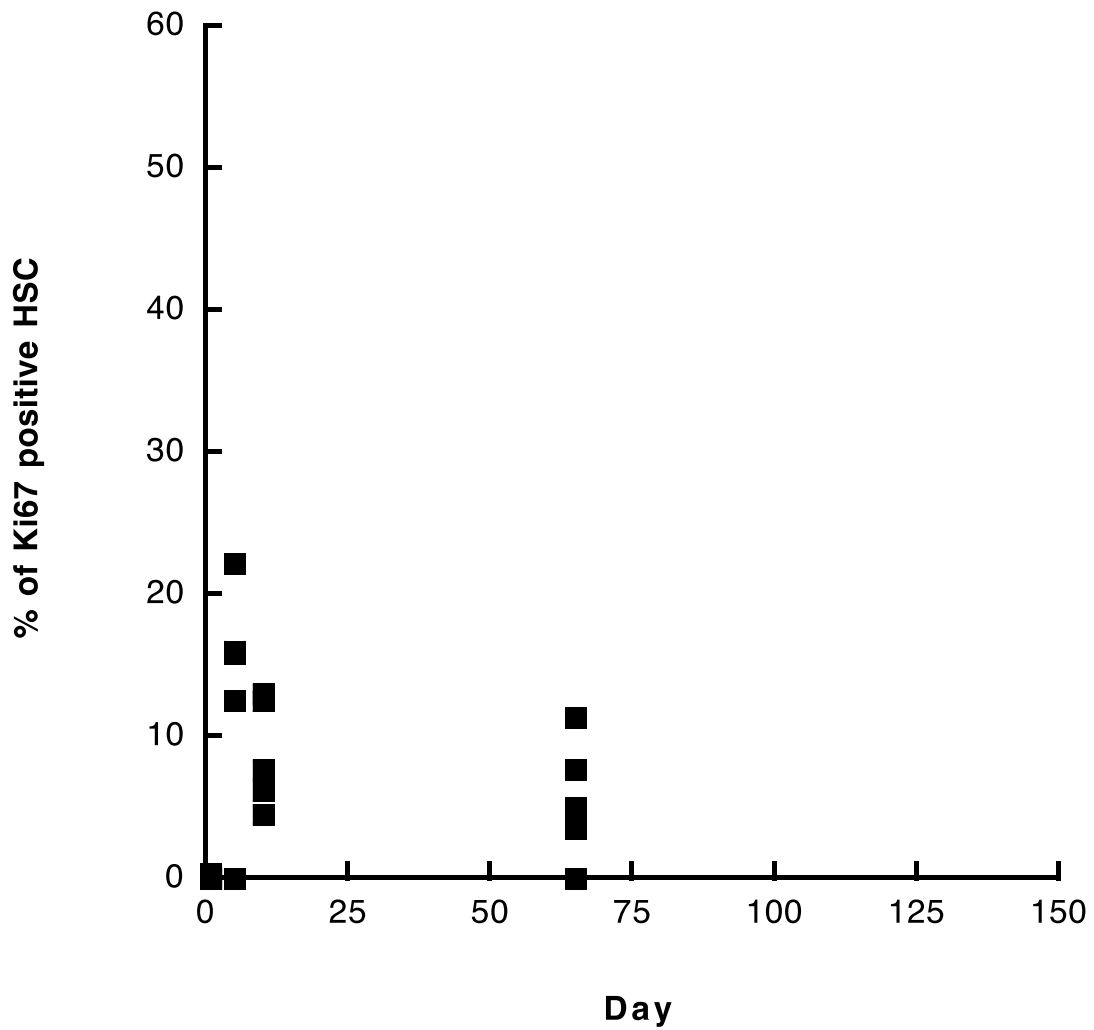


図33. 200mGy/min群における Ki67 発現 HSC の割合の経時的変化

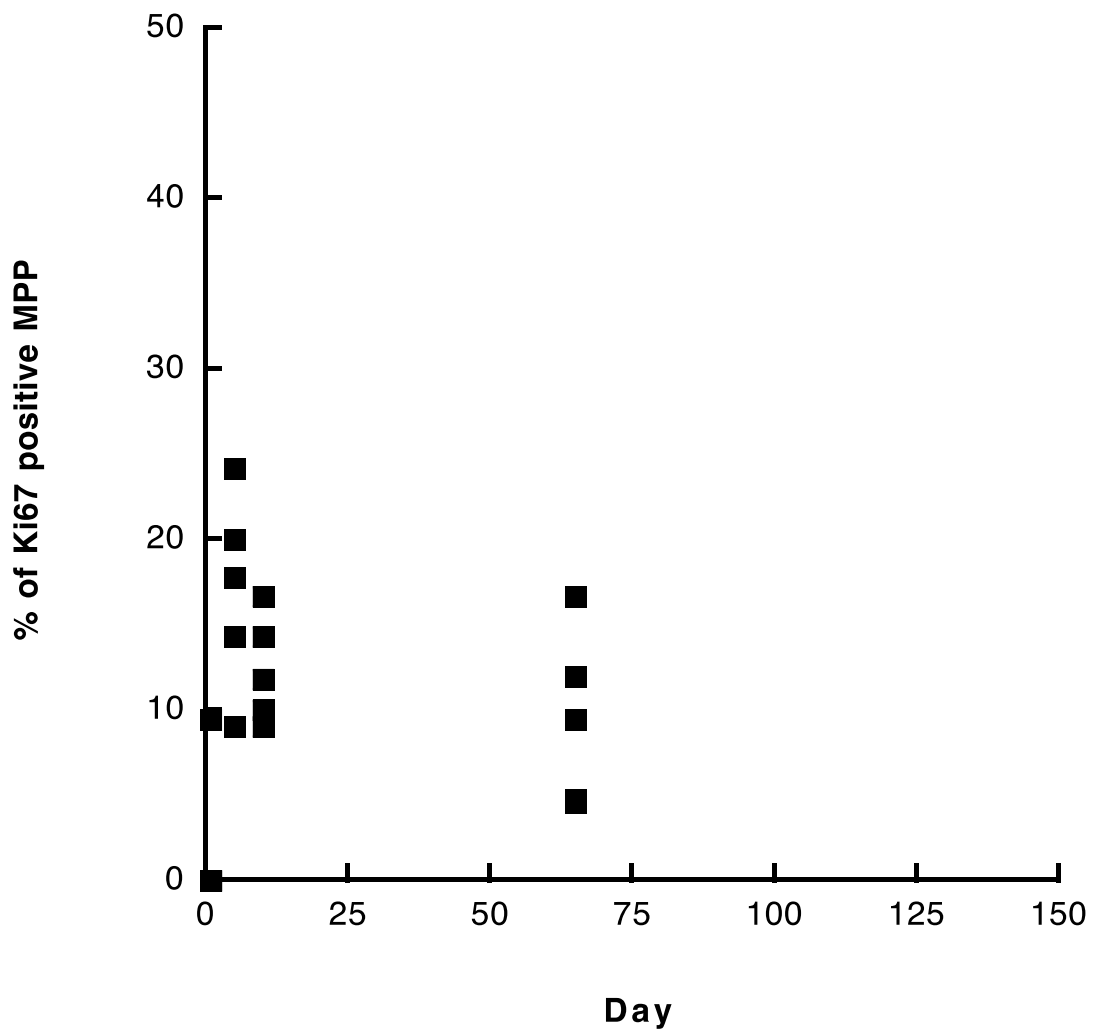


図34. 200mGy/min群における Ki67 発現 MPP の割合の経時的変化

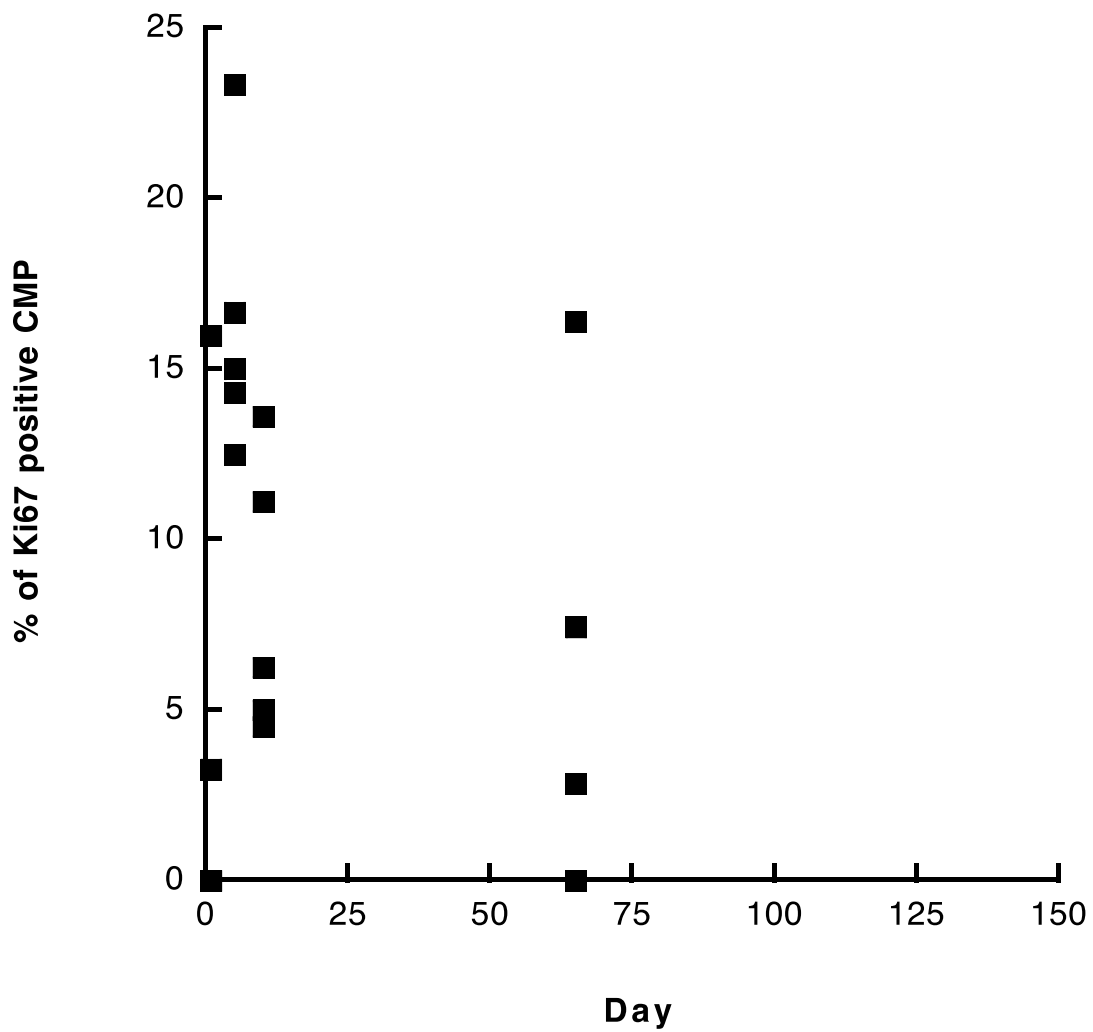


図35. 200mGy/min群における Ki67 発現 CMP の割合の経時的変化

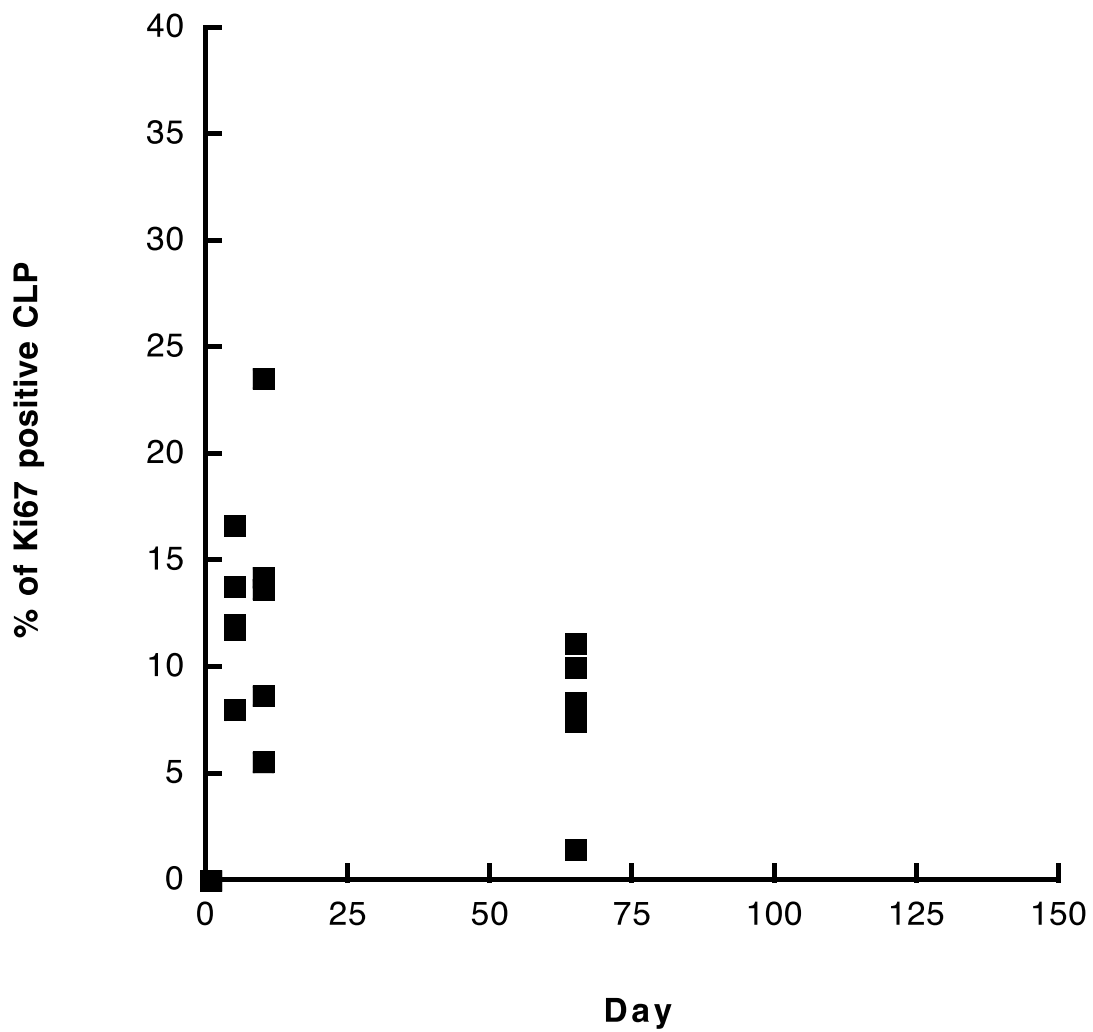


図36. 200mGy/min群における Ki67 発現 CLP の割合の経時的変化



# **An emerging picture of radiation cancer risk at low doses and dose rates brought by systematic review and experimental analysis on cell turnover**

Michiaki Kai<sup>\*1</sup>, Mitsuaki Ojima<sup>\*1</sup>, Junya Ishikawa<sup>\*1</sup>  
Tokuhisa Hirouch<sup>\*2</sup>,  
Nobuhiko Ban<sup>\*3</sup>, Shizue Izumi<sup>\*4</sup>

<sup>\*1</sup> Oita University of Nursing and Health Sciences

<sup>\*2</sup> Institute for Environmental Sciences

<sup>\*3</sup> Tokyo Healthcare University

<sup>\*4</sup> Department of Computer Science and Intelligent Systems, Oita University

Keywords: radiation, cell turnover, aging, active oxygen, DNA damage, AML

## Abstract

This study conducts a systematic review on stem cell kinetics and the experiment in mice in order to analyze the role of cell turnover in the light of radiation-induced acute myeloid leukemia (rAML). The review indicates radiation can induce mutation-related phenomena such as ROS accumulation and aging through radiation-induced cell turnover. We examined the dose-rate response in hematopoietic stem cells (HSC) and progenitors of total-body irradiated C3H/He Njcl mice at 20 mGy/day, 200 mGy/day and 1000mGy/min. This experiment needs long follow-up observation until 250 days after irradiation and does not complete all observation data. Current data suggest that 20mGy/day gave no significant effects until 150 days while 200 mGy/day increased the number of HSC and progenitors one day after irradiation and shortly recovered to normal. The positive expression of Ki67 in HSC increased with time in both 20 mGy/day and 200 mGy/day. To clarify the dose rate effect of the cell turnover, these data need to be analyzed by the model as a function of time and dose rate. The dynamics of hematopoietic stem cells can be controlled by proliferation and differentiation of blood cells. The preliminary simulation was conducted using a mathematical model of hematopoiesis developed by Colijn and Mackey. The model analysis of our experimental data will produce a consistent sight into the radiation dose-rate effects of stem cell turnover that would lead radiation leukaemogenesis.

## 放射線の非がん影響の解明

## 放射線による循環器障害に関する分子機構の解明

近藤 隆（富山大学大学院医学薬学研究部・放射線基礎医学講座・教授）

柏倉 幾郎（弘前大学大学院保健学研究科・放射線生命科学・教授）

稲波 修（北海道大学大学院獣医学研究科・放射線生物学・教授）

## 研究要旨

放射線による発がん影響に関する研究は歴史も古く、研究情報の集積も膨大で、被ばくにおける発がんリスクも周知されている。一方、放射線による非がん影響の研究は著しく遅れており、その分子機構の解明については殆ど進んでいない。このため、本研究では非がん影響の分子機構を解明することを目的とし昨年引き続き研究を実施した。主な研究対象は骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響とし、富山大学と分担課題を「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索」として弘前大学が担当した。また、これらの影響のメカニズム解析の一環として、放射線による細胞内酸化ストレスの増加に着目し、分担課題を「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割」として北海道大学が担当した。その結果、以下に示す新たな知見が得られた。

- 1) ヒト臍帯血静脈内皮細胞に対する放射線照射後の NO 産生の機構を検討したところ PKC- $\beta$ II の発現増加を介して、eNOS が活性化し、NO 産生に至る過程が明らかとなった。
- 2) 腫瘍形成に関与するがん関連転写因子の一つである c-Myc の発現は、低線量から高線量曝露マウス骨髄細胞のいずれにおいても 72 時間まで直線的に増加し、c-Myc が造血機能における有意な指標となり得る可能性が示された。
- 3) 放射線照射によりミトコンドリアの形態異常の誘発とこれに由来する活性酸素種(ROS)の生成およびミトコンドリア量の増加が判明し、この形態異常の形成に Dynamin-related protein 1 (Drp1)の関与が明らかとなった。また、Drp1 を阻害すると分裂期崩壊による細胞死を抑制できることから、放射線によるミトコンドリア構造異常と分裂期崩壊による細胞死の関連が示された。一方、ROS 生成とミトコンドリア形態異常および分裂期崩壊との関連性はないと思われる。

今後は生体での現象の確認とその機構の解明および低線量での応答について、検討する予定である。

キーワード: ヒト臍帯血静脈内皮細胞、細胞応答、細胞内酸化ストレス、ミトコンドリア、炎症造血幹細胞、放射線感受性、CD34 陽性細胞、c-Myc、ミトコンドリア、活性酸素 (ROS)、Drp1、アポトーシス、ミトコンドリア形態異常、分裂期崩壊

## 研究協力者及び研究参加者の氏名(所属・役職)

服部裕一・富山大学大学院医学薬学研究部・教授

田渕圭章・富山大学生命科学先端研究センター・准教授

趙 慶利・富山大学大学院医学薬学研究部・助教

廣内篤久・環境科学技術研究所・主任研究員

真里谷 靖・弘前大学大学院保健学研究科・教授

門前 暁・弘前大学大学院保健学研究科・助教  
吉野浩教・弘前大学大学院保健学研究科・助教  
山盛 徹・北海道大学大学院獣医学研究科・准教授  
安井博宣・北海道大学大学院獣医学研究科・助教

## I 研究目的

最近、放射線による非がん影響についても国民の関心が高まっており、この未解明な領域で、細胞および生体応答の機構を分子レベルで解明し、また、線量応答を明らかにすることは、極めて重要と思われる。放射線による発がん影響に関する研究は歴史も古く、発せられた研究情報の集積も膨大で、被ばくにおける発がんリスクも周知されている。一方、放射線による非がん影響の研究は著しく遅れており、特に分子機構の解明については殆ど進んでいない。このため、本研究では非がん影響の分子機構を解明することを目的とした。主な研究対象は骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響とし、弘前大学および富山大学が担当した。また、これらの影響のメカニズム解析の一環として、放射線による細胞内酸化ストレスの増加に着目し、放射線感受性とミトコンドリア機能との関連についての研究を北海道大学が担当した。

富山大学では、心・血管系への放射線影響について、その分子・細胞水準で機構解明を目的とした。主にヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用い、その放射線応答を明らかにするため、照射後の遺伝子発現変化を解析に続き、NO が関係する情報伝達機構について調べた。弘前大学では、造血幹細胞の放射線感受性に関与する遺伝子の網羅的解析を行い、放射線に対する個体差感受性との関わりや個々の感受性を規定する因子を解明し、最終的には放射線感受性の予測診断や新たな治療方法への応用へと繋げることを目的とした。放射線による細胞死は古くからゲノム DNA 障害が重要であると考えられてきたが、近年、ミトコンドリア機能修飾による活性酸素 (ROS) 生成が関与する酸化ストレスが重要であるとの報告がある<sup>1)</sup>。しかし、その詳細については未だ知られていない。北海道大学では放射線照射後、数時間後に遅れて ROS の生成が起きることを示し、この ROS の生成には細胞周期チェックポイントとミトコンドリアの融合・分裂周期との関連性を明らかにしている<sup>2)</sup>。これらに引き続き、照射された培養細胞やマウスでのミトコンドリアの代謝過程とそれともなう ROS 生成の機構、関連する細胞死のメカニズムを解明し、放射線による心臓血管障害や骨髄障害のメカニズムと防護法の開発に繋げることを目的とした。

## II 研究方法

材料として、主にヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を使用した。細胞死については、主にアポトーシスを指標に、常法に従って調べ、細胞内情報伝達については、Western Blot 法にて蛋白質およびリン酸化を調べ、解析した。eNOS の活性については、 $[^3\text{H}]\text{-L-arginine}$  から $[^3\text{H}]\text{-L-citrulline}$  への変換を放射活性を調べることで行った。

造血幹細胞の遺伝的特徴と放射線感受性との関連性については、1) 造血幹細胞の低線量および致死高線量での放射線感受性評価、2) 造血幹細胞の放射線応答分子の変動解析、3) DNA 損傷マーカーの解析、4) サイトカインの定量、5) 造血幹細胞の酸化ストレス応答システムの解析、6) 放射線応答遺伝子解析と遺伝子相互のネットワーク解析ヒト造血幹細胞の放射線応答遺伝子の解析

について、下記の実験方法にて検討し、解析した。

1. ヒト CD34 陽性細胞の分離精製: 国立病院機構弘前病院もしくは弘前大学医学部附属病院より供与

されたヒト臍帯血から、比重遠心法で有核細胞を分離し、磁気ビーズ法(EasySep®)により CD34 陽性細胞を精製する。これらの研究は弘前大学倫理委員会の承認を得た。

2. マウスは 8 週齢, 雌 C57BL/6Jcl マウスを用いた。
3. 表面抗原解析:細胞は各種モノクローナル抗体によって 4°C 遮光下で 30 分間染色後、洗浄し、各細胞について、それぞれの表面抗原の発現率をフローサイトメーター (EPICS® XL, BeckmanCoulter Inc, Orange County, CA, USA) で測定した。それぞれの実験は、アイソタイプ抗体を陰性コントロールとする。
4. 放射線感受性に関与する因子の探索:細胞周期、表面抗原発現、活性酸素量解析、末梢血抗酸化度 (Biological Antioxidant Potential, BAP) テスト及び酸化度解析 (Reactive Oxygen Metabolites, d-ROMs) テスト、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析、 $\gamma$ -H2AX 発現による DNA2 本鎖切断の検出等について評価解析した。
5. 遺伝子発現解析:遺伝子発現レベルの評価は、放射線を照射した CD34 陽性細胞をサイトカイン含有もしくは非含有無血清培地で液体培養後、一定時間経過後 total RNA を抽出し、定量 RT-PCR をインターカーション法で行なった。遺伝子の網羅的解析にはマイクロアレイ法を用いた。

ミトコンドリアに関する研究にはマウス胚線維芽細胞株 NIH3T3 細胞および Drp1 遺伝子欠損マウス胚線維芽細胞 (KO MEF) および対照となるマウス胚線維芽細胞 (WT MEF) (九州大学大学院の野村政壽講師より供与) を使用した。細胞内ミトコンドリア形態の観察に際しては、MitoTracker™ Green FM で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察および記録を行った。また、ミトコンドリア膜量、同由来 ROS 量および膜電位を測定するために、フローサイトメーターを用いて解析した。その他、放射線照射後の分裂期崩壊についても評価した。

#### 倫理面への配慮

当該研究遂行にあたり、研究内容が培養細胞を用いた実験であるものについては、倫理面の問題がないと判断した。弘前大学の研究に関しては医学研究科倫理委員会に対し、【申請実験・研究課題名】「臍帯血由来造血幹細胞の分化・増殖ならびに制御因子に関する研究」でヒト細胞の使用に関し申請を行い、既に承認を得ている。動物実験については、各大学の実験動物倫理委員会の規定に基づき実施した。

### III 研究結果

血管内皮細胞は放射線感受性が比較的高いことが知られている。比較的高線量照射の場合には、照射後の経過とともに、機能的に障害に加え、内皮細胞の形態学変化が顕著に認められることを報告してきた<sup>3)</sup>。本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、放射線照射による内皮細胞において重要な生理学的役割を果たしている血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)のシグナリングの変化について検討した。X線照射(1-20 Gy)後、6 から 72 時間の観察期間で HUVEC の eNOS の発現量には変化がなかったが、セリン 1177 部位での eNOS リン酸化は増加しスレオニン 495 部位での eNOS 脱リン酸化が亢進した。結果的に [<sup>3</sup>H]-L-arginine から [<sup>3</sup>H]-L-citrulline への変換で調べた eNOS 活性は有意に亢進し、硝酸性窒素類(NO<sub>3</sub>)と亜硝酸窒素類(NO<sub>2</sub>)といった NO 代謝産物の増加が認められた。内皮細胞の eNOS の調節因子である Akt の活性化についてそのリン酸化で検討したが変わらなかったことから、X線照射による eNOS 活性化は、その上流にある Akt の変化によるものではない。放射線照射による HUVEC に存在する多くのプロテインキナー

ゼ C (PKC)サブタイプにはその発現量に変化を認めなかったが、PKC-βII のみがアップレギュレーションしていた。そこで、PKC-βII siRNA を作成し、HUVEC に導入して、PKC-βII の発現を抑えると、放射線照射で認められたセリン 1177 部位での eNOS リン酸化の増加、スレオニン 495 部位での eNOS 脱リン酸化、NO 代謝産物の増加は全て消失した。すなわち放射線照射は、急性期の作用として、血管内皮細胞の eNOS を PKC-βII の発現増加を介して活性化し、NO を産生して血管拡張性に働くものと考えられる。以上の結果は放射線の急性反応(>1 Gy)として NO の増加機構の一端を明らかにしたものである。

弘前大学担当の結果として、以下の点が示された。

- 1) 0.5, 2, 7 Gy 放射線曝露 6, 24, 72 時間後のマウス個体における骨髄細胞数は、線量及び時間依存的に減少した。一方、骨髄細胞に含まれる肥満細胞数は、0.5 及び 2 Gy 照射後の経過に伴い増加傾向が示された。
- 2) 各処理個体末梢血中の酸化度の指標である d-ROMs 値は、0.5 及び 2 Gy 照射後 24 時間でピークとなった。骨髄細胞中のγ-H2AX 発現は、線量依存的に増加し、6 時間で最大値を示した。
- 3) 昨年度ヒト造血幹細胞の放射線曝露において有意な変動を示した c-Myc 発現は、マウスにおいても線量及び時間依存的に増加し、有意な指標となり得る可能性が示唆された。  
が明らかになった。

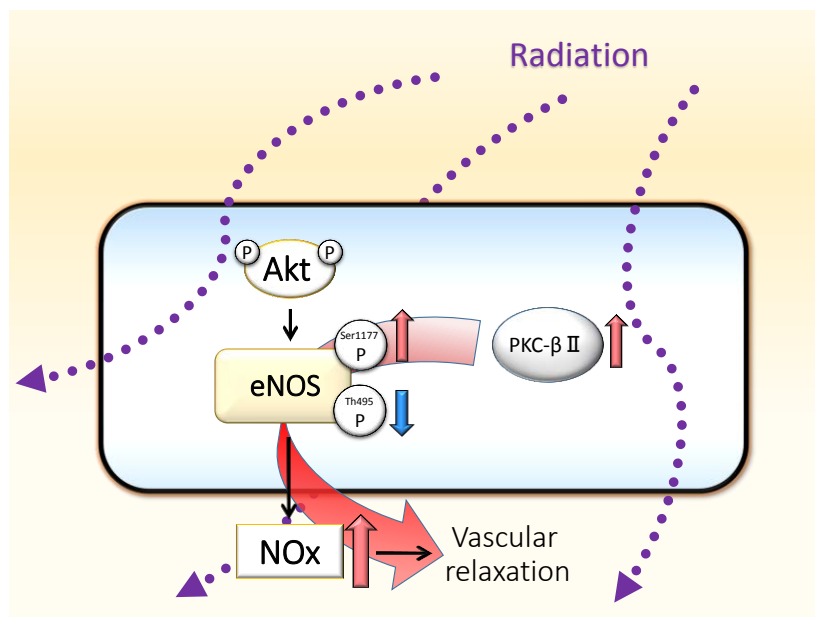
北海道大学担当の結果として、以下の点が示された。

- 1) 10Gy を照射した NIH3T3 細胞において 24 時間後にミトコンドリア膜量が増加するとともに、断片化や環状構造ミトコンドリアの出現が増大した。また、ミトコンドリア分裂の制御に関与する Drp1 のリン酸化が 24 時間後に亢進した。また、特異的阻害剤 mdivi-1 で阻害されたことから、この Drp1 活性化がミトコンドリアの断片化を促進していることが示された。
- 2) Drp1 遺伝子欠損マウス由来の線維芽細胞を用いた場合、X 線照射後のミトコンドリアの断片化誘導は Drp1 野生型を持つ線維芽細胞と比較して有意に小さいものであった。
- 3) NIH3T3 細胞において Drp1 特異的阻害剤 mdivi-1 で処置すると、X 線照射後の分裂期崩壊の出現を抑制した。また、Drp1 遺伝子欠損マウス由来の線維芽細胞を用いたところ Drp1 野生型を持つ線維芽細胞と比較して放射線による分裂期崩壊の出現は抑制した。
- 4) X 線照射による分裂期崩壊は、N アセチルシステインで前処理しておいても生成量に変化はなく、ミトコンドリア由来の活性酸素については放射線による分裂期崩壊との関連性は小さいことが示された。
- 5) 予備実験において、全身照射マウスの脾臓を単離し、脾臓細胞の ROS 生成とミトコンドリア膜量を評価した。その結果、0.1 ~1.0 Gy ではミトコンドリア ROS 生成は認められなかったが、3.0 Gy で有意な増加が観察された。

#### IV 考察

HUVEC に対する放射線照射後の NO 産生の機構を検討したところ PKC-βII の発現増加を介して、eNOS が活性化し、NO 産生に至るシグナル伝達機構の一端が明らかとなった。その機序については下に示す図 1 にまとめた。今後、1 Gy 以下の低線量も含めた線量依存性についても検討する予定である。

図1. HUVEC における放射線照射後の NO 産生の機構



弘前大学における知見からは、腫瘍形成に関与するがん関連転写因子の一つである *c-Myc* の発現は、低線量から高線量のいずれにおいても 72 時間まで直線的に増加し、*c-Myc* が造血機能の放射線感受性における有意な指標となり得る可能性が示された。

北海道大学における知見からは、培養系では放射線照射によるミトコンドリア断片化・環状化が Drp1 を介して起きること、さらにはこれが、放射線で生じる分裂期崩壊 (mitotic catastrophe) の引き金となる事が明らかとなった。この放射線による Drp1 活性化に至るシグナル伝達経路をめぐりメカニズムや低線量での Drp1 活性化やミトコンドリア形態異常の評価については今後の検討課題である。以前、アポトーシス<sup>4)</sup> やそのシグナルであるチトクローム C のミトコンドリアからの放出<sup>5)</sup> には放射線によるミトコンドリア由来 ROS の関与を示したが、分裂期崩壊には ROS の関与はないものと思われる。また、マウス全身照射でも脾臓のリンパ球において ROS の上昇とミトコンドリア膜の増加が観察されたが、1 Gy 以下の線量では有意な増加は観察されず、機構解明を含めて、継続的に検討する予定である。

## V 結論

本研究では放射線の非がん影響の分子機構を解明することを目的とし、三大学共同研究を行い骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響および、これらの影響のメカニズム解析の一環として、放射線による細胞内酸化ストレスの増加に着目し、放射線感受性とミトコンドリア機能との関連について研究を実施した。その結果、

- 1) HUVEC に対する放射線照射後の NO 産生の機構を検討したところ PKC-βII の発現増加を介して、eNOS が活性化し、NO 産生に至る過程が明らかとなった。
- 2) 今後は、*c-Myc* が関与する遺伝子が関わる遺伝子発現を中心に解析し、得られた知見をもとに、造血幹細胞発現抗原、遺伝子と放射線感受性との関連性解明、siRNA による個体の放射線感受性制御、最終的には、放射線感受性の予測診断法へ繋げる。
- 3) 本研究において線維芽細胞での培養系では放射線照射によるミトコンドリア断片化・環状化が起きており、Drp1 の活性化が関係することが明らかとなった。また、このミトコンドリア

の形態異常が、放射線誘発分裂期崩壊 (mitotic catastrophe) の引き金となっている事が明らかとなった。一方、放射線によるミトコンドリアの ROS 生成の上昇はマウス全身照射後の脾臓リンパ球でも確認され、0.1 Gy~1Gy 以下の低線量では見られず、3 Gy 以上を必要とした。

以上のことが明らかとなった。これらの研究成果を基盤として、より低線量 (率) および生体での応答の解明に繋げ、放射線の非がん影響を明らかにする一助としたいと考えている。

## VI 次年度以降の計画

本研究では非がん影響、骨髄・造血系への影響と心・血管系への影響の分子機構について低線量での応答を細胞に加えて生体レベルでも解明することを目的とする。即ち、低線量 (<0.2 Gy)、中線量(0.2~1.0 Gy)、高線量(1 Gy 以上)応答を、細胞および実験動物水準で調べ、遺伝子応答と病態を明らかにし、その分子機構を解明する。

富山大学では、静脈・冠動脈の血管内皮細胞を対象に放射線による細胞損傷を検討するとともに、遺伝子応答を網羅的に解析する。動物実験では、動脈硬化のモデルマウスを用いて、放射線による循環器・血管系の炎症に注目して解析し、病態を把握するとともに、免疫組織学的にその解析を行う。

細胞内での活性酸素種 (ROS) の生成は放射線影響を考える上で、普遍的な重要課題であるが、照射による直接生成よりも照射後の細胞内代謝修飾により生成する ROS が、その後の病態形成に関係することが知られている。ミトコンドリアは ROS 生成に係る主要小器官であり、放射線照射後の機能解析を行うことで、血管系および骨髄系細胞での細胞内酸化ストレス増加の機構解明に寄与するとともに、慢性炎症成因の解明の一助となる。次年度以降は今までに得られた知見をもとに、三大学の連携をより密なものとして、細胞および動物実験を進めるとともに、低線量率、長時間照射後の応答の研究へと展開する。

弘前大学では、特に、低線量 (< 0.2) から高線量 (> 1.0) にわたる造血幹細胞の放射線応答機構を *in vitro* および *in vivo* で引き続き評価すると共に、応答に関わる遺伝子とその相互関係を解明する。造血幹細胞は、全ての血球を生み出す能力を有する増殖能の高い細胞故に放射線の標的細胞の1つであるが、生体内に極めて少数しか存在しないため、その放射線感受性や応答機構の解明は十分とは言えず、特にヒト造血幹細胞では不明な点が多い。しかしながらこれら応答機構の解明は、事故や医療での放射線被ばくに伴う骨髄死や晩発影響等を考えるうえで極めて重要な課題である。本研究では、ヒトおよびマウスの造血幹細胞を用い、低線量および致死高線量での放射線感受性評価、放射線応答分子の変動、DNA 損傷修復や酸化ストレス応答システムの評価、放射線応答遺伝子と遺伝子相互のネットワーク解析を行う。本研究成果は、放射線感受性なハイリスク個体の識別、新たな放射線防護剤開発や放射線による診断・治療分野への応用展開が期待される。

次年度は、培養系の実験では低線量 (<0.2 Gy) から中線量 (0.2 Gy-1 Gy) についても放射線によるミトコンドリア形態異常、ROS の産生と分裂期崩壊による細胞死との関連性を明らかにすると同時に、ミトコンドリアの形態異常に関与する Drp1 の活性化機構、関わってくるキナーゼを中心とするシグナル伝達経路についても明らかにする予定である。今回、マウスの全身照射の系でミトコンドリアの ROS の上昇が見られたが、今後、この ROS がアポトーシス誘導に関与するか否か、ミトコンドリアの形態異常が関連しているかどうかについて明らかにする。もし、細胞死に ROS が関与する場合には、照射後のミトコンドリア由来の ROS 生成を阻害することで細胞死を抑制できるか否か、更には個体の死を抑制することが出来るか否かについても評価する予定である。本研究を通じて、低線量から高線量に至る照射による細胞のミトコンドリア形態、ミトコン

ドリア代謝ならびにミトコンドリア由来 ROS 等に起因とする細胞死のメカニズムを明らかにすると同時に放射線防護剤等の開発に繋げたいと考えている。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 雑誌

- 1) Jawaid P Rehman MU Yoshihisa Y Li P Zhao QL Hassan MA Miyamoto Y Shimizu T Kondo T: Effects of SOD/ catalase mimetic platinum nanoparticles on radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* 2014; in press.
- 2) Yasui H Takeuchi R Nagane M Meike S Nakamura Y Yamamori T Ikenaka Y Kon Y Murotani H Oishi M Nagasaki Y Inanami O. Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 2014; in press.
- 3) Nishida N Yasui H Nagane M Yamamori T Inanami O. 3-Methyl pyruvate enhances radiosensitivity through increasing mitochondria-derived reactive oxygen species in tumor cell lines. *J Radiat Res.* 2014 in press.
- 4) Goodwin J, Yachi K, Nagane M, Yasui H, Miyake Y, Inanami O, Bobko AA, Khramtsov VV, Hirata H. In vivo tumour extracellular pH monitoring using electron paramagnetic resonance: the effect of X-ray irradiation. *NMR Biomed.* 2014;27:453-458.
- 5) Kondo T. Radiation-induced cell death and its mechanism. *Radiation Emergency Medicine* 2013; 2: 1-4.
- 6) Tabuchi Y Furusawa Y Kariya A Wada S Ohtsuka K and Kondo T. Common gene expression patterns responsive to mild temperature hyperthermia in normal human fibroblastic cells. *Int J Hyperthermia* 2013;29: 38-50.
- 7) Okazawa S Furusawa Y Kariya A Hassan MA Arai M Hayashi R Tabuchi Y Kondo T Tobe K. Inactivation of DNA-dependent protein kinase promotes heat-induced apoptosis independently of heat-shock protein induction in human cancer cell lines. *PLoS One* 2013; 8(3):e58325.
- 8) Yunoki T Kariya A Kondo T Hayashi A Tabuchi Y. The combination of silencing BAG3 and inhibition of the JNK pathway enhances hyperthermia sensitivity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett* 2013; 335: 52-57.
- 9) Morii A Ogawa R Watanabe A Cui Z-G Takasaki I Doi T Kondo T Fuse H. Utilization of microRNAs whose expression levels decrease in response to X-ray irradiation for fine-tuning radiation-controlled gene regulation. *Int J Mol Med* 2013; 32: 9-16.
- 10) Kariya A Tabuchi Y Yunoki T and Kondo T. Identification of common gene networks responsive to mild hyperthermia in human cancer cells. *Int J Mol Med* 2013; 32: 195-202.
- 11) Tabuchi Y Sugahara Y Ikegami M Suzuki N Kitamura K Kondo T. Genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound in MC3T3-E1 preosteoblast cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 22721-22740.
- 12) Piao JL Cui ZG Furusawa Y Ahmed K Tabuchi Y Rehman MU Kadowaki M Kondo T: The molecular mechanisms and gene expression profiling for Shikonin-induced apoptotic and necroptotic cell death in U937 cells. *Chemico-Biological Interaction* 2013; 205:119-127.
- 13) Yamamori T Meike S Nagane M Yasui H Inanami O. ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of



- Rad51. *FEBS Lett.* 2013;587:3348-3353.
- 14) Nagane M Yasui H Yamamori T Zhao S Kuge Y Tamaki N Kameya H Nakamura H Fujii H Inanami O. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;437:420-4425.
  - 15) Yasui H Asanuma T Kino J Yamamori T Meike S Nagane M Kubota N Kuwabara M Inanami O. The prospective application of a hypoxic radiosensitizer, doranidazole to rat intracranial glioblastoma with blood brain barrier disruption. *BMC Cancer.* 2013;13:106.
  - 16) Monzen S Takimura K Kashiwakura I Hosokawa Y. Acute promyelocytic leukemia mutated to radioresistance suppressed monocyte lineage differentiation by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Leuk Res,* 2013; 37: 1162–1169.
  - 17) Yamaguchi M Ebina S Kashiwakura I. Proliferation and differentiation of human hematopoietic stem/progenitor cells exposed to low-dose irradiation. *Radiat Emerg Med,* 2013; 2: 56–62.
  - 18) Monzen S Yoshino H Kashiwakura I. Radiosensitivity of myeloid progenitor cells against X-irradiation and heavy ion beam. *PLoS One* 2013; 8: e59385.
  - 19) Yoshino H Kiminarita K Matsushita Y Kashiwakura I. Mitochondrial superoxide production and redox status in human monocytic cells after ionizing irradiation. *Radiat Emerg Med* 2013; 2: 43–48.
  - 20) Hirose K Sato H Monzen S Aoki M Hatayama Y Kawaguchi H Sato M 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* 2013; 54: 438–446.
  - 21) Hirose K Monzen S Yoshino H Hatayama Y Kawaguchi H Sato M Narita Y Takai Y Kashiwakura I. Different radiation responses on the maturation of megakaryocytopoiesis. *J Radiat Res* 2013; 54:447–452.
  - 22) Monzen S Yoshino Y Kashiwakura I. Radiosensitivity of myeloid progenitor cells against X-irradiation and heavy ion beam. *PLoS One,* 2013; 8: e70503.
  - 23) Hosoki A Yonekura SI Zhao, QL Wei, ZL Takasaki I Tabuchi Y Wang LL Hasuike S Nomura T Tachibana A Hashiguchi K Yonei S Kondo T Zhang-Akiyama QM. Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells, *J Radiat Res* 2012; 53: 58-71.
  - 24) Yu DY Zhao QL Furuta M Todoroki S Izumi K Yamakage K Matsumoto K Nomura T Kondo T. Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dodecylcyclobutane, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphomaU937 cells. *Apoptosis* 2012;17: 636-645.
  - 25) Furusawa Y Wei ZL Sakurai H Tabuchi Y Li P Zhao QL Nomura T Saiki I Kondo T. TGF-beta-activated kinase 1 promotes cell cycle arrest and cell survival of X-ray-irradiated HeLa cells dependent on p21 induction but independent of NF-kB, p38 MAPK and ERK phosphorylations, *Radiat Res* 2012;177: 766-774.
  - 26) Morii A Ogawa R Watanabe A Kakutani S Zhao QL Kume K Kondo T Fuse H. Regulation of gene expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation, *Gene Ther* 2012; 19:219-227.
  - 27) Eitaki M Yamamori T Meike S Yasui H Inanami O. Vincristine enhances amoeboid-like motility via

- GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells. *BMC Cancer*. 2012 12:469.
- 28) Yamamori T Yasui H Yamazumi M Wada Y Nakamura Y Nakamura H Inanami O. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* 2012;53:260-270.
- 29) Indo HP Inanami O Koumura T Suenaga S Yen HC Kakinuma S Matsumoto K Nakanishi I St Clair W St Clair DK Matsui H Cornette R Gusev O Okuda T Nakagawa Y Ozawa T Majima HJ. Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic Res* 2012; 46:1029-1043.
- イ) 著書
- 1) Kondo T. The mechanism of radiation induced cell death and its application for cancer therapy. Chapter 1 “Cellular Response to Physical Stress and Therapeutic Applications” edited by Shimizu T and Kondo T. Nova Science Publishers, Inc, 2013;1-14.

#### 引用文献

- 1) Solaini G, Sgarbi G and Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cells *Biophys. Biochem. Acta - Bioenergetics* 2011;1807: 534-542.
- 2) Yamamori T Yasui H Yamazumi M Wada Y Nakamura Y Nakamura H Inanami O. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* 2012;53:260-270
- 3) Zhang XH Matsuda N Jesmin S Sakuraya F Gando S Kenmotsu O Hattori Y. Normalization by edaravone, a free radical scavenger of irradiation-induced endothelial nitric oxide synthase expression. *Eur J Pharmacol* 2003; 476:131-137.
- 4) Takahashi K Inanami O Hayashi M Kuwabara M. Protein synthesis-dependent apoptotic signalling pathway in X-irradiated MOLT-4 human leukaemia cell line. *Int J Radiat Biol*. 2002;78:115-24.
- 5) Ogura A Oowada S Kon Y Hirayama A Yasui H Meike S Kobayashi S Kuwabara M Inanami O. Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett*. 2009;277:64-71.

# Elucidation of the mechanisms of radiation-induced non-cancerous effects -Molecular mechanisms of radiation-induced cardiovascular diseases-

Takashi Kondo<sup>\*1</sup>, Qing-Li Zhao<sup>\*1</sup>, Yuichi Hattori<sup>\*2</sup>, and Yoshiaki Tabuchi<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup>*Department of Radiological Sciences, <sup>\*2</sup>Department of Molecular and Medical Pharmacology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama*

<sup>\*3</sup>*Life Science Research Center, University of Toyama*

**Keywords:** Human umbilical endothelial cells; eNOS; Signal transduction

## **Abstract**

Cardiovascular diseases have been considered as major health-risk factors after exposure to ionizing radiation as in A-bomb survivors. Recently, the association of radiation dose with cardiovascular diseases mortality was investigated in a life span study of a cohort of 86,000 A-bomb survivors with estimated doses. Although chronically produced reactive oxygen species and inflammation are thought to be the pathogenic mediators of atherosclerosis, the exact mechanism is still unclear. Here, for better understanding of the molecular mechanisms underlying the inflammatory reaction frequently encountered in the vascular system post exposure to ionizing radiation, we carried out analytical test on eNOS and its signal transduction pathways in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). At 6-72 h after exposure to X-rays (1-20 Gy), eNOS phosphorylation at Ser1177 was increased while eNOS phosphorylation at Thr495 was decreased without any change in total eNOS expression. Consequently, eNOS activity, as assessed by the extent of change from [<sup>3</sup>H]-L-arginine to [<sup>3</sup>H]-L-citrulline, was significantly increased, and NOx levels (nitrite and nitrate) in culture medium were elevated. The phosphorylation level of Akt, an upstream enzyme of eNOS, was unchanged by irradiation, suggesting that radiation can activate eNOS independently of its upstream activator Akt. Our results also showed that the protein kinase C (PKC)-βII expression was up-regulated after X-irradiation. The transfection of PKC-βII siRNA into cells abrogated radiation-induced eNOS dephosphorylation and NOx elevation in HUVECs. We thus conclude that ionizing radiation produces acute effects on eNOS activation through increased expression of PKC-βII in HUVEC. This may partly account for the molecular mechanism of radiation-associated cardiovascular diseases.

# Search for genes involved in radiosensitivity of hematopoietic stem cells

Ikuo Kashiwakura<sup>\*1</sup>, Tokuhisa Hirouchi<sup>\*2</sup>, Yasushi Mariya<sup>\*1</sup>, Satoru Monzen<sup>\*1</sup>, Hironori Yoshino<sup>\*1</sup>,  
Masaru Yamaguchi<sup>\*1</sup> and Takakiyo Tsujiguchi<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> *Graduate School of Health Sciences, Hirosaki University*

<sup>\*2</sup> *Department of Radiobiology, Institute for Environmental Sciences*

*Keywords* : Hematopoietic stem cells; Radiosensitivity;

## **Abstract**

To clarify the characters of genes contributing radiosensitivities of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), the present study analyzed gene expression profiles of bone marrow cells prepared from mice exposed to 0.5, 2 and 7 Gy X-irradiation. In the present study, female C57BL/6J mice at 8 weeks of age were exposed to X-irradiation at a dose rate of 0.9 Gy/min. The expressions of *c-Myc* were analyzed at 24, 48 and 72 h after irradiation. At the same time, the level of biological antioxidant potential and reactive oxygen metabolites (d-ROMs) detected in peripheral blood and  $\gamma$ -H2AX observed in bone marrow cells were also analyzed. The number of bone marrow cells of all irradiated groups decreased in a radiation dose- and a time-dependent manner. The level of d-ROMs, one of an index of oxidation degree, showed a peak at 24 h after 0.5 and 2 Gy X-irradiation. In addition, the expression of  $\gamma$ -H2AX increased in a radiation dose-dependent manner and reached a peak at 6 h. Regarding the expression of *c-Myc*, its expression detected in bone marrow cells was also increased in a radiation dose- and a time-dependent manner. In conclusion, the present findings show the possibility that *MYC* is a useful indicator to consider about the radiosensitivity of hematopoiesis in individual, suggesting that *MYC* play a key role in radiosensitivity of HSPCs. However, more precise approaches will be required. Finally, we would like to establish the presumptive diagnosis method for individual radiosensitivity.

# Radiation-induced modification of mitochondrial function and radiosensitivity

Osamu Inanami, Hironobu Yasui, and Tohru Yamamori

*Laboratory of Radiation Biology, Department of Environmental Veterinary Sciences,  
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University*

*Key Words:* Mitochondria, Reactive oxygen species (ROS), Apoptosis, Mitochondrial morphological alteration, Mitotic catastrophe, Drp1

## Abstract

Ionizing radiation induces DNA damage and triggers various responses in cells. Mitochondria have been demonstrated to play important roles in the cellular radioresponses through various mechanisms including the production of reactive oxygen species (ROS) and the activation of apoptosis signaling. It has been reported that mitochondria are dynamic organelles that constantly fuse and divide, and the control of fusion and fission is important for the maintenance of cellular homeostasis. Recent evidence suggests that dynamin-related protein 1 (Drp1), which is a mitochondrial fission protein, is involved in multiple cellular functions such as ROS production and the execution of apoptosis. Although several reports have shown the mitochondrial morphological changes after exposure to ionizing radiation, it has not been fully elucidated whether mitochondrial dynamics plays a role in cellular radioresponses such as alterations in mitochondrial function, cell cycle arrest and radiation-induced cell death. Therefore, this study was aimed to determine this point. When the effect of X-irradiation on mitochondrial morphology was evaluated in NIH3T3 cells and in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from either wild-type or Drp1-deficient mice, mitochondrial fragmentation was induced in NIH3T3 cells and in Drp1 wild-type MEFs after X-irradiation. This radiation-induced mitochondrial fragmentation was suppressed by the Drp1 inhibitor mdivi-1 and the genetic knockout of Drp1. Furthermore, mitochondrial fragmentation was accompanied by the concomitant increase of Drp1 phosphorylation at Ser616, which is associated with its activation. Mdivi-1 treatment attenuated the increase of mitochondrial mass after irradiation, but mitochondria-derived ROS levels and mitochondrial membrane potential were not affected. On the other hand, none was altered by the deletion of Drp1. While radiation-induced G2/M arrest was upregulated by mdivi-1 treatment, genetic inhibition had no effect. Radiation-induced cell death by mitotic catastrophe was suppressed by both mdivi-1 and Drp1 gene deletion. These results suggest that X-irradiation induces mitochondrial fragmentation through Drp1 activation, and Drp1 is involved in radiation-induced mitotic catastrophe. In conclusion, the present study suggests that mitochondrial morphological change after ionizing radiation influences the determination of the cell fate after irradiation, providing new insights into the regulatory mechanism of cellular radioresponses.

研究課題名：低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の

## 放射線障害の蓄積に関する研究

研究項目名：低線量率・低線量被ばくによる組織 DNA 障害の蓄積解析

鈴木啓司（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻・准教授）

### 研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、低線量放射線、とりわけ 100mSv 以下の放射線被ばくによる健康影響が懸念されている。疫学調査結果等では、このような低線量放射線による健康影響については明確な答えを得る事は極めて困難であるため、放射線防護の立場から、直線しきい値なし（Linear Non-Threshold: LNT）モデルを採用しているが、このことが逆に、一般住民の健康不安を醸成する原因にもなっている。そこで、本研究課題では、低線量率・低線量被ばくモデル動物において、被ばくによって誘発される DNA 損傷および発がん変異の組織における蓄積と排除を、組織幹細胞に着目しながら解析することを計画した。具体的には、公益財団法人環境科学技術研究所（環境研）において低線量率・低線量放射線（0.05～20mGy/日）を照射したマウスにおいて、累積線量が 1～100mGy の間で、甲状腺や生殖組織を含む 11 種の代表組織を採取し、長崎大学において DNA 損傷分子プローブおよび幹細胞マーカーあるいは増殖マーカーとの蛍光免疫二重染色を検討した。

まず、低線量率・低線量放射線照射マウスにおける標本の採取については、0.05mGy/日、1 mGy/日、20 mGy/日の線量率で蓄積線量 1mGy あるいは 20mGy を照射をしたマウスより、甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化管、肝臓、肺、腎臓、膀胱および生殖腺を採取し、ホルマリン中で固定後にパラフィン包埋を行った。組織切片は、厚さを 4 ミクロンに固定して薄切し、スライドガラス上に固定した切片を脱パラフィン後、抗体賦活化処理を施して、抗 53BP1 および抗 Ki-67 抗体で蛍光免疫染色を行った。その結果、まず、組織を構成する全ての細胞で 53BP1 フォーカスが検出されるのではなく、特異的な領域の細胞でのみフォーカス形成が観察されることがわかった。また、組織毎に非照射マウスにおける 53BP1 フォーカス形成頻度（以降 BG と表記）が異なることも明らかにした。さらに、低線量率・低線量放射線照射マウスにおける検討から、0.05mGy/日の照射は、BG のレベルを超える DNA 損傷の蓄積を起こさないことも確認した。

今後、低線量率・低線量放射線照射したマウスから採取した臓器・組織における DNA 損傷動態の解析を完了して、低線量率・低線量被ばくマウスの組織幹細胞における DNA 損傷の蓄積と排除について科学的知見をまとめ、これらの研究成果により、福島での原子力被災者などの健康管理・健康不安対策に資する低線量率・低線量被ばくの影響解明をめざす。

キーワード：低線量、低線量率、100mGy、組織幹細胞、DNA 損傷

### I. 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、低線量放射線、とりわけ 100mSv 以下の放射線被ばくによる健康影響についての多くの議論が交わされている。しかしながら、広島・長崎の原爆被爆者の疫学調査結果等では、100 mGy よりも低い低線量放射線による

健康影響について明確な答えを得る事は極めて困難で、このため、放射線防護の立場から直線しきい値なし（Linear Non-Threshold: LNT）モデルが採用されているが、このことが逆に、一般住民の健康不安を醸成する原因にもなっている。福島復興再生に向けた住民（ひいては国民）の安心のためにも、100mGy を下回るような低線量域での被ばくの影響の機構論に依拠した解明が望まれている。加えて、現存被ばくの状態で行っている福島県民の安心・安全のための健康管理において、その科学的妥当性をより一層高めるためにも、年間 20mSv や生涯累積線量 100mSv 等の、長期低線量率・低線量慢性被ばくの影響の有無について、とりわけ発がんや継世代影響の標的となる組織幹細胞における放射線障害の蓄積の有無という観点から、科学的に実証された真実を得る事が求められている<sup>1)</sup>。そこで本研究では、低線量率・低線量被ばくモデル動物において、被ばくによって誘発される DNA 損傷および発がん変異の蓄積と排除を、放射線発がんの標的となる臓器・組織の幹細胞、あるいはそこから単離した幹細胞において解析することを目的とした。

## II. 研究方法

低線量率・低線量放射線の照射は、環境研の極低線量率・低線量放射線照射施設において行った<sup>2)</sup>。具体的には、長崎大学で購入した B6C3F1 マウス（1 グループ 6 匹）を環境研に搬入し、検疫の後に、0.05mGy/日、1mGy/日および 20mGy/日の条件で、累積線量が 1mGy あるいは 20mGy になるまで照射を継続した。コントロールとして非照射群を同期間飼育した。また、陽性コントロールとして、高線量率照射群（400mGy/日で累積線量が 100mGy および 400mGy）を同様の方法により照射した。1 日の照射時間は 22 時間に設定し、残りの 2 時間を動物飼育環境のメンテナンスにあてた。目的の累積線量に達したところで、甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化管、肝臓、肺、腎臓、膀胱、卵巣を採取し、フォルマリン中で固定後にパラフィン包埋した。その後、4 ミクロンの厚さで薄切標本を作成して、脱パラフィン処理後に、PBS 中に保存した。

標本は、賦活化液中で 95℃で 30 分処理して、抗原の賦活化を行った。その後、5%skim milk を含む TBS-T (0.5% Tween-20 を含む TBS 緩衝液) に一次抗体を希釈して、切片と 37℃で 2 時間反応させた。一次抗体としては、抗 53BP1 抗体 (Bethyl, A300-272) および抗 Ki-67 抗体 (DAKO, TEC-3) を用いた。反応終了後、PBS でよく洗浄して、二次抗体を 37℃で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa532 標識の抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa647 標識の抗ラット IgG 抗体を用いた。標本は、1 μg/ml の DAPI を含む 10%グリセリン PBS 溶液中で封入して保存した。

作成した標本は、蛍光顕微鏡下で観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システムにより最低でも 500 個（非照射群では DNA 損傷の頻度に応じて 1000 個程度まで）の細胞について解析を行い、53BP1 の斑点状のシグナル（フォーカス）の出現頻度を算出することにより DNA 損傷の蓄積および排除を評価した<sup>3)</sup>。

（倫理面への配慮）

本研究は、動物実験を行うにあたっては、国内の動物実験指針を遵守し、照射実験を行う環境科学技術研究所の動物実験委員会等の承認を受けた上で、同所の動物実験ガイドラインを遵守して実験を行った。

## III. 研究結果

### 1. 組織における DNA 損傷応答の評価

B6C3F1 マウスを 5~6 週齢で入手し、環境研の低線量照射棟に搬入した。1 ケージあたり 3 匹のマウスを入れて、検疫の後、8 週齢になったところで照射を開始した。0.05mGy/日、1 mGy/日、20 mGy/日の各線量率で照射を継続し、累積線量 1mGy あるいは 20mGy になったところで照射を終了し、非照射マウスと共にマウスを搬出して、環境研先端分子生物科学研究センターに搬入し、解剖を行った。各臓器・組織は 10%中性緩衝ホルマリン中で 1 日振盪し、流水洗浄の後に 70%エタノールに浸漬し臓器の切り出しを行った。切り出した臓器は、カセットに入れて自動包埋装置によりパラフィン包埋した。採取した臓器は甲状腺、乳腺、脾臓、胸腺、消化管、肝臓、肺、腎臓、膀胱および生殖腺で、薄切切片はスライドグラス上に固定した。

抗 53BP1 抗体での染色を行うと、組織の中でも、部位によって 53BP1 蛋白質の発現レベルが異なることが明らかになった。また、53BP1 フォーカス形成にも、組織内の部位特性が確認された。例えば、肺では、肺泡に貫入する細気管支の絨毛円柱上皮細胞に 53BP1 のシグナルが認められ、BG の 53BP1 フォーカスもこの一層の細胞に確認された。これに対し、肺泡の細胞は、ほとんどが 53BP1 陰性で、その中の極少数の細胞で 53BP1 フォーカス形成が認められるのみであった。同様の染色パターンは、Ki-67 でも観察され、円柱上皮細胞と肺泡の中の極少数の細胞で陽性シグナルが確認された。これに対し、免疫系の組織である脾臓や胸腺では、組織を構成するほとんど全ての細胞で、53BP1 の発現が見られ、53BP1 のフォーカスもほぼ全ての細胞で一様に観察された。肺と同じように特定の部位で 53BP1 蛋白質の発現が観察されたのが、肝臓である。肝臓は、大半が肝実質細胞で充満しているが、実質細胞は、観察した限り、全ての細胞で 53BP1 の発現を認めなかった。唯一発現があったのが、グリソン鞘の一部を構成する胆管細胞である。末梢のグリソン鞘では、大半を占める静脈の脇に胆管と動脈が共存しており、この胆管細胞で 53BP1 蛋白質の発現及び 53BP1 フォーカスの形成を確認した。

## 2. 低線量率・低線量放射線照射マウスにおける DNA 損傷応答の定量的評価

まず、非照射マウス由来の組織において、53BP1 フォーカスの BG の出現頻度を評価した。その結果、肺では、細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度が平均 0.04 であった。しかしながら、終末細気管支の領域によっては、局所的に多数の 53BP1 フォーカスを誘発している領域もあり、場所によっては数十個の細胞の領域で、細胞あたりの平均のフォーカス頻度がほぼ 1 に近いところも存在した。胸腺や脾臓では、細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度は極めて低く、胸腺で平均 0.004、脾臓で平均 0.002 であった。興味深いことに、胸腺の皮質領域では、無数の細胞で、53BP1 の BG のフォーカスが確認できた。この他には、脳での 53BP1 フォーカス頻度が平均 0.001、肝臓では平均 0.01 であることがわかった。

次に、低線量率・低線量放射線照射マウスから採取した臓器・組織について検討をおこなったところ、400mGy/日の高線量率照射では、組織内に DNA 損傷が蓄積することがわかった。たとえば、400mGy/日を 10 日間連続して照射すると、細胞あたり平均ほぼ 1 個の 53BP1 フォーカスが蓄積した。このレベルは、同じ累積線量 4Gy を急性照射した時のレベル（平均で少なくとも細胞あたり 15 個以上）とは全く異なるが、BG のレベルと比較すると蓄積が明らかである。また、53BP1 フォーカス陽性細胞率も評価すると、400mGy/日では、おおよそ 60%細胞が陽性であることがわかった。BG の割合は、おおよそ 4%であることから、放射線照射による有意な増加と結論できる。一方で、低線量率・低線量放射線照射の場合を評価すると、例えば、20mGy/日の照射では、おおよそ 22 時間で 20mGy を照射するが、細胞あたりの 53BP1 フォーカスの平均出現数は 0.07 で、BG のおおよそ 2 倍で



あった。これに対し、0.05mGy/日の照射では、20日間の照射、すなわち累積線量1mGyの段階でも、53BP1フォーカスの蓄積は見られなかった。

### 3. 組織幹細胞におけるDNA損傷の蓄積と排除

組織内に存在する幹細胞に着目して、DNA損傷の蓄積と排除を検討した。組織幹細胞は、幹細胞特異的マーカーに対する抗体でその存在を確認するのが理想であるが、様々な抗体を検討してはいるが、未だに、検出に堪え得る感度を持つマーカー抗体はなく、本研究では、当初の予定どおり、Ki-67抗体での同定を応用した。その結果、Ki-67陽性細胞と陰性細胞との比較において、53BP1フォーカスの出現頻度に差はなく、現時点では、組織幹細胞に特徴的な現象は観察していない。一方、Ki-67抗体を用いた方法には限界もあり、陽性細胞は必ずしも組織幹細胞ではない。また、Ki-67シグナルを用いた組織幹細胞の組織からの排除は解析不能であるため、Edu標識法の導入を平成25年度より始めた。これまでに、EdU標識の実験条件の設定を終え、標識細胞の追跡に着手した。

## IV. 考察

平成24年度の段階で、既に様々な臓器・組織で53BP1フォーカスを確認していたが、今年度の定量的解析から、組織の中でも、部位によって53BP1蛋白質の発現および53BP1フォーカス形成頻度が異なることが明らかになった。例えば、肺では、細気管支の繊毛円柱上皮細胞に53BP1のシグナルが認められたが、細気管支内壁を構成する一層の上皮細胞は、主気管支に至るまで53BP1の発現があり、53BP1フォーカスの誘導も確認できた。これに対し、肺胞の細胞では、ほとんどが53BP1陰性で、その中の極少数の細胞で53BP1フォーカス形成が認められるのみであった。皮膚での解析では、基底細胞から角化細胞に至る過程で、53BP1の発現が消失する。したがって、細胞の分化程度による53BP1の発現の差が考えられる。つまり、肺胞細胞では、より分化した細胞では53BP1のシグナルが消失し、逆に、53BP1の発現がある細胞はより未分化な細胞であろう。事実、53BP1シグナル陽性の細胞では、Ki-67のシグナルも検出されることが多く、増殖性を持つより未分化な細胞が53BP1陽性であると考えられることができる。

53BP1フォーカスは、DNA二重鎖切断を基点としたATM依存的なDNA損傷応答が惹起された結果形成される。ATMによって最初にリン酸化される蛋白質がヒストンH2AXで、 $\gamma$ H2AXと呼ばれるリン酸化ヒストンH2AXも、DNA二重鎖切断の分子マーカーとしてよく用いられる。53BP1フォーカスは、さらに複雑な蛋白質複合体形成の過程を経て形成される後発的な蛋白質複合体であるが、このように、あくまでも、DNA二重鎖切断が形成された後のクロマチン構造変化にともなう生化学的変化を検出しているに過ぎない。したがって、リン酸化やユビキチン化などの生化学的変化が起り得る細胞でなければ、53BP1フォーカスは形成されない。現時点では、あくまでも53BP1フォーカスは、DNA損傷により誘発されるとして妥当であるが、フォーカスがないからといってDNA損傷がないとは結論づけられない。この点が、 $\gamma$ H2AXをはじめ、DNA二重鎖切断の分子マーカーを用いてDNA損傷を検出する系の限界であるが、本研究では、この点も踏まえながら、53BP1フォーカスを形成できる組織内の領域をきちんと特定した後に、その部分に限局して定量的な解析を水平方向で行うように計画した。たとえば、肺であれば、繊毛円柱上皮細胞が標的であるし、肝臓であれば、胆管上皮細胞などである。

放射線照射していない非照射マウス由来の組織において、53BP1フォーカスのBGの出現頻度を評価したところ、組織によってその頻度が異なることを見いだした。例えば、肺

では、細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度が平均 0.04 であったが、胸腺や脾臓では、細胞あたりの 53BP1 フォーカス頻度は極めて低く、胸腺で平均 0.004、脾臓で平均 0.002 であった。また、脳では 53BP1 フォーカス頻度が平均 0.001、肝臓では平均 0.01 であることがわかった。このような BG での 53BP1 フォーカス頻度の違いは、各臓器・組織の生理的な状況を反映していると考えられ、たとえば、終末細気管支では、領域によって、局所的に多数の 53BP1 フォーカスを誘発している部分が観察された。場所によっては数十個の細胞の領域で、細胞あたりの平均のフォーカス頻度がほぼ 1 に近いところも存在し、これは、100mGy の放射線をうけた時とほぼ同等のレベルの DNA 損傷のレベルである。その原因を特定するには至っていないが、感染や炎症などによって ROS のレベルが局所的に上昇し DNA 損傷の誘発に至ったことが考えられる。これまで、個体内での日常的な DNA 損傷の誘発については、ほとんどデータがなかったが、本研究の結果、生体内の臓器・組織では、恒常的に DNA 損傷が誘発されている様子が明らかになった。もっといえば、このような、日常起きている DNA 損傷に対して生体はきちんと反応し、組織としての恒常性を保つように組織反応を起こしているということになる。このような事実は、とりわけ低線量率・低線量放射線被ばくに対する放射線影響の理解に多に貢献できると確信する。

次に、低線量率・低線量放射線照射マウスから採取した臓器・組織について検討をおこなったところ、線量率の違いによる DNA 損傷の蓄積程度の顕著な違いが明らかになった。まず、400mGy/日（毎時 18mGy）の高線量率照射では、たとえば、10 日間の連続照射により、細胞あたり平均ほぼ 1 個の 53BP1 フォーカスが確認された。このレベルは、400mGy を急性照射による受けた場合の細胞あたり平均 4 個と比較すると 4 分の 1 のレベルで明らかに少ないが、400mGy を 22 時間かけて受けたことを考慮すると、DNA 損傷修復により BG と同等のレベルまで減少するとの期待には合致しない。したがって、400mGy/日の線量率では、22 時間の照射終了時の残存 DNA 損傷が翌日まで持ち越され、新たに誘発された DNA 損傷のうち修復されなかった分が足し合わされた結果であると予想できる。一方、低線量率・低線量放射線照射の場合は、例えば、20mGy/日（毎時 0.9mGy）の照射では、おおよそ 22 時間で 20mGy を照射するが、細胞あたりの 53BP1 フォーカスの平均出現数は 0.07 で、BG のおおむね 2 倍程度の値であった。このレベルは、照射終了後 24 時間では、全てが修復されるレベルであるので、DNA 損傷の蓄積はないと推定できる。これに対し、0.05mGy/日（毎時 2.27  $\mu$  Gy）の照射では、20 日間の照射、すなわち累積線量 1mGy の段階でも、53BP1 フォーカスの蓄積は一切見られなかった。したがって、線量率の違いによる組織における DNA 損傷の蓄積は、線量率に依存して全く異なる結果になることが明らかになった。今後、低線量率・低線量放射線照射マウスにおける解析をすすめて、累積線量で 1mGy、20mGy、100mGy の照射による、組織における DNA 損傷の蓄積の全貌を解明することが期待される。

## V. 結論

低線量率・低線量放射線被ばくマウスにおいて、採取した臓器・組織における DNA 損傷の蓄積と排除の解析を実施した。その結果、臓器・組織によって、53BP1 フォーカスを誘導する特異的部位が存在することを明らかにした。また、非照射マウスにおいても低頻度ながら DNA 損傷が生じていることを確認したが、その頻度が臓器・組織によって異なること、さらに、組織によっては、非照射時にも、局所的に多数の DNA 損傷が生じるような状況があることを明らかにした。低線量率・低線量放射線照射マウスにおける定量的 DNA 損傷の評価から、極低線量率・低線量放射線被ばくでは、DNA 障害の蓄積が起ら

ない可能性を見いだした。Ki-67 と 53BP1 との二重蛍光染色法では、組織幹細胞における DNA 損傷の蓄積と排除を評価できるが、現時点では組織幹細胞に限局した変化は認めていない。

#### VI. 次年度以降の計画

平成 25 年度は、3 年の全体計画の中の間年度として位置づけられ、低線量率・低線量放射線照射マウスから目的とする臓器・組織を採取し、DNA 損傷の定量的な解析を実施した。最終年度である平成 26 年度は、低線量率・低線量放射線照射を終了したこれら全ての標本の解析を完遂して、低線量率・低線量放射線被ばくによる DNA 損傷の組織幹細胞における蓄積と排除に関する科学的知見を提示する。また、組織幹細胞における DNA 損傷の消長が、DNA 損傷修復によるものか、あるいは DNA 損傷を受けた幹細胞のアポトーシスによる排除の結果なのかを明確にする。

本研究に関する現在までの研究状況、業績  
なし

#### 引用文献

- 1) Niwa O. Roles of stem cells in tissue turnover and radiation carcinogenesis, *Radiat Res* 2010; 174: 833-839.
- 2) Tanaka S Tanaka IB III Sasagawa S Ichinohe K Takabatake T Matsushita S Matsumoto T Otsu H Sato F. No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates, *Radiat Res* 2003; 160: 376-379.
- 3) Suzuki K Nakashima M Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue, *Radiat Res* 2010; 174: 415-423.

# Analysis of DNA damage accumulation in tissues exposed to low dose and low-dose rate radiation

Keiji Suzuki

*Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences*

*Keywords:* Low-dose; Low-dose-rate; Dose-rate effect; 100 mGy; Tissue stem cells; DNA damage

## **Abstract**

After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in Japan, much attention has been paid for probable health risks associated with annual low-dose radiation exposure. While the epidemiological studies of A-bomb survivors from Hiroshima and Nagasaki have indicated a linear dose-dependent increase in cancer risk at doses above 100 mGy, it is quite difficult to estimate cancer risks stem from lower doses of radiation, e.g. less than 100 mGy. Thus, the LNT model has been adopted and used as the current standard for radiation protection. However, the LNT model does not always explain biological and epidemiological data. Although the LNT model assumes that accumulation of the initial radiation-induced damage in the target cells is associated with cancer development, this has not been proven in any of the experimental systems so far. Therefore, current study aimed to demonstrate whether DNA damage is accumulated in mouse tissues exposed to low-dose-rate radiation. B6C3F1 mouse were exposed to low-dose-rate gamma-rays until the total dose became 1 mGy, 20 mGy or 100 mGy, and several organs, including lung, liver, spleen, thymus, thyroid, mammary gland, intestine et al., were obtained. Then, tissue slices were incubated with anti-53BP1 and anti-Ki-67 antibodies to visualize DNA damage and proliferating cells, respectively.

53BP1 foci were detectable in every tissues derived from exposed mouse, whereas not all cells consisting tissues and organs form 53BP1 foci. In particular, more differentiated cells seem to lose the ability to form 53BP1 foci. Importantly, the 53BP1 foci were also observed in the control mouse, and the spontaneous foci frequency was completely different from tissues to tissues. Low-dose-rate radiation was confirmed to induce 53BP1 foci, however, their effects were totally dependent on dose and dose-rate. For example, 400 mGy/day increased the frequency of 53BP1 foci over the spontaneous level. However, 0.05 mGy/day irradiation did not show any increase. The present study established an experimental system, by which accumulation and exclusion of DNA damage in the tissue and/or tissue stem cells can be determined. The results are anticipated to provide scientific evidences that should contribute to the scientifically acceptable estimation of cancer risks from low-dose-rate radiation exposure.

# 低線量率・低線量放射線被ばくによる組織幹細胞の放射線障害 の蓄積に関する研究

## 低線量率・低線量被ばくによる乳腺幹細胞への影響蓄積の評価

今岡達彦（放射線医学総合研究所放射線防護研究センター発達期被ばく影響研究プログラム反復被ばく研究チームチームリーダー）

### 研究要旨

原子力災害による健康リスクの評価の基盤となる新たな科学的知見を創出するため、組織幹細胞への放射線影響を評価することが、本研究の目的である。本年度は、ラット乳腺未分化細胞モデルとされる細胞凝集塊の特徴を解明するとともに、その形成に対して放射線が及ぼす影響を評価した。その結果、細胞凝集塊は幹細胞のコロニーではなく、両能性前駆細胞を含む細胞が増殖しつつ凝集したものであることが示唆された。細胞凝集塊の形成は照射された細胞においてもあまり変化がなく、生存した細胞凝集塊内の細胞による細胞凝集塊の再形成において照射の影響は残存していなかった。また、個体における DNA 損傷細胞の追跡実験を立ち上げた。次年度は細胞凝集塊の分化能に放射線が及ぼす影響を評価し、これまでの結果を数理的に解析するとともに、損傷細胞の追跡実験を行う。

キーワード:組織幹細胞、乳腺、放射線影響、ターンオーバー

### I 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所事故後では、多くの被災者が低線量率もしくは低線量の放射線に被ばくした。我が国の放射線防護体系は、低線量でも線量に比例したリスクが生まれ蓄積するという直線しきい値なし (LNT) モデルを採用してリスクを評価する。LNT モデルは単に実用的であるばかりでなく、多くの不確実性がある現状において科学的に一番もっともらしい仮定とされる<sup>1)</sup>。

放射線によるがんリスクを蓄積する実体として、組織幹細胞（長寿命の前駆細胞等を含む）が想定される。LNT モデルの基礎に「放射線は線量に比例した頻度で組織幹細胞に遺伝子変異を起こし、変異細胞の頻度に比例してがんリスクが生じる」という仮説があり、大きな不確実性もここにある<sup>2-4)</sup>。たとえば、線量に比例して変異幹細胞が生成されたとしても、その数を変えるようなターンオーバー（細胞致死、自己複製、分化等）が同時に線量依存的に起これば、この仮定は成り立たない<sup>5)</sup>。

本研究では、放射線防護上の重要臓器の一つである乳腺に注目し、組織幹細胞に放射線が及ぼすターンオーバーの影響を定量的に解明することを目的とする。これまで、乳腺幹細胞及び前駆細胞の実験モデルとされる細胞凝集塊（マンモスフィア）<sup>6)</sup>を利用して、放射線が細胞凝集塊の形成に関わる細胞の致死に大きな影響を及ぼさないことを明らかにした。本年度は、個体における DNA 損傷細胞の追跡実験の立ち上げ、二次細胞凝集塊の形成に及ぼす放射線影響の評価、細胞凝集塊の分化能に及ぼす放射線影響の評価実験のほか、細胞凝集塊の性質の解明を行った。

### II 研究方法

DNA 損傷細胞の追跡実験：細胞追跡のために 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU, 50 mg/kg/回、3 回/日) を腹腔内投与した 7 週齢雌ラットに、最終投与の 2 時間後にガンマ線 (0.5Gy/分) を全身照射 (4Gy) し、非照射個体及び 1~72 時間後の各 1 匹から乳腺等の 11 組織を採取した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本電子画像を閲覧システムにより、親水化した凍結未染色標本を郵送により、それぞれ長崎大学へ提供した。

ラット乳腺上皮細胞の作製:成体雌ラットの下腹部乳腺脂肪体を細断及びコラゲナーゼ III 処理して