

7.3.2 低線量率 γ 線連続照射マウスに生じた白血病のゲノム異常と細胞分化

段階の線量率による違い

Dose-Rate Dependent Differences in Genomic Alterations and Cell Differentiation Stages of Murine Leukemias Induced by Continuous Low-Dose-Rate Gamma-Ray Irradiation

廣内 篤久, 田中 聡, 田中 イグナシア III ブラガ, 一戸 一晃, 田中 公夫, 小木曾 洋一
生物影響研究部

Tokuhisa HIROUCHI, Satoshi TANAKA, Braga Ignacia-TANAKA, Kazuaki ICHINOHE,
Kimio TANAKA, Yoichi OGHISO
Department of Radiobiology

Abstract

Continuous γ -ray irradiation at low-dose-rate (LDR) of 20 mGy/22h/day for 400 days highly induced leukemias in mice. However, little is known about the mechanism for development of leukemias induced by LDR-irradiation. In this study, relationships between regional chromosomal copy number aberrations and cell differentiation stages were analyzed in leukemias induced by γ -ray irradiation at three different dose rates. C3H/He Nrs mice were irradiated at LDR (total dose of 8 Gy at 20 mGy/22h/day), medium-dose-rate (MDR: total dose of 4 Gy at 400 mGy/22h/day) and high-dose-rate (HDR: total dose of 3 Gy at 1.0 Gy/min). All leukemias were classified into two groups (one with partial hemizygous deletion on chromosome 2 and the other without any deletion) according to array CGH results. The majority of leukemias from non-irradiated mice (non-irradiated leukemias) and LDR radiation-induced leukemias (LDR leukemias) had no deletions around the qE3 region of chromosome 2 and 30% of MDR radiation-induced leukemias (MDR leukemias) and all of HDR radiation-induced leukemias (HDR leukemias) had partial hemizygous deletion on chromosome 2. Differentiation stages of leukemic cells in the bone marrow and spleen cells analyzed by flowcytometry were highly coincident with presence or absence of chromosome 2. Increase of the common lymphoid progenitor-like cell population was frequently found in leukemias without deletion of chromosome 2. In contrast, leukemias with hemizygous deletion of chromosome 2 showed expansion of the common myeloid progenitor-like cell population. Furthermore, transplantation of 100 leukemic cells isolated from each of 7 cell differentiation stages into a syngeneic mouse revealed that leukemic stem cells of leukemias without chromosome 2 deletions were involved in common lymphoid progenitor cells, showing CD45R/B220^{pos} and Gr-1^{pos} phenotypes, while those of leukemias with partial hemizygous deletion on chromosome 2 were involved in hematopoietic stem cells or common myeloid progenitor-like cells. These findings indicate a possibility that γ -ray irradiation at different dose rates might induce leukemic stem cells with different origins and differentiation stages.

1. 目的

高線量率放射線は、ヒトやマウスの細胞のゲノム DNA に突然変異を誘発し、白血病等の様々な腫瘍が

発生すると考えられている。高線量率放射線によって誘発される DNA 二重鎖切断は、DNA 鎖修復時のエラー等により欠失や転座等の染色体異常を生じる。

これらの DNA 損傷を持った造血細胞は、自己複製能力や細胞分化の異常、さらに、異常な細胞増殖の結果、白血病に特有の貧血や末梢白血球数増加等を引き起こすと考えられている。高線量率放射線誘発マウス急性骨髄性白血病の約 90%の症例では、脾臓や骨髄の白血病細胞に 2 番染色体の片側で約 30Mb の大きな欠失が観察され (Hayata *et al.* 1979)、この領域に含まれる *PU.1* 遺伝子の機能の失活によって白血病が引き起こされると考えられている (Cook *et al.* 2004, Jawad *et al.* 2006)。高線量率放射線と比べ、低線量率放射線照射では単位時間あたりに光子が通過する細胞数が極端に少ないために染色体異常等、ゲノムや DNA の変化はわずかししか検出されないと考えられる。しかし、20 mGy/22h/day の低線量率 γ 線を約 400 日間連続照射したマウスでは、非照射群に比べ、雌雄共に腫瘍死による 100 日程度の有意な寿命短縮が認められるとともに (Tanaka *et al.* 2003)、雄において有意に白血病発症頻度が増加していた (非照射群で 1.4%に対し、20 mGy/22h/day 照射群で 4.8%に上昇) (Tanaka *et al.* 2007)。本調査では、白血病細胞のゲノム異常と細胞分化段階に着目して、低・中線量率 γ 線誘発白血病と高線量率 γ 線誘発白血病を比較することで、低線量率 γ 線による白血病発症機構の特徴を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

高線量率放射線誘発白血病の好発系である C3H/He Nrs 雌雄マウスに、低線量率 (20 mGy/22 h/day; 以下 20 mGy/day と記す) γ 線を約 400 日間連続照射 (集積線量 8 Gy)、あるいは中線量率 (400 mGy/22 h/day; 以下 400 mGy/day と記す) γ 線を 10 日間連続照射 (集積線量 4 Gy) した。また比較のために、C3H/He Nrs 雄マウスに高線量率 (0.9 Gy/min) γ 線を約 3 分間照射 (集積線量 3 Gy) した。照射後、各実験群で白血病を発生したマウスの脾臓と大腿骨から白血病細胞を採取してアレイ CGH 法によってゲノム異常を検出し、また、CD 抗体で特異的細胞表面抗原を標識し細胞分化段階を FACS にて解析した。末梢血のスメア標本をメイ・グリュンワルド・ギムザ染色し、顕微鏡下で白血病の診断を行った。

さらに、白血病細胞が転移している可能性のある心臓、肺、肝臓、腎臓をホルマリン固定後、組織標本を作製して顕微鏡下で病理組織学的検索を行った。

3. 成果の概要

低線量率 (20 mGy/day) 照射群では白血病の発生頻度や発生日数において非照射群と比べて有意な違いは認められなかったが、中線量率 (400 mGy/day) 照射群では発生頻度に差がなかったが、照射開始日から白血病を発症するまでの日数は有意に短くなっていた (Fig. 1)。低線量率 (20 mGy/day) 照射群、中線量率 (400 mGy/day) 照射群の白血病細胞と、非照射群、高線量率 (0.9 Gy/min) 照射群の白血病細胞のゲノム異常をアレイ CGH 法で比較したところ、中線量率照射群では高線量率放射線誘発白血病の特徴である *PU.1* 遺伝子欠損を含む片側 2 番染色体の欠失をもつ白血病が高線量率よりは低いが、約 62% の頻度で観察されたのに対し、低線量率照射群では非照射群と同様に *PU.1* 遺伝子周辺の 2 番染色体の異常は大部分の個体で観察されなかった (低線量率照射群では 30%、非照射群では 12%: Fig. 2)。さらに、CD 抗体を用いて細胞分化段階の解析を行ったところ、高線量率照射群、中線量率照射群において高頻度に認められた 2 番染色体の片側に欠失を持つ白血病細胞は、赤血球やマクロファージ等の起源である骨髄球系共通前駆細胞の割合が増加していたのに対し、2 番染色体欠失を持たない非照射群と低線量率照射群の白血病細胞では T リンパ球や B リンパ球の起源であるリンパ球系共通前駆細胞の割合が増加していた。これらの結果から、低線量率 (20 mGy/day) と中線量率 (400 mGy/day) γ 線連続照射により発生した白血病のゲノム異常と細胞分化段階は異なり、前者は自然発生白血病に類似し、後者は高線量率放射線誘発白血病と共通の特徴を持っていることが示された。また、今回の結果は線量率の違いにより白血病細胞の起源となる細胞の分化段階が異なる可能性を示しており、今後、放射線誘発白血病の詳細な発生機構を調べるための有益な情報になるとと思われる。

引用文献

Cook, W.D. *et al.* (2004) *Blood*. **104**, 3437-3444.
 Hayata, I. *et al.* (1979) *J Natl Cancer Inst.* **63**, 843-848.
 Jawad, M. *et al.* (2006) *Int J Radiat Biol.* **82**, 383-391.

Tanaka, I.B. 3rd *et al.* (2007) *Radiat Res.* **167**, 417-437.
 Tanaka, S. *et al.* (2003) *Radiat Res.* **160**, 376-379.

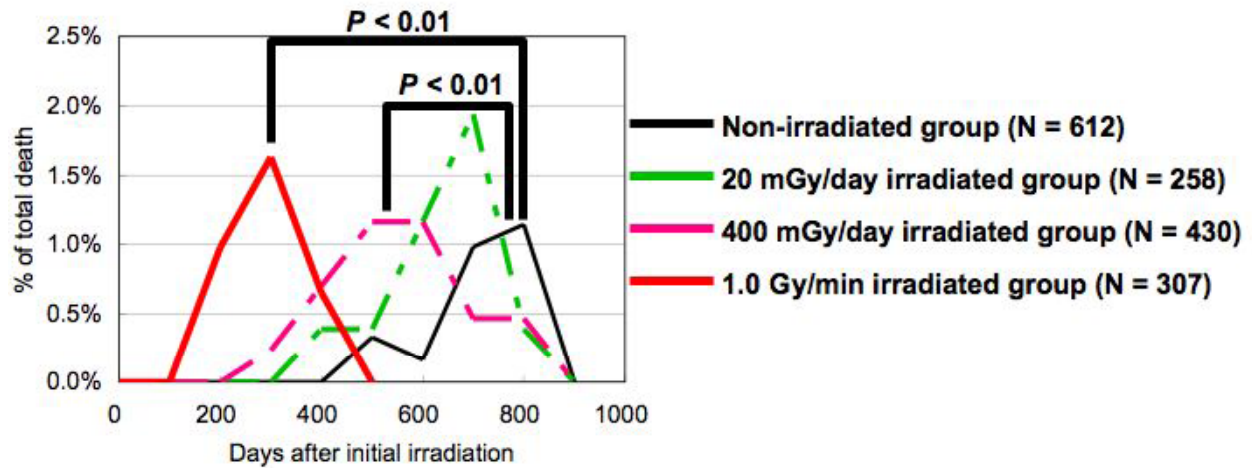


Fig. 1 Comparison of days until onset of leukemias after transplantation of leukemia cells

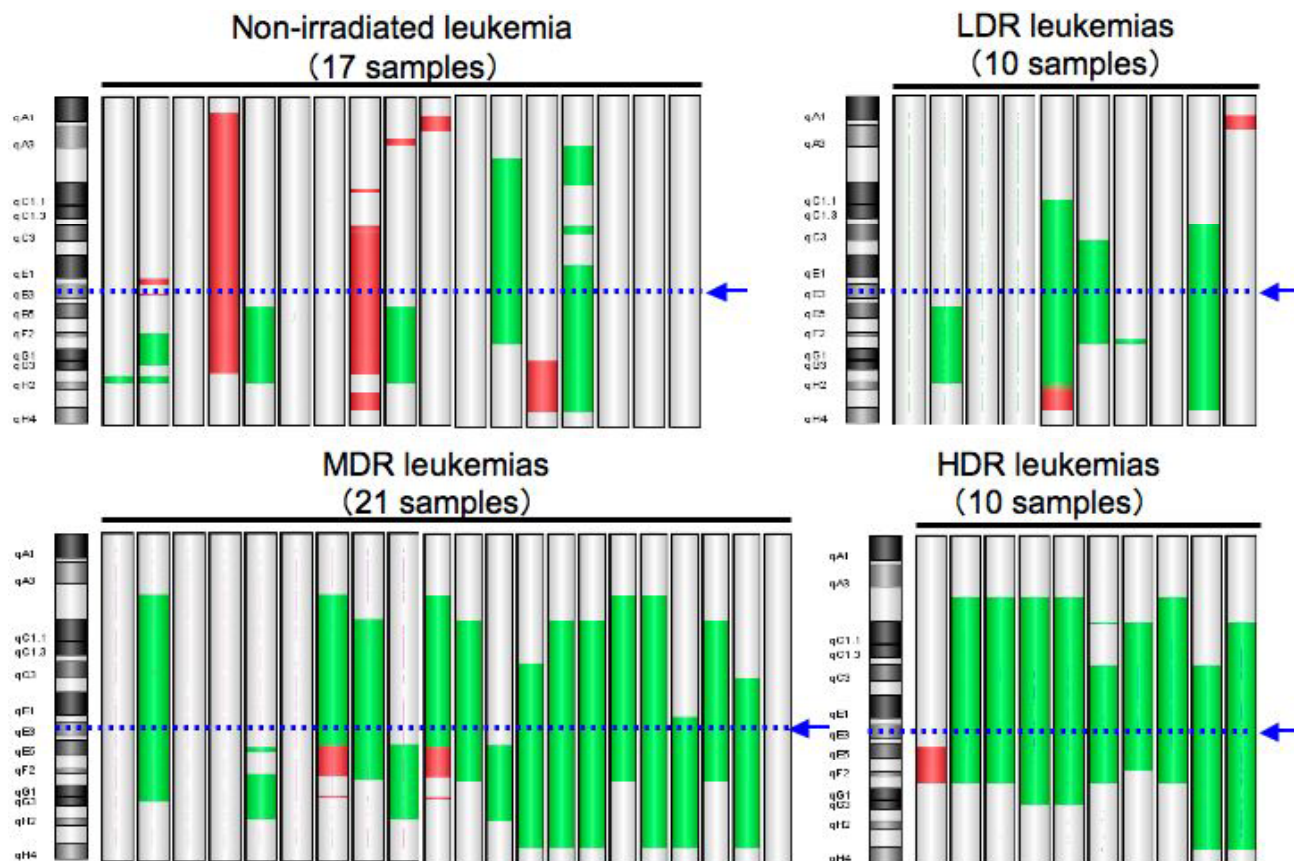


Fig. 2 Chromosomal aberrations among four leukemia groups (Non-irradiated, LDR, MDR and HDR leukemias). Red and green regions on each chromosome showed regions with gain and loss, respectively. Blue dotted lines indicate the region of mapping of the *POU1* locus.