

2.3.1.2 低・中・高線量率放射線がマウスの骨髄の造血環境に及ぼす影響

Effects of Low, Medium, and High Dose-rate Whole Body Irradiation on Hematopoietic Environment in Murine Bone Marrow

廣内 篤久, 田中 聡, 田中 イグナシヤ, 小村 潤一郎
生物影響研究部

Tokuhisa HIROUCHI, Satoshi TANAKA, Ignacia TANAKA, Jun-ichiro KOMURA
Department of Radiobiology

Abstract

It is known that hematopoiesis in the bone marrow and spleen is highly sensitive to radiation. Our previous study showed that whole body low dose-rate (LDR) radiation exposure resulted in a decrease in the number of hematopoietic stem cells (HSCs). In vivo, HSCs in the bone marrow are surrounded by a microenvironment (a hematopoietic niche) that is composed of various cells controlling the balance between self-renewal and differentiation of HSCs. Although there are a few studies on alterations in the hematopoietic niche, gene expression analysis has suggested that the decrease in the number of HSCs after LDR irradiation is associated with alteration of biomolecules that control the cell cycle and differentiation of HSCs, such as cytokines and hormones. This study aims at clarifying the effect of LDR irradiation on the hematopoietic niche. We exposed eight-week-old male C3H/HeN mice to gamma-rays at low (LDR: 20 mGy/day), medium (MDR: 400 mGy/day) and high (HDR: 770 mGy/min) dose-rates, and collected the bone marrow at pre-determined intervals for examination. Sections of fresh bone marrow tissue from the femur and humeri were prepared following Kawamoto's method and stained with hematoxylin and eosin. Compared to age-matched non-irradiated controls, bone marrow exposed to MDR of 400 mGy/day showed a decrease in bone marrow cell counts at day 1 (dose received = 400 mGy), but on day 10 (dose received = 4000 mGy), the bone marrow cell counts were not significantly different from the non-irradiated control. No significant difference in bone marrow cell counts was observed at day 20 (dose received = 8000 mGy), day 35 (15 days post-irradiation, dose received = 8000 Gy) and day 50 (30 days post-irradiation, dose received = 8000 Gy). We also found no change in both HDR at 5000 mGy and LDR at 2000 mGy (day 100). We are now analyzing compositional and qualitative changes in bone marrow cells using fluorescent antibody immunostaining. Furthermore, we have started an ex vivo HSC culture to study the function of extracellular biomolecules that was predicted by the gene expression analysis.

1. 目的

造血ニッチは造血幹細胞に特異的な周辺環境であり、様々な細胞や液性因子、酸素分圧・活性酸素によって造血幹細胞の分裂や分化を制御している。高線量率高線量放射線照射は、骨髄内の脂肪細胞増加や血管周辺酸素分圧の上昇を誘発し、造血ニッチに変化を及ぼす。これは、白血病幹細胞の発生要因

の一つである造血幹細胞の複製ストレスの一因となっている可能性がある。これまでの調査では、マウスへの低線量率(20 mGy/日)放射線の400日間連続照射によって、造血幹細胞が減少し、その減少した造血幹細胞の中に白血病幹細胞となる細胞があって、白血病の発症に至ることを明らかにした。また、造血幹細胞の遺伝子発現解析結果から、低線量率放

射線による造血幹細胞の減少は造血ニッチからのシグナルに起因する可能性が示唆された。そこで、本研究では、低線量率放射線によって生じる造血ニッチの変化が白血病の誘発に及ぼす影響を明らかにすることを最終的な目的とし、低線量率放射線照射による造血ニッチの変化とその変化が及ぼす造血幹細胞への影響について、20 mGy/日の低線量率放射線長期照射と中・高線量率放射線照射との違いを明らかにすることを目標とする。

2. 方法

8週齢のSPF C3H/HeN Jclマウスを用い、高線量率照射群（750 mGy/分の γ 線を5000 mGy照射）、中線量率照射群（400 mGy/日の γ 線を連続照射）、低線量率照射群（20 mGy/日の γ 線を連続照射）の3照射群及び非照射群を作成した。中線量率照射群は20日間照射、低線量率照射群は100日間照射した後非照射区域で飼育した。実験スケジュールに従って摘出した大腿骨と上腕骨の薄切片を川本法によって作成した。作成した薄切片はヘマトキシリン・エオジンで染色し、光学顕微鏡で観察・撮影した。また、大腿骨薄切片の多重蛍光染色には、電子レンジの低出力超短波を利用した短時間染色法を用いた。

培養造血幹細胞を用いた実験のために、C3H/Heマウスの骨髄から造血幹細胞を分離し、*ex vivo*での培養を行った。Lympholyte®（CEDARLANE社）を用いた密度勾配遠心分離法によって骨髄に含まれる赤血球を除去し、Lineage Cell ディブリーションキット（Miltenyi社）を用いたMACSによって成熟した血球を除去し、さらにFACS Aria IIu（BD社）に

よって造血幹細胞を単離した。これをhuman LDL、BIT9500、SCF、TPO、Flt-3Lを加えたStemSpan SFEM II培養液（Stemcell Technologies社）とPreset VECCELL™（VECELL社）を用いて培養した。

3. 成果の概要

高線量率放射線高線量照射では骨髄細胞数の減少や脂肪化など変化が生じることが報告されており、我々が予備的に実施したCV環境での高線量率放射線5,000 mGy照射マウスにおいても、照射後4日目と11日目に骨髄細胞数の減少が確認された。しかし、SPF区域内で行った本実験では、骨髄細胞数減少が観察された個体は少数であり、さらにその症状は個体差が大きかった。中線量率照射群においては高線量率照射群に比べて影響が少なく、最も顕著な影響が観察されたのは照射開始1日後であった（Fig. 1）。

造血幹細胞の変化には周辺細胞が関与している。そこで、本実験では複数種類の蛍光色素を用い、造血幹細胞と造血ニッチ細胞の分別・観察を行った。その結果、造血幹細胞の多くが血管に隣接して位置していることが確認された（Fig. 2）。

造血ニッチの細胞による造血幹細胞の制御において細胞外因子は重要な役割を有する。そこで、放射線照射による細胞外因子の影響を高感度で検出するために、造血幹細胞の体外培養を実施した。密度勾配遠心分離法、MACS及びFACSとの組み合わせにより分離・濃縮した骨髄幹細胞を、生体中の造血幹細胞の足場を模した構造体である多孔質膜メッシュ（VECELL社）に播種し培養を行った（Fig. 3）。現在、この培養細胞を用いた照射実験を行っている。

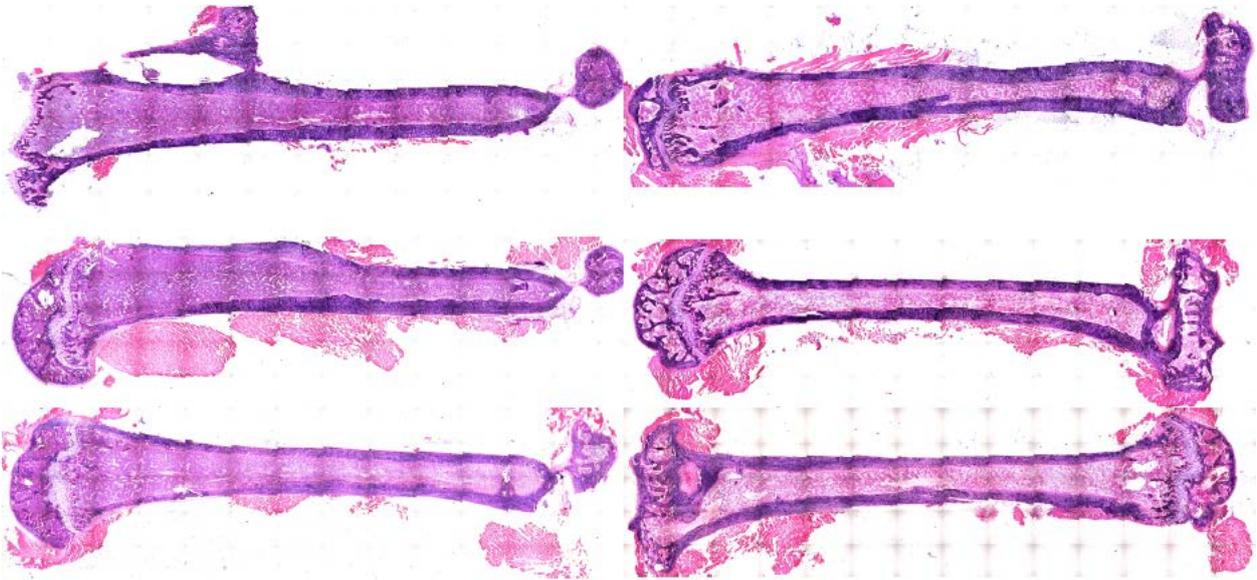


Fig. 1 Fresh frozen tissue sections of the bone marrow (H&E Stain). Photos on the left are from non-irradiated mice, while those on the right are from mice exposed to MDR of 400 mGy/day after 1 day.

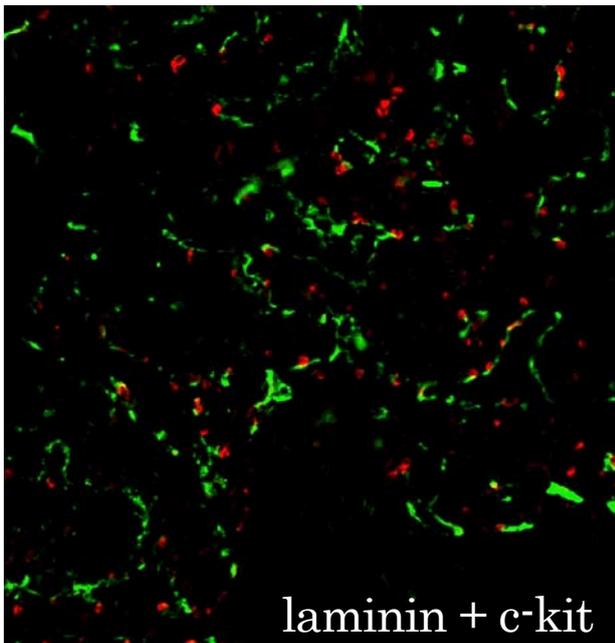


Fig. 2 Fluorescent immunohistochemical staining showing blood vessels (laminin^{pos}: green) and hematopoietic stem cells (c-kit^{pos}: red)

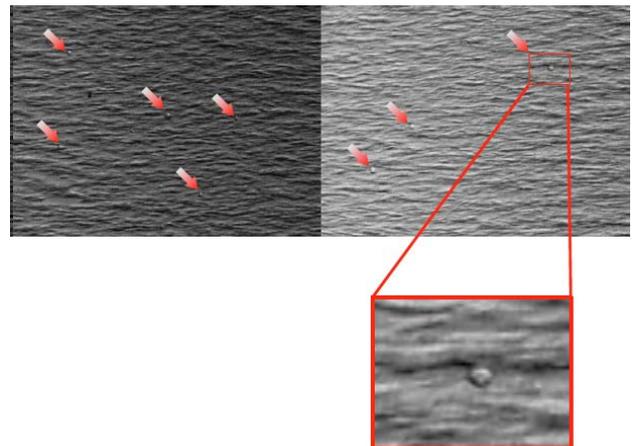


Fig. 3 Cultured hematopoietic stem cells (arrows) in Preset VECELL™.