

## 2.4.1.2 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, 齋藤 幹男, 田中 聡, 小村 潤一郎  
生物影響研究部

Tokuhisa HIROUCHI, Mikio SAITOU, Satoshi TANAKA, Jun-ichiro KOMURA  
*Department of Radiobiology*

#### Abstract

The hematopoietic stem cell (HSC) niche is the microenvironment essential for hematopoiesis in the bone marrow. While it is known that radiation exposure induces hematopoietic injury, there are few reports on its effects on the HSC niche, particularly the effects of low dose-rate (LDR) radiation. Chronic radiation exposure at a low dose-rate of 20 mGy/day has been shown to be leukemogenic, but its effect on the HSC niche in the bone marrow is unknown. We compared the effects of high-dose-rate (HDR), middle-dose-rate (MDR) and LDR radiation in the bone marrow, using both *in vivo* and *ex vivo* experimental approaches.

*In vivo* analyses focused on bone marrow cellularity (ratio of hematopoietic (non-fat) tissues) and blood vessels. The bone marrow from the femurs of 8-week-old C3H males exposed at the dose-rates of 750 mGy/min (acute HDR), 400 mGy/day (chronic MDR) and 20 mGy/day (chronic LDR) were histologically analyzed. Decreased cellularity was noticed at 10 days after the HDR exposure (total dose: 8000 mGy) and at 50 days after the beginning of the MDR exposure (total dose: 20000 mGy). At lower total doses or at earlier time points, the disintegration of basement membranes of venous sinuses, but not decreased cellularity, was observed. So far, we have not detected any effects of the LDR exposure.

*Ex vivo* cultures of HSCs, isolated from 16-week-old C3H males and exposed at 870 mGy/min (acute HDR) to a total dose of 4290 mGy or at 359 mGy/day (chronic MDR) to a total dose of 4667 mGy, showed lower cell counts after 20 days in culture. Thus, isolated HSCs might be more radiosensitive than *in vivo* HSCs in the niche.

These results suggest that radiation exposure could alter the hematopoietic microenvironment and that these alterations could influence the fate of HSCs in the bone marrow.

#### 1. 目的

骨髄の造血環境（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と考えられている。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から白血病幹細胞に変異するものが生じることで、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、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

本解析は、低・中・高線量率放射線の影響をマウスの骨髄を対象とする *In vivo* (生体内) と、マウスから取り出した造血幹細胞を用いた *Ex vivo* (生体外) の2つの側面から行った。*In vivo* 解析には、8週齢の SPF C3H/HeN Jcl マウスを用い、高線量率照射2群 (750 mGy/分の $\gamma$ 線を5000 mGy ないし 8000 mGy 照射)、中線量率照射2群 (400 mGy/日の $\gamma$ 線を20日間連続照射ないし終生連続照射)、低線量率照射群 (20 mGy/日の $\gamma$ 線を連続照射) の5照射群及び非照射群を作成した。高線量率照射群および中線量率20日間連続照射群は、照射後に非照射区域で飼育した。照射開始後、実験スケジュールに従って定期的に大腿骨と上腕骨を摘出し、川本法による薄切片作成を行った。薄切片はヘマトキシリン・エオジン染色、Oil Red O 染色 (脂肪細胞の染色)、Laminin-DyLight488 抗体染色 (血管を検出) を施し、画像解析を行った。

*Ex vivo* 解析には、16週齢の SPF C3H/HeN Jcl マウスを用い、骨髄から造血幹細胞を分取・培養し、*Ex vivo* (生体外) で高 (870 mGy/分)・中線量率 (359 mGy/日) 照射を行った。培養開始20日後に培養液中の細胞を蛍光抗体で標識し、FACS Aria IIu により増殖率

及び細胞構成割合等を解析した。

## 3. 成果の概要

*In vivo* 解析 (Table 1) において、高線量率放射線と中線量率放射線照射群では、骨髄細胞数が総線量に比例して減少することが観察されたが、低線量率放射線照射群では総線量 8000 mGy まで顕著な影響が見られなかった。また、高線量放射線照射により骨髄細胞が減少した骨髄内には、これまで報告されているような脂肪細胞の増加は認められなかった。血管への影響については、高・中線量率放射線照射群の総線量が高い群で血管基底膜の断裂が観察され、骨髄細胞の減少に比べて低い総線量から影響が認められた。低線量率放射線に関しては、総線量 2000 mGy において影響は認められなかった (4000 mGy と 8000 mGy に関しては次年度解析予定)。

*Ex vivo* 解析では、改良した造血幹細胞培養法により、放射線照射の長期影響を観察した。中・高線量率放射線照射群では、両線量率照射群共に総線量に比例した造血幹細胞の増殖抑制が認められ、中線量率放射線の総線量 4667 mGy 及び高線量率放射線の総線量 4290 mGy 以上の照射群では殆ど増殖しなかった (Fig. 1)。総線量 2154 mGy 以下の照射群では、造血幹細胞、休止期造血幹細胞及びミエロ-リンフォイド系共通前駆細胞の占める割合が高く、中線量率放射線の 1077 mGy 照射群においては造血幹細胞とミエロ-リンフォイド系共通前駆細胞数が非照射群と同等かそれ以上であった。低線量率放射線に関しては、現在解析中である。

Table 1 *In vivo* analyses of femoral bone marrow

	750 mGy/min acute irradiation (5000 mGy)	750 mGy/min acute irradiation (8000 mGy)	400 mGy/day chronic irradiation	20 mGy/day chronic irradiation
Decreased cellularity	no change	From day 10 post-irradiation	From day 50 of radiation exposure	no change
Disintegration of basement membranes of venous sinuses	From day 15 post-irradiation	From day 1 post-irradiation	From day 1 of radiation exposure	no change

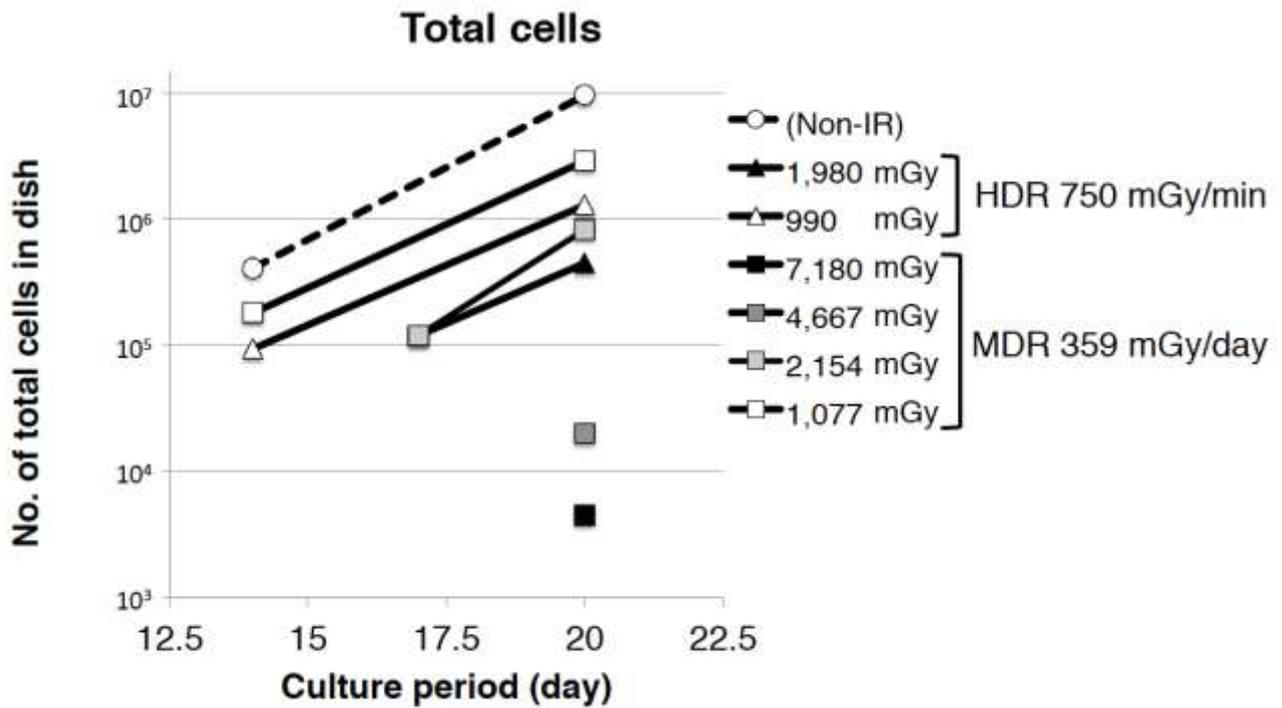


Fig. 1 Cell counts of HSCs cultured for 20 days *ex vivo* after exposure to acute HDR [870 mGy/min; total doses = to 990 (△) and 1980 mGy (▲)] or chronic MDR [359 mGy/day; total doses = 1077 (□), 2154 (■), 4667 (■) and 7180 mGy (■)] radiation compared to the non-irradiated control (○).