

6.3.3 低線量率 γ 線連続照射マウスの造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

Analysis of Gene Expression Profiles of Hematopoietic Stem Cells of Mice Exposed to Low-dose-rate Gamma-rays

廣内 篤久, 田中 聡, 田中 イグナシヤ, 一戸 一晃, 田中 公夫
生物影響研究部

Tokuhisa HIROUCHI, Satoshi TANAKA, Ignacia TANAKA,
Kazuaki ICHINOHE, Kimio TANAKA
Department of Radiobiology

Abstract

Previous studies showed that continuous exposure to low-dose-rate (LDR) radiation is leukemogenic. We recently showed that hematopoietic stem cells (HSCs) in mice irradiated with LDR (20mGy/day) γ -rays were significantly decreased at day 400 of irradiation when compared with age-matched non-irradiated mice. In this study, we investigated the changes in gene expressions that may be related to the observed decrease in HSCs of mice exposed to LDR radiation. RNA extracted from HSCs of irradiated and non-irradiated mice was subjected to gene expression microarray, and the gene expression profiles were analyzed by bioinformatic methods with Ingenuity Pathway Analysis. We observed that less than 1% of the total analyzed genes were differently expressed in HSCs in LDR-irradiated versus non-irradiated mice. We predicted that bio-functions of “cell viability”, “cell survival”, and “maturation of cells” were promoted in irradiated HSCs. Surprisingly, contrary to high-dose-rate-irradiated HSCs, no bio-function associated with cell death, such as apoptosis, was altered in LDR-irradiated HSCs. These findings suggested that the decreases in HSCs observed in LDR-irradiated mice might be a result of cell differentiation.

1. 目的

これまでの調査によって低線量率放射線の長期照射は高線量率放射線の高線量照射と同様に白血病を誘発するが、両者の白血病幹細胞の特性は異なることが分かった。前年度にはこれらの白血病幹細胞の性質の違いは高線量率放射線と低線量率放射線が造血システムに及ぼす影響の違いから生じていると仮定し、20 mGy/日の γ 線を400日間照射したマウスの造血細胞の血球数を照射開始時から100日おきに比較したところ、照射終了時において、造血幹細胞等と同週齢の非照射群に比べて減少していることが分かった。今年度の調査では、この減少した原因の一端を解明することを目的として、20 mGy/日の γ

線を400日間照射したマウスの造血幹細胞等の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

2. 方法

8週齢のB6C3F1のオスマウスにSPF環境下で20 mGy/日の低線量率 γ 線を照射開始し、総線量が8Gyとなる照射開始後400日まで連続照射を行った。照射終了時（照射開始後400日）に、各4匹の照射マウスと非照射マウスの大腿骨から造血細胞を採取した。採取した造血細胞を細胞表面抗原プロファイルに基づいて、造血幹細胞、多能性前駆細胞、リンパ球系共通前駆細胞、骨髄球系共通前駆細胞に分類してそれぞれの細胞を-80°Cに保存した。これらの細胞

から RNA を抽出し、EPICENTRE 社の TargetAmp 2-round amplification kit により complementary RNA を合成・増幅し、Agilent 社のマイクロアレイによって遺伝子発現プロファイルを作製した。この際、Agilent 社の RNA spike mix を抽出した RNA に混合させることにより、様々な長さの RNA が均一に complementary RNA に合成されていることを確認した。各細胞の遺伝子発現プロファイルの解析作業は、最新の論文を含む膨大な研究情報に基づいて任意の遺伝子プロファイルのアノテーションを行うことができる Ingenuity Systems 社の Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を使用して行った。

3. 成果の概要

前年度、20 mGy/日照射群のマウスでは 400 日間の照射終了時に骨髄中の造血幹細胞、多能性前駆細胞、リンパ球系共通前駆細胞、骨髄球系共通前駆細胞が非照射群に比べて有意に減少していることが確認された。細胞数が減少している原因は、細胞死や細胞増殖の抑制、細胞分化の促進など様々な可能性が考えられるが、これを究明するために照射マウスの造血幹細胞と前駆細胞の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。評価は、同週齢の非照射マウスと比較した際の p 値が小さい全体の約 1% を占める遺

伝子について行った。造血幹細胞については、 $p < 0.15$ の遺伝子群の中で発現比の絶対値が 8.3 倍以上のものについて行った (Fig.1 の青色のサークル)。ここでは、各種細胞の遺伝子発現解析結果のうち、とくに特徴的な結果が得られた造血幹細胞の場合について記載する。

照射群と非照射群の造血幹細胞の遺伝子プロファイルと比較することにより、低線量率 γ 線の 400 日照射によって造血幹細胞に生じていることが予測される性質の変化を抽出した (Table 1)。その結果、照射群の造血幹細胞では生存率 (cell viability、cell survival) と共に分化 (maturation of cells) が促進されていることが示唆された。すなわち、低線量率放射線を長期連続照射された造血幹細胞は、高線量率の場合のような細胞死によるアポトーシスではなく細胞分化によって細胞数が減少していることが示唆された。

平成 25 年度には、今回の照射 400 日目の造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルによって示唆された細胞分化の促進が、それ以前の照射 200 日目や 300 日目、また 400 日の照射終了後に非照射区域でさらに 100 日間飼育した際にも観察されるかを確認する。

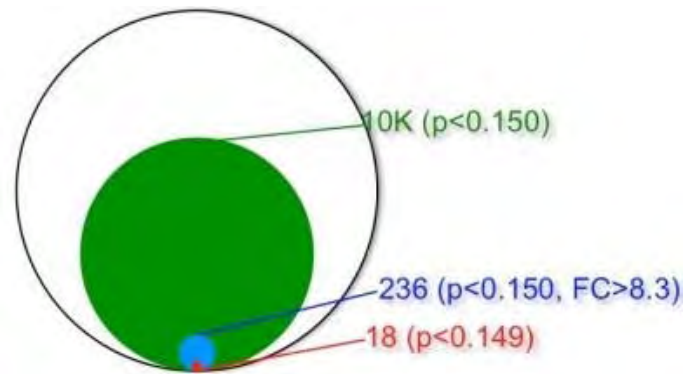


Fig. 1 Extraction of genes in non-irradiated and irradiated mice that were differently expressed in hematopoietic stem cells

Table 1 Bio-functions predicted to be altered in irradiated hematopoietic stem cells

Predicted Activation State	Functions Annotation	Category
Increased	cell survival	Cell Death and Survival
	survival of organism	Organismal Survival
	cell viability	Cell Death and Survival
	maturation of cells	Cellular Development
	quantity of tumor	Cancer
	cell viability of tumor cell lines	Cell Death and Survival
Decreased	apoptosis of cancer cells	Cell Death and Survival, Tumor Morphology
	Bleeding malformation	Organismal Injury and Abnormalities
	activation of leukocytes	Developmental Disorder
	activation of lymphocytes	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking, Inflammatory Response
	activation of lymphocytes	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking, Inflammatory Response
	organismal death	Organismal Survival