

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12324

研究課題名(和文) ゲノム再編成を行う幼若ニューロンにおける放射線感受性

研究課題名(英文) Radiation sensitivity of neural stem cells and immature neurons in the fetal mouse striatum.

研究代表者

白石 一乗 (SHIRAIISHI, Kazunori)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40347513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胎児線条体の放射線感受性を明らかにするため、放射線修復動態とアポトーシス活性を測定した。その結果、神経幹細胞と神経細胞のDNA修復活性は同等であり、照射後6時間までにDNA修復が完了することが示された。神経幹細胞を含む領域では、照射後3時間でCaspase3活性化細胞が出現し、神経細胞を含む領域では、照射後8時間でCaspase3活性化細胞が出現した。この遅延型カスパーゼ活性化は神経細胞で見られ、細胞死を引き起こしていた。の発達期の中樞神経系におけるアポトーシス関連遺伝子の制御の違いは、照射後の細胞の運命に関連している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の報告で、胎児線条体における幹細胞と神経細胞はDNA2本鎖切断損傷に対して、同等の修復活性を持つことが示された。その一方で、細胞死を指標とした放射線感受性は異なることが示された。この感受性の違いは、アポトーシス関連遺伝子であるcaspase-3の活性化の関与によるものであることが示唆された。胎内被ばくにおける、神経幹細胞と新生ニューロンの感受性を明らかにすることは、放射線の潜在的リスクを考える上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the radio sensitivity of fetal striatum, DNA repair kinetics and apoptotic activity were evaluated. The results showed that the DNA repair activities of neural stem cells and neurons were comparable, and that DNA repair was terminated by 6 hours post-irradiation. In the region containing neural stem cells, Caspase3-activated cells appeared at 3 hours after irradiation, and in the region containing neurons, Caspase3-activated cells appeared at 8 hours after irradiation. This delayed caspase activation was seen in neurons and triggered cell death. The results suggested that the differential regulation of apoptosis-related genes in the developing central nervous system are involved in the fate of the cells after irradiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：神経幹細胞 放射線感受性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らはニューロンの高い放射線感受性を報告した(Kashiwagi, H. et al., J. Radiat. Res., 2018)。この論文では、マウス胎児神経幹細胞とその分化した神経細胞の *in vitro* での放射線感受性について調べられた。DNA2 本鎖切断マーカー-g-H2ax を用いた、DNA 修復動態の検証では、両者に違いは認められなかった。一方、核凝縮を指標とした、アポトーシス活性の検証において、神経細胞の感受性は優位に高かった。一般に、未分化な細胞ほど、放射線感受性の高いことが知られており(ペルゴニー・トリポンド 則)、この結果は従来の放射線感受性の認識とは異なるものであった。

### 2. 研究の目的

申請者らは胎児期ニューロンの高い放射線感受性を報告した。これは従来の放射線感受性の認識とは異なるものであり、独自性が高いものである。しかしながら、高い放射線感受性を示した神経細胞は幹細胞を薬剤処理により、強制分化した細胞であるため、本来の性質を示していない可能性が存在した。そこで、本研究では神経幹細胞および神経細胞の本来の放射線応答性を明らかにするために、培養系を介さず、より直接的な放射線応答性を検証することを目的とした。そこで、マウス胎児脳組織の細胞を直接フローサイトメトリー解析した。さらにマウス胎児脳の凍結切片を作成し、各種マーカーを利用した免疫染色法により上記の目的を達成することにした。

### 3. 研究の方法

マウス胎児脳組織内の放射線応答性を確認するため、胎齢 14.5 日の ICR マウスに X 線 2Gy を照射し、線条体組織断面を撚取し、培養することなく、事件に用いた。フローサイトメトリー法での解析では、DNA2 本鎖切断の指標として g-H2ax、アポトーシスの指標として AnnexinV を免疫染色で用いた。また、神経幹細胞マーカーとして SSEA-1 を用い、陽性細胞を幹細胞、陰性細胞を神経細胞と定義した。さらにマウス胎児脳の凍結切片を作成し、DNA2 本鎖切断の指標として 53BP1、アポトーシスの指標として cleaved caspase-3 を免疫染色した。III-tubulin 陽性領域を神経細胞に富む領域、また、III-tubulin 陰性で側脳室に隣接する領域を神経幹細胞に富む領域とした。

### 4. 研究成果

フローサイトメトリー法、および組織免疫染色の結果から、胎児神経幹細胞と神経細胞の DSB 修復動態は同様(図 1、図 2.)であり、DSB は、照射後 1 時間から検出され始め、照射 3 時間後に最も多くなった。その後は照射 6 時間後から 48 時間後で DSB 数が減少した。一方、cleaved caspase-3 陽性細胞は照射 3 時間後から検出され始め、神経細胞よりも神経幹細胞で多く見られた。しかし、照射 6 時間後、および 24 時間後では神経幹細胞よりも神経細胞で cleaved caspase-3 陽性細胞が多く見られた。また、神経幹細胞が存在する脳室下帯 (SVZ) 周辺に比べ、神経細胞領域では細胞の減少が見られた。以上の結果から、*in vitro* で観察された神経細胞の高い放射線感受性は、組織中でも観察されることが明らかとなった。

放射線障害において、神経幹細胞と神経細胞は同様の DNA 修復動態を持つにもかかわらず、抵抗性が異なることが明らかになった。神経幹細胞で見られる一過的な caspase-3 活性化とその消失が DNA 損傷を受けた細胞の生存に有利に働く可能性がある。今回の研究により、細胞運命を決定する、新規の caspase-3 機能が示唆された。

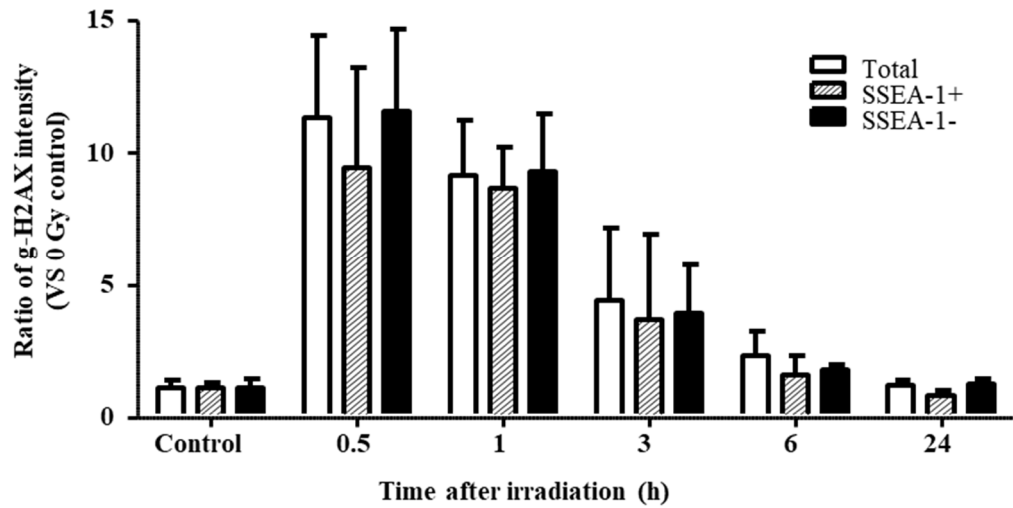


図 1. フローサイトメトリー解析による胎児線条体の DNA 修復動態。E14.5 マウスに子宮内で 2Gy の放射線を照射した。照射後、線条体を順次摘出・懸濁し、抗 SSEA1 ab および抗 -H2AX ab で免疫した。エラーバーは、4 匹の同腹マウスによる独立した 3 回の実験から求められた。

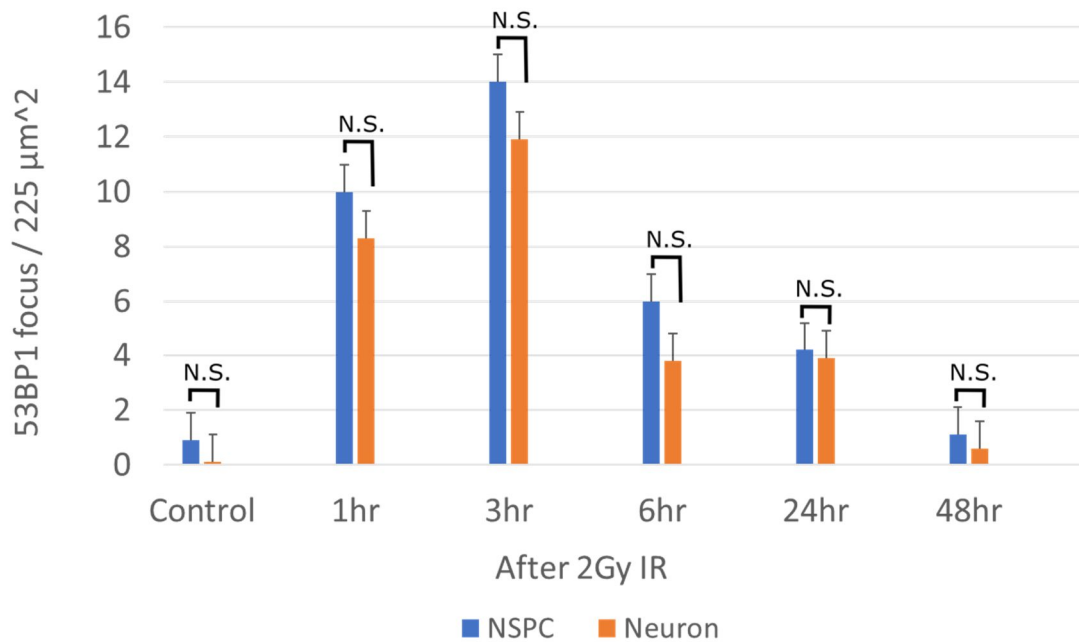


図 2. 線条組織免疫染色解析による胎児線条体の DNA 修復動態。E14.5 マウスに子宮内で 2Gy の放射線を照射した。照射後、線条体を順次摘出・懸濁し、抗 b3-tubulin ab および抗 53BP1 ab で免疫した。エラーバーは、4 匹の同腹マウスによる独立した 3 回の実験から求められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北畠涼、白石一乗、児玉靖司
2. 発表標題 マウス胎児脳組織におけるX線誘発DNA2本鎖切断とアポトーシスの解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白石 一典、尾家 彩加、北畠 涼、児玉 靖司
2. 発表標題 被ばく胎児マウス脳組織における神経幹細胞および神経細胞死の動態解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------