

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12599

研究課題名(和文)ニューロンにおけるDNA2本鎖切断修復能低下が認知機能に及ぼす影響の究明

研究課題名(英文)Effect of reduced repair ability of DNA double strand breaks on cognitive function in neurons

研究代表者

児玉 靖司(Kodak, Seiji)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00195744

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)：本研究は、マウス神経幹/前駆細胞(NSPC)及びニューロンにおけるX線誘発DNA2本鎖切断(DSB)の修復動態を、線維芽細胞(MEF)と比較して調べた。その結果、NSPCとニューロンの修復速度には差がないが、両細胞とも線維芽細胞と比べると修復速度が速いことが分かった。その理由は、DNA依存性のプロテインキナーゼ(DNA-PK)活性が、NSPCとニューロンではMEFより約2倍高いことに起因すると推定される。一方、X線によるp53依存性のアポトーシスの誘発には、ニューロンはNSPCより約3倍高感受性であることが分かった。この感受性差は、ニューロンとNSPCのDSB修復における忠実度の差かもしれない。

研究成果の概要(英文)：We investigated the repair kinetics of X-ray-induced DNA double-strand breaks (DSBs) in mouse neural stem/progenitor cells (NSPCs) and their differentiated neurons by scoring the number of phosphorylated histone H2AX (gamma-H2AX) foci or phosphorylated 53BP1 foci post-irradiation. The DSB repair in neurons differentiated from NSPCs in culture was faster than that in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), possibly due to the higher DNA-dependent protein kinase activity, but similar to that in NSPCs. Further, the incidence of p53-dependent apoptosis induced by X-irradiation in neurons was significantly higher than that in NSPCs. This difference in response of X-ray-induced apoptosis between neurons and NSPCs may reflect the difference in the fidelity of non-homologous end joining or the differential sensitivity to DNA damage other than DSBs.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ニューロン トーシス 神経幹/前駆細胞 DNA2本鎖切断 非相同末端結合 DNA依存性のプロテインキナーゼ アポ

### 1. 研究開始当初の背景

代表的な認知症のひとつであるアルツハイマー病 (AD) は、アミロイドβ (Aβ) の神経組織への蓄積が神経細胞死を誘発して発症するとの仮説 (Aβカスケード仮説) が有力である。このように認知症発症と神経細胞死は密接に関わると想定されるが、神経細胞死の直接の原因については未だ明らかではない。申請者は、神経細胞死の原因を明らかにするには、ニューロンに特異的な DNA 損傷応答と DNA 2本鎖切断 (DSB) 修復機構の放射線生物学的視点からの究明が必要であると考え、本研究を開始した。この着想は、以下のエビデンスによって支持される。①DSB 修復に係る遺伝子欠損では小頭症や神経変性症状を呈する<sup>1)</sup>。②AD 患者の神経細胞では DNA 鎖切断の蓄積が健常人より多く<sup>2), 3)</sup>、また、切断された DNA 鎖の再結合活性も低下している<sup>4)</sup>。③Aβ が DNA 依存的プロテインキナーゼ (DNA-PK) 活性を阻害する<sup>5)</sup>。④AD 患者のニューロンでは、細胞死の前に細胞周期への再突入が起き、これがアポトーシスの引き金になる<sup>6)</sup>。⑤頭部放射線照射を受けた小児患者に認知機能の低下がみられる<sup>7)</sup>。以上のエビデンスは、ニューロンにおける DSB 修復能に関する理解が認知機能低下メカニズムを解明する上で必須であることを示している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ニューロンにおける DSB 修復動態とニューロン死との関係を明らかにすることである。認知機能低下にニューロン死が関わることを考慮し、その細胞死が起きる原因としての DSB に関して、ニューロン特異的な DSB 修復動態を明らかにする。本研究を、放射線非がん影響としての認知機能低下の原因解明の突破口としたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 神経幹/前駆細胞 (NSPC) 及びニューロンにおける DSB 修復動態の解析

B6C3F1 マウス胎児から線条体を分離し、培地中でニューロスフェア形成させて神経幹/前駆細胞 (NSPC) を得た。また、ICR マウス胎児から得た NSPC では、培地中での 48 時間分化培養によりニューロンを得た。NSPC、またはニューロンに X 線 (1Gy) を照射し、DSB 修復動態の経時変化について DSB マーカー (γ-H2AX、または 53BP1) を計測して定量化した。

#### (2) 脳組織における DSB 修復酵素 (DNA-PK) の発現と活性に関する解析

B6C3F1 マウス胎児脳を採取し、ニューロンで主要な DSB 修復機構となる非相同末端結合 (NHEJ) の必須因子である DNA 依存的プロテインキナーゼ (DNA-PK) の遺伝子発現、タンパク質発現、及び活性を測定した。

#### (3) NSPC 及びニューロンにおける放射線誘発アポトーシスの解析

ICR マウス胎児から得られた NSPC とニューロンに X 線 (1Gy, 2Gy) を照射し、核凝縮 (pyknotic nucleus) をアポトーシスの指標として計測し、定量化した。

### 4. 研究成果

(1) ニューロンにおける DSB 修復動態の解析  
始めに、NSPC に X 線 (1Gy) を照射し、その後の DSB 修復動態を DSB マーカー (γ-H2AX フォーカス) で調べたところ、細胞当たりの DSB 数は、照射後 0.5 時間で 13 個程度まで増加し、その後 1~6 時間でだいに減少し、6 時間後では 3 個程度、24 時間後は非照射レベルの 2 個未満まで低下した。この X 線誘発 DSB の修復動態は、胎齢 12.5 日、14.5 日、及び 16.5 日で違いはなく、NSPC では DSB 修復能に胎齢間による差はないことが分かった。

次に、ICR マウス胎児 (14.5 日齢) の線条体より採取した NSPC をニューロンに分化させる培養法を確立した。この培養法では、増殖因子等を添加した neurobasal 培地で NSPC を 48 時間接着培養することにより、高い分化率 (82.4%) でニューロンが得られた。その一方、ニューロンへの分化過程において、アポトーシスが高率 (37.0%) に生じることも明らかになった。次に、ICR マウス胎児から得た NSPC、ニューロン及び線維芽細胞に X 線 (1Gy) を照射し、DSB 修復動態について、53BP1 フォーカスを DSB マーカーとして 3 種の細胞間で比較した。その結果、NSPC とニューロンの DSB 修復動態に差はなく、DSB 数は照射後 10 分から 12 時間まで単調に減少し、12 時間後にはほぼ非照射レベルに戻った。これに対し、線維芽細胞の DSB 数は照射後 10 分から 1 時間まで一定であり、その後 12 時間まで時間依存的に低下して非照射レベルに戻った。この結果より、NSPC とニューロンのような神経系細胞では、DSB 修復は線維芽細胞と比べて速いことが特徴であることが明らかになった (図 1)。

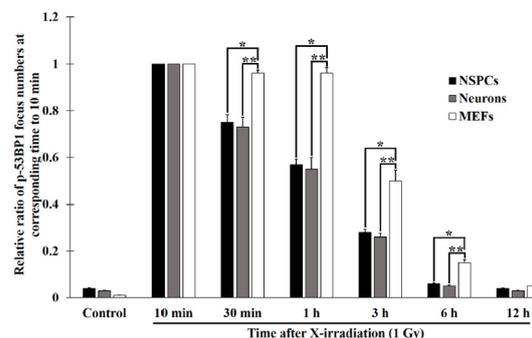


図 1 NSPC、ニューロン及び線維芽細胞における DNA 2本鎖切断 (DSB) 修復動態の比較。照射 10 分後における核当たりの DSB 数を基準にして相対量で示した。NSPCs: 神経幹/前駆細胞; Neurons: ニューロン; MEFs: 線維芽細胞  
\*, \*\* p<0.05, paired Student's t-test.

## (2) 脳組織における DSB 修復酵素 (DNA-PK) の発現と活性に関する解析

B6C3F1 マウス胎児脳の神経発生期における DNA-PK の活性、並びにその触媒サブユニット (DNA-PKcs) の遺伝子発現とタンパク質発現を明らかにするために、胎齢 10.5 日、12.5 日、14.5 日、16.5 日、17.5 日の脳組織由来細胞で調べた。その結果、DNA-PKcs 遺伝子の発現は、5 種の胎齢間で全く差が見られなかったのに対し、タンパク質発現は、胎齢 12.5 日で 10.5 日に比べて約 2.5 倍に増加し、その後胎齢が進むにつれて低下し、17.5 日で 10.5 日と同レベルに戻った。一方、DNA-PK 活性は、タンパク質発現と同様に 10.5 日に比べて 12.5 日で増加し、そのまま 17.5 日まで高い活性を保持した。本研究の結果は、神経発生期において、ニューロン発生が盛んになる胎齢 12.5 日に DNA-PK のタンパク質発現と活性が一斉に高くなることを示している。このことは、ニューロンが発生する過程で多量の DSB が発生し、それを修復する DNA-PK 活性が高くなる可能性を示唆しており、発生期神経系細胞の特徴と考えられる。

また、NSPC、ニューロン及び線維芽細胞で DNA-PK 活性を比較したところ、NSPC とニューロンの活性は、線維芽細胞の約 2 倍高い傾向が見られた。この結果は、NSPC とニューロンでは線維芽細胞に比べて DSB 修復が速いという先に示した結果を支持している。

## (3) NSPC 及びニューロンにおける放射線誘発アポトーシスの解析

ICR マウス胎児 (14.5 日齢) より分離した NSPC と NSPC から分化させて得たニューロンを用いて、DSB による細胞死を調べるために、X 線 (1Gy, 2Gy) を細胞に照射して 6 時間後の p53 依存的アポトーシスの誘発を調べた。その結果、X 線 1Gy により誘発されるアポトーシスは、NSPC では 8.7%、ニューロンでは 25.4%であり、2Gy ではそれぞれ 12.2%及び 34.8%であった (図 2)。

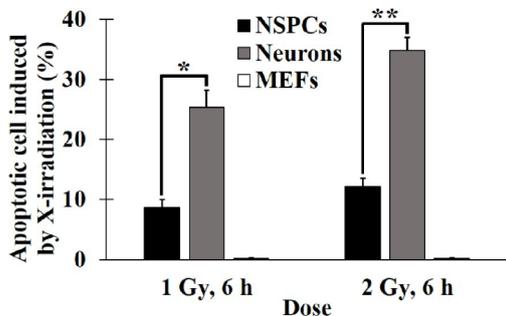


図 2 X 線照射による NSPC とニューロンへのアポトーシスの誘導。核凝縮 (pyknotic nucleus) をアポトーシスの指標として計測した。NSPCs: 神経幹/前駆細胞; Neurons: ニューロン; MEFs: 線維芽細胞

\*,\*\* $p < 0.05$ , paired Student's *t*-test.

図 1 で示したように、DSB 修復動態において、NSPC とニューロンには差がないこと、また、X 線被ばく 6 時間後にはほとんどの DSB 修復が終了していること等を考えると、図 2 の結果は、ニューロンでは NSPC に比べて DSB の修復誤りが生じやすい可能性を示唆している。

## (4) まとめ

1) 神経幹/前駆細胞 (NSPC) とニューロンの DSB 修復は、線維芽細胞に比べて速い。これには、DSB 修復で中心的な役割を果たす DNA 依存的プロテインキナーゼ (DNA-PK) 活性の強さが関連すると推定され、NSPC とニューロンではその活性が線維芽細胞より高い。

2) 神経発生期の胎齢 12.5 日~16.5 日で、DSB 修復動態に胎齢間の差はない。一方、DNA-PKcs 発現と DNA-PK 活性は胎齢により変動する。前者は 10.5 日から 12.5 日で一過性に上昇し、17.5 日にかけて低下するが、後者は 12.5 日で上昇し、17.5 日まで高い活性を保持する。

3) ニューロンは、NSPC より放射線誘発アポトーシスに対して感受性が約 3 倍高い。この結果は、ニューロンでは NSPC に比べて DSB の修復誤りが生じやすい可能性を示唆している。

本研究により、神経系細胞は 1)~3) に示した DSB 修復動態と DSB による細胞死に関する特徴を示すことが明らかになった。これまで、神経系細胞は放射線感受性が低いと考えられてきたが、分化初期段階の幼若ニューロン (分化培養 48 時間) は、神経幹/前駆細胞 (NSPC) に比べて放射線感受性が高いという本研究の結果は新しい知見である。

## <引用文献>

- (1) Mckinnon P. K. et al., Genome integrity and disease prevention in the nervous system. *Genes Dev.*, 31, 1180-1194, 2017.
- (2) Mullaart, E. et al., Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. *Neuro. Aging*, 11, 169-173, 1990.
- (3) Adamec, E. et al., DNA strand breaks in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 849, 67-77, 1999.
- (4) Shackelford, D. A., DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease. *Neuro. Aging*, 27, 596-605, 2006.
- (5) Cardinale, A. et al., Sublethal doses of  $\beta$ -amyloid peptide abrogate DNA-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 287, 2618-2631, 2012.
- (6) Wu, Q. et al., Beta-amyloid activated microglia induce cell cycling and cell death in cultured cortical neurons. *Neuro. Aging*, 21, 797-806, 2000.
- (7) Abayomi, O., Pathogenesis of irradiation induced cognitive

dysfunction. *Acta Oncol.*, 35, 659-663, 1994.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kashiwagi, H., Shiraishi, K., Sakaguchi, K., Nakahama, T., and Kodama, S. Repair kinetics of DNA double-strand breaks and incidence of apoptosis in mouse neural stem/progenitor cells and their differentiated neurons exposed to ionizing radiation. *J. Radiat. Res.*, in press, 2018 (査読有).

DOI:10.1093/jrr/rrx089

[学会発表] (計15件)

- ① マウスニューロンにおける DNA 損傷応答の解析、中野彰人、児玉靖司、白石一乗、日本放射線影響学会第 60 回大会 (2017 年 10 月 25 日～28 日、京葉銀行文化プラザ、千葉市)
- ② 神経発生期間における DNA 依存的プロテインキナーゼ触媒サブユニット発現と DNA 依存的プロテインキナーゼ活性の解析、金星咲良、白石一乗、児玉靖司、日本放射線影響学会第 60 回大会 (2017 年 10 月 25 日～28 日、京葉銀行文化プラザ、千葉市)
- ③ X線誘発テロメアシグナル異常への酸化ストレスの関与、坂本佳美、白石一乗、児玉靖司、日本放射線影響学会第 60 回大会 (2017 年 10 月 25 日～28 日、京葉銀行文化プラザ、千葉市)
- ④ 被ばく染色体と DNA2 本鎖切断の相互作用を検出する実験系確率の試み、西田一貴、白石一乗、戸田邦彦、児玉靖司、日本放射線影響学会第 60 回大会 (2017 年 10 月 25 日～28 日、京葉銀行文化プラザ、千葉市)
- ⑤ 小核における DNA2 本鎖切断蓄積の細胞周期におけるタイミングの解析、富野菜央、杉本憲治、児玉靖司、日本放射線影響学会第 60 回大会 (2017 年 10 月 25 日～28 日、京葉銀行文化プラザ、千葉市)
- ⑥ 放射線によるテロメア姉妹染色分体交換 (T-SCE) の線量依存的誘発、遠山由貴、白石一乗、児玉靖司、日本放射線影響学会第 60 回大会 (2017 年 10 月 25 日～28 日、京葉銀行文化プラザ、千葉市)
- ⑦ 胎児期のマウス脳組織における X 線誘発 DNA2 本鎖切断修復動態、白石一乗、尾家彩加、児玉靖司、日本放射線影響学会第 60 回大会 (2017 年 10 月 25 日～28 日、京葉銀行文化プラザ、千葉市)
- ⑧ 小核由来被ばく染色体の細胞周期における移入時期と不安定化の関係、西田拓馬、白石一乗、児玉靖司、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

- ⑨ 胎内被ばくによってマウス神経幹・前駆細胞に誘発される DNA 二本鎖切断の解析、白阪耀介、坂口健太、白石一乗、児玉靖司、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

- ⑩ 小核における DNA 二本鎖切断蓄積と主核への取り込み頻度の解析、富野菜央、白石一乗、杉本憲治、児玉靖司、川喜多愛、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

- ⑪ 放射線によるテロメアシグナル異常に対するアスコルビン酸の影響、坂本佳美、児玉靖司、白石一乗、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

- ⑫ マウスニューロンにおける X線誘発 DNA 二本鎖切断の修復能解析、柏木裕呂樹、白石一乗、坂口健太、白阪耀介、児玉靖司、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

- ⑬ マウスニューロンにおける非同相末端結合の阻害効果の解析、今岡航、柏木裕呂樹、坂口健太、白石一乗、児玉靖司、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

- ⑭ アストロサイトの放射線損傷応答に関する解析、泉谷彬元、児玉靖司、白石一乗、日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年 10 月 26 日～28 日、JMS アステールプラザ、広島市)

- ⑮ 放射線による染色体異常生成とその後の運命について、児玉靖司、日本環境変異原学会第 45 回大会 (2016 年 11 月 17 日～18 日、つくば国際会議場、つくば市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻・放射線生物学のホームページ:

<http://chokai.riast.osakafu-u.ac.jp/~housya6/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

児玉 靖司 (KODAMA, Seiji)

大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・教授

研究者番号: 00195744

### (2) 連携研究者

白石 一乗 (SHIRAISHI, Kazunori)

大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・助教  
研究者番号：40347513

(3)研究協力者

柏木 裕呂樹 (KASHIWAGI, Hiroki)  
大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・博士後期課程3年(平成28年度)、客員研究員(平成29年度)

坂口 健太 (SAKAGUCHI, Kenta)  
大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・博士後期課程3年(平成29年9月30日まで)、客員研究員(平成29年10月1日～平成30年3月31日まで)

尾家 彩加 (OIE, Ayaka)  
大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・博士前期課程2年

金星 咲良 (KANABOSHI, Sakura)  
大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・博士前期課程2年