

細則様式第 1 - 2 号

学位請求論文の内容の要旨

領 域	医療生命科学領域	分 野	放射線生命科学分野
氏 名	山口 平		
(論文題目) ヒト造血幹/前駆細胞の放射線応答におけるミトコンドリア機能及び遺伝子の関与			
主 査	中村 敏也		
副 査	三浦 富智		
副 査	工藤 せい子		
副 査	柏倉 幾郎		
<p><b>【背景】</b></p> <p>造血幹細胞は、数日から数十日しか機能しない成熟血球を生涯に渡って産生し続ける生体の恒常性維持に必須の細胞である。その高い増殖能と未分化性のため、造血幹細胞は放射線などの酸化ストレスに対して高い感受性を示す細胞であるとされている。しかしながらヒト造血幹細胞は生体内に極めて少数しか存在しないため、その採取や分離精製及び培養評価等には困難を伴い、造血幹細胞の放射線感受性に関する詳細は不明な点が多い。これまでの報告で、造血幹細胞は造血幹細胞ニッチにおいて静止期で存在し、自己の幹細胞特性を維持するためミトコンドリアを脱共役させ細胞老化に繋がる活性酸素種(ROS)産生を抑制しており、実際に成熟機能細胞と比べミトコンドリア含有量は少ない。一方、分化/増殖過程では、ミトコンドリア生合成及び酸化的リン酸化が促進し、生理的レベルの細胞内ROSが造血サイトカインと共に内因性の分化/増殖シグナルとなるため、ミトコンドリア生合成と同時に幹細胞特性が喪失する現象が起こる。造血幹細胞の幹細胞特性の維持や分化の進行におけるミトコンドリアの重要性は近年明らかにされつつあるが、その造血幹細胞の分化/増殖過程に及ぼす電離放射線の影響と細胞内ミトコンドリアの関連性についての多くは不明のままである。福島原発事故後、放射線の生物影響研究の重要性が様々な分野で求められており、広島・長崎の被ばく者やチェルノブイリ事故での被災住民の白血病発症では放射線の寄与が高い事からも、とりわけヒト造血幹細胞に対する放射線の影響研究は将来の発が</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】

スク評価にも直結するため極めて重要な課題である。

本研究では、ヒト胎盤/臍帯血由来CD34陽性造血幹/前駆細胞の分化/増殖過程における放射線応答と、ROSやミトコンドリア機能との関連性について評価した。なお、本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て研究を行った。

【実験方法】

母親からインフォームド・コンセントが得られた正期産・正常妊娠分娩のヒト臍帯血からCD34陽性造血幹/前駆細胞を磁気ビーズ法にて高純度に分離精製後（純度90~95%）、実験使用時まで凍結保存した。実験では、解凍細胞を無血清培地に懸濁し、0~7 GyのX線(150 kVp, 20 mA, 0.5 mmAl + 0.3 mmCu, 1.0 Gy/min)を照射、遺伝子組換えヒト造血サイトカイン(G-CSF, GM-CSF, EPO, IL-3, SCF)存在下で培養した。その後、経時的に細胞を回収しトリパンブルー色素排除法で細胞生存率を、メチルセルロースコロニー形成法で造血前駆細胞数計測によるクローン増殖能を評価した。また、フローサイトメトリー法により経時的な細胞内ROS産生(過酸化水素, ヒドロキシラジカルなど)とミトコンドリア含有量, スーパーオキシドを測定した。DNA損傷は、二重鎖切断マーカーであるgamma-H2AX発現を指標にして経時的に解析した。また、リアルタイムPCR法によりミトコンドリアDNA (mtDNA), mtDNA転写関連遺伝子, 抗酸化酵素遺伝子の発現を評価した。

【結果及び考察】

放射線ばく露ヒト造血幹/前駆細胞の分化・増殖におけるROSの役割について検討した(第一章)。0~7 Gyまでの放射線を曝露させたCD34陽性造血前駆細胞由来コロニー形成は、2 Gy照射で非照射細胞の約20%、4 Gy照射で約5%に低下した。次に、2 Gy又は4 Gy照射細胞を造血サイトカイン存在下で液体培養したところ、3日及び7日間培養で非照射コントロールに比べて有意な生存細胞数の減少がみとめられた。また、1日、3日及び7日間液体培養した細胞中の前駆細胞数から各時点でのクローン増殖能を評価したところ、X線照射で非照射コントロールよりも有意な減少をみせた。そのうち2 Gy照射細胞中の前駆細胞数は培養時間経過とともに僅かな増加を示した一方、4 Gy照射では細胞中の前駆細胞数は変動がみられなかった。この時各日に回収した細胞内のROS産生について調べたところ、1日及び3日間培養の4 Gy照射細胞で非照射コントロールと比較して有意なROS産生増加が観察された。一方、細胞内ミトコンドリア含有量及びミトコンドリア由来のスーパーオキシド産生には有意な増加は認められな

かった。さらに、DNA二重鎖切断初期応答において二重鎖切断部位にフォーカスを形成するgamma-H2AXの発現を免疫蛍光法で評価したところ、4 Gy照射直後に最も多く確認され培養時間経過とともに減少がみられたが、非照射コントロールのレベルまでは減少せずDNA損傷の残存がみとめられた。X線照射によるCD34陽性造血幹/前駆細胞のクローン増殖能喪失には、DNA損傷及び過剰な細胞内ROS産生の関与が示唆されるが、ミトコンドリアの関与は低い可能性が考えられる。

次に、4 Gyの放射線照射及び造血サイトカイン存在下で3日間液体培養したCD34陽性造血幹/前駆細胞を回収し、mtDNA及びその転写関連遺伝子、抗酸化酵素遺伝子の発現と造血幹/前駆細胞の放射線応答との関連を検討した(第二章)。Table 1に示したよう

にミトコンドリア電子伝達系全体の律速段階となっている複合体1のタンパ

Table 1 mtDNA 及びその転写関連遺伝子、抗酸化酵素遺伝子リスト

ク質をコードするMT-ND1の発現は、4 Gy照射細胞と非照射コントロールで同等のレベルを示した。一方、非照射コントロールと比較して4 Gy照射によってPEO1、APEX2 及びSOD2の発現に統計的有意な増加がみとめられた。PEO1 及びAPEX2はmtDNAのゲノム安定性に関わっており、SOD2はミトコンドリア由来のスーパーオキシドを消去する酵素であるため、放射線ばく露時細胞内のミトコンドリアでは酸化ストレスの抑制、緩和に関連する遺伝子の発現が亢進する可能性が示された。

Gene	Function
<i>MT-ND1</i>	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1
<i>TFB1M</i>	Transcription factor B1
<i>TFB2M</i>	Transcription factor B2
<i>TEFM</i>	Transcription elongation factor
<i>PEO1</i>	DNA helicase
<i>POLG</i>	DNA polymerase
<i>POLRMT</i>	RNA polymerase
<i>OGG1</i>	DNA lyase
<i>APEX1</i>	DNA lyase
<i>APEX2</i>	DNA lyase
<i>FEN1</i>	DNA endonuclease
<i>NUDT1</i>	8-oxo-dGTPase
<i>UNG</i>	DNA glycosilase
<i>MUTYH</i>	DNA glycosilase
<i>TFAM</i>	Transcription factor A
<i>PPRC1</i>	Transcription coactivator
<i>SOD1</i>	Radical scavenger in cytoplasm
<i>SOD2</i>	Radical scavenger in mitochondria

**【結語】**

本研究の結果、放射線ばく露ヒト胎盤/臍帯血由来CD34陽性造血幹/前駆細胞の分化/増殖過程において、ミトコンドリア生合成及びミトコンドリア由来ROSの異常生成は抑制されており、放射線による細胞のDNA損傷及び持続的な細胞内ROSの異常産生が幹細胞機能破綻を引き起こしている可能性が示唆された。

【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	Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells
著者名	Masaru Yamaguchi and Ikuo Kashiwakura
掲載学術誌名	Plos One
巻, 号, 項	8 巻 7 号 7 頂
掲載年月日	2013 年 7 月 25 日