

細胞動態のシステマティックレビューと実験データ解析による

低線量・低線量率における放射線がんリスクの描写

甲斐 倫明（公立大学法人大分県立看護科学大学看護学部看護学科・教授）

研究要旨

低線量における科学的にリスクの実態を理解していくためには、放射線が関与するがん化のプロセスに関わる生物学的な個々の現象の線量および線量率との関係を明らかにしていく必要がある。本研究では低線量・低線量率放射線による細胞動態の変化をシステマティックレビューと実験を組み合わせることを目的として、学術報告のシステマティックレビューにより、造血幹細胞、活性酸素種、老化、放射線による細胞動態の変化について文献レビューを行い、急性骨髄性白血病の発症機構に関わる仮説を検証した。また、造血系細胞の動態を記述できる数理モデルをレビューし、それに基づいたシミュレーションから今後のデータ解析利用の可能性を検討した。実験研究では線量率効果のメカニズムおよび放射線照射後のマウスの白血病誘発過程における造血系細胞の動態変化を明らかにするために、1) 放射線をくり返し照射したヒト正常線維芽細胞における染色体異常の蓄積性、2) 放射線を照射した C3H/HeNjcl マウスの造血系細胞における DNA 初期損傷および活性酸素種産生量の経時的変化、3) 20 mGy/day、200 mGy/day、1000 mGy/min の線量率で照射した C3H/HeNjcl マウスの造血系幹細胞 (HSC)、前駆細胞 (MPP, CMP, CLP) および末梢血細胞 (WBC, RBC, PLT) の動態をそれぞれ調べた。細胞動態は時間・線量率・累積線量の関数と捉えることができ、統合的な解析を行うために、文献レビューからの考察と生物モデル研究者からのアドバイスを得て、モデル解析の方向性について検討した。

その結果、1) 線量率に応じて抹消血球数が減少しそれに伴い造血幹/前駆細胞の動態が変化すること、2) 細胞動態の変化により ROS の産生が生じることが分かった。細胞動態の変化に伴う ROS が AML に必須な *Sfpi1* 遺伝子に点突然変異を引き起こすか否か今後の課題であるが、低線量・低線量率放射線による発がんメカニズムを考える上で重要な知見が得られた。

キーワード：放射線、細胞動態、老化、活性酸素種、DNA 損傷、急性骨髄性白血病 (AML)

研究協力者：廣内篤久（環境科学技術研究所）、伴信彦（東京保健医療大学東が丘看護学部看護学科教授）、和泉志津恵（大分大学工学部知能情報システム工学科准教授）

I 研究目的

放射線によってヒトに引き起こされる代表的ながんとして、急性骨髄性白血病 (AML) があげられる。これまでにヒトの AML のモデルマウスである C3H/HeNjcl マウスを用いた実験で、AML の発症には (1) 放射線照射後平均して約 1~2 年の潜伏期間があること¹⁻⁵⁾、(2) 2 番染色体の中間部分の欠失型異常⁶⁻¹⁰⁾ と対立する 2 番染色体上の *Sfpi1* 遺伝子の点突然変異¹¹⁻¹³⁾ が必須であることが分かっている。では、これらの異常が放射線照射後いつどのようにして生じるのだ

ろうか？染色体異常の生成に関しては2つの可能性が考えられる。

1つ目の可能性としては、放射線が直接引き起こしたDNA二重鎖切断(DSB)が原因となって生じるというものである。AMLを発症させやすい線量(3Gy)の放射線は、細胞内のDNAにクラスター型のDNA損傷を引き起こす。このDNA損傷は自然発生、もしくは他の化学物質等により生成されるものとは異なり、修復の過程で遺伝子の欠失を起こしやすい。このことを考えるとAMLの発症に必須の2番染色体の欠失型異常は、放射線照射後比較的早い段階で生じるものと考えられる。現に、(1)同型の染色体異常が骨髄および脾臓細胞中に放射線照射後1~4ヶ月の時点で観察されていること、(2)照射後24時間の時点でも骨髄細胞中に同様の異常が存在していたことが挙げられる^{7,14,15)}。

2つ目の可能性としては放射線が間接的に2番染色体の欠失型異常を生じさせるというものである。近年、放射線が遺伝的不安定性を誘導することが報告された。これは放射線照射を受けた細胞のゲノムが不安定化し、その子孫細胞に染色体異常や突然変異が生じるという現象である¹⁶⁻¹⁸⁾。RithidechらはマウスにX線を照射後、経時的に屠殺して骨髄細胞中の2番染色体異常を調べた結果、照射後9ヶ月くらいまでは末端部近傍の切断による転座の頻度が高いが、AMLの発症が見られる時期になると中間部分の欠失が多くなったと報告している¹⁹⁾。Boufflerらが行った実験でも、照射後1年以上経つと2番染色体の中間部分の欠失の割合が多くなったことを報告している²⁰⁾。これらの結果は、放射線が造血系の細胞にゲノムの不安定化を引き起こし、AMLの原因となる2番染色体の欠失型異常を間接的に引き起こしている可能性を意味している。しかし、現時点において、上記のどの可能性によってマウスAMLに必須な染色体異常が生じるのか結論は得られていない。

ではSfp1遺伝子の点突然変異についてはどうだろうか？Banらは放射線照射後の造血系の細胞動態に関する解析を行なった。その結果、未熟な造血細胞の数が照射後数ヶ月経っても回復しないことを明らかにした。さらに、そのデータに基づいて数理モデルによる解析を実施した結果、未熟な細胞の回復が遅れるのは成熟血球の回復が優先されるためであり、造血幹細胞(HSC)の分裂活性は長期にわたって上昇することが示唆された^{21,22)}。分裂活性が高まるということは老化が促進される可能性が考えられる²³⁾。細胞は老化するとミトコンドリアの抗酸化機能が低下することが知られている^{24,25)}。このため細胞内に活性酸素種(ROS: $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ 等)が蓄積される。活性酸素はDNAに損傷を作る因子の引き起こす因子の一つであることから、細胞の老化がSfp1遺伝子に点突然変異を起こすのではないかと考えられる。しかしまだ実験的には証明されていない。このように放射線が直接的ではなく間接的に細胞動態を変化させることでがん化のプロセスを促進させている可能性はAMLに限らず、甲状腺がんや胸腺リンパ腫等でも考えられている^{26,27)}。よって放射線による細胞動態を詳細に解析することが高線量・高線量率を基礎にした放射線のがんリスクを考察し、科学的事実を下にしたリスクの全体描写を考える上で非常に重要である。

そこで本研究では低線量・低線量率放射線による細胞動態の変化をシステムティックレビューと実験を組み合わせることを目的として、これまで実施されてきた細胞レベルの細胞動態(細胞死、細胞増殖、細胞分化、変異)に関する学術報告のシステムティックレビューを行なった。実験研究では線量率効果のメカニズムおよび放射線照射後のマウスの白血病誘発過程における造血系細胞の動態変化を明らかにするために、1)放射線をくり返し照射したヒト正常線維芽細胞における染色体異常の蓄積性、2)放射線を照射したC3H/HeNjclマウスの造血系細胞におけるDNA初期損傷および活性酸素種産生量の経時変化、3)20mGy/day、200mGy/day、

1000 mGy/min の線量率で照射した C3H/HeNjcl マウスの造血系幹細胞 (HSC)、前駆細胞 (MPP, CMP, CLP) および末梢血細胞 (WBC, RBC, PLT) の動態 (細胞数および Ki67 発現細胞の割合を指標) をそれぞれ調べた。

引用文献

- 1) Upton AC Wolff FF Furth J et al. A comparison of the induction of myeloid and lymphoid leukemias in X-irradiated RF mice. *Cancer Res*, 1958; 18: 842-848.
- 2) Major IR. Induction of myeloid leukemia by whole-body single exposure of CBA male mice to X-rays. *Br J Cancer*, 1979; 47: 285-291.
- 3) Mole RH Papworth DG Corp MJ. The dose-response for X-rays induction of myeloid leukemia in male CBA/H mice. *Br J Cancer*, 1983; 47: 285-291.
- 4) Resnitzky P Estrov Z Haran-Ghera N. High incidence of acute myeloid leukemia in SJL/J mice after X-irradiation and corticosteroids. *Leuk Res*, 1985; 9: 1519-1528.
- 5) Seki M Yoshida K Nishimura M et al. Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat Res*, 1991; 127: 146-149.
- 6) Hayata I Seki M Yoshida K et al. Chromosome aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. *Cancer Res*, 1983; 43: 367-373.
- 7) Trakhtenbrot L Krauthgamer R Resnitzky P et al. Deletion of chromosome 2 is an early event in the development of radiation-induced myeloid leukemia in SJL/J mice. *Leukemia*, 1988; 2: 545-550.
- 8) Rithidech KN Bond VP Cronkite EP et al. A specific Chromosomal deletion in murine leukemic cells induced by radiation with different qualities. *Exp Hematol*, 1993; 21: 427-431.
- 9) Clark DJ Meijne EI Bouffler SD et al. Microsatellite analysis of recurrent chromosome 2 deletions in acute myeloid leukaemia induced by radiation in F1 hybrid mice. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996; 16: 238-246.
- 10) 伴信彦. マウスの急性骨髄性白血病と 2 番染色体の異常. 放射線生物研究, 2000; 35: 115-126.
- 11) Cook WD McCaw BJ Herring C et al. PU.1 is suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood*, 2004; 104: 3437-3444.
- 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 El 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 (AOCR-2)*, 2006.
- 23) Olga AS Hirokawa I Drazen BZ. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable 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.

II. 細胞動態に関する文献レビュー

PubMedより細胞動態、老化、活性酸素、DNA損傷、染色体異常、急性骨髄性白血病をキーワードとして文献を収集し、造血幹細胞、活性酸素種、老化、放射線による細胞動態の変化について文献レビューを行い、急性骨髄性白血病の発症機構に関わる仮説を検証した。

II-1. 造血幹細胞の概略

造血幹細胞 (HSC)は、自己複製能と多分化能を有し、個体の生涯を通して末梢血球を供給し続けることで特徴付けられる¹⁾。この細胞は、ニッチとして知られる特異的な微小環境において維持され、骨髄の低酸素領域である骨膜内のニッチ中で静止状態に保たれている^{2,3)}、また正常なHSCは細胞内低酸素状態であり、未熟な状態の維持にはHIF-1 α ²⁾、Foxo⁴⁾、ATM^{5,6)}等のような幾つかの分子が関与することが知られている。未熟なHSCは細胞内の活性酸素種(ROS)が低レベルに抑えられており^{4,7,8)}、適切な細胞内ROSレベルは細胞の分化、増殖に重要な役割を果たすことが知られている^{1,7-9)}。しかし一方で、過剰な細胞内ROSレベルだけではなく、外因性もしくは内因性の過剰なROSは、HSCの生存、分化、増殖に悪影響を及ぼす^{1,8,10)}。

このようにHSCは、周辺環境もしくは細胞内の酸素状態、ROSレベルなどによって影響され得る複雑な情報伝達経路により精密に制御されていることが明らかとなった。

II-2. 活性酸素種の概略

放射線や化学療法薬剤などを含む酸化ストレスの代表例は、活性酸素種(ROS)による作用である。ROSの発生源は主にミトコンドリアによる代謝過程であると考えられている^{9,11)}。Naka Kらによるとスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシ・ラジカルを含むROSは、不対電子を有し、フリーラジカルと作用することができる。またスーパーオキシド・ディスムターゼであるMnSODやCu/ZnSODは、スーパーオキシドを過酸化水素へ変換することができる⁹⁾。それに加えて、Fe²⁺やCu⁺は、FentonもしくはHarber-Weiss反応を経由して、過酸化水素から反応性の高いヒドロキシ・ラジカルへ変換され¹²⁾、これはDNA損傷の原因となり得る。全ての細胞は、過酸化水素を水に変換することで無毒化するカタラーゼもしくはグルタチオン・ペルオキシターゼ等により、ROS仲介性の酸化ストレスから自身を防衛している。

II-3. 複製ストレスの概略

正常な細胞には、精密にDNAを複製もしくは維持するために様々な機構が備わっており、このようなDNA損傷応答は複雑で緻密な制御により維持されていることが良く知られている¹³⁾。これまでに細胞分裂に伴うDNA複製は、その反復によりDNA損傷の蓄積や突然変異を生じる可能性が指摘されており^{14,15)}、これらは複製ストレスと総称される。造血幹細胞においても継続的な細胞分裂に伴う複製ストレスが、幹細胞の老化を促進することが指摘されている¹⁶⁻¹⁹⁾。さらに、放射線照射後の造血細胞における過剰な細胞分裂は、生存した造血幹細胞の老化を促進すること、またクロマチンリモデリングやDNA修復のようなゲノム安定性を確保するために作用する遺伝子の発現を抑制することが報告されている²⁰⁾。このように、過剰な複製ストレスは、細胞の老化や突然変異発生頻度を徐々に増加させる可能性がある。

II-4. 細胞老化の概略

細胞老化とは、細胞が不可逆的に分裂を停止することを指し、これは細胞分裂により染色体末端に存在するテロメアの短縮が起きることが原因であることが示された²¹⁾。この現象を裏付けるように、ヒト間葉系幹細胞では、細胞が分裂停止するまでの最終的な分裂回数とドナー年齢との間に負の相関があること、テロメア長と最終分裂回数との間に正の相関があること、分裂回数の増加とともに p16、SA-β-Gal 発現が陽性となることが示された²²⁾。Sedelnikova OA らは、継代数依存的に細胞老化マーカーである SA-β-Gal の発現増大が脳、肺、腎、肝など多くの組織で起きることを示した²³⁾。また、造血幹細胞においても老化は例外ではなく、自己複製能の低下、クローン増殖能の低下、骨髄移植後の生着能の低下、Myeloid-bias の様な特徴が現れることも報告された²⁴⁾。さらに HSC では、加齢とともに非 G0 集団の割合が増加しており、細胞周期進行を示唆している²⁵⁾。もっと言うと、HSC では加齢に伴い DNA の 2 本鎖切断頻度 (γ-H2AX)²⁶⁾、染色体異常の発生頻度²⁷⁾の増大が、多くの組織では加齢に伴い塩基損傷頻度 (8-OHdG) の増大²⁸⁾、抗酸化能の低下²⁹⁾、遺伝子突然変異発生頻度の増大^{30,31)}が示されている。このように、加齢の際に細胞内では細胞の老化が起きていることは明白であり、これに伴いテロメアの短縮、ROS 産生量の増大、抗酸化能の低下、DNA 損傷の蓄積、遺伝子突然変異発生頻度の増大、など様々な細胞動態変化が生じることが明らかとなった。もしかしたら、この様な細胞動態の変化が、加齢した HSC において幹細胞の機能低下、造血の調節異常を結果としてもたらしているのかもしれない、発がん傾向を強めるのかもしれない²⁰⁾。

II-5. 放射線による細胞動態の変化

放射線は酸化ストレスの一種であり、照射により *in vitro* ではヒト HSC の生存率及びクローン増殖能の低下が³²⁻³⁵⁾、*in vivo* ではマウス HSC の存在割合の低下が確認されている^{36,37)}。さらにマウス HSC では放射線照射により老化マーカー (p16, SA-β-Gal) の発現が増大することが示され³⁸⁾、同様に、放射線照射による老化マーカーの発現 (p21, SA-β-Gal) が、持続的に起こることも報告されている³⁹⁾。これらは放射線による細胞老化の誘導を示唆するデータである。もっと言うと、放射線照射後のマウス HSC では、ROS 産生量、DNA 2 本鎖切断頻度、塩基損傷頻度の増大が起り、結果としてクローン増殖能が劇的に減少することが示された^{36,37)}。このクローン増殖能の低下は、いずれも抗酸化剤の投与 (*N*-acetylcysteine: NAC、NOX inhibitor である diphenylene iodium: DPI、スーパーオキシド・ディスムターゼの擬態性抗酸化剤である Mn(III) *meso*-tetrakis(*N*-ethylpyridium-2-yl): MnTE) によりほぼコントロールレベルにまで回復することから、ROS がマウス HSC の老化に関与していると考えられる。さらに外因性の ROS はマウス HSC の p38-MAPK を活性化させ、老化マーカーの発現 (p16, p19) を特異的に誘導し、HSC の再構成能喪失と細胞周期進行の誘導に関与することが示された⁴¹⁾。また、放射線照射は、マウス HSC において p21 の活性化と p53 の抑制をもたらし、BrdU、Ki67 陽性細胞数を増加させ、これにより細胞周期の進行が誘導されることが示唆された⁴⁰⁾。

一方、放射線照射はゲノム不安定性を導き、マウス HSC において不安定型染色体異常を起こさせることも報告され、この場合にも ROS 産生量、DNA 2 本鎖切断頻度、塩基損傷頻度の増大が認められた⁴¹⁾。

これら過去の報告をまとめると、放射線照射は HSC の細胞動態を変化させることで、特に細胞周期、ROS 産生量、DNA 損傷頻度、塩基損傷頻度などの増大により、不安定型染色体異常による細胞死、細胞老化に伴うクローン増殖能の低下を結果としてもたらすのかもしれない、加齢した

HSCの細胞動態変化を鑑みると、このような変化が発がんの傾向を強めるのかもしれない。

II-6. 急性骨髄性白血病の発症機構に関わる仮説

放射線誘導性発がんの代表例である急性骨髄性白血病 (AML)は、AMLモデルマウスである C3H/HeN Jcl マウスを用い、これまでに 1) 放射線照射から平均して 1-2 年の潜伏期間があること⁴²⁻⁴⁶⁾、2) 2 番染色体の欠失型異常⁴⁷⁻⁵¹⁾および対立する 2 番染色体上の *Sfpil* 遺伝子の点突然変異⁵²⁻⁵⁴⁾が必須であることが明らかになっている。これらの異常のうち 2 番染色体の欠失型異常には過去の報告から 2 つの可能性が示唆されている。第 1 は DNA2 本鎖切断が原因となり、放射線照射後の比較的早い段階で生じる可能性である^{48,55,56)}。第 2 は放射線による遺伝的不安定性により生じる可能性である⁵⁷⁻⁶⁰⁾。しかし、この 2 つの可能性について確証は未だ得られていない。一方、*Sfpil* 遺伝子の点突然変異については、放射線照射後の末梢血球減少に対応する為の HSC の持続的な分裂活性の上昇⁶¹⁾、これにより老化が促進され⁶²⁾、老化による抗酸化能の低下が^{63,64)}、細胞内 ROS の蓄積を可能にし、結果として点突然変異を生じるのかもしれない。そこで研究者らは、放射線が HSC の細胞動態変化をもたらし、細胞の老化を誘導することにより、結果として AML の発症に繋がる 2 番染色体の欠失型異常や *Sfpil* 遺伝子の点突然変異を惹起するのではないかと仮定するに至った。

引用文献

- 1) Naka K et al. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 2008; 10: 1883-1894.
- 2) Takubo K et al. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell*, 2010; 7: 391-402.
- 3) Pietras EM et al. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol*, 2011; 195: 709-720.
- 4) Tothova Z et al. FoxO are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiological oxidative stress. *Cell*, 2007; 128: 325-339.
- 5) Ito K et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2004; 431: 991-1002.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Owusu-Ansah E et al. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 2009; 461: 537-541.
- 9) Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal*, 2008; 10: 1923-1940.
- 10) 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.
- 11) 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.

- 12) 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.
- 13) Ban N et al. Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *Br J Cancer*, 2009; 101: 363-371.
- 14) Kamminga LM et al. Cellular memory and hematopoietic stem cell aging. *Stem Cells*, 2006; 24: 1143-1149.
- 15) Sharpless NE et al. How stem cell age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8: 703-713.
- 16) Harrison DE et al. Loss of proliferative capacity in immunohematopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J Exp Med*, 1978; 147: 1526-1531.
- 17) Harrison DE et al. Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell. *J Exp Med*. 1990; 172: 431-437.
- 18) Ross EA et al. Serial depletion and regeneration of the murine hematopoietic system. Implications for hematopoietic organization and the study of cellular aging. *J Exp Med*. 1982; 155: 432-444.
- 19) Spangrude GJ et al. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: *in vivo* expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood*, 1995; 85: 1006-1016.
- 20) Chambers SM et al. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol*, 2007; 8: e201.
- 21) Hayflick L et al. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961; 25: 585-621.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Chen J. Hematopoietic stem cell development, aging and functional failure. *Int J Hematol*, 2011; 94: 3-10.
- 25) 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.
- 26) Rube CE et al. Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PLoS One*, 2011; 6: e17487.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) de la Asuncion JG et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J*, 1996; 10: 333-338.
- 30) 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.

- 31) Xu G et al. Ionizing radiation-induced mutant frequencies increase transiently in male germ cells of older mice. *Mutat Res.* 2012; 744: 135-139.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) Yamaguchi M et al. Role of reactive oxygen species in the response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One.* 2013; 8: e70503.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) Wang Y et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood.* 2006; 107: 358-366.
- 39) Seol MA et al. Prolonged expression of senescence markers in mice exposed to gamma-irradiation. *J Vet Sci.* 2012; 13: 331-338.
- 40) 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.
- 41) Pazhanisamy SK et al. NADPH oxidase inhibition attenuates total body irradiation-induced hematopoietic genomic instability. *Mutagenesis.* 2011; 26: 431-435.
- 42) Upton AC Wolff FF Furth J et al. A comparison of the induction of myeloid and lymphoid leukemias in X-irradiated RF mice. *Cancer Res.* 1958; 18: 842-848.
- 43) Major IR. Induction of myeloid leukemia by whole-body single exposure of CBA male mice to X-rays. *Br J Cancer.* 1979; 47: 285-291.
- 44) Mole RH Papworth DG Corp MJ. The dose-response for X-rays induction of myeloid leukemia in male CBA/H mice. *Br J Cancer.* 1983; 47: 285-291.
- 45) Resnitzky P Estrov Z Haran-Ghera N. High incidence of acute myeloid leukemia in SJL/J mice after X-irradiation and corticosteroids. *Leuk Res.* 1985; 9: 1519-1528.
- 46) Seki M Yoshida K Nishimura M et al. Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat Res.* 1991; 127: 146-149.
- 47) Hayata I Seki M Yoshida K et al. Chromosome aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. *Cancer Res.* 1983; 43: 367-373.
- 48) Trakhtenbrot L Krauthgamer R Resnitzky P et al. Deletion of chromosome 2 is an early event in the development of radiation-induced myeloid leukemia in SJL/J mice. *Leukemia.* 1988; 2: 545-550.
- 49) Rithidech KN Bond VP Cronkite EP et al. A specific Chromosomal deletion in murine leukemic cells induced by radiation with different qualities. *Exp Hematol.* 1993; 21: 427-431.

- 50) Clark DJ Meijne EI Bouffler SD et al. Microsatellite analysis of recurrent chromosome 2 deletions in acute myeloid leukaemia induced by radiation in F1 hybrid mice. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996; 16: 238-246.
- 51) 伴信彦. マウスの急性骨髄性白血病と2番染色体の異常. 放射線生物研究, 2000; 35: 115-126.
- 52) Cook WD McCaw BJ Herring C, et al. PU.1 is suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood*, 2004; 104: 3437-3444.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) Hayata I. Leukemogenesis and chromosomal abnormalities:experimental animals. *Acta Haematol Jpn*, 1985; 48: 1857-1863.
- 56) 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.
- 57) Ullrich LR Ponnaiya B. Radiation-Instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int J Radiat Biol*, 1998; 74: 747-754.
- 58) Morgan WF. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 1996; 146: 247-258.
- 59) Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 397-404.
- 60) 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.
- 61) 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 (AOCR-2)*, 2006.
- 62) 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.
- 63) Sohal RS Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann NY Acad Sci*, 1992; 663: 74-84.
- 64) 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.

III. 実験

III-1. 放射線のくり返し照射による二動原体染色体異常の蓄積性の検討

III-1-1. 目的

放射線は細胞内の DNA に二重鎖切断 (DSB) を引き起こす。この損傷は細胞に致死的に作用するが、修復されれば生存が可能となる。しかし、修復の際、異なった染色体の DSB 断片同士が結合してしまうと染色体異常となる。染色体異常は子孫細胞に遺伝子変化をもたらす原因となるため、発がんのプロセスにつながる恐れがある。よって、放射線は発がんを引き起こす因子のひとつであることが分かる。しかし、1978年に Bauchinger らは 4 Gy の γ 線を 500 mGy/min および 17 mGy/min の線量率で照射し、二動原体染色体の発生頻度を調べた結果、17 mGy/min の方が 500 mGy/min と比べて 2/3 となり、線量率を下げることで発生頻度が抑制されることを報告した¹⁾。また、2006年に Elmore らは 1Gy の γ 線を、0.19 ~1.9 mGy/min の線量率で 1000 mGy を照射し、細胞形態変化 (細胞がん化の初期段階で見られる変化) の発生頻度を調べた。その結果、0.19 mGy/min の線量率で照射すると、1.9 mGy/min で照射するよりも発生頻度が約 1/2 になることを報告した²⁾。このように、同じ線量の放射線であっても線量率を下げると生物学的影響が抑制されるという現象は、細胞死や遺伝子突然変異でも見られており、総称して線量率効果と呼ばれている³⁾。しかし、そのメカニズムは明らかにされていない。線量率効果のメカニズムを明らかにすることは、今、福島で問題となっている低線量率長期連続被ばくによる発がんリスクを考える上で非常に重要である。

そこで本研究では線量率効果のメカニズムとして次のような仮説を立てた。線量率効果を分割線量のくり返し照射による効果としてとらえる。つまり、1回で 1 Gy を照射するよりも、それらの線量を分割して 0.1~0.5 Gy ずつ単位時間毎にくり返し照射した方が最初の照射により生じる初期損傷も少なくなり、かつ次の照射までに修復が行なわれるため生物学的影響が小さくなると考えた。

そこで本研究ではこの仮説を検証することを目的として、ヒト正常線維芽細胞に 1 Gy の X 線を 1 回照射した場合と、0.1~0.5 Gy を単位時間毎に 1 Gy になるまでくり返し照射した場合とで二動原体染色体異常の発生頻度に差が生じるか検討した。

III-1-2. 方法

<細胞>

本研究では正常ヒト胎児肺腺維芽細胞である MRC-5 を用いた。細胞は European Collection of Culture (ECACC) より購入し、10% の牛胎児血清 (Multi Ser) 及びペニシリン (100 units/ml) ストレプトマイシン (100 μ g/ml) 含有の MEM 培地中、37.0 $^{\circ}$ C、5% インキュベーター内で培養した。

<X線照射>

X 線照射には X 線装置 320 (島津メクテム) を使用した。本研究では照射時間を一定にそろ

えるために、0.1 Gy の X 線は、管電圧 90 kV、管電流 30 mA、フィルターには 1 mm 厚の銅板と 1 mm 厚のアルミニウム板を使用し、0.2 Gy/min の線量率で照射した。0.2~1 Gy の場合は、管電流 18 mA、管電圧 200 kV、フィルターには 0.5 mm 厚の銅板と 0.5 mm 厚のアルミニウム板を使用し、X線管からの距離を変えることで 0.2 Gy/min (0.2 Gy)、または 1 Gy/min (0.5, 1 Gy) の線量率で照射した。

くり返し照射の概要を図 III-1 に示す。照射と照射の間の時間を 1 分から 1440 分 (24 時間) とし、0.1 Gy は 10 回、0.2 Gy は 5 回、0.5 Gy は 2 回くり返し照射を行なった。

<染色体標本の作製>

T-25 フラスコでコンフレントまで培養し、G₀期に揃えた細胞に各条件で X 線を照射してから、24 時間後に培養液をアスピレートした。1~2 ml の PBS で細胞面をゆっくり洗浄した後、PBS をアスピレートした。この操作を 2 回くり返した後、0.5 ml のトリプシンを細胞に作用させた。その後、7.5 ml の MEM 培地を用いてピペティングし、50 ml チューブに細胞を回収した。同じ条件で照射したもう一つの T-25 フラスコの細胞も同様の操作を行い、同じ 50 ml チューブに回収して計 15 ml とした。回収した細胞を T-75 フラスコに播き、6 時間培養した後、10 μ g/ml のデメコルシン (シグマアルドリッチ) を 20 ng/ml の濃度で加え、さらに 42 時間培養を継続した。その後、培養液を 50 ml のチューブに回収し、3~5 ml の PBS で洗浄する操作を 2 回くり返した後、トリプシンを入れ、細胞全体になじませた後、細胞が剥がれるまで静置させた。その後、フラスコを軽く叩くことで、分裂期の細胞をフラスコから剥がし、あらかじめ回収しておいた培養液でピペティングを行い、分裂期の細胞を含む細胞浮遊液とした。その細胞浮遊液を 50 ml のチューブに回収して、1200 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て 5 ml の 0.075 M KCl で細胞混濁液とし、37 $^{\circ}$ C で 20 分間低張処理を行った。低張処理後、氷冷したカルノア固定液 (メタノール:酢酸 = 3:1) を 5 ml 静かに重層し、ゆっくりと混和し、1200 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、再度カルノア固定液 5 ml を加えて攪拌した後、1200 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。この操作を 2 回くり返した後、カルノア固定液 0.5 ml を加え再混濁し、細胞混濁液とした。細胞混濁液は、80 $^{\circ}$ C の水浴上でスライドガラスに滴下し、染色体を分散させて、染色体標本とした。

<ギムザ染色>

十分乾燥させた染色体標本を 3% のギムザ水溶液に 10 分間静置した。静置後、流水で十分に染色体標本を洗い、室温で乾燥させ、オイキットを 2~3 滴落とし、24 \times 45 mm のカバーガラスをかけた。

<二動原体染色体異常の観察>

染色体異常の中でも転座は放射線発がんのプロセスに重要な異常である。しかし転座は、一見正常な染色体と同じ形をしているため、観察が困難である。そこで、本研究では転座と同じ生成機構⁴⁾でかつ、簡便に観察することができる二動原体染色体異常を指標とした。二動原体染色体異常は、倒立型電動リサーチ顕微鏡 IX81 (OLYMPUS, Japan) を用いて観察した。1 つの照射条件につき 100 個以上の細胞を観察し、細胞 1 個当たりの二動原体染色体異常の発生頻度を求めた。

III-1-3. 結果

<二動原体染色体異常の線量反応関係>

図 III-2 に二動原体染色体異常の発生頻度の線量反応関係を示す。二動原体染色体異常の発生頻度は非照射群では、0.008 となった。これに対して、0.1 Gy の X 線を照射した場合は 0.013、0.2 Gy では 0.018、0.5 Gy では 0.054、1Gy では 0.136 となり、二動原体染色体異常の線量反応関係が従来通りの LQ (Linear-Quadratic) モデルにあてはまることが確認できた。

<くり返し照射による二動原体染色体異常の蓄積性>

0.1 Gy の X 線を 1 分、5 分、15 分、30 分、24 時間毎に 10 回くり返し照射した結果を図 III-3 に示す。1 分の場合の二動原体染色体異常の発生頻度は 0.094、5 分の場合は 0.032、15 分の場合は 0.032、30 分の場合は 0.029、24 時間の場合は 0.023 であった。

0.2 Gy を同様の時間間隔で 5 回くり返し照射した結果は図 III-4 に示す。1 分の場合は 0.113、5 分の場合は 0.046、15 分の場合は 0.042、30 分の場合は 0.044、24 時間の場合は 0.038 であった。

0.5 Gy を同様の時間間隔で 2 回くり返し照射した結果は図 III-5 に示す。1 分の場合は 0.146、5 分の場合は 0.054、15 分の場合は 0.051、30 分の場合は 0.048、24 時間の場合は 0.049 であった。

0.1、0.2、0.5 Gy を 1 分間毎に照射した場合は、1 Gy を 1 回照射した場合とほぼ同じ頻度の二動原体染色体異常が観察された (t-test, $p>0.05$)。しかし、照射と照射の間の時間を 5 分以上にすると染色体異常の発生頻度が有意に減少することが分かった。

III-1-4. 考察

本研究で立てた線量率効果の誘導仮説を検証するために、照射と照射の時間を変えて 0.1、0.2、0.5 Gy の X 線を 1 Gy になるまでくり返し照射し、1 Gy を 1 回照射した場合の二動原体染色体異常の発生頻度と比較した。その結果、1 分毎にくり返し照射場合は 1 Gy を 1 回照射した場合とほぼ同じ頻度の二動原体染色体異常が観察された。しかし、照射と照射の間の時間を 5 分以上にすると、染色体異常の発生頻度は有意に減少した。この結果は、くり返し照射による二動原体染色体異常の発生頻度の蓄積は、照射と照射の間が 1 分でないと見られないことを意味している。ではなぜ照射と照射の間の時間が 1 分だと二動原体染色体異常の発生頻度の蓄積が生じたのだろうか？

放射線により DSB が生じると、ヒストンタンパク質の一種である H2AX がリン酸化して、 γ -H2AX の構造に変わり、DSB 部位でフォーカスを形成することが明らかにされた⁵⁾。このフォーカスは免疫蛍光抗体染色法により可視化することが可能であるため DSB の指標として広く用いられている。この γ -H2AX フォーカスを利用して放射線による DSB の修復時間関係が調べられており、X 線照射後 3~15 分で修復機構が働き始めることが報告されている⁶⁾。よって、照射と照射の間が 1 分の場合は、1 回目の照射で生じた DSB が修復される間もなく、再び照射を受けることになるため DSB の蓄積が生じてしまうのではないかと思われる。DSB 数は多いほど、修復エラーが起きる確率が上がるので、結果として染色体異常の発生頻度が上昇したと考えられ

た。では照射と照射の間の時間間隔を5分以上空けた場合に二動原体染色体異常の発生頻度が蓄積されなかったのはなぜだろうか？一つの可能性としては、2回目の照射までの間に1回目の照射でできたDSBが完全に修復されたためであると考えられた。

2009年に田中らは、1 Gyの γ 線を低線量率（1 mGy/day）でマウスに照射したものと高線量率で照射した場合の二動原体染色体異常の発生頻度を調べた。その結果、低線量率で放射線を照射したマウスでは、高線量率と比較して二動原体染色体異常の発生頻度の蓄積がほぼ見られなかった⁷⁾。ではなぜ低い線量率だと異常の蓄積が見られなかったのだろうか？本研究結果を踏まえて、下記の可能性を考えた。

線量率は単位時間あたりの線量を意味する。よって、低線量率の場合は、高線量率の場合に比べて同じ細胞に短時間で放射線がくり返しヒットする可能性が低くなる。これによりDSBの蓄積が生じず、結果として二動原体染色体異常の蓄積にもつながらなくなるのではないかと考えた。

以上の本研究結果より、低線量率放射線の長期連続被ばくによる発がんリスクは、同一細胞に放射線がくり返しヒットするまでの間の時間が十分に空くような線量率であれば、増加しない可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Bauchinger M Schmid E et al. Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after Co γ -irradiation of human lymphocytes. *Radiat Biol*, 1979; 35: 229-233
- 2) Elmore E Lao X Y et al. The effect of dose rate on radiation-induced neoplastic transformation in vitro by low doses of low-LET radiation. *Radiat Res*, 2006; 166: 832-8.
- 3) 小嶋 光明 甲斐 倫明. 低線量域における線量率効果～二動原体染色体発生頻度に着目して～. *放射線生物研究*, 2012; 47: 347-360.
- 4) Kanda R Hayata I. Comparison of the yields of translocations and dicentrics measured using conventional giemsa staining and chromosome painting. *Int J Radiat Biol*, 1996; 69: 701-705.
- 5) Grudzenski S Raths A Conrad S et al. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *PNAS*, 2010; 107: 14205-14210.
- 6) Rothkamm K Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *PNAS*, 2003; 100: 5057-5062.
- 7) Tanaka K Kohda A Satoh K et al. Dose-rate Effectiveness for Unstable-Type Chromosome Aberrations detected in Mice after Continuous Irradiation with Low-Dose Rate γ -Rays. *Radiat Res*, 2009; 171: 290-301.

図表

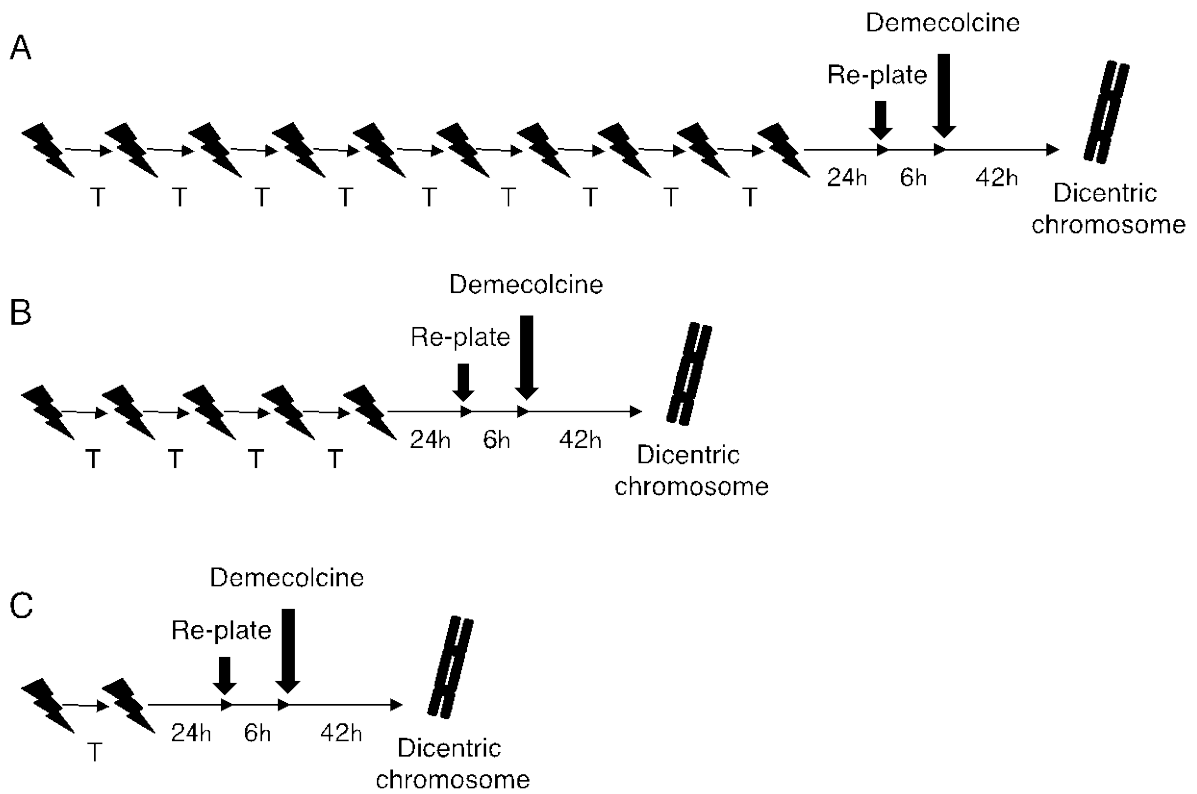


図 III-1 くり返し照射の実験スキーム

A: 0.1 Gy の X 線を 10 回照射、B: 0.2 Gy の X 線を 5 回照射、C: 0.5 Gy の X 線を 2 回照射、
T: 照射と照射の間の時間（1 分、5 分、15 分、30 分、24 時間）をそれぞれ表す。

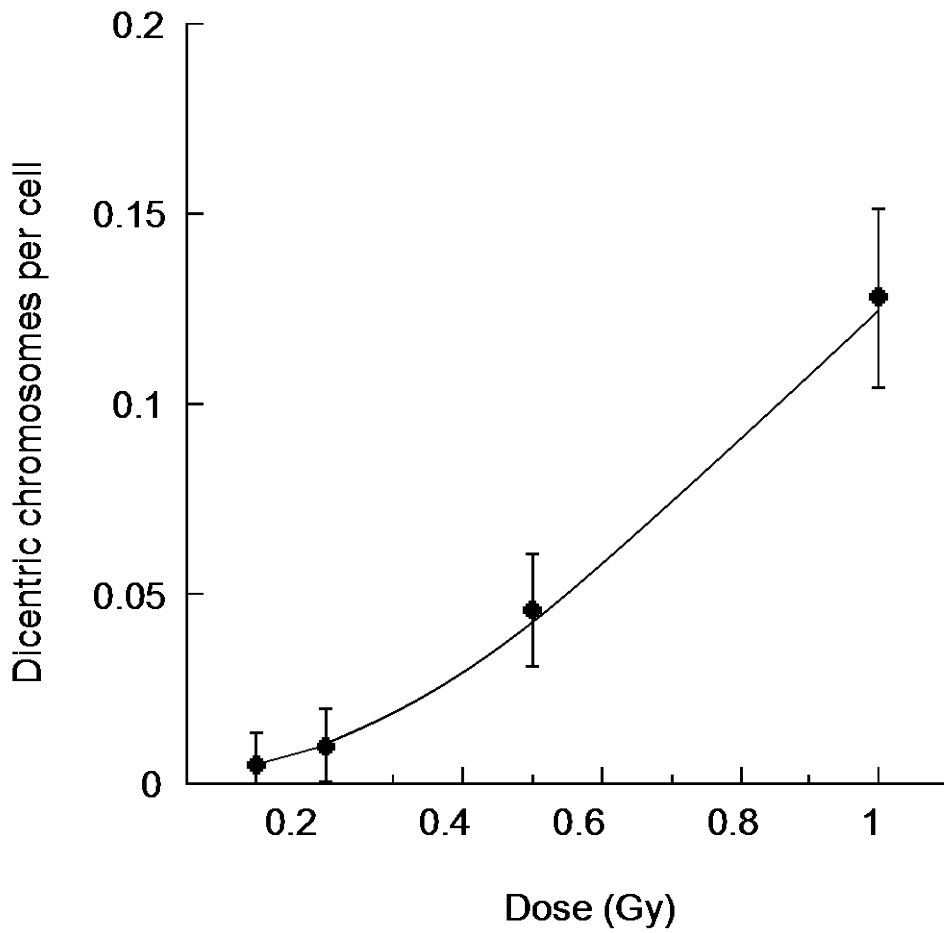


図 III-2 二動原体染色体異常の線量反応関係

● : 非照射群に観察された二動原体染色体異常の数を差し引いた細胞一個あたりの二動原体染色体異常の数、エラーバーは標準誤差を表す。

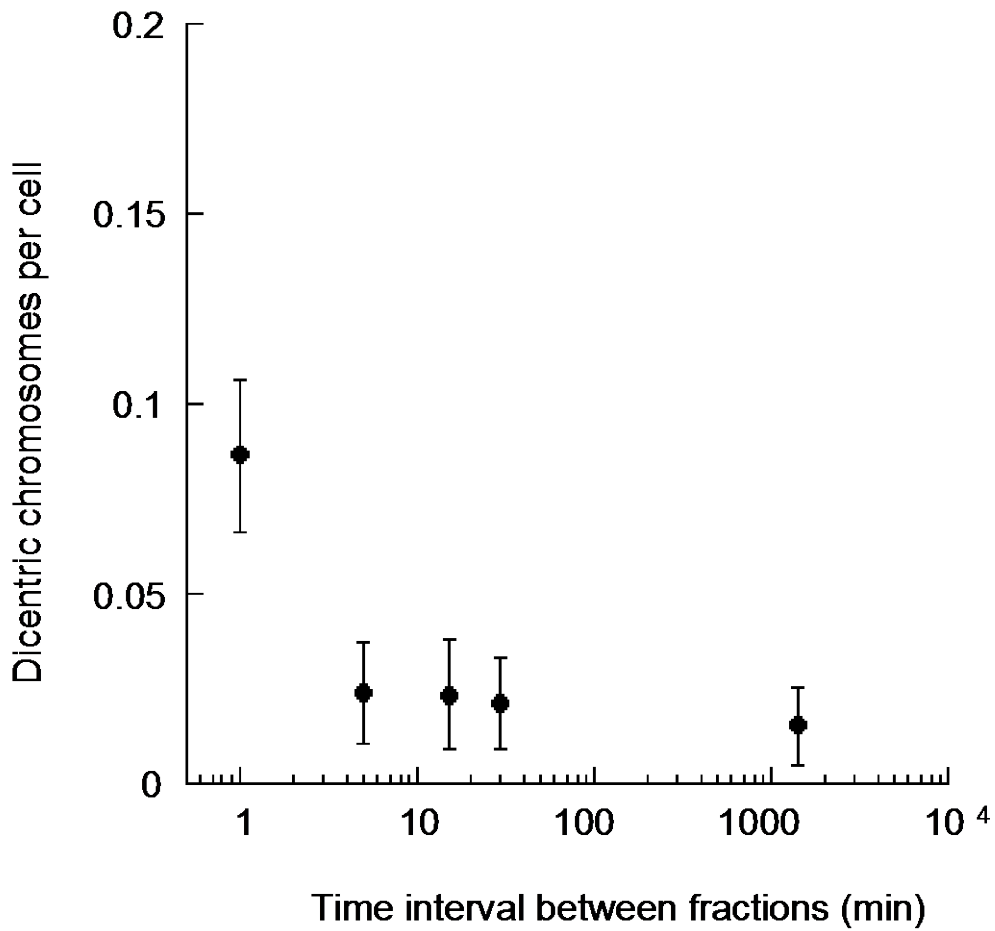


図 III-3 0.1 Gy の X 線を 10 回くり返し照射した後の二動原体染色体異常の頻度
 ● : 非照射群に観察された二動原体染色体異常の数を差し引いた細胞一個あたりの二動原体染色体異常の数、エラーバーは標準誤差を表す。

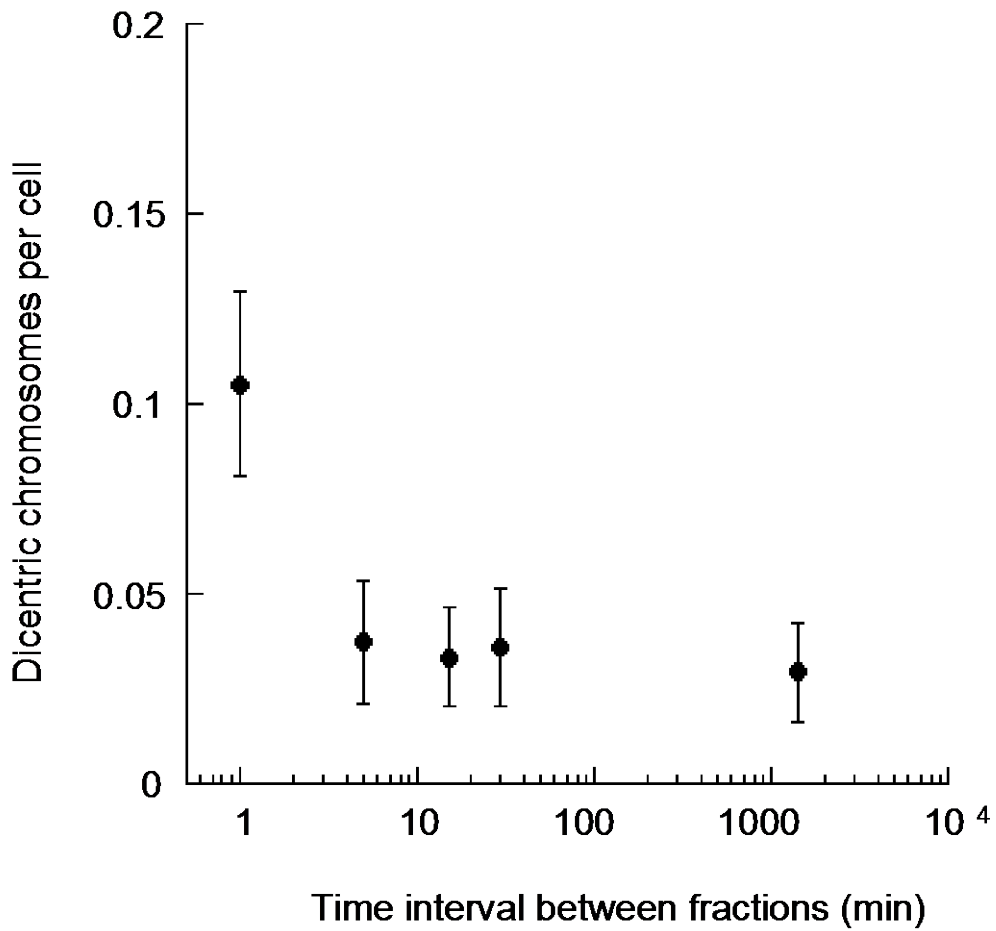


図 III-4 0.2 Gy の X 線を 5 回くり返し照射した後の二動原体染色体異常の頻度

● : 非照射群に観察された二動原体染色体異常の数を差し引いた細胞一個あたりの二動原体染色体異常の数、エラーバーは標準誤差を表す。

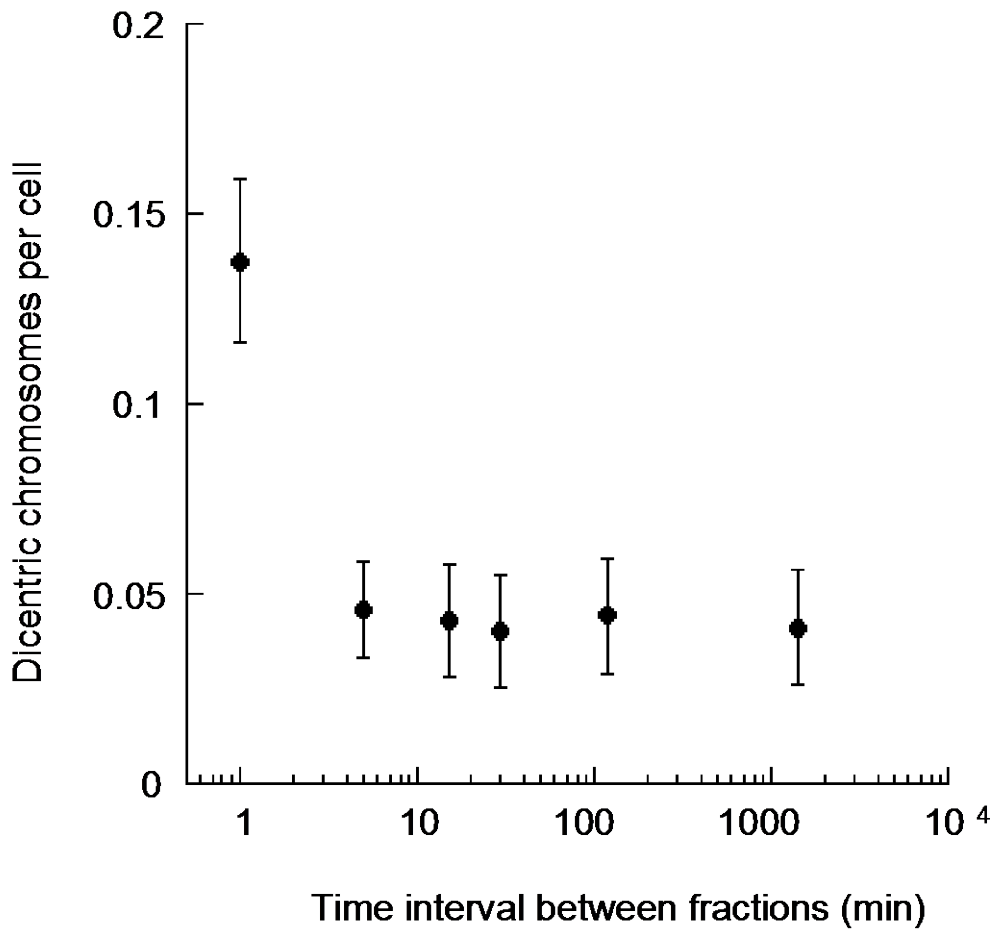


図 III-5 0.5 Gy の X 線を 2 回くり返し照射した後の二動原体染色体異常の頻度

● : 非照射群に観察された二動原体染色体異常の数を差し引いた細胞一個あたりの二動原体染色体異常の数、エラーバーは標準誤差を表す。

III-2. 放射線を全身照射したマウスの造血系細胞における DNA 損傷数線量反応関係 および活性酸素産生量の経時的変化の検討

III-2-1. 目的

放射線の初期の生物作用の一つに DNA の二重鎖切断 (DSB) がある。この損傷は細胞にとって致命的なものであるが細胞内に備わった非相同末端結合修復や相同組換え修復等の DSB 修復機構により修復され生存が可能になる。しかし、非相同末端結合修復はエラーを伴いやすく染色体異常を形成しやすい。このことを考えると AML の発症に必須の 2 番染色体の欠失型異常は、放射線照射後比較的早い段階で生じるものと考えられる。現に、放射線照射後、同型の染色体異常が骨髄および脾臓細胞中に早い時期に観察されている^{1,2,3)}。では AML の発症に必要なもう一つの異常である *Sfp1* 遺伝子の点突然変異はいつ起きるのだろうか？現時点においてその答えはない。

そこで本研究では、放射線照射したマウスの骨髄細胞における DNA 損傷の線量反応関係と、点突然変異を作る因子の一つとして知られている活性酸素種 ($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ 等) 産生量の経時的変化を調べた。

III-2-2. 方法

<マウス>

8 週齢の雌の C3H/HeNjcl マウスを日本クレアから購入し、温度、湿度、室内照明 12 時間ごとの点灯消灯サイクルで管理された飼育室中で飼育した。マウスは 1~2 匹ずつ飼育ケージに收容し、固形飼料 (日本クレア製 CE-2) と水を自由に摂取させた。

<X線の照射>

X線照射はX線装置 HF320 (島津メクテム) を使用した。マウスを非照射群 (0 Gy)、0.5 Gy 群、2 Gy 照射群、1 Gy 照射群、3 Gy 照射群の 4 群に分けて、照射群のマウスに管電圧 200kV、管電流 18mA、フィルターに 0.5mm 厚の銅板と 0.5mm 厚のアルミニウム板を使用し、0.47mGy/min の線量率でX線を全身照射した。

<EasySep Mouse PE Selection Kit による造血幹細胞含有骨髄細胞の分離>

ドラフトチェンバー内でマウスにエーテル麻酔をかけ、頸椎脱臼により屠殺した。その後、両側の大腿骨を切断し、φ30 シャーレ内で PBS with 2 % FBS 溶液に浸した。大腿骨の両側を数 mm 切断し、23G の注射針を付けた 1 ml のシリンジを用いて両側から 1 ml ずつ、計 2 ml の PBS with 2 % FBS 溶液を大腿骨内に勢いよく注入し、10 ml の遠心管チューブに骨髄細胞含有 PBS with 2 % FBS 溶液を作成した。本研究では骨髄細胞中の造血幹細胞の含有量を高めるために、EasySep Mouse PE Selection Kit (VERITAS) を用いた磁気細胞分離を行った。まず、骨髄細胞含有 PBS with 2 % FBS 溶液を、セルストレイナー (BD Falcon) を用いて濾過し、その後 10 ml 遠心管チューブに入れ、1400 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、200 μl の PBS with 2 % FBS 溶液を入れ、よく攪拌した。攪拌後、2 μl の FcR blocking antibody (VERITAS) を入れ、よく攪拌した。その後、

1 μ l の PE-conjugated antibody (VERITAS) を入れ、よく攪拌し 15 分静置した。静置後、10 μ l の PE-selection cocktail (VERITAS) を入れ、よく攪拌し 15 分静置した。その後、10 μ l の Magnetic nanoparticles (VERITAS) を入れ、よく攪拌し 10 分静置した。静置後、2.5 ml の PBS with 2 % FBS 溶液を入れ、よく攪拌した後にマグネット用チューブに全量注入した。その後、マグネット用チューブをマグネットにセットし、5 分間静置した。静置後、チューブをマグネットにセットしたままの状態、容器を傾け上澄み液を捨てた。マグネットからチューブを取り外し、2.5 ml の PBS with 2 % FBS 溶液を入れ、よく攪拌した後、10 ml 遠心管チューブに入れ、1400 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、2 ml の PBS 溶液を入れ、よく攪拌した。これらの操作を行うことで、EPCR (+) 細胞 (造血幹細胞特有の細胞膜タンパク質)⁴⁾ の含有量を高めた骨髓細胞含有 PBS 溶液を作成した。

<密度勾配遠心法による末梢血リンパ球の単離および標本の作製>

ドラフトチェンバー内でマウスにエーテル麻酔をかけ、頸椎脱臼により屠殺した。その後、ヘパリン(ノボヘパリン注1000、アベンティスファーマー株式会社)混合の注射器を使用し、心臓採血により、末梢血リンパ球含有の血液を採取した。採血した血液は、5 μ lのヘパリンが含有した1.5 mlチューブの中に入れ、よく攪拌した。その後、ヘパリン含有の血液をPBS溶液と同量(1:1の割合)になるように加え、よく攪拌した。攪拌後、2 mlの ficoll-Paque 液 (Pharmacia Biotech) を 10 mlの遠心管チューブに入れ、その上から ficoll-Paque 液の境界面を乱さないように慎重に PBS 混合の血液を重層させた。重層後、400 rcfで 30 分間遠心した。遠心後、リンパ球の層のみをマイクロピペットで回収し、10 mlの遠心管チューブ内で、6 mlの PBS 溶液と混合させ、100 rcf で 10 分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、2 mlの PBS 溶液を入れ、100 rcf で 10 分間遠心した。その後、上澄み液を捨て、500 μ lの PBS 溶液を入れ攪拌し、4 %パラフォルムアルデヒド 500 μ lを静かにいれ攪拌し、20 分間静置した。静置後、300 rcf で 5 分間遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液を 500 μ l入れよく攪拌し、再度 300 rcf で 5 分間遠心した。この作業を 2 回繰り返した後、500 μ lの PBS 溶液を加えてよく攪拌し、シランコートスライドガラス (マツナミ) をセットしたチェンバー内に全量注入した。このチェンバーをオートスメア (サクラ精機) にセットし、800 rpmで 5 分間遠心することにより、スライドガラス上に末梢血リンパ球を塗抹した。遠心後、スライドガラスをコプリンジャー瓶内 70 %エタノール溶液に浸し、細胞を固定した。

<リン酸化ATM免疫蛍光抗体染色>

DNA に二重鎖切断が生じると、切断部位にリン酸化した ATM が集積し、フォーカスを形成する。このフォーカスは、可視化することが可能であるため、DNA 二重鎖切断の指標となる。そこで、本研究では ATM フォーカスを下記の方法で可視化し、DNA 二重鎖切断を観察した。

固定した細胞が塗抹されているスライドガラスのふちから余分な溶液を拭き取った後、0.2 % トライトン X/PBS 溶液に浸し、20 分間静置した。静置後、スライドガラスを取り出し、スライドガラスのふちから、余分な溶液を吸い取った。その後、100 μ lの一次抗体溶液 (Anti-ATM protein kinase Rabbit-Poly, (RCK) : 3 %/BSA/TBS 溶液=0.2 μ l : 99.8 μ l) を細胞面上に滴下し、パラフィルムで封入した後、37 °Cの湿潤環境、5 %CO₂ インキュベーター内で 1 時間培養した。一次抗体処理後、コプリンジャー瓶内に PBS 溶液を満たし、スライドガラスを 2 回洗浄した。洗浄後、スライドガラスのふちから、余分な溶液を吸い取った後、100 μ lの二次抗体溶液 (Ale X a Fluor 546 goat

anti-rabbit IgG (H+L) , (Life Technologies) : 3 %/BSA/TBS 溶液=0.2 μ l : 99.8 μ l) を細胞面上に滴下し、パラフィルムで封入した後、37 $^{\circ}$ C の湿潤環境、5 %CO₂ インキュベーター内で 1.5 時間培養した。培養後、コプリンジャー瓶内に PBS 溶液を満たし、スライドガラスを 5 回洗浄した。洗浄後、スライドガラスのふちから、余分な溶液を吸い取った後、細胞面上に 10 μ l の DAPI II counterstain (Vysis) を滴下し、22 \times 22 mm のカバーガラスで封入した。

<リン酸化ATMフォーカスの観察>

リン酸化ATMフォーカスは、DSカメラコントロールユニットDS-U2 (Nikon) を装備した蛍光顕微鏡DS-Ril (Nikon) を用いて観察した。骨髄細胞と末梢血リンパ球の細胞核は、青色の蛍光像として映り、リン酸化ATMフォーカスは赤色の粒状に見える。1 匹のマウスあたり、末梢血リンパ球のスライドと骨髄細胞のスライド計 2 枚作製し、1 つのスライドから 50 個以上の末梢血リンパ球および骨髄細胞を観察し、細胞 1 個あたりのリン酸化 ATM フォーカス数を算出した。

<MitoSOX Red (invitrogen) によるミトコンドリア内 \cdot O₂⁻の測定>

細胞内のミトコンドリアは酸素を取り込み、細胞分裂などに必要なエネルギーを生成している。活性酸素はその副産物として産生されることが知られている。そのため、ミトコンドリア内 \cdot O₂⁻ 検出用蛍光試薬である MitoSOX Red (invitrogen) を用いてミトコンドリアで産生される \cdot O₂⁻ の測定を行った。

1.5 ml チューブ内で PBS 溶液 1 ml 中に 1.0 \times 10⁵ 個の細胞を入れた後、6000 rpm で 30 秒遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、1 μ M に希釈した MitoSOX Red (invitrogen) を 1 ml 注入し、攪拌した後、37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ インキュベーター内で 30 分静置した。静置後、6000 rpm で 30 秒遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 400 μ l を注入し、攪拌した。攪拌後、6000 rpm で 1 分遠心し、上澄み液を捨て、PBS 1 ml を注入し攪拌したものを、励起波長 510 nm、蛍光波長 580 nm の分光蛍光光度計を用いて測定した。

<APF (積水メディカル) による細胞質内 \cdot OH の測定>

放射線は細胞中の水分子を電離させ、 \cdot H と \cdot OH を発生させる。発生した \cdot H と \cdot OH が再び結合し、水分子に戻ると何も問題は生じないが、ラジカルは非常に結合しやすい性質を持っているため、他の分子と結合した場合、結合した分子の性質を変えてしまう可能性が考えられる。そのため、 \cdot OH 検出用蛍光試薬である APF (積水メディカル) を用いて、細胞質内で産生される \cdot OH の測定を行なった。

1.5 ml チューブ内で PBS 溶液 1 ml 中に 1.0 \times 10⁵ 個の細胞を入れた後、6000 rpm で 30 秒遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、5 μ M に希釈した APF (積水メディカル) を 1 ml 注入し、攪拌した後、37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ インキュベーター内で 30 分静置した。静置後、6000 rpm で 30 秒遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 400 μ l を注入し、攪拌した。攪拌後、6000 rpm で 1 分遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 1ml を注入し攪拌したものを、励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm の分光蛍光光度計を用いて測定した。

III-2-3. 結果

<骨髄細胞および末梢血リンパ球における DNA 損傷数の線量反応関係>

X線を全身照射したマウスの骨髄細胞および末梢血リンパ球におけるリン酸化ATMフォーカス数の線量反応関係を図III-6に示す。図III-6より、末梢血リンパ球における細胞1個あたりのリン酸化ATMフォーカス数は、非照射群では約10個、0.5 Gy照射群では約20個、1 Gy照射群では約23.7個、2 Gy照射群では約32.8個、3 Gy照射群では約59個となった。これに対して骨髄細胞では、非照射群では約4.4個、0.5 Gy照射群では約5個、1 Gy照射群では約9.3個、2 Gy照射群では約15.1個、3 Gy照射群では約12.5個となった。骨髄細胞におけるリン酸化ATMフォーカス数を末梢血リンパ球と比較すると、0.5 Gyでは約0.06倍、1 Gyでは約0.36倍、2 Gyでは約0.47倍、3 Gyでは約0.17倍になることが分かった。

<ミトコンドリア内 $\cdot\text{O}_2^-$ 産生量の経時的変化>

図III-7にMitoSOXの測定値の経時的変化を示す。図III-7より、照射後1日目のMitoSOXの値は、非照射群と比較して1 Gy照射群では約1.5倍、3 Gy照射群では約3倍増加していることが分かった。その後、MitoSOXの値は減少傾向を示し、照射後20日目には、両照射群ともに非照射群と差が見られなくなった。しかし、照射後400日が経過すると、マウスの個体間でばらつきがあるものの、1 Gy照射群では約1.3倍、3 Gy照射群では約1.5倍増加していることが分かった。

<細胞質内 $\cdot\text{OH}$ 産生量の経時的変化>

図III-8にAPFの測定値の経時的変化を示す。図III-8より、細胞質内の $\cdot\text{OH}$ は1 Gy照射群および3 Gy照射群ともに照射後30日まで非照射群と差が見られなかった。しかし、照射後400日以上が経過するとマウスの個体間でばらつきがあるものの、1 Gy照射群では約1.4倍、3 Gy照射群では約1.7倍増加していることが分かった。

<8-OHdG 生成量の経時的変化>

III-2-4. 考察

<骨髄細胞および末梢血リンパ球における DNA 損傷数の線量反応関係>

X線を全身照射したC3H/HeNJclマウスの骨髄細胞および末梢血リンパ球におけるDNA損傷の線量反応関係をリン酸化ATMフォーカスを指標として調べた。その結果、骨髄細胞に生じたリン酸化ATMフォーカス数は末梢血リンパ球の0.5 Gyでは約0.06倍、1 Gyでは約0.36倍、2 Gyでは約0.47倍、3 Gyでは約0.17倍となることが分かった。この結果は、骨髄細胞は末梢血リンパ球よりも放射線感受性が低いことが分かった。ではなぜ骨髄細胞は放射線に対して感受性が低いのだろうか？X線は細胞内の H_2O を電離して $\cdot\text{H}$ および $\cdot\text{OH}$ を生成することが知られている。これらのラジカルは生成されても再結合してしまえば H_2O に戻るだけだが、DNAと結合してしまうと塩基が変わってしまいDNA損傷になる可能性がある。この現象は間接効果といい、X線による生物影響を引き起こすメカニズムである。しかし、この効果は細胞の置かれている環境によって左右される。一般的に低酸素環境下で細胞を培養した方が放射線に抵抗性になる⁵⁾。ではなぜ酸素濃

度によってX線の感受性が変わるのだろうか？高酸素状態だと、X線によって細胞内に生じた $\cdot\text{H}$ が酸素分子と再結合してしまうため、フリーになった $\cdot\text{OH}$ 数が増加する。しかし、低酸素状態だと $\cdot\text{OH}$ は $\cdot\text{H}$ と結合する確率が増えるためフリーの活性酸素の数は減少する。つまり、低酸素状態の方が活性酸素とDNAが結合してDNA損傷になる確率が小さくなるということである。これにより低酸素下では放射線に抵抗性になる。大腿骨内は0.1~1%、血管内は7%の酸素濃度であることが報告されている⁶⁾。よって、骨髄細胞は末梢血リンパ球よりも放射線によるDNA損傷数が少なくなったのだろうと考えられた。

<活性酸素産生量の経時的変化>

放射線を照射したマウスの骨髄細胞における $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ 産生量の経時的変化を実験的に観察した。まず、MitoSOX Redを用いてミトコンドリア内の $\cdot\text{O}_2^-$ の値を測定した。その結果、照射後1日目での $\cdot\text{O}_2^-$ の産生量は非照射群と比較して1Gy照射群では約1.5倍、3Gy照射群では約3倍に増加した。その後は減少していき、照射後20日には両照射群とも非照射群と差がみられなくなった。しかし、400日が経過すると、マウス個体間でばらつきがあるものの、1Gy照射群では約1.3倍、3Gy照射群では約1.5倍に増加した。ミトコンドリアは細胞の活動に必要なATPを酸素を使って生成する。その際、副産物として $\cdot\text{O}_2^-$ が産生される。これまでの研究で細胞が分裂期に入ると $\cdot\text{O}_2^-$ のレベルが徐々に増えていき、 G_0 期に移行するとミトコンドリアが持っている抗酸化能が活性化して $\cdot\text{O}_2^-$ は徐々に減少していくことが報告されている⁷⁾。よって、本研究で見られた放射線照射後20日目まで見られた $\cdot\text{O}_2^-$ の増加は、放射線照射によってアポトーシスが起きた血液系の細胞を補うために、骨髄細胞中の造血幹細胞が分裂期に入っていた結果ではないかと考えられる。そして、十分な量の血液が補えると徐々に分裂期から G_0 期に移行していき、照射後20日ではほとんどの造血幹細胞が G_0 期になることで、 $\cdot\text{O}_2^-$ のレベルが非照射群と同様になるのだろうと考えられた。この考えを示唆する結果として、放射線照射後の造血幹細胞の細胞動態の変化をシミュレーション計算で調べた結果、照射を受けた造血幹細胞は照射直後から分裂期に入る割合が増加するということが報告されている⁸⁾。では照射してから400日以降に再び見られた $\cdot\text{O}_2^-$ の増加はどう考えればいいのか。これまでの研究で、細胞が老化するとミトコンドリアの抗酸化能が低下し、細胞中に活性酸素種が蓄積するということが報告されている。例えば、高齢のマウスから取り出したミトコンドリアは、若齢のマウスのミトコンドリアよりも多くの活性酸素種を産生している^{9,10)}。これを踏まえて一つの可能性を考えた。放射線照射によって引き起こされた血液系の細胞の損出を補うために、骨髄細胞中の造血幹細胞は分裂期に入る。これにより、細胞の老化が促進され、ミトコンドリアの抗酸化能が低下していき、照射後400日以上経過したマウスの骨髄細胞に $\cdot\text{O}_2^-$ の増加が生じたのではないかと考えた。

次に、本研究ではAPFを用いて細胞質内の $\cdot\text{OH}$ も測定した。その結果、 $\cdot\text{OH}$ のレベルは照射後30日まで1Gy照射群および3Gy照射群ともに非照射群と差がみられなかった。しかし、照射後400日目では1Gy照射群で約1.4倍、3Gy照射群で約1.7倍に増加した。 $\cdot\text{OH}$ は放射線が細胞内の水分子を分解することによって生じる。しかし、この $\cdot\text{OH}$ は非常に反応性が高いため、他のフリーラジカルと結合して消滅してしまう。よって、 $\cdot\text{OH}$ を検出するためには放射線照射直後か持続的に産生されている状態にあることが必要になる。今回、放射線照射後1日目から測定を開始したため、 $\cdot\text{OH}$ の産生量に非照射群と違いがなかったのかもしれない。では照射してから400日目に以降になぜ $\cdot\text{OH}$ は増加したのだろうか。一つの可能性としては先にも挙げた細胞の老化が関係し

ていると考えられる。2010年に Cadet らはミトコンドリア内で生成された $\cdot\text{O}_2^-$ が H_2O_2 に変換されて核まで到達し、核内で $\cdot\text{OH}$ になることを報告した¹¹⁾。このことから、本研究で見られた $\cdot\text{OH}$ の増加は、放射線によって老化が促進された造血幹細胞中のミトコンドリアが盛んに $\cdot\text{O}_2^-$ を産生することで、 H_2O_2 を生じ、核内に移行して $\cdot\text{OH}$ になっているのではないかと考えた。では $\cdot\text{OH}$ が生成されると生物学的にどのような影響が生じるのだろうか。 $\cdot\text{OH}$ はDNAの塩基と結合しやすく、その結果、シトシンがウラシル、グアニンが8ヒドロキシグアニン等になってしまう。これらを塩基損傷という。通常、塩基損傷は塩基除去修復によってほぼ100%元通りに修復されるが、塩基損傷の数が多くなると修復しきれず、点突然変異の原因となってしまう。よって、細胞内で $\cdot\text{OH}$ が増加するという事は点突然変異が生じるチャンスも増えることを意味している。

従って、本研究結果より、放射線が骨髓細胞中の造血幹細胞に老化を引き起こすことで、照射後400日以降にミトコンドリア内で $\cdot\text{O}_2^-$ が増加し、それが核内で $\cdot\text{OH}$ となって点突然変異を起こす可能性が示唆された。この点突然変異がAMLに必須な2番染色体の*Sfpi1*遺伝子で生じる可能性が十分考えられる。従って、放射線による造血幹細胞の老化が間接的にAMLの発症につながる事が示唆された。

引用文献

- 1) Trakhtenbrot L Krauthgamer R Resnitzky P et al. Deletion of chromosome 2 is an early event in the development of radiation-induced myeloid leukemia in SJL/J mice. *Leukemia*, 1988; 2: 545-550
- 2) Hayata I. Leukemogenesis and chromosomal abnormalities: experimental animals. *Acta Haematol. Jpn*, 1985; 48: 1857-1863
- 3) 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
- 4) Iwasaki H Arai F Kubota Y et al. Endothelial protein C receptor-expressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver. *Blood* 2010; 116: 544-553.
- 5) Hirayama R Furusawa Y Fukawa T et al., Repair Kinetics of DNA-DBS Induced by X-rays or Carbon Ions under oxic and Hypoxic Conditions. *J. Radiation Res.*, 2005; 46: 325-332.
- 6) Richardson RB. Stem cell niches and other factors that influence the sensitivity of bone marrow to radiation-induced bone cancer and leukaemia in children and adults. *International Journal of Radiation Biology*, 2011; 87: 343-359.
- 7) Redpath JL Gutierrez M. Kinetics of induction of reactive oxygen species during the post-irradiation expression of neoplastic transformation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001; 77: 1081-1085.
- 8) Ban N Kai M. Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *Br. J. Cancer* 2009; 101: 363-371.
- 9) Sohal RS Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1992; 663: 74-84.
- 10) 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.
- 11) Cadet J Douki T Ravant J-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biol. Med.* 2010; 49: 9-21.

図表

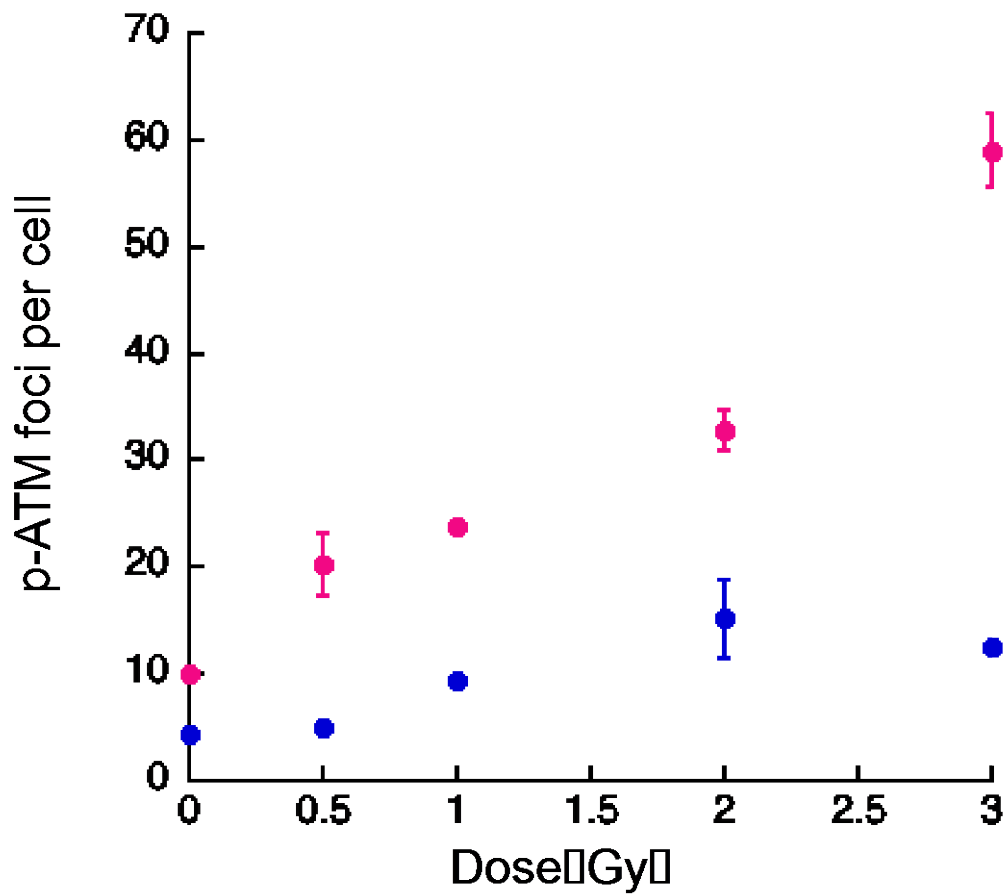


図 III-6 X線を全身照射したマウスの骨髄細胞および末梢血リンパ球における DNA 損傷の線量反応関係

●：骨髄細胞、●：末梢血リンパ球、エラーバーは標準誤差をそれぞれ表す。

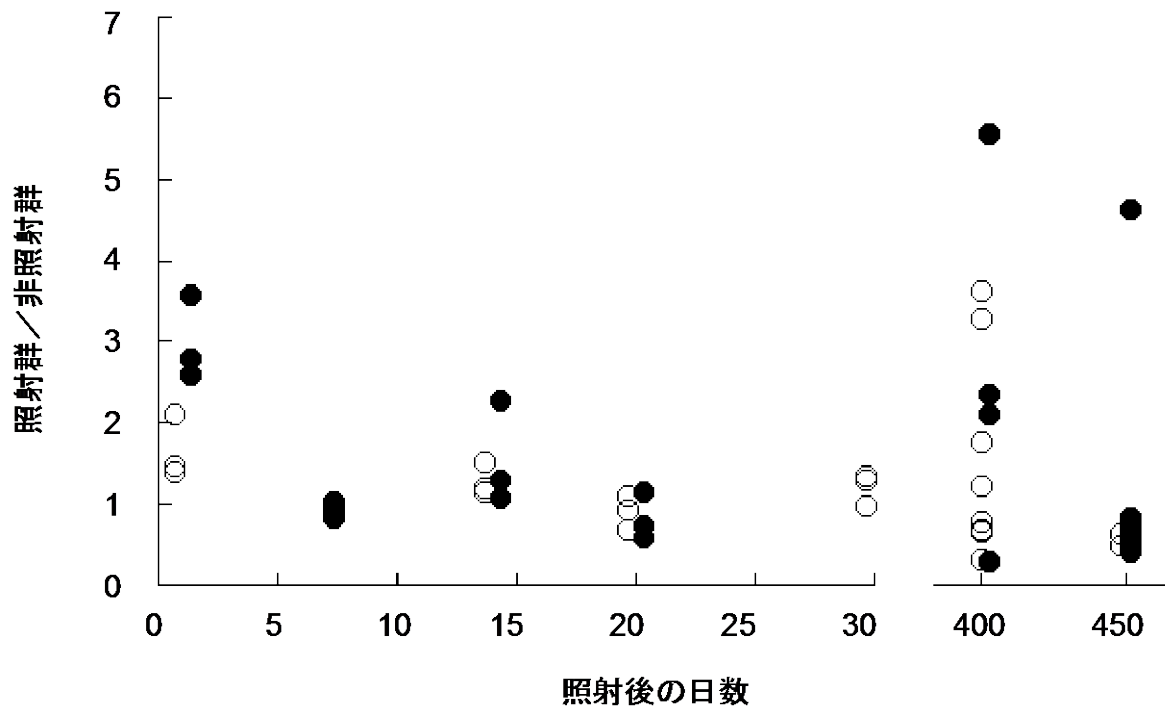


図 III-7 X線を全身照射したマウスの骨髄細胞における O_2 ラジカルの経時的变化
● : 3 Gy、○ : 1 Gyを表す。

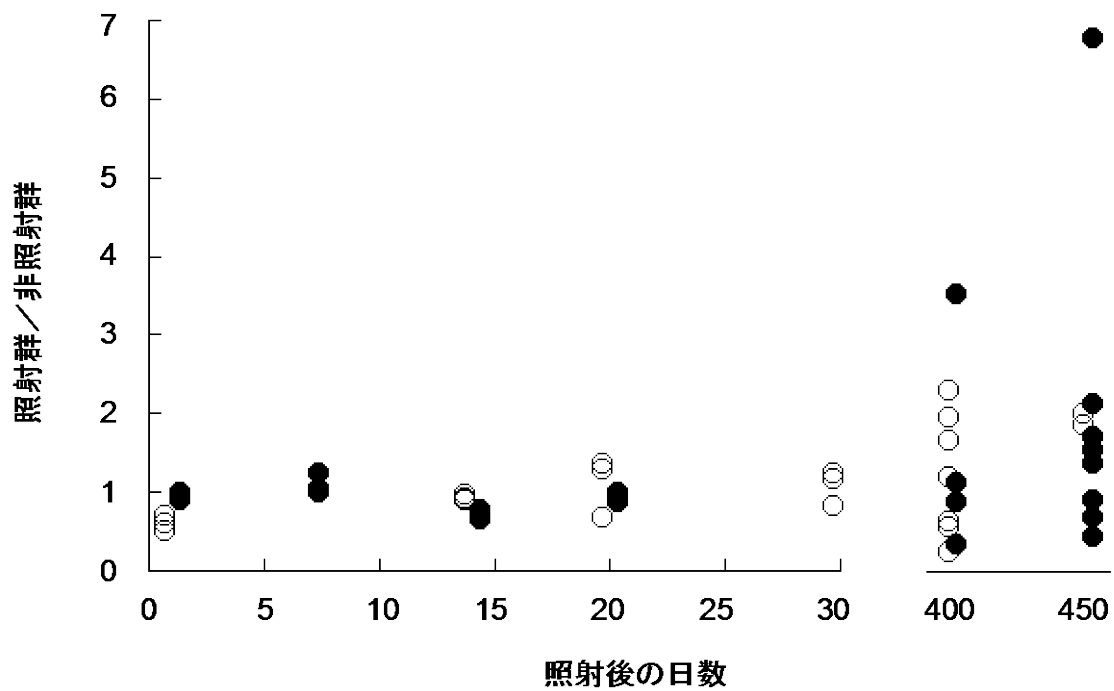


図 III-8 X線を全身照射したマウスの骨髄細胞におけるOHラジカルの経時的変化
 ● : 3 Gy、○ : 1 Gyを表す。

III-3. 低線量率 γ 線長期連続照射したマウスの造血幹/前駆細胞における細胞動態の経時的変化

III-3-1. 目的

放射線発がんの代表例である急性骨髄性白血病 (AML) は、これまでに AML モデルマウスである C3H/HeN Jcl マウスを用いて、1) 放射線照射から平均して 1-2 年の潜伏期間があること¹⁻⁵⁾、2) 2 番染色体の欠失型異常⁶⁻¹⁰⁾ および対立する 2 番染色体上の *Sfpil* 遺伝子の点突然変異¹¹⁻¹³⁾ が必須であることが明らかになっている。これらの異常のうち 2 番染色体の欠失型異常は放射線照射後の比較的早い段階で生じる可能性が報告されている^{7, 14, 15)}。

Sfpil 遺伝子の点突然変異については放射線照射後どのような経過で生じるのか明らかではない。そこで本研究では *sfpil* 遺伝子の点突然変異のメカニズムを次ぎのように考えた。マウスの全身に放射線を照射すると早い段階で抹白血球数の減少が生じる。これに対応するために、造血幹細胞 (HSC) の持続的な分裂活性が上昇し²⁰⁾、これにより老化が促進される^{21, 22)}。細胞に老化が生じると抗酸化能の低下が起こり^{23, 24)}、細胞内に活性酸素種 (ROS) が蓄積してしまう。ROS は点突然変異を引き起こす因子になりうるので、これにより *sfpil* 遺伝子に点突然変異が生じるのではないかと考えられる。ROS 以外にも、HSC の分裂活性の上昇に伴う複製ストレス^{21, 25)} が遺伝子変異を引き起こす可能性もある。

そこで本研究では放射線照射後の AML 誘発過程における造血系細胞の動態変化を線量率毎に明らかにすることを目的として、20 mGy/day、200 mGy/day、1000 mGy/min の線量率で照射した C3H/HeN Jcl マウスの造血系幹細胞 (HSC)、前駆細胞 (MPP, CMP, CLP) および末梢血細胞 (WBC, RBC, PLT) の動態を細胞数と Ki67 (G₀期以外の細胞のマーカー) 発現細胞の割合を指標として調べた。また、細胞動態の変化に伴う活性酸素種発現細胞の割合の経時的変化も調べた。

III-3-2. 方法

<マウス>

本研究では 8 週齢の♂の C3H/HeN Jcl マウスを用いた。マウスは最大 4 匹ずつケージに収容し、温度、湿度、室内照明の明暗サイクルが管理された SPF 環境下の飼育室中で飼育した。固形飼料と水を自由に摂取させた。

< γ 線の照射>

γ 線照射は環境科学技術研究所に設置してある Cs-137 低線量率 γ 線照射装置を用いた。マウスを非照射群 (0Gy)、20 mGy/day 群、200 mGy/day 群、1 Gy/min 群の 4 群に分け、集積線量が 3 Gy に到達するまで γ 線を全身に連続照射した。照射期間は 20 mGy/day 群では 150 日、200 mGy/day 群では 15 日、1 Gy/min 群では 3 分である。本研究では 1 群 35 匹のマウスを使用した。また、飼育は照射開始から最大で 250 日間行なった。照射スケジュールは図 III-9 に示す。

<血球数の測定>

マウスをエーテルで麻酔後頸椎脱臼し、心臓採血を行なった。その後コールターカウンターを

用いて、白血球 (WBC)、赤血球 (RBC)、血小板 (PLT) の数を計測した。

<フローサイトメーターによる造血幹/前駆細胞の単離および測定>

フローサイトメーターによる各分化段階の造血幹/前駆細胞の単離は Hirouchi らによって確立されているプロトコールに従って行なった²⁶⁾。下記に簡単に説明する。エーテル麻酔後頸椎脱臼したマウスの両側の大腿骨から骨髓細胞を摘出した。各分化段階の造血系細胞は細胞膜表面タンパク質の発現パターンが異なっていることが分かっている。その特性を利用してそれぞれのタンパク質の抗体処理を行ない、フローサイトメーターにて造血幹細胞 (HSC)^{*1}、多能性前駆細胞 (MPP)^{*2}、骨髓球系造血前駆細胞 (CMP)^{*3}、リンパ球系前駆細胞 (CLP)^{*4}をそれぞれ単離した。この操作は全て環境科学技術研究所にて実施した。

^{*1}HSC : CD34 陰性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

^{*2}MPP : CD34 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陽性

^{*3}CMP : CD34 陽性、Lin 陰性、sca1 陰性、c-kit 陽性

^{*4}CLP : CD34 陽性、Lin 陰性、sca1 陽性、c-kit 陰性

<Ki67 の免疫蛍光抗体染色>

HSC、MPP、CMP、CLP を 4% パラフォルムアルデヒド溶液で固定した。その後、1200 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、PBS 溶液 200 μ l を加え、よく攪拌した後に 1200 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上澄み液を捨て、ブロッキング溶液^{*1}を 200 μ l 入れ、よく攪拌し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した。静置後、1200 rpm で 5 分間遠心した後、上澄み液を捨て、その後、1 次抗体液^{*2} 200 μ l を加え、よく攪拌した後、37 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。静置後、1200 rpm で 5 分間遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 100 μ l で攪拌した。攪拌後、再度 1200 rpm で 5 分間遠心し、上澄み液を捨てた後、2 次抗体液^{*3} 100 μ l を加え、よく攪拌し、37 $^{\circ}$ C、暗室の環境下で 1 時間静置した。静置後、1200 rpm で 5 分間遠心し、上澄み液を捨て、PBS 溶液 100 μ l を加え、よく攪拌した。この操作を 3 回くり返した後、再度 1200 rpm で 5 分間遠心し、上澄み液を捨て、DAPI II counterstain (Vysis) 10 μ l を加え、よく攪拌し、全量をカバーガラスに乗せて、スライドガラスに貼付けた。

^{*1}ブロッキング溶液 : 0.5% Triton X で 0.03g/ml の濃度に調整した BSA 溶液。

^{*2}1 次抗体 : Anti-Ki67 Rabbit-Poly (Novus USA) とブロッキング液を 1:299 で混合した溶液。

^{*3}2 次抗体 : Ale Xa 488 (life technologies) とブロッキング液を 1:199 で混合した溶液。

<Ki67 発現細胞の観察および解析>

Ki67 を発現している細胞は蛍光顕微鏡 OPTIPHOT-2 (Nikon) を用いて観察した。DAPI で染色されている細胞は蛍光フィルター DM400 UV-2A (Nikon) で、Ki67 を発現している細胞は蛍光フィルター DM510 B-2A (Nikon) でそれぞれ観察した。露出: 40 ms、ゲイン: 27.0 X、コントラスト: リニアで観察を行った。DAPI で染色された細胞から全細胞数を求め、Ki67 を発現している細胞 (細胞増殖期にある細胞) の割合を計測した。

<活性酸素種の測定>

10⁵個のHSC、MPP、CMP、CLPを5 ml チューブに移した。その後、300 G で5 分間分離し、上澄み液を除去した。200 µl のPBS で再懸濁し、500 µMのCellRoxGreen を2 µl 添加して、37 °Cの暗室で30 分間インキュベートした。その後、1 ml のPBS を添加し300 G で5 分間遠心分離した。上澄み液を除去し、2 mlのPBS で再懸濁した。再び300 G で5 分間遠心分離し、上澄み液を除去した後、200 µl のPBS で再懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析を行った。

<統計解析>

本研究では、照射群と非照射群、および線量率間での細胞数の差を t 検定で比較し、p<0.05 を有意差有りとして評価した。

III-3-3. 結果

<血球数の経時的変化>

20 mGy/day 群における血球数の経時的変化を図 III-13~15 に示す。WBC 数は照射開始後から 50 日目まで減少傾向を示し、50 日目以降も回復傾向は見られなかった (図 III-13)。RBC 数および PLT 数は照射開始から 250 日目までの間照射群と同様の変化を示した (図 III-14, 15)。

200 mGy/day 群における血球数の経時的変化を図 III-16~18 に示す。WBC 数は、照射開始から 15 日目までにかけて急激な減少を示し、集積線量が 3Gy に達した 15 日目以降は 250 日目まで変化が見られなかった (図 III-16)。RBC 数は照射開始から 15 日目まで減少傾向を示し、その後 110 日目まで回復していく傾向が観察された (図 III-17)。PLT 数は照射開始から 15 日目までにかけて急激な減少を示したが、その後は回復傾向を示し、65 日目以降は非照射群と差は見られなくなった (図 III-18)。

1 Gy/min 群における血球数の経時的変化を図 III-19~21 に示す。WBC 数は照射後 50 日目までにかけて減少傾向を示した。しかし、その後は回復傾向を示し、100 日目以降は非照射群と差が見られなくなった (図 III-19)。RBC 数および PLT 数は照射後 250 日目まで非照射群と同様の変化を示した (図 III-20, 21)。

集積線量が 3 Gy に達した時点での線量率間の差を検討した結果、WBC 数は差が見られなかったが、RBC 数および PLT 数は 200 mGy/day 群で 20 mGy/day 群および 1 Gy/min 群よりも有意な減少が認められた。

<造血幹/前駆細胞数の経時的変化>

20 mGy/day 群における造血幹/前駆細胞数の経時的変化を図 III-26~29 に示す。HSC 数は照射開始してから徐々に減少していく傾向が見られ、100 日目では非照射群との間に有意差が認められた。その後は回復傾向を示したが、1 匹の外れ値のデータを除くと 250 日目でも非照射群のレベルまでは回復していなかった (図 III-26)。MPP 数は照射開始から 10 日目まで非照射群よりも低い値を示していたが、その後回復していく傾向が見られた。しかし、250 日目でも非照射群のレベルまでは達していなかった (図 III-27)。CMP 数は照射開始から 150 日目まで非照射群と同様の変化を示した。しかし、250 日目では非照射群との間に有意な減少が見られた (図 III-28)。CLP 数は照射開始から 250 日目まで非照射群と同様の変化を示した (図 III-29)。

200 mGy/day 群における造血幹/前駆細胞数の経時的変化を図 III-30~33 に示す。HSC 数は照射

開始後 5 日目に急激な減少を示したが、集積線量が 3Gy に達した 15 日目以降は非照射群と同様の变化を示した。しかし、250 日目では 1 匹の外れ値を除くと非照射よりも有意な減少が認められた(図 III-30)。MPP 数は照射開始から 250 日目まで非照射群と同様の变化を示した(図 III-31)。CMP 数は照射を開始してから 15 日目まで急激に減少し、その後は非照射群と同様の变化を示した(図 III-32)。CLP 数は照射開始から 250 日目まで非照射群と同様の变化を示した(図 III-33)。

1 Gy/min 群における造血幹/前駆細胞数の経時的変化を図 III-34~37 に示す。HSC 数は照射後 100 日目まで非照射群と同様の变化を示した。しかし、250 日目に有意な増加が見られた(図 III-34)。MPP 数は照射後 250 日目まで非照射群と同様の变化を示した(図 III-35)。CMP 数および CLP 数も照射後 250 日目まで非照射群と同様の变化を示した(図 III-36, 37)。

集積線量が 3 Gy に達した時点での線量率間の差を検討した。その結果、HSC 数は線量率間で差が見られなかった。MPP 数、CMP 数は 1 Gy/min 群と 20 mGy/day 群との間には差は見られなかったが、200 mGy/day 群は 20 mGy/day 群および 1 Gy/min 群よりも有意な減少が認められた。CLP 数は 20 mGy/day 群および 200 mGy/day 群が 1 Gy/min 群よりも有意な減少を示したが、20 mGy/day 群と 200 mGy/day 群との間には有意な差は見られなかった。

<造血幹/前駆細胞の Ki67 発現細胞の割合の経時的変化>

造血幹/前駆細胞における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化を 20 mGy/day 群は図 III-42~45、200 mGy/day 群は図 III-46~49、1 Gy/min 群は図 III- 50~53 にそれぞれ示す。

20 mGy/day 群は HSC、MPP、CMP、CLP いずれも照射開始後から 100 日目にかけて Ki67 を発現している細胞の割合が増加していく傾向が見られた。しかし、その後は減少し、非照射群と差が見られなくなった。

200 mGy/day 群は HSC、MPP、CMP、CLP いずれも照射開始後から 10 日目に Ki67 を発現している細胞の割合が増加していく傾向が見られた。しかし、その後は減少し、非照射群と差が見られなくなった。

1 Gy/min 群は HSC、MPP、CMP、CLP いずれも照射後から 50 日目までは Ki67 を発現している細胞の割合に変化が見られなかった。しかし、100 日目に増加し、250 日目までも高い割合を示していることが分かった。

線量率間で Ki67 を発現している細胞の割合に差は見られなかった。

<造血幹/前駆細胞の活性酸素種発現細胞の割合の経時的変化>

造血幹/前駆細胞における活性酸素種 (ROS) を発現している HSC、MPP、CMP、CLP の割合の経時的変化を図 III-54 に示す。非照射群および 1 Gy/min 群ではいずれの細胞も ROS を発現している細胞が見られなかった。しかし、20 mGy/day では照射開始から 100 日目、200 mGy/day では照射開始から 50 日目以降に ROS を発現している HSC、MPP、CMP、CLP の割合が増加している傾向が観察された。

III-3-4. 考察

本研究では 20 mGy/day、200 mGy/day、1 Gy/min の線量率で γ 線を C3H マウスに長期連続照射し、血球数 (WBC、RBC、PLT) および造血幹/前駆細胞数がどのように変化するかを実験的に調べた。まず血球数の変化を調べた。その結果、血球数は 20 mGy/day 群では照射開始から 50 日目、200 mGy/day 群では照射開始から 5 日目まで徐々に減少していく傾向が見られた。しかし、その後は増減が見られなくなった。1 Gy/min 群では 3Gy に到達後すぐには血球数の減少は見られなかったが、その後 50 日目まで減少していくことが分かった。この結果から、線量率が 20 mGy/day および 200 mGy/day では、集積線量が 1 Gy のところで血球数の減少が顕著に起きていることが分かった。しかし、1Gy/min ではそのような傾向は見られなかった。

次に、造血幹/前駆細胞数の変化を調べた。その結果、HSC 数、MPP 数は、20 mGy/day 群では照射開始から 100 日目、200 mGy/day 群では照射開始から 10 日目、1 Gy/min 群では照射後 50 日目まで減少していく傾向が見られた。しかし、その後は徐々に増加していく傾向が見られたが、20 mGy/day 群および 200 mGy/day 群では照射開始から 250 日目 (20 mGy/day 群では照射後 100 日目、200 mGy/day 群では照射後 235 日目を意味する) であっても非照射群のレベルまで戻っていないことが分かった。CLP、CMP に関してはいずれの群も非照射群と同様の変化を示していた。本研究では造血幹/前駆細胞における Ki67 (G_0 期以外の細胞のマーカー) を発現している細胞の割合の変化も調べた。その結果、いずれの細胞も 20 mGy/day では照射開始から 100 日目、200 mGy/day では照射開始後 10 日目、1 Gy/min 群では照射後 100 日目に Ki67 を発現している割合が増加していることが分かった。これらの結果から、血球数の減少に応じて、上流の造血幹/前駆細胞の細胞動態が変化し、造血幹/前駆細胞数が増加して、下流の血球を補っている可能性が考えられた。しかし、いずれの線量率においても、血球数や造血幹/前駆細胞数が 3 Gy 照射後非照射群のレベルまで回復するには時間がかかることも分かった。

ではこれらの細胞動態の変化が AML に必須な異常を引き起こす原因となりうるだろうか。Wang らは 6.5 Gy の γ 線をマウスに全身照射し、造血幹細胞 (HSC) 数の経時的変化と p16 (細胞老化マーカー) を発現している HSC の割合を調べた。その結果、放射線照射直後から HSC 数は著しく減少し、14 日目から増加していくことを観察した。また、HSC 数の増加に伴い p16 を発現している HSC の割合も増加していることがわかり、HSC に細胞老化が生じていることを報告した²⁷⁾。さらに、彼らは、HSC 中の活性酸素種 (ROS) 産生量を調べた。そして、ROS が照射後 14 日目に非照射群と比較して 2.5 倍増加していることを報告した²⁸⁾。そこで、本研究でも同様の傾向が見られるのか造血幹/前駆細胞における ROS 発現細胞の割合の経時的変化を調べた。その結果、いずれの細胞も 20 mGy/day 群では照射開始後 5 日目と 150 日目に、200 mGy/day 群では照射開始後 1 日目と 65 日目に ROS を発現している細胞の割合が増加していた。しかし、1 Gy/min 群は非照射群と違いが見られなかった。

Redpath らは human hybrid 細胞 (Hela \times human skin fibroblast) を用い、細胞数の変化と ROS の関係を詳細に調べた。その結果、細胞数の増加に伴って ROS 発現細胞の割合も徐々に増加していき、コンフレントの状態を維持し続けると ROS 発現細胞の割合が減少していくことを報告した²⁹⁾。ROS は細胞増殖の際に産生されることが知られている。このことより、対数増殖期では ROS の発生と細胞内の抗酸化能による除去がスムーズに行なわれていることが分かった。また、コンフレントになった直後では、抗酸化能が一時的に低下し、その時点で細胞内にあった ROS が残存す

るのではないかと考えられる。本研結果で示した Ki67 発現細胞の割合の経時的変化と見比べてみると、ROS 発現細胞は Ki67 発現細胞の割合が増加している時点では見られていない。しかし、Ki67発現細胞の割合が非照射群のレベルになるとROS発現細胞の割合の増加が見られた。このことから、Rdpathらの報告と同様に造血幹／前駆細胞の増殖が終わったときにROSが細胞内に残存されていたことが分かった。また、1 Gy/minで ROS 発現細胞が観察されなかったのは、増殖期にある細胞が 250 日間存在し続けていたからかもしれない。この可能性を示唆するようにKi67を発現している細胞が一定の割合で250日目間存在し続けていた。

よって、以上の本研究結果より、1) 線量率に応じて抹消血球数の減少と伴に造血幹／前駆細胞の動態が変化すること、2) 細胞動態の変化によりROSの産生が生じることがそれぞれ分かった。

今後は、細胞動態の変化に伴うROSがAMLに必須な*Sfp1*遺伝子に点突然変異を引き起こす原因となりうるか直接調べる必要性が考えられた。

引用文献

- 1) Upton AC Wolff FF Furth J et al. A comparison of the induction of myeloid and lymphoid leukemias in X-irradiated RF mice. *Cancer Res*, 1958; 18: 842-848.
- 2) Major IR. Induction of myeloid leukemia by whole-body single exposure of CBA male mice to X-rays. *Br J Cancer*, 1979; 47: 285-291.
- 3) Mole RH Papworth DG Corp MJ. The dose-response for X-rays induction of myeloid leukemia in male CBA/H mice. *Br J Cancer*, 1983; 47: 285-291.
- 4) Resnitzky P Estrov Z Haran-Ghera N. High incidence of acute myeloid leukemia in SJL/J mice after X-irradiation and corticosteroids. *Leuk Res*, 1985; 9: 1519-1528.
- 5) Seki M Yoshida K Nishimura M et al. Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat Res*, 1991; 127: 146-149.
- 6) Hayata I Seki M Yoshida K et al. Chromosome aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. *Cancer Res*, 1983; 43: 367-373.
- 7) Trakhtenbrot L Krauthgamer R Resnitzky P et al. Deletion of chromosome 2 is an early event in the development of radiation-induced myeloid leukemia in SJL/J mice. *Leukemia*, 1988; 2: 545-550.
- 8) Rithidech KN Bond VP Cronkite EP et al. A specific Chromosomal deletion in murine leukemic cells induced by radiation with different qualities. *Exp Hematol*, 1993; 21: 427-431.
- 9) Clark DJ Meijne EI Bouffler SD et al. Microsatellite analysis of recurrent chromosome 2 deletions in acute myeloid leukaemia induced by radiation in F1 hybrid mice. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996; 16: 238-246.
- 10) 伴信彦. マウスの急性骨髄性白血病と 2 番染色体の異常. 放射線生物研究, 2000; 35: 115-126.
- 11) Cook WD McCaw BJ Herring C et al. PU.1 is suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood*, 2004; 104: 3437-3444.
- 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) 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 (AOCR-2)*, 2006.
 - 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) 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.
 - 23) Sohal RS Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann NY Acad Sci*, 1992; 663: 74-84.
 - 24) 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.
 - 25) Flach J Bakker ST Mohrin M Conroy PC Pietras EM Reynaud D et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing hematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 512:198-202.
 - 26) 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.
 - 27) Wang Y et al. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood*. 2006; 107: 358-366.
 - 28) 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.
 - 29) Redpath J.L Gutierrez M. Kinetics of induction of reactive oxygen species during the post-irradiation expression of neoplastic transformation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol*. 2001; 77: 1081-1085.

図表

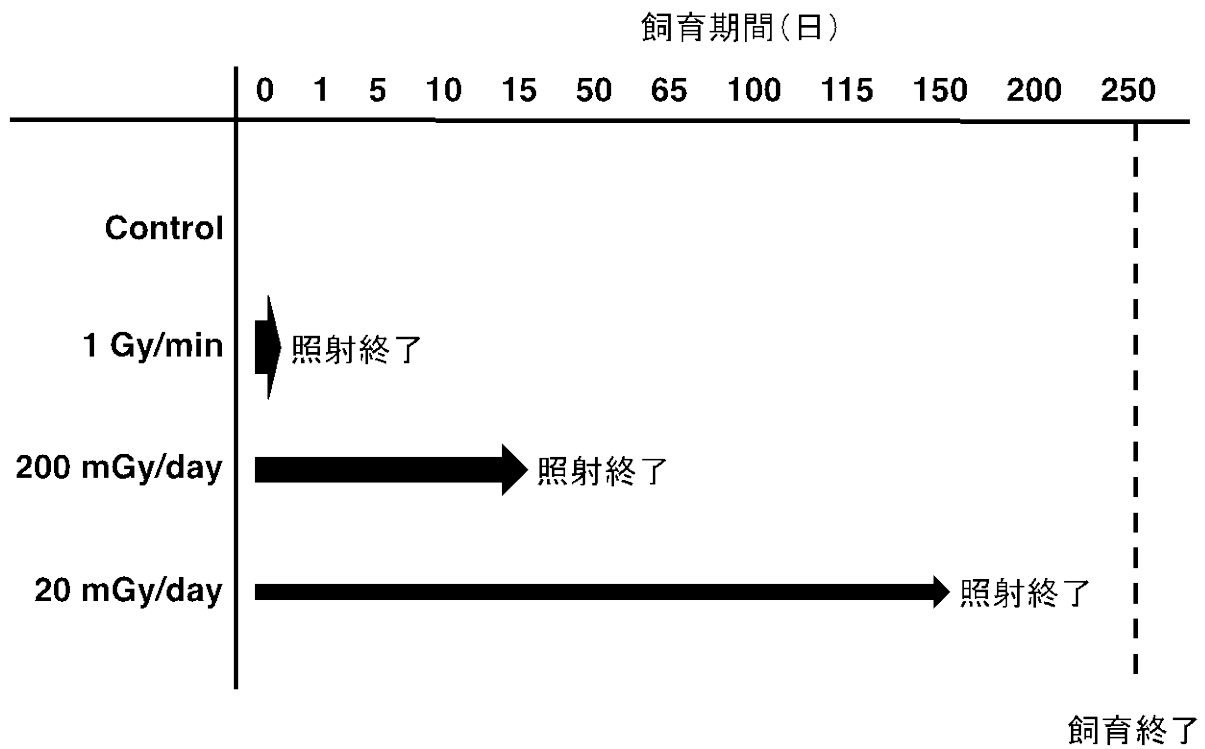


図 III-9 飼育・照射のスケジュール

8週齢の♂の C3H/HeNJcl マウスを温度、湿度、室内照明の明暗サイクルが管理された SPF 環境下で上記のスケジュールに沿って飼育・照射を行なった。

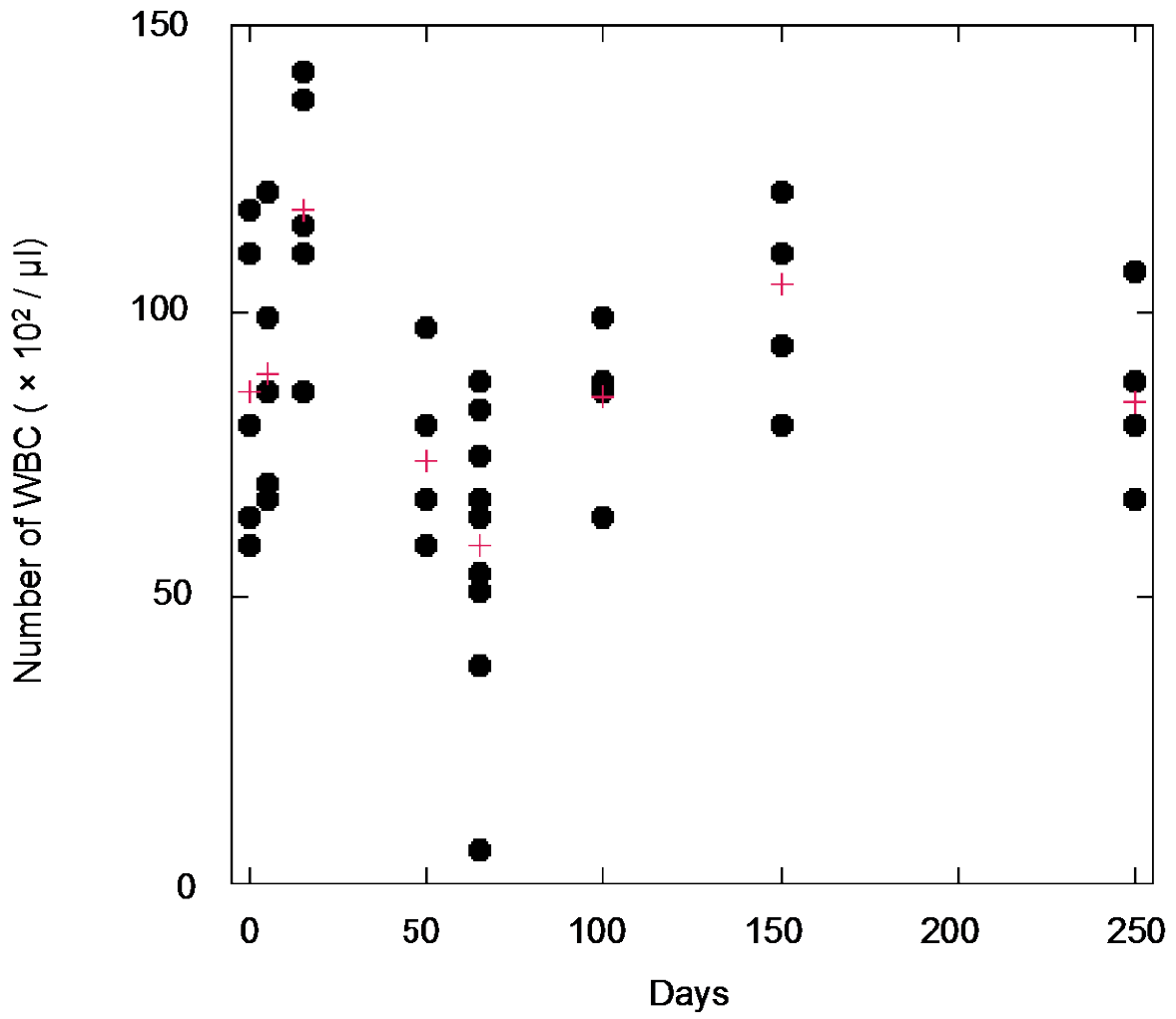


図 III-10 非照射群のマウスにおける WBC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の WBC 数、+ : 平均値を表す。

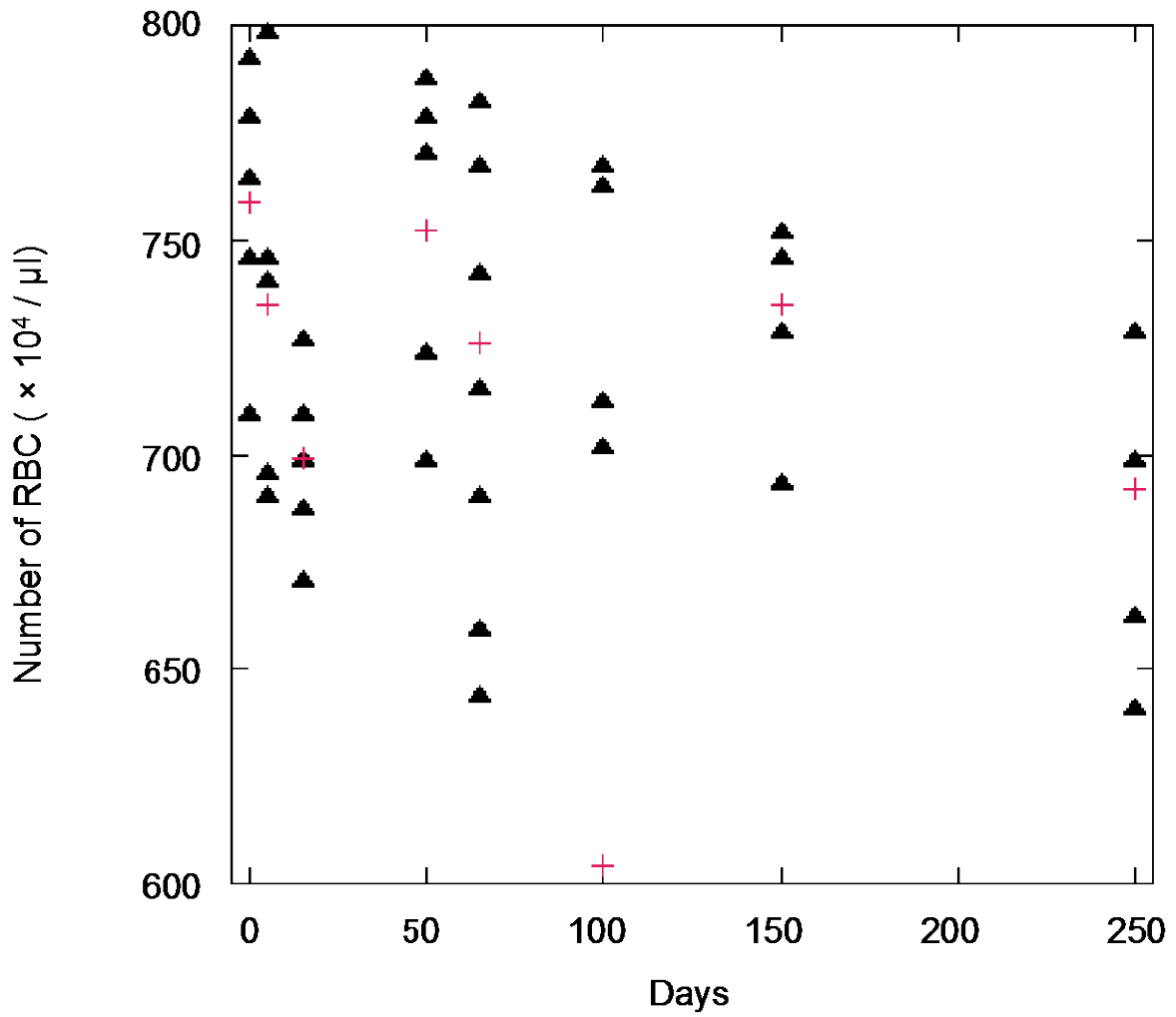


図 III-11 非照射群のマウスにおける RBC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の RBC 数、+ : 平均値を表す。

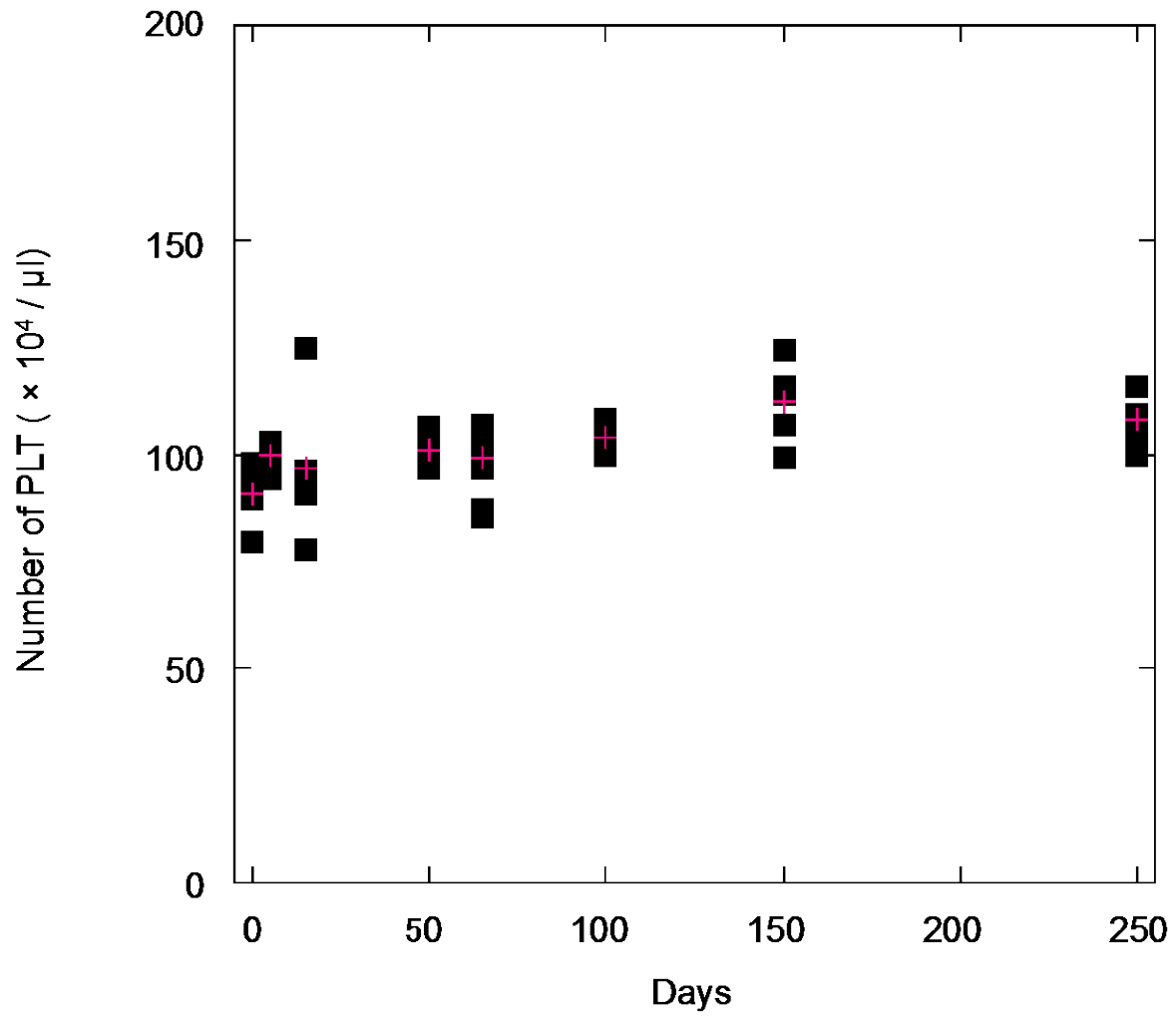


図 III-12 非照射群のマウスにおける PLT 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の PLT 数、+ : 平均値を表す。

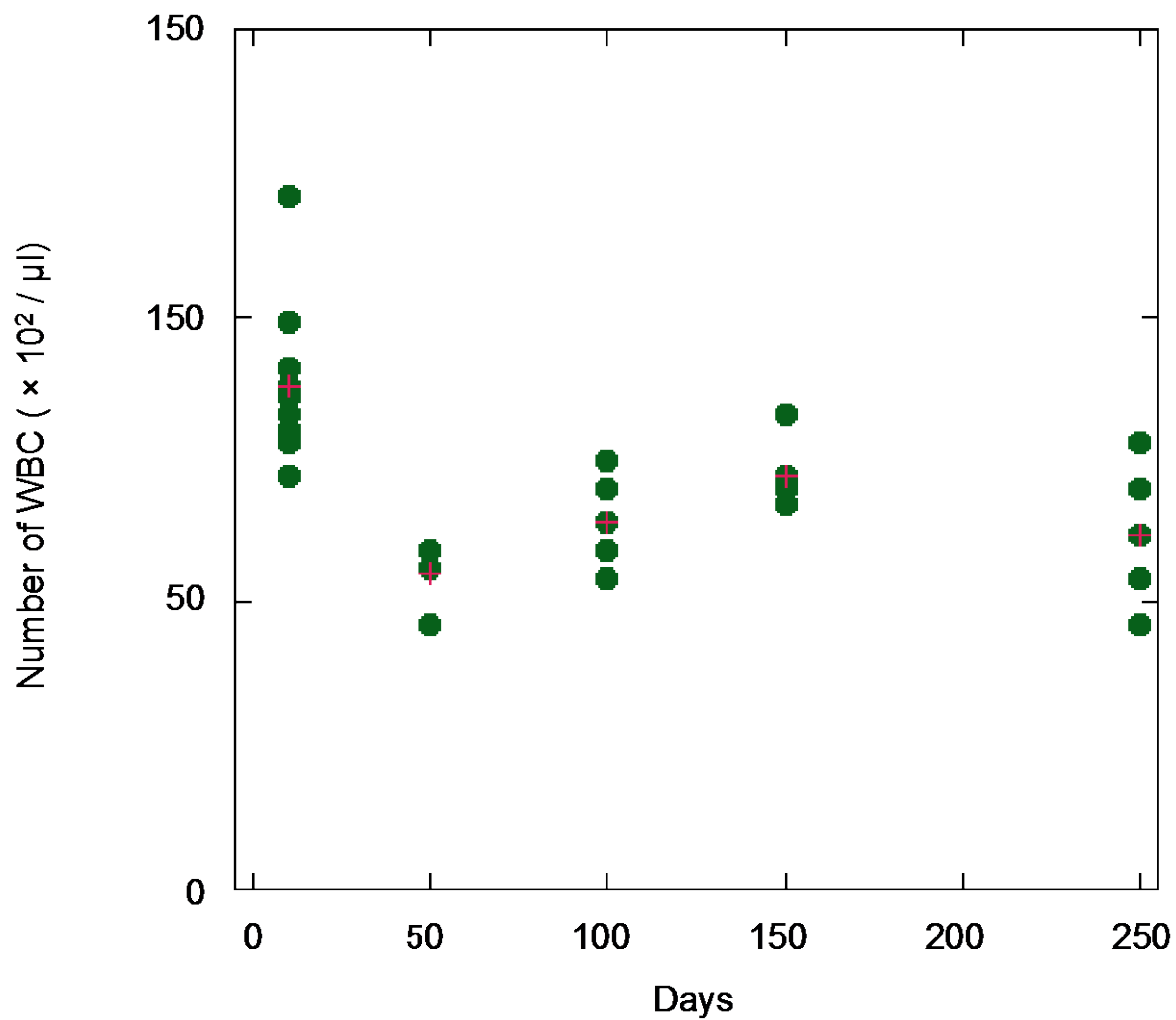


図 III-13 20 mGy/day 群のマウスにおける WBC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の WBC 数、+ : 平均値を表す。

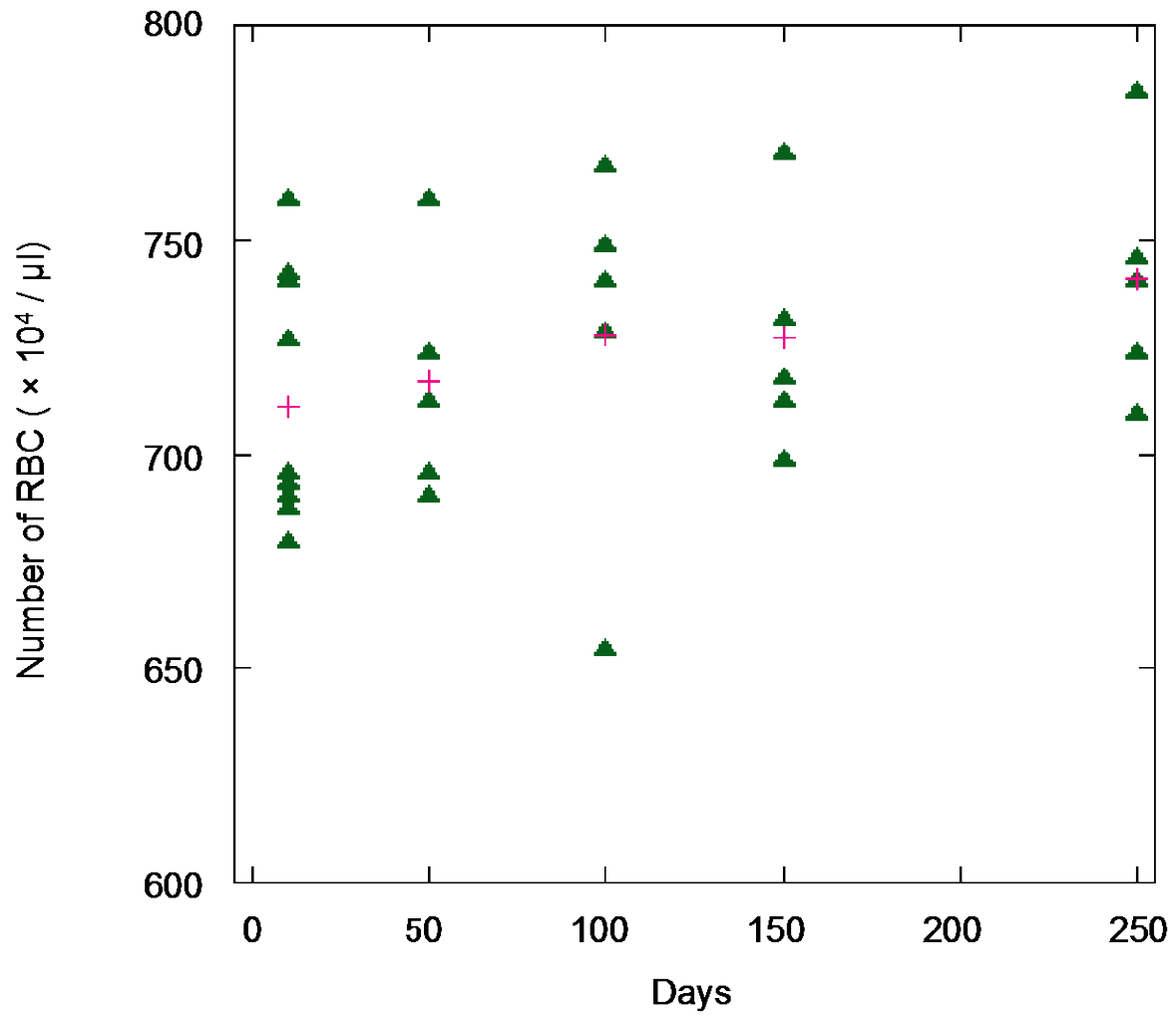


図 III-14 20 mGy/day 群のマウスにおける RBC 数の経時的変化

▲：マウス 1 匹毎の RBC 数、+：平均値を表す。

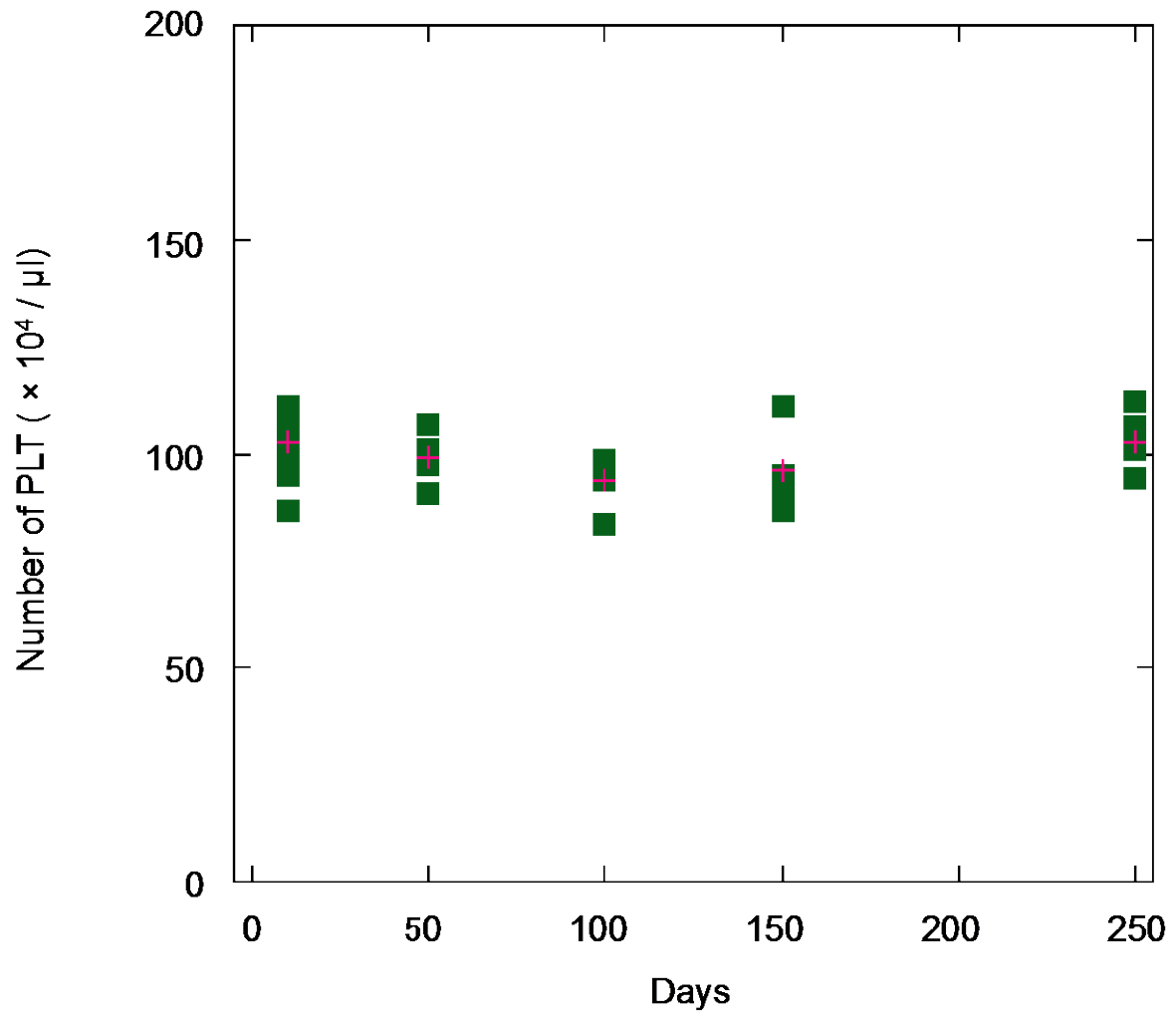


図 III-15 20 mGy/day 群のマウスにおける PLT 数の経時的変化

■ : マウス 1 匹毎の PLT 数、+ : 平均値を表す。

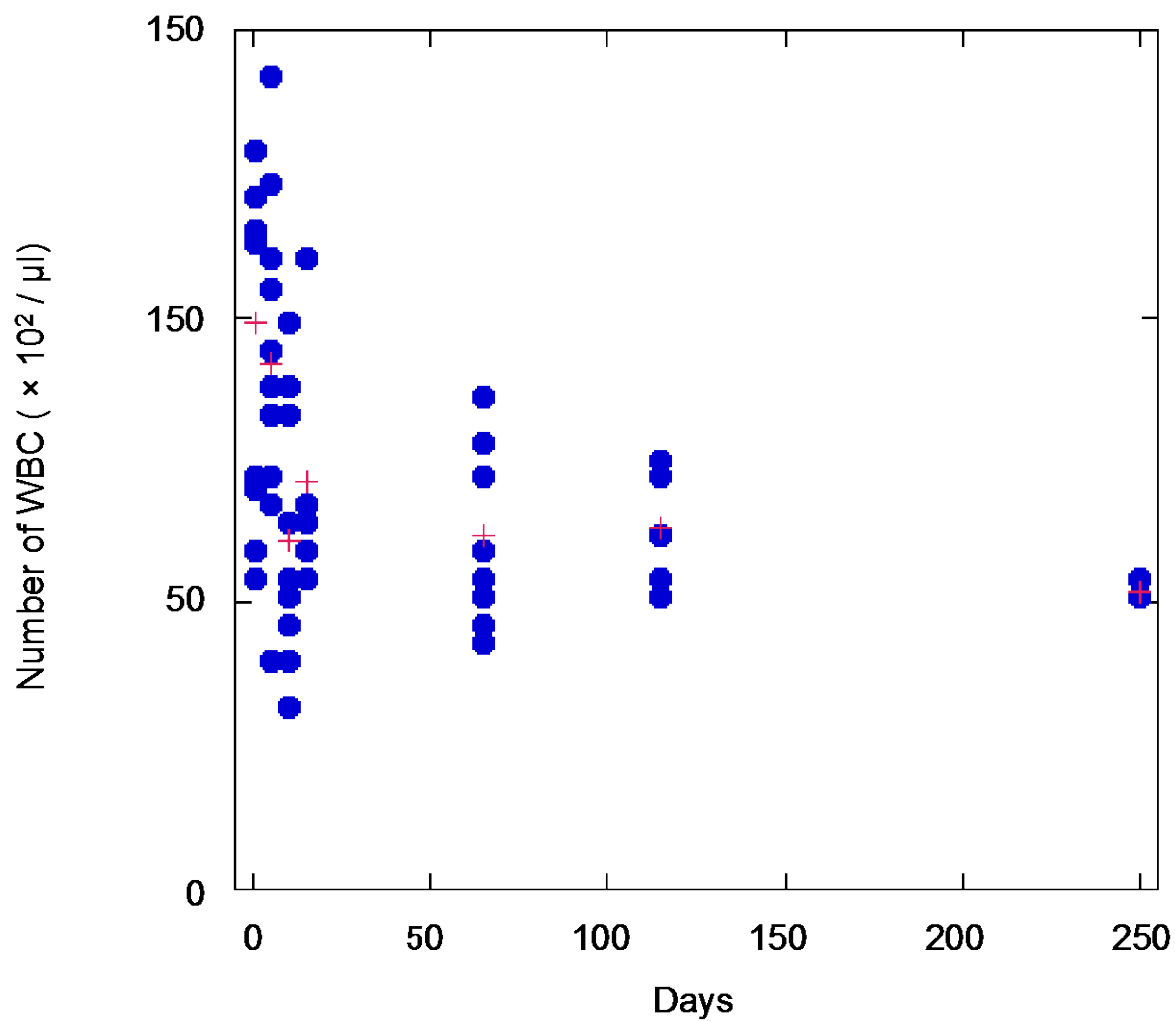


図 III-16 200 mGy/day 群のマウスにおける WBC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の WBC 数、+ : 平均値を表す。

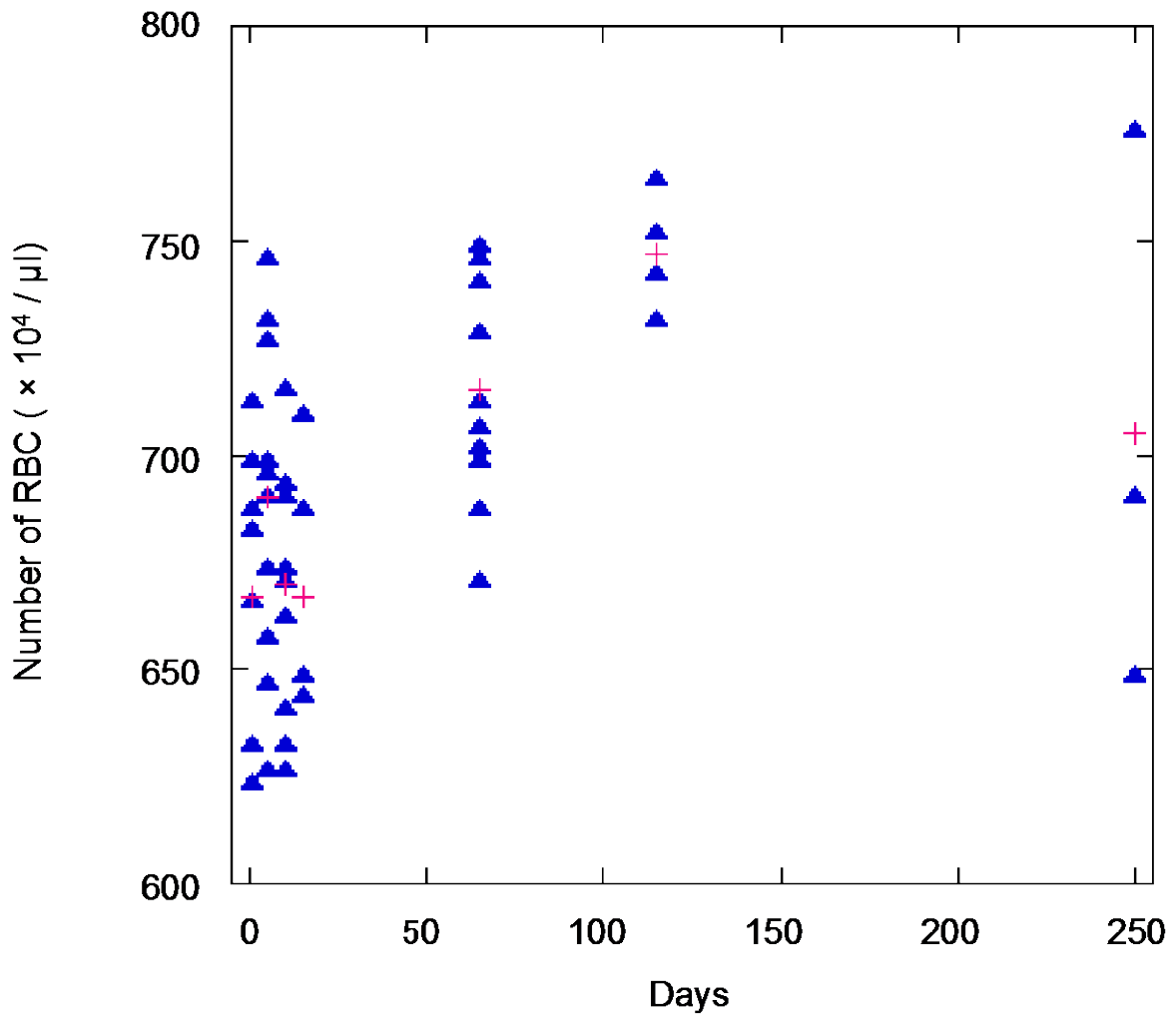


図 III-17 200 mGy/day 群のマウスにおける RBC 数の経時的変化
 ▲：マウス 1 匹毎の RBC 数、+：平均値を表す。

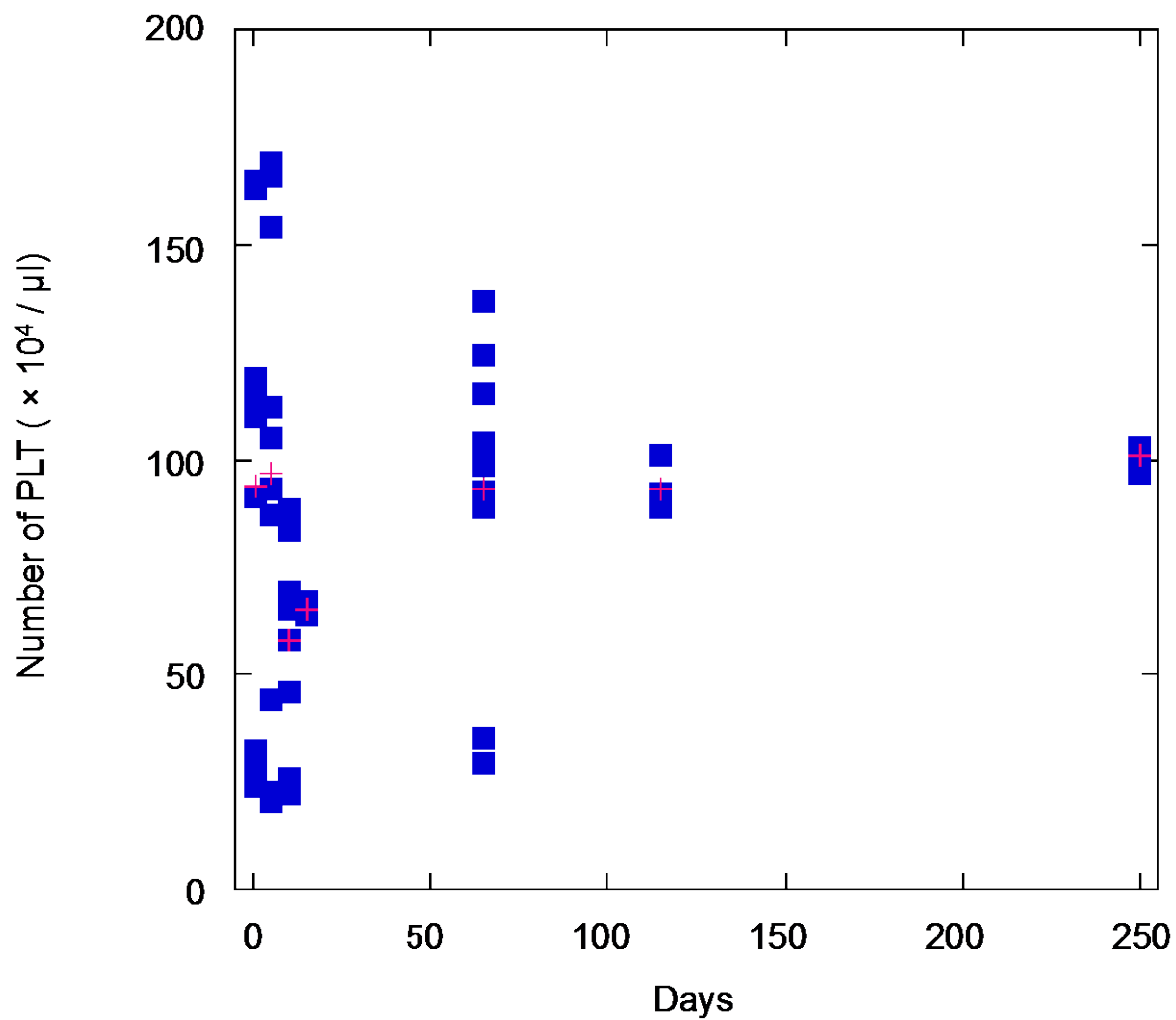


図 III-18 200 mGy/day 群のマウスにおける PLT 数の経時的変化

■ : マウス 1 匹毎の PLT 数、+ : 平均値を表す。

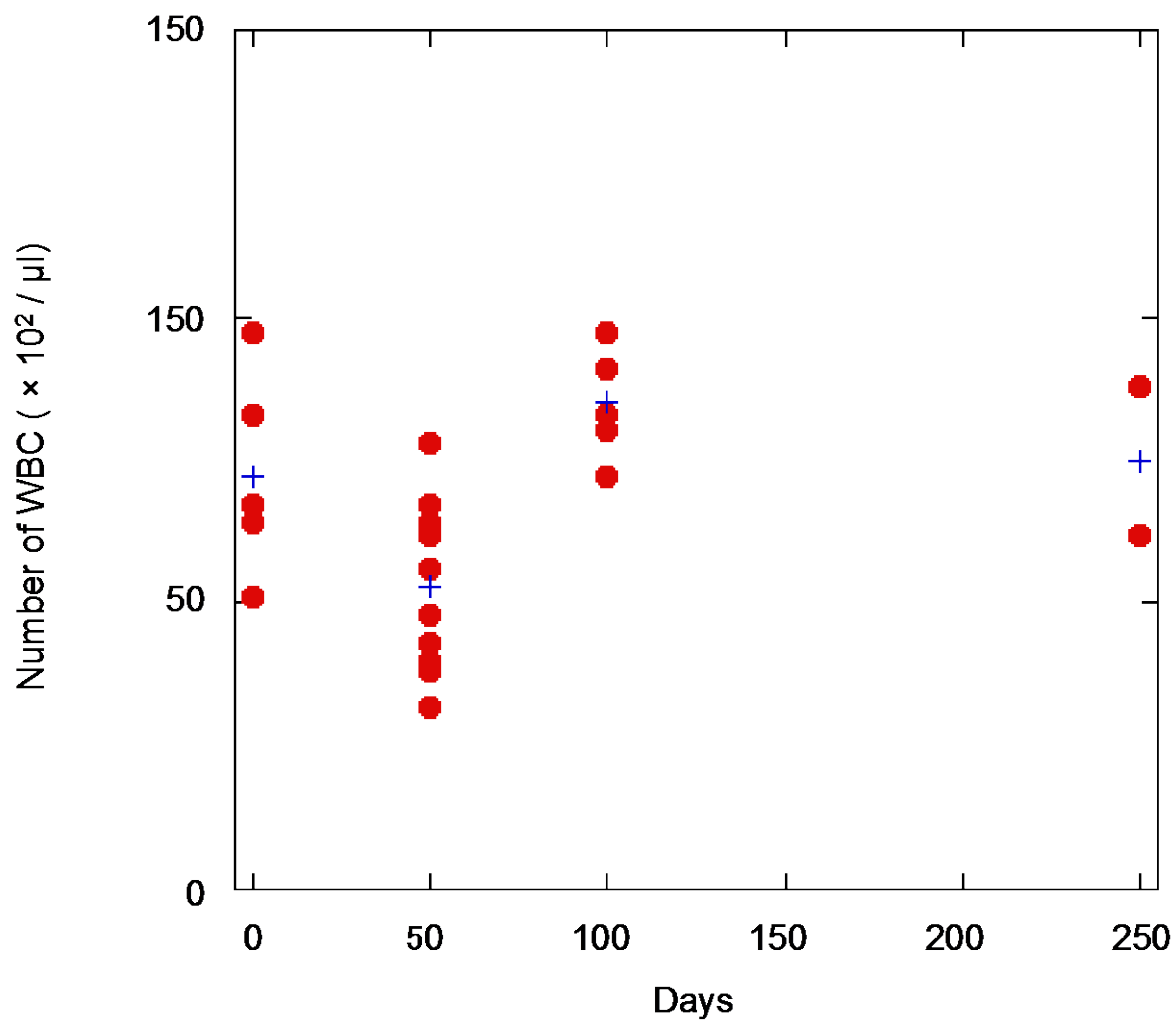


図 III-19 1 Gy/min 群のマウスにおける WBC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の WBC 数、+ : 平均値を表す。

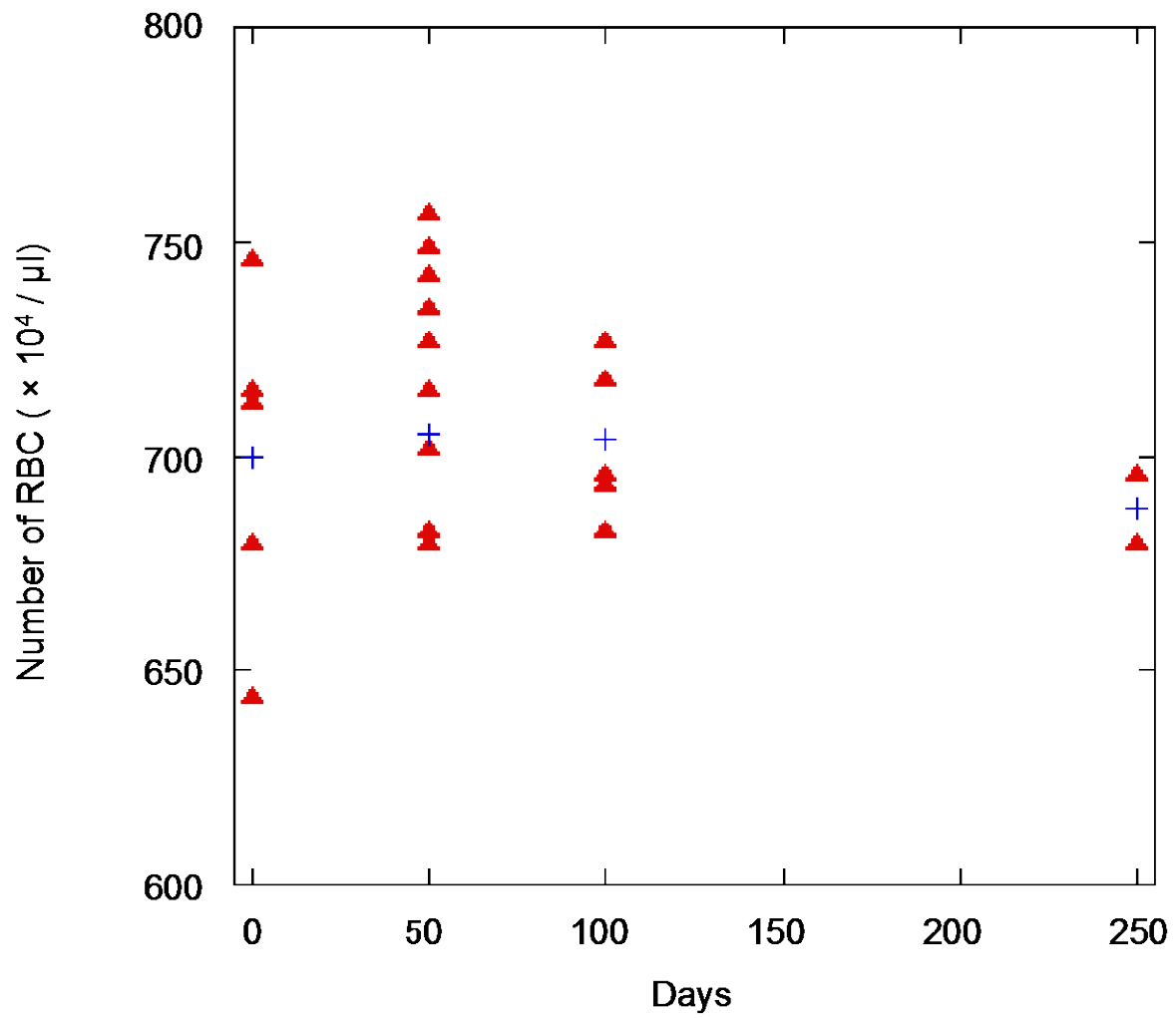


図 III-20 1 Gy/min 群のマウスにおける RBC 数の経時的変化

▲：マウス 1 匹毎の RBC 数、+：平均値を表す。

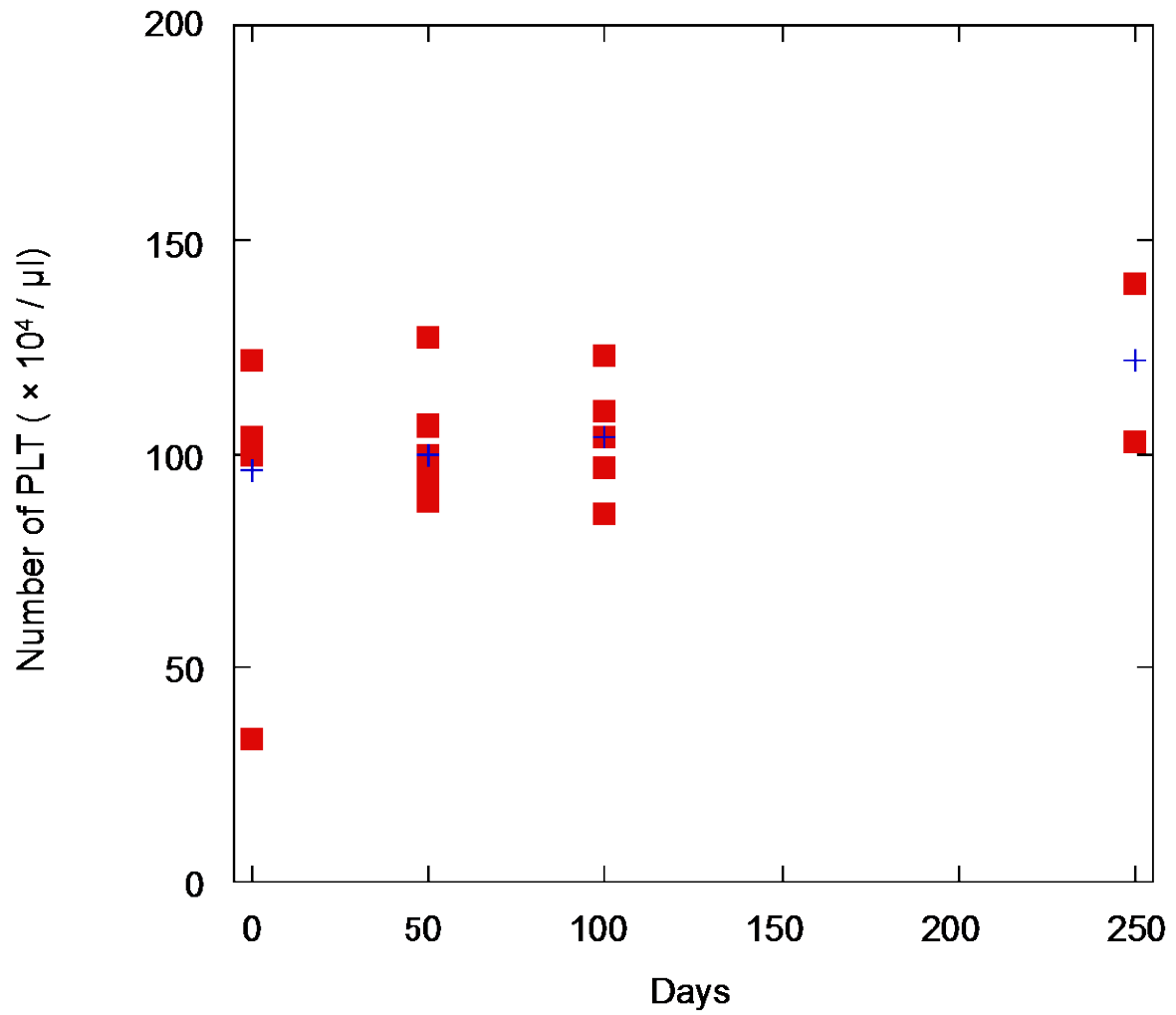


図 III-21 1 Gy/min 群のマウスにおける PLT 数の経時的変化

■ : マウス 1 匹毎の PLT 数、+ : 平均値を表す。

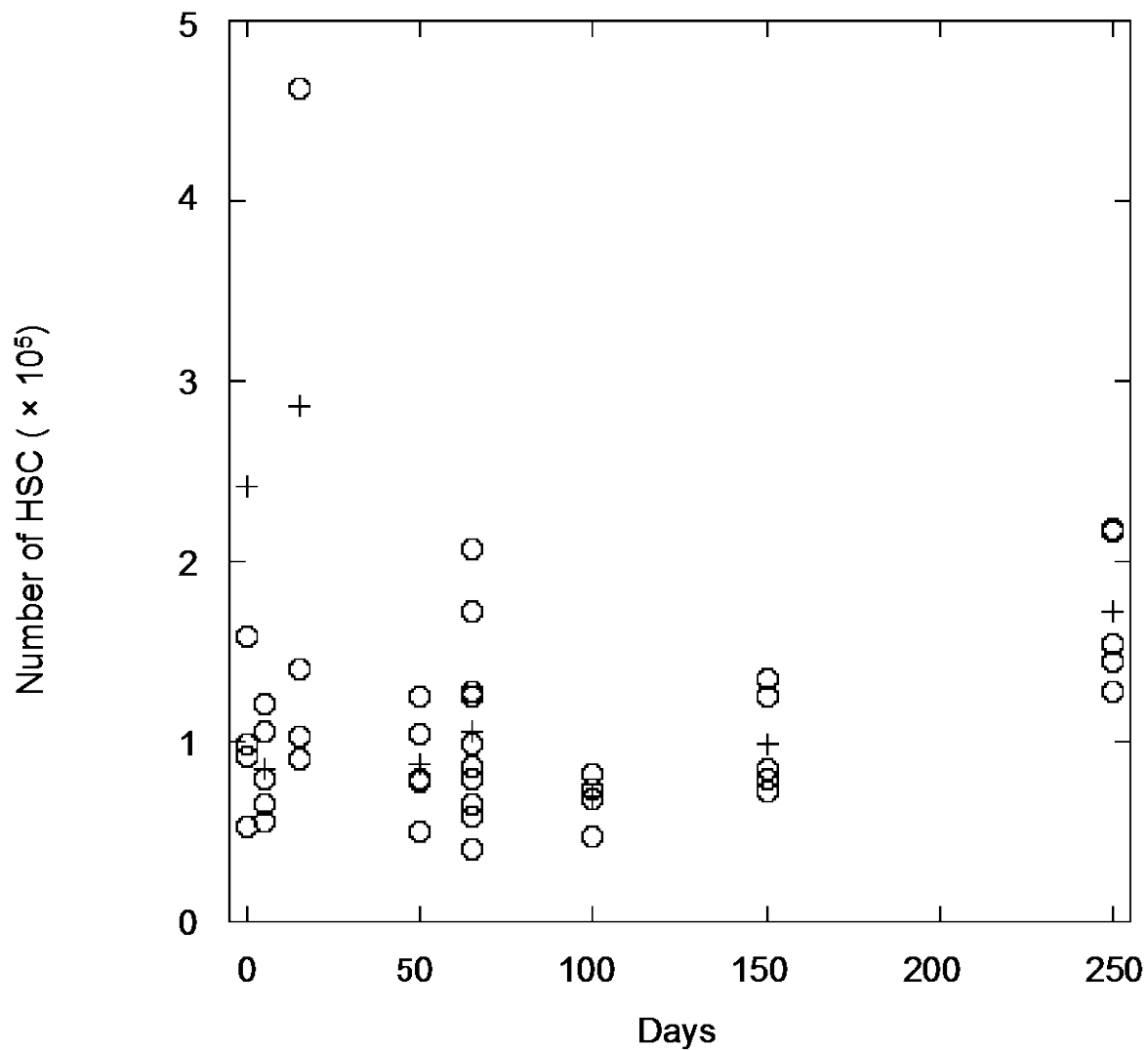


図 III-22 非照射群のマウスにおける HSC 数の経時的変化

○：マウス 1 匹毎の HSC 数、+：平均値を表す。

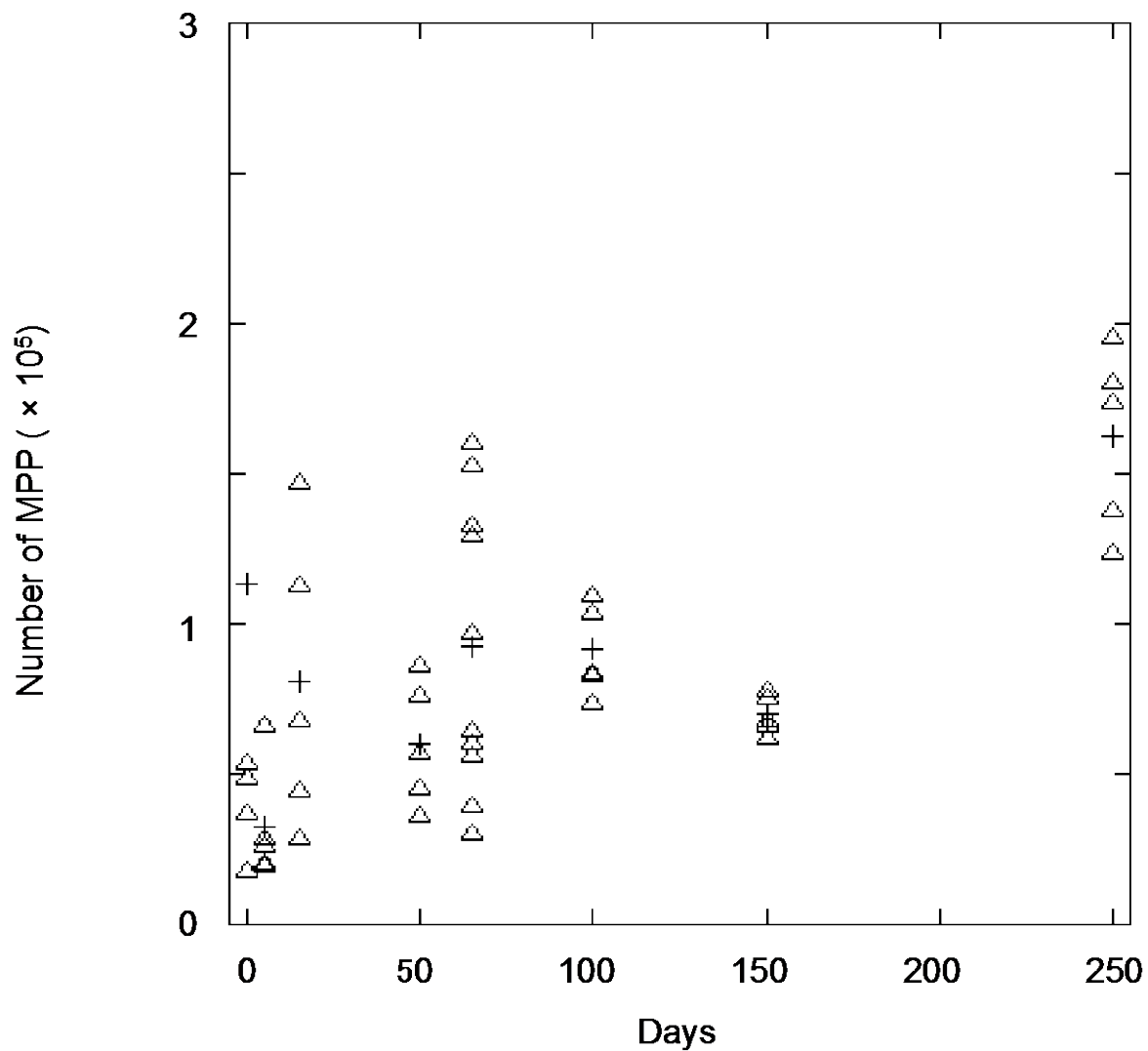


図 III-23 非照射群のマウスにおける MPP 数の経時的変化

△：マウス 1 匹毎の MPP 数、+：平均値を表す。

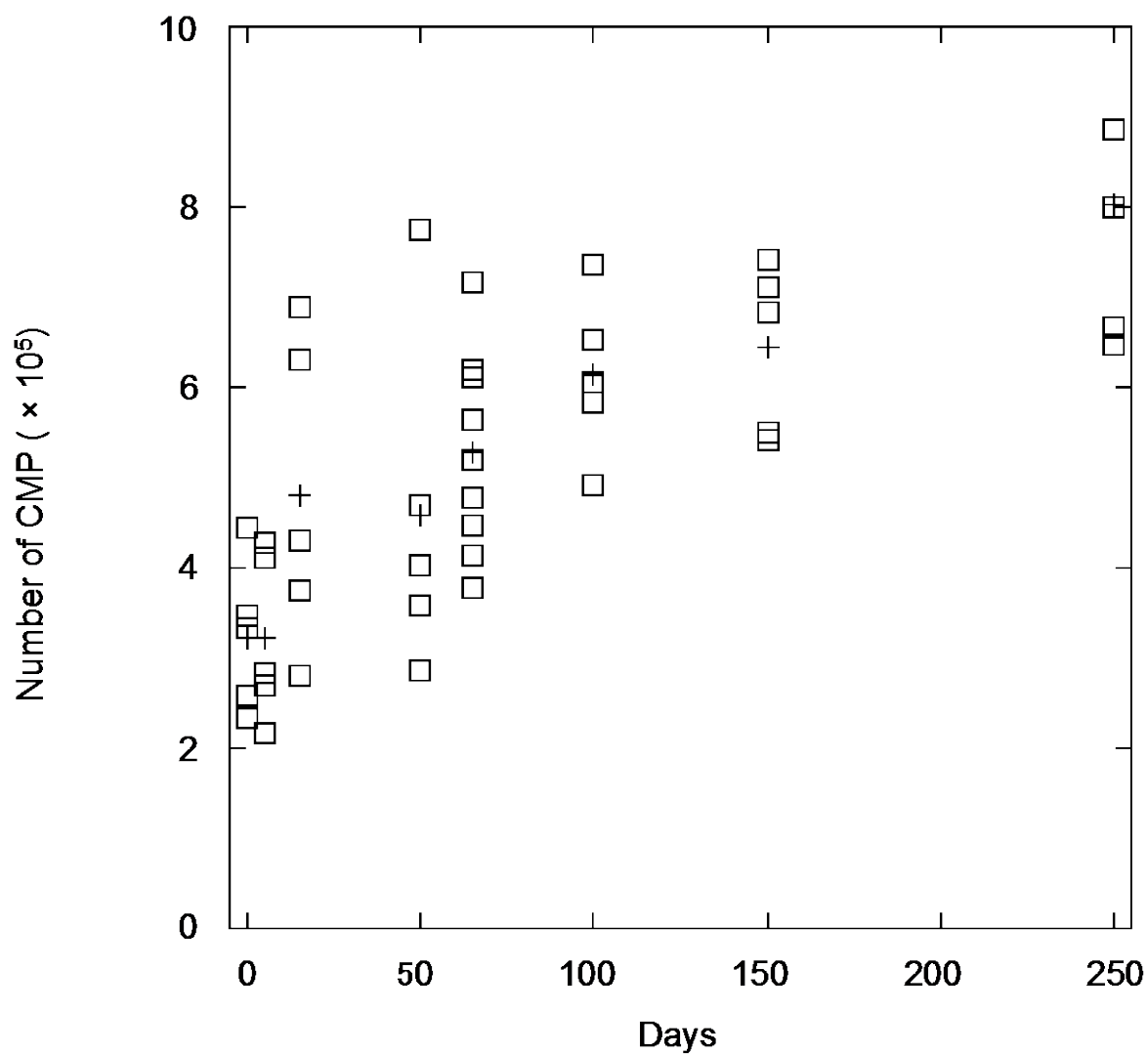


図 III-24 非照射群のマウスにおける CMP 数の経時的変化

□：マウス 1 匹毎の CMP 数、+：平均値を表す。

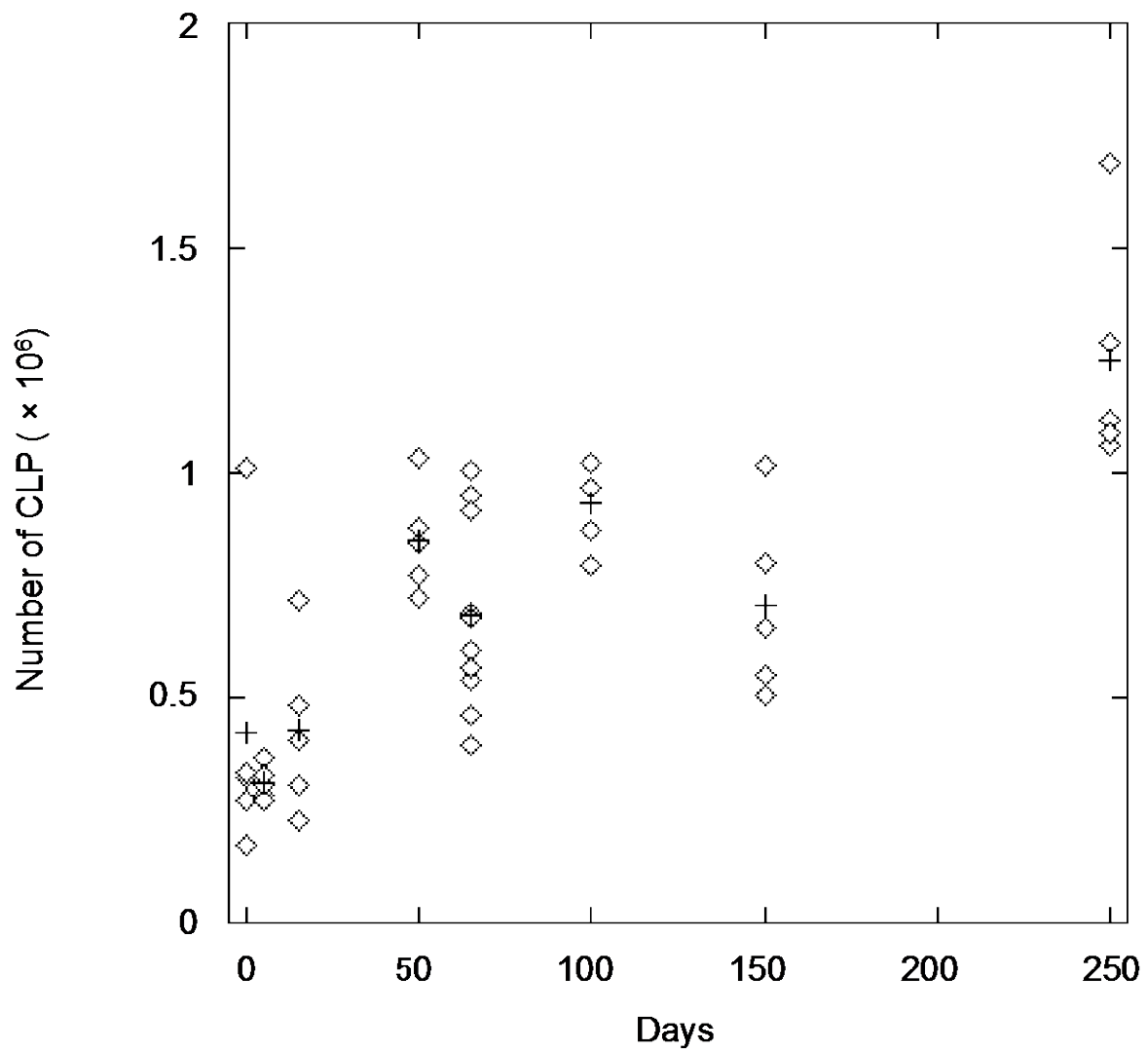


図 III-25 非照射群のマウスにおける CLP 数の経時的変化

◇ : マウス 1 匹毎の CLP 数、+ : 平均値を表す。

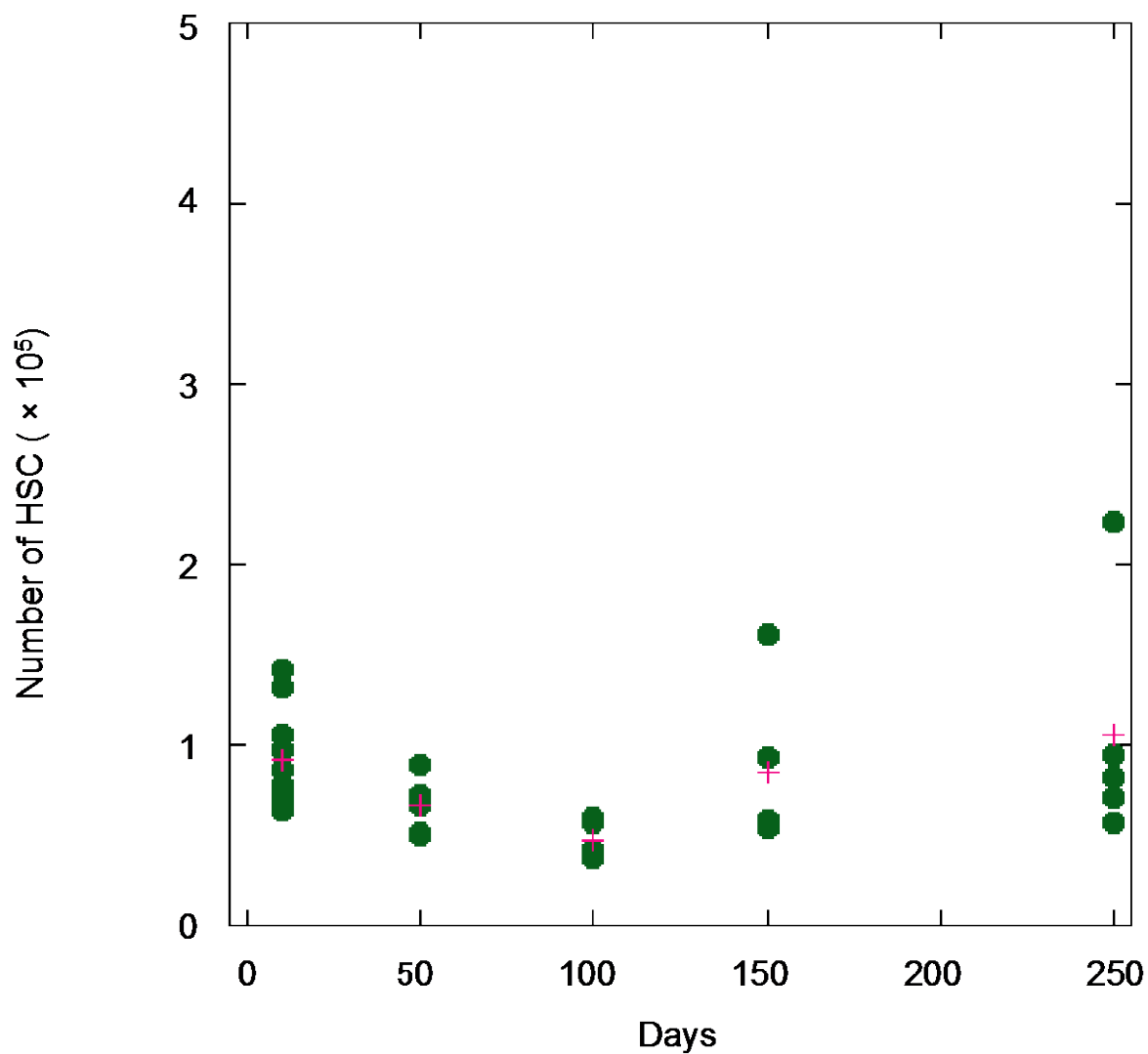


図 III-26 20 mGy/day 群のマウスにおける HSC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の HSC 数、+ : 平均値を表す。

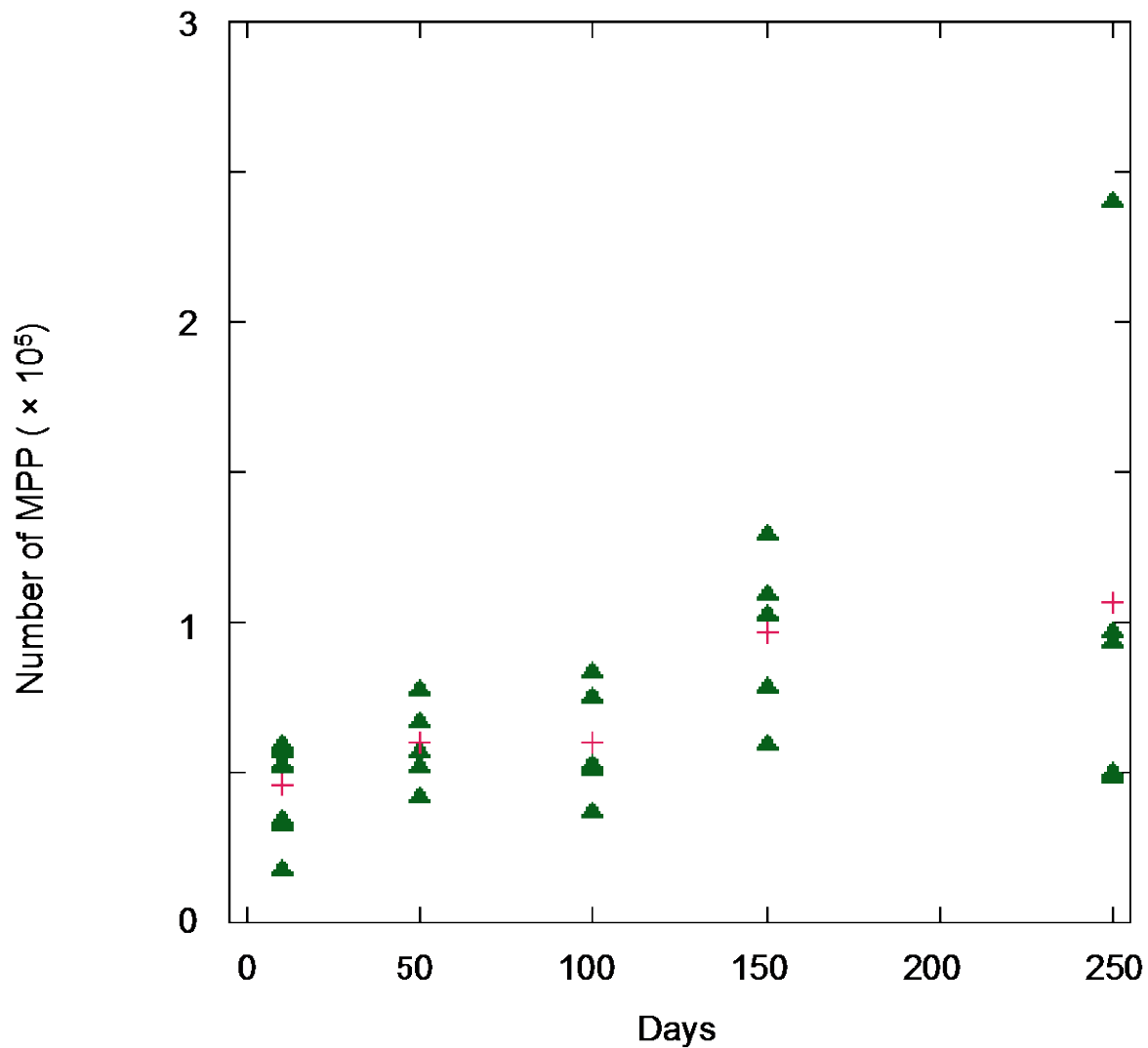


図 III-27 20 mGy/day 群のマウスにおける MPP 数の経時的変化

▲：マウス 1 匹毎の MPP 数、+：平均値を表す。

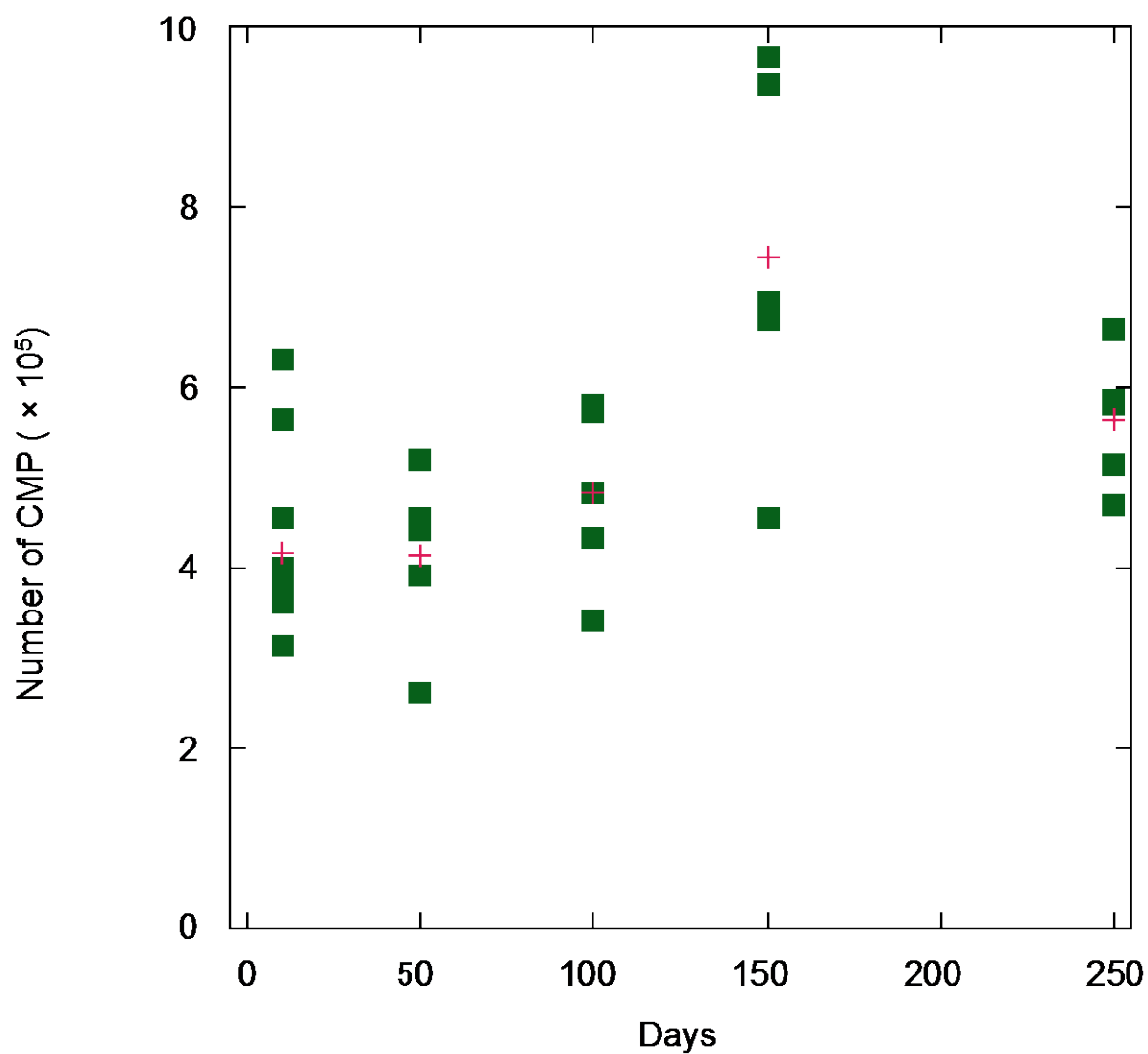


図 III-28 20 mGy/day 群のマウスにおける CMP 数の経時的変化

■ : マウス 1 匹毎の CMP 数、+ : 平均値を表す。

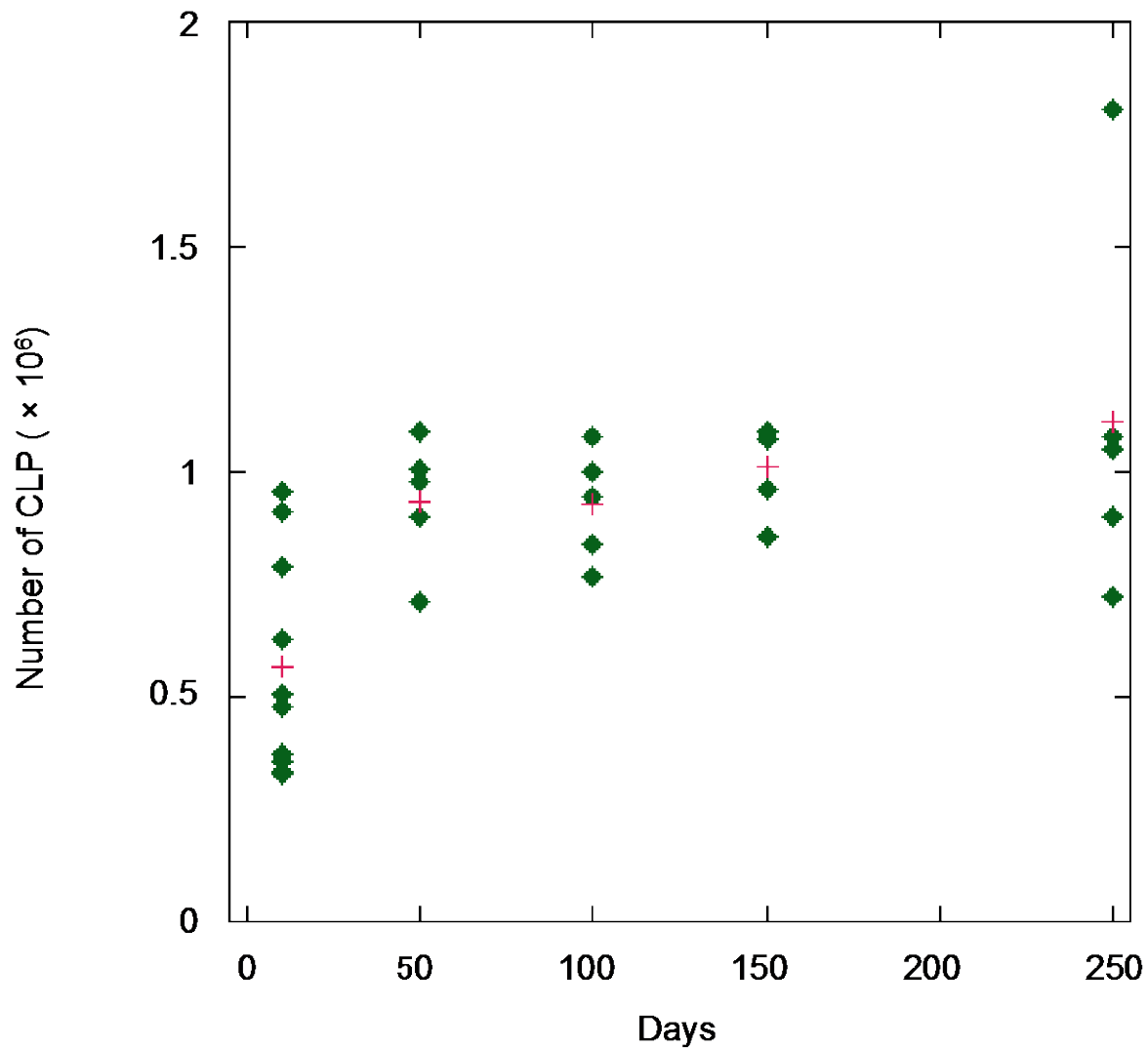


図 III-29 20 mGy/day 群のマウスにおける CLP 数の経時的変化

◆ : マウス 1 匹毎の CLP 数、+ : 平均値を表す。

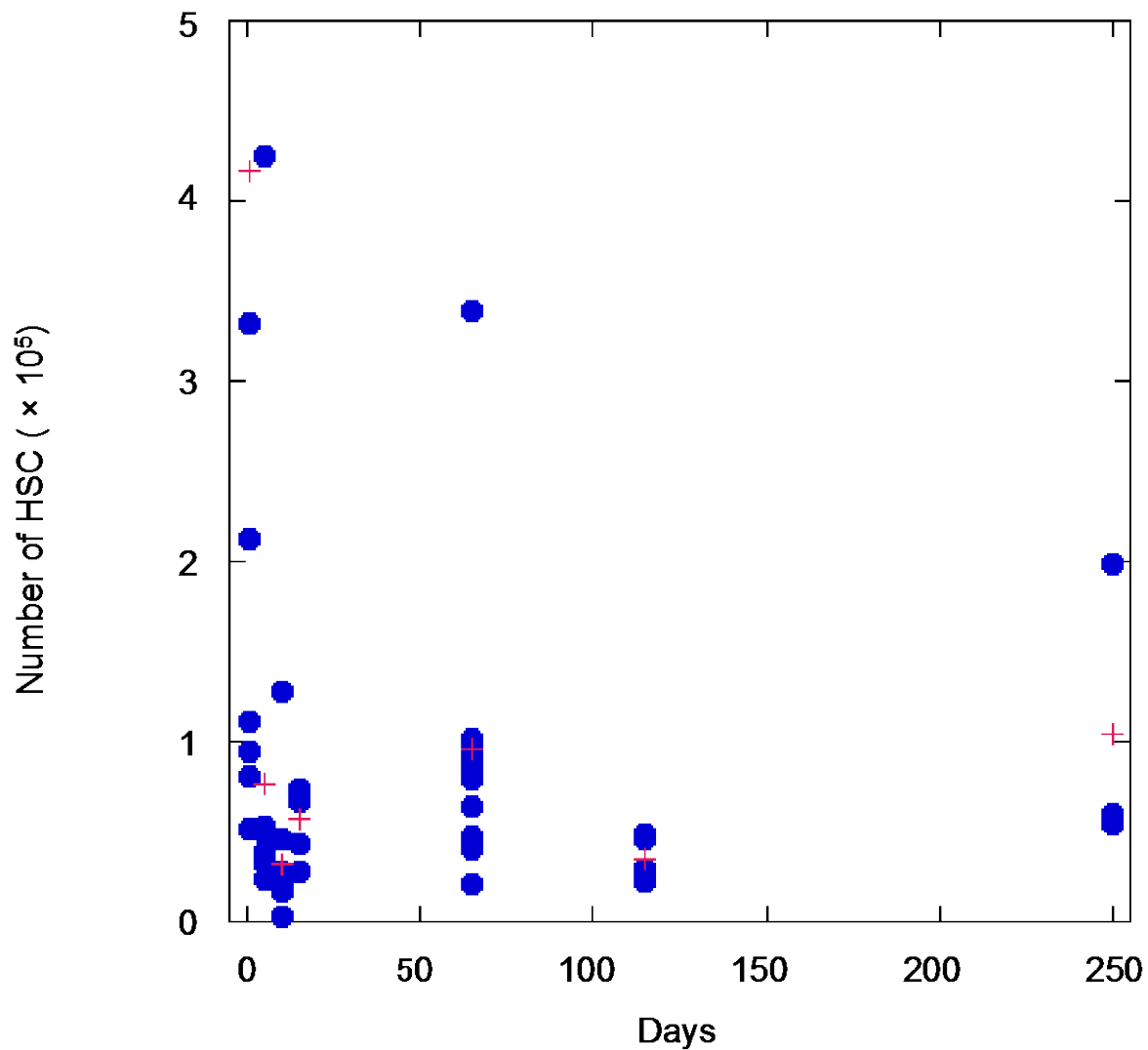


図 III-30 200 mGy/day 群のマウスにおける HSC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の HSC 数、+ : 平均値を表す。

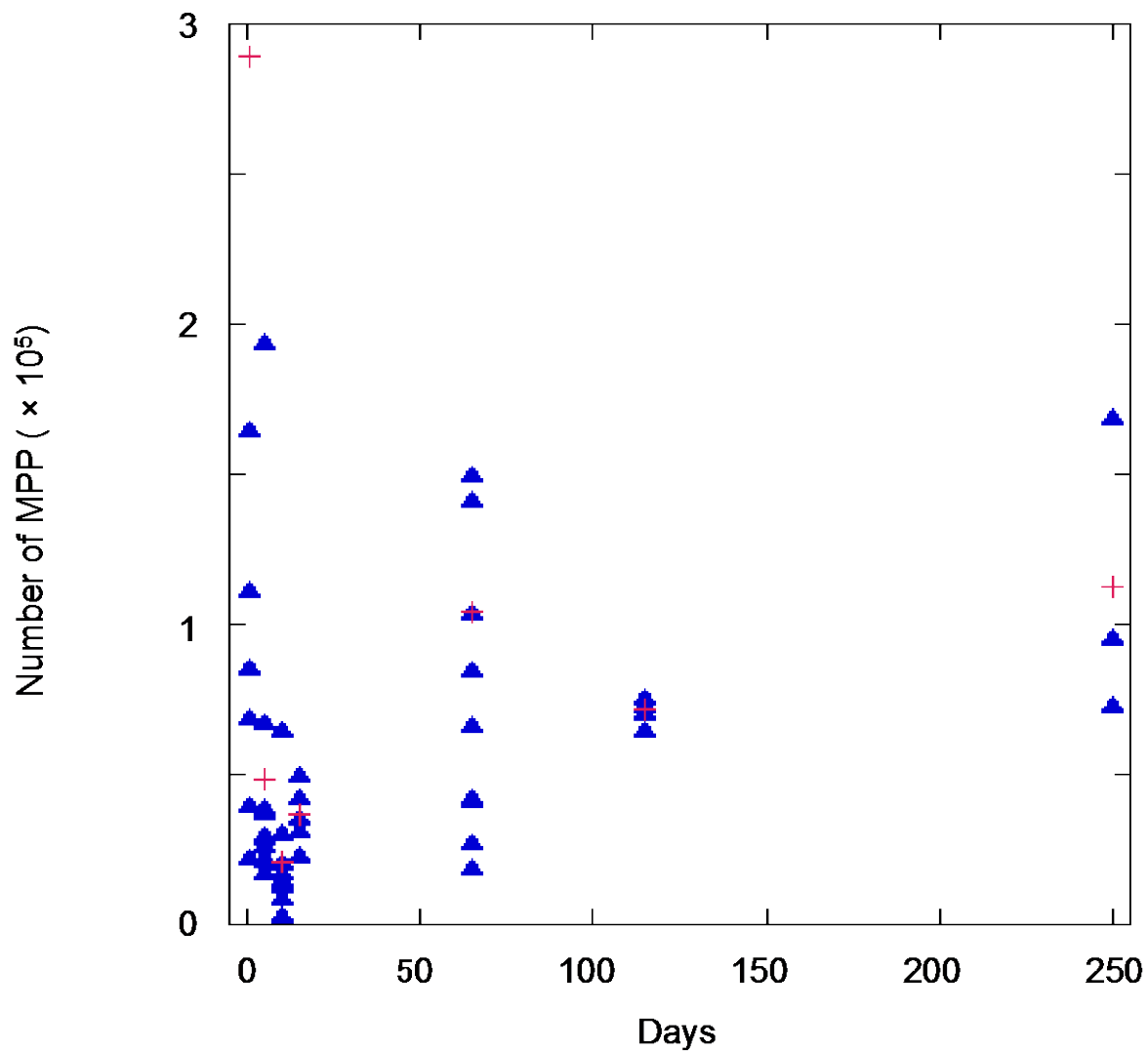


図 III-31 200 mGy/day 群のマウスにおける MPP 数の経時的変化

▲：マウス 1 匹毎の MPP 数、+：平均値を表す。

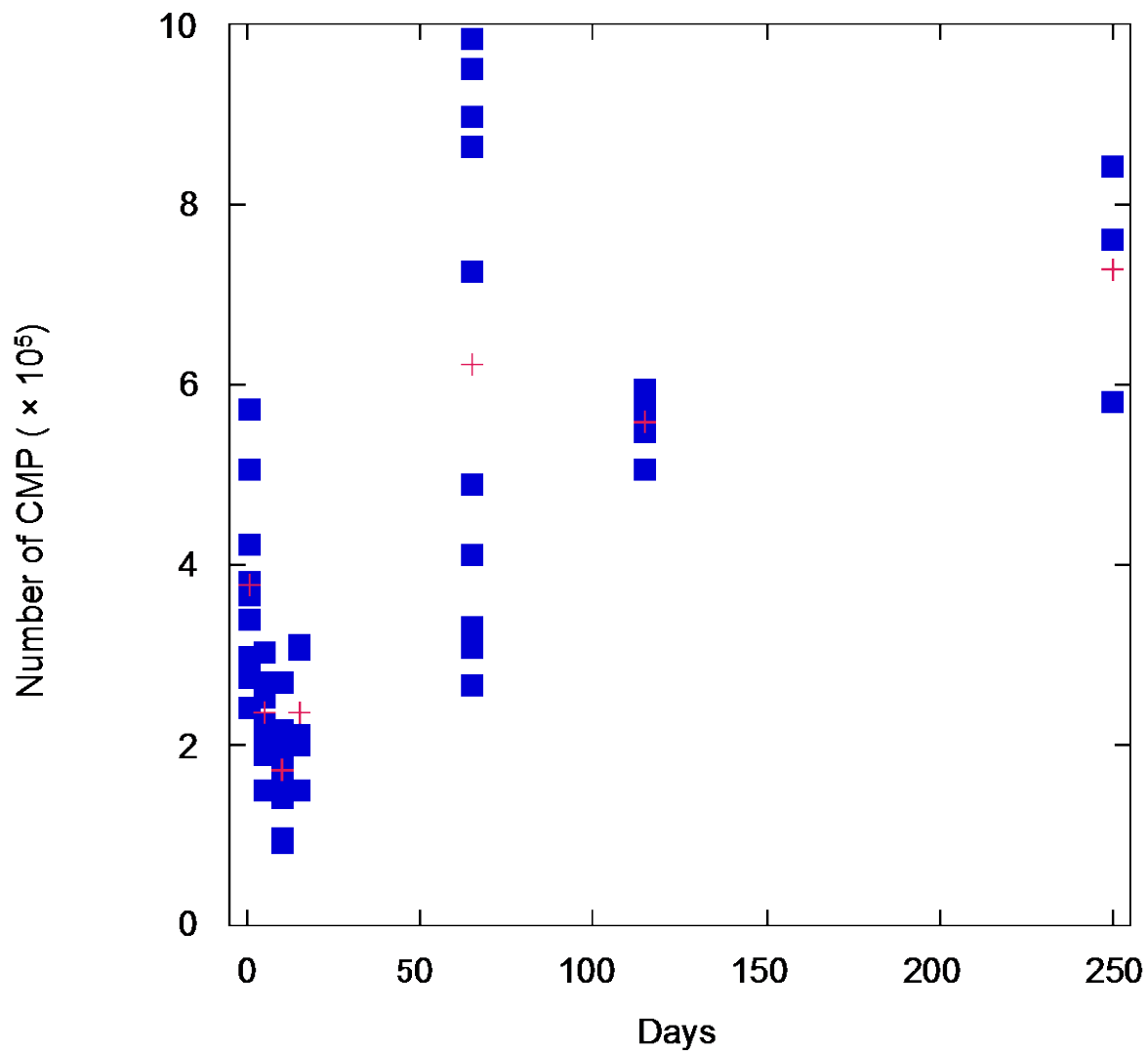


図 III-32 200 mGy/day 群のマウスにおける CMP 数の経時的変化

■ : マウス 1 匹毎の CMP 数、+ : 平均値を表す。

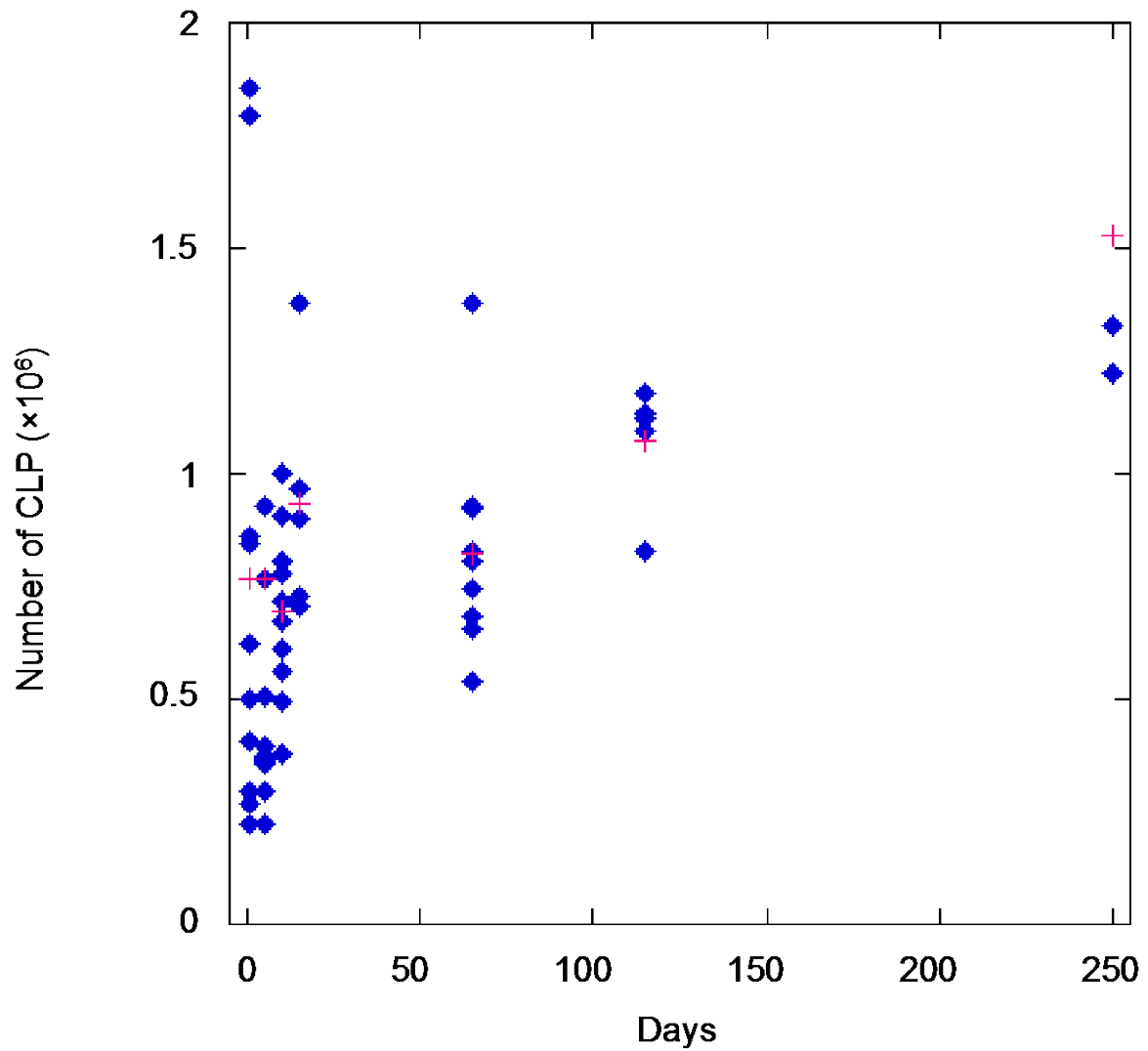


図 III-33 200 mGy/day 群のマウスにおける CLP 数の経時的変化

◆ : マウス 1 匹毎の CLP 数、+ : 平均値を表す。

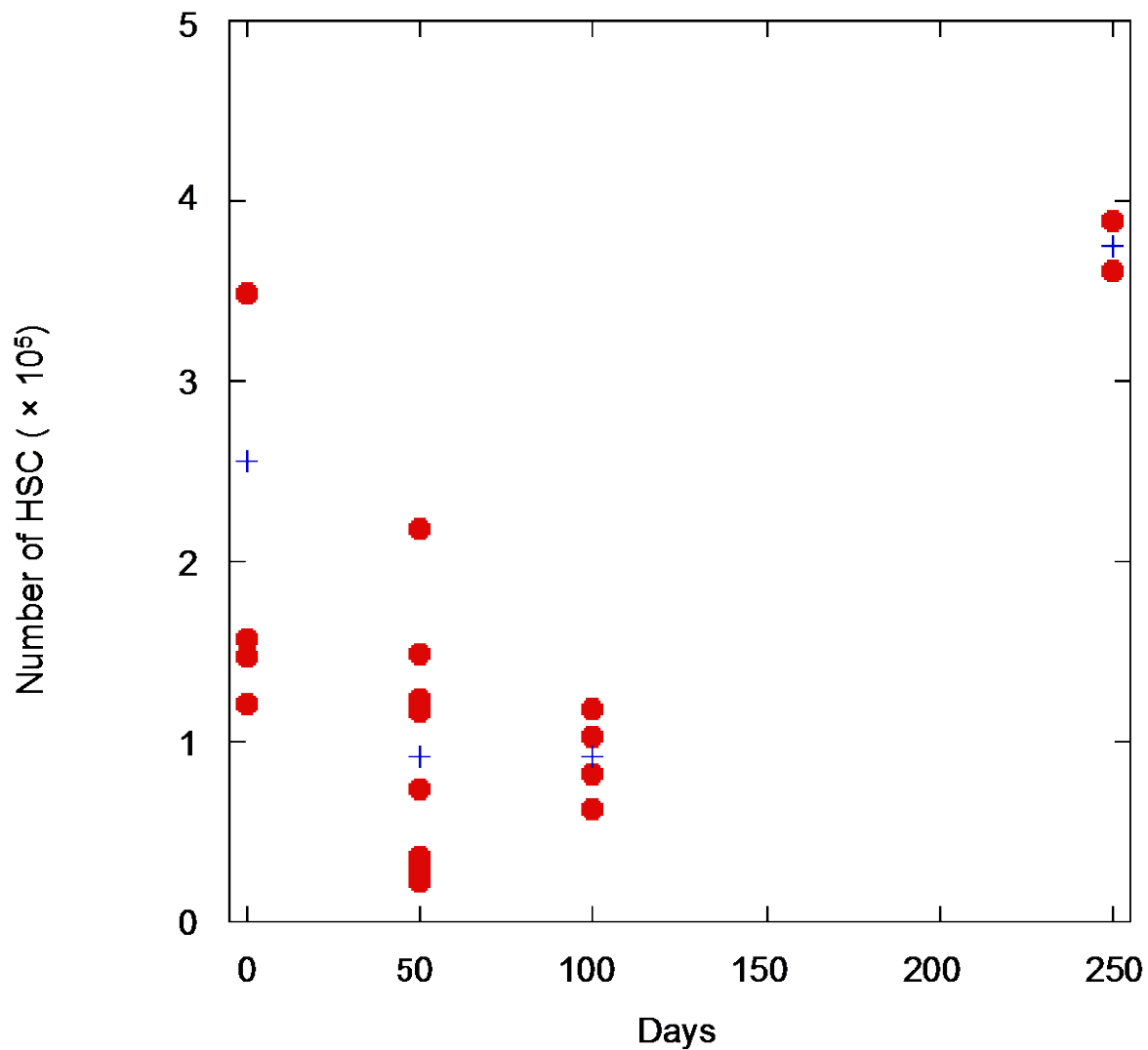


図 III-34 1 Gy/min 群のマウスにおける HSC 数の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の HSC 数、+ : 平均値を表す。

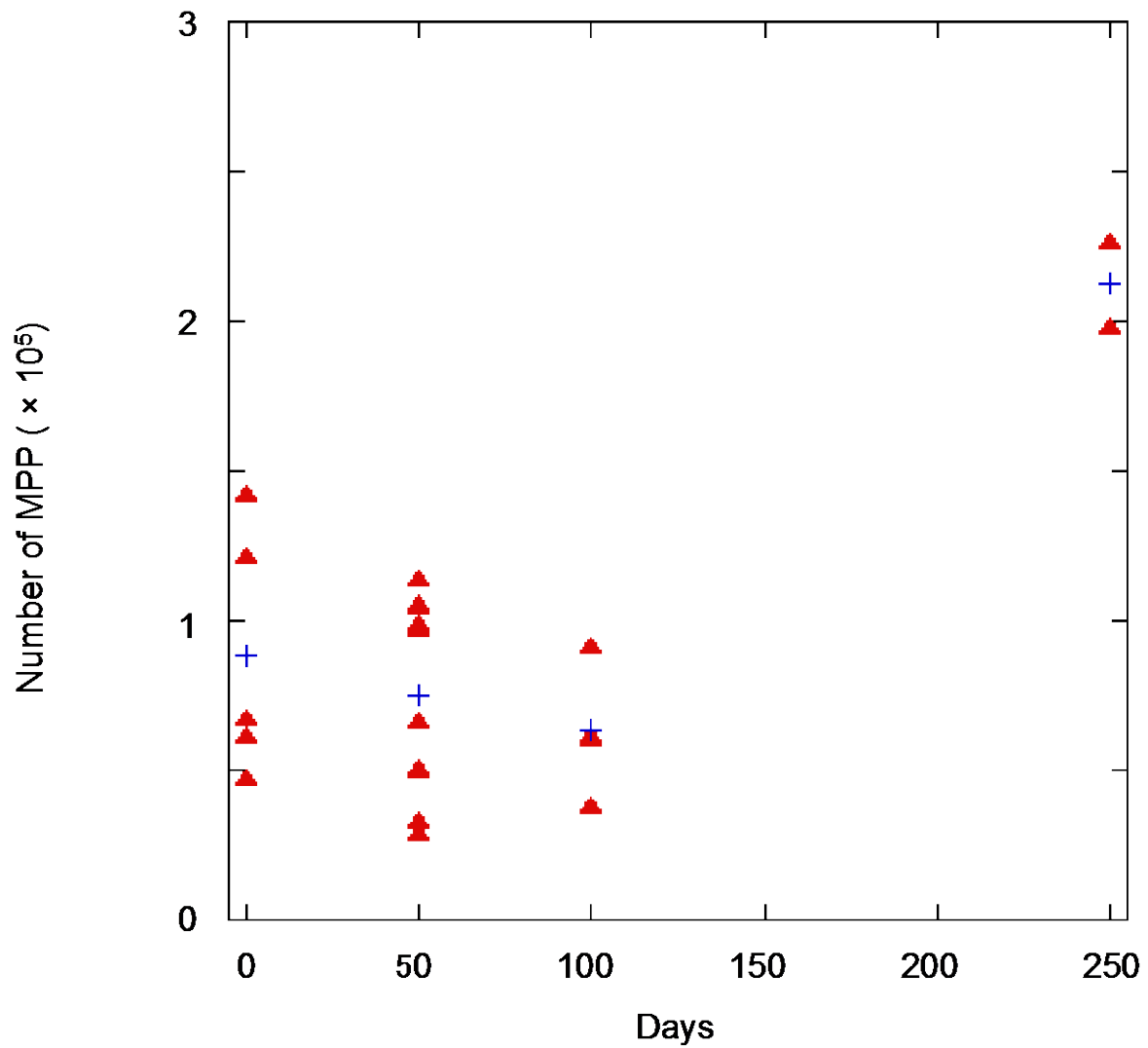


図 III-35 1 Gy/min 群のマウスにおける MPP 数の経時的変化

▲：マウス 1 匹毎の MPP 数、+：平均値を表す。

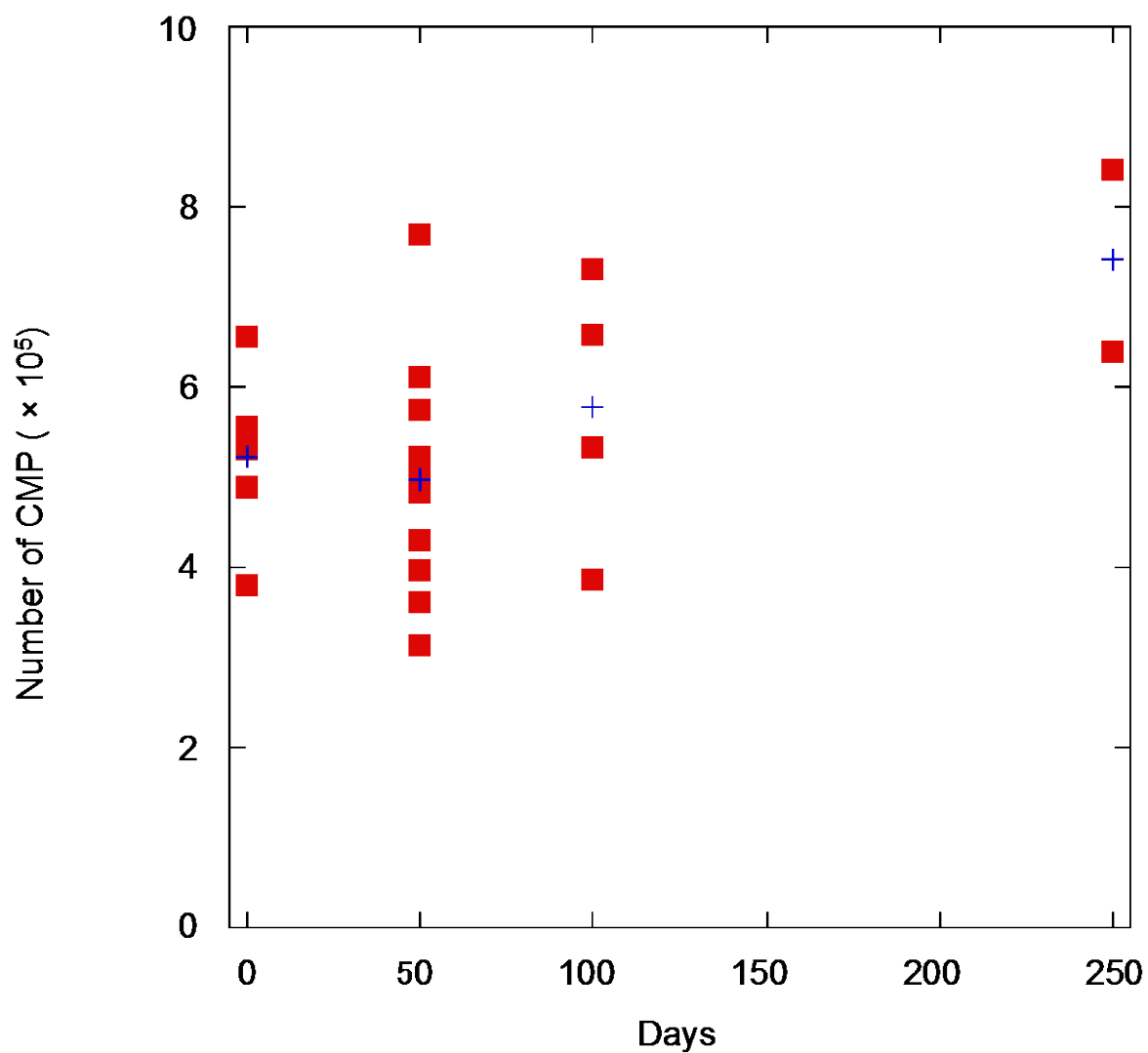


図 III-36 1 Gy/min 群のマウスにおける CMP 数の経時的変化

▲: マウス 1 匹毎の CMP 数、+ : 平均値を表す。

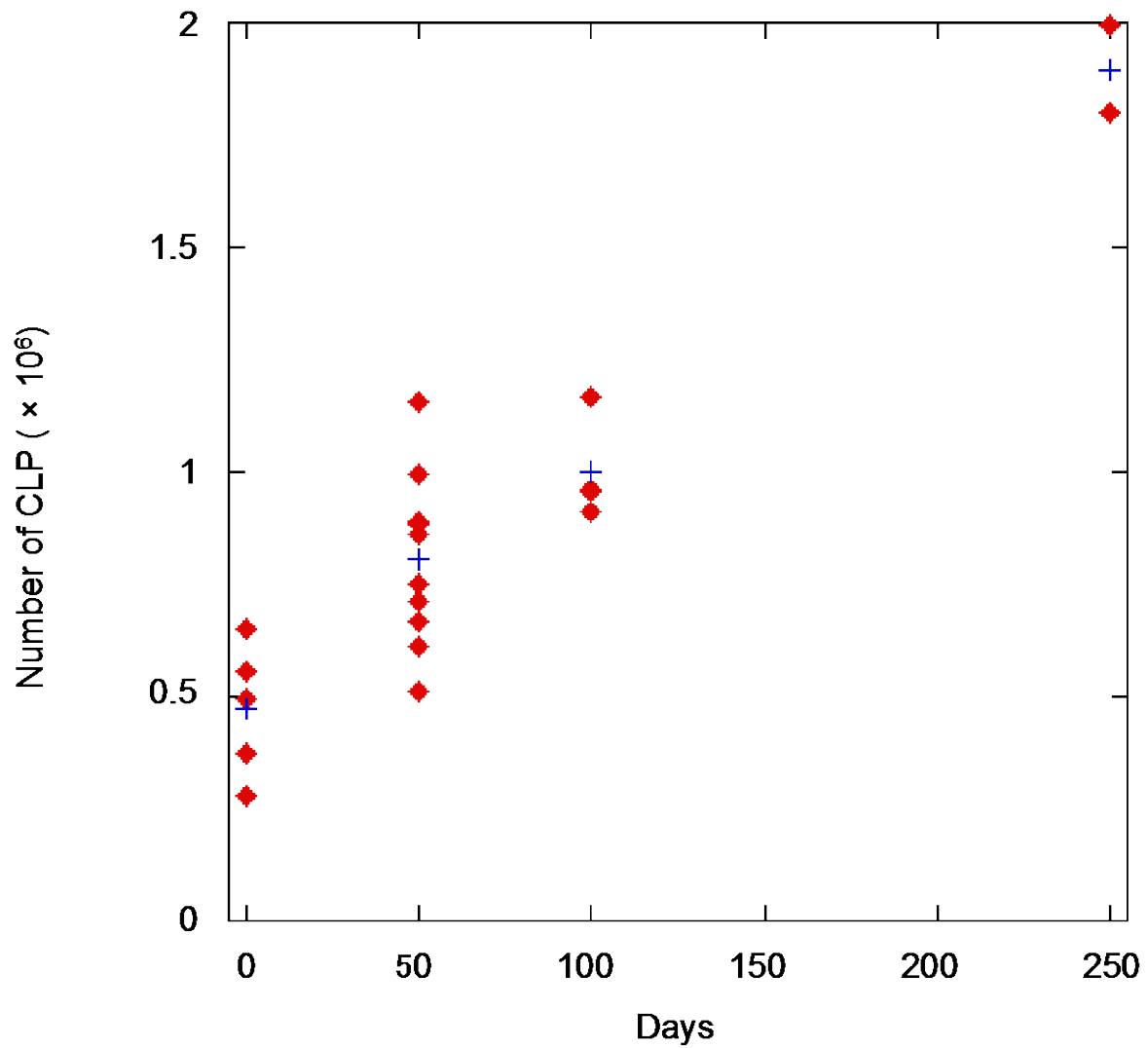


図 III-37 1 Gy/min 群のマウスにおける CLP 数の経時的変化

◆ : マウス 1 匹毎の CLP 数、+ : 平均値を表す。

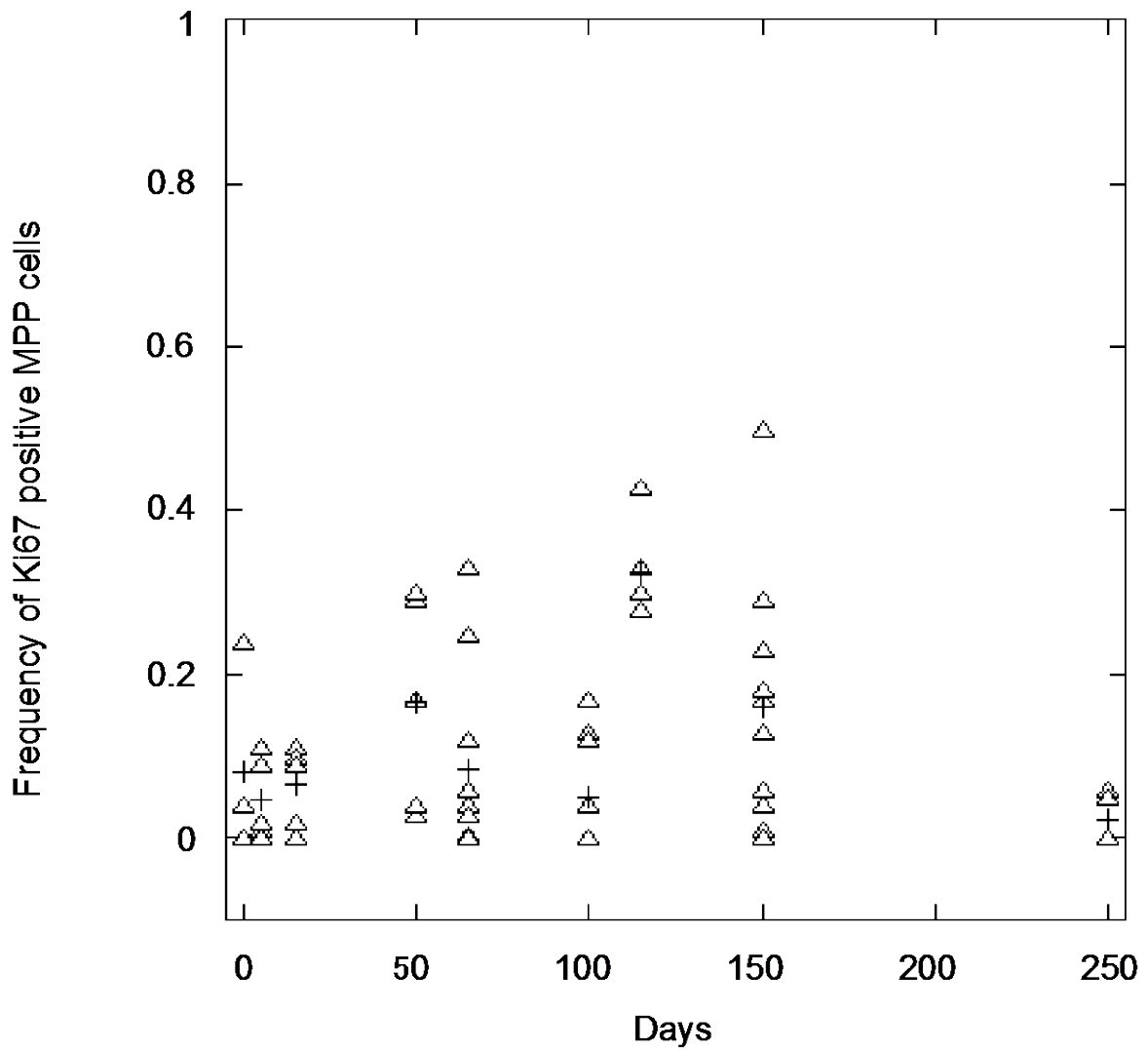


図 III-39 非照射群のマウスの MPP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 Δ : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

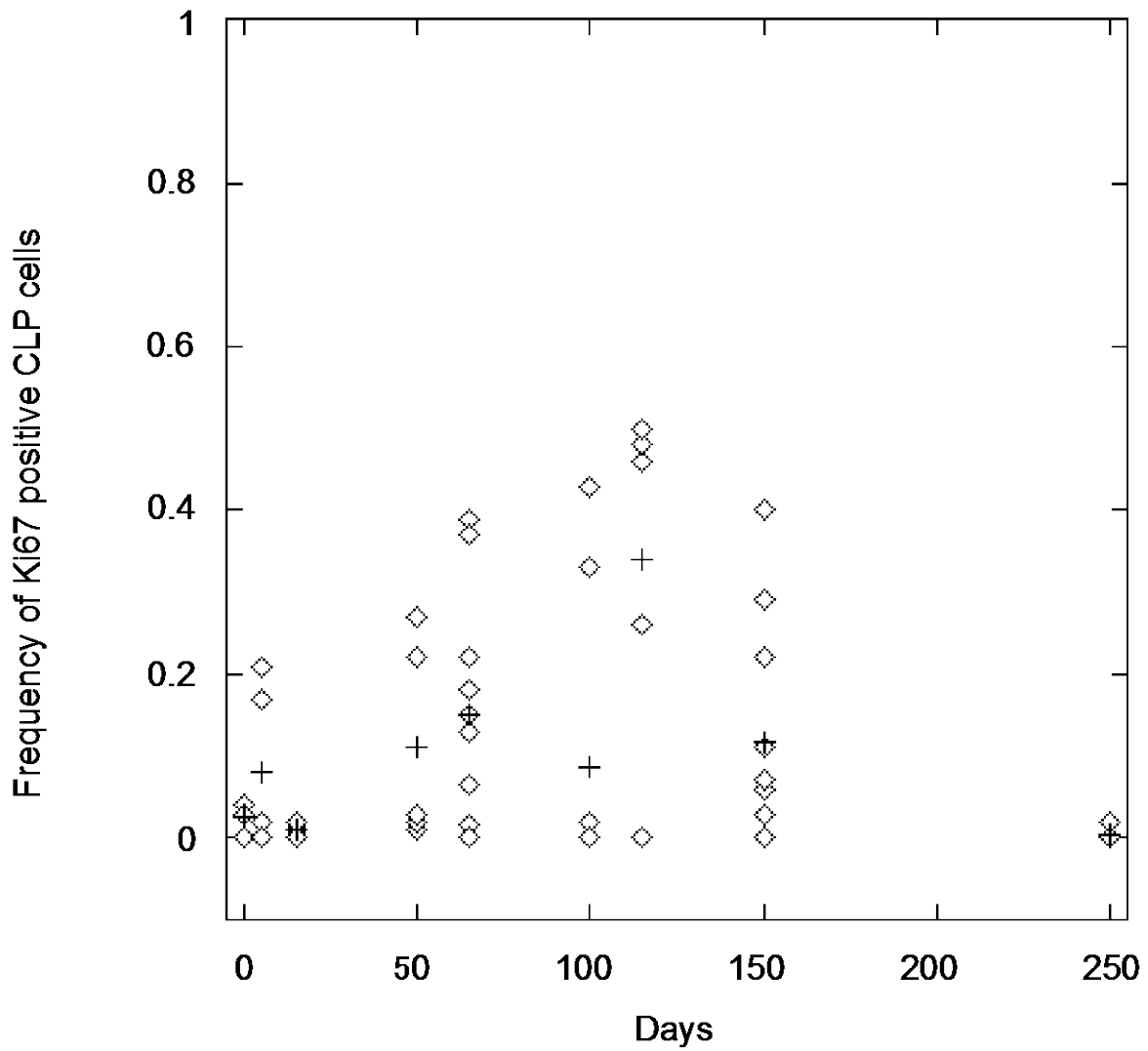


図 III-41 非照射群のマウスの CLP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ◇ : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

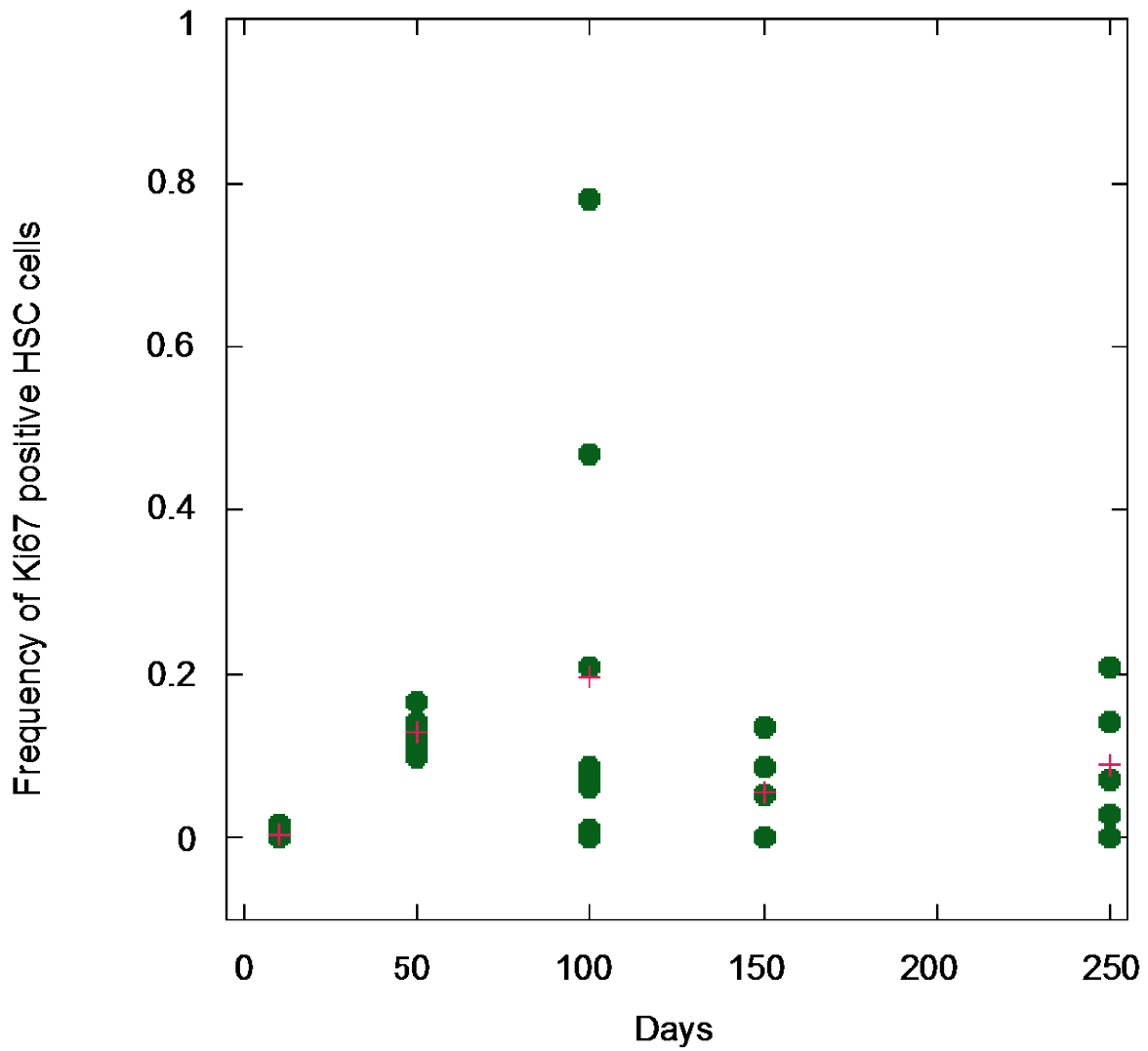


図 III-42 20 mGy/day 群のマウスの HSC における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ● : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

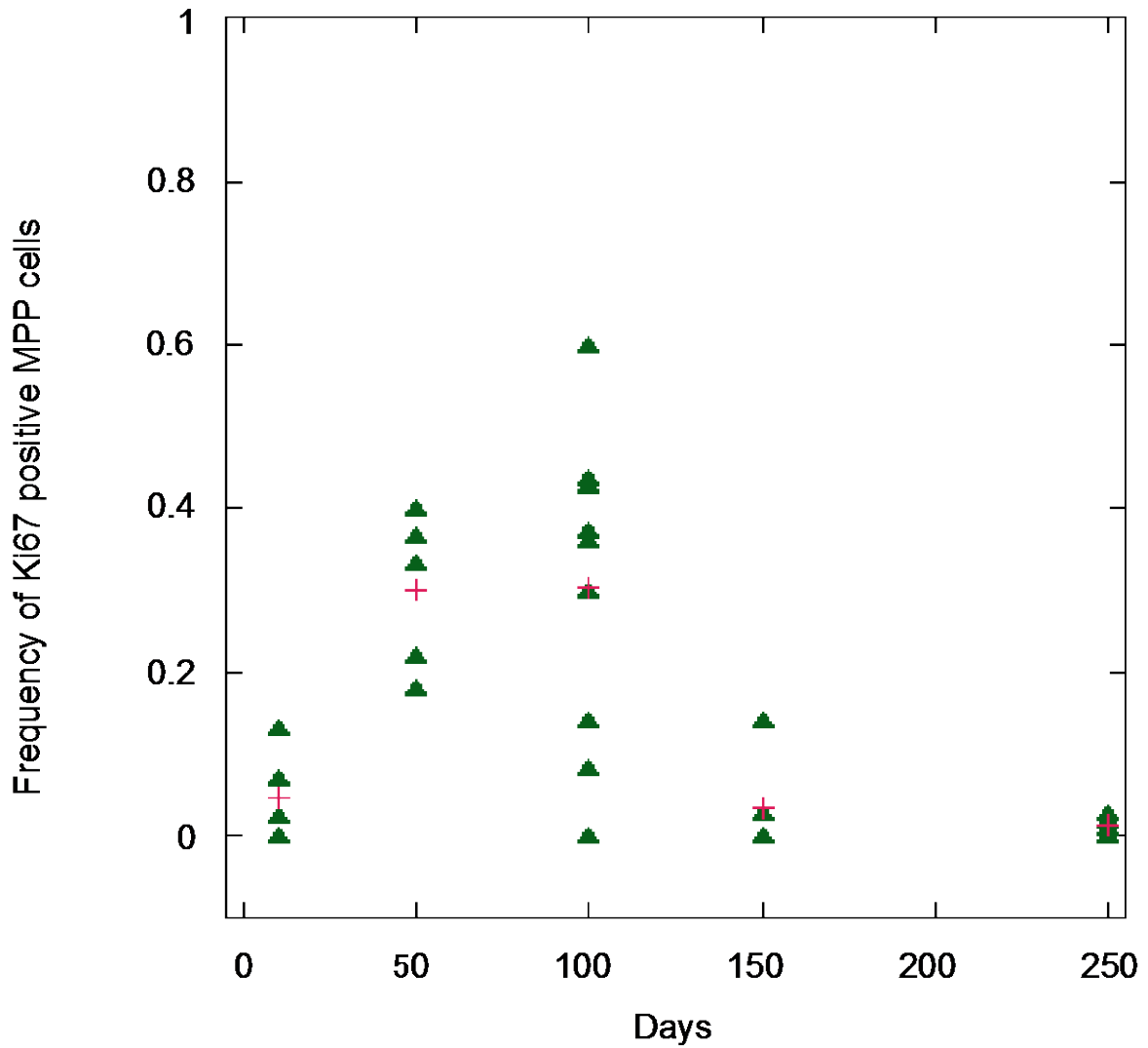


図 III-43 20 mGy/day 群のマウスの MPP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ▲：マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+：平均値を表す。

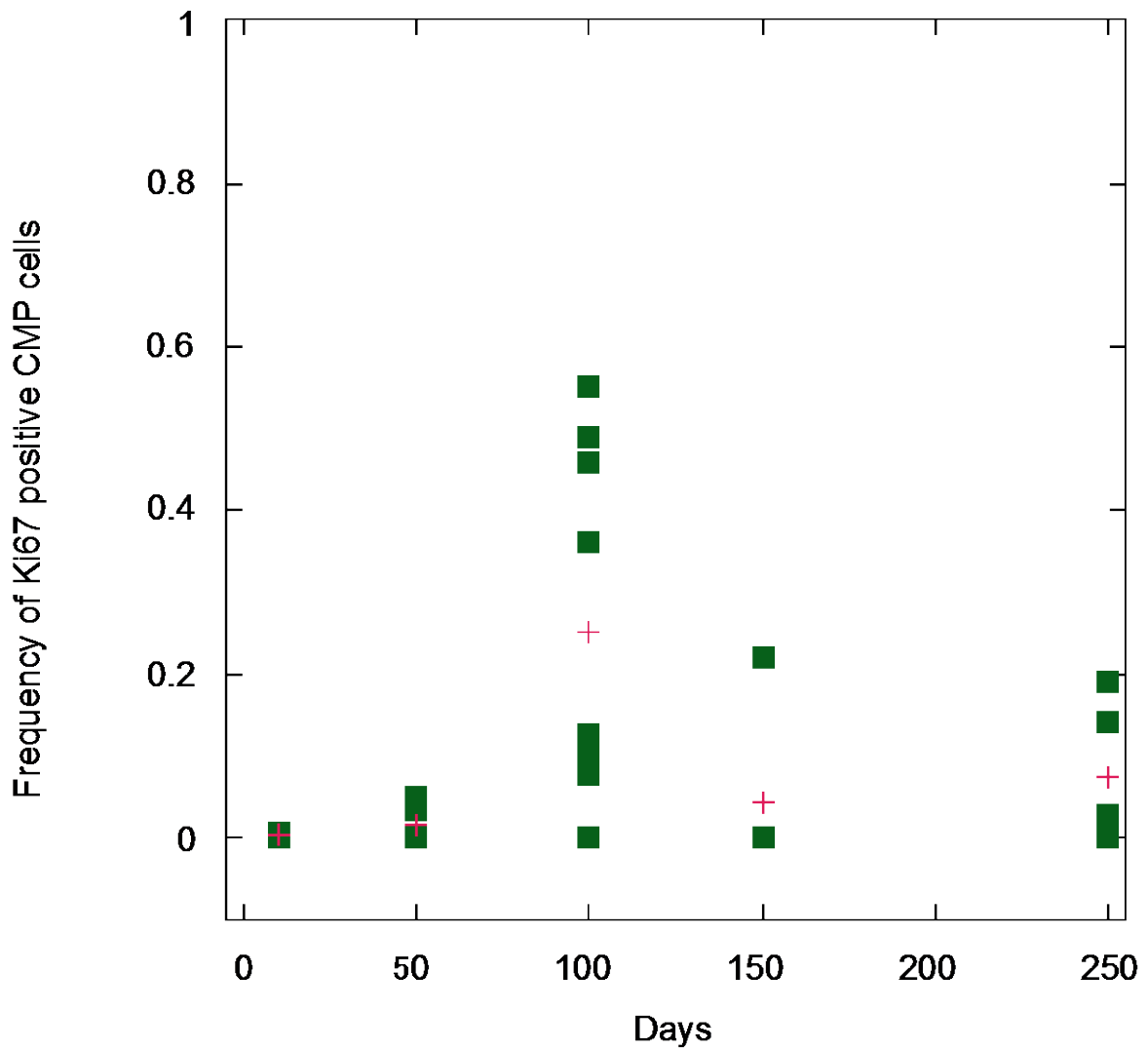


図 III-44 20 mGy/day 群のマウスの CMP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ■ : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

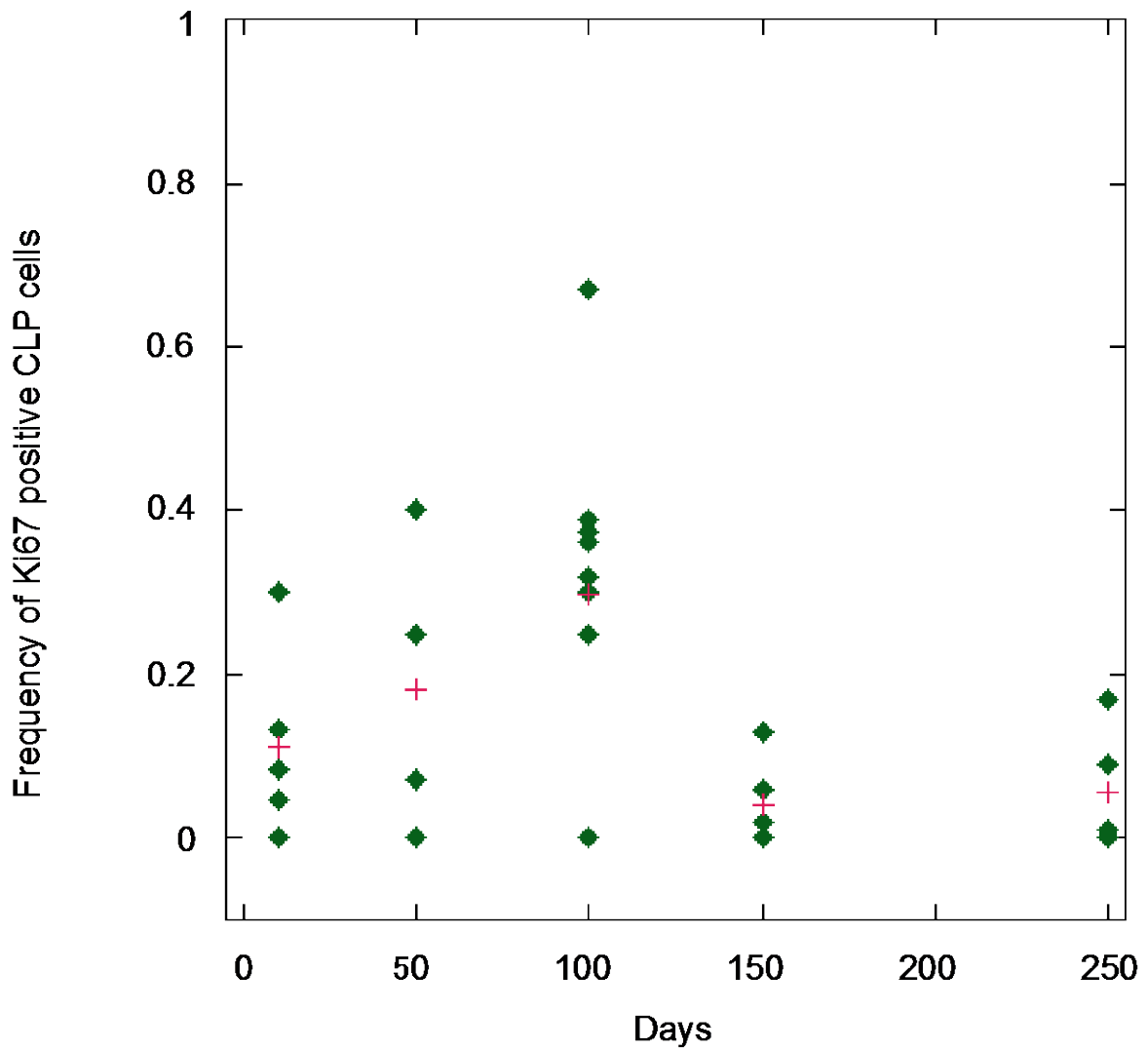


図 III-45 20 mGy/day 群のマウスの CLP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化

◆ : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

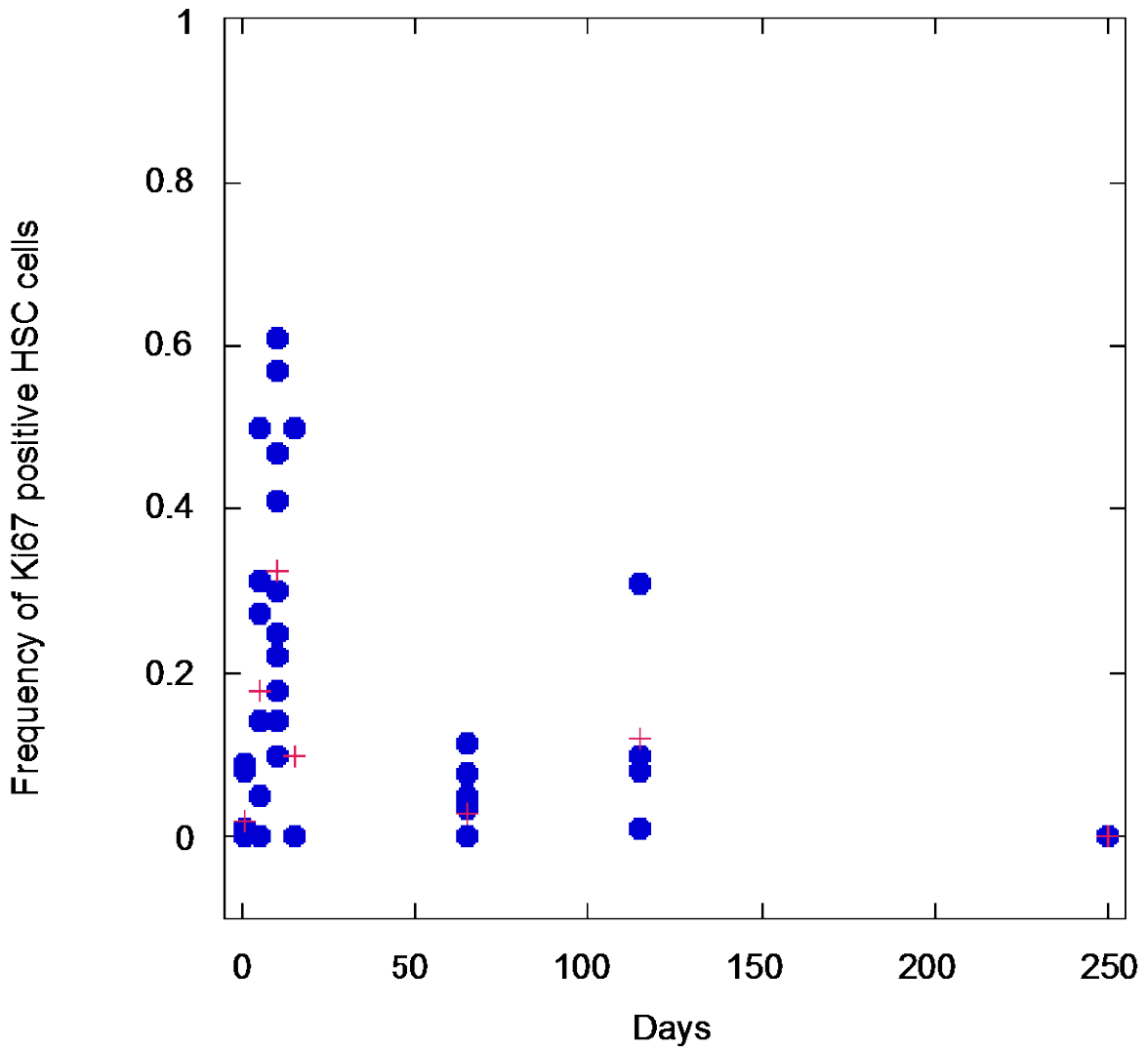


図 III-46 200 mGy/day 群のマウスの HSC における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ● : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

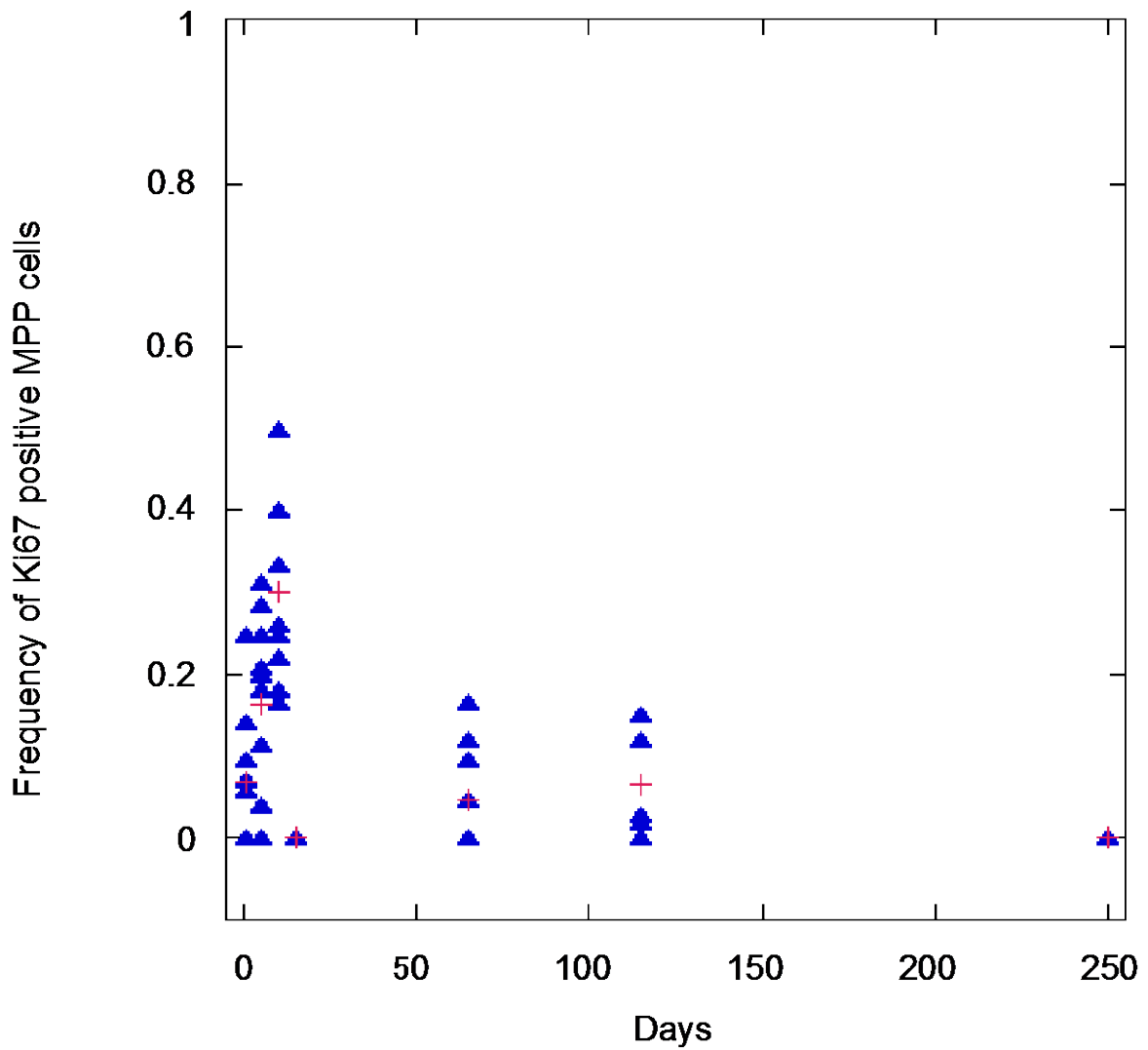


図 III-47 200 mGy/day 群のマウスの MPP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ▲：マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+：平均値を表す。

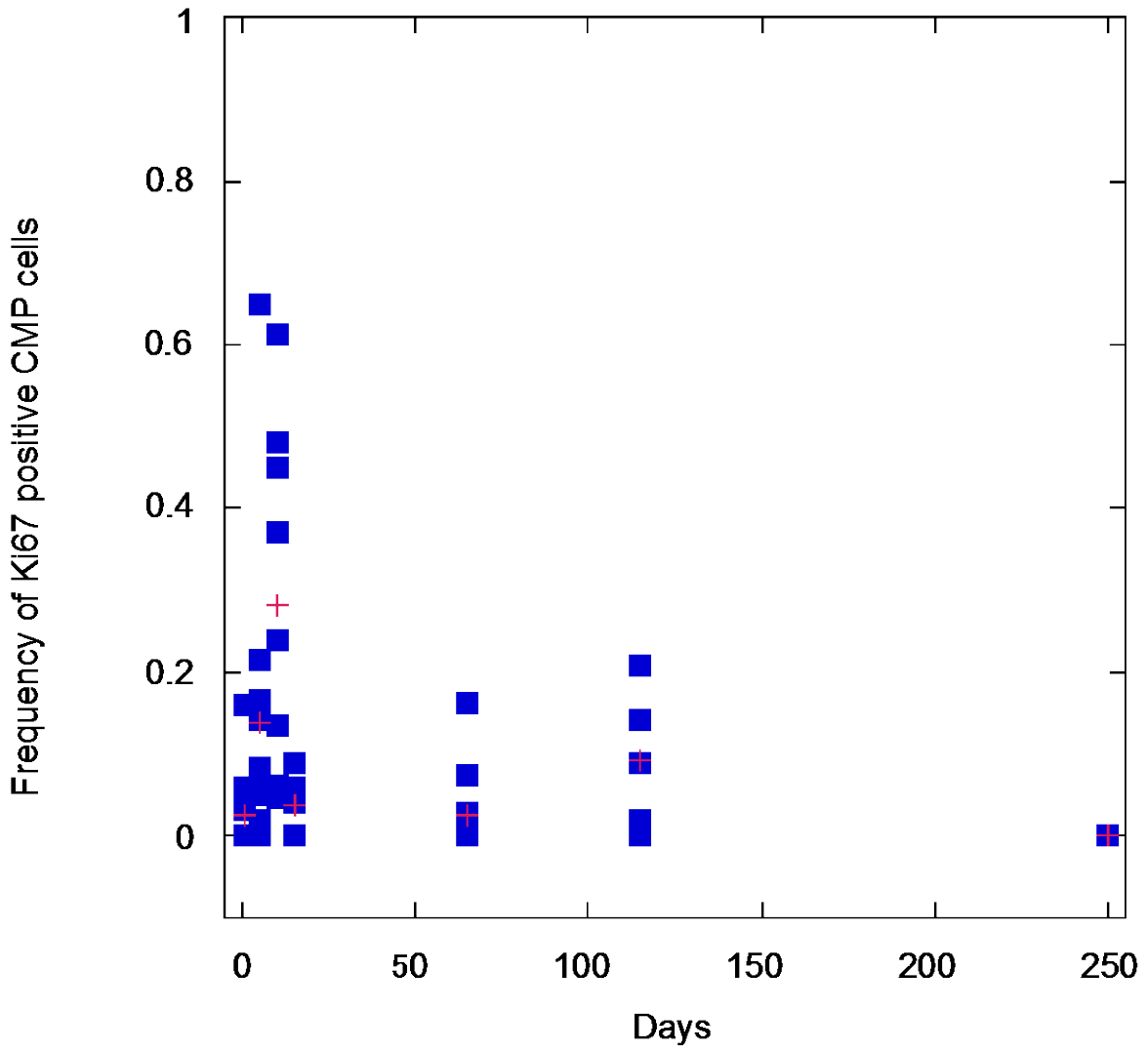


図 III-48 200 mGy/day 群のマウスの CMP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ■ : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

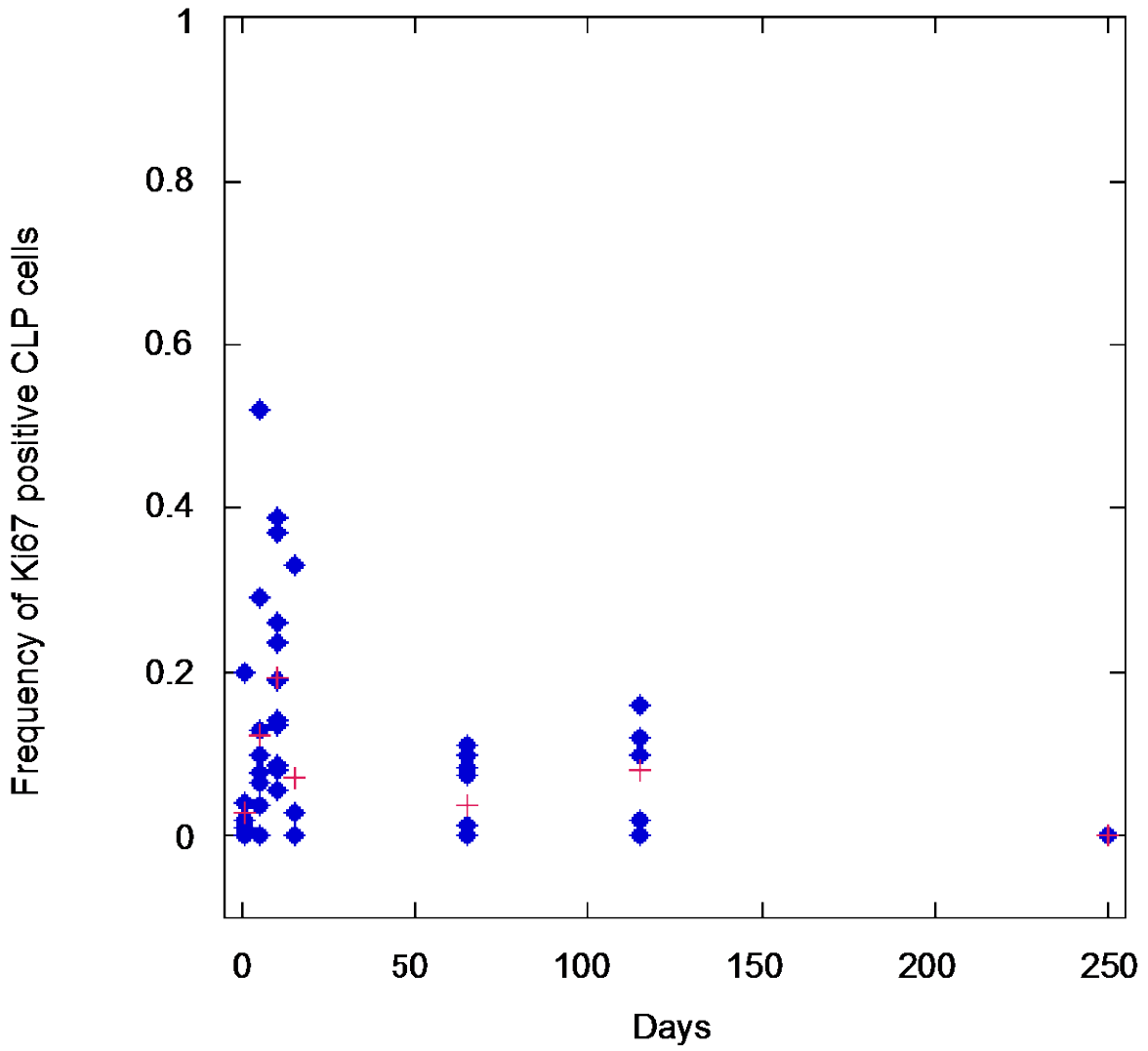


図 III-49 200 mGy/day 群のマウスの CLP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ■ : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

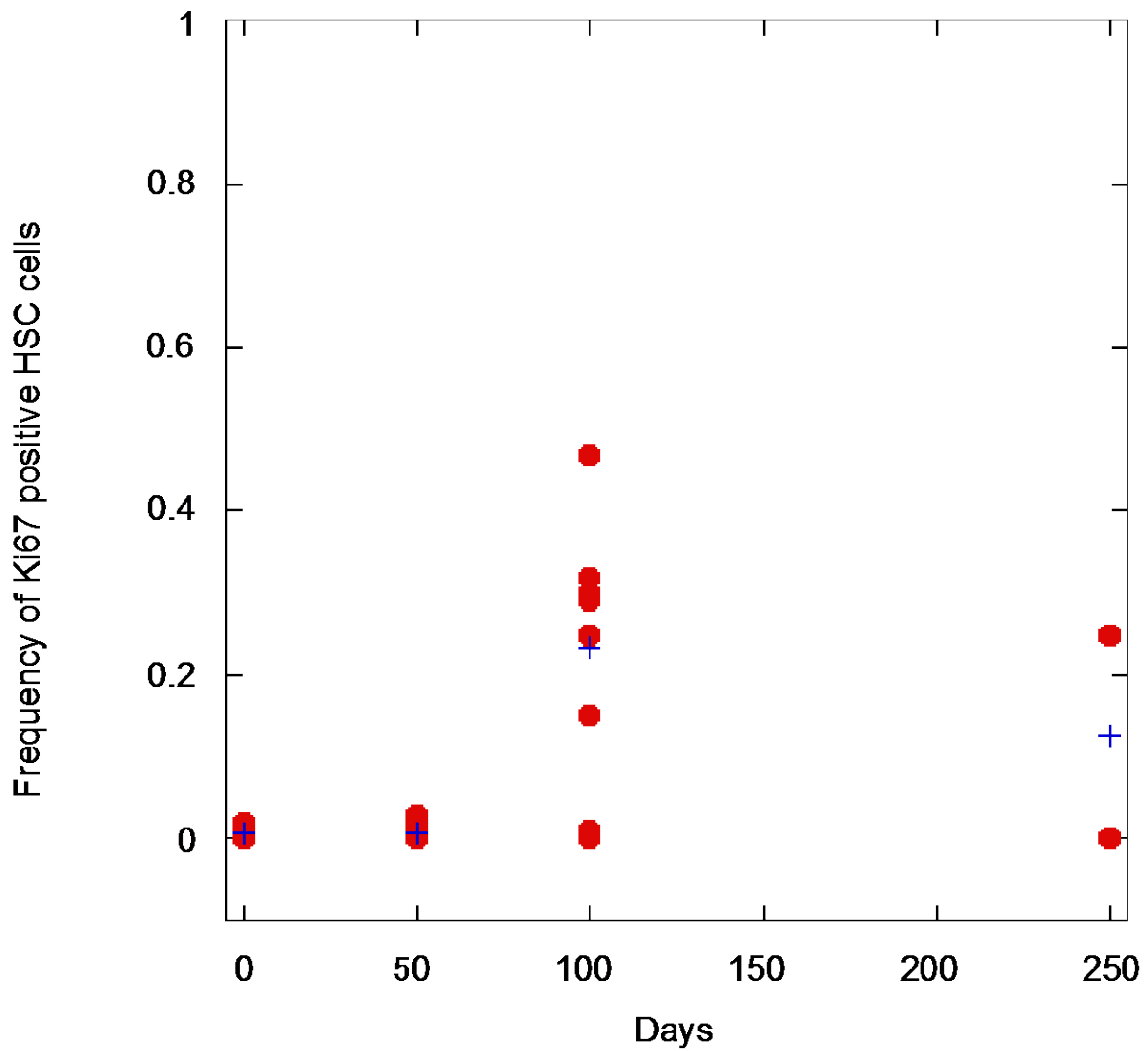


図 III-50 1 Gy/min 群のマウスの HSC における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化

● : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

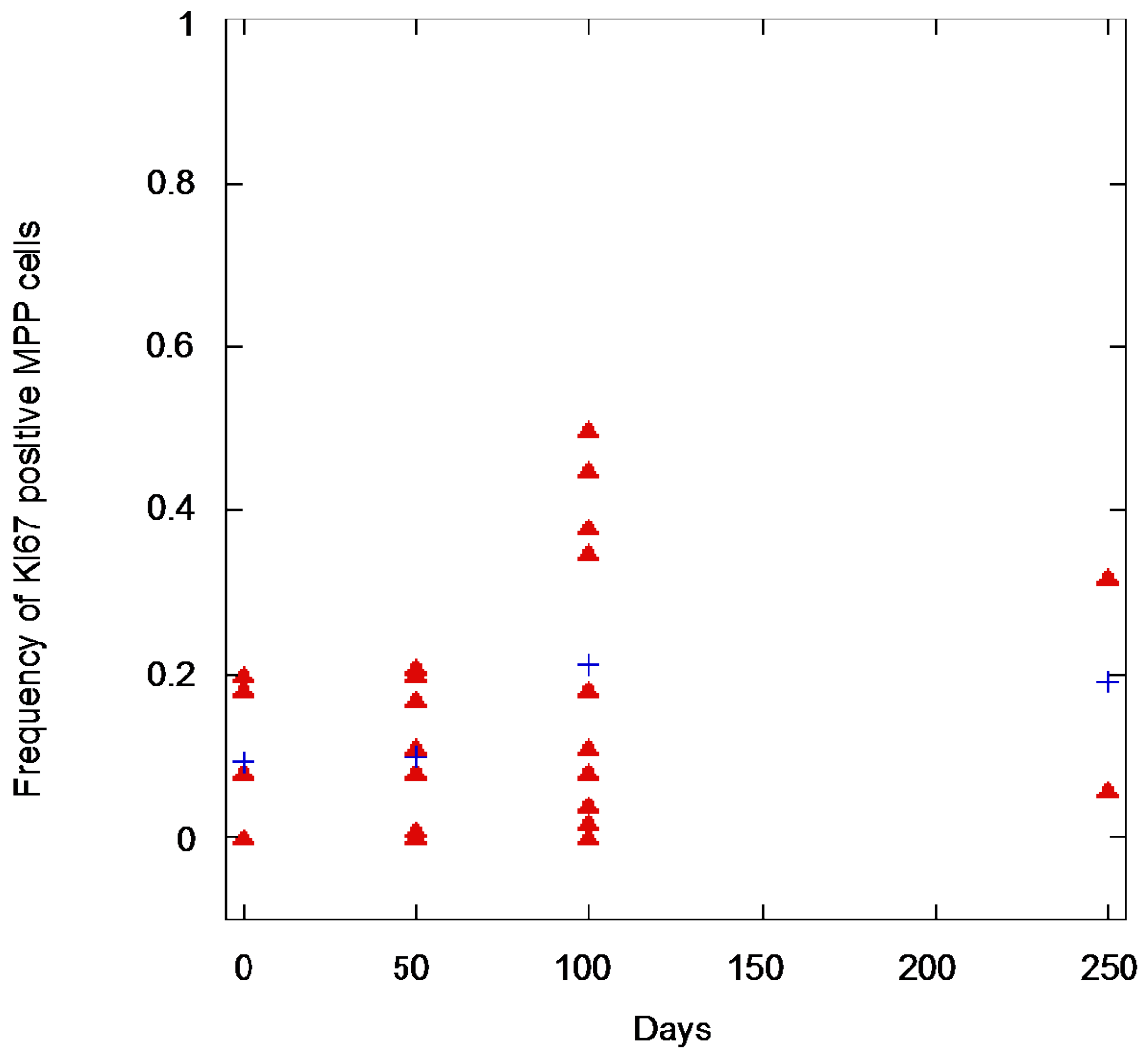


図 III-51 1 Gy/min 群のマウスの MPP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ▲: マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

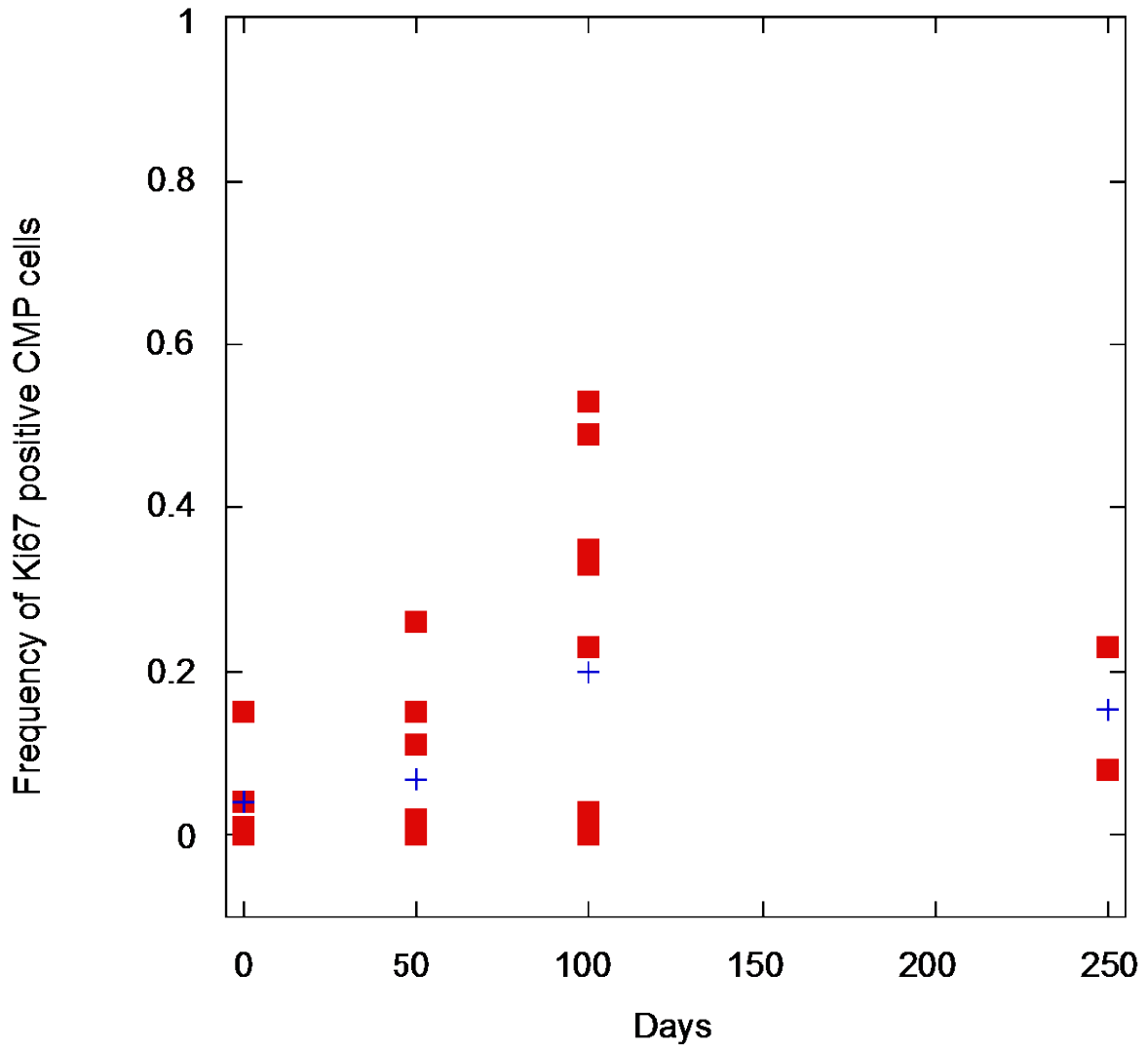


図 III-52 1 Gy/min 群のマウスの CMP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化
 ▲: マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

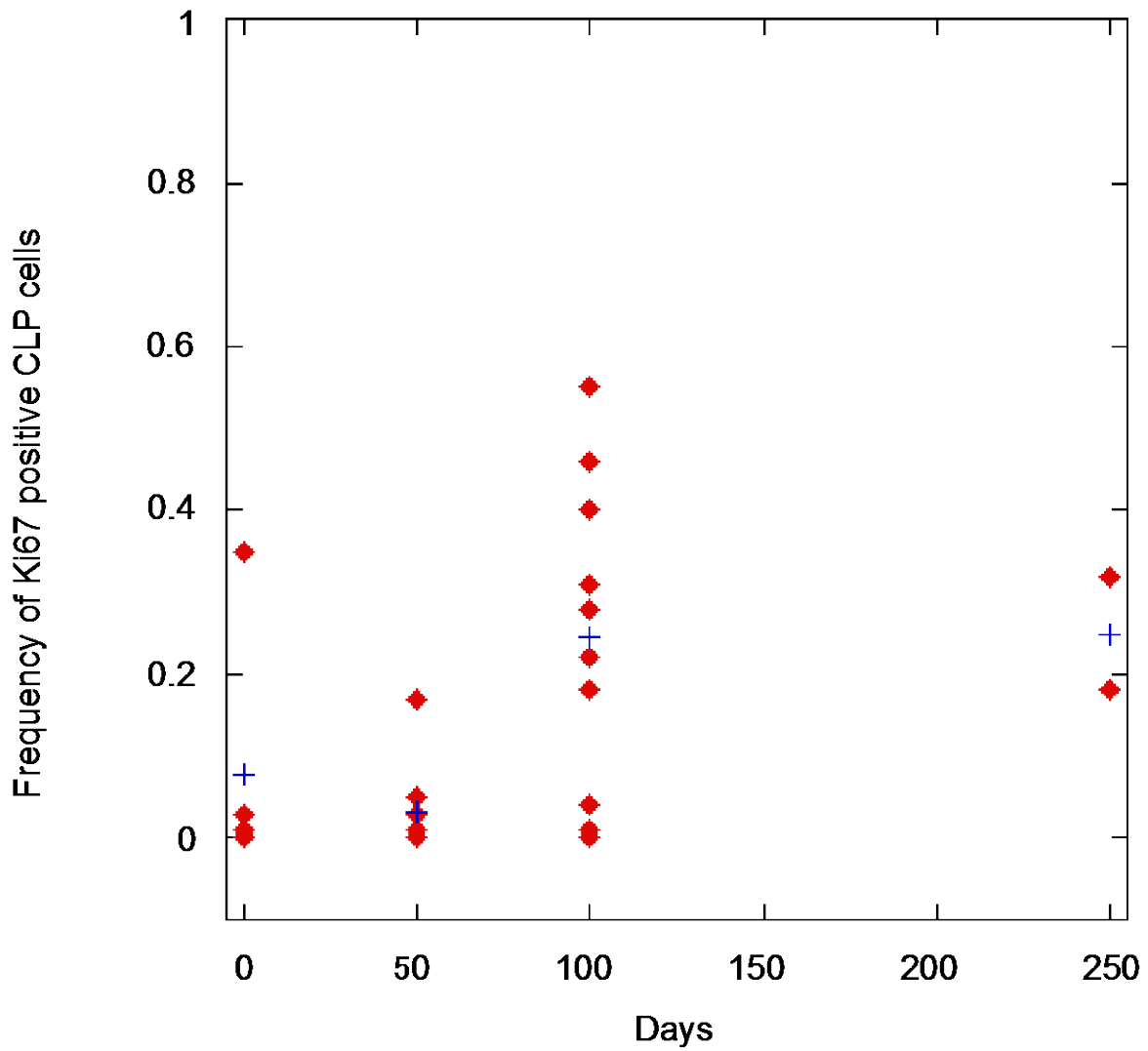


図 III-53 1 Gy/min 群のマウスの CLP における Ki67 発現細胞の割合の経時的変化

◆ : マウス 1 匹毎の Ki67 発現細胞、+ : 平均値を表す。

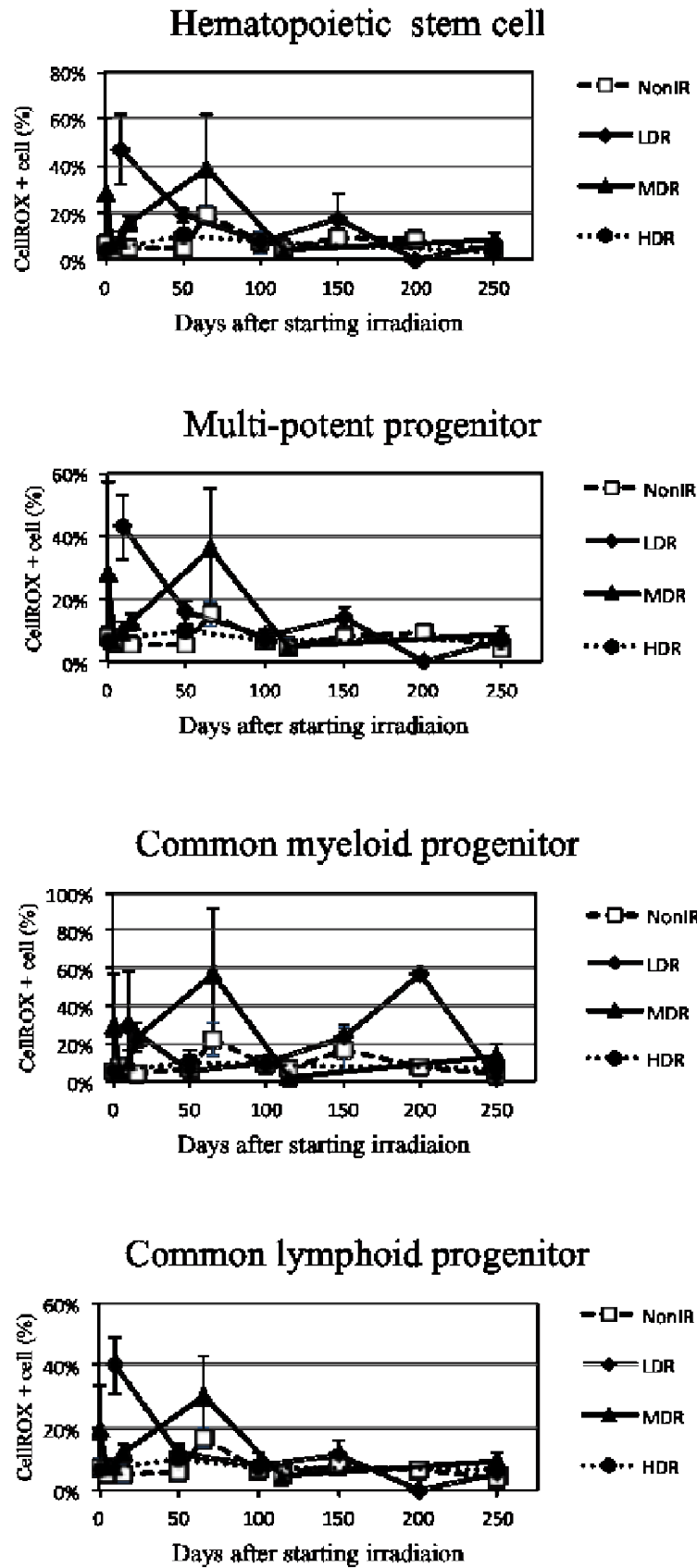


図 III-54 造血幹/前駆細胞における ROS 発現細胞の割合の経時的変化

IV. 造血幹細胞および前駆細胞の動態に関する数理モデル

造血系細胞の動態は、血液幹細胞(HSC)から前駆細胞を経て、白血球や赤血球のような末梢血液細胞まで分化していく複雑なプロセスである。健常組織の恒常性はフィードバックによって維持されており、その信号は分化した細胞から発せられる。本研究では、造血系細胞の動態をフィードバックの機構を組み込んだ数理モデルによって記述することで、放射線照射が造血幹細胞の分化に与える影響を分析する。マウスの急性骨髄性白血病(AML)は、HSCの複製ストレスによってAMLの発症に必要な変異する確率が増加するとする仮説を検証するためには、造血系細胞の動態の放射線による影響を調べる必要がある。本研究では、造血系細胞の動態をフィードバックの機構を組み込んだ数理モデルによってシミュレーションし、マウスの実験データと比較することで、造血系細胞の動態に与える放射線の影響を分析した。

IV-1. フィードバックを組み込んだ数理モデルの構築

造血幹細胞からの血液分化過程における組織の恒常性を維持するフィードバックの仕組みを組み込んだ Ignacio ら¹⁾による数理モデルを用いた。このモデルは分化後の細胞から分化前の細胞に対して送られるフィードバックのシグナルが数理的に組み込まれている。今回、モデルを構築していく上で造血幹細胞 (HSC)、多能性前駆細胞 (MPP)、骨髄球系造血前駆細胞 (CMP)、リンパ球系前駆細胞 (CLP) までに焦点を当てた。モデルの概要を図 IV-1 に示す。図 1 において、幹細胞 (S)、多能性前駆細胞 (D)、リンパ球系前駆細胞 (D₂)、骨髄球系前駆細胞 (D₃) とし、それぞれの細胞数を表す。また、各パラメータが持つ特性は以下の通りである。造血幹細胞の細胞分裂速度 (p)、分化した細胞が形を変えず再び造血幹細胞となる確率 (q)、前駆細胞の細胞分裂速度 (r)、分化した細胞が形を変えず再び前駆細胞となる確率 (s)、前駆細胞から分化した細胞のうち CMP へとなる確率を (u)、CMP から分化および細胞死する速度 (w₁)、CLP から分化および細胞死する速度 (w₂) と置いた。これらは分化後の細胞からフィードバックを受けるものとしている。以上の方程式を利用し、定常状態の造血系細胞数の確認を行った。これらの分化過程を次の微分方程式で表現した。

$$\begin{aligned}
 \frac{dS}{dt} &= \{(2q(D)-1)p(D)-a\}S \\
 \frac{dD}{dt} &= 2(1-q(D))p(D)S + \{(2s(D_{2,3})-1)r(D_{2,3})-b\}D \quad \dots (式-1) \\
 \frac{dD_2}{dt} &= 2(1-s(D_{2,3}))r(D_{2,3})uD - w_1D_2 \\
 \frac{dD_3}{dt} &= 2(1-u(D_{2,3}))r(D_{2,3})(1-s(D_{2,3}))D - w_2D_3
 \end{aligned}$$

分化後の細胞から分化前の細胞に対して送られるフィードバックについては次のように表される。

$$\begin{aligned}
p(D) &= p_0 / (1 + gD^k) \\
q(D) &= q_0 / (1 + hD^l) \\
r(D_{2,3}) &= r_0 / (1 + i_1 D_2^{m_1} + i_2 D_3^{m_2}) \\
s(D_{2,3}) &= s_0 / (1 + j_1 D_2^{n_1} + j_2 D_3^{n_2})
\end{aligned}
\quad \dots (式-2)$$

式-1の微分方程式は順に HSC、MPP、CMP、CLP の動態をモデル化したものであり、これらの微分方程式は MATLAB の ode45 を使用して解いた。実験データにおける放射線非照射時およびコントロール群の細胞数を基準として定常状態のパラメータを推定した。

IV-2. 数理モデルによるデータの解析結果

上記で構築した数理モデルを用いて、HSC、MPP、CMP、CLP の4つの細胞動態についてシミュレーションを行った。まず、血液細胞数の標準値となる定常状態についてパラメータを推定した。このパラメータはフィードバックの強弱を決定するとともに各方程式の収束値を決定することがわかった。そのため定常状態としての初期値が異なる場合であっても、改めて各パラメータを推定することで対応できることがわかった。次に、放射線による影響を照射期間および照射線量に応じた条件付けを行い、実験データに適合するパラメータを探索した。その結果、実験データ全体を説明可能な HSC、MPP、CMP、CLP の時間変化をモデル化できた。結果を図 IV-2~10 に示す。

IV-2-1. 線量率ごとの解析結果

各線量率群を 20 mGy/day 群(LDR)、200 mGy/day 群(MDR)、1 Gy/min 群(HDR)の3群について実験データとモデル解析結果を比較した。

<LDR の実験データとの比較>

LDR の照射期間は 150 日間である。そのうち、100 日付近まで HSC の細胞数の減少が緩やかに生じている。一方、MPP は HSC よりも 10 日付近までに急激に細胞数が減少している。そのため、アポトーシスに関するパラメータ (a、b) を細胞の減少が継続している期間ごとに条件づけた。するとモデル計算において MPP の減少に伴い、CMP、CLP も急激に減少した。したがって、CMP、CLP の細胞動態は MPP の絶対量に大きく左右されることが示された。その後、50 日付近で再び減少傾向となるのは、HSC の減少がまだ継続しているため、MPP、CMP、CLP の減少が継続し、150 日時点にはフィードバックによる回復が働き、250 日までには回復に至っている。250 日時点で CMP、CLP が初期値に近い、もしくはそれよりも高値まで回復を示している 要因として以下のことで説明できる。まず、MPP からの分化比率 (r_0) を上昇させる条件付けをすることで定常状態よりも末梢への供給量を増やしていることが言える。その一方で照射期間外において末梢への分化速度 (w_2) が低下する条件付けをすることで CLP よりも末梢における白血球数の減少が生じていることを説明が出来る。

<MDRの実験データとの比較>

HSCでは照射期間の15日間の中でLDRと比較し短期間で細胞数の減少がみられるがLDRと同様に回復は緩やかに進み250日には回復に至る。一方、MPPはHSCとの大きな差が無く類似した動態変化を示している。そのため、アポトーシスに関するパラメータ(a, b)の条件付けは同期間において、よりHSCのアポトーシス(a)が急激に生じるように設定した。その条件付けによってHSCにおいてLDRよりもMDRの方が放射線の効果が強く現れていることがわかった。また、CMP、CLPのアポトーシス(w_1, w_2)が増加する条件付けを与えることで、MDRではMPPの動態変化以上にCMP、CLP自体の動態、とくにアポトーシスによって細胞数が減少していると考えられることで説明できた。

<HDRの実験データとの比較>

HDRは3分間の照射なので、0日時点で照射が終了している。細胞のアポトーシスについてはCMP、CLP(b, w_1, w_2)の減少について短期間で条件付けすることでデータに適合できたので、照射時点における細胞のアポトーシスが急激に生じていることがわかった。その後も動態変化が生じていることがわかった。とくに、HSC、MPPの分裂速度(p_0, r_0)が上昇することで、全体への供給量を補っていると考えられる。加えて50日付近まではHSCが分化後に再びHSCとなる自己再生確率(q_0)が下がることで末梢への供給が促進されるといえる。そして、50日付近で、再びHSCとなる自己再生確率(q_0)が上昇するように条件付けることでHSCの回復過程についても説明することが出来た。

IV-2-2. 線量率ごとの細胞動態のモデル解析についての考察

LDRの細胞動態の場合、HSCの放射線影響による動態変化は、照射期間途中までアポトーシスが継続し、その後、MPP細胞数の減少によるフィードバックによって回復が働き、250日後には回復に至ることが示された。一方、CMP、CLPにおける細胞数の急激な変化は、MPPのアポトーシスが短期間において生じ絶対量が減少しているため、供給が制限されることが要因と言える。その後、HSC、MPPからの分化細胞の供給によって緩やかに細胞数の回復が生じていることがモデルによって説明することができた。50日付近で再び減少傾向となるのは、HSCの減少がまだ継続しているため、CMP、CLPの減少が継続していると言える。

MDRにおけるHSCとMPPの動態変化はLDRの場合とは異なり、2つの動態変化が類似した傾向を示している。そのため供給先であるCMP、CLPにおいて、HSCの動態変化に伴い、ごく初期において細胞数の減少が生じている。このことからMDRはLDRの場合よりもHSCにおけるアポトーシスが急激に生じており、より高い線量率によってHSCへのダメージが大きくなることが示された。

HDRの細胞動態では、LDR、MDRとは異なり、HSCの減少はアポトーシスだけではなく、末梢からの需要が供給量を上回っていることが大きな要因だと考えることができる。そのため他の線量率(LDR,MDR)よりもCMP、CLPの動態変化がHSCの減少に伴い大きく減少していないと言える。また、線量率が上がるに連れて、各細胞における分化速度が定常状態よりも一時的に変化していることがパラメータの条件付けから説明できる。つまり、回復の過程において定常状態よ

りも分化後の細胞からのフィードバックが強く働くことで、回復に至ることをシミュレーションによって示すことができた。しかし、放射線によるアポトーシスは CMP、CLP よりもさらに末梢の細胞においても生じていることから、今後は、さらに末梢細胞からのフィードバックを組み込んだ数理モデルを構築することで、より詳細な放射線による細胞動態への影響を調べることが出来ると考える。

図 IV-11~12 に、リンパ球系前駆細胞と造血幹細胞のすべての線量率データを重ねて描いたグラフを参考のために示す。

IV-2-3. 線量率ごとの累積細胞分裂数の計算

本研究は、放射線が誘発する造血系細胞の動態変化によって自然突然変異が増幅されることが生じているという仮説を検証するために計画された。そこで、実験データに整合するモデルによって計算される各造血系細胞の累積細胞分裂数を計算した。計算方法は次の通りである。

$$\begin{aligned} \text{HSC の累積細胞分裂数} &= \int_0^T p(d)S dt \\ \text{MPP の累積細胞分裂数} &= \int_0^T r(D_{2,3})D dt \\ \text{CMP の累積細胞分裂数} &= \int_0^T w_1 D_2 dt \end{aligned}$$

計算結果を図 IV-13~15 に示す。この結果、LDR と MDR では累積細胞分裂数に明らかな違いを認めることができなかった。HDR は、LDR・MDR と 3 倍から 4 倍程度の違いが認められた。

IV-2-4. 累積細胞分裂数の線量率効果についての考察

本研究結果から、累積細胞分裂数に比例して *Sfp1* の点突然変異が上昇するとするならば、放射線による AML の発症率は、累積線量が同じであっても線量率の違いによって 3 倍から 4 倍程度の違いが生じることが予想できる。この予想は、古瀬が報告する AML の線量率実験²⁾の結果ともほぼ一致する。LDR と MDR に違いは認められないのは本研究結果と古瀬らの結果とも一致し、この程度の線量率では変化が顕著でないことを示した。しかし、実際の問題となるさらに 100 分の 1 の線量率 (0.2mGy/day = 8.3μGy/hr) においても細胞動態に同じような影響がもたらすのかは明らかではない。最近の環境科学技術研究所が行った染色体異常の線量率効果では、20mGy/day から 1mGy/day に線量率を低減することで、線量反応関係の 1 次項の傾きに違いがある³⁾。この結果からも、本研究の結果は、さらに線量率を低減することによって細胞動態に与える影響は低下し、累積細胞分裂数は低下することが予想される。今後の実験によって検証していくべき課題で

ある。

従来、放射線は初期の DNA 直接損傷によって修復エラーなどの原因によって突然変異が蓄積し、その結果、多段階発がん過程に寄与すること考えられてきた。最新のサイエンスで報告されている論文では⁴⁾、がんの生涯リスクと幹細胞の累積細胞分裂数が高い相関関係にあることを示し、細胞分裂に伴う DNA replication によるランダムな突然変異が生じる確率の違いが組織間のリスクの大小を説明するものであることを示唆した。このことから、高線量率によって誘発される放射線がんは、放射線によって損傷を受けた組織の修復過程で起きる細胞動態の結果として DNA replication によるランダムな突然変異が生じる確率の上昇を導いていると考えることができる。本研究では、造血系幹細胞・前駆細胞から生じると考えられる AML の発症における放射線の関与は、細胞動態の変化を通して起きるといふ仮説を基に、線量率効果を実験的に調べ、モデル解析によって線量率効果の影響を推定した。本仮説はさらに検証するために実験研究を進めていく必要がある。

これまで、放射線による直接 DNA 損傷を契機として生じる突然変異が放射線発がんにつながるというモデルが主流となっている。このモデルによれば、線量率を低減しても one track で生じるある線量率以下であれば線量率効果は消失してしまうことを予想する。しかし、このモデルが正しくなく、放射線がん誘発のプロセスに組織損傷による修復プロセスが重要な役割を果たしているとすれば、低線量および低線量率へのリスク推定のアプローチは大きく変わってくる可能性がある。内部被ばくは、摂取量(Bq)の低下が線量だけでなく、線量率の低下を意味するため、単純な線形関係でリスクを表現することができないことが示唆されてきた^{5,6)}。高線量率がもたらす組織・細胞損傷がその後のがんリスクにどのように影響を与えているか、低線量率とはどこが決定的に異なるのか、従来の DNA 損傷モデルでは解明できなかった様々な高線量率と低線量率の違いを明らかにするためには、モデルを明確にして比較検証して必要がある。

引用文献

- 1) Ignacio A Rodriguez-Brenes. Evolutionary dynamics of feedback escape and the development of stem-cell-driven cancers, PNAS 2011; 108: 18983-18988.
- 2) 古瀬健. (1999)、マウス白血病発生における低線量率放射線の影響、放射線科学 1999;42 Suppl.: 29-36.
- 3) Tanaka K Satoh K Kohda A. Dose and dose-rate response of lymphocyte chromosome aberrations in mice chronically irradiated within a low-dose-rate range after age adjustment. Radiation Protection Dosimetry 2014; 159(1-4):38-45.
- 4) Tomasetti C Vogelstein B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. Science 2015; 347(6217): 78-81.
- 5) Raabe OG. Concerning the health effects of internally deposited radionuclides. Health Phys. 2010; 98(3): 515-536.
- 6) Brooks AL Eberlein PE Couch LA Boecker BB. The role of dose-rate on risk from internally-deposited radionuclides and the potential need to separate dose-rate effectiveness factor (DREF) from the dose and dose-rate effectiveness factor (DDREF). Health Phys. 2009; 97(5): 458-69.

図表

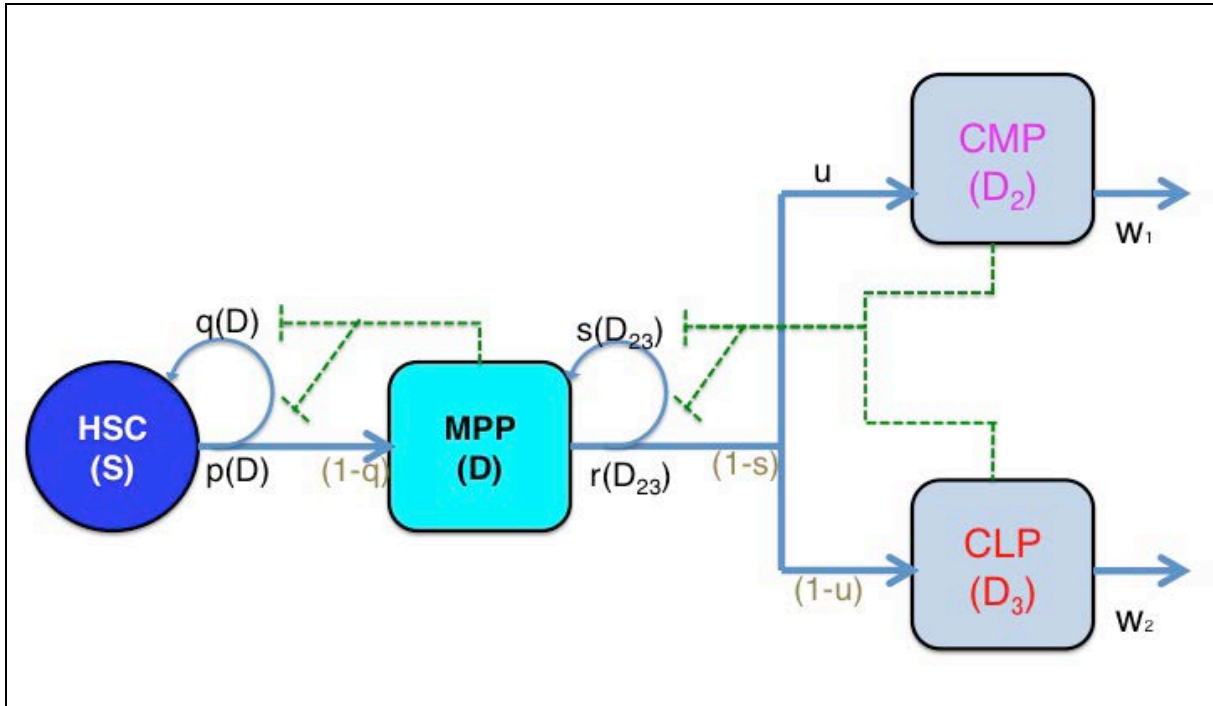


図 IV-1 造血系細胞の動態をフィードバックループの機構を組み込んだ数理モデル

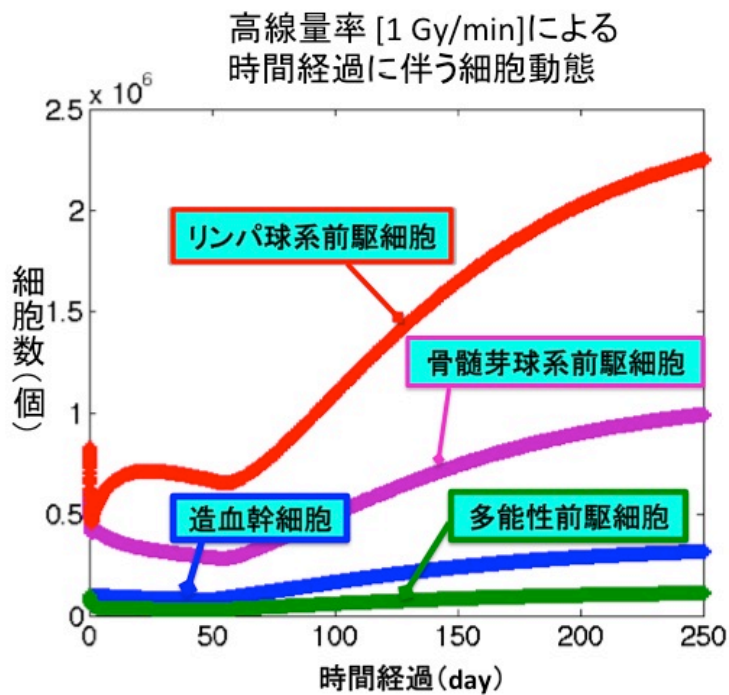


図 IV-2 高線量率による時間経過に伴う細胞動態

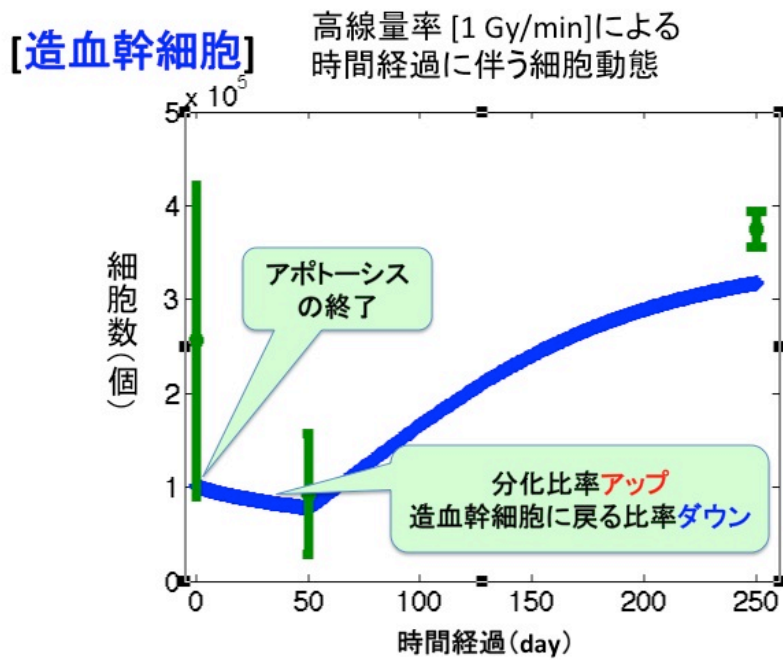


図 IV-3 高線量率による時間経過に伴う造血幹細胞の細胞動態

**[リンパ球系
前駆細胞]**

高線量率 [1 Gy/min]による
時間経過に伴う細胞動態

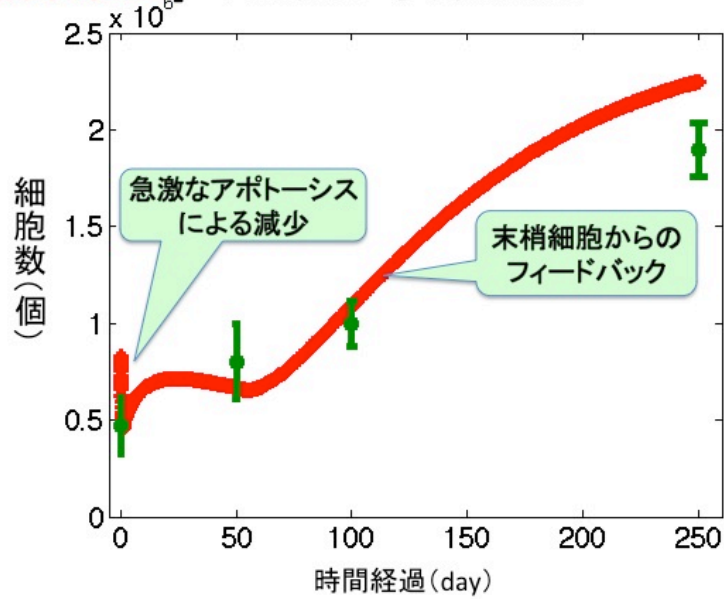


図 IV-4 高線量率による時間経過に伴うリンパ球系前駆細胞の細胞動態

中線量率 [200 mGy/day]による
時間経過に伴う細胞動態

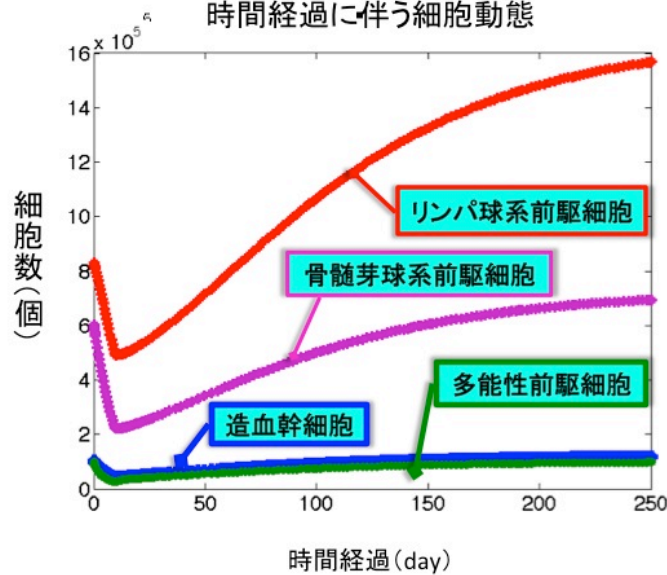


図 IV-5 中線量率による時間経過に伴う細胞動態

[造血幹細胞] 中線量率 [200 mGy/day]による
時間経過に伴う細胞動態

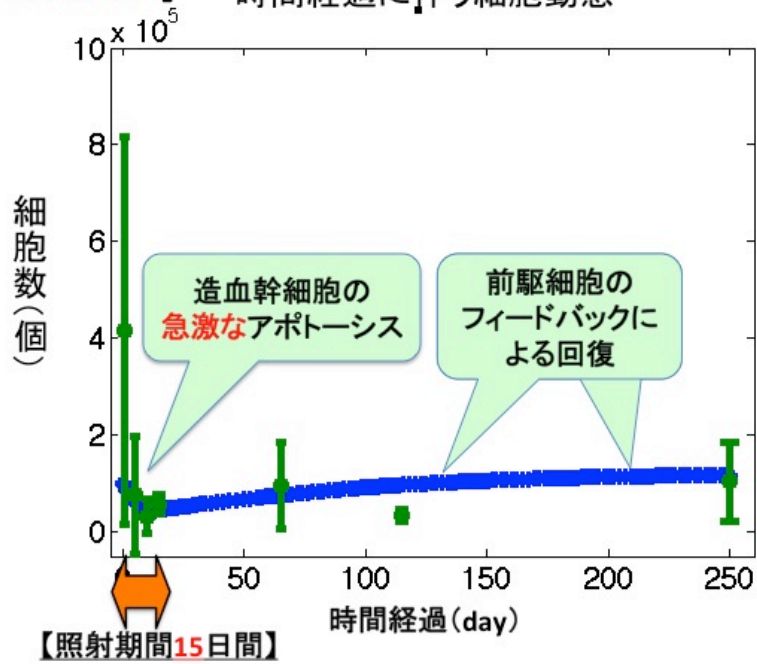


図 IV-6 中線量率による時間経過に伴う幹細胞の細胞動態

**[リンパ球系
前駆細胞]** 中線量率 [200 mGy/day]による
時間経過に伴う細胞動態

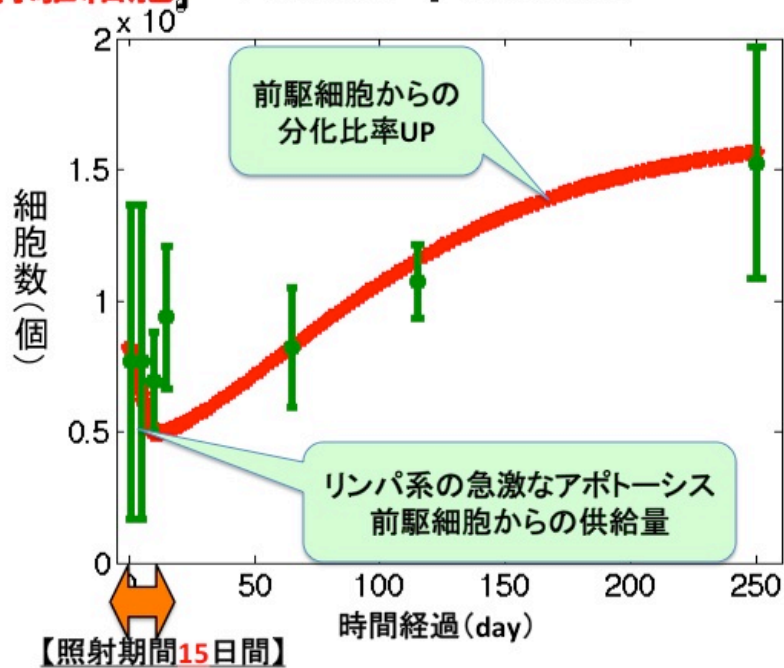


図 IV-7 中線量率による時間経過に伴うリンパ球系前駆細胞の細胞動態

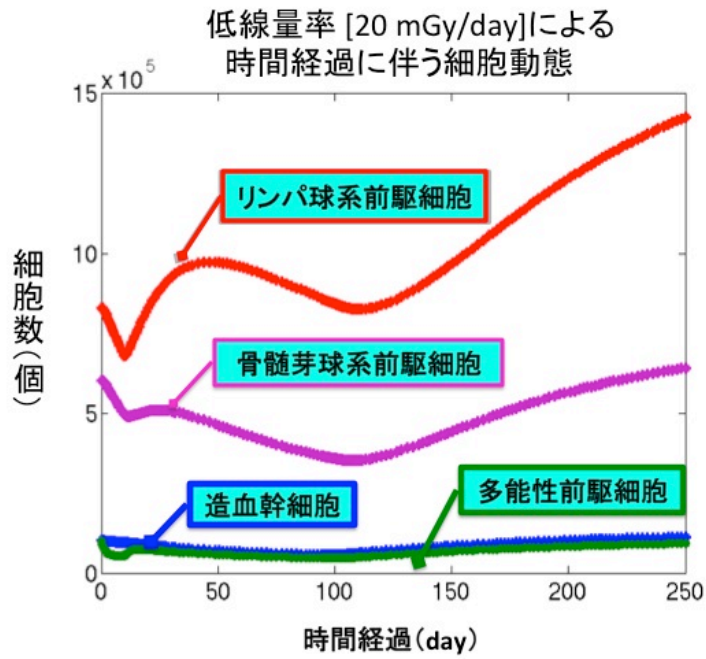


図 IV-8 低線量率による時間経過に伴う細胞動態

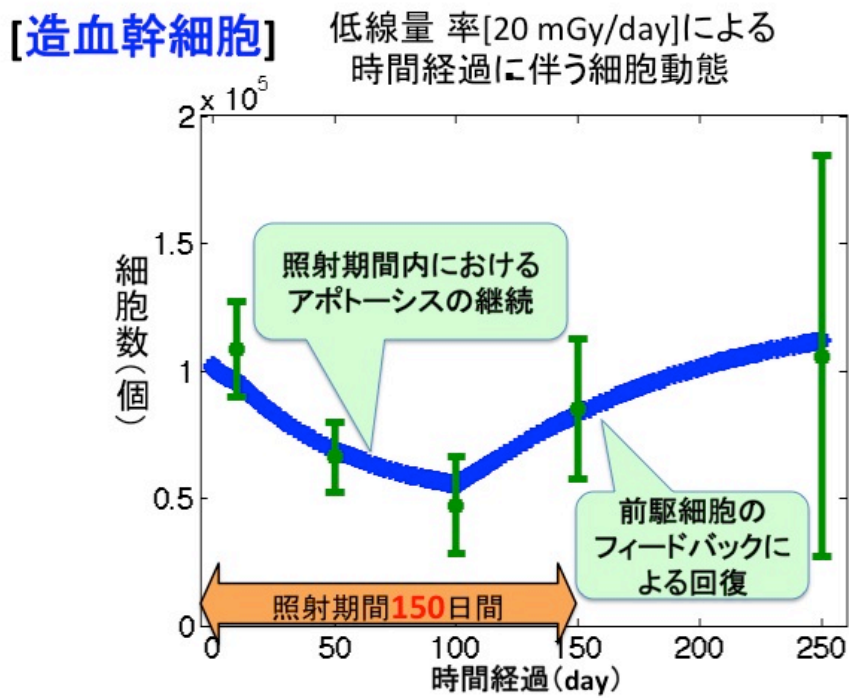


図 IV-9 低線量率による時間経過に伴う造血幹細胞の細胞動態

[リンパ球系 前駆細胞]

低線量率[20 mGy/day]による
時間経過に伴う細胞動態

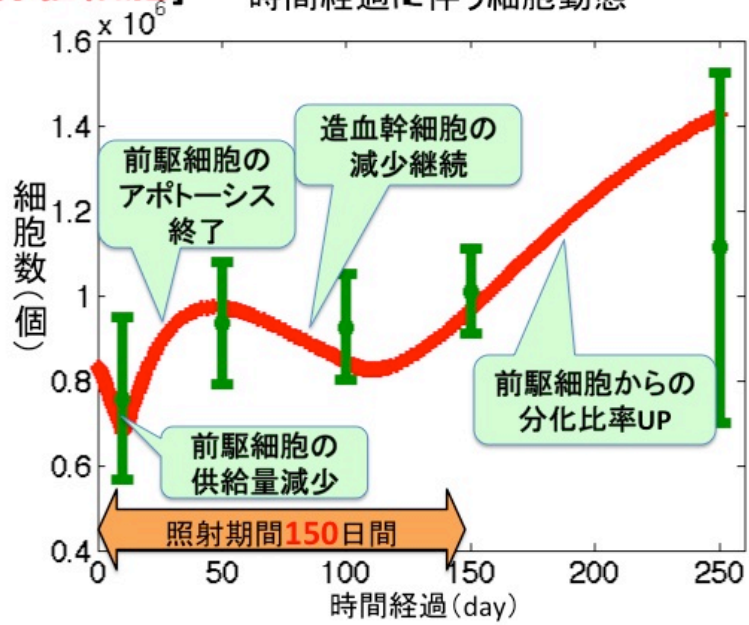


図 IV-10 低線量率による時間経過に伴うリンパ球系前駆細胞の細胞動態

[造血幹細胞] 低線量率、中線量率、高線量率
による細胞動態の比較

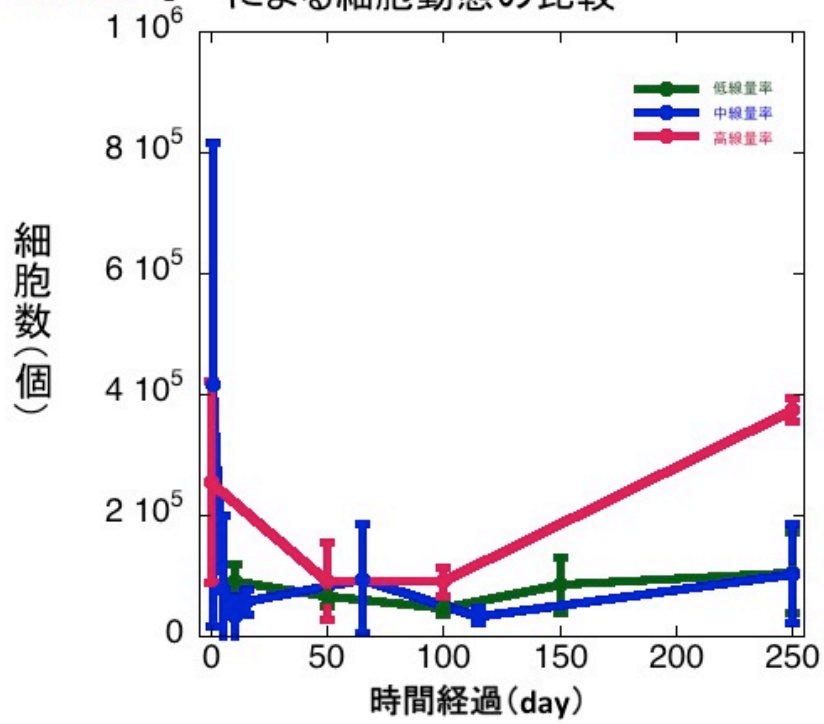


図 IV-11 各線量率による時間経過に伴う造血幹細胞の細胞動態

[リンパ球系前駆細胞] 低線量率、中線量率、高線量率による細胞動態の比較

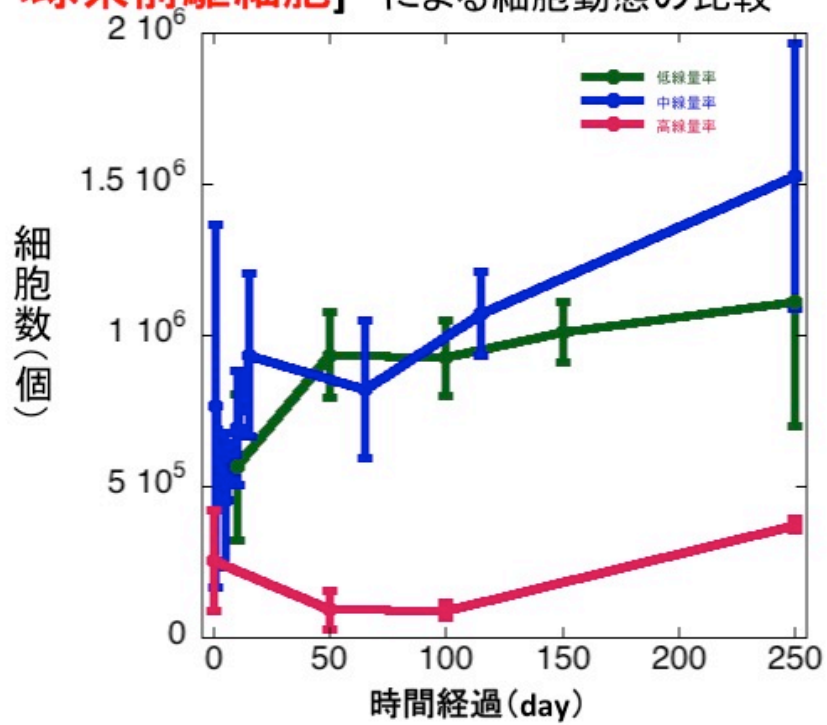


図 IV-12 各線量率による時間経過に伴うリンパ球系前駆細胞の細胞動態

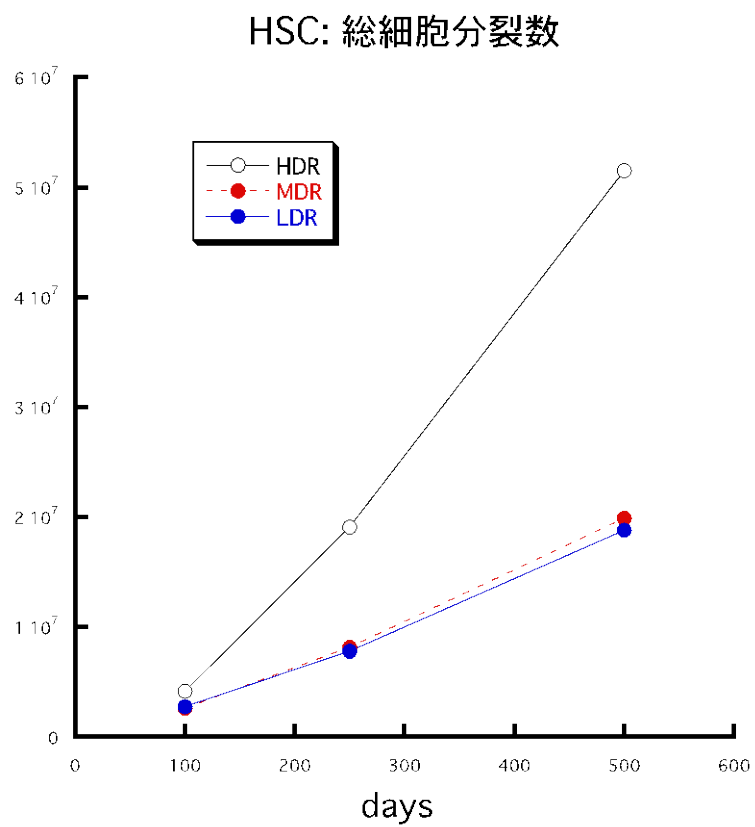


図 IV-13 線量率の違いによる幹細胞の累積細胞分裂数の時間変化

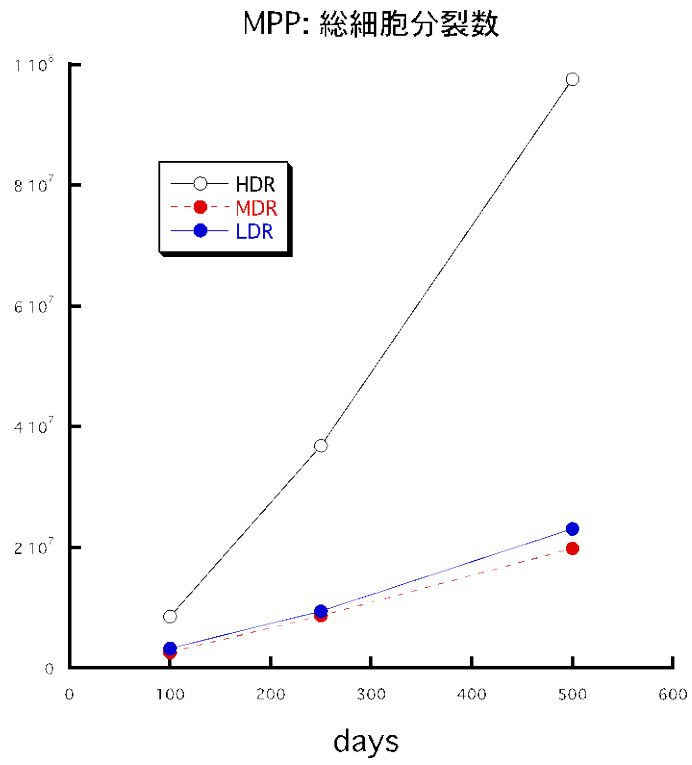


図 IV-14 線量率の違いによる前駆細胞の累積細胞分裂数の時間変化

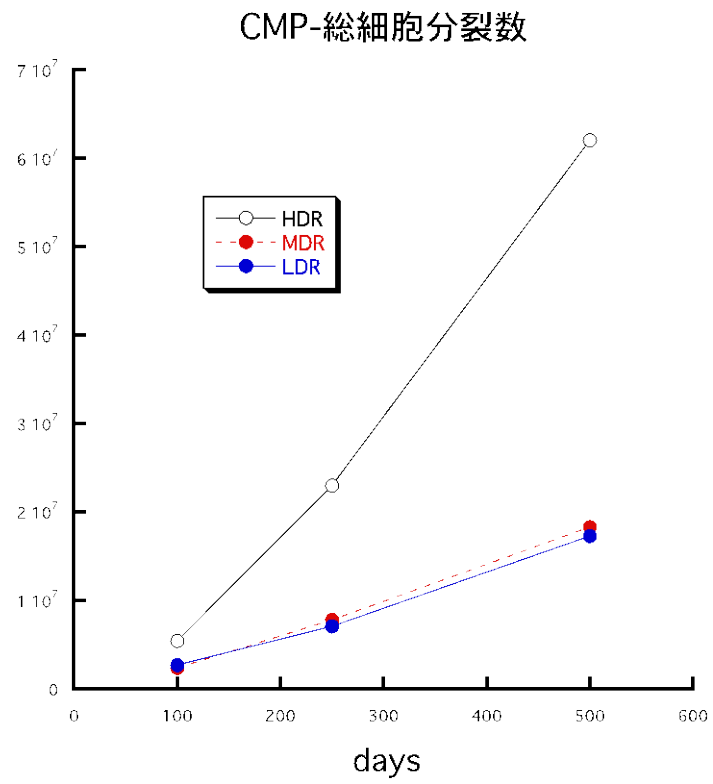


図 IV-15 線量率の違いによるリンパ球系前駆細胞の累積細胞分裂数の時間変化

V. 結論

本研究結果より、放射線による AML 誘発過程を図 V-1 に示す。図 V-1 より、放射線は造血系細胞に線量率に応じて動態変化を引き起こす。この動態変化は複製ストレスや細胞老化に伴う ROS の蓄積の原因になりうる。これらにより、AML に必須な DNA 損傷を誘発する可能性は十分考えられる。この可能性を示唆するデータとして、予備実験ではあるが 3 Gy の X 線を全身照射した ICR 系マウスの末梢血リンパ球における DNA 損傷の経時的変化を調べたところ、照射後 90 日以降に DNA 損傷が再誘発されることが分かった (図 V-2)。よって、放射線がんのリスクを考える上で細胞動態を詳細に解析していくことが重要である。

図表

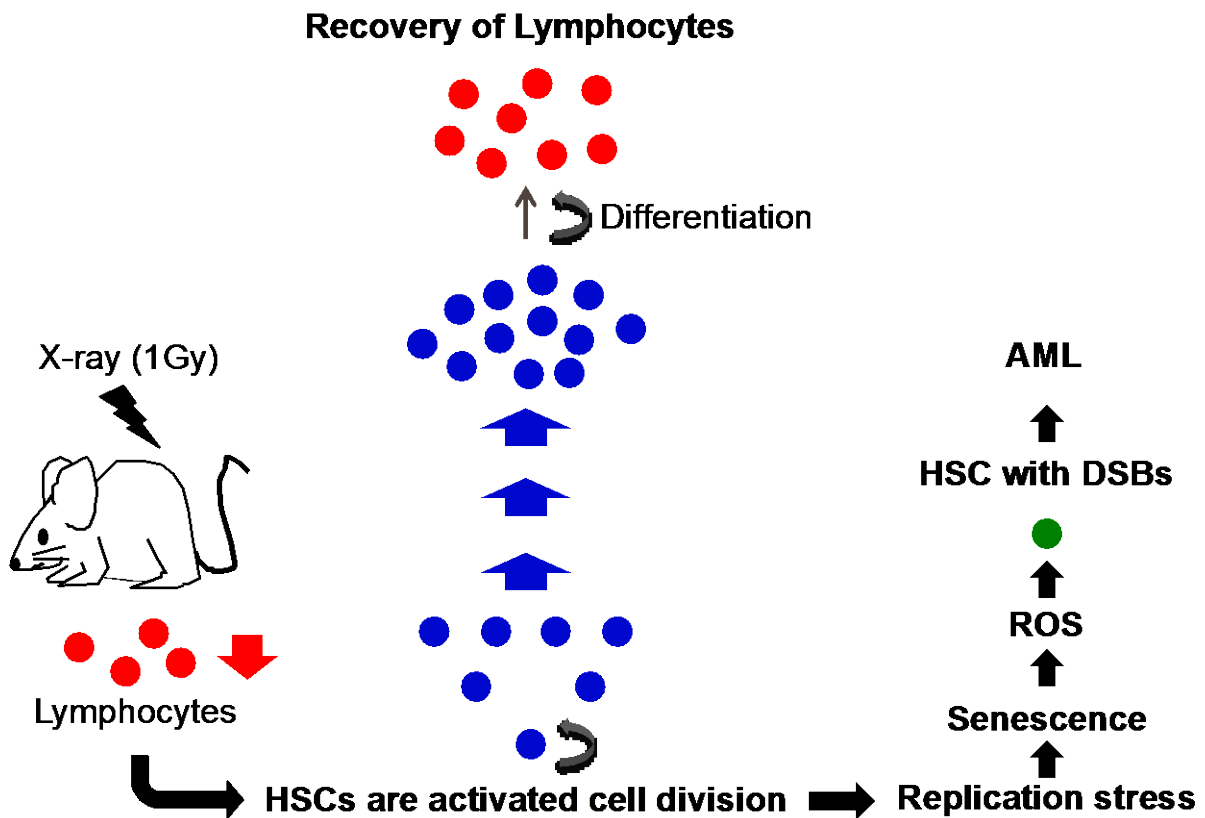


図 V-1 放射線による AML 誘発過程の仮説

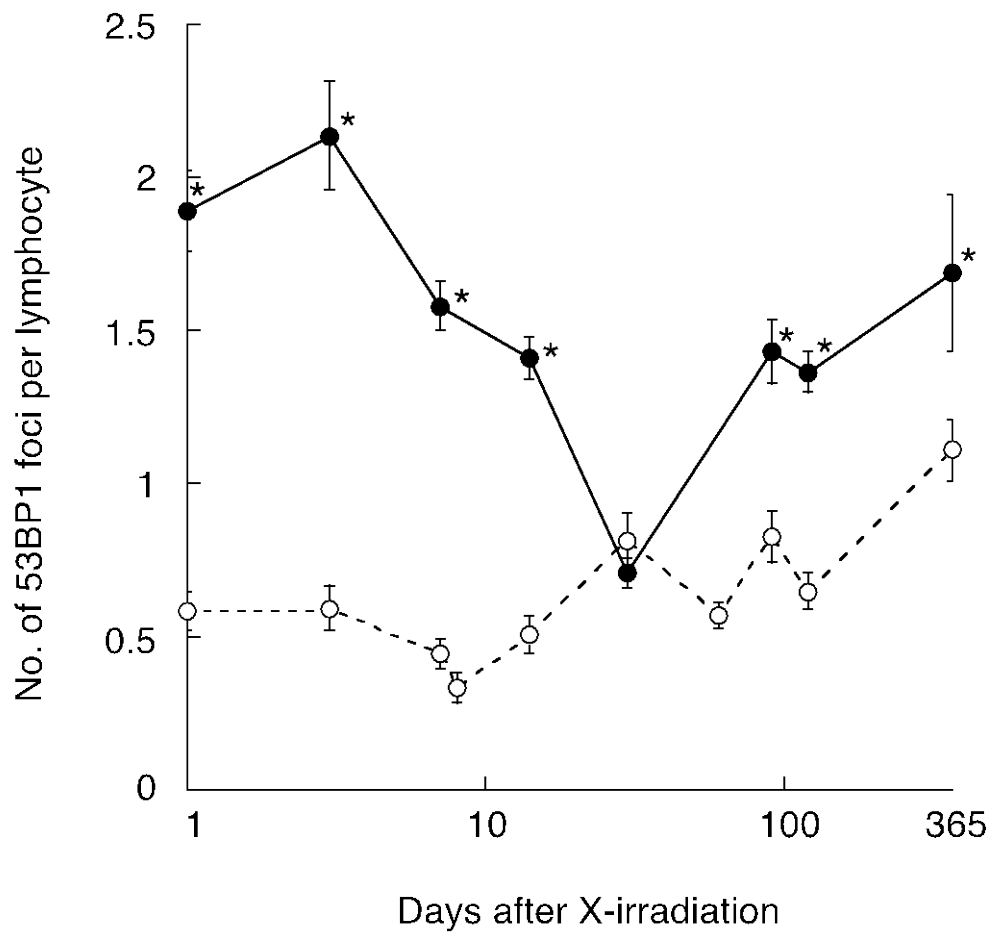


図 V-2 X線を全身照射したマウスの末梢血リンパ球における DNA 損傷の経時的変化
 ● : 1 Gy 照射群、○ : 非照射群、* : t-test, $p < 0.05$ 、エラーバー : 標準誤差をそれぞれ表す。

VI. 本研究に関する研究業績

- 1) 甲斐倫明. 低線量・低線量率のリスク推定のための理論とデータ. 放射線生物研究, 2012; 47: 379-393.
- 2) 小嶋光明. 低線量域における線量率効果～二動原体染色体発生頻度に着目して～. 放射線生物研究, 2012; 47: 347-360.
- 3) 石川純也, 小嶋光明, 甲斐倫明. 放射線による造血幹／前駆細胞の動態変化. 放射線生物研究, 2014; 49: 127-140.
- 4) Ojima M Ito M Suzuki K Kai M. Unstable chromosome aberrations do not accumulate in normal human fibroblast after fractionated X-irradiation. *Plos One*, 2015; 10: e0116645.

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

Oita University of Nursing and Health Sciences

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 of cell turnover (the number of cells, and of Ki67, which shows up regulate of cell cycle, positive cells) in hematopoietic stem cells (HSC) and progenitors (MPP, CMP, CLP) of total-body irradiated C3H/He N1c1 mice at 20 mGy/day, 200 mGy/day and 1000 mGy/min. This experiment followed up until 250 days after irradiation. The data suggested that cell turnover changes by dose-rate. IR damage HSCs by inducing apoptosis, since HSCs are relatively sensitive to IR. Then, we thought that the normal HSCs, which escaped apoptosis, might be activated cell turnover. It has been reported that cell turnover causes aging. The aged cell produces accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS), which induces damage to DNA. In this study, we also observed that accumulation of ROS occurred during irradiation in HSC and progenitors. Therefore, we hypothesized that aging through IR-induced cell turnover can induce rAML-related mutations. The model analysis of our experimental data produced a consistent insight 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

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）

山盛 徹（北海道大学大学院獣医学研究科・放射線生物学・准教授）

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一昨年に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、分担研究課題「放射線による循環器障害に関する分子機構の解明（主任研究者：富山大学・近藤 隆）」と分担研究課題「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索（分担研究者：弘前大学・柏倉 幾郎）」を実施した。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、分担研究課題「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割（分担研究者：北海道大学・山盛 徹）」を実施した。本研究では、低線量の影響についても検討し、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- β II の発現増加を介して、eNOS が活性化する経路と細胞内活性酸素(ROS)が関係する二つの経路があり、NO 産生に至る新たな過程が明らかとなった。但し、eNOS 活性化は 0.5 Gy 以下では明かな変化は認められなかった。
- 2) ヒト造血幹細胞への2Gy照射でc-Myc発現が有意な変動を示した。マウスにおいては低線量 (0.2 Gy) でも認められ、また時間依存的に増加した。さらに、下流遺伝子のうちEIF4G1及びPNO1遺伝子の発現が上昇した。また、マウス造血幹・前駆細胞から肥満細胞への分化は放射線により低下したが、脱顆粒応答性が増加したことから、放射線被曝による肥満細胞の量的および質的变化が、慢性的な炎症に繋がる可能性が示された。
- 3) 本研究において、X 線によるミトコンドリア形態変化には 2.5 Gy 以上の線量が必要であること、ならびに放射線照射後のミトコンドリア機能変化は、ミトコンドリア形態制御タンパク質である Drp1 に依存していないことが明らかとなった。また、インビボにおいても X 線によりミトコンドリア機能に影響が生じるが、これには 3 Gy 以上の線量が必要であることが示された。さらに、放射線照射により細胞からのサイトカイン分泌に影響があり、それは照射線量により異なる効果をもたらすことが観察された。

キーワード: ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ミトコンドリア、炎症造血幹細胞、CD34 陽性細胞、c-Myc、Drp1

研究協力者: 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）、廣内篤久（環境科学技術研究所・主任研究員）

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、研究課題「放射線による循環器障害に関する分子機構の解明（主任研究者：富山大学・近藤 隆）」および研究課題「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索（分担研究者：弘前大学・柏倉 幾郎）」で実施した。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研究課題「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割（分担研究者：北海道大学・山盛 徹）」で実施した。研究課題「放射線による循環器障害に関する分子機構の解明（主任研究者：富山大学・近藤 隆）」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。「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索（分担研究者：弘前大学・柏倉 幾郎）」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 障害が細胞死には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¹⁾。しかし、その詳細については未だ知られていない。「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割（分担研究者：北海道大学・山盛 徹）」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²⁾。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。eNO S の活性については、³H]-L-arginine から³H]-L-citrulline への変換について放射活性を調べることで行った。必要に応じて、各種、阻害剤を用いた。

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、 γ -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 をインターカレ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。

「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割(分担研究者:北海道大学・山盛 徹)」については、次の方法により行った。細胞実験において、Drp1 遺伝子欠損マウス胚線維芽細胞 (KO MEF) およびそのコントロールとなるマウス胚線維芽細胞 (WT MEF) を使用した。細胞内ミトコンドリア形態の観察は、細胞をミトコンドリア染色色素で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。ミトコンドリア由来 ROS 量およびミトコンドリア膜電位の測定は、それぞれに対し特異的な蛍光色素とフローサイトメーターを用いて行った。分裂期崩壊の解析は常法に従って行った。インビボ実験では、C57BL/6NCr マウスに X 線全身照射を行い、照射後に脾臓を摘出しリンパ球を比重遠心法により回収した。単離した脾臓リンパ細胞の ROS ならびにミトコンドリア膜量はそれぞれに対する特異的蛍光色素とフローサイトメーターにて評価した。さらに、サイトカイン分泌については細胞より分泌されたサイトカインの解析を、抗体アレイ (RayBiotech Mouse L-308 Array) を用いて行った。

(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³⁾。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 [³H]-L-arginine から [³H]-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(NO₃)と亜硝酸窒素類(NO₂)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。

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。本研究でも放射線照射により時間依存的に ROS 産生量は増加した。放射線照射による ROS 産生は、NADPH oxidase 阻害薬である VAS2870 と apocynin により有意に抑えられることから、NADPH oxidase 活性上昇が関与している可能性が示された。抗酸化剤である N-acetylcysteine を用い eNOS リン酸化部位への影響を検討したところ、放射線照射で亢進していたセリン 1177 部位での eNOS リン酸化、スレオニン 495 部位での eNOS 脱リン酸化、NO 代謝産物の増加を抑制したが、PKC-βII の発現、また Akt のリン酸化レベルには特に影響を与えなかった。

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 の発現増加を介する経路および ROS を介する経路により活性化し、NO を産生して血管拡張性に働くものと考えられる。これらの変化は 0.5 Gy 以下では認めがたく 1 Gy 以上で放射線の急性反応として NO の増加に働く、その機構の一端を明らかにした。

昨年度に続き、「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索 (分担研究者: 弘前大学・柏倉 幾郎)」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髓細胞数は、線量及び時間依存的に減少した。一方、骨髓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) 個体の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。骨髓細胞中の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) 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発現の解析から、下流遺伝子に属するEIF4G1遺伝子、PNO1遺伝子の発現が上昇していた。
- 4) 照射マウス実験から、非照射コントロール群と比較し0.5 Gy照射群のMyc相対発現量は照射後に上昇して3日後で2.5倍程度に、2 Gy照射群でも同様に照射3日後においてコントロールの4倍程度に上昇した。これらの結果から、低線量及び高線量電離放射線曝露のいずれにおいてもMyc遺伝子の発現が上昇し、その変動が線量依存的であることが示された。
- 5) マウス骨髓細胞に含まれる造血幹・前駆細胞から肥満細胞への分化は、放射線により低下したが、脱顆粒応答性が増加したことから、放射線被曝による肥満細胞の量的および質的变化が、慢性的な炎症に繋がる可能性が示された。

「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割 (分担研究者: 北海道大学・山盛 徹)」の結果として、以下の点が示された。

1) X線照射後のミトコンドリア形態変化、ミトコンドリア由来 ROS およびミトコンドリア膜電位について野生型および Drp1 欠損線維芽細胞において検討を行い、以下の結果を得た。

- ① WT MEF (マウス胎児性線維芽細胞) における放射線照射後に起こるミトコンドリア形態変化には 2.5 Gy 以上の線量が必要であった。
- ② ミトコンドリア由来 ROS およびミトコンドリア膜電位について WT MEF および KO MEF での X 線照射後の変化を検討したところ、どちらの細胞においても X 線はミトコンドリア ROS 産生と膜電位を増加させ、WT MEF と KO MEF における有意な差は見られなかった。
- ③ WT MEF に対する放射線照射による分裂期崩壊の誘導は、PI3K 阻害剤 BI2536 および CDK2 阻害剤 NU6140 の処理により顕著に抑制された。KO MEF では、上記二種類の阻害剤は影響を与えなかった。

2) インビボ・低線量での評価実験を行い、以下の結果を得た。

- ① X 線照射後の脾臓リンパ球におけるミトコンドリア ROS 量およびミトコンドリア膜量は 0.1 から 1 Gy では非照射サンプルと比べ有意な変化は得られなかった一方で、3 Gy 照射では有意な上昇が観察された。
- ② ミトコンドリア抗酸化剤 MitoQ の照射直後のマウスへの投与は、照射によるミトコンドリア ROS およびミトコンドリア膜量の変化に影響しなかった。

3) 炎症応答・サイトカイン分泌における放射線の効果について Balb/c MEF を用いて線量を 0 から 10 Gy の範囲で検討を行った結果、放射線照射により細胞からのサイトカイン分泌に影響があり、それは照射線量により異なる効果をもたらすことが示された。

IV 考察

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-βII の発現増加および ROS 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。その機序については図 1 にまとめた。尚、0.5 Gy 以下では明らかな変化は認められなかった。今後はさらに低線量・低線量率も含めた線量依存性についても検討する必要がある。

HUVEC に対する放射線照射後における eNOS 活性化

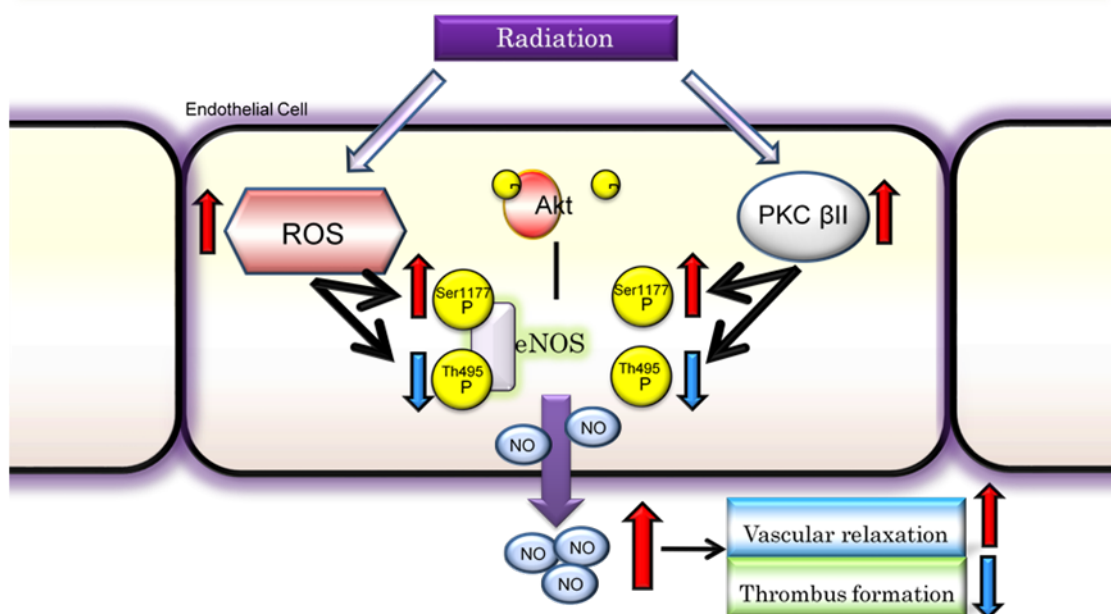


図 1. ヒト臍帯血静脈内皮細胞における放射線照射後の NO 産生の機構

「造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索 (分担研究者: 弘前大学・柏倉 幾郎)」における今までの知見からは、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* が造血機能における有意な指標となり得る可能性が示された。造血幹細胞からの各種血球への分化・増殖過程は、放射線に対して感受性が高いことが知られているが⁴⁾、応答遺伝子に関する情報は少ない。今回の解析から、*c-Myc* が重要な役割を担っており、その下流遺伝子のうちEIF4G1及びPNO1遺伝子発現が上昇することを明らかとした。また、造血幹・前駆細胞からの肥満細胞分化や成熟に放射線が影響することが示されたが、これらの現象への*c-Myc* やEIF4G1及びPNO1遺伝子の関与についての詳細は不明である。今後のさらなる解析が必要である。

「放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割(分担研究者: 北海道大学・山盛 徹)」における今までの知見からは、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。これに関する放射線によるシグナル伝達経路や低線量での影響について検討したところ、X線によるミトコンドリア形態変化の誘導には2.5 Gy以上の線量が必要であることが示された。また、放射線照射後のミトコンドリア機能変化は、ミトコンドリア形態制御タンパク質である Drp1 に依存していないことが明らかとなった。さらに、放射線による分裂期崩壊誘導のシグナルに Pik1 および CDK2 が介在していることが示された。このことは、放射線によるミトコンドリア形態変化が細胞周期制御機構に何らかの影響を与えることで分裂期崩壊の誘導につながる可能性を示唆しているものと考えられた。以前、アポトーシス⁵⁾ 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⁶⁾ 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、3 Gy 以上の放射線の全身被ばくによりミトコンドリアにおいて急性の酸化ストレスが生じるが、これは被ばく後の抗酸化剤の投与により抑制できないことが示唆された。

Balb/c MEF を用いた検討では放射線照射により細胞からのサイトカイン分泌に影響があり、それは照射線量により異なる効果をもたらすことが観察され、放射線照射による炎症応答における線量依存性を示唆しているものと考えられた。

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、3つの課題を設定し分担して研究を行い骨髄・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、以下の知見を得た。

- 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-βII の発現増加を介して、eNOS が活性化する経路と細胞内活性酸素(ROS)が関係する二つの経路があり、NO 産生に至る新たな過程が明らかとなった。但し、eNOS 活性化は 0.5 Gy 以下では明かな変化は認められなかった。
- 2) ヒト造血幹細胞への2Gy照射でc-Myc発現が有意な変動を示し、マウスにおいても線量及び時間依存的に増加した。さらに、下流遺伝子のうちEIF4G1及びPNO1遺伝子の発現が上昇した。また、マウス造血幹・前駆細胞から肥満細胞への分化は放射線により低下したが、脱顆粒応答性が増加したことから、放射線被曝による肥満細胞の量的および質的变化が、慢性的な炎症に繋がる可能性が示された。
- 3) X 線によるミトコンドリア形態変化には 2.5 Gy 以上の線量が必要であること、ならびに放射線照射後のミトコンドリア機能変化は、ミトコンドリア形態制御タンパク質である Drp1 に依存していないことが明らかとなった。また、インビボにおいても X 線によりミトコンドリア機能に影響が生じるが、これには 3 Gy 以上の線量が必要であることが示された。さらに、放射線照射により細胞からのサイトカイン分泌に影響があり、それは照射線量により異なる効果をもたらすことが観察された。

以上、放射線照射されたマウスでは、酸化ストレスが更新し、血液中の指標に反映され、血管内皮細胞の変化においても酸化ストレスが重要な役割を担う。一方、細胞内で ROS 生成源であるミトコンドリアの形態学的変化については ROS の関与はないと思われる。照射後の骨髄細胞数の変化や同幹細胞の c-Myc 発現の変化は 0.5 Gy 以下で認められるが、血管内皮細胞へ影響やミトコンドリア機能変化には少なくとも 1 Gy 以上の線量が必要と思われる。

VI 次年度以降の計画

本年度で3年間実施した本研究課題研究は終了するが、今後の福島復興や福島第一原発事故の収拾作業や事故炉や老朽化した原子炉の廃炉作業での放射線影響を評価する為にも、低線量から高線量にかけての人への放射線の健康影響研究の必要性は高い。さらには、被ばく個体の放射線防護に関わる研究は国際的に見ても日本は遅れていると言わざるを得ない状況である。今後もこうした問題の解決に向けて取り組んでいきたい。

本年度までの研究により、ミトコンドリア形態変化と細胞の放射線応答については一定の成果を得たため、これを学術論文として発表する予定である。一方、マウスを用いた個体レベルの研究については、脾

臓リンパ球のみならず、他の臓器・組織での影響についても解析を行うことで、線維症や血管障害などの放射線被ばくによる非がん有害事象についてのより深い知見が得られることが期待される。また、放射線被ばくによるROS生成と炎症応答・サイトカイン分泌との関連については、今後さらなる検討が必要な事項である。

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して行ってきた。細胞内での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。これまでに新たに興味ある知見が得られたので、これらの点について、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したい。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Yoshino H Chiba K Saitoh T et al. Ionizing radiation affects the expression of Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytic cells through c-Jun N-terminal kinase activation, *J Radiat Res*, *in press*.
- 2) Nishiyama A Yamaguchi M Tsujiguchi T et al. Evaluation of oxidative stress markers in plasma derived from individual exposed to ionizing radiation, *Exp Ther Med*, *in press*.
- 3) Nagane M Yasui H Sakai Y et al. Activation of eNOS in endothelial cells exposed to ionizing radiation involves components of the DNA damage response pathway, *Biochem Biophys Res Commun* 2015;456(1):541-6
- 4) Yasui H Takeuchi R Nagane M et al. Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles, *Cancer Lett* 2014;347(1):151-8.
- 5) Nishida N Yasui H Nagane M et al. 3-Methyl pyruvate enhances radiosensitivity through increasing mitochondria-derived reactive oxygen species in tumor cell lines, *J Radiat Res* 2014;55(3):455-63.
- 6) Yamaguchi M Hirouchi T Nakano M et al. Long-lasting radioprotective effects of a combination of pharmaceutical drugs on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation, *Radiat Emerg Med* 2014, 3(1): 50–55.
- 7) Wu LH Li P Zhao QL et al. Arbutin, an intracellular hydroxyl radical scavenger, protects radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells, *Apoptosis* 2014;19:1654-1663.
- 8) Rehman MU Jawaid P Yoshihisa Y et al. Spiruchostatin A and B, novel histone deacetylase inhibitors, induce apoptosis through reactive oxygen species-mitochondria pathway in human lymphoma U937 cells. *Chemico-Biological Interaction* 2014;221:24-34.
- 9) Li P Zhao QL Wu LH et al. Isofraxidin, a potent reactive oxygen species (ROS) scavenger, protects human leukemia cells from radiation-induced apoptosis via ROS/mitochondria pathway in p 53-independent manner. *Apoptosis* 2014;19(6):1043-1053.
- 10) Jawaid P Rehman MU Yoshihisa Y et al. Effects of SOD/catalase mimetic platinum nanoparticles on radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* 2014;19(6):1006-1016.
- 11) Goodwin J Yachi K Nagane M et al. In vivo tumour extracellular pH monitoring using electron paramagnetic resonance: the effect of X-ray irradiation. *NMR Biomed* 2014;27:453-458.

- 12) Kondo T. Radiation-induced cell death and its mechanism, *Radiation Emergency Medicine* 2013; 2: 1-4.
- 13) Tabuchi Y Furusawa Y Kariya A et al. Common gene expression patterns responsive to mild temperature hyperthermia in normal human fibroblastic cells, *Int J Hyperthermia* 2013;29: 38-50.
- 14) Okazawa S Furusawa Y Kariya A et al. 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.
- 15) Yunoki T Kariya A Kondo T et al. 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.
- 16) Morii A Ogawa R Watanabe A et al. 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.
- 17) Kariya A Tabuchi Y Yunoki T et al. Identification of common gene networks responsive to mild hyperthermia in human cancer cells, *Int J Mol Med* 2013; 32: 195-202.
- 18) Tabuchi Y Sugahara Y Ikegami M et al. Genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound in MC3T3-E1 preosteoblast cells, *Int J Mol Sci* 2013; 14: 22721-22740.
- 19) Piao JL Cui ZG Furusawa Y et al. 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.
- 20) Yamamori T Meike S Nagane M et al. 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.
- 21) Nagane M Yasui H Yamamori T et al. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model, *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;437:420-4425.
- 22) Yasui H Asanuma T Kino J et al. The prospective application of a hypoxic radiosensitizer, doranidazole to rat intracranial glioblastoma with blood brain barrier disruption, *BMC Cancer* 2013;13:106.
- 23) Monzen S Takimura K Kashiwakura I et al. Acute promyelocytic leukemia mutated to radioresistance suppressed monocyte lineage differentiation by phorbol 12-myristate 13-acetate, *Leuk Res* 2013; 37: 1162–1169.
- 24) 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.
- 25) Monzen S Yoshino H Kashiwakura I. Radiosensitivity of myeloid progenitor cells against X-irradiation and heavy ion beam, *PLoS One* 2013; 8: e59385.
- 26) Yoshino H Kiminarita K Matsushita Y et al. Mitochondrial superoxide production and redox status in human monocytic cells after ionizing irradiation, *Radiat Emerg Med* 2013; 2: 43–48.
- 27) Hirose K Sato H Monzen S et al. 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.
- 28) Hirose K Monzen S Yoshino H et al. Different radiation responses on the maturation of megakaryocytopoiesis, *J Radiat Res* 2013; 54:447–452.
 - 29) Monzen S Yoshino Y Kashiwakura I. Radiosensitivity of myeloid progenitor cells against X-irradiation and heavy ion beam, *PLoS One* 2013; 8: e70503.
 - 30) Hosoki A Yonekura SI Zhao QL Wei et al.. Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells, *J Radiat Res* 2012; 53: 58-71.
 - 31) Yu DY Zhao QL Furuta M et al. Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dodecylcyclohexane, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphoma U937 cells, *Apoptosis* 2012;17: 636-645.
 - 32) Furusawa Y Wei ZL Sakurai H et al. 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.
 - 33) Morii A Ogawa R Watanabe A et al. Regulation of gene expression in prostate cancer cells with an artificially constructed promoter responsive to radiation, *Gene Ther* 2012; 19:219-227.
 - 34) Eitaki M Yamamori T Meike S et al. Vincristine enhances amoeboid-like motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells, *BMC Cancer* 2012; 12:469.
 - 35) Yamamori T Yasui H Yamazumi M et al. 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.
 - 36) Indo HP Inanami O Koumura T et al. 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.
 - 37) 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 et al. 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 et al. Normalization by edaravone, a free radical scavenger of irradiation-induced endothelial nitric oxide synthase expression, *Eur J Pharmacol* 2003; 476:131-137.
- 4) Fliedner TM Graessle DH. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation, *Radiat Environ Biophys* 2008; 47(1): 63-9.
- 5) Takahashi K Inanami O Hayashi M et al. Protein synthesis-dependent apoptotic signalling pathway in

X-irradiated MOLT-4 human leukaemia cell line, *Int J Radiat Biol* 2002;78:115-24.

- 6) Ogura A Oowada S Kon Y et al. 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

Takashi Kondo^{*1}, Tohru Yamamori^{*2}, Ikuo Kashiwakura^{*3}

**1Department of Radiological Sciences, *2Laboratory of Radiation Biology, Department of Environmental Veterinary Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, *3Graduate School of Health Sciences, Hirosaki University*

Keywords: eNOS; mitochondria; Drp1; hematopoietic stem cells; CD34⁺ cells; c-Myc

Abstract

The studies to determine the mechanisms of radiation-induced non-cancerous effects were performed with following perspectives, 1) radiation-induced cardiovascular diseases, 2) radiation-induced modification of mitochondrial function and radiosensitivity, and 3) in search for candidate genes involved in radiosensitivity of hematopoietic stem cells.

It has been known that vascular endothelial cells can absorb higher radiation doses than any other tissue in the body, and post-radiation induced-impaired endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function may be developed as a potential contributor to the pathogenesis of vascular injury. However, in this study, it was found that ionizing radiation (IR) increased eNOS phosphorylation at Ser-1177 and dephosphorylation at Thr-495 in human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) in a dose-dependent (≤ 20 Gy) and time-dependent (6-72 h) manner. Total eNOS expression was unchanged in irradiated HUVECs. Although, a transient but significant increase in extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation and a biphasic decline in Akt phosphorylation was observed after irradiation, but these inhibitors have no effect on the radiation-induced changes in eNOS phosphorylation. Further an increase in protein kinase C- β II (PKC- β II) expression was observed and its ablation by small interfering RNA (siRNA) negated the radiation effect on the two eNOS phosphorylation events. Moreover, when an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine protected the radiation-induced increase in reactive oxygen species (ROS) generation, the eNOS Ser-1177 phosphorylation and Thr-495 dephosphorylation in irradiated HUVECs were also significantly reduced. However, transfection of PKC- β siRNA did not alter ROS production after irradiation, and NAC failed to block the radiation-induced increase in PKC- β II expression. Taken together, our results suggest that IR-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells due to both the up-regulation of PKC- β II and the increase in ROS generation in independent manners.

Second, it was investigated that how mitochondria alter their morphology in response to the different doses of IR and how these change affects the mitochondrial functions after irradiation. It was found that

mitochondria shape change required more than 2.5 Gy of X-rays and the change in mitochondrial functions was independent of mitochondrial shape. We also studied the dose-dependent effect of IR on the mitochondrial functions, and found that the radiation-induced alteration in mitochondrial functions required more than 3 Gy of X-rays. Furthermore, it was shown that IR affected the cytokine secretion profiles differently depending on the irradiated doses. This study provides novel insights into the mechanism by which IR influences mitochondria functions, thereby affecting various radiation-induced biological consequences.

Third, we revealed the following points. The expression of the MYC oncogene increased in human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) exposed to 2 Gy X-irradiation, and its expression was also increased in mice bone marrow derived cells (BMCs) in a radiation dose- and a time-dependent manner. The analysis with respect to MYC downstream side genes showed the increase of EIF4G1 and PNO1 gene expression. In addition, differentiation from HSPCs into mast cells was reduced by X-irradiation. Further, the degranulation response of mature mast cells, suggests that IR can lead to chronic inflammation.

放射線の非がん影響の解明

造血幹細胞の放射線感受性関与遺伝子の探索

柏倉幾郎（弘前大学大学院保健学研究科・教授）

研究要旨

本研究では、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目的とする。

本研究の結果以下の成果が得られた。ヒト造血幹細胞への2Gy照射で*c-Myc*発現が有意な変動を示し、マウスにおいても線量及び時間依存的増加がみられた。さらに、下流遺伝子のうちEIF4G1及びPNO1遺伝子の発現が上昇した。また、マウス造血幹・前駆細胞から肥満細胞への分化は放射線により低下したが、脱顆粒応答性が増加したことから、放射線被曝による肥満細胞の量的および質的变化が、慢性的な炎症に繋がる可能性が示された。

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。

キーワード: 造血幹細胞、放射線感受性、CD34陽性細胞、*c-Myc*

研究協力者: 廣内篤久（環境科学技術研究所・主任研究員）

I 研究目的

全ての血球を生み出す「造血幹細胞」は、多分化能と自己複製能を有する特異な細胞であるが、その高い増殖能ゆえに放射線の標的細胞となる。しかしながら造血幹細胞の放射線感受性、特に関与する遺伝子情報については殆ど不明である。本研究では、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する。

II 研究方法

本研究では、造血幹細胞の遺伝的特徴と放射線感受性との関連性を解明する。具体的な検討項目は下記の通りである。

- 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

これらの項目は下記の実験方法にて検討、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) 放射線照射：放射線照射は、X 線発生装置 (MBR-1520R, HITACHI MEDICAL, Tokyo, Japan) を用いて行った。照射条件は、管電圧を 150 kVp、管電流を 20 mA、照射距離を 45 cm、フィルターを 0.5 mmAl/0.3 mmCu にセットし、線量率は約 0.9 Gy/min で行った。線量評価は、電離箱式測定器で行った。
- 5) 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、 γ -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。
- 6) 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 をインターカレ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。

(倫理面への配慮)

主任研究者である柏倉幾郎は、所属機関の弘前大学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。同承認に基づき、臍帯血は弘前大学医学部附属病院及び国立病院機構・弘前病院において、担当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のみ臍帯血を採取する。臍帯血は、正期産、正常妊娠分娩後に娩出される胎盤および臍帯より採取し、比重遠心法・磁気ビーズ法により有核細胞・造血幹細胞を分離精製する。遺伝子解析については厚生労働省のガイドラインに基づき承認を受けており、本研究課題を遂行する上で問題は無い。また、研究参加者の真里谷靖、門前暁、吉野浩教、山口平及び辻口清貴も同承認を得ている。また、実験動物については、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

本研究の結果以下の点が明らかとなった。

- 1) 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発現の解析から、下流遺伝子に属するEIF4G1遺伝子、PNO1遺伝子の発現が上昇していた。
- 2) 照射マウス実験から、非照射コントロール群と比較し0.5 Gy照射群のMyc相対発現量は照射後に上昇して3日後で2.5倍程度に、2 Gy照射群でも同様に照射3日後においてコントロールの4倍程度に上昇した。これらの結果から、低線量及び高線量電離放射線曝露のいずれにおいてもMyc遺伝子の発現が上昇し、その変動が線量依存的であることが示された。
- 3) マウス骨髄細胞に含まれる造血幹・前駆細胞から肥満細胞への分化は、放射線により低下したが、脱顆粒応答性が増加したことから、放射線被曝による肥満細胞の量的および質的変化が、慢性的な炎症に繋がる可能性が示された。

IV 考察

造血幹細胞からの各種血球への分化・増殖過程は、放射線に対して感受性が高いことが知られているが¹⁾、応答遺伝子に関する情報は少ない。今回の解析から、c-Mycが重要な役割を担っており、その下流遺伝子のうちEIF4G1及びPNO1遺伝子発現が上昇することを明らかにした。また、造血幹・前駆細胞からの肥満細胞分化や成熟に放射線が影響することが示されたが、これらの現象へのc-MycやEIF4G1及びPNO1遺伝子の関与についての詳細は不明である。今後のさらなる解析が必要である。

V 結論

ヒト造血幹細胞への2Gy照射でc-Myc発現が有意な変動を示し、マウスにおいても線量及び時間依存的に増加した。さらに、下流遺伝子のうちEIF4G1及びPNO1遺伝子の発現が上昇した。また、マウス造血幹・前駆細胞から肥満細胞への分化は放射線により低下したが、脱顆粒応答性が増加したことから、放射線被曝による肥満細胞の量的および質的変化が、慢性的な炎症に繋がる可能性が示された。

VI 次年度以降の計画

本年度で3年間実施した本研究課題研究は終了するが、今後の福島復興や福島第一原発事故の收拾作業や事故炉や老朽化した原子炉の廃炉作業での放射線影響を評価する為にも、低線量から高線量にかけての人への放射線の健康影響研究の必要性は高い。さらには、被ばく個体の放射線防護に関わる研究は国際的に見ても日本は遅れていると言わざるを得ない状況である。今後こうした問題の解決に向けて取り組んでいきたい。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) H Yoshino K Chiba T Saitoh et al. Ionizing radiation affects the expression of Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytic cells through c-Jun N-terminal kinase activation, *J Radiat Res, in press.*
- 2) A Nishiyama M Yamaguchi T Tsujiguchi et al. Evaluation of oxidative stress markers in plasma

derived from individual exposed to ionizing radiation, *Exp Ther Med*, *in press*.

- 3) M Yamaguchi T Hirouchi M Nakano et al. Long-lasting radioprotective effects of a combination of pharmaceutical drugs on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation, *Radiat Emerg Med* 2014; 3(1): 50–55.
- 4) Monzen S Takimura K Kashiwakura I et al. Acute promyelocytic leukemia mutated to radioresistance suppressed monocyte lineage differentiation by phorbol 12-myristate 13-acetate, *Leuk Res* 2013; 37: 1162–1169.
- 5) 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.
- 6) Monzen S Yoshino H Kashiwakura I. Radiosensitivity of myeloid progenitor cells against X-irradiation and heavy ion beam, *PLoS One* 2013; 8: e59385.
- 7) Yoshino H Kiminarita K Matsushita Y et al. Mitochondrial superoxide production and redox status in human monocytic cells after ionizing irradiation, *Radiat Emerg Med* 2013; 2: 43–48.
- 8) Hirose K Sato H Monzen S et al. 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.
- 9) Hirose K Monzen S Yoshino H et al. Different radiation responses on the maturation of megakaryocytopoiesis, *J Radiat Res* 2013; 54(3):447–452.
- 10) Monzen S Yoshino Y Kashiwakura I. Radiosensitivity of myeloid progenitor cells against X-irradiation and heavy ion beam, *PLoS One* 2013; 8: e70503.
- 11) Kato K Kuwabara M Kashiwakura I. The influence of gender- and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood, *J Radiat Res* 2011; 52: 293–299.
- 12) Kato K Takahashi K Monzen S et al. Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in human hematopoietic stem cells, *Radiat Res* 2010; 174: 177–184.
- 13) Takahashi K Monzen S Hayashi N et al. Correlations of cell surface antigens with the individual differences of radio-sensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells, *Radiat Res* 2010; 173: 184–190.

引用文献

- 1) Fliedner T M Graessle D H. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation, *Radiat Environ Biophys* 2008; 47(1): 63-69.

Search for genes involved in radiosensitivity of hematopoietic stem cells

Ikuo Kashiwakura

Graduate School of Health Sciences, Hirosaki University

Keywords: Hematopoietic stem cells; radiosensitivity; CD34⁺ cells; c-Myc

Abstract

In the previous study, the characteristics of the gene expression detected in highly purified human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) exposed to 2 Gy X-irradiation were analyzed. As a result, we found that the expression of the MYC oncogene increased after X-irradiation and its expression was also increased detected in mice bone marrow cells (BMCs) in a radiation dose- and a time-dependent manner. These results suggest that MYC play a key role in radiosensitivity of HSPCs. MYC is one of a regulator gene that codes for a cancer-related transcription factor and is one of an initialization factor that induced mouse pluripotent stem (iPS) cells founded by Prof. Yamanaka group. In addition, the analysis with respect to MYC downstream side genes showed the increase of EIF4G1 and PNO1 gene expression.

Next, to reveal the influence of ionizing radiation on the differentiation of mast cells from HSPCs, we investigated the differential induction of mast cells from BMCs of female C57BL/6JJcl mice exposed to 2 Gy X-irradiation. In X-irradiated mice, the number of BMCs was lower than that of non-irradiated control mice. In addition, after four weeks of culture, the percentages of FcεRI⁺/c-kit⁺ cells derived from X-irradiated mice were increased in a culture period-dependent manner, as well as cells derived from non-irradiated mice, showing that BMCs from irradiated mice retain the potential to phenotypically differentiate into BMCs. However, in cultured cells derived from X-irradiated mice, the percentages of FcεRI⁺/c-kit⁺ cells were lower than that from non-irradiated mice. In contrast, β-hexosaminidase release in the BMCs from X-irradiated mice was increased compared to BMCs from non-irradiated mice. These results suggest that radiation exposure to mast cell progenitors can cause damages on the differentiation pathway and lead to chronic inflammation in individuals. However, although the relationship between the role of MYC and differentiation from HSPCs into mast cells is not clear, more precise approaches will be required.

放射線の非がん影響の解明

放射線感受性に関わるミトコンドリア機能修飾の役割

山盛 徹 (北海道大学大学院獣医学研究科・准教授)

研究要旨

放射線による細胞死において、ゲノム DNA 損傷のみならずミトコンドリア由来活性酸素 (ROS) 生成の亢進による酸化ストレスが重要な働きをすることが近年示唆されている。現在までの我々の研究により、培養細胞において放射線照射後に起こる ROS 生成に細胞周期チェックポイントならびにミトコンドリア形態変化調節機構との関連があることが明らかとなっている。本研究では、このミトコンドリア形態変化と放射線量との関係、およびミトコンドリア形態変化と照射後のミトコンドリア機能との関連について検討を行った。その結果、ミトコンドリア形態変化には 2.5 Gy 以上の線量が必要であり、放射線によるミトコンドリア機能への効果はミトコンドリア形態調節とは独立の現象であることが明らかとなった。また、マウスを用いた検討により、放射線によるミトコンドリア機能変化における線量ならびに抗酸化剤の影響について個体レベルでの評価を行い、インビボにおいて放射線がミトコンドリア機能に影響を与えるためには 3 Gy が必要であり、これに対し抗酸化剤は効果がないことが見出された。さらに、放射線照射による細胞由来サイトカイン分泌について、線量との関係について検討を行い、放射線照射は細胞からのサイトカイン分泌に影響を与え、それは照射線量により異なる効果をもたらすことが観察された。本研究を通じて、照射された培養細胞やマウスでのミトコンドリアの機能修飾とそれとともなる ROS 生成の機構、関連する細胞死のメカニズムを明らかにすることで、これらの事象と放射線による非がん損傷のメカニズムを解明し、心臓血管障害などの放射線有害事象に対する防護法の開発に繋げることを目標とする。

キーワード: ミトコンドリア、活性酸素 (ROS)、ミトコンドリア形態、分裂期崩壊、抗酸化剤、サイトカイン

I 研究目的

本研究は、放射線による心臓血管障害や骨髄障害などの非がん影響に共通するメカニズムとしてゲノム DNA 損傷とともに重要な放射線によるミトコンドリア機能修飾を解明し、それに伴う活性酸素(ROS)生成機構ならびにそれによる酸化ストレスとアポトーシスを含む細胞死の誘導、炎症応答やバイスタンダー効果との関連を明らかにすることを目的としている。現在までの我々の研究により、各種培養細胞において放射線照射後に起こる ROS 生成に細胞周期チェックポイントならびにミトコンドリアの融合/分裂周期との関連があることが示唆されてきた。また、昨年度までの検討により、高線量(10 Gy)の X 線照射により、ミトコンドリアの形態変化が亢進し、これは Drp1 というミトコンドリア分裂制御タンパク質の働きに依存していること、また放射線照射により引き起こされる分裂期崩壊と呼ばれる核形態異常を伴う細胞死にも Drp1 が必要であること

を示し、Drp1 およびそれによるミトコンドリア形態変化が放射線により引き起こされる分裂期崩壊を介した細胞死の誘導に関与していることが示唆された。本年度は、この研究をさらに進行させ、ミトコンドリア形態変化と放射線量との関係、およびミトコンドリア形態変化と照射後のミトコンドリア機能との関連について検討を行った(研究1)。また、放射線によるミトコンドリア機能変化については、マウスを用いたインビボでの検討も行い、線量の影響ならびに抗酸化剤の効果について知見を得た(研究2)。さらに、放射線により引き起こされる炎症応答とミトコンドリア由来 ROS との関連性についての検討として、放射線照射による細胞由来サイトカイン分泌について、その線量依存性の検討を行ったのでこれを報告する(研究3)。本研究を通じて、照射された培養細胞やマウスでのミトコンドリアの機能修飾とそれともなう ROS 生成の機構、関連する細胞死のメカニズムを明らかにすることで、これらの事象と放射線による非がん損傷のメカニズムを解明し、心臓血管障害や骨髄障害に対する防護法の開発等に繋げることが今後の目標となると考える。

II 研究方法

【研究1】

細胞株および培養方法

Drp1 遺伝子欠損マウス胚線維芽細胞 (KO MEF) およびそのコントロールとなるマウス胚線維芽細胞 (WT MEF) は、10% FBS を含む DMEM 培地で、37°C、5% CO₂ 条件下で維持した。

培養細胞の X 線照射

X 線照射は、PANTAK HF-320 (島津製作所, 京都, 日本) または、X-RAD iR-225 (PXi, North Branford, CT, USA) を用いて行った。照射は PANTAK HF-320 では出力 200 kVp、20 mA、線源距離 615 mm、1.0 mm Al フィルター、線量率 2.54 Gy/min の条件で行い、X-RAD iR-225 では出力 200 kVp、15 mA、線源距離 650 mm、1.0 mm Al フィルター、線量率 1.37 Gy/min の条件で行った。X 線照射はターンテーブル上に細胞を置き、回転させながら室温で行った。

細胞内ミトコンドリア形態の観察

WT MEF 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに播種して一晩接着させた後に、X 線を照射した。照射 8 時間後に培地を 100 nM MitoTracker™ Green FM を含む無血清 DMEM 培地で置換し、細胞を 37°C、5% CO₂ 条件下で 30 分間インキュベートした。その後、無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄し、10% FBS を含む DMEM 培地に置換した。ステージを 37°C に維持し、5% CO₂ を通気させた条件下で、LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, German) を用いて観察および記録を行った。

ミトコンドリア由来 ROS 量およびミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリア由来 ROS 量およびミトコンドリア膜電位を測定するために、それぞれに対する特異的蛍光プローブである MitoSOX™ Red および TMRM を使用した。細胞に X 線を 10 Gy 照射し、一定時間培養後にトリプシン処理により回収した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後に、5 μM MitoSOX™ Red ないし 20 nM TMRM を含む無血清 DMEM 培地で再懸濁し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、PBS で 1 回洗浄したものを試料とし、10,000 個の細胞についてフローサイトメーターにより解析を行った。

分裂期崩壊の評価

細胞を Cellmatrix Type I-C (新田ゼラチン, 大阪, 日本) でコートしたカバーガラス上に播種して

一晚接着させた後に X 線を照射した。24 時間培養後、細胞を PBS で洗浄し、3.7%パラホルムアルデヒドを含む PBS により室温で 10 分間固定した。固定後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 を含む PBS により室温で 5 分間透過処理した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄した後に、1% BSA を含む PBS により室温で 30 分間ブロッキングした。個々の細胞の区別を行うため、細胞内のアクチンフィラメントを 1% Alexa Fluor 488 phalloidin を含む PBS により室温で 30 分間染色した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、核を 300 nM 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む PBS により室温で 5 分間染色した。PBS で 3 回洗浄した後に、ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies Corporation) を用いて封入した。200 個以上の細胞に対して蛍光顕微鏡 BX61 (OLYMPUS, 東京, 日本) を用いて観察および撮影した。得られた画像から核形態に関して正常な細胞と異常な細胞を分類してカウントし、核形態に異常を持つ細胞の割合を、分裂期崩壊を起こした細胞の割合として算出した。

【研究 2】

マウスに対する X 線照射

動物は、日本 SLC より C57BL/6NCr マウス (♂、6-8 週齢) を購入して使用した。X 線照射は、0.5mm Al+0.5mm Cu、200kV、20 mA にて、0.5 Gy/min の条件で行い、照射線量は、0、0.1、0.25、0.5、1.0、3.0 Gy とし、マウス専用照射用ケージにて全身照射した。

マウス脾臓からリンパ球の単離

照射 4 時間後に、頸椎脱臼にてマウスを安楽殺し、脾臓を摘出、10%FBS 添加 RPMI1640 内にて、脾臓細胞を被膜より機械的に分離した。駒込ピペットで十分に分散させた後、70 μ m セルストレイナーを通すことで粗大物、結合組織片を除いた。リンパ球分離溶液 Lympholyte-M (CEDARLANE 社) 6 ml に対し、6 ml の細胞浮遊液を静かに重層し、1300 g で 20 分間遠心した。Lympholyte-M 層と培地層の間にリンパ球層が得られ、培地にて十分に洗浄後、解析用のサンプルとした。

脾臓リンパ細胞の ROS ならびにミトコンドリア膜量

各サンプルを 2 本に分けた後、リンパ球はミトコンドリア含量の指標となる MitoTracker Green (100 nM)、およびミトコンドリア由来 ROS の指標となる MitoSOXTM Red (2 μ M) とそれぞれ室温で 30 分反応インキュベートした。その後、PBS で 1 回洗浄したものを試料とし、10,000 個の細胞についてフローサイトメーターにより解析を行った。

【研究 3】

サイトカイン分泌

Balb/c マウス胎子より分離したマウス胚線維芽細胞 (Balb/c MEF) に対し、X 線照射 (0.1, 1, 10 Gy) を行い、6 日間培養を行った。照射 6 日後に培地を血清を含まない DMEM 培地に交換し、24 時間培養した。24 時間後培地を回収し、細胞より分泌されたサイトカインの解析を、抗体アレイ (RayBiotech Mouse L-308 Array) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

最初の細胞レベルの研究では倫理的に配慮すべき問題はないと判断できる。実験動物の使用について、本研究では動物実験に際して「動物の愛護及び管理に関する法律」(平成 18 年 6 月 1 日

施行), 並びに, 「動物実験等の実施に関する基本方針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号) に基づき, 適正に実施している。また, 実験動物倫理を審議する動物委員会が分担者の所属する大学に設置されており, 本研究では本委員会を経て承認後行われている。

III 研究結果

【研究 1】

X 線照射後のミトコンドリア形態変化、ミトコンドリア由来 ROS およびミトコンドリア膜電位について野生型および Drp1 欠損線維芽細胞において検討を行い、以下の結果を得た。

- ① 放射線照射後に起こるミトコンドリア形態変化について、WT MEF を用いて線量依存性について検討したところ、5 Gy および 10 Gy では明瞭な変化が観察された。その一方、0.5 Gy および 1 Gy では非照射細胞とほとんど区別がつかなかった。2.5 Gy を照射した細胞では、一部ミトコンドリア形態に変化が見られたものの、統計的に有意な差は得られなかった。
- ② KO MEF では、すべての線量においてミトコンドリア形態の有意な変化は観察されなかった。
- ③ WT MEF において、ミトコンドリア形態変化のタイムコースを調べたところ、ミトコンドリア形態変化は照射後徐々に観察され、照射後 4 時間で有意に増加していた。その後、照射 12 時間後に最大の変化を示し、24 時間後にはその変化はわずかに減弱した。
- ④ ミトコンドリア由来 ROS およびミトコンドリア膜電位について WT MEF および KO MEF での X 線照射後の変化を検討したところ、どちらの細胞においても、X 線はミトコンドリア ROS 産生を亢進し、ミトコンドリア膜電位を上昇させることが明らかになった。また、これらの変化に対し、WT MEF と KO MEF で有意な差は見られなかった。
- ⑤ WT MEF に対する放射線照射による分裂期崩壊の誘導は、Pik1 阻害剤 BI2536 および CDK2 阻害剤 NU6140 の処理により顕著に抑制された。KO MEF では、放射線による分裂期崩壊はそもそも WT MEF より低レベルであるが、これに対し上記二種類の阻害剤は影響を与えなかった。

【研究 2】

中間評価での指摘事項でもあった、インビボ・低線量での評価実験を行い、以下の結果を得た。

- ① X 線照射後の脾臓リンパ球におけるミトコンドリア ROS 量について検討したところ、0.1 Gy、0.25 Gy、0.5 Gy および 1 Gy では非照射サンプルと比べて増加傾向にあるものの、有意な変化は得られなかった一方で、3 Gy 照射では有意な上昇が観察された。
- ② ミトコンドリア膜量についても、0.1 Gy、0.25 Gy、0.5 Gy および 1 Gy では非照射サンプルと比べ有意な変化は得られなかった一方で、3 Gy 照射では有意な上昇が観察された。
- ③ ミトコンドリアにおいて抗酸化作用を示すことが報告されている MitoQ の効果について、検討を行ったところ、MitoQ の照射直後のマウスへの投与は、照射によるミトコンドリア ROS およびミトコンドリア膜量の変化に影響しなかった。

【研究 3】

中間評価での指摘事項でもあった、炎症応答・サイトカイン分泌における放射線の効果について線量を 0 から 10 Gy の範囲で検討を行い、以下の結果を得た。

放射線照射による Balb/c MEF からのサイトカイン分泌については、大きく次の 4 つの傾向が見られた。(1) 常に高発現するもの (例: CD80、FGFR5b、ICK 等)。(2) 10 Gy でのみ減少するもの (例: IGFBP3、MMP2、Osteopontin 等)。(3) 10 Gy でのみ増加するもの (例: Gremlin)。(4) 0 から 10 Gy にかけて徐々に増加するもの (例: CCL7)。一方で、10 Gy 以外の線量 (0.1 および 1 Gy) では顕著な変化を検出するのは困難であった。

IV 考察

研究 1 からは、X 線によるミトコンドリア形態変化の誘導には 2.5 Gy 以上の線量が必要であることが示された。また、放射線照射後のミトコンドリア機能変化は、ミトコンドリア形態制御タンパク質である Drp1 に依存していないことが明らかとなった。さらに、放射線による分裂期崩壊の誘導には Drp1 が関与するが、このシグナルに Plk1 および CDK2 が介在していることが示唆された。このことは、放射線によるミトコンドリア形態変化が細胞周期制御機構に何らかの影響を与えることで分裂期崩壊の誘導につながる可能性を示唆しているものと考えられる。また今回、放射線による酸化ストレス誘導は、ミトコンドリア形態調節機構および分裂期崩壊の誘導とは独立した現象であることを示唆する結果が得られたが、以前の我々の研究では、アポトーシス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には放射線によるミトコンドリア由来 ROS が深く関与していることが示されていることから、今回の放射線による分裂期崩壊に特異的な現象である可能性も示唆された。

研究 2 では、マウスを用いて全身照射をしたインビボの系でも脾臓リンパ球のミトコンドリアの ROS 生成や膜量の増加が起きることが示されたが、それには 3 Gy 以上の線量が必要であることが明らかとなった。また、これらの事象に対しミトコンドリアへの抗酸化剤の供給は顕著な効果を示さないことが明らかとなった。これは、3 Gy 以上の放射線の全身被ばくによりミトコンドリアにおいて急性の酸化ストレスが生じるが、これは被ばく後の抗酸化剤の投与により抑制できないことを示唆する結果となった。

研究 3 では、放射線照射により細胞からのサイトカイン分泌に影響があり、それは照射線量により異なる効果をもたらすことが観察された。10 Gy においては多数のサイトカインの変動が観察されたが、0.1 および 1 Gy において観察された変化はそれほど多くなかった。このことは、放射線照射による炎症応答における線量依存性を示唆しているものと考えられる。しかしながら、今回の実験では照射後の時間経過については検討できなかったことから、この点については今後の課題である。また、この放射線照射により引き起こされる細胞からのサイトカイン分泌に対するミトコンドリア由来 ROS の関与についても今後の検討が必要である。

V 結論

本研究において、X 線によるミトコンドリア形態変化には 2.5 Gy 以上の線量が必要であること、ならびに放射線照射後のミトコンドリア機能変化は、ミトコンドリア形態制御タンパク質である Drp1 に依存していないことが明らかとなった。また、インビボにおいても X 線によりミトコンドリア機能に影響が生じるが、これには 3 Gy 以上の線量が必要であることが示された。さらに、放射線照射により細胞からのサイトカイン分泌に影響があり、それは照射線量により異なる効果をもたらすことが観察された。

VI 次年度以降の計画

本年度までの研究により、ミトコンドリア形態変化と細胞の放射線応答については一定の成果を得たため、これを学術論文として発表する予定である。一方、マウスを用いた個体レベルの研究については、脾臓リンパ球のみならず、他の臓器・組織での影響についても解析を行うことで、線維症や血管障害などの放射線被ばくによる非がん有害事象についてのより深い知見が得られることが期待される。また、放射線被ばくによる ROS 生成と炎症応答・サイトカイン分泌との関連については、今後さらなる検討が必要な事項である。本研究成果ならびに今後の研究成果をもとに、新規放射線防護剤開発や放射線による診断・治療法の開発といった応用方面へ展開することが今後の目標となると考える。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Nagane M Yasui H Sakai Y et al. Activation of eNOS in endothelial cells exposed to ionizing radiation involves components of the DNA damage response pathway, *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 456(1): 541-6.
- 2) Yasui H Takeuchi R Nagane M et al. Radiosensitization of tumor cells through endoplasmic reticulum stress induced by PEGylated nanogel containing gold nanoparticles, *Cancer Lett* 2014; 347(1): 151-8.
- 3) Nishida N Yasui H Nagane M et al. 3-Methyl pyruvate enhances radiosensitivity through increasing mitochondria-derived reactive oxygen species in tumor cell lines, *J Radiat Res* 2014; 55(3): 455-63.
- 4) Yamamori T Meike S Nagane M et al. 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(20): 3348-53.
- 5) Nagane M Yasui H Yamamori T et al. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model, *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 437(3): 420-5.
- 6) Meike S Yamamori T Yasui H et al. A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (TAS106), sensitizes cells to radiation by suppressing BRCA2 expression, *Mol Cancer* 2011; 10(1): 92.
- 7) Meike S Yamamori T Yasui H et al. 8-Aminoadenosine enhances radiation-induced cell death in human lung carcinoma A549 cells, *J Radiat Res (Tokyo)* 2011; 52(4): 456-63.

Radiation-induced modification of mitochondrial function and radiosensitivity

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); mitochondrial morphology; mitotic catastrophe; antioxidant; cytokine

Abstract

Recent evidence suggests that, not only genomic DNA damage, but oxidative stress caused by the mitochondria-derived reactive oxygen species (ROS) also plays an important role in the cell death after exposure to ionizing radiation (IR). Our previous studies have shown that the radiation-induced ROS production is associated with cell cycle checkpoints as well as the mitochondria shape regulation mechanism. In this study, we investigated how mitochondria alter their morphology in response to the different doses of IR and how mitochondria shape change affects the mitochondrial functions after irradiation. It was found that mitochondria shape change required more than 2.5 Gy of X-rays and the radiation-induced alteration in mitochondrial functions was independent of mitochondria shape regulatory protein Drp1. We also studied the dose-dependent effect of IR on the mitochondrial functions and the effect of the mitochondrial antioxidant MitoQ *in vivo*, and found that the radiation-induced alteration in mitochondrial functions required more than 3 Gy of X-rays. Furthermore, we examined the dose-dependent effect of IR on the cytokine secretion profiles derived from irradiated mouse embryonic fibroblasts. It was shown that IR affected the cytokine secretion profiles differently depending on the irradiated doses. This study provides novel insights into the mechanism by which IR influences mitochondria functions, thereby affecting various radiation-induced biological consequences.