

2.4.1.2 低・中・高線量率放射線が Ex vivo 培養条件下のマウス造血幹細胞に及ぼす影響

Effects of Medium and High Dose-rate Irradiation Exposure on Hematopoietic Stem Cells in Ex Vivo Culture

廣内 篤久, 斎藤 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 microenvironment is essential for hematopoiesis. While it is known that irradiation causes hematopoietic damages, there are few reports on effects of irradiation on the HSC niches, particularly the effects of radiation at lower dose-rates. Chronic whole body radiation exposure at a low dose-rate (LDR) of 20 mGy/day in mice has been shown to increase the incidence of leukemia. Gene expression analyses of the irradiated HSCs demonstrated that apoptosis and DNA damage responses were rarely induced at LDR unlike that of high dose-rate exposure. Although the microenvironment in HSC niches are also exposed to radiation, very little is known about the changes induced in these niches. Since the microenvironment of HSC niches play an important roles in maintaining of HSCs, we studied the effects of LDR irradiation on HSC niches by comparing it with the effects found in those exposed middle dose-rate (MDR) and high dose-rate (HDR) irradiations, using an *ex vivo* experimental approaches. *Ex vivo* cultures of HSCs were isolated from C3H males aged 100 to 200 days, exposed to 359 mGy/22hours/day (chronic MDR) or 870 mGy/min (acute HDR) of gamma rays. Total doses of both chronic MDR and acute HDR irradiations were 1100, 2200, or 4600 mGy, and total culture periods of all experiments were 21 days. The solo HSC cultures without HSC niche-constructing cells showed higher radio-sensitivity both to chronic MDR and acute HDR exposures. The cell counts in acute MDR experiments were decreased at total doses of 2200 and 4600 mGy, and were equivalent to only 23% and 0.1% of those in non-irradiated control cells at day 21 respectively. On day 21 at acute HDR exposure, the cell counts at the total dose of 2.2 Gy were equivalent to 16% of the non-irradiated control cell counts, and at the total dose of 4600 mGy, cells were rarely found. These results suggest that HSCs isolated from HSC niches become more radiosensitive than those in HSC niches.

1. 目的

「DNA 修復関連遺伝子への低線量率影響実験調査：平成 22～26 年度」において 20 mGy/日の低線量率放射線を 400 日間連続照射（総線量 8,000 mGy）したマウスでは、造血幹細胞は個体の生長に伴う細胞増殖が抑制され、連続照射を終了した後においても回復しなかった。増殖抑制された個体の造血幹細胞は、遺伝子発現解析によって細胞外環境からの負の制御を受けている可能性が示された。造血幹細胞の細胞外環境は造血ニッチと呼ばれ、これを構成する細胞は液性因子の分泌や細胞間結合を介して造血幹細胞の分裂や分化を制御している。そこで、本研究では、低・中・高線量率放射線の造血ニッチへの影響とこれを介した造血幹細胞への影響を比較する

ことで、線量率効果を明らかにすることを目標とする。

2. 方法

100～200 日齢の C3H/HeN Jcl 雄マウス 5 匹の骨髓から磁気細胞分離 (MACS) 装置を用いて造血幹・前駆細胞を濃縮し、造血幹細胞を蛍光抗体で標識してフローサイトメーター (BD 社 FACS Aria IIu) で分取した。これを動物由来成分を含まない培地に懸濁し、ガンマセルまたはγシミュレーター室で高線量率もしくは中線量率γ線照射を行なった。高線量率群の線量率は 870 mGy/min で総線量 1100、2200 及び 4700 mGy をそれぞれ照射した。中線量率群は、CO₂ インキュベーターを用い、線量率 359 mGy/22 時間/日で高線量率群と同じ総線量をそれぞれ照射した。照射後、非照射区域で培養を継続し、定期的に細胞数を計数した。

3. 成果の概要

非照射群では、細胞数はほぼ指数関数的に増加し、21 日目には 7.5×10^5 個に達した (Fig. 1 および Fig. 2)。中線量率照射群では、総線量 2200 mGy 群と 4600 mGy 群において細胞増殖の抑制が認められ、総線量 2200 mGy 群では、非照射群に比べて 12 日目で 3%、16 日目で 49%、19 日目で 22%、21 日目で 23%であった (図 1)。また、総線量 4600 mGy 群では 12 日目で 0.7%、16 日目で 0.3%、19 日目で 0.5%、21 日目で 0.1%であった。一方、総線量 1100 mGy 群では 12 日目は非照射群の 30%であったが、16 日目に細胞数が 12 日目の約 200 倍に増加した後、増殖が停止し、培養開始後日数との関連は見られなかった。高線量率照射群でも総線量に比例した細胞増殖の抑制

が観察され (Fig. 2)、総線量 2200 mGy 群では、中線量率照射群と同様の経過を辿り、12、16、19、21 日目の細胞数はそれぞれ非照射群の 2、39、11、16%で、長期に渡り増殖が抑制されていた。総線量 4600 mGy 群の 12 日目は、非照射群の 0.7%で中線量率照射群と同等の値であったが、16、19、21 日目は細胞が全く検出されなかった。

本調査で用いたマウスの系統とは異なるが、DNA 修復関連遺伝子への低線量放射線影響調査 (平成 22～26 年度) において、B6C3F₁ マウスのオスに *In vivo* で中線量率 (400 mGy/日) γ線を照射した結果、照射 10 日目および 20 日目 (総線量 4000 および 8000 mGy) において骨髓中の造血幹細胞数はそれぞれ非照射群の 20%と 9.1%に減少するが、照射後には回復することを、高線量率放射線 5000 mGy 照射群では照射後 1 日目と 30 日目の骨髓中の造血幹細胞数は非照射群の 42%と 43%に減少することを報告した。一方、*Ex vivo* での照射である本解析では、中線量率放射線 4600 mGy 群の細胞数は、12 日間照射 (359 mGy/22 時間/日 \times 12 日、総線量 4300 mGy) 直後に非照射の 0.7%に減少したまま回復せず、照射の影響は持続的であった。高線量率照射群の造血幹細胞も *In vivo* 照射より高感受性であった。中・高線量率放射線の総線量 4000～5000 mGy 照射は *In vivo* では造血幹細胞を枯渇または回復不能にしないが、*Ex vivo* では細胞分裂をほぼ完全に停止させたものと思われる。本解析で加えたサイトカインの培地濃度が不足している可能性は低いので、骨髓内では他の要因により造血幹細胞の生存と増殖を促進しているものと考えられる。令和元年度は、低線量率照射の結果を加え、線量率間の比較を行い、造血ニッチの造血幹細胞防御機構の一端の解明を目指す。

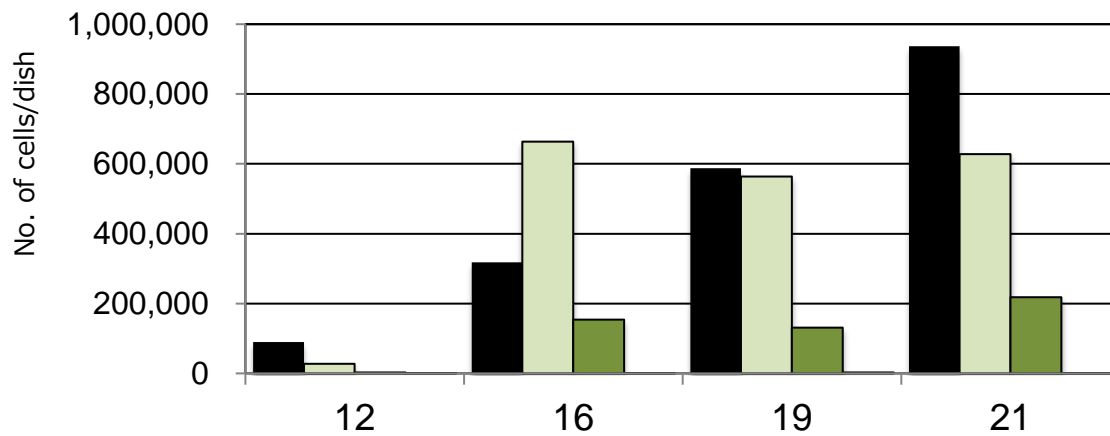


Fig. 1 Time-dependent changes in cell counts of *ex vivo*-cultured hematopoietic stem cells exposed to medium dose-rate gamma rays. Hematopoietic stem cells were irradiated to total doses of 1100 (■), 2200 (■) and 4600 mGy (■) at a dose-rate of 359 mGy/22 hours/day, and then cultured for a total of 21 days after radiation exposure with corresponding non-irradiated control cells (■).

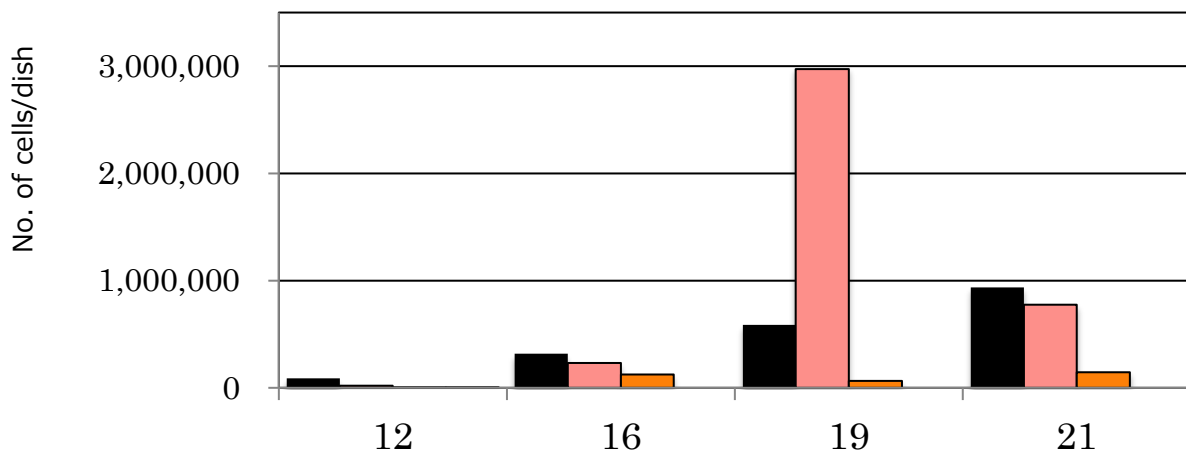


Fig. 2 Time-dependent changes in cell counts of *ex vivo*-cultured hematopoietic stem cells exposed to high-dose rate gamma rays. Hematopoietic stem cells were irradiated to total doses of 1100 (■), 2200 (■) and 4600 mGy (■) at a dose rate of 870 mGy/minute, and then cultured for a total of 21 days after radiation exposure with corresponding non-irradiated control cells (■).