

2.3 低線量率放射線に対する生理応答影響実験調査（第2期）

2.3.2 低線量率放射線が血管系に及ぼす影響

Analyzing Effects of Low Dose-Rate Radiation on Endothelial Cells Regulating Hematopoietic Stem Cell Maintenance

廣内 篤久, 田中 聡, 小村 潤一郎
生物影響研究部

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

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSCs) are surrounded by blood vessels in the bone marrow. Endothelial cells in arteries and sinusoids play an important role in regulating HSC behaviors. Sinusoidal endothelial cells (SECs) anchor HSCs in vascular niches, and arterial endothelial cells (AECs) secrete stem cell factors (SCFs) and Cxcl12 that promote self-renewal of HSCs. These endothelial cells were sensitive to a lethal dose of high dose-rate radiation, resulting in rupture and hemorrhage. The sensitivity of SECs and AECs to low dose-rate (LDR) radiation is unknown. Previously, we showed that ex vivo HSCs isolated from the bone marrow were highly sensitive to 20 mGy/day of LDR radiation as compared to in vivo HSCs irradiated in the bone marrow. Results suggest that the microenvironment surrounding HSCs, such as the SECs and AECs may attenuate the antiproliferative effects of LDR radiation on HSCs. Since the sensitivity of AECs and SECs and their response to LDR radiation has not been investigated, the object of this study is to clarify roles of AECs and SECs on maintenance of HSCs during and after irradiation, as well as the possible contribution of the irradiated AECs and SECs towards the transformation of HSCs into leukemic stem cells.

1. 目的

骨髄内の血管は造血幹細胞の周辺環境を構築し、造血幹細胞の増殖、休止、分化、移動を制御する。20 mGy/日の低線量率放射線は、長期照射によりマウスの造血幹細胞の増殖を抑制するが、骨髄内血管への影響は明らかになっていない。一方、亜致死線量及び致死線量の高線量率放射線は骨髄内血管を断裂させ、造血幹細胞の周辺環境を破壊し、造血幹細胞の減少につながると考えられている。低線量率放射線については、これまでの調査によって総線量8Gyまで血管断裂は見られないが、造血幹細胞を体外に出して周辺環境から切り離した環境（Ex vivo環境）での0.4Gy照射は体内に比べて感受性が高く、前述の総線量8Gy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結果は細胞外因子によって増

殖が抑制されている可能性が示された。つまり、低線量率放射線照射中の造血幹細胞周辺環境の形態的变化は小さいが、総線量などに応じて造血幹細胞を維持するために機能していると考えられる。骨髄内血管の血管内皮細胞は、造血幹細胞周辺環境の足場となる洞様毛細血管内皮細胞（Sinusoidal Endothelial Cell: SEC）と造血幹細胞増殖因子を分泌する細動脈内皮細胞（Arteriole Endothelial Cell: AEC）があり、造血幹細胞の維持にとって重要である。本研究は、低線量率放射線が骨髄内血管内皮細胞に着目して、SECとAECが照射中の造血幹細胞の維持のために果たしている役割を明らかにすることを目標とし、同時に造血幹細胞の白血病幹細胞化への寄与を考察する。

2. 方法

フローサイトメーターによる骨髓中のAEC、SECなどの細胞数測定を検討した。自家繁殖の158～160日齢のSPF C3H/He Nrsオスマウスにと殺前にPDPN-PerCP/Cy5.5蛍光抗体3 µgを尾静脈より注射し、10分間放置した。イソフルラン麻酔による安楽死の後に上腕骨と大腿骨を採取し、骨髓の吹き出し、吹き出し後サンプルの鉗子、メス、乳鉢による破碎を行った。これにcollagenase IVとdisperse IIを同時に処理し、Pharm Lyse溶液 (BD社) による溶血処理を行った。得られた細胞に含まれる死細胞はFVS780 (BD社) で標識して除外した。これに蛍光抗体を反応させた後、Cellotion (Zenoaq社) で洗浄し、FACS Aria Fusion (BD社) で解析した。

骨髓内血管内皮細胞と造血幹細胞の共培養系の対照実験として、ポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol: PVA) を用いた造血幹細胞の単独培養を検討した。140～190日齢のSPF C3H/He Nrsオスマウスの上腕骨と大腿骨の骨髓細胞をDMEM培地に吹き出し、Direct lineage cell depletion kit (Miltenyi社) を用いた磁気細胞分離 (MACS) 法により成熟した細胞を除去し、FVS780標識により死細胞を除去した。これに蛍光抗体を反応させ、FACS Aria Fusionを用いてlineage^{neg}c-kit^{pos}Sca1^{pos}CD34^{neg}の造血幹細胞を分取した。分取した造血幹細胞をポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol: PVA) と0.1%とBIT 9500 (STEMCELL Technologies社) を20%含むStemSpan SFEM II培地 (STEMCELL Technologies社) にhuman LDL (STEMCELL Technologies社)、SCF、TPO、Flt-3L (R & D社) をそれぞれ25 µg/ml、100 ng/ml、100 ng/ml、1 ng/mlの終濃度で添加してCO₂インキュベーターで培養した。培地交換は培養開始5日目、それ以降は3日毎に行った。培養後は、Trypan Blue溶液で死細胞を染色し、血球計算盤で生細胞を計数した。

3. 成果の概要

AECとSECの細胞表面抗原プロファイルは共にCD45陰性、TER119陰性、CD31陽性だが、SECはSca1高発現でpodoplanin (PDPN) 陽性、CD54 (ICAM1) 陽性、AECはSca1弱発現でPDPN陰性、ICAM1陰性で判別可能である。AECとSECを含む血管内皮細胞の

起源である血管内皮幹細胞はCD45陰性、TER119陰性はAEC、SECと同じだが、CD157陽性、CD200陽性で分離可能である。フローサイトメーターに用いるモノクローナル蛍光抗体の多くはC57BLマウスの細胞表面抗原との反応を保証しているが、認識部位は抗体産生クローンによって異なる。表1に検討に用いたモノクローナル蛍光抗体を示す。30-F11クローン (CD45)、TER119クローン (TER119)、YN1/1.7.4クローン (CD54抗体) 由来の抗体はC3Hとの良好な反応が確認された。8.1.1クローン (PDPN抗体) とBP-3クローン (CD157抗体) については明確なピークが得られなかった。CD31抗体については、MEC13.3クローンと390クローン由来の抗体を検討し、共に弱陽性細胞が骨髓と脾臓で観察された。僅かではあるがMEC13.3の方が蛍光強度が高かったので幾分反応性が良いと考えられる。Sca-1抗体は従来から使用しているD7クローン由来のものを使用したが、強陽性細胞が観察されなかった。AECとSECについては特定が極めて困難であった。一方、血管内皮幹細胞は骨髓と脾臓で明確な陽性細胞が認められた。AECとSECを判別についてはCD31抗体、Sca1抗体、CD54抗体、PDPN抗体のクローンを変え、CD62E (E-selectin) 抗体を加えて引き続き検討を行い、B6C3F1マウスに対する反応性の調査も併せて行う。

造血幹細胞ニッチ機能解析では造血幹細胞と骨髓内血管内皮細胞を可能な限り長期間共培養することで造血幹細胞の維持機能を評価することが望ましい。同時に各共培養実験の造血幹細胞は非照射の150日齢前後のマウスからその都度分取するので、内在性コントロール実験を行なって各造血幹細胞単独での自己複製能と分化能を実験間で補正する必要がある。造血幹細胞単独の長期培養はPVAとヒトフィブロネクチンを用いることで約2ヶ月間の培養が可能である。そこで、従来の造血幹細胞Ex vivo培養法にPVAとヒトフィブロネクチンを添加して造血幹細胞単独の長期培養法を検討した。この条件では、造血幹細胞を培養容器底面に接着させ、3日毎の培地交換時に浮遊細胞を廃棄するので、定期的に分化した細胞が除かれ、自己複製した造血幹細胞だけが残存する。培養開始3日目から細胞係数を計測したところ、17日目において培養開始時の約30倍程度に増加し、

20日目で定常状態に達した。今後は増加細胞の細胞分化解析を行うと同時に、各種骨髓内血管内皮細胞と全骨髓細胞との共培養実験の条件検討を行う。

Table 1. List of monoclonal fluorescent antibodies used for flow cytometry

Cell surface antigen	Clone name	AEC	SEC	Endothelial vascular stem cell
Sca-1	D7	++	+	
CD45	30-F11	-	-	-
TER119	TER119	-	-	-
CD31	MEC13.3, 390	+	+	+
CD54(ICAM1)	YN1/1.7.4	-	+	
PDPN (podoplanin)	8.1.1	-	+	
CD157	BP-3			+