

電離放射線による造血幹/前駆細胞の細胞動態の変化

The Kinetics Alteration of Human Hematopoietic
Stem/Progenitor Cells Exposed to Ionizing Radiation

弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻

提出者氏名: 石川 純也

所 属: 医療生命科学領域 放射線生命科学分野

指導教員: 柏倉 幾郎

目 次

| | |
|-------------|----|
| 略 語 | 2 |
| 序 論 | 3 |
| 第 1 章 | 8 |
| 第 2 章 | 30 |
| 結 論 | 43 |
| 謝 辭 | 44 |
| 引用文献 | 45 |
| 論文一覽 | 54 |
| 英文要旨 | 56 |

略 語

ATF2: activating transcription factor 2

BFU-E: burst-forming unit-erythroids

CDKN1A: cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A

CFC: colony-forming cells

CFU-GM: colony-forming unit-granulocyte/macrophages

CFU-Mix: colony-forming unit- granulocyte/erythroids/macrophages/megakaryocytes

DNA: deoxyribonucleic acid

EDTA: ethylenediamineteraacetic acid

EIF4G1: eukaryotic translocation initiation factor 4 gamma 1

EPO: erythropoietin

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FITC: fluorescein isothiocyanate

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor

GM-CSF: granulocyte/macrophage-colony stimulating factor

HBSS: hanks' balanced salt solutions

IL-3: interleukin-3

mAb: monoclonal antibodies

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

mRNA: messenger ribo nucleic acid

PBS: phosphor-buffered saline

PC5: phycoerythin-cyanin-5-forochrome tandem

PE: phycoerythrin

PNO1: RNA-binding protein PNO1

ROS: reactive oxygen species

SCF: stem cell factor

序 論

造血幹細胞の発見は、1961年にまで遡る。Tillらは、マウスへ電離放射線を照射し、その後、骨髄移植を試みたところ10日目に造血細胞で構成されるコロニーを脾臓上で肉眼的に発見した¹⁾。この脾臓上のコロニー細胞を再移植したところ、さらに多様な造血細胞を形成したことから、幹細胞の概念が確立されるに至った。現在では、造血幹細胞は全ての血液細胞を産生する多分化能と、未分化性を維持したまま増殖する自己複製能を有し、個体の生涯を通して限られた寿命を有する全ての造血系統細胞を産生供給すると定義されている。また、造血幹細胞は特異な微小環境「ニッチ」において維持され、静止状態が保たれている^{2, 3)}。これまでにニッチには骨髄性と血管性が存在し、間葉系幹細胞、脂肪細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などを含む多くの細胞から形成されると報告されている⁴⁾。造血幹細胞は、これらニッチを構成する細胞との cell-cell interaction に加えて、ニッチで産生される低濃度のサイトカインなどのシグナルにより、その動態が精密に制御されている⁵⁾。このように、造血幹細胞の生存⁶⁾、増殖⁷⁾、分化^{8, 9)}には、タンパク性の生理活性因子であるサイトカインの存在が不可欠である。さらに造血幹細胞は、多様なサイトカイン刺激により幾つかの前駆細胞を介して末梢血球へと分化する^{8, 10, 11)}。近年の技術革新により、分化階層は細胞表面抗原により特徴付けられるようになった^{4, 9, 10, 12, 13)} (Figure 1)。

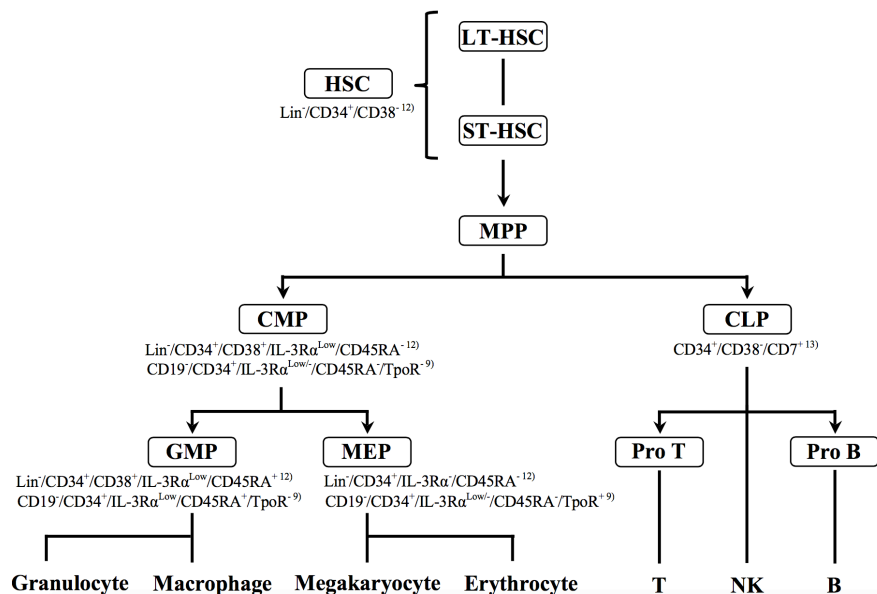


Figure 1. 造血幹細胞の分化階層と表面発現抗原.

電離放射線は酸化ストレスの一種であり、その物理的な直接作用と化学的な間接作用により、哺乳類細胞において DNA、タンパク質、脂質への損傷原因となり、さらに活性酸素種のミトコンドリア依存性産生をもたらし、細胞周期停止、アポトーシス、遺伝子発現の変化、細胞老化を含む様々なストレス応答を引き起こす¹⁴⁻¹⁶。また、個体への高線量放射線ばく露は、致命的な急性放射線症候群を引き起こす。残念ながら、世界的に見ればこのような事象は決して珍しくない (Table 1)。重篤な放射線障害である急性放射線症候群のうち、最も低線量域で生じる致命的損傷は骨髄死であり、主な要因は造血幹/前駆細胞の細胞死とクローン増殖能の喪失が関与していると考えられる。一方、ヒトの放射線感受性には個体差が存在することが知られているが、これらを規定する因子は未だ不明である。

Table 1 近年の高線量放射線ばく露事故の一例

| 年 | 場所 | 事象 |
|------|------------------------|---|
| 1987 | ブラジル, ゴイアニア市 | 廃屋となった病院跡地に放置されていた医療用放射線装置から放射線源格納容器が盗難。その後、格納容器内の ¹³⁷ Cs線源が露出し、住人など249名が被ばく。このうち4名が死亡した。 |
| 1999 | 日本, 東海村 | ウラン燃料加工中の誤操作により臨界事故が発生した。約20時間後に終息したが、作業員3名が高線量被ばく。このうち2名が死亡した。 |
| 2000 | タイ, サムートプラ カーン地方 | 使用不能になった医療用放射線装置が不用意に解体された。 ⁶⁰ Co線源が露出し、作業員やその家族など10名が高線量被ばく。このうち3名が死亡した。 |
| 2005 | チリ, コンセプシオン市 | 非破壊検査の作業中に ¹⁹² Ir線源が脱落。それを作業員が拾得し、重度の局所被ばくを負った。その後、外科的手術や間葉系幹細胞移植により治癒に至った。 |
| 2006 | ベルギー, フリュリュス | 医療機器滅菌用の照射施設で、 ⁶⁰ Co線源が格納されていないことに気付かず、照射室内へ入室。1名が高線量被ばくした。その後、血小板輸血やサイトカイン投与による治療により治癒に至った。 |

高線量の放射線ばく露事故に対する治療法は、これまでに多くの研究者により再考が繰り返され、その都度、優れた成果をもたらしてきた¹⁷⁻²⁰。現在までに報告されている治療法には、遺伝子組換え型サイトカインや受容体作動薬が使用される。一方、Shaoらは、サイトカイン刺激が、短期的には救命と回復をもたらす一方、長期的には持続性の骨髄抑制を引き起こすことを指摘した⁴。さらに最近では、Liらも緊急被ばく医療における代表的薬剤であるG-CSFの投与が、長期的な骨髄抑制を

引き起こすことを報告した²¹⁾. これらの知見は、造血幹/前駆細胞の長期的な骨髄再構成能、即ちクローン増殖能の重要性を指摘している. このように、電離放射線による生体影響を詳細に理解するためには、電離放射線による造血幹/前駆細胞の細胞死とクローン増殖能喪失メカニズムを明らかにする必要がある. しかし、これには電離放射線による「死のシグナル」と、実験的に添加された過剰なサイトカイン刺激による「生のシグナル」の両面を考慮する必要があり、大変に複雑である. 従って、造血幹細胞の増殖および分化における電離放射線の影響は、実験的に加えられる「生のシグナル」を除外するために、サイトカインが生理的濃度で存在もしくは存在していない状況下で考慮されるべきである. それとは対照的に、緊急被ばく医療や生体幹細胞移植などサイトカイン投与が必須となる治療を想定するならば、サイトカインによる「生のシグナル」も含めて評価する必要があり、実験的にサイトカインを存在させた状況下で考慮されるべきである. これら両面を慎重に考慮し放射線影響を評価することで、その詳細なメカニズムの理解が深められる.

本研究では、造血幹/前駆細胞への放射線影響を明らかにするため、サイトカイン存在下および非存在下におけるヒト臍帯血由来造血幹/前駆細胞細胞の細胞動態の変化について解析した. 本論文は第 1 章および第 2 章で構成される.

【第 1 章】電離放射線ばく露ヒト造血幹/前駆細胞のサイトカイン非存在下における分化・増殖能の変化

電離放射線による造血幹細胞の死のメカニズムを明らかにするために、ヒト臍帯血より高純度に分離精製した CD34⁺細胞のクローン増殖能に対する放射線影響を、サイトカイン非存在下で調査した. CD34⁺細胞へ 0-2 Gy の X 線を照射後、0-48 時間に渡りサイトカイン非存在下で培養した. その後、CD34⁺細胞の生存率、クローン増殖能、細胞表面抗原、細胞内ミトコンドリア膜量、細胞内ミトコンドリア由来スーパーオキシド産生量について、幾つかの時間点で解析した. X 線照射から 12 時間後、照射群の生存細胞数は非照射群の初期値に比較して約 70-80%に減少したが、一方、照射群のクローン増殖能は約 50-60%

にまで減少した。さらに、照射 6 時間後において細胞内のミトコンドリア由来スーパーオキシドの有意な産生量増加を認め、照射 12-24 時間後に最大値へと達した。しかしながら、多種類の細胞内活性酸素種産生量もしくは細胞内ミトコンドリア膜量に、非照射群と照射群との間で有意な差異は認められなかった。また、各細胞表面抗原の発現は明らかな変化を示さず、生存細胞集団の構成に顕著な変化は認められなかった。それに加えて、cDNA マイクロアレイ解析では、X 線照射 6 時間後の CD34⁺細胞中で発現が変動した遺伝子群は、*CDKN1A* などのアポトーシス関連遺伝子が多くを占めていた。これらの結果より、ヒト造血幹/前駆細胞は、サイトカイン非存在下では電離放射線照射後、細胞死に比べクローン増殖能が急激に低下することが明らかとなり、それには電離放射線により誘導されたミトコンドリア由来スーパーオキシドや p21 が関与している可能性が示唆された。

【第 2 章】電離放射線ばく露ヒト造血幹/前駆細胞のサイトカイン存在下と非存在下における遺伝子発現変化の網羅的解析

ヒト造血幹/前駆細胞の放射線感受性に関与する遺伝子の本質を明らかにするために、2 Gy の X 線照射 CD34⁺細胞を、遺伝子組換え型ヒト Thrombopoietin + Interleukin 3 + Stem cell factor の存在下もしくは非存在下で 6 時間に渡り無血清培養し、各処理細胞の cDNA マイクロアレイにより得られた遺伝子発現レベルについて、応答遺伝子のネットワーク解析を行った。この時、X 線照射の有無 (IR (+), IR (-)) およびサイトカインの有無 (Cyt (+), Cyt (-)) により以下の 4 つの条件で処理した; IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (-), IR (-) Cyt (+), IR (+) Cyt (+)。また、未処理細胞をコントロールとした。その結果、IR (+) Cyt (-) と IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (-) と未処理細胞, IR (+) Cyt (+) と IR (-) Cyt (+) の 3 つの比較で共通していた 17 の「電離放射線応答遺伝子」と、IR (+) Cyt (+) と IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (+) と未処理細胞の 2 つの比較で共通していた 36 の「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」が抽出された。これらに共通する上流遺伝

子として、*MYC* の有意な活性化を見出した。*MYC* はがん遺伝子であり、これまでに染色体の転座や細胞周期の開始期に重要な役割を果たすことが報告されている。さらに誘導された *MYC* 下流遺伝子のうち *EIF4G1* および *PNO1* の関与が示された。それぞれ、*EIF4G1* は翻訳開始因子としてタンパク合成の開始期に、*PNO1* はプロテアソームやリボソームの新生に関与する遺伝子であることが報告されており、これら 2 つの遺伝子はいずれも RNA の機能に関連している。本研究は、*MYC* が造血幹/前駆細胞の放射線感受性において重要な役割を果たすこと、さらに *MYC* 下流遺伝子の *EIF4G1* と *PNO1* が、造血細胞の放射線感受性において重要な機能を有している可能性を示唆した。

本研究から、ヒト造血幹/前駆細胞は、サイトカイン非存在下では電離放射線照射後、細胞死に比べてクローン増殖能が急激に低下することが明らかとなった。この造血幹/前駆細胞の放射線感受性に *MYC* がん遺伝子の関与が考えられた。今後ヒト造血幹/前駆細胞の放射線感受性を規定する因子を特定し、電離放射線のリスク診断や予測などへの応用発展が期待される。

第 1 章

電離放射線ばく露ヒト造血幹/前駆細胞の サイトカイン非存在下における分化・増殖能の変化

要 旨

電離放射線による造血幹細胞の死のメカニズムを明らかにするために、ヒト臍帯血より高純度に分離精製された CD34⁺細胞のクローン増殖能に対する放射線影響を、サイトカイン非存在下で調査した。CD34⁺細胞へ 0-2 Gy の X 線を照射後、0-48 時間に渡りサイトカイン非存在下で培養した。その後、CD34⁺細胞の生存率、クローン増殖能、細胞表面抗原、細胞内ミトコンドリア膜量、細胞内ミトコンドリア由来スーパーオキシド産生量について、幾つかの時間点で解析した。X 線照射から 12 時間後、照射群の生存細胞数は非照射群の初期値に比較して約 70-80%に減少したが、一方、照射群のクローン増殖能は約 50-60%に減少にまで減少した。さらに、照射 6 時間後において細胞内のミトコンドリア由来スーパーオキシドの有意な産生量増加を認め、照射 12-24 時間後に最大値へと達した。しかしながら、多種類の細胞内活性酸素種産生量もしくは細胞内ミトコンドリア膜量に、非照射群と照射群との間で有意な差異は認められなかった。また、各細胞表面抗原の発現は明らかな変化を示さず、生存細胞集団の構成に顕著な変化は認められなかった。それに加えて、cDNA マイクロアレイ解析では、X 線照射 6 時間後の CD34⁺細胞中で発現が変動した遺伝子群は *CDKN1A* などのアポトーシス関連遺伝子が多くを占めていた。これらの結果より、ヒト造血幹/前駆細胞は、サイトカイン非存在下では電離放射線照射後、細胞死に比べクローン増殖能が急激に低下することが明らかとなり、それには電離放射線により誘導されたミトコンドリア由来スーパーオキシドや p21 が関与している可能性が示唆された。

緒 言

造血幹細胞は全ての血液細胞を産生する多分化能と、未分化性を維持したまま増殖する自己複製能を有し、個体の生涯を通して限られた寿命を有する全ての造血系統細胞を産生供給する。造血幹細胞は高い増殖能を有しているが故に、一般的に電離放射線や化学療法薬剤のような細胞外酸化ストレスに対して高い感受性を有することが良く知られている²²⁻²⁷⁾。それに加えて、造血幹細胞の生存⁶⁾、増殖⁷⁾、分化^{8,9)}には、タンパク性の生理活性因子であるサイトカインの存在が不可欠である。

哺乳類細胞に対する電離放射線ばく露は、DNA やタンパク質、脂質への損傷原因となり、さらに活性酸素種のミトコンドリア依存性産生をもたらし、細胞周期停止、アポトーシス、遺伝子発現の変化を含む様々なストレス応答を引き起こす^{14, 15)}。造血幹細胞が電離放射線にさらされると、サイトカインは電離放射線による造血不全の軽減および造血幹細胞の再構築のための因子として作用する²⁸⁻³¹⁾。一方で幾つかのサイトカインは、炎症やアポトーシスを誘導することも知られている^{6, 32)}。従って、造血幹細胞に対する放射線影響を考える際には、電離放射線もしくはサイトカインによる「死のシグナル」と、実験的に添加された過剰なサイトカイン刺激による「生のシグナル」の両面を考える必要があり、複合的かつ複雑である³³⁾。しかしながら、電離放射線により造血幹細胞に誘導される細胞死のメカニズムには未だ不明な点が多い。もっと言うと、恒常的な造血において生体内のサイトカイン濃度は、実験的に添加されるサイトカインの濃度に比較し、決して高いレベルで維持されていない。従って、造血幹細胞の増殖および分化における電離放射線の影響は、実験的に加えられる外因性の「生のシグナル」を除外するために、サイトカインが生理的濃度で存在もしくは存在していない状況下で考慮されるべきである。

本研究では、電離放射線により誘発される造血幹細胞の細胞死メカニズムを明らかにするため、サイトカイン非存在下におけるヒト臍帯血由来の造血幹/前駆細胞細胞の分化・増殖能に対する放射線影響について調査した。

材料と方法

増殖因子および蛍光標識抗体

Recombinant human interleukin-3 (IL-3) および Recombinant human stem cell factor (SCF) は Biosource (Tokyo, Japan) より購入した。Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) および Erythropoietin (EPO) は Sankyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。Recombinant human granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) は PeproTech (New Jersey, USA) より購入した。蛍光標識された Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD34 monoclonal antibodies (mAb), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD34 mAb, PE-conjugated anti-human CD38 mAb, Phycoerythrin-cyanin-5-forochrome tandem (PC5)-conjugated anti-human CD45 mAb は Beckman Coulter Immunotech (Marseille, France) より購入した。PC5-conjugated anti-human CD45RA および CD123 mAb, PE-conjugated anti-human CD110 mAb は Becton Dickinson Biosciences (California, USA) より購入した。PE-conjugated anti-human Tie-2 は R&D System Inc. (Minnesota, USA) より購入した。Mouse IgG₁-FITC, -PC5, -PE (Beckman Coulter Immunotech) はアイソタイプコントロールとして使用した。活性酸素種検出用蛍光プローブである 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) および MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator (MitoSOX) と, ミトコンドリア選択的プローブである MitoTracker Green FM special (MitoTracker) は Molecular Probes, Invitrogen Corporation (California, USA) より購入した。

ヒト胎盤/臍帯血由来 CD34⁺細胞の採取および濃縮

本研究は、弘前大学大学院医学研究科に設置されている倫理委員会の承認を得て行われた。臍帯血は、対象となる妊婦からインフォームドコンセントを得られたのち、東京臍帯血バンクのガイドラインに基づいた抗凝固剤を含む滅菌コレクションバッグを用いて、正常な満期分娩後の胎盤/臍帯より採取した。本研究では、これらのサンプルを個別に単離し、各実験に用いた。臍帯血の採取から 24 時間以内に、

Limphosepar I (1.077 g/ml; Immuno-Biological Laboratories, Takasaki, Japan) を用いた比重遠心法により高濃度の単核球細胞を分離し, 次に 5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 含有 Phosphor-buffered saline (PBS) を用いて 3 回洗浄した. さらに The Indirect CD34 MicroBeads Kit and autoMACS™ Pro Separator (Miltenyl Biotec, Tokyo, Japan) を用い, 製造者の指示に基づいたポジティブセレクションにより CD34⁺細胞の濃縮を行った.

電離放射線の照射

CD34⁺細胞への電離放射線照射は, X 線発生装置 (MBR-1520R; Hitachi Medical Co., Tokyo, Japan) を用いて行った. 照射条件は管電圧: 150 kVp, 管電流: 20 mA, 照射距離: 45 cm に設定し, フィルターに 0.5 mm Al 及び 0.3 mm Cu を用い, 線量率は 80 cGy/min, 総照射線量は 0–2 Gy とした. なお, 照射中の積算線量は, 電離箱式線量計により監視した. CD34⁺細胞は無血清培地で懸濁され, 1.5 ml チューブ中で照射された.

液体培養

CD34⁺細胞の液体培養は, 無血清培養用の血清代替物である BIT9500 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) を添加した無血清の Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco®, Invitrogen) を用いて行った. CD34⁺細胞は 5×10^4 cells/ml の濃度にて, 総量 500 μ l/well を 24-well cell culture plates (Falcon, Becton Dickinson Biosciences) 上に播種し, 37°C, 5% CO₂ 存在下で 0, 12, 24, 48 時間に渡りサイトカイン非存在下で培養した. 生存率は, 前述の培養後に各群の全細胞を回収し, トリパンプルー色素排除法を用い, 顕微鏡下で評価した. 生存率は, 非照射群の生存細胞数に対する各照射群の生存細胞数の割合として計算し, 相対値で算出した.

メチルセルローズ培養

クローン増殖能を調査するために, MethoCult (StemCell Technologies Inc.) を

用い、赤血球系コロニー形成細胞 (BFU-E)、白血球系コロニー形成細胞 (CFU-GM)、混合系コロニー形成細胞 (CFU-Mix) と、これらの総計である全コロニー形成細胞 (CFC) を評価した。まず、前述の方法で X 線を照射し、CD34⁺細胞を各時間点までサイトカイン非存在下で液体培養した。次に、IL-3 (100 ng/ml)、SCF (100 ng/ml)、G-CSF (10 ng/ml)、EPO (4 U/ml)、GM-CSF (10 ng/ml)、penicillin (100 U/ml)、streptomycin (100 µg/ml) を含有したメチルセルロース培地に、非照射群は 375 cells/ml、0.5 Gy 照射群は 375 cells/ml、2 Gy 照射群は 1500 cells/ml の濃度で、総量 300 µl/well を 24-well plate 上に播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 14 日間培養した。コロニーの計数は、50 細胞以上の集団をコロニーと定義し、倒立型顕微鏡 (×4; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて行った。

細胞表面抗原の発現解析

CD34⁺細胞における未熟な造血細胞に特異的な幾つかの表面抗原発現の変化を、フローサイトメトリー法により解析した。まず、前述の方法で X 線を照射後に CD34⁺細胞を各時間点までサイトカイン非存在下で液体培養した。次に、各抗体を飽和濃度で添加し、暗所にて反応させた (30 分、4°C)。最後に PBS で洗浄後、フローサイトメーター (Cytomics™ FC500; Beckman Coulter Immunotech) を用いて解析を行った。なお、各実験においてネガティブコントロールとして、アイソタイプの適合した関連性のないコントロール抗体を用いた。

細胞周期分布の解析

CD34⁺細胞の細胞周期分布は、フローサイトメーター (Cell Lab Quanta™ SC MPL; Beckman Coulter Immunotech) を用いて解析した。まず、前述の方法で X 線を照射後に CD34⁺細胞を各時間点までサイトカイン非存在下で液体培養した。次に、0.1% Triton X-100 (Wako, Osaka, Japan) 含有 PBS により細胞膜透過処理を行った後 (5 分、4°C)、50 µg/ml の濃度で propidium iodide (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を用いて染色し、その DNA 量を測定した。

細胞内ミトコンドリア膜量の解析

CD34⁺細胞内のミトコンドリア膜量は、MitoTracker を用いて解析した。まず、前述の方法で X 線を照射後に CD34⁺細胞を各時間点までサイトカイン非存在下で液体培養した。次に、PE-conjugated anti-human CD34 mAb を添加し、暗所にて反応させた (5 分, 4°C)。さらに PBS で洗浄後、5 nM MitoTracker を添加し、37°C, 5% CO₂ 存在下で 15 分反応させた。最後に PBS で細胞を再懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析した。

細胞内 ROS 産生量の解析

CD34⁺細胞内の ROS 産生量は、複数の活性酸素種を検出する試薬である CM-H₂DCFDA およびミトコンドリア由来スーパーオキシド特異的な検出試薬である MitoSOX を用いて解析した。まず、前述の方法で X 線を照射後に CD34⁺細胞を各時間点までサイトカイン非存在下で液体培養した。次に、PE-conjugated anti-human CD34 mAb もしくは FITC-conjugated anti-human CD34 mAb を添加し、暗所にて反応させた (5 分, 4°C)。さらに、それぞれ PBS もしくは HBSS で洗浄後、5 μM CM-H₂DCFDA を添加し、37°C, 5% CO₂ 存在下で 20 分もしくは 2.5 μM MitoSOX を添加し、37°C, 5% CO₂ 存在下で 10 分反応させた。最後にそれぞれ PBS もしくは HBSS で 2 回洗浄した後に細胞を再懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析した。

全 RNA の抽出

5 つのサンプルの CD34⁺細胞から全 RNA を抽出するために、過去の文献で報告された手順を踏襲した¹⁵⁾。全 RNA は RNeasy[®] Micro Kit (Qiagen, Bothell, Washington, USA) を用い、製造者の指示に従い抽出し、濃度および純度は Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) を用いて測定した。

マイクロアレイの手順とデータ解析

DNA マイクロアレイおよびデータ解析は、過去の文献で報告された手順を基に

行った^{34, 35)}. 遺伝子発現解析は, 製造者の指示に従い, GeneChip[®] system with Human Genome U133-plus 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) を用いて行った. さらに, 遺伝子発現プロファイルの解釈は, GeneSpring GX (Agilent Technologies) , Ingenuity Pathways Analysis (Qiagen) を用いて行い, その遺伝子の発現が2倍以上に増加もしくは2倍以下に減少した場合に, 大きく変化したことを指し示すものと考えた.

統計解析

2 群間の差異は, 対応のある t 検定およびウィルコクソン符号順位検定を用いて解析した. 統計解析は Excel 2007 (Microsoft, Washington, USA) のアドインソフトである Statcel 3 (OMS, Saitama, Japan) を用いた. 本研究では p 値が 0.05 未満の場合を, 統計学的に有意な差異が存在すると定義した.

結果

X線ばく露 CD34⁺細胞における生存率の変化

電離放射線による生存率の変化を明らかにするため、CD34⁺細胞へ 0–2 Gy の X 線を照射後、48 時間に渡りサイトカイン非存在下で液体培養した (Figure 2) . 非照射群の生存細胞数は、照射 24 時間後では初期値の約 70–80%にまで減少した. 同様に、両照射群の生存細胞数は、約 40–60%にまで減少した. しかしながら、液体培養を行った 48 時間を通して、非照射群と両照射群との間に統計的に有意な差異は認められなかった.

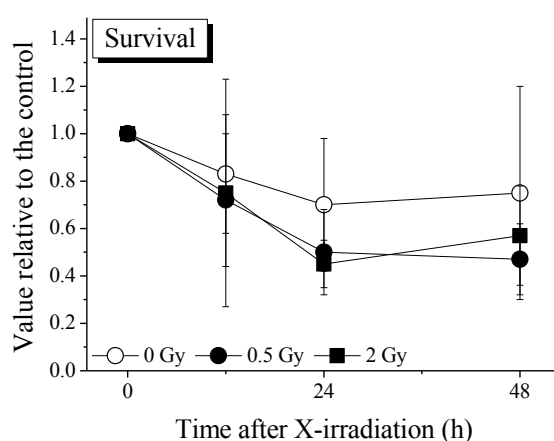


Figure 2. サイトカイン非存在下で培養した非照射および X 線照射 CD34⁺細胞の生存率. 材料と方法に記載したように、非照射群および両照射群の CD34⁺細胞を無血清培地中に播種し、サイトカイン非存在下で 48 時間に渡り液体培養を行った. 各時間点において、条件毎に細胞を回収し、トリパンブルー色素排除法を用いて生存細胞数を計数した. 実験は 2 重に 3 回以上を独立して行い、値は Mean ± Standard Deviation (S.D.) で示した. * $p < 0.05$.

X線ばく露 CD34⁺細胞におけるクローン増殖能の変化

電離放射線によるクローン増殖能の変化を明らかにするため、CD34⁺細胞へ 0–2 Gy の X 線を照射後、0–48 時間に渡りサイトカイン非存在下で液体培養し、各時間点において、メチルセルロース培地を用いたコロニーアッセイを行った. Figure 3 に示したように CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix の総計である CFC は、非照射群、両照射

群ともに時間依存的に減少した。照射 24–48 時間後の非照射群では、初期値の約 50–60%のクローン増殖能を保っていたが、両照射群では 20%未満にまで減少していた。さらに全ての時間点において、非照射群と両照射群との間に統計学的に有意な差異を認めた。特に BFU-E と CFU-Mix では、より顕著なクローン増殖能の低下を認めた。

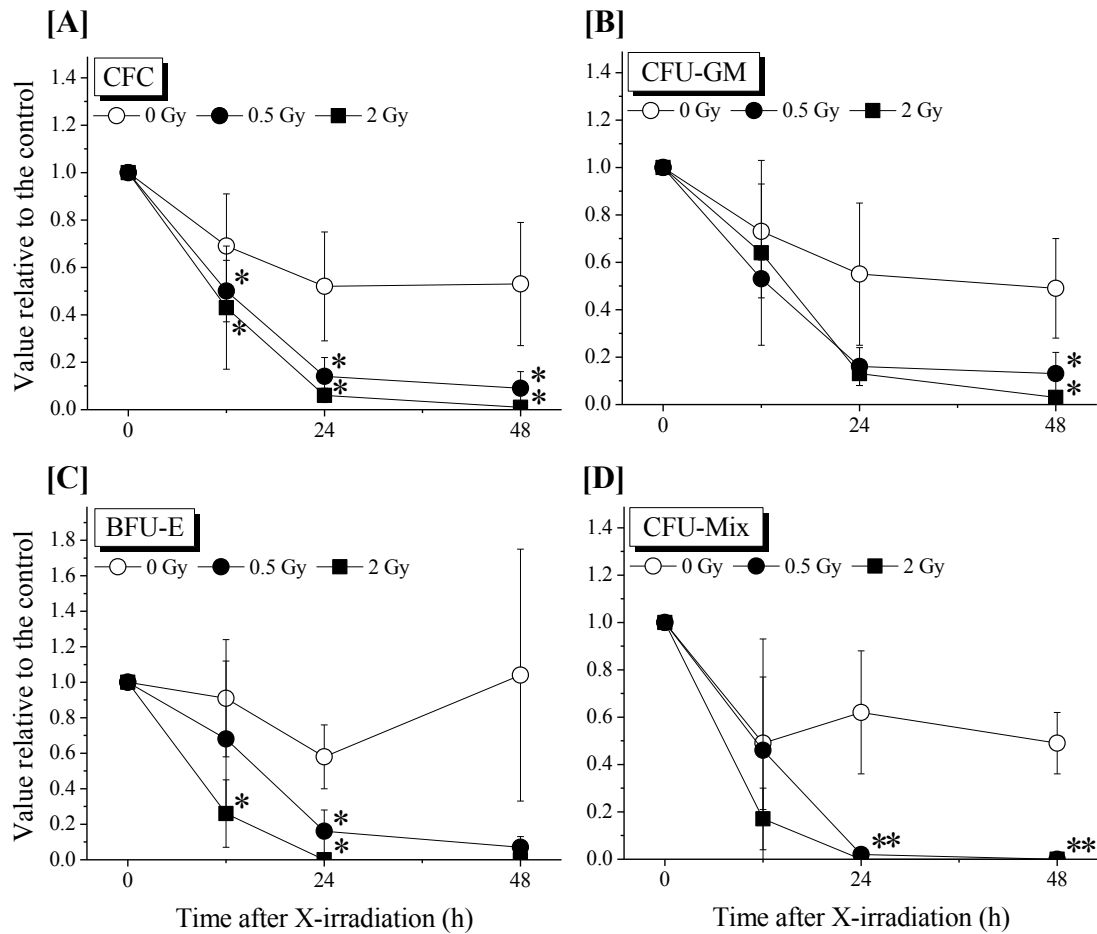


Figure 3. サイトカイン非存在下で培養した非照射および X 線照射 CD34⁺ 細胞のクローン増殖能。材料と方法に記載したように、CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix を含む CFC は、メチルセルロース法を用いて評価した。50 個以上の細胞集団をコロニーとして、倒立型顕微鏡を用いて計数した。実験は 2 重に 3 回以上を独立して行い、値は Mean ± Standard Deviation (S.D.) で示した。**p* < 0.05.

X線ばく露 CD34⁺細胞における細胞表面抗原の変化

CD34, CD38, CD45RA, CD110, CD123, CD202b のような初期の造血に関連する細胞表面抗原の発現を、過去の研究に基づきフローサイトメトリー法により解析した^{12, 36)}. CD34⁺細胞は、未熟な前駆細胞や系統が運命付けられた前駆細胞^{37, 38)}、さらに間質性細胞³⁹⁾のような様々な機能性細胞を含む不均一な集団である。正常なヒト CD34⁺細胞は、細胞間のクロストークに寄与し、様々な段階の造血を調節する膨大な成長因子、サイトカイン、ケモカインを分泌する⁴⁰⁾. このように、CD34⁺細胞は多くの役割を果たしている。

CD38 抗原は、細胞や組織に広く発現しているが、特に白血球で顕著に発現している多機能性細胞外酵素である⁴¹⁾. CD45RA 抗原は、CD45 抗原ファミリーメンバーで、顆粒球と単球を除く全ての造血細胞に発現している^{9, 42)}. CD110 抗原は、Thrombopoietin の受容体で、造血幹/前駆細胞、巨核球や血小板に発現している³¹⁾. CD123 抗原は、Interleukin 3 receptor alpha として知られ、形質細胞様樹状細胞と好塩基球にのみ高発現しており、単球、好酸球、骨髄樹状細胞、多能性前駆細胞、骨髄前駆細胞では低発現している。CD202b 抗原は、Tyrosine kinase with immunoglobulin and the epidermal growth factor homology domain 2 (Tie-2) として知られる Angiopoietin-1 の受容体で、造血幹細胞に発現している^{43, 44)}. 各抗原の発現は、全ての群で明らかな変化を示しておらず、生存細胞集団の構成に顕著な変化が認められないことを指し示している (Data not shown) . さらに、未熟な造血細胞集団としてよく知られている CD34⁺/CD38⁻群と、より成熟した前駆細胞として特徴付けられる CD34⁺/CD38⁺群に、目立った変化は認められなかった (Figure 4) . このように、本研究で調査した細胞集団の多くは、ほとんど変化を示さなかった。一方、CD34⁺/CD202b⁺群のみが、非照射群と比較して照射 24 時間後に統計学的に有意に増加したが、48 時間後には有意な差異は認められなかった。

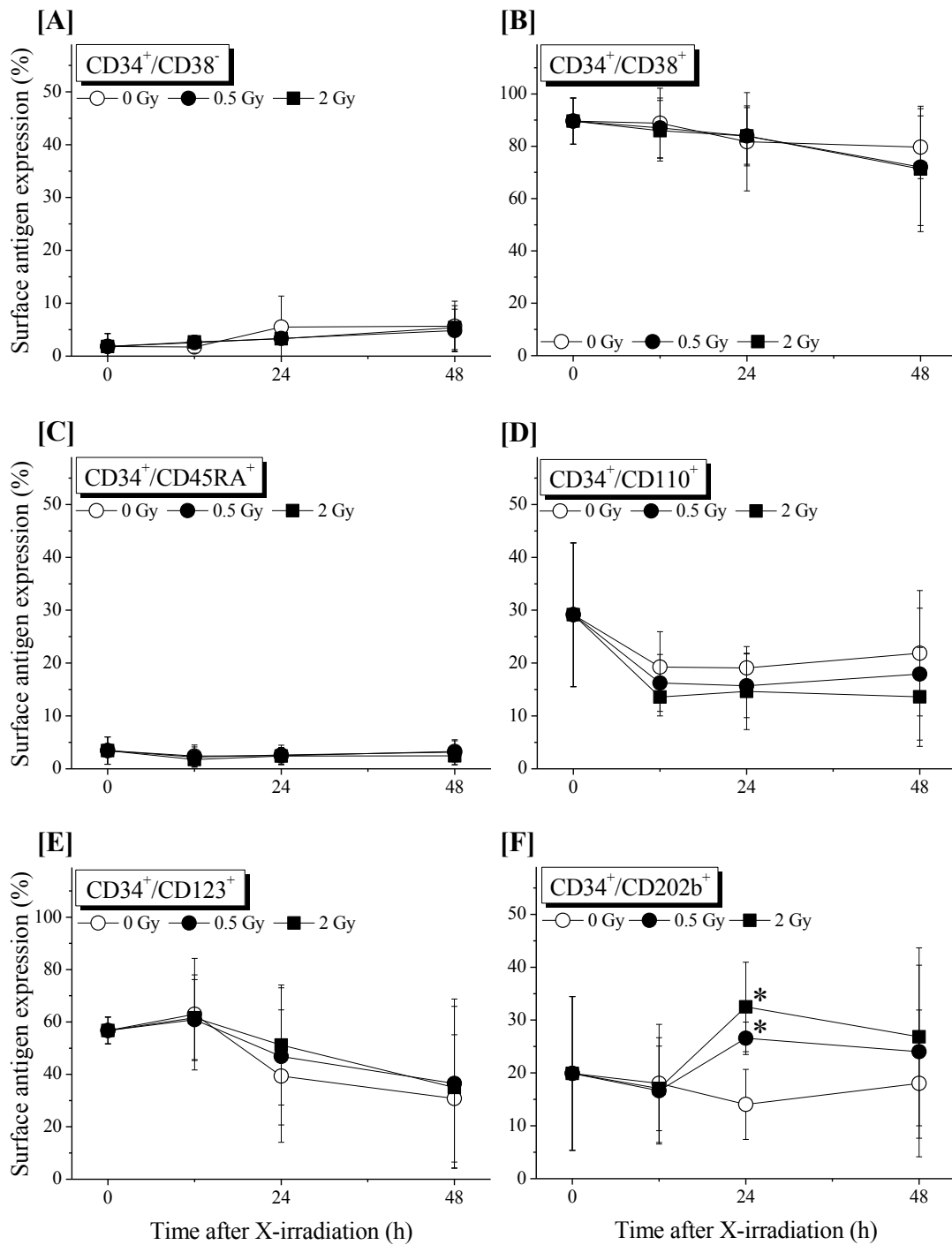


Figure 4. サイトカイン非存在下で培養した非照射および X 線照射 CD34⁺ 細胞における細胞表面抗原の変化. 材料と方法に記載したように, 特異的な細胞表面抗原の発現は, 直接免疫蛍光フローサイトメトリー法を用いて評価した. 実験は 2 重に 3 回以上を独立して行い, 値は Mean ± Standard Deviation (S.D.) で示した. * $p < 0.05$.

次に、フローサイトメトリー法を用いて、電離放射線による CD34⁺細胞の細胞周期分布の変化を調査し、Table 2 にまとめた。非照射群の初期値は、それぞれ Sub G1; 20.8 ± 2.2%, G0/G1; 73.2 ± 3.6%, S/G2/M; 5.7 ± 3.8%であった。この 12 時間後には、それぞれの細胞周期分布は Sub G1; 34.7 ± 12.5%, G0/G1; 54.1 ± 7.7%, S/G2/M; 11.2 ± 5.0%へと変化し、Sub G1 集団が約 1.7 倍にまで増加していた。照射群における Sub G1 集団の割合は、0.5 Gy 照射群では 45.5 ± 0.7%へと、2 Gy 照射群では 41.0 ± 1.0%にまで増加し、Sub G1 集団が非照射細胞群に比較し有意に増加していた。さらにこれらの集団は、12 時間後の非照射群および照射群の両方と比較して、24 時間後および 48 時間後まで時間依存的に減少していた。それとは対照的に、G0/G1 集団は、全ての群で 12 時間後から 24 時間後までに時間依存的に増加していた。しかしながら、照射群の細胞周期分布に統計学的な差異は認められなかった。

Table 2 サイトカイン非存在下で培養した非照射および X 線照射 CD34⁺細胞の細胞周期分布の変化.

| Time | Phase | 0 Gy | 0.5 Gy | 2 Gy |
|------|--------|----------------|----------------|----------------|
| 0 h | Sub G1 | 20.76 ± 2.22% | | |
| | G0/G1 | 73.22 ± 3.64% | | |
| | S/G2/M | 5.67 ± 3.76% | | |
| 12 h | Sub G1 | 34.67 ± 12.49% | 45.51 ± 0.73%* | 41.00 ± 1.00%* |
| | G0/G1 | 54.13 ± 7.68% | 46.90 ± 2.06%* | 49.47 ± 1.89% |
| | S/G2/M | 11.20 ± 4.98% | 7.49 ± 2.10% | 9.53 ± 1.80% |
| 24 h | Sub G1 | 25.17 ± 8.18% | 25.90 ± 9.16% | 25.38 ± 4.70% |
| | G0/G1 | 63.94 ± 16.23% | 67.65 ± 13.25% | 66.66 ± 8.50% |
| | S/G2/M | 10.91 ± 8.43% | 6.45 ± 4.18% | 7.97 ± 4.48% |
| 48 h | Sub G1 | 17.81 ± 11.06% | 10.14 ± 5.56% | 10.96 ± 3.13% |
| | G0/G1 | 78.88 ± 11.05% | 86.93 ± 7.52% | 86.11 ± 3.93% |
| | S/G2/M | 3.29 ± 2.27% | 2.93 ± 1.96% | 2.93 ± 0.81% |

実験は 2 重に 3 回以上を独立して行い、値は Mean ± Standard Deviation (S.D.) で示した。* $p < 0.05$.

X線ばく露 CD34⁺細胞における細胞内ミトコンドリア膜量, 活性酸素種量, ミトコンドリア由来スーパーオキシド量の変化

CD34⁺細胞における細胞内活性酸素量および細胞内ミトコンドリア由来スーパーオキシド量は, それぞれ CM-H₂DCFDA および MitoSOX を用いて解析した. また, CD34⁺細胞における細胞内ミトコンドリア膜量は, MitoTracker を用いて解析した (Figure 5). 細胞内のミトコンドリア由来スーパーオキシド産生量は, 2 Gy 照射群では照射 6 時間後に, 0.5 Gy 照射群では照射 24 時間後に, それぞれ有意に増加していた. それとは対照的に, 細胞内ミトコンドリア膜量および活性酸素種量の測定値は, 非照射群と両照射群との間で統計学的に有意な差異は認められなかった. 残念ながら, サイトカイン非存在下では, 培養により生存細胞数が大きく失われるため, 照射から 48 時間後では, これらの解析は困難であった.

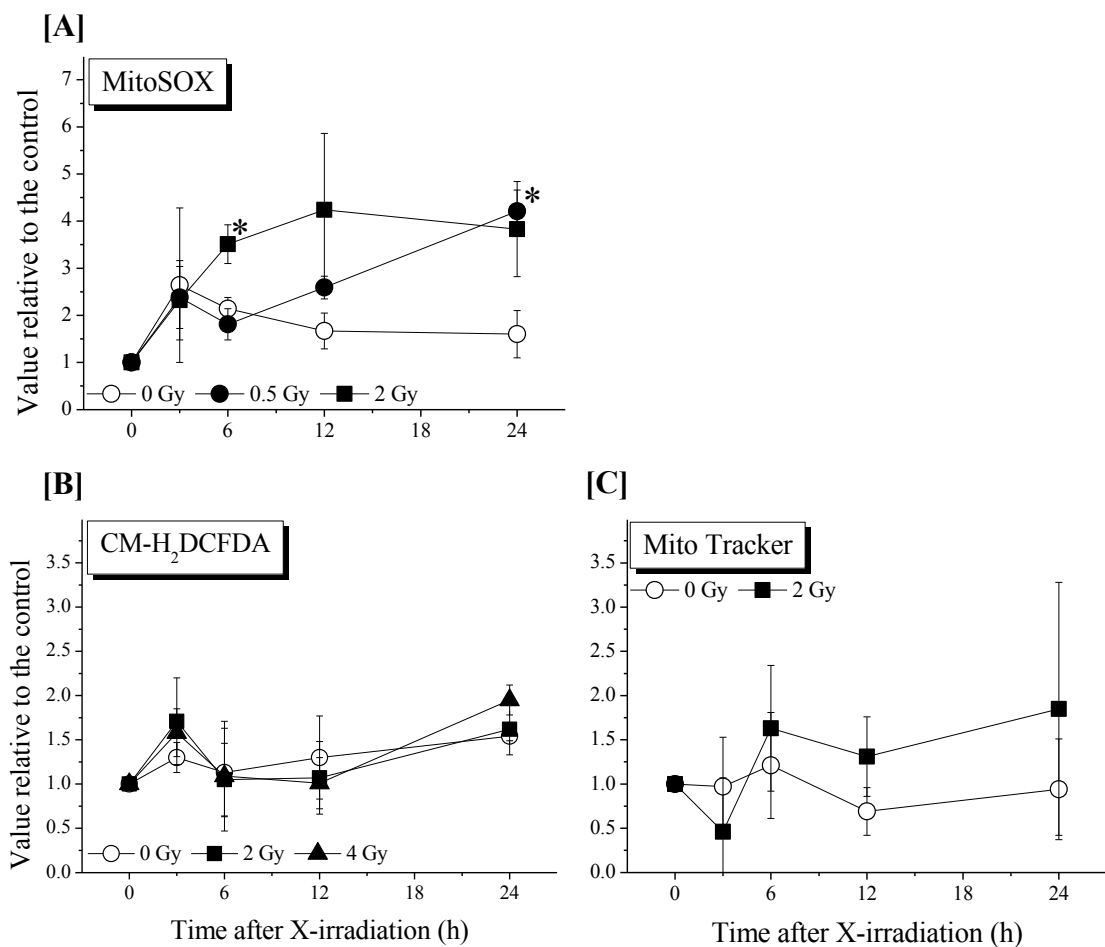


Figure 5. サイトカイン非存在下で培養した非照射および X 線照射 CD34⁺

細胞における細胞内ミトコンドリア膜量および活性酸素種産生量. 材料と方法に記載したように, 細胞内のミトコンドリア膜量, 活性酸素種産生量, ミトコンドリア由来スーパーオキシド産生量は, フローサイトメトリー法を用いて評価した. 実験は2重に3回以上を独立して行い, 値は Mean \pm Standard Deviation (S.D.) で示した. * $p < 0.05$.

X線ばく露 CD34⁺細胞における遺伝子発現の変化

CD34⁺細胞における mRNA 発現に対する電離放射線の影響を調査するために, 0–2 Gy の X 線照射後に cDNA マイクロアレイ解析を行った. クローン増殖能が照射 12 時間後までに大きな減少を示したため, 決定的な影響が照射から 12 時間以内に起きていると推測し, 照射 6 時間後における細胞死関連遺伝子群の発現について調査した. 発現量の比較は非照射群と照射後 6 時間の群で行い, 2 倍以上増加あるいは減少した遺伝子を抽出した.

細胞死に関連する遺伝子として抽出された遺伝子の多くはアポトーシスに関連した遺伝子であり, 他の細胞死形態であるネクローシスに関連した遺伝子や, オートファジーに関連した遺伝子は, ほぼ抽出されなかった. 抽出されたアポトーシスに関連する遺伝子は 375 であり, CD34⁺細胞におけるアポトーシス制御の複雑さを指し示している. 次に, これら 375 の遺伝子を, その局在に基づいて 4 つの領域 (細胞外, 細胞膜, 細胞質, 核) に分類すると, 核領域に最も多くの遺伝子が分類された (Figure 6, Table 3). 核領域に分類された遺伝子のうち, 最も発現増加を示した遺伝子は, Cyclin-dependent kinase inhibitor である p21 をコードする *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A)* で, 5.04 倍に増加していた. 一方, 最も発現低下を示した遺伝子は, DNA 結合タンパクのロイシンジッパーファミリーメンバーである転写因子をコードする *Activation transcription factor 2 (ATF2)* で, 8.29 倍に減少していた.

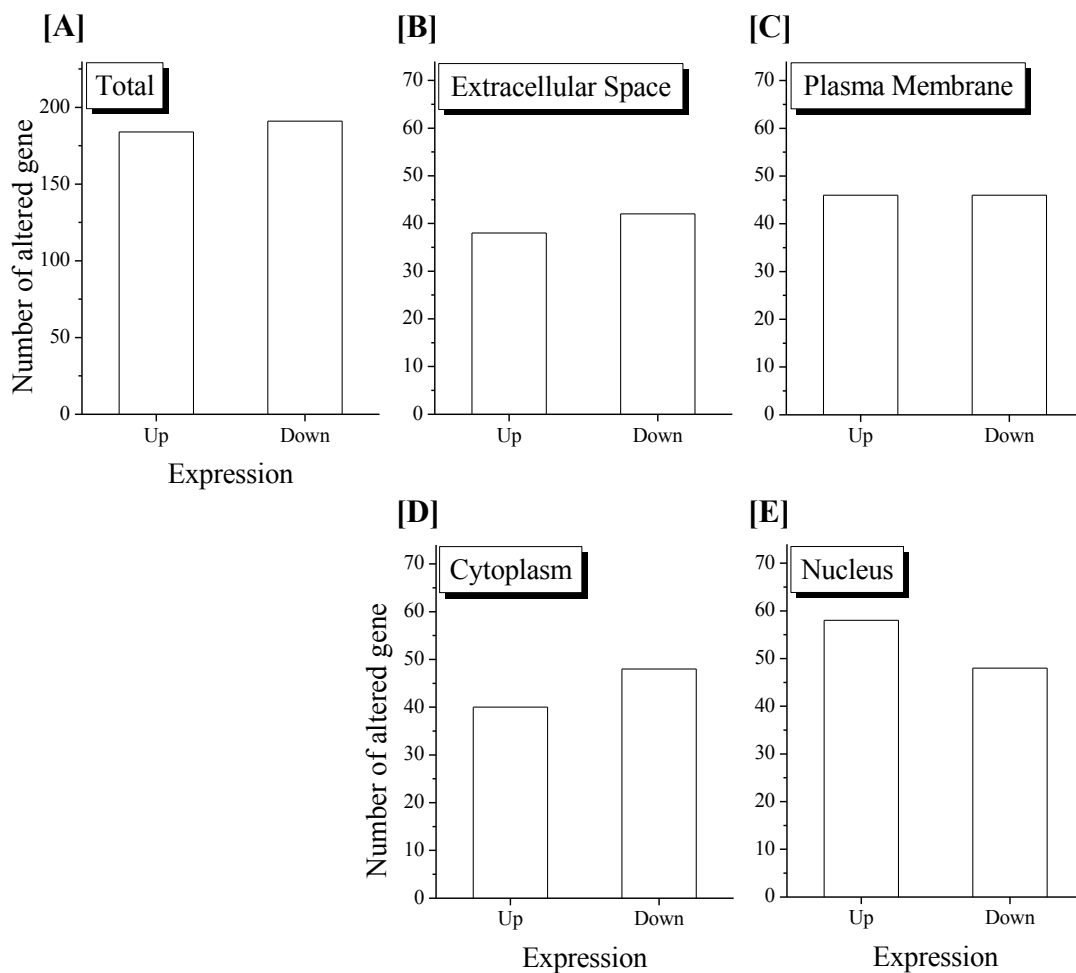


Figure 6. サイトカイン非存在下で培養した非照射および X 線照射 CD34⁺ 細胞の cDNA マイクロアレイの解析結果. Ingenuity Pathway Analysis knowledge を用い, 発現量が 2 倍以上に変化したアポトーシス関連遺伝子数を, その局在ごとに分類した.

Table 3 CD34⁺細胞の核に局在し、電離放射線により発現が変動した遺伝子

(A) 発現が増加した遺伝子群

| Symbol | Entrez gene name | Fold change |
|----------------|--|-------------|
| <i>CDKN1A</i> | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 | 5.04 |
| <i>CCND1</i> | Cyclin D1 | 4.27 |
| <i>RPS6KA5</i> | Ribosomal protein S8 kinase, 90kDa, polypeptide 5 | 4.26 |
| <i>MDM2</i> | MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase | 4.04 |
| <i>PLK2</i> | Polo-like kinase 2 | 3.72 |
| <i>PLK3</i> | Polo-like kinase 3 | 3.58 |
| <i>NR4A1</i> | Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 | 3.52 |
| <i>PPARD</i> | Peroxisome proliferator-activated receptor delta | 3.44 |
| <i>PIAS2</i> | Protein inhibitor of activated STAT, 2 | 3.32 |
| <i>GLI2</i> | GLI family zinc finger 2 | 3.25 |
| <i>GLI3</i> | GLI family zinc finger 3 | 3.22 |
| <i>HIPK3</i> | Homeodomain interacting protein kinase 3 | 3.18 |
| <i>YAP1</i> | Yes-associated protein 1 | 3.08 |
| <i>GADD45A</i> | Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | 3.02 |
| <i>ARNT2</i> | Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 | 2.97 |
| <i>DDB2</i> | Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa | 2.93 |
| <i>HIPK2</i> | Homeodomain interacting protein kinase 2 | 2.78 |
| <i>POLH</i> | Polymerase (DNA directed), eta | 2.76 |
| <i>FOSL1</i> | FOS-like antigen 1 | 2.70 |
| <i>ZMAT3</i> | Zinc finger, matrin-type 3 | 2.70 |
| <i>VDR</i> | Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor | 2.57 |
| <i>GATA4</i> | GATA binding protein 4 | 2.57 |
| <i>LATS2</i> | Large tumor suppressor, homolog 2 | 2.55 |
| <i>EGR4</i> | Early growth response 4 | 2.51 |
| <i>EPAS1</i> | Endothelial PAS domain protein 1 | 2.50 |
| <i>POLR2A</i> | Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa | 2.49 |
| <i>RPS27L</i> | Ribosomal protein S27-like | 2.46 |
| <i>STK17A</i> | Serine/threonine kinase 17a | 2.46 |
| <i>PCNA</i> | Proliferating cell nuclear antigen | 2.45 |
| <i>AIRE</i> | Autoimmune regulator | 2.44 |
| <i>UBR4</i> | Ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 4 | 2.43 |
| <i>BCL3</i> | B-cell CLL/lymphoma 3 | 2.43 |
| <i>ZIC1</i> | Zic family member 1 | 2.39 |
| <i>LATS1</i> | Large tumor suppressor, homolog 1 | 2.38 |
| <i>FOXC1</i> | Forkhead box C1 | 2.38 |
| <i>ATF3</i> | Activating transcription factor 3 | 2.36 |

Continued

| | | |
|----------------|---|------|
| <i>GATAD2A</i> | GATA zinc finger domain containing 2A | 2.35 |
| <i>E2F1</i> | E2F transcription factor 1 | 2.32 |
| <i>EGR1</i> | Early growth response 1 | 2.31 |
| <i>XPC</i> | Xeroderma pigmentosum, complementation group C | 2.29 |
| <i>ETS1</i> | V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 | 2.29 |
| <i>KCNIP3</i> | Kv channel interacting protein 3, calsenilin | 2.27 |
| <i>NCOA3</i> | Nuclear receptor coactivator 3 | 2.25 |
| <i>SRSF1</i> | Serine/arginine-rich splicing factor 1 | 2.24 |
| <i>DLX2</i> | Distal-less homeobox 2 | 2.21 |
| <i>IKZF3</i> | IKAROS family zinc finger 3 | 2.21 |
| <i>IRF4</i> | Interferon regulatory factor 4 | 2.14 |
| <i>PML</i> | Promyelocytic leukemia | 2.14 |
| <i>SPO11</i> | SPO11 meiotic protein covalently bound to DSB homolog | 2.12 |
| <i>HUWE1</i> | HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase | 2.08 |
| <i>PGR</i> | Progesterone receptor | 2.06 |
| <i>RBL1</i> | Retinoblastoma-like 1 | 2.05 |
| <i>BCL6</i> | B-cell CLL/lymphoma 6 | 2.04 |
| <i>SRF</i> | Serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor) | 2.03 |
| <i>SUZ12</i> | Suppressor of zeste 12 homolog | 2.03 |
| <i>RUNX1</i> | Runt-related transcription factor 1 | 2.03 |
| <i>LMNA</i> | Lamin A/C | 2.02 |
| <i>NCOA6</i> | Nuclear receptor coactivator 6 | 2.00 |

(B) 発現が減少した遺伝子群

| Symbol | Entrez gene name | Fold change |
|---------------|--|--------------------|
| <i>ATF2</i> | Activating transcription factor 2 | 8.29 |
| <i>ATF3</i> | Activating transcription factor 3 | 5.10 |
| <i>ZNF423</i> | Zinc finger protein 423 | 4.80 |
| <i>MLL</i> | Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila) | 4.34 |
| <i>MKI67</i> | Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 | 4.23 |
| <i>PAWR</i> | PRKC, apoptosis, WT1, regulator | 4.20 |
| <i>CDC25C</i> | Cell division cycle 25C | 3.52 |
| <i>SYCP2</i> | Synaptonemal complex protein 2 | 3.26 |
| <i>HLF</i> | Hepatic leukemia factor | 3.20 |
| <i>LEF1</i> | Lymphoid enhancer-binding factor 1 | 3.17 |
| <i>CDK6</i> | Cyclin-dependent kinase 6 | 3.12 |
| <i>TNP2</i> | Transition protein 2 (during histone to protamine replacement) | 2.95 |
| <i>SMAD6</i> | SMAD family member 6 | 2.93 |

Continued

| | | |
|-----------------|---|------|
| <i>CAMK4</i> | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV | 2.87 |
| <i>ZNF622</i> | Zinc finger protein 622 | 2.87 |
| <i>GSK3B</i> | Glycogen synthase kinase 3 beta | 2.80 |
| <i>SMARCB1</i> | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin | 2.71 |
| <i>FLI1</i> | Friend leukemia virus integration 1 | 2.64 |
| <i>TSC22D1</i> | TSC22 domain family, member 1 | 2.62 |
| <i>SOX5</i> | SRY (sex determining region Y)-box 5 | 2.61 |
| <i>ARHGAP35</i> | Rho GTPase activating protein 35 | 2.50 |
| <i>SATB1</i> | SATB homeobox 1 | 2.49 |
| <i>PPP5C</i> | Protein phosphatase 5, catalytic subunit | 2.45 |
| <i>SMAD3</i> | SMAD family member 3 <i>SMAD3</i> | 2.44 |
| <i>NFKBID</i> | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta | 2.43 |
| <i>SOX6</i> | SRY (sex determining region Y)-box 6 | 2.40 |
| <i>RUNX1T1</i> | Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related) | 2.39 |
| <i>TYMS</i> | Thymidylate synthetase | 2.31 |
| <i>SOX17</i> | SRY (sex determining region Y)-box 17 | 2.29 |
| <i>RASSF1</i> | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 | 2.28 |
| <i>RAG1</i> | Recombinant activating gene 1 | 2.26 |
| <i>HEY1</i> | Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1 | 2.25 |
| <i>ZEB2</i> | Zinc finger E-box binding homeobox 2 | 2.23 |
| <i>RGN</i> | Regucalcin (senescence marker protein-30) | 2.17 |
| <i>MSRB2</i> | Methionine sulfoxide reductase B2 | 2.16 |
| <i>EBF1</i> | Early B-cell factor 1 | 2.16 |
| <i>NKX2-5</i> | NK2 homeobox 5 | 2.14 |
| <i>RELA</i> | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian) | 2.14 |
| <i>ESR1</i> | Estrogen receptor 1 | 2.13 |
| <i>NCOA2</i> | Nuclear receptor coactivator 2 | 2.12 |
| <i>TEX11</i> | Testis expressed 11 | 2.10 |
| <i>IRX1</i> | Iroquois homeobox 1 | 2.09 |
| <i>NRII3</i> | Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 | 2.08 |
| <i>CSRNP3</i> | Cysteine-serine-rich nuclear protein 3 | 2.05 |
| <i>NOVA1</i> | Neuro-oncological ventral antigen 1 | 2.05 |
| <i>ING5</i> | Inhibitor of growth family, member 5 | 2.04 |
| <i>TAL1</i> | T-cell acute lymphocytic leukemia 1 | 2.03 |
| <i>HMGA2</i> | High mobility group AT-hook 2 | 2.01 |

考 察

本研究の結果で X 線ばく露した CD34⁺細胞の生存率は、時間依存的に徐々に減少したが、一方でクローン増殖能は、サイトカイン非存在下においてより劇的に減少した (Figure 2 および 3) . X 線照射 12 時間後における生存細胞数は、非照射群の初期値に比較して約 70%–80%に減少していたが、一方で照射群のクローン増殖能は非照射群の初期値に比較して約 50%–60%にまで減少していた. この時、非照射群の培養で認められた播種効率は約 22%であり (data not shown) , CD34⁺細胞のクローン増殖能喪失という観点からみると、X 線ばく露が重大な事象であることを指し示している. それに加えて、0.5 Gy 照射群と 2 Gy 照射群との間で、生存率もしくはクローン増殖能に統計学的に有意な差異は認められなかった. 言い換えれば、たった 0.5 Gy の X 線ばく露でも、サイトカイン非存在下において CD34⁺細胞のクローン増殖能は大きく低下した.

サイトカイン刺激は、造血幹細胞の生存⁶⁾、分化⁷⁾、増殖^{8, 9)}において決定的な役割を果たしている. 我々の過去の研究は、幾つか種類のサイトカインが、造血前駆細胞数の劇的な増加を導くことを示している^{45, 46)}. 本研究の結果は、たとえ 0.5 Gy であったとしても、電離放射線が CD34⁺細胞に対して顕著な損傷を誘発し、クローン増殖能を急激に低下させることを明らかにした.

造血幹/前駆細胞は、放射線ばく露に伴って産生される活性酸素種に対して高感受性である. Hayashi らは、CD34⁺/CD38⁻の幹細胞集団が、より分化した CD34⁺/CD38⁺および CD34⁻/CD38⁺の細胞集団に比較し、放射線誘発性アポトーシスや細胞内スーパーオキシド産生に対して、より感受性であることを示した⁴⁷⁾. また、Wang らは、亜致死線量を全身照射したマウスの造血幹細胞において、持続的な活性酸素種産生の増加が認められることを報告した⁴⁸⁾. 本研究では、2 Gy 照射群で照射 6 時間後にミトコンドリア由来スーパーオキシド産生量の有意な増加を認め、さらに両照射群とも照射 12 時間後から 24 時間後の間で最大値に達した (Figure 5A) . しかしながら、細胞表面抗原の発現 (Figure 4) , 細胞周期分布 (Table 2) , 多種類の活性酸素種を検出するために用いた CM-H₂DCFDA レベル (Figure 5B) に有意な変化は認められなかった.

一般的に、ミトコンドリアがスーパーオキシドの主な発生源であることはよく知られている⁴⁹⁾。これまでに、幾つかの文献がミトコンドリア由来活性酸素種と放射線誘導性細胞死との関係性を示してきた。Motoori らは、ヒト肝がん細胞株である HLE において、ミトコンドリアの Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) の過剰発現が、放射線誘導性細胞死に対して防護的に作用することを証明した⁵⁰⁾。それに加えて、Epperly らは、マウス造血幹細胞株である 32D cl 3 のサブクローンにおいて、ヒト Mn-SOD の遺伝子導入が、放射線誘導性アポトーシスを減少させたことを証明した⁵¹⁾。さらに、Thompson らは、擬似的な Mn-SOD である M40403 が、成体マウスを致死的な全身照射から防護したことを証明した⁵²⁾。これら過去の報告は、ミトコンドリア性の活性酸素種が、一部では放射線誘導性の細胞死に関与していることを示している。一方、我々は最近、サイトカイン存在下で 2 Gy 照射された CD34⁺細胞において、照射 24 時間後に細胞内活性酸素種産生量の有意な増加を認めたと報告した⁵³⁾。これらの知見は、サイトカインを含む造血因子が細胞内の活性酸素種産生量を増加させると報告した過去の研究と一致している^{54, 55)}。それとは対照的に、ミトコンドリア由来スーパーオキシドの細胞内レベルは、照射 7 日目まで変化はなかった。本研究において、2 Gy 照射した CD34⁺細胞をサイトカイン存在下で培養した時に生み出された CFC の総数は、照射 1 日目および 3 日目において、それぞれ初期値の 0.6 倍および 0.16 倍となった。まとめると、これらの知見は CD34⁺細胞のクローン増殖能喪失に、X 線によるミトコンドリア由来スーパーオキシド産生が関与している可能性を示している。

細胞死には、アポトーシス、オートファジー、老化などを含む幾つかの形態が存在する^{32, 56, 57)}。サイトカイン非存在下における電離放射線ばく露 CD34⁺細胞の細胞死メカニズムの一端を明らかにするために、CD34⁺細胞の遺伝子発現変化を網羅的に解析した (Figure 6) 。電離放射線ばく露後の発現量が、2 倍以上に変動を示したアポトーシス関連遺伝子に制限すると、375 の遺伝子が抽出された。これらの遺伝子を、局在ごとに 4 つの領域 (細胞外, 細胞膜, 細胞質, 核) に分類すると、核領域で最も多く、109 の遺伝子が抽出された (Figure 6, Table 3) 。

最近、造血幹/前駆細胞のサイトカイン非存在下における培養が、p16 および

p21 タンパクの発現増加を伴った増殖抑制をもたらすことが示された⁷⁾。さらに、電離放射線が p21 の誘導と密接に関連した老化応答拡大の引き金となっていることが示された⁵⁸⁾。これらの知見は、電離放射線ばく露が p21 の発現増加を介した老化応答と関係している可能性を示している。本研究において、核領域に分類された遺伝子のうち、X 線照射により発現が最も増加した遺伝子は、p21 をコードする *CDKN1A* であった。従って本研究の結果は、老化応答が p21 の発現増加に関係しており、さらに放射線誘導性のクローン増殖能喪失の要因となっている可能性を示している。最近、ヒト B リンパ芽球細胞株である IM-9 において、X 線照射により線量依存的に *CDKN1A* の mRNA 発現レベルが有意に増加したことが示された⁵⁹⁾。一方、MAPK signaling は、造血幹細胞の静止状態の維持に重要な役割を果たしていることが証明されてきた⁶⁰⁾。特に ERK MAPK 経路は重要で、p38 MAPK signaling は、ROS 仲介性酸化ストレスへの応答において造血幹細胞の消耗・枯渇に寄与する。

同様に最近、電離放射線応答において *ATF2* 発現の低下が報告されており⁶¹⁾、これは本研究の結果と一致している (Table 2) 。さらに過去の報告は、*ATF2* のノックダウンが薬剤誘導性の *ATF3* 発現を消滅させたこと、さらに薬剤が phospho-p38 MAPK, JNK, ERK レベルの増加を導いたことを証明した⁶²⁾。これらの結果は、*ATF2* 発現が p38 MAPK, JNK, ERK 依存性経路により仲介されていることを示唆している。従って、これらの経路は、もしかしたら本研究における *CD34*⁺細胞の分化・増殖に重要な役割を担っているのかもしれない。しかしながら、本研究の遺伝子発現解析は、X 線照射 6 時間後のみで行われているため、これらの可能性を検証するには更なる研究が必要とされる。前述の遺伝子を含めた電離放射線により変動した遺伝子群の役割を明らかにするための、より正確な研究が、現在、進行している。

本研究は、各臍帯血サンプルから得られる *CD34*⁺細胞数が少ないために、照射線量が 0.5 Gy および 2 Gy のみである、サイトカイン非存在下での培養は 24 時間が限度である等の限られた条件下で行われた。本研究を計画する際、2 つの根拠に基づき照射線量を 2 Gy に設定した。1 つは、がんに対する放射線治療において、一般的な分割照射の 1 回線量が 2 Gy であることである。もう 1 つは、2 Gy を超える線量では、CFU-Mix のコロニー形成頻度が検出限界以下となり、X 線ばく露した *CD34*⁺細

胞を適正に評価できないためである。今後、より多くの解析を行うためには、これらの諸問題を解決する必要がある。

結論として、本研究は、ヒト造血幹/前駆細胞のクローン増殖能が電離放射線に高感受性である可能性を示した。高線量放射線ばく露事故の際には、造血幹/前駆細胞のクローン増殖能の減少を回避するために、可能な限り早期にサイトカインや造血因子投与による治療が行われなければならない。

第 2 章

電離放射線ばく露ヒト造血幹/前駆細胞の

サイトカイン存在下と非存在下における遺伝子発現変化の網羅的解析

要 旨

ヒト造血幹/前駆細胞の放射線感受性に関与する遺伝子の本質を明らかにするために、2 Gy の X 線照射 CD34⁺細胞を、遺伝子組換え型ヒト Thrombopoietin + Interleukin 3 + Stem cell factor の存在下もしくは非存在下で 6 時間に渡り無血清培養し、各処理細胞の cDNA マイクロアレイにより得られた遺伝子発現レベルについて、応答遺伝子のネットワーク解析を行った。この時、X 線照射の有無 (IR (+), IR (-)) およびサイトカインの有無 (Cyt (+), Cyt (-)) により以下の 4 つの条件で処理した; IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (-), IR (-) Cyt (+), IR (+) Cyt (+)。また、未処理細胞をコントロールとした。その結果、IR (+) Cyt (-) と IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (-) と未処理細胞, IR (+) Cyt (+) と IR (-) Cyt (+) の 3 つの比較で共通していた 17 の「電離放射線応答遺伝子」と、IR (+) Cyt (+) と IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (+) と未処理細胞の 2 つの比較で共通していた 36 の「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」が抽出された。これらに共通する上流遺伝子として、*MYC* の有意な活性化を見出した。*MYC* はがん遺伝子であり、これまでに染色体の転座や細胞周期の開始期に重要な役割を果たすことが報告されている。さらに誘導された *MYC* 下流遺伝子のうち *EIF4G1* および *PNO1* の関与が示された。それぞれ、*EIF4G1* は翻訳開始因子としてタンパク合成の開始期に、*PNO1* はプロテアソームやリボソームの新生に関与する遺伝子であることが報告されており、これら 2 つの遺伝子はいずれも RNA の機能に関連している。本研究は、*MYC* が造血幹/前駆細胞の放射線感受性において重要な役割を果たすこと、さらに *MYC* 下流遺伝子の *EIF4G1* と *PNO1* が、造血細胞の放射線感受性において重要な機能を有している可能性を示唆した。

緒 言

造血器が放射線に対して高い感受性を有するのは、その高い分裂能が要因であることが、これまでに示唆されてきた^{63, 64)}。全ての末梢血球は、造血幹細胞の自己複製能と多分化能により維持されている。我々の過去の研究は、造血幹細胞の静止に関連する細胞表面発現抗原である Tyrosine kinase with immunoglobulin and the epidermal growth factor homology domain 2 (Tie-2 または CD202b) が⁴³⁾、ヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞の放射線感受性に関与することを示していた³⁶⁾。さらに、骨芽細胞に接着している Tie-2⁺の造血幹細胞は静止しており、抗アポトーシス性であることが報告されている⁴³⁾。これらの知見は、造血細胞の放射線感受性と細胞分裂率との間に正の相関が存在する可能性を示唆しているが、静止している造血幹細胞の抗アポトーシス性が電離放射線により影響されているか否かは明らかになっていない。

それに加えて、電離放射線ばく露により造血細胞は、悪性化するリスクが増加する。原爆生存者における急性骨髄性白血病の発症率は、被ばく後 3–5 年に最大値を迎える固形腫瘍とは異なり、より早い時期に最大値を迎える⁶⁵⁾。また、放射線抵抗性の造血細胞は、電離放射線ばく露応答において突然変異を生じることにより抗アポトーシス性応答を示す可能性がある。白血病細胞の突然変異は、正常に修復されなかった電離放射線誘導性の DNA 損傷から生じているが、造血幹/前駆細胞の電離放射線応答における DNA 修復メカニズムは、未だ不明な点が多い。マウス造血幹細胞において、DNA 修復は細胞周期と関係し、細胞周期が活性化された時点で最大の影響が発揮される^{66, 67)}。Desai らは、Exonuclease 1 が、活性化した造血幹細胞における DNA 損傷過程に不可欠であることを提唱しており⁶⁶⁾、さらに Chen らは、Gadd45a が造血細胞において放射線誘導性の DNA 損傷応答を調節していると報告した^{67, 68)}。しかしながら、これらの遺伝子が他の遺伝子といかにかして相互作用しているのか、さらに、これら遺伝子上流に調節因子が存在するのか否かは明らかになっていない。同様に、ヒト造血幹/前駆細胞の電離放射線応答における遺伝子発現レベルに関する知見は、未だ不足している。

本研究では、電離放射線に対するヒト造血システムの決定的な応答を理解するために、電離放射線ばく露したヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞における遺伝子発現プロ

ファイルを解析した. ヒト臍帯血由来 CD34⁺細胞の長期にわたる *ex vivo* 培養には, 幾つかのサイトカインの実験的な添加が必要とされるが, これらの分子は造血幹/前駆細胞を刺激し, その遺伝子発現に変化を生じさせる. 従って, 本研究ではサイトカイン存在下と非存在下の両方を考慮することで, その影響の低減化を試みた.

材料と方法

増殖因子

Recombinant human interleukin-3 (IL-3) および Recombinant human stem cell factor (SCF) は Biosource (Tokyo, Japan) より購入した. Recombinant human thrombopoietin (TPO) は PeproTech (New Jersey, USA) より購入した.

ヒト胎盤/臍帯血由来 CD34⁺細胞の採取および濃縮

本研究は, 弘前大学大学院医学研究科に設置されている倫理委員会の承認を得て行われた. 臍帯血は, 対象となる妊婦からインフォームドコンセントを得られたのち, 東京臍帯血バンクのガイドラインに基づいた抗凝固剤を含む滅菌コレクションバッグを用いて, 正常な満期分娩後の胎盤/臍帯より採取した. 本研究では, これらのサンプルを個別に単離し, 各実験に用いた. 臍帯血の採取から 24 時間以内に, Lymphosepar I (1.077 g/ml; Immuno-Biological Laboratories, Takasaki, Japan) を用いた比重遠心法により高濃度の単核球細胞を分離し, 次に 5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 含有 Phosphor-buffered saline (PBS) を用いて 3 回洗浄した. さらに The Indirect CD34 MicroBeads Kit and autoMACS™ Pro Separator (Miltenyl Biotec, Tokyo, Japan) を用い, 製造者の指示に基づいたポジティブセレクションにより CD34⁺細胞の濃縮を行った.

電離放射線の照射

CD34⁺細胞への電離放射線照射は, X 線発生装置 (MBR-1520R; Hitachi Medical Co., Tokyo, Japan) を用いて行った. 照射条件は管電圧: 150 kVp, 管電流: 20 mA,

照射距離: 45 cm に設定し, フィルターに 0.5 mm Al および 0.3 mm Cu を用い, 線量率は 80 cGy/min, 総照射線量は 2 Gy とした. なお, 照射中の積算線量は, 電離箱式線量計により監視した. CD34⁺細胞は無血清培地で懸濁され, 1.5 ml チューブ中で照射された.

液体培養

CD34⁺細胞の液体培養は, 無血清培養用の血清代替物である BIT9500 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) を添加した無血清の Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco[®], Invitrogen) を用いて行った. 2 Gy 照射もしくは非照射の CD34⁺細胞は, 30×10^4 cells/ml の濃度にて, 総量 500 μ l/well を 24-well cell culture plates (Falcon, Becton Dickinson Biosciences) 上に播種し, 37°C, 5% CO₂ 存在下で 6 時間に渡り, サイトカイン存在下もしくは非存在下で培養した. これらの培養に際し, サイトカイン投与群では TPO (50 ng/ml), IL-3 (100 ng/ml), SCF (100 ng/ml) を添加した. サイトカイン非存在下では, 造血幹細胞の増殖能は速やかに失われる⁶⁹⁾. これらのサイトカインの組合せは, 造血幹/前駆細胞の生存と分化に適切であることが報告されている^{30, 70)}.

全 RNA の抽出

5 つのサンプルの CD34⁺細胞から全 RNA を抽出するために, 過去の文献で報告された手順を踏襲した¹⁵⁾. 全 RNA は RNeasy[®] Micro Kit (Qiagen, Bothell, Washington, USA) を用い, 製造者の指示に従い抽出し, 濃度および純度は Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) を用いて測定した.

マイクロアレイの手順とデータ解析

DNA マイクロアレイおよびデータ解析は, 過去の文献で報告された手順を基に行った^{34, 35)}. 遺伝子発現解析は, 製造者の指示に従い, GeneChip[®] system with Human Genome U133-plus 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) を用

いて行った. さらに, 遺伝子発現プロファイルの解釈は, GeneSpring GX (Agilent Technologies) , Ingenuity Pathways Analysis (Qiagen) を用いて行い, その遺伝子の発現が2倍以上に増加もしくは2倍以下に減少した場合に, 大きく変化したことを指し示すものと考えた. 電離放射線およびサイトカイン投与の影響は, それぞれ異なる群の結果と比較することにより決定した.

結 果

X線ばく露 CD34⁺細胞における遺伝子発現の変化

CD34⁺細胞における mRNA 発現に対する電離放射線の影響を調査するために, 0–2 Gy の X 線照射後に cDNA マイクロアレイ解析を行った. 第 1 章では, クローン増殖能が照射 12 時間後までに急激な減少を示したため, 決定的な影響が照射から 12 時間以内に起きていると推測し, 照射 6 時間後に遺伝子発現の変化を解析した.

最初に, 非照射群と照射群との間で遺伝子発現プロファイルを比較することで, 電離放射線により応答した遺伝子の抽出を試みた (Figure 7) . 電離放射線ばく露に
応答する遺伝子を抽出するために, それぞれサイトカインの有無, 即ち Cyt (+) もしくは Cyt (-) , 電離放射線ばく露の有無, 即ち IR (+) もしくは IR (-) , に従って以下の 3 つの比較を行った; IR (+) Cyt (-) 群と IR (-) Cyt (-) 群, IR (+) Cyt (-) 群と 0 h 群, IR (+) Cyt (+) 群と IR (-) Cyt (+) 群. これら 3 つの比較において抽出された「電離放射線応答遺伝子」は, 低い *p* 値を示した 20,108 の遺伝子のうち, 約 1%であった. 3 つの比較で認められた「電離放射線応答遺伝子」の数は, それぞれ IR (+) Cyt (-) 群と IR (-) Cyt (-) 群では 237, IR (+) Cyt (-) 群と 0 h 群では 237, IR (+) Cyt (+) 群と IR (-) Cyt (+) 群では 243 であった. これらの遺伝子のうち, 17 の遺伝子が 3 つの比較に共通して認められた (Table 4A) .

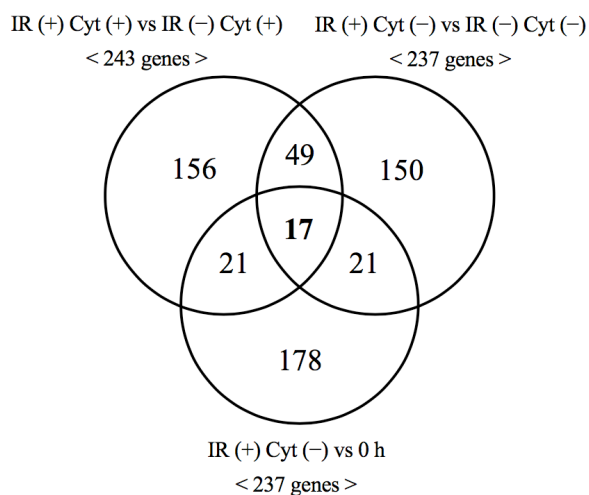
同様に, 「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」を, IR (+) Cyt (+) 群と IR (-) Cyt (-) 群, IR (+) Cyt (+) 群と 0 h 群での 2 つの比較により抽出した. この比較で認められた「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」は, それぞれ IR (+) Cyt (+) 群と IR (-) Cyt (-) 群では 231, IR (+) Cyt (+) 群と 0 h 群では 215 であった. これらの

遺伝子のうち、36 の遺伝子が 2 つの比較に共通して認められた (Table 4B) .

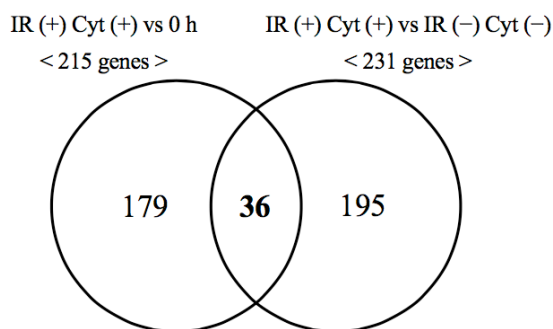
本研究において、遺伝子発現プロファイルの注釈づけのために用いられた Ingenuity Pathways Analysis software は、実験的な 2 群間の差異を示すことで、幾つかの生物学的な特徴を予測することができる。それ故に、これらの注釈知見に基づいて、電離放射線により影響された上流に位置する調節因子「Upstream regulator」を抽出した (Table 5) . 全ての 2 群間比較において、共通して *MYC* の z-score が 2.0 以上となり活性化されていた。特に、IR (+) Cyt (-) 群と IR (-) Cyt (-) 群から予測された *MYC* の変化は、他の全てのの上流に位置する調節因子のうち、最も高い z-score (4.81) を示した。前述の 5 つの比較における *MYC* 発現の変化を Table 6A に要約した。 *MYC* の発現レベルは統計学的に有意ではなかったものの、 *MYC* の遺伝子調節機能が、IR (-) 群と IR (+) 群との比較で、電離放射線により増加させられることが示された。

誘導された *MYC* が、実際に下流の遺伝子に影響しているか否かを明らかにするために、17 の「電離放射線応答遺伝子」 (Figure 7A) および 36 の「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」 (Figure 7B) と *MYC* との関係性を調査した (Table 6B) . Table 6B に示したように、3 つの「電離放射線応答遺伝子」 (*EIF4G1*, *GART*, *PNO1*) と 5 つの「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」 (*EIF4G1*, *HLA-E*, *MDM2*, *PNO1*, *TIMP2*) が、 *MYC* の下流に位置する遺伝子として抽出された。さらに、このうち *EIF4G1* と *PNO1* は、「電離放射線応答遺伝子」と「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」に共通する遺伝子でもあった (Figure 7C) .

[A] 電離放射線応答遺伝子数



[B] 電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子数



[C] 共通する遺伝子数

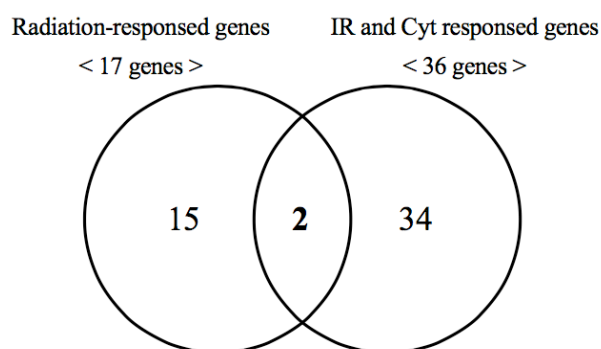


Figure 7. 遺伝子発現レベルの比較により抽出された「電離放射線応答遺伝子」と「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」の数. X線照射の有無 (IR (+) もしくは IR (-)) およびサイトカインの有無 (Cyt (+) もしくは Cyt (-)) により以下の4つの条件で処理した; IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (-), IR (-) Cyt (+), IR (+) Cyt (+). また, 未処理細胞をコントロールとした. A: 「電離放射線応答遺伝子」を3群間 (IR (+) Cyt (-) 群と IR (-) Cyt (-) 群, IR (+) Cyt (-) 群と 0 h 群, IR (+) Cyt (+) 群と IR (-) Cyt (+) 群) で比較した. B: 「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」を2群間 (IR (+) Cyt (+) 群と IR (-) Cyt (-) 群, IR (+) Cyt (+) 群と 0 h 群) で比較した. C: 17の電離放射線応答遺伝子と36の電離放射線およびサイトカイン応答性遺伝子に共通する遺伝子数.

Table 4 共通する遺伝子の発現変化

(A) 電離放射線応答遺伝子

| Symbol | Gene Name | Location |
|---------------|---|---------------------|
| <i>BNIP3L</i> | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like | Cytoplasm |
| <i>DCAF13</i> | DDB1 and CUL associated factor 13 | Nucleus |
| <i>EIF4G1</i> | Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1 | Cytoplasm |
| <i>GAL</i> | Galanin/GMAP prepropeptide | Extracellular Space |
| <i>GART</i> | Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylglycinamidazole synthetase | Cytoplasm |
| <i>MLLT4</i> | Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4 | Nucleus |
| <i>NDFIP1</i> | Nedd4 family interacting protein 1 | Cytoplasm |
| <i>NSUN2</i> | NOP2/Sun RNA methyltransferase family, member 2 | Nucleus |
| <i>PMM2</i> | Phosphomannomutase 2 | Cytoplasm |
| <i>PNO1</i> | Partner of NOB1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | Nucleus |
| <i>PSMA3</i> | Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3 | Cytoplasm |
| <i>SEH1L</i> | SEH1-like (<i>S. cerevisiae</i>) | Cytoplasm |
| <i>TM4SF1</i> | Transmembrane 4 L six family member 1 | Plasma Membrane |
| <i>WWC2</i> | WW and C2 domain containing 2 | Other |
| <i>YPEL2</i> | Yippee-like 2 (<i>Drosophila</i>) | Nucleus |
| <i>YPEL5</i> | Yippee-like 5 (<i>Drosophila</i>) | Other |
| <i>ANF277</i> | Zinc finger protein 277 | Nucleus |

(B) 電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子

| Symbol | Gene Name | Location |
|-------------------|--|---------------------|
| <i>BNIP3L</i> | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like | Cytoplasm |
| <i>BTBD10</i> | BTB (POZ) domain containing 10 | Other |
| <i>CD70</i> | CD70 molecule | Extracellular Space |
| <i>CERS5</i> | Ceramide synthase 5 | Cytoplasm |
| <i>CLEC2B</i> | C-type lectin domain family 2, member B | Plasma Membrane |
| <i>CREBRF</i> | CREB3 regulatory factor | Other |
| <i>CXCL11</i> | Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 | Other |
| <i>EIF4G1</i> | Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1 | Cytoplasm |
| <i>Gm6749</i> | Predicted pseudone 6749 | Nucleus |
| <i>HLA-E</i> | Major histocompatibility complex, class I, E | Other |
| <i>LEPROT</i> | Leptin receptor overlapping transcript | Plasma Membrane |
| <i>LOC286052</i> | Uncharacterized LOC286052 | Other |
| <i>MAK16</i> | MAK16 homolog (S. cerevisiae) | Nucleus |
| <i>MDM2</i> | MDM2 oncogene, E2 ubiquitin protein ligase | Nucleus |
| <i>MLLT4</i> | Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4 | Nucleus |
| <i>NDFIP1</i> | Nedd4 family interacting protein 1 | Cytoplasm |
| <i>NSUN2</i> | NOP2/Sun RNA methyltransferase family, member 2 | Nucleus |
| <i>OPA3</i> | Optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia) | Other |
| <i>PI4KB</i> | Phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta | Cytoplasm |
| <i>PIK3IP1</i> | Phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1 | Other |
| <i>PLXND1</i> | Plexin D1 | Plasma Membrane |
| <i>PNO1</i> | Partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae) | Nucleus |
| <i>PRKCB</i> | Protein kinase C, beta | Cytoplasm |
| <i>PSMA3</i> | Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3 | Cytoplasm |
| <i>PWP2</i> | PWP2 periodic tryptophan protein homolog (yeast) | Nucleus |
| <i>RBM28</i> | RNA binding motif protein 28 | Nucleus |
| <i>RIN3</i> | Ras and Rab interact 3 | Cytoplasm |
| <i>SEH1L</i> | SEH1-like (S. cerevisiae) | Cytoplasm |
| <i>SNX3</i> | Sorting nexin 3 | Other |
| <i>TIMP2</i> | TIMP metalloproteinase inhibitor 2 | Extracellular Space |
| <i>TM4SF1</i> | Transmembrane 4 L six family member 1 | Plasma Membrane |
| <i>TMEM68</i> | Transmembrane protein 68 | Other |
| <i>UBE2R2</i> | Ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2 | Other |
| <i>WWC2</i> | WW and C2 domain containing 2 | Other |
| <i>YPEL5</i> | Yippee-like 5 (Drosophila) | Other |
| <i>ZBTB11-AS1</i> | ZBTB11 antisense RNA 1 | Other |

Table 5 X線照射により有意に影響したと推測される上流の調節因子

| Condition | | Upstream regulator | Predicted activation State | z-score ^a |
|----------------|----------------|--------------------|----------------------------|----------------------|
| 0 h | IR (-) Cyt (-) | | No Data | |
| 0 h | IR (+) Cyt (-) | <i>MYC</i> | Activated | 3.07 |
| | | <i>MYCN</i> | Activated | 2.19 |
| | | <i>NFKB1</i> | Activated | 2.19 |
| | | <i>MGEA5</i> | Inhibited | -2.00 |
| 0 h | IR (+) Cyt (+) | <i>MYC</i> | Activated | 2.74 |
| | | <i>MYCN</i> | Activated | 2.23 |
| | | <i>OSM</i> | Activated | 2.04 |
| | | <i>STAT5B</i> | Inhibited | -2.00 |
| | | <i>PGR</i> | Inhibited | -2.00 |
| | | <i>STAT5A</i> | Inhibited | -2.00 |
| IR (-) Cyt (-) | IR (+) Cyt (-) | <i>MYC</i> | Activated | 4.81 |
| | | <i>CD28</i> | Inhibited | -2.00 |
| IR (-) Cyt (-) | IR (+) Cyt (+) | <i>MYC</i> | Activated | 2.81 |
| | | <i>TP53</i> | Activated | 2.50 |
| | | <i>IL3</i> | Activated | 2.24 |
| | | <i>FOS</i> | Activated | 2.20 |
| | | <i>IL2</i> | Activated | 2.17 |
| | | <i>TP73</i> | Activated | 2.00 |
| | | <i>TREM1</i> | Activated | 2.00 |
| IR (-) Cyt (+) | IR (+) Cyt (+) | <i>MYC</i> | Activated | 3.54 |
| | | <i>IKBKB</i> | Activated | 2.45 |
| | | <i>TGFB1</i> | Activated | 2.35 |
| | | <i>IL13</i> | Activated | 2.17 |
| | | <i>BRD4</i> | Activated | 2.00 |
| | | <i>CD28</i> | Inhibited | -3.00 |

^a z-score は、各々の下流に位置する遺伝子の発現に基づき、Ingenuity Pathways Analysis の z-score algorithm により算出された値である。2.0 より高い、もしくは-2.0 より低い z-score を有した上流の調節因子は、それぞれ活性化、もしくは抑制されたと推測される。

Table 6 X線照射により有意に影響したと推測される上流の調節因子

(A) MYC 発現における X 線照射およびサイトカイン投与の影響

| Group A | Group B | Upstream regulator | | Expression change | |
|----------------|----------------|----------------------------|----------------------|-------------------|---------|
| | | Predicted activation State | z-score ^a | Fold change | p-value |
| 0 h | IR (+) Cyt (-) | Activated | 3.07 | 2.13 | 0.28 |
| 0 h | IR (+) Cyt (+) | Activated | 2.74 | 3.29 | 0.11 |
| IR (-) Cyt (-) | IR (+) Cyt (-) | Activated | 4.81 | 1.48 | 0.62 |
| IR (-) Cyt (-) | IR (+) Cyt (+) | Activated | 2.81 | 1.18 | 0.69 |
| IR (-) Cyt (+) | IR (+) Cyt (+) | Activated | 3.54 | 1.32 | 0.85 |

^a z-score は、各々の下流に位置する遺伝子の発現に基づき、Ingenuity Pathways Analysis の z-score algorithm により算出された値である。2.0 より高い、もしくは-2.0 より低い z-score を有した上流の調節因子は、それぞれ活性化、もしくは抑制されたと推測される。

(B) MYC の下流に位置する「電離放射線応答遺伝子」と「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」との関連性

| Symbol | Downstream of MYC | Gene Name | Group ^a |
|---------------|-------------------|---|--------------------|
| <i>EIF4G1</i> | Positive | Eukaryotic translation initiation factor 4 | A and B |
| <i>GART</i> | Positive | Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylglycinamidazole synthetase | A |
| <i>HLA-E</i> | Positive | Major histocompatibility complex, class I, E | B |
| <i>MDM2</i> | Positive | MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase | B |
| <i>PNO1</i> | Positive | Partner of NOB1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | A and B |
| <i>TIMP2</i> | Positive | TIMP metalloproteinase inhibitor 2 | B |

^a Group A は「電離放射線応答遺伝子」群に、Group B は「電離放射線およびサイトカイン応答遺伝子」群に含まれる遺伝子であることを、それぞれ表している。

考 察

本研究では、ヒト臍帯血より高純度に分離精製され、2 Gy の X 線を照射された CD34⁺細胞における遺伝子発現の特徴を X 線照射 6 時間後に解析した。CD34⁺細胞は、X 線照射の有無 (IR (+) もしくは IR (-)) およびサイトカインの有無 (Cyt (+) もしくは Cyt (-)) により以下の 4 つの異なる条件で処理した; IR (-) Cyt (-), IR (+) Cyt (-), IR (-) Cyt (+), IR (+) Cyt (+)。また、未処理細胞をコントロールとした。

5 つの異なる状況下で液体培養された CD34⁺細胞から得られた遺伝子発現プロファイルの比較において、全ての 2 群間比較で *MYC* の発現が認められた (Table 5)。*MYC* はがん遺伝子であり、*MYC* 発現の増加が染色体転座に関係していることが広く知られている^{47,71)}。それに加えて、*MYC* は細胞周期の開始に際して重要な役割を果たし、同様に G1/S 期および G0 期にも関連し、また多くのヒト悪性腫瘍中で *MYC* の発現レベルが異常に増加している⁷²⁻⁷⁴⁾。Table 6A は非照射群と照射群との比較により、*MYC* の遺伝子調節機能が電離放射線により促進されたことを示している。Lin らは、*c-Myc* の発現増加が、ヒト悪性腫瘍において頻繁に生じており、さらに腫瘍の浸潤に関係すると報告したが、腫瘍細胞中で高発現している *c-Myc* が包括的な遺伝子制御におよぼす影響については僅かにしか理解されていない⁷⁵⁾。Lin らは同様に、*c-Myc* の増加が RNA polymerase II による転写伸長と、細胞当たりの転写レベル増加を導くことを示した。しかしながら、本研究は、ヒト CD34⁺細胞を用いた X 線照射 6 時間後のみの限られた条件下で行われているため、CD34⁺細胞における *MYC* の正確な役割を、本データのみで説明することは難しい。

前述の解析に加えて、発現が変化した遺伝子数は Ingenuity Pathways Analysis software の *p* 値に基づいて絞り込まれた。最終的に、*MYC* に関連した 2 つの下流遺伝子 *EIF4G1* と *PNO1* が、電離放射線ばく露により発現が異なると同定された (Table 6B)。*EIF4G1* はヒトのタンパクである Eukaryotic translocation initiation factor 4 gamma 1 をコードし、*PNO1* はヒトのタンパクである RNA-binding protein PNO1 をコードしており、これは両遺伝子が RNA の機能に関連していることを指し示している。

過去に他の論文では、様々な遺伝子の電離放射線応答について議論してきた⁷⁶⁾。Chiarugi らは、ヒトおよび動物を起源とする細胞株で、電離放射線および抗がん

剤に対する感受性に、支配的ながん遺伝子の影響を報告した論文において相反する結果の多様性について考察していた。彼らは、がん抑制遺伝子である *TP53* と抗アポトーシス性遺伝子である *BCL2* が、支配的ながん遺伝子の影響を調節していると推測した。さらに、感受性もしくは抵抗性に対する支配的ながん遺伝子の影響が、*TP53* と *BCL2* の間の発現バランスに依存していると推測した⁷⁷⁾。他の研究は、胚性線維芽細胞である NIH/3T3 細胞中のがん遺伝子である *N-ras* 発現が、*in vitro* で放射線抵抗性を増加させたことを示した。さらに、これらの知見は、がん抑制遺伝子の *RAF1* を発現しているヒト細胞株でも一致して認められた⁷⁸⁾。

FitzGeraldらは、造血前駆細胞株である 32D cl 3 に形質導入し、*v-myc* を発現させると、5 cGy/min と 116 cGy/min の両方に対して放射線抵抗性が増加したことを証明した⁷⁹⁾。この細胞株での知見は、もしかしたら放射線治療を実施した *ABL1* を発現したヒトの造血悪性腫瘍細胞の放射線抵抗性と相関しているのかもしれない。Tanakaらは、前白血病状態で疾病を有さない *Spa-1* (-/-) マウスが、定常状態の造血の減少と、 γ 線全身照射に対する抵抗性の減衰を示し、これは造血前駆細胞の持続性 *p53* 応答に帰することを証明した⁸⁰⁾。*Spa-1* (-/-) の造血前駆細胞は、*c-Myc* の過剰発現と *p19Arf* の増加を示し、同様に *Atm/Chk* 経路の活性化に伴う γ H2AX 発現の増加を示した。この研究は、造血前駆細胞中での DNA 損傷と *c-Myc* 発現の増加が、*Spa-1* (-/-) マウスにおける骨髄増殖性疾患の進展に先立って起き、結果として骨髄増殖性疾患の発症と急性転化への障壁として *TP53* 応答の機能がもたらされることを示唆している。しかしながら、造血幹/前駆細胞の放射線感受性とサイトカインの重要性に関する情報は、僅かしか報告されていない。本研究の知見は、*MYC* がヒト造血細胞における放射線感受性の指標として有益である可能性を示している⁸¹⁾。

結論として、本研究は *MYC* が造血幹/前駆細胞の放射線感受性において重要な役割を果たすこと、さらに *MYC* により制御される遺伝子、特に *EIF4G1* および *PNO1* が、ヒト造血細胞の放射線感受性において重要な機能を有していることを示唆した。しかしながら、これらの結果を確立し、発展させるためには、より精密な実験的手法が必要とされる。

結 論

本研究において、第1章および第2章の結果より指し示された結論は次の通りである。

1. ヒト造血幹/前駆細胞は、サイトカイン非存在下では電離放射線照射後、細胞死に比べクローン増殖能が急速に低下することが明らかとなり、それには電離放射線により誘導されたミトコンドリア由来スーパーオキシドや p21 が関与している可能性が示唆された。
2. *MYC* が造血幹/前駆細胞の放射線感受性において重要な役割を果たすこと、さらに *MYC* 下流遺伝子の *EIF4G1* と *PNO1* が、造血細胞の放射線感受性において重要な機能を有している可能性が示唆された。

本研究から、ヒト造血幹/前駆細胞は、サイトカイン非存在下では放射線照射後、細胞死に比べクローン増殖能が急速に低下することが明らかとなった。この造血幹/前駆細胞の放射線感受性に *MYC* がん遺伝子の関与が考えられた。今後ヒト造血幹/前駆細胞の放射線感受性を規定する因子や遺伝子を特定し、放射線のリスク診断や予測などへの応用発展が期待される。

謝 辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました弘前大学大学院保健学研究科 医療生命科学領域 放射線生命科学分野 柏倉幾郎 教授に深く感謝申し上げますとともに、有益なる御助言と御協力を賜りました弘前大学大学院保健学研究科 医療生命科学領域 放射線生命科学分野 細川洋一郎 教授，門前暁 助教，吉野浩教 助教に感謝申し上げます。また，臍帯血の採取・供与に御協力いただきました各医療施設およびスタッフの皆様に感謝申し上げます。最後になりましたが，臍帯血の採取・提供に快く同意してくださいました全ての御家族の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Till JE, McCulloch HA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14: 213–222, 1961.
- 2) Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 7: 391–402, 2010.
- 3) Pietras EM, Warr MR, Passegué E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol*, 195: 709–720, 2011.
- 4) Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*, 20: 1447–1462, 2014.
- 5) Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol*, 8: 426–433, 2005.
- 6) Kim H, Whartenby KA, Georgantas RW 3rd, Wingard J, Civin CI. Human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells express high levels of FLIP and are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Stem Cells*, 20: 174–182, 2002.
- 7) Alvarado-Moreno A, Chávez-González A, Cébulo A, Arriaga L, Mayani H. In vitro cell cycle dynamics of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Hematology*, 15: 11–20, 2010.
- 8) Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404: 193–197, 2000.
- 9) Edvardsson L, Dykes J, Olofsson T. Isolation and characterization of human myeloid progenitor populations-TpoR as discriminator between common myeloid and megakaryocyte/erythroid progenitors. *Exp Hematol*, 34: 599–609, 2006.
- 10) Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 703–713, 2007.
- 11) Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 387–403, 2001.

- 12) Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 99: 11872–11877, 2002.
- 13) Hao QL, Zhu J, Price MA, Payne KJ, Barsky LW, Crooks GM. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*, 97: 3683–3690, 2001.
- 14) Kaneyuki Y, Yoshino H, Kashiwaura I. Involvement of intracellular reactive oxygen species and mitochondria in the radiosensitivity of human hematopoietic stem cells. *J Radiat Res*, 53: 145–150, 2012.
- 15) Kato K, Takahashi K, Monzen S, Yamamoto H, Maruyama A, Itoh K, Kashiwakura I. Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in human hematopoietic stem cells. *Radiat Res*, 174: 177–184, 2010.
- 16) Ishikawa J, Ojima M, Kai M. The kinetic alteration of hematopoietic stem cells irradiated by ionizing radiation. *Radiat Biol Res Commun*, 49: 127–140, 2015.
- 17) Hirouchi T, Ito K, Nakano M, Monzen S, Yoshino H, Chiba M, Hazawa M, Nakano A, Ishikawa J, Yamaguchi M, Tanaka K, Kashiwakura I. Mitigative effects of a combination of multiple pharmaceutical drugs on the survival of mice to lethal ionizing radiation. *Curr Pharm Biotechnol*, 17: 190–199, 2015.
- 18) Yamaguchi M, Hirouchi T, Nakano M, Manzen S, Yoshino H, Chiba M, Ishikawa J, Nishiyama A, Murakami S, Ito K, Kashiwakura I. Long-lasting radioprotective effects of a combination of pharmaceutical drugs on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation. *Radiat Emerg Med*, 3: 50–55, 2014.
- 19) Hérodin F, Grenier N, Drouet M. Revisiting therapeutic strategies in radiation casualties. *Exp Hematol*, 35: 28–33, 2007.
- 20) Ishihara H, Tanaka I, Yakumar H, Tanaka M, Satoh A, Ishiwata A, Yokochi K, Kurematsu A, Ueda J, Shibata T, Hachiya M, Akashi M. Acceleration of regeneration of mucosa in small intestine damaged by ionizing radiation using anabolic steroids. *Radiat Res*, 175: 367–374, 2011.

- 21) Li C, Lu L, Zhang J, Huang S, Xing Y, Zhao M, Zhou D, Li D, Meng A. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates hematopoietic stem cell injury after irradiation. *Cell Biosci*, 5: 65, 2015.
- 22) Kadhim MA, Wright EG. Radiation-induced transmissible chromosomal instability in hematopoietic stem cells. *Adv Space Res*, 22: 587–596, 1998.
- 23) Kashiwakura I, Takahashi K, Takagi K. Application of proteoglycan extracted from the nasal cartilage of salmon heads for ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells derived from human umbilical cord blood. *Glycoconj J*, 24: 251–258, 2007.
- 24) 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*, 52: 293–299, 2011.
- 25) Nagayama H, Misawa K, Tanaka H, Ooi J, Iseki T, Tojo A, Tani K, Yamada Y, Kodo H, Takahashi TA, Yamashita N, Shimazaki S, Asano S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. *Bone Marrow Transplant*, 3: 197–204, 2002.
- 26) Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Tietze-Buerger C, Reufi B, Thiel E, Blau IW. In vitro effects of perifosine, bortezomib and lenalidomide against hematopoietic progenitor cells from healthy donors. *Invest New Drugs*, 30: 1396–403, 2012.
- 27) Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res*, 153: 245–257, 2000.
- 28) Goff JP, Shields DS, Boggs SS, Greenberger JS. Effects of recombinant cytokines on colony formation by irradiated human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Radiat Res*, 147: 61–69, 1997.
- 29) Hérodin F, Grenier N, Drouet M. Revisiting therapeutic strategies in radiation casualties. *Exp Hematol*, 35: 28–33, 2007.
- 30) Kashiwakura I, Inanami O, Abe Y, Satoh K, Takahashi TA, Kuwabara M.

- Regeneration of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis in vitro from X-irradiated human hematopoietic stem cells. *Radiat Res*, 166: 345–351, 2006.
- 31) Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SE. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34⁺CD38⁻ bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood*, 90: 2282–2292, 1997.
- 32) Dybedal I, Yang L, Bryder D, Aastrand-Grundstorm I, Leandersson K, Jacobsen SE. Human reconstituting hematopoietic stem cells up-regulate Fas expression upon active cell cycling but remain resistant to Fas-induced suppression. *Blood*, 102: 118–126, 2003.
- 33) Gewirtz DA, Holt SE, Elmore LW. Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem Pharmacol*, 76: 947–957, 2008.
- 34) Takasaki I, Taniguchi K, Komatsu F, Sasaki A, Andoh T, Nojima H, Shiraki K, Hsu DK, Liu FT, Kato I, Hiraga K, Kuraishi Y. Contribution of spinal galectin-3 to acute herpetic allodynia in mice. *Pain*, 153: 585–592, 2011.
- 35) Furusawa Y, Tabuchi Y, Wada S, Takasaki I, Ohtsuka K, Kondo T. Identification of biological functions and gene networks regulated by heat stress in U937 human lymphoma cells. *Int J Mol Med*, 28: 143–151, 2011.
- 36) Takahashi K, Monzen S, Hayashi N, Kashiwakura I. Correlations of cell surface antigens with individual differences in radiosensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Radiat Res*, 173: 184–190, 2010.
- 37) Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*, 78: 2848–2853, 1991.
- 38) Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in normal human adult bone marrow by novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78: 55–62, 1991.
- 39) Torok-Storb B. Cellular interactions. *Blood*, 72: 373–85, 1988.

- 40) Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34⁺ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 97: 3075–3085, 2001.
- 41) Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 93: 1470–1474, 1996.
- 42) Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M, Papa S. Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Biol Regul Honmeost Agents*, 15: 14–22, 2001.
- 43) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118: 149–161, 2004.
- 44) Yuasa H, Takakura N, Shimomura T, Suenobu S, Yamada T, Nagayama H, Oike Y, Suda T. Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 731–737, 2002.
- 45) Hayashi N, Takahashi K, Abe Y, Kashiwakura I. Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34⁺ cells. *Life Sci*, 84: 598–605, 2009.
- 46) Kashiwakura I, Takahashi TA. Basic fibroblast growth factor-stimulated ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 122: 479–488, 2003.
- 47) Hayashi T, Hayashi I, Shinohara T, Morishita Y, Nagamura H, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Seyama T, Nakachi K. Radiation-induced apoptosis of stem/progenitor cells in human umbilical cord blood is associated with alterations in reactive oxygen and intracellular pH. *Mutat Res*, 556: 83–91, 2004.

- 48) Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, Li H, Meng A, Zhou D. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stresses in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic Biol Med*, 48: 348–356, 2010.
- 49) Gaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal*, 10: 1923–1940, 2008.
- 50) Motoori S, Majima HJ, Ebara M, Kato H, Hirai F, Kakinuma S, Yamaguchi C, Ozawa T, Nagano T, Tsuji H, Saisho H. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. *Cancer Res*, 61: 5382–5388, 2001.
- 51) Epperly MW, Bray JA, Esocobar P, Bigbee WL, Watkins S, Greenberger JS. Overexpression of the human manganese super oxide dismutase (MnSOD) transgene in subclones of murine hematopoietic progenitor cell line 32D cl 3 decreases irradiation-induced apoptosis but dose not alter G2/M or G1/S phase cell cycle arrest. *Radiat Oncol Investig*, 7: 331–342, 1999.
- 52) Thompson JS, Chu Y, Glass J, Tapp AA, Brown SA. The manganese superoxide dismutase mimetic, M40403, protects adult mice from lethal total body irradiation. *Free Radic Res*, 44: 529–540, 2010.
- 53) Yamaguchi M, Kashiwakura I. Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One*, 8: e70503, 2013.
- 54) Iiyama M, Kakihana K, Kurosu T, Miura O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell Signal*, 18: 174–182, 2006.
- 55) Pervaiz S, Taneja R, Ghaffari S. Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells. *Antioxid Redox Signal*, 11: 2777–2789, 2009.
- 56) Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Miyamoto K, Shima H, Ito K, Suda T. Function of oxidative stress in the regulation of

- hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 363; 578–583, 2007.
- 57) Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 110; 3056–6303, 2007.
- 58) Chu K, Teele N, Dewey MW, Albright N, Dewey WC. Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14–3–3sigma and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiat Res*, 162: 270–286, 2004.
- 59) Chiba M, Miura T, Kasai K, Monzen S, Kashiwakura I, Nakamura T. Identification of up-regulated and down-regulated cis-natural antisense transcripts in the human B lymphoblastic cell line IM-9 after X-ray irradiation. *Mol Med Rep*, 5: 1151–1157, 2012.
- 60) Geest CR, Coffey PJ. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol*, 86: 237–250, 2009.
- 61) Arora H, Qureshi R, Park AK, Park WY. Coordinated regulation of ATF2 by miR-26b in γ -irradiated lung cancer cells. *PloS One*, 6: e23802, 2011.
- 62) Lee SH, Bahn JH, Whitlock NC, Baek SJ. Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathway. *Oncogene*, 29: 5182–5192, 2010.
- 63) Donnelly EH, Nemhauser JB, Smith JM, Kazzi ZN, Farfán EB, Chang AS, Naeem SF. Acute radiation syndrome: assessment and management. *South Med J*, 103: 541–546, 2010.
- 64) Rubin P, Casarett GW. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer*, 22: 767–778, 1968.
- 65) Ishimaru T, Hoshino T, Ichimaru M, Okada H, Tomiyasu T. Leukemia in atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1 October 1950–30 September 1966. *Radiation Res*, 45: 216–233, 1971.

- 66) Desai A, Qing Y, Gerson SL. Exonuclease 1 is a critical mediator of survival during DNA double strand break repair in nonquiescent hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell*, 32: 582–593, 2014.
- 67) Chen Y, Ma X, Zhang M, Wang X, Wang C, Wang H, Guo P, Yuan W, Rudolph KL, Zhang Q, Ju Z. Gadd45a regulates hematopoietic stem cell stress response in mice. *Blood*, 123: 851–862, 2014.
- 68) Chen Y, Yang R, Guo P, Ju Z. Gadd45a deletion aggravates hematopoietic stem cell dysfunction in ATM-deficient mice. *Protein Cell*, 1: 80–89, 2014.
- 69) Ishikawa J, Hayashi N, Yamaguchi M, Monzen S, Kashiwakura I. Characteristics of human CD34⁺ cells exposed to ionizing radiation under cytokine-free conditions. *J Radiat Res*, 56: 678–690, 2015.
- 70) Kashiwakura I, Inanami O, Takahashi K, Takahashi TA, Kuwabara M, Takagi Y. Protective effects of thrombopoietin and stem cell factor on X-irradiated CD34⁺ megakaryocytic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. *Radiat Res*, 160: 210–216, 2003.
- 71) Yahata T, Takahashi T, Mugurume Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 118: 2941–2950, 2011.
- 72) Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Bonffoli D, Falzetti F, Tabilio A, Capitano N. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem*, 280: 26467–26476, 2005.
- 73) Chen CT, Hsu SH, Wei YH. Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming. *Biochim Biophys Acta*, 1820: 571–576, 2012.
- 74) Inoue S, Noda S, Kashima K, Nakada K, Hayashi J, Miyoshi H. Mitochondrial respiration defects modulate differentiation but not proliferation of hematopoietic

- stem and progenitor cells. *FEBS Lett*, 584: 3402–3409, 2010.
- 75) Lin CY, Loven J, Rahi PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*, 151: 56–67, 2012.
- 76) Tanaka H, Tamura A, Sekai M, Hamazaki Y, Minato N. Increased c-Myc activity and DNA damage in hematopoietic progenitors precede myeloproliferative disease in Spa-1-deficiency. *Cancer Sci*, 102: 784–791, 2011.
- 77) Chiaguri V, Magnelli L, Cinelli M, Turchetti A, Ruggiero M. Dominant oncogenes, tumor suppressors, and radiosensitivity. *Cell Mol Biol Res*, 41: 161–166, 1995.
- 78) Dorn DC, Kou CA, Png KJ, Moore MA. The effect of cantharidins on leukemic stem cells. *Int J Cancer*, 124: 2186–2199, 2009.
- 79) FitzGerald TJ, Santucci MA, Das I, Kase K, Pierce JH, Greenberger JS. The v-abl, c-fms, v-myc oncogene induces gamma radiation resistance of hematopoietic progenitor cell line 32d cl 3 at clinical low dose rate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21: 1203–1210, 1991.
- 80) Tanaka H, Matsumura I, Itoh K, Hatsuyama A, Shikamura M, Satoh Y, Heike T, Nakahata T, Kanakura Y. HOX decoy peptide enhances the ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34⁺ hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 11: 2592–2602, 2006.
- 81) Tsujiguchi T, Hirouchi T, Monzen S, Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T, Kashiwakura I. Expression analysis of radiation-responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiat Res*, Epub ahead of print.

論文一覧

【主論文】

1. **Ishikawa J**, Hayashi N, Yamaguchi M, Monzen S and Kashiwakura I: Characteristics of human CD34⁺ cells exposed to ionizing radiation under cytokine-free conditions. *Journal of Radiation Research*, 56: 678–690, 2015.

【参考論文】

1. Fukushi Y, Yoshino H, **Ishikawa J**, Sagisaka M, Kashiwakura I and Yoshizawa A: Synthesis and anticancer properties of phenyl benzoate derivatives possessing a terminal hydroxyl group. *Journal of Materials Chemistry B*, 2: 1335–1343, 2014.
2. Fukushi Y, Yoshino H, **Ishikawa J**, Sagisaka M, Kashiwakura I and Yoshizawa A: Effects of liquid crystallinity on anticancer activity of benzoate derivatives possessing a terminal hydroxyl group. *Liquid Crystals*, 41: 1873–1878, 2014.
3. Yamaguchi M, Hirouchi T, Nakano M, Monzen S, Yoshino H, Chiba M, **Ishikawa J**, Nishiyama A, Murakami S, Ito K and Kashiwakura I: Long-lasting radioprotective effects of a combination of pharmaceutical drugs on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation. *Radiation Emergency Medicine*, 3: 50–55, 2014.
4. 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*, 49: 127–140, 2014.
5. Hirouchi T, Ito K, Nakano M, Monzen S, Yoshino H, Chiba M, Hazawa M, Nakano A, **Ishikawa J**, Yamaguchi M, Tanaka K and Kashiwakura I: Mitigative effects of a combination of multiple pharmaceutical drugs on the survival of mice

- exposed to lethal ionizing radiation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17: 190–199, 2015.
6. Murakami S, Yoshino H, **Ishikawa J**, Yamaguchi M, Tsujiguchi T, Nishiyama A, Yokoyama K and Kashiwakura I: Effects of ionizing radiation on differentiation of murine bone marrow cells into mast cells. *Journal of Radiation Research*, 56: 865–871, 2015.
 7. Tsujiguchi T, Hirouchi T, Monzen S, Tanuchi Y, Takasaki I, Kondo T, Kashiwakura I: Expression analysis of radiation-responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Journal of Radiation Research*, 57: 35–43, 2015.

Abstract

The kinetics alteration of human hematopoietic stem/progenitor cells exposed to ionizing radiation.

Junya Ishikawa.

Department of Radiological Life Sciences,
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences.

Hematopoietic stem cells can self-renew and differentiate into all hematopoietic lineages throughout the lifetime of an organism. Since their high proliferative potential, these cells have a highly sensitivity to exposure to extracellular oxidative stress, such as radiation and chemotherapeutic agents. In this study, to clarify the effects of radiation on hematopoietic stem/progenitor cells, we investigated the kinetics alteration of human hematopoietic stem/progenitor cells exposed to ionizing radiation under cytokine-present or -free conditions.

Chapter 1: Characteristic of human CD34⁺ cells exposed to ionizing radiation in cytokine-free conditions.

To clarify the mechanisms underlying radiation-induced hematopoietic stem cell death, we investigated the effects of excessive ionizing radiation on the clonogenic potential of CD34⁺ cells obtained from human umbilical cord blood under cytokine-free conditions. The CD34⁺ cells were X-irradiated (up-to 2 Gy) and were

cultured for 0–48 h under cytokine-free conditions. At 12 h after X-irradiation, the number of viable cells had decreased to approximately 70%–80%, whereas the clonogenic potential in the X-irradiated cells decreased to approximately 50%–60% compared with the 0-h non-irradiated control. Furthermore, significant generation of mitochondrial superoxide was observed at 6 h, and reached a maximum value between 12 h to 24 h after X-irradiation. However, no significant differences were observed between non-irradiated and X-irradiated cells in terms of the generation of reactive oxygen species or in the intracellular mitochondrial contents. In addition, a cDNA microarray analysis showed that the majority of the altered genes in the CD34⁺ cells at 6 h after X-irradiation were apoptosis-related genes, such as *CDKN1A*. These results indicate that hematopoietic stem/progenitor cells exposed to ionizing radiation are sharply decreased clonogenic potential, and suggest possibility that the elimination of the clonogenic potentials involves the generation of mitochondrial superoxide and p21 expression induced by ionizing radiation under cytokine-free conditions.

Chapter 2: Expression analysis of radiation-responsive genes in human

hematopoietic stem/progenitor cells.

To clarify the nature of genes that contribute to the radiosensitivity of human hematopoietic stem/progenitor cells, we analyzed the gene expression profiles detected

in these cells irradiated with 2 Gy X-rays after culture with or without cytokines. Highly purified CD34⁺ cells from human placental/umbilical cord blood were exposed to 2 Gy X-irradiation and treated in serum-free medium under five different conditions for 6 h. The gene expression levels were analyzed by cDNA microarray, and then the network of responsive genes was investigated. And we found that the expression of the *MYC* oncogene increased after X-irradiation. In fact, the activation of *MYC* was observed immediately after X-irradiation, and was the only gene still showing activation at 6 h after irradiation. Furthermore, *MYC* had a significant impact on the biological response, particularly on the tumorigenesis of cells and the cell cycle control. *MYC* activation due to irradiation was suppressed by culturing the CD34⁺ cells with combinations of cytokines which exerted radioprotective effects. Our results suggest that *MYC* was strongly associated with the radiosensitivity of hematopoietic stem/progenitor cells.

Conclusion:

These results indicate that hematopoietic stem/progenitor cells exposed to ionizing radiation are sharply decreased clonogenic potential under cytokine-free condition, and suggest that *MYC* was strongly associated with the radiosensitivity of hematopoietic stem/progenitor cells.