

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791395

研究課題名（和文） 放射線照射で誘導される骨髄細胞と小脳神経細胞融合の生理学的意義の解明

研究課題名（英文） The study of Migration of Bone Marrow Derived Microglia (BMDM) to the Cerebellum in Adult Mice induced by Cranial Irradiation.

研究代表者

神沼 拓也 (KAMINUMA TAKUYA)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：60599538

研究成果の概要（和文）：

近年の報告で、成熟脳に見られるミクログリアは胎生8日以前に卵黄嚢で生産されるマクロファージに由来し、出生後の骨髄造血幹細胞はミクログリアの供給に関与していない事が示されている。一方で、全身照射を受けたマウス脳において、骨髄から脳内に移行してミクログリア様の性質を示す細胞（BMDM）の存在が確認されている。本研究では成熟マウスに前処置の後 GFP 標識された骨髄細胞を移植した。骨髄移植から4週間後、頭部照射群には頭部に13 Gyを照射し、対象群(n=5)は照射せずに経過を観察し、8週間後に小脳のBMDMの有無を観察したところ、骨髄からの移行を示唆するGFP陽性細胞は、頭部照射群では小脳にびまん性に認められたが、対照群ではほとんど認められなかった。このことからBMDMは頭部への照射のみで誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies have shown that adult microglia derived from primitive myeloid progenitors arising prior to embryonic day 8, and postnatal hematopoietic progenitors little contribute to microglia homeostasis in the brain of adult mice. On the other hand, some studies have suggested that “whole body irradiation” induced migration of bone marrow cells like microglia (BMDM) to the brain. Donor bone marrow cells (BM) were obtained from transgenic mice expressing the enhanced GFP. The GFP expressing BM cells were transplanted into adult mice. Four weeks after the BM transplant, one group received cranial irradiation of 13 Gy (n = 5), while another group was observed without irradiation (n = 5). Eight weeks after the cranial irradiation, 50- μ m vibratome sections of the brain were obtained. In the sections of the group received whole body and cranial irradiation, GFP-expressing cells were present diffusely throughout the cerebellum. In contrast, only a few GFP-expressing cells were detected in the group received just whole body irradiation. Our results suggest that cranial irradiation, not whole body irradiation, induces migration of peripheral BMDM to the brain in adult mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経生理

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線、神経細胞、ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは脳内の免疫機構を担う細胞であり、神経変性疾患や脳腫瘍の予防・治療において重要な役割を担っている可能性が示唆されている[1]。

近年の報告では、成熟脳に見られるミクログリアは、胎生8日以前に卵黄嚢で生産されるマクロファージに由来しており、出生後は骨髄造血幹細胞はミクログリアの供給に関与していない、という事が示されている[2]。一方で、全身照射を受けたマウスの脳において、骨髄から脳内に移行してミクログリア様の性質を示す細胞(=Bone Marrow Derived Microglia; BMDM)の存在が確認されている[3]。

さらにこの現象は、骨髄移植の前処置として全身照射を受けたヒトの脳においても報告されている[4]が、詳細は明らかとなっていない。

[1]Wake. et al. J. Neurosci., 29 (2009) 3974-3980.

[2]Ginhoux F, et al. Science., 330 (2010) 841-845.

[3]Priller J. et al. Nat Med., 7 (2001) 1356-1361.

[4]Weimann JM, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (2003) 2088-2093.

2. 研究の目的

ミクログリアを効率的に誘導する方法があれば、現在有効な治療法が確立されていない神経変性疾患や脳腫瘍に対して、新たな治療法や予防法の開発につながると考えられる。そのため、本研究では、頭部(脳)への照射でBMDMが脳内に誘導されるかについて、マウスを用いて検討した。

3. 研究の方法(図1)

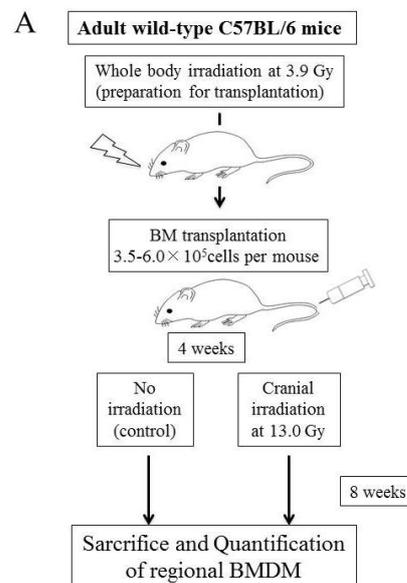
成熟 C57BL/6 マウスと murine stem cell

virus-based retroviral vector により green fluorescent protein (GFP) 標識を施した骨髄細胞を用いた。

まず、骨髄移植の前処置として、全身に 3.9 Gy の照射 (200kV X-ray, 1.3 Gy/min) を行った。

次に、経静脈的に GFP 標識された骨髄細胞を、一匹あたり $3.5-6.0 \times 10^5$ 個移植した。

骨髄移植から4週間後にマウスを頭部追加照射群 (n=5) と対象群 (n=5) に群分けを行った。頭部追加照射群に対しては頭部に更に 13 Gy を照射し、対照群に対しては追加照射はせずに経過を観察した。



(図1)

頭部照射から8週間後に全てのマウスを屠殺し、50 μmの厚さで脳標本薄切を作成した。ミクログリアの標識として Iba1 抗体を用い、まず一次抗体として Iba1 を1晩用い、その後二次抗体で1時間の染色を行った。標本の観察は共焦点顕微鏡を用いて行い、小脳の BMDM の有無を観察した。

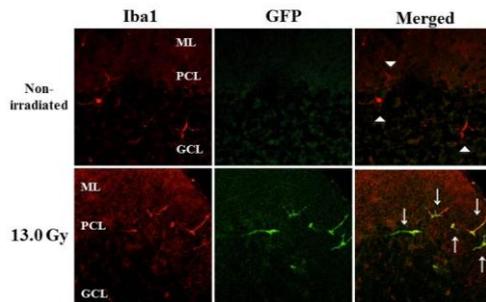
4. 研究成果

骨髄移植による移植片対宿主反応 (Graft-versus-host disease : GVHD) は認められなかった。

Iba-1 陽性のミクログリアは全ての標本の小脳に広く散財していた。

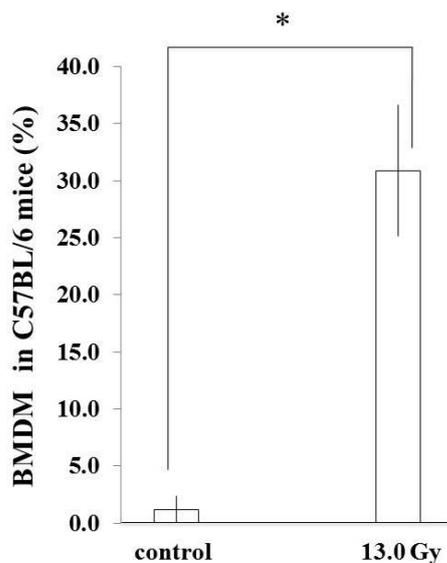
全身照射に加え全脳照射を施行した頭部照射追加群では、GFP で標識された細胞が小脳でびまん性に認められた。

一方で、全脳照射を追加しなかった対照群では GFP で標識された細胞はほとんど認められなかった。(図 2)



(図 2)

Iba-1 陽性ミクログリアに対する GFP 標識ミクログリアの割合は、頭部照射追加群では $33.0 \pm 3.8\%$ であったのに対し、対照群は $2.0 \pm 2.3\%$ であり、統計学的に有意差を認めた ($p < 0.001$)。(図 3)



(図 3)

本研究の結果からは、全身照射ではなく頭部への照射により BMDM は脳へ誘導されることが示された。

本研究で行った頭部への 13Gy の照射は、ヒトに対して実臨床でも使用可能な線量である。

より効率的な誘導法を検証する必要があるが、将来的に頭部への放射線治療で神経変性疾患などが治療できるようになる可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① N. Okonogi, T. kaminuma、Cranial irradiation induces migration of bone marrow derived cells to the cerebellum and their differentiation into microglia in adult mice, 11th International Stereotactic Radiosurgery Society Congress, 2013. 6. 18, Sheraton Center (トロント、カナダ)

② 小此木範之、神沼拓也、頭部への X 線照射による Bone Marrow Derived Microglia (BMDM) の誘導、第三回 国際放射線神経生物学学会大会、2013. 1. 26、万国津梁館 (沖縄県)

③ N. Okonogi, T. kaminuma、Cranial Irradiation Induces Migration of Bone Marrow Derived Microglia (BMDM) to the Cerebellum in Adult C57BL/6 Mice、2012. 10. 29、Boston Convention and Exhibition Center (ボストン、アメリカ合衆国)

④ 小此木範之、神沼拓也、頭部への X 線照射による Bone Marrow Derived Microglia (BMDM) の誘導、第 50 回 日本放射線腫瘍学会 生物部会学術大会、2012. 6. 30、カルチャーリゾートフェストーネ (沖縄県)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神沼 拓也 (KAMINUMA TAKUYA)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：60599538

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし