

2. 4. 1. 2 低線量率放射線が造血幹細胞周辺環境に及ぼす影響と造血幹細胞の動態制御における役割

Effects of Low Dose-rate Radiation Exposure on Hematopoietic-stem-cell Microenvironments and Roles in Regulations of Hematopoietic-stem-cell Behaviors

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

Chronic radiation exposure at a low dose-rate (LDR) of 20 mGy/day suppresses proliferation of murine hematopoietic stem cells (HSCs). Recent studies have reported that HSC behaviors involving proliferation are dependent on surrounding conditions, called the HSC “niche”. Our gene expression analysis of HSCs in LDR-irradiated mice has predicted that the proliferative suppression is caused by extracellular factors. The extracellular factors in the HSC niche have been well investigated and reported to maintain HSC homeostasis, and irregular secretions of them could promote HSC mutation resulting in transformation into leukemic stem cells. Meanwhile, little is known about radiation-induced changes of the HSC niche and effects of these changes on HSCs. In order to clarify the direct and indirect effects of LDR radiation on HSCs, we have analyzed the changes in the HSC niche irradiated *in vivo* and in the niche-free HSCs irradiated *ex vivo*. Here we report the results of the latter analysis, showing the proliferation and differentiation of HSCs after *ex vivo* irradiation. HSCs were isolated from C3H males aged 100 to 150 days and cultured *ex vivo*. The *ex vivo* HSCs were irradiated with 20 mGy/day (LDR), 287 mGy/day (MDR) or 839 mGy/min (HDR) of gamma-rays, and cultured under the non-irradiated condition thereafter. Irradiation at all three dose rates induced proliferative suppression. LDR irradiation to a total dose of 0.4 Gy suppressed cell proliferation completely, whereas a total dose of 1.72 Gy of MDR or HDR irradiation was necessary to induce similar effects. Thus, LDR irradiation seems more effective. In addition, LDR radiation promoted differentiations into CD8a⁺CD8b⁺ cells. These results, together with the results of our previous *in vivo* whole-body LDR irradiation experiments that the suppression of HSC proliferation was not induced by irradiation with a total dose less than 2 Gy, suggest that *ex vivo* HSCs without their niche might be more sensitive to LDR radiation than their *in vivo* counterparts.

1. 目的

マウスへの 20 mGy/日の低線量率放射線の 400 日間連続照射（総線量 8000 mGy）には、造血幹細胞の増殖抑制作用がある。造血幹細胞の増殖、休止、分化、移動は周辺の環境によって制御されていると考えられているが、前調査において実施した低線量率放射線照射造血幹細胞の遺伝子発現プロファイル解

析の結果も、細胞外因子による負の増殖制御が生じている可能性を示すものであった。造血幹細胞周辺環境の研究は近年急速に進み、局在する細胞や造血幹細胞の動態制御に関連する分泌因子や分泌機構に関する知見が多く蓄積されている。本研究では、低線量率放射線の骨髄の造血幹細胞周辺環境への影響とこれらの影響が造血幹細胞に与える影響を明らか

にすることを目標とする。本項目は、*In vivo*（生体内）における造血幹細胞周辺環境への低線量率放射線の影響の解析と、周辺環境から取り出した状態（*Ex vivo*）での造血幹細胞に対する低線量率放射線の影響の解析の二つの解析からなるが、ここでは後者の解析について報告する。

2. 方法

100～150 日齢の 5 匹の C3H/HeN Jcl 系統のオスマウスの大腿骨と上腕骨から、細胞表面抗原に対する抗体による標識反応と BD 社 FACS Aria IIu によるフローサイトメトリー法によって、造血幹細胞を分取した。これを動物由来成分無添加培地で懸濁し、高線量率 γ 線については培養前、低・中線量率 γ 線については培養中に照射を行なった。低・中・高線量率 γ 線の線量率はそれぞれ 839 mGy/min、287 mGy/日、20 mGy/日とした。照射後は非照射環境下で培養した。培養中は毎日 15 分間 20 rpm で振盪し、定期的に細胞を計数し、培養終了後にフローサイトメトリー法によって細胞分化段階を解析した。

3. 成果の概要

Ex vivo（生体外）放射線照射により、*In vivo* の造血幹細胞周辺環境の影響を排した条件下での造血幹細胞単独の放射線応答を観察した。低・中・高線量率放射線いずれの場合も総線量が高くなるとほぼ完全な増殖抑制が観察されたが、低線量率放射線でこれが見られたのは総線量 0.4 Gy であったのに対して、中・高線量率放射線では総線量 3.7Gy であった（Fig. 1）。細胞分化に対する影響においても線量率による差異が観察され、低・中線量率放射線照射では培養開始から 27～35 日目に CD8a⁺ CD8b⁺ 細胞障害性 T 細胞が増加したのに対し、高線量率放射線照射では増加を認めなかった。

これまでの *In vivo*（生体内）における造血幹細胞周辺環境への低線量率放射線の影響の解析において、骨髓の造血幹細胞周辺環境を構成する血管が低線量率放射線に低感受性であることが明らかになったこと、また、これまでの *In vivo*（生体内）の放射線影響解析と今回報告した *Ex vivo*（生体外）の影響解析

の比較等から、造血幹細胞は *In vivo* の造血幹細胞周辺環境から隔離された環境では低線量率放射線に対してより高感受性であることが示唆される。

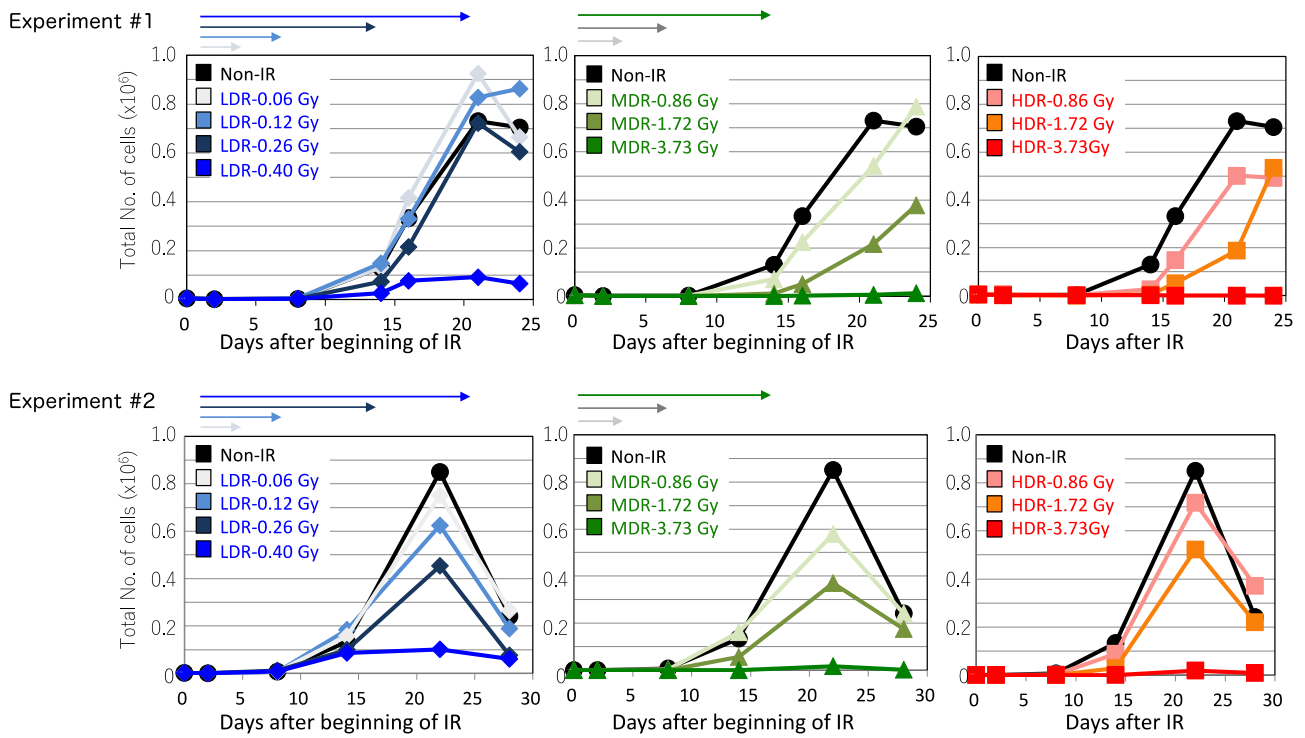


Fig. 1 Time-dependent changes in the number of *ex vivo*-cultured hematopoietic stem cells exposed to radiation (Experiments #1 and #2). Dose-rates of radiation were 839 mGy/min (HDR, high dose-rate), 287 mGy/day (MDR, middle dose-rate) and 20 mGy/day (LDR, low dose-rate). Dose rates and total doses are indicated near the symbols on the graphs. Arrows above the graphs indicate the irradiation periods of LDR- and MDR-irradiated groups. “Non-IR” means the non-irradiated group.