

細則様式第 1 - 2 号

学位請求論文の内容の要旨

領 域	医療生命科学	分 野	放射線生命科学
氏 名	石川 純也		
(論文題目)	電離放射線による造血幹/前駆細胞の細胞動態の変化		
主 査	細川 洋一郎		
副 査	敦賀 英知		
副 査	井瀧 千恵子		
副 査	柏倉 幾郎		
【背景】	<p>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。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。これまでにニッチ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。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と考えられている。このように、造血幹細胞の生存、増殖、分化には、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。</p> <p>電離放射線は酸化ストレスの一種であり、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。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。これらの要因は主に、各組織における生体幹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。しかしながら、造血幹/前駆細胞への電離放射線の影響は、未だ不明な点が多い。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、電離放射線による細胞死とクローン増殖能喪失メカニズムに焦点を当てる必要がある。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。</p>		

(注) 論文題目が外国語の場合は、和訳を付すこと。

【細則様式第1 - 2号続き】

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、サイトカインが微量に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ような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」を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等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、細胞死に比ベ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。

【細則様式第 1 - 2 号続き】

【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。これらに共通する遺伝子として、MYCがん遺伝子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。

【まとめ】

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、細胞死に比べクロン増殖能が急速に低下する事が明らかとなった。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。

【細則様式第 1 - 2 号続き】

学位論文のもととなる研究成果としての筆頭著者原著

論文題目	Characteristics of human CD34 ⁺ cells exposed to ionizing radiation under cytokine-free conditions.
著者名	Junya Ishikawa, Naoki Hayashi, Masaru Yamaguchi, Satoru Monzen, and Ikuo Kashiwakura
掲載学術誌名	Journal of Radiation Research
巻, 号, 項	56, 4, 678-690
掲載年月日	2015 年 4 月 15 日