

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15044

研究課題名(和文) 宇宙放射線の脳機能への影響に関する神経生物学的研究

研究課題名(英文) Effects of high-energy particles on neural activity

研究代表者

岡野 ジェイムス洋尚 (Okano, Hirotaka James)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90338020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞1個もしくは少数の細胞からなる神経回路を狙い撃ちして照射し観察できる放射線医学総合研究所のマイクロビーム細胞照射装置 (SPICE) を活用し、陽子線によって引き起こされる神経活動を経時的に観察した。細胞内カルシウムを可視化する蛍光色素を細胞内に導入し、顕微鏡による経時的蛍光イメージングを行い、マイクロビーム照射時と非照射時のニューロンの活動を比較検討した。細胞はマウス大脳皮質由来一次培養ニューロンを使用した。その結果、照射したニューロンは照射直後に活性化し、逆に照射細胞周辺のニューロンでは活動の低下が観察された。これらの観察から陽子線が神経活動・脳活動に影響を及ぼす可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：A research group of National Institute of Radiological Sciences constructed a microbeam facility (named as SPICE) by using our HVEE Tandem accelerator (3.4 MeV proton) and they have shown various biological effects of microbeam irradiation with protons in culture cells. This imaging system enables to perform Ca imaging of a single cultured neuron that attach down the bottom of a culture dish. Intracellular calcium is a second messenger that plays important roles in regulating many cell functions and Ca imaging allows real-time analyses of individual cells. To develop an in vitro experimental system, we irradiated cultured mouse cortical neurons with repeated bursts of protons by SPICE and observed neuronal activities by Ca imaging before and after irradiation. The proton irradiation evoked calcium responses in an irradiated single neuron and also it seemed to inhibit the spontaneous calcium oscillation in surrounding cells, which might be a bystander effect of irradiation.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：宇宙放射線 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

宇宙放射線は宇宙空間を飛び交う高エネルギーの放射線で、高線エネルギー付与荷電粒子線をはじめとした多様な線質の放射線であるが、主な成分は陽子である。これまで宇宙に滞在した宇宙飛行士の約80%が、宇宙放射線が宇宙船を通過する際に閃光を見る「アイフラッシュ」と呼ばれる現象を経験したことが報告されている (Fuglesang et al. *Aviat Space Environ Med.* 2006)。我が国の毛利、向井、野口、土井宇宙飛行士も目をつぶると目の中の色々な場所に光が見え、白かったり色がついていたり軌跡が見えることもあったと報告している。特に、太陽活動期にフレア (爆発) が起こると大量の太陽粒子線 (99%が陽子・ヘリウムイオン、1%が炭素イオン・鉄イオンなど重粒子) が放出され宇宙船に降り注ぐため、船内の宇宙飛行士が同時にアイフラッシュを見ることがある。

アイフラッシュの観察結果を実験的に再現するために、Narici らはマウスの網膜に¹²C beam を照射し、光感受性細胞および大脳皮質一次視覚野のニューロンに電気生理学的応答を引き起こすことに成功した (Sannita et al. *Neurosci letters* 2007)。宇宙放射線が眼球を貫いた時、ラジカル再結合により発生する化学発光に網膜杆体細胞のロドプシンが反応したことが原因であると報告している (Narici et al. *Int J Radiat Biol.* 2013)。

一方、陽子線治療施設において、陽子線照射を頭部に受けることによってもアイフラッシュ、幻聴、異臭、異常味覚を経験することがあると知られている (Livio Narici et al. 未発表)。頭部への陽子線治療の際に見られる異常感覚が視覚のみに限定されているわけではなく、照射方向によって聴覚、嗅覚、味覚としても感知されるということから、脳内のニューロンが照射による直接の影響を受けている可能性が考えられる。そこで、培養ニューロンに陽子線・重粒子線を照射し、カルシウムイメージング法を用いて神経活動を可視化する実験により、神経活動に対する宇宙放射線の影響を地上実験で検証することができる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

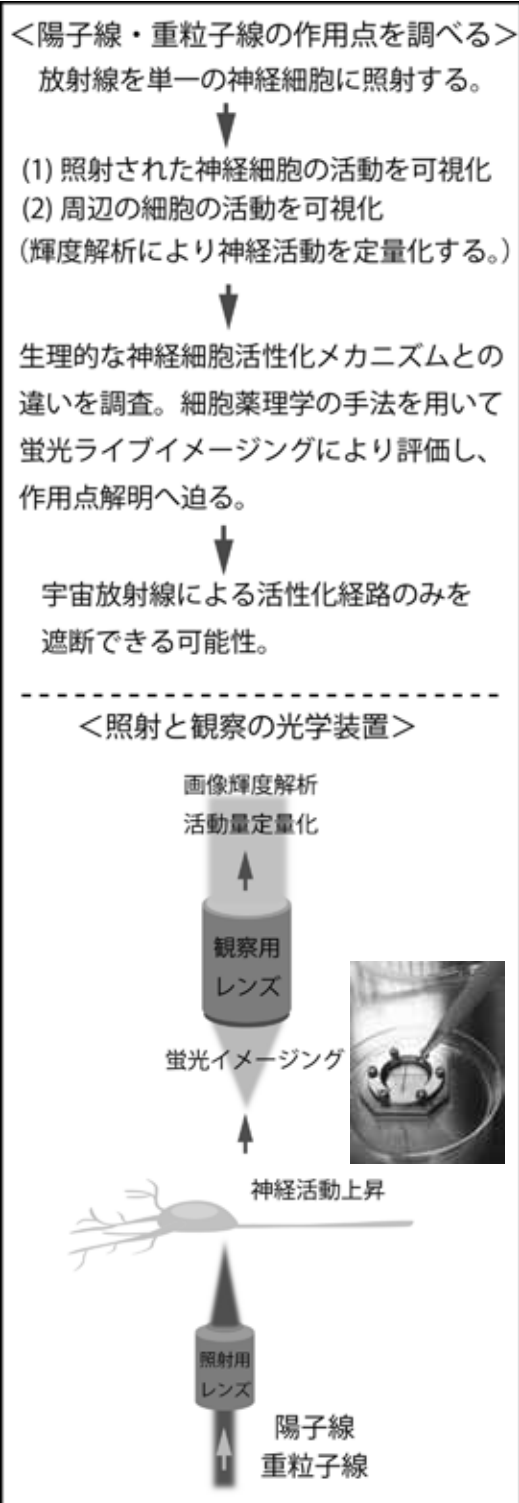
地上高度 400km の低地球軌道を周回する国際宇宙ステーション (ISS) でさえも低線量率の宇宙放射線が隔壁を貫いて船内まで

入ってくるためにアイフラッシュが起こる。しかし、月や火星を往復して惑星間飛行を行う宇宙船の乗員は、はるかに多い電離放射線を長期間被曝することになるため対策の必要性が指摘されている。特に、宇宙放射線の脳に対する影響は大きな懸念材料であり、宇宙放射線が宇宙飛行士の思考に大きな影響を与える場合、惑星間飛行計画の成功を左右する事態となり得る。最近、Robert Heinz らは、ラットを用いた高エネルギー荷電粒子線照射実験により多くの個体に深刻な注意力の欠落、衝動性の増加、反射の遅れが観察されたことを報告し、宇宙放射線の長期被曝に警笛を鳴らしている (Davis et al. *Radat Res.* 2014)。興味深いことに、障害の程度と放射線量は相関しない上、障害の有無に個体差があることから、個人の体質や被曝時の体内環境が障害の発生に影響を与える可能性が考えられている。脳障害が起こる分子機序はいまだに不明であるが、宇宙放射線による障害を予防・回避する方法の開発のため、細胞生物学的実験系の確立が切望される。宇宙空間における電離放射線の脳への影響を予測するためには地上実験のできる研究プラットフォームを構築することが必須である。

本研究では、脳内のニューロンが宇宙放射線 (主に陽子線) の照射により直接影響を受ける可能性を検証するために、培養ニューロンに陽子線・重粒子線を照射し、カルシウムイメージング法を用いて神経活動を計測する。さらに神経薬理学的手法を駆使して、神経活動に対する陽子線・重粒子線の作用点を明らかにする。本研究は、脳活動に対する宇宙放射線の影響を研究するための地上実験プラットフォームを構築し、惑星間有人飛行を実現するために必要な医学的基礎データを收拾することを目的としている。

3. 研究の方法

ニューロンは成熟したシナプスを介して樹状突起で他のニューロンからの信号を受け取ることができるようになり、細胞体において入力信号を処理し、軸索から他のニューロンへと信号を出力している。信号を受け取ったニューロンは同じように別のニューロンへ信号を出力する。あるニューロンが信号を出力すると、次々と信号が神経ネットワーク内の他のニューロンに伝播していく。神経の伝達機構はこのように単純な法則で説明でき、情報処理モデルとして

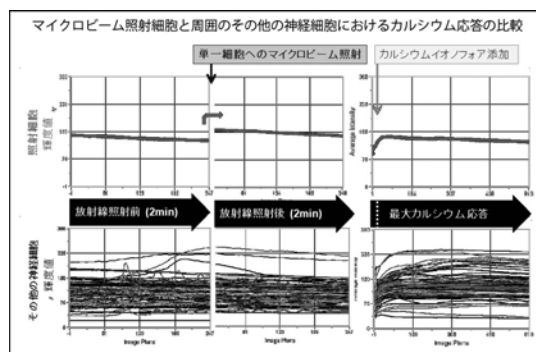


考案できるような機械的な信号の入出力が行われていることが知られている。そして、この神経回路への入力、電気信号や神経伝達物質により行われると考えられている。本研究では、培養ニューロンに陽子線・重粒子線を照射し、カルシウムイメージング法を用いて神経活動を可視化することにより、神経活動に対する宇宙放射線の影響を地上実験で検証した。放射線医学総合研究所の静電加速器からの陽子線をマイクロビーム細胞照射装置 (SPICE)を用いて、陽子

線による活性化の経路および分子メカニズムを検討した。単一細胞レベルでの放射線に対する初期応答を時系列で解析することが重要であるが、一般的なブロードビーム照射では複数の細胞が同時に照射されることにより、ニューロン間のシグナルのやり取りが複合的に発生し、検出が困難になる。また、一般的なストレスに対する応答では、シグナル伝達が即座に開始され、その後数十秒後に最大値を示すことが知られている。そのため、照射直後からの観察が可能な照射・観察システムが必要となる。単一細胞への照射および追跡が可能であり、照射細胞および非照射細胞を区別して追跡できるマイクロビーム細胞照射装置による照射実験と画像取得・解析を行うことが目的を達成するために必須である。

4. 研究成果

観察する神経細胞は、マイクロビームを透過することのできる極めて薄い特殊な素材の膜上で培養しなくてはならないが、細胞の接着があまり良くないためコーティング条件の検討が必要であった。また培養に用いる薄膜の強度が十分でないため、長期に培養すると膜が歪んだり、液漏れ起こしてしまい、観察・測定が困難になる。そこでマイクロビーム照射に用いることのできる薄膜の中から神経細胞培養に最適な膜の検討を行い安定的に培養可能な条件を決定した(左図)。またコーティングの種類、神経分化を促進する新しい培養液、神経栄養因子の添加などを検討し、比較的速くニューロンが成熟する培養条件を決定した。使用する細胞は、マウス大脳皮質由来一次培養ニューロンであり、主に GABA ニューロンとコリン作動性ニューロンが含まれる。

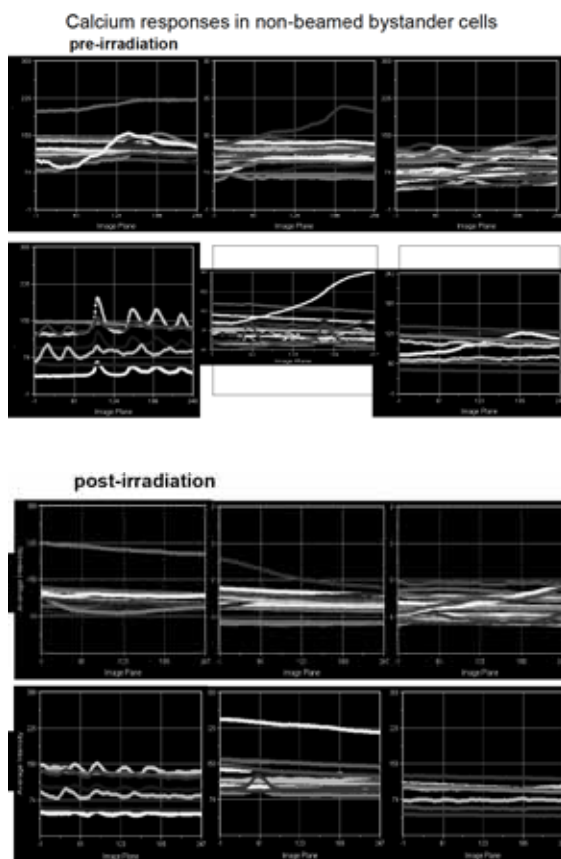


慈恵医大にて細胞の調整およびカルシウムイメージングの基礎実験を行い、放射線医学総合研究所 SPICE にて同細胞の照射およびイメージングを行った。細胞内カルシウ

ムを可視化する蛍光色素を細胞内に導入し、顕微鏡による経時的蛍光イメージングを行い、マイクロビーム照射時と非照射時のニューロンの活動を比較検討した。

照射する粒子数は 500-5000 個 (<2Gy) で検討し、500msec 間隔で 1 2 分間タイムラプス撮影を行い、イオノマイシン添加により細胞応答性を確認した。

その結果、照射したニューロンは照射直後に蛍光強度が増強し、活性化したことが示された(上図)。逆に、照射細胞周辺のニューロンでは活動の低下が再現性良く観察された(下図、pre および post-irradiation)。イオノマイシン(カルシウムイオノフォア)の添加により観測した全てのニューロンの蛍光強度が増強した。これらの観察から陽子線が神経活動・脳活動に影響を及ぼす可能性が強く示唆された。



陽子線が神経活動に直接急性の影響を及ぼすことを示した世界では初めての成果であり、また地上実験により宇宙放射線の脳への影響をシミュレーションできる実験系を確立したことが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Okano, Hirotaka James

Effects of high-energy particles on neural activity in primary cultured cortical neurons.

第 7 回国際放射線神経生物学会大会

(招待講演) 2017 年 2 月 9 日 (新潟)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 0 件)

○

○ 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野ジェイムス洋尚

(Hirotaka James Okano)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90338020