

学位請求論文の内容の要旨

領 域	放射線技術科学領域	分 野	
氏 名	林 直樹		
(論文題目) 生体幹細胞の分化・増殖に対する放射線の影響			
主 査	細川 洋一郎		
副 査	三浦 富智		
副 査	木立 るり子		
副 査	柏倉 幾郎		
<p>生体幹細胞は自己複製能と多分化能を有し, 必要に応じ様々な機能細胞を生み出す. この幹細胞は胚性幹細胞や人工多能性幹 (induced pluripotent stem; iPS) 細胞のような多能性幹細胞と, 造血幹細胞や間葉系幹細胞のような体性幹細胞に大別される. 幹細胞が放射線に曝露されると, 分化・増殖能を失い個体の発生や機能障害, 場合によっては個体の死につながる. 定常状態では, 個体や組織中に含まれる幹細胞は極めて少数であり, その為幹細胞の分化・増殖に対する放射線の影響についての詳細は不十分な点が多い.</p> <p>本研究では, 多能性幹細胞としてマウス iPS 細胞, 体性幹細胞としてヒト臍帯血から分離精製した造血幹細胞の分化・増殖に対する放射線の影響を検討すると共に, ヒト臍帯血より培養誘導した間葉系幹細胞様支持細胞による放射線曝露造血幹細胞の造血回復や未分化維持に対する効果について検討した.</p> <p>【第一章 マウス多能性幹細胞の増殖及び分化に及ぼす電離放射線の影響】</p> <p>多能性幹細胞であるマウス iPS 細胞に 1-7.5 Gy の X 線を曝露させた. その結果, マウス iPS 細胞の D0 及び n 値は <math>1.85 \pm 0.18</math> 及び <math>1.00 \pm 0.13</math> であった. 一方, iPS 細胞と比較して成熟な細胞であるマウス CD34<sup>+</sup>細胞の D0 及び n 値は <math>1.11 \pm 0.55</math> 及び <math>1.00 \pm 0.13</math> であった. また, iPS 細胞からの初期分化形態である胚様体形成を検討したところ, 放射線曝露の有無によって胚様体の形成に影響を示</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】

さなかったが、そのサイズは線量依存的に低下した。また、形成された胚様体の分化は、放射線非曝露 iPS 細胞由来では内胚葉系マーカーである *Afp* の発現が劇的に up regulate したが、放射線曝露 iPS 細胞由来では *Afp* の発現が線量依存的に down regulate した。以上の結果より、マウス iPS 細胞は、造血幹/前駆細胞より放射線感受性が低いことが示された。また、分化能に対する放射線の影響は一様ではなく、内胚葉系への分化が抑制される可能性が示唆された。

【第二章 臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞は放射線曝露ヒト CD34<sup>+</sup>細胞の造血回復を支持する】

未熟な造血幹細胞の増殖及び未分化維持能を支持することが知られている臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞を樹立し、インターロイキン-3 (IL-3)、幹細胞因子 (SCF) 及びスロンボポエチン (TPO) のサイトカインコンビネーション存在下で放射線非曝露及び 2 Gy 曝露造血幹細胞と共培養した結果、骨髓球系前駆細胞数はサイトカインのみでの培養と比較してそれぞれ約 3.5 倍及び 2.5 倍の有意な増加を示した。加えて、未熟な造血幹/前駆細胞である CD34<sup>+</sup> 及び CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> 細胞数も、共培養により放射線曝露細胞は約 6.9 倍及び 6.5 倍の有意な増加を示した。さらに、放射線曝露細胞をサイトカイン刺激前に 16 時間ストローマ細胞と共培養したところ、サイトカイン刺激を同時に行った場合と同等の細胞増殖を示した。また、培養液中のサイトカインを測定した結果、ストローマ細胞は IL-6, IL-9, G-CSF 及び GM-CSF のような、骨髓球系造血細胞の増殖に関係したサイトカインを産生した。以上の結果より、放射線曝露造血幹/前駆細胞からの造血再生に対する間葉系幹細胞様ストローマ細胞の造血支持効果があきらかになり、細胞間接触が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【第三章 凍結ヒト造血幹/前駆細胞の体外増殖における電離放射線の影響】

造血幹/前駆細胞は臨床使用及び実験使用のために凍結し、各機関によって保存されている。そこで、放射線照射や臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細

胞との共培養に対する造血幹/前駆細胞の応答における凍結の影響について検討した．凍結解凍処理後，2 Gy 曝露造血幹/前駆細胞を IL-3，SCF 及び TPO のサイトカインコンビネーションとストローマ非存在下もしくは存在下で培養した．凍結の前後で細胞の表面抗原の発現を測定した結果，未分化な細胞である  $CD34^+/CD38^-$  細胞の割合は凍結前の  $3.4\pm1.1\%$  と比較して，凍結後では  $5.9\pm1.3\%$  と有意に増加した．一方で，造血前駆細胞である  $CD34^+/CD45RA^+$  及び  $CD34^+/CD117^+$  細胞は凍結前の  $16.0\pm5.2\%$  及び  $14.4\pm9.2\%$  と比較して，凍結後では  $9.3\pm3.3\%$  及び  $6.9\pm5.1\%$  と有意に減少した．放射線曝露された凍結細胞の培養において，放射線非曝露細胞の増殖率に対する  $CD34^+$ ， $CD34^+/CD38^-$  及び造血前駆細胞のそれぞれの増殖率は 12.6%，11.8% 及び 14.9% であり，放射線曝露された新鮮な細胞のそれぞれの増殖率 9.9%，9.3% 及び 14.6% より高かった．驚くことに，ストローマ細胞との共培養における造血支持効果が凍結後の放射線曝露造血幹/前駆細胞において確認できなかった．以上の結果より，凍結処理はストローマ細胞の造血支持効果を低下させるが，未熟及び放射線抵抗性造血幹/前駆細胞の割合を増やすことが示された．このように，凍結処理は造血幹/前駆細胞の性質を変化することが示唆された．

本研究から，多能性幹細胞のように非常に未分化な幹細胞では放射線感受性が低く，放射線に対する防御機構が備わっている可能性が示唆された．また，分化能に対する放射線の影響は一様ではなく，内胚葉系組織への分化誘導は抑制されるが，その他の細胞への誘導には影響しないことが示唆された．一方，体性幹細胞である造血幹細胞は放射線曝露した場合も，間葉系幹細胞様ストローマ細胞が構築する造血微小環境での cell to cell 相互作用が大きく影響し，造血幹細胞の放射線損傷が緩和され，その後の増殖能及び未分化維持能力を所有することが示唆された．一方，細胞バンク等で行われる凍結保存により，放射線曝露造血幹細胞の分化・増殖能維持に対する間葉系幹細胞等の作用が低下することが示唆された．本研究の結果から，生体幹細胞の分化・増殖に対する放射線の影響は，未熟や分化の程度に大きく依存し，その修復や再生にはサイトカインを含めた多様な刺激因子を必要とすることが明らかとなった．今後はこうした細胞由来の成熟細胞の機能や将来の発がん等のリスク検証も必要である．

【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	Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34 <sup>+</sup> cells
著 者 名	Hayashi N, Takahashi K, Abe Y, Kashiwakura I
掲載学術誌名	Life Sciences
巻, 号, 項	84, 17-18, 598-605
掲載年月日	2009 Apr

論 文 題 目	The effect of X-irradiation on ex vivo expansion of cryopreserved human hematopoietic stem/progenitor cells
著 者 名	Hayashi N, Takahashi K, Kashiwakura I
掲載学術誌名	Journal of Radiation Research
巻, 号, 項	51, 2, 137-144
掲載年月日	2010 May

論 文 題 目	Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells
著 者 名	Hayashi N, Monzen S, Ito K, Fujioka T, Nakamura Y, Kashiwakura I
掲載学術誌名	Journal of Radiation Research
巻, 号, 項	53, 2, 195-201
掲載年月日	2012 Apr