

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651019

研究課題名（和文）神経幹細胞を用いた放射線生体影響評価系の確立

研究課題名（英文）Establishment of an assay system for biological effect of radiation using neural stem cells

研究代表者

児玉 靖司 (KODAMA SEIJI)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：00195744

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、幹細胞を用いた新しい放射線生体影響評価系を確立することである。そのために、マウス神経幹細胞を含むニューロスフェア細胞を用い、対照としてマウス線維芽細胞を用いた。ニューロスフェア細胞は、線維芽細胞よりも放射線によるDNA2本鎖切断の修復速度が速いという特徴がみられた。そこで、ニューロスフェア細胞を長期継代培養することにより、神経幹細胞の特徴を有した不死化細胞株の樹立を試みた。その結果、神経幹細胞の特徴をよく保持し、2倍体の染色体構成を示すマウス不死化ニューロスフェア細胞株の樹立に成功した。

研究成果の概要（英文）：To establish an assay system for biological effect of radiation using neural stem cells, we used mouse neurosphere cells that contain neural stem cells, and fibroblast cells as a control. Neurosphere cells showed faster repair kinetics for DNA double strand breaks than fibroblast cells. To establish immortal neurosphere cell lines, we subcultured the neurosphere cells by successive transfer until the cells exceeded 100 population doubling numbers. Finally, we immortalized several mouse neurosphere cell lines that retained diploid karyotype and characteristics of neural stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：神経幹細胞、放射線生体影響、ニューロスフェア、不死化、2倍体細胞

## 1. 研究開始当初の背景

（1）放射線による生体影響で重要な課題は、発がんへの影響をどのように評価するかである。この点において、幹細胞を放射線影響評価に用いる試みは重要である。その理由は、幹細胞そのものが発がんの起源になることが実験的に示されていること、また、がん細

胞のなかに、幹細胞様の性質を示す細胞、すなわち、がん幹細胞が存在することが明らかになってきたからである。

（2）幹細胞が発がんリスクを評価する上で決定的に重要であることは明らかになってきたにもかかわらず、これまで幹細胞を放射線の標的として用いる生体影響評価実験系

は確立されてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、幹細胞を用いた新しい放射線生体影響評価系を確立することである。その目的のために、神経幹細胞を含む細胞集団が無血清培地中でスフェア状に増殖することによって形成されるニューロスフェア細胞を実験に用いた。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞

14.5日齢のICRマウス胎児脳組織を培養系に移して無血清培地中で培養することにより、ニューロスフェア細胞を得た。対照として、マウス胎児線維芽細胞を、10%牛胎児血清添加培地で培養して用いた。

### (2) DNA 修復能

X線照射後、DNA2本鎖切断の修復能をリン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ -H2AX) フォーカス形成、及びcalyculin A添加により誘発した未成熟染色体凝縮 (PCC) により調べた。

### (3) 長期継代培養による細胞の不活化

一定数の細胞を一定面積 (25cm<sup>2</sup>) のフラスコに植え込んで、3日毎、5日毎、及び10日毎に継代する方法で長期継代培養した。

### (4) 染色体解析

長期継代培養した細胞について染色体標本を作製し、染色体数の分布を調べた。また、分裂寿命が延長したニューロスフェア細胞から2倍体細胞をクローニングし、染色体数の安定性を解析した。

### (5) 放射線感受性解析

初代ニューロスフェア細胞、不活化ニューロスフェア細胞、及び初代線維芽細胞について、コロニー形成法によりX線感受性を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) ニューロスフェア細胞のDNA修復能

ニューロスフェア細胞、及び線維芽細胞に1GyのX線を照射後、0.5、1、3、6、及び12時間後に細胞をスライドグラス上に固定して、細胞当たりの $\gamma$ -H2AXフォーカス数を計測した。その結果、X線照射直後0.5-1-3-6-12時間後の平均フォーカス数は、ニューロスフェア細胞では、22.1-15.9-13.8-12.5-8.9-5.1個であったのに対し、線維芽細胞では、30.9-33.1-29.7-17.7-12.4-8.0個であり、いずれの時点でもニューロスフェア細胞の方が少ないことがわかった。特に、ニューロスフェア細胞では、1時間以内に62%までフォーカス数が減少しているのに対して、線維芽細胞では、1時間以内では全くフォーカス数が減少していない点が大きな差であることがわかった。同様の結果は、calyculin A誘発PCCによる染色体

断片数の解析でも得られた。PCC解析では、3GyのX線照射直後-1-3時間後の細胞当たりの平均染色体断片数を計測し、ニューロスフェア細胞では、18.7-12.1-9.3個であったのに対し、線維芽細胞では、19.0-17.4-11.2個であった。以上の結果は、両細胞では1時間以内の修復能に差があり、ニューロスフェア細胞は、線維芽細胞に比べて修復が速いことが明らかになった。

### (2) 長期継代培養による細胞の不活化

線維芽細胞、及びニューロスフェア細胞を3日毎に継代培養した場合 (図1, A)、前者は約8集団倍加数 (PDN) で、また、後者は20-30PDNで増殖停止となり老化した (図1, B, C)。この結果は、この条件下でニューロスフェア細胞は、線維芽細胞より分裂寿命が3-4倍長いことを示している。

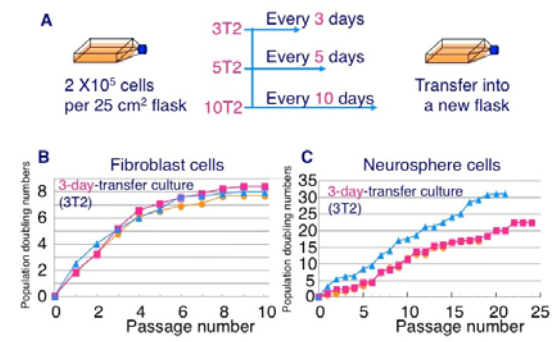


図1 継代培養法と3日毎の継代培養による集団倍加数の変化 A, 細胞を3日毎 (3T2)、5日毎 (5T2)、及び10日毎 (10T2) に継代した。B, 3日毎に継代した線維芽細胞のPDNを示した。C, 3日毎に継代したニューロスフェア細胞のPDNを示した。

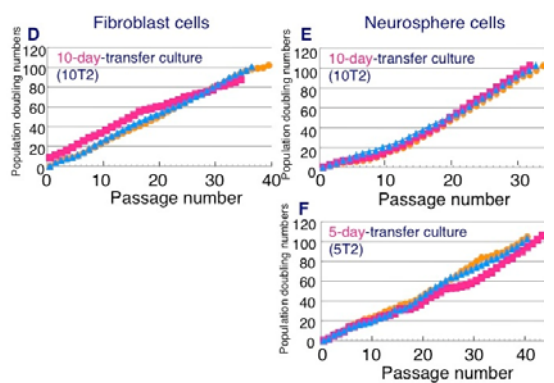


図2 5日毎、及び10日毎の継代培養による集団倍加数の変化 D, 10日毎に継代した線維芽細胞のPDNを示した。E, 10日毎に継代したニューロスフェア細胞のPDNを示した。

F, 5日毎に継代したニューロスフェア細胞のPDNを示した。

さらに、ニューロスフェア細胞を、5日、及び10日毎、線維芽細胞を10日毎に継代培養したところ、どちらの細胞も3日毎の継代培養で示した分裂寿命よりはるかに延長した。いずれの継代培養も、それぞれ3系統の細胞を独立に培養したが、全ての系統で100PDNを超えた(図2, D, E, F)。そこで、いずれも不死化したと判断した。

### (3) 長期継代培養に伴う染色体数の変化

10日毎に継代した線維芽細胞では、40PDNの時点で、95%の細胞の染色体数が4倍体域に移行していた。これに対して、ニューロスフェア細胞では、54PDN(10日毎の継代)、あるいは75PDN(5日毎の継代)の時点で、50~60%の細胞の染色体数が2倍体域に分布していた。しかし、その後100PDNを超えた時点では、約80%の細胞の染色体数が4倍体域に移行することが分かった。そこで、2倍体を示す不死化ニューロスフェア細胞を樹立するために、5日毎の継代細胞の67PDNの時点で2倍体を保持したニューロスフェア細胞を7種(クローンA~G)分離し、その性質を調べた。

### (4) 2倍体を保持した不死化ニューロスフェア細胞の性質

#### ①染色体安定性

分離したクローン性細胞7種のうち5種(71%)は、100PDNを超えても80%以上の細胞で染色体数が2倍体を保持していた(表1)。

表1 分離したクローン性ニューロスフェア細胞中の2倍体細胞の割合

クローン (n=7)	2倍体細胞 (2n=40±2)(%)	
	84~92 PDN	104~137 PDN
A	86	78
B	92	53
C	90	86
D	96	66
E	92	84
F	94	86
G	78	89

PDN: 集団倍加数

このことは、2倍体の染色体構成を示す不死化ニューロスフェア細胞株の樹立に成功したことを示している。

#### ②幹細胞マーカー、分化能、放射線感受性

2倍体不死化ニューロスフェア細胞におい

て、幹細胞の性質が保持されているのかを調べるために、幹細胞マーカーであるCD133を発現している細胞の頻度を調べた。その結果、7種の2倍体細胞において、CD133発現陽性細胞の割合は、1.0~7.4%であり、初代ニューロスフェア細胞における1.7%と同等かそれ以上を示すことが分かった。さらに、1つの2倍体不死化細胞株(クローンA)について分化能を調べたところ、95%がグリア細胞への分化能を有していた。さらに、別の2倍体不死化細胞株(クローンC)についてX線感受性を調べたところ、 $D_0$ 値が1.1Gyであり、初代ニューロスフェア細胞と同じ放射線感受性を示すことが分かった(図3)。

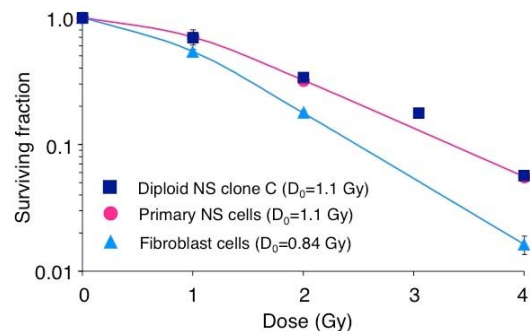


図3 X線感受性

2倍体不死化ニューロスフェア(NS)細胞と初代ニューロスフェア(NS)細胞のX線感受性をコロニー形成法で調べた。対照として、初代線維芽細胞を用いた。 $D_0$ 値は、不死化NS細胞と初代NS細胞がともに、1.1Gyであり、線維芽細胞が0.84Gyを示した。

以上の結果は、樹立した2倍体不死化ニューロスフェア細胞の染色体構成が安定で、しかも神経幹細胞の特徴をよく保持しており、放射線生体影響の評価系に用いるのに有用であることを示している。

### (5) 成果の国内外における位置づけとインパクト

国内外において、神経幹細胞を含むニューロスフェア細胞を用いて放射線応答を解析した研究はこれまでに無い。さらに、神経幹細胞の性質を保持した2倍体マウスニューロスフェア細胞の不死化に成功したのは世界で本研究が初めてである。したがって、本研究で得られた成果は、極めて新規性が高いと評価できる。

### (6) 今後の展望

①2倍体不死化ニューロスフェア細胞株が保持している神経幹細胞の特性を解析し、初代ニューロスフェア細胞との相違点を明ら

かにする。

- ②2 倍体不死化ニューロスフェア細胞株の核型を詳細に調べ、どのような染色体変異があるのかを明らかにする。
- ③2 倍体不死化ニューロスフェア細胞株を用いて、特に放射線応答に着目し、幹細胞がどのような特徴を示すのかを明らかにする。

(7) まとめ

神経幹細胞の特徴を保持し、2 倍体の染色体構成を示すマウス不死化ニューロスフェア細胞株の樹立に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Suzuki, K., Yamaji, H., Kobashigawa, S., Kawauchi, R., Shima, K., Kodama, S., and Watanabe, M. Epigenetic gene silencing is a novel mechanism involved in delayed manifestation of radiation-induced genomic instability in mammalian cells. *Radiat. Res.*, 175, 416-423, 2011 (査読有) .
- ② Suzuki, K., Kodama, S., and Watanabe, M.: Role of Ku80-dependent end-joining in delayed genomic instability in mammalian cells surviving ionizing radiation. *Mutat. Res.*, 683, 29-34, 2010 (査読有) .

[学会発表] (計 19 件)

- ① “Radiation response of mouse neural stem cells”, Seiji Kodama, Kazunori Shiraishi, Takashi Teramoto, Kae Imanishi, Yasuyuki Harajo, Mizuki Toda, and Masayuki Hara, The Sugahara Memorial International Symposium (January 25-26, 2012, Kyoto)
- ② “Characterization of biological response to ionizing radiation in mouse neural stem cells”, Seiji Kodama, Kazunori Shiraishi, Takashi Teramoto,

Kae Imanishi, and Masayuki Hara, 14th International Congress of Radiation Research (August 28-September 1, 2011, Warsaw, Poland).

- ③ 「放射線被ばくした染色体を介した染色体不安定性」, 児玉靖司, 白石一乗, 押村光雄, 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋市)
- ④ 「UVA 照射染色体移入による染色体不安定性の誘発」, 漆原あゆみ, 児玉靖司, 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋市)
- ⑤ 「マウス神経幹細胞における放射線応答」, 児玉靖司, 白石一乗, 寺本敬志, 今西香絵, 原正之, 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市)
- ⑥ 「2 倍体を示すマウス不死化ニューロスフェア細胞の樹立」, 今西香絵, 白石一乗, 原正之, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市)
- ⑦ 「ヒト線維芽細胞における低線量放射線超感受性に関する解析」, 岩井明乃, 白石一乗, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市)
- ⑧ 「テロメア配列を含む RNA 分子 (TERRA) の発現に対する X 線及び紫外線の影響」, 徐子牛, 白石一乗, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市)
- ⑨ 「神経幹細胞における選択的染色体分配に対する放射線影響」, 原條靖之, 白石一乗, 原正之, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市)
- ⑩ 「定量的テロメア FISH 法によるテロメア不安定化の評価」, 塚本淳, 白石一乗, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市)
- ⑪ 「染色体不安定性誘発における紫外線の影

響」, 漆原あゆみ, 児玉靖司, 横谷明德, 日本放射線影響学会第 54 回大会 (2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市)

- ⑫ “ Transmission of Chromosomal Instability via a Chromosome Irradiated with Ionizing Radiation”, Seiji Kodama, Masateru Tanabe, Kazunori Shiraishi, and Mitsuo Oshimura, 7th International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas (November 24-26, 2010, Navi Mumbai).
- ⑬ 「UVA 照射染色体移入による遺伝子不安定性誘発の解析」, 漆原あゆみ, 児玉靖司, 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月 22-24 日, 大阪市)
- ⑭ 「マウス神経幹細胞における選択的染色体分配」, 児玉靖司, 白石一乗, 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月 22-24 日, 大阪市)
- ⑮ 「非 2 重鎖切断型損傷による遺伝的不安定性の誘発」, 漆原あゆみ, 児玉靖司, 横谷明德, 日本放射線影響学会第 53 回大会 (2010 年 10 月 20-22 日, 京都市)
- ⑯ 「マウス神経幹細胞における放射線損傷応答の解析」, 寺本 敬志, 白石一乗, 原正之, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 53 回大会 (2010 年 10 月 20-22 日, 京都市)
- ⑰ 「放射線誘発染色体不安定性と染色体内再構成との関係」, 田辺正輝, 白石一乗, 縄田寿克, 押村光雄, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 53 回大会 (2010 年 10 月 20-22 日, 京都市)
- ⑱ 「マウスニューロスフェア形成細胞を用いた細胞不死化の試み」, 今西香絵, 白石一乗, 原正之, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 53 回大会 (2010 年 10 月 20-22 日, 京都市)
- ⑲ 「放射線適応応答時の骨髄細胞における

p53 関連遺伝子の発現解析」, 岡島藤也, 白石一乗, 児玉靖司, 日本放射線影響学会第 53 回大会 (2010 年 10 月 20-22 日, 京都市)

[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・放射線生物学研究室のホームページ:

<http://chokai.riast.osakafu-u.ac.jp/~hosuya6/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・大学院理学系研究科・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・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号: 40347513