

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893030

研究課題名(和文)放射線脳壊死の発症機序解明における神経幹細胞および分化細胞の関与についての研究

研究課題名(英文)The measurement of cell death in human neural stem cells and glioblastoma cells

研究代表者

磯野 真由 (Isono, Mayu)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・研究員

研究者番号：90713511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では放射線照射後のネクローシス及びアポトーシスの誘導について、神経幹細胞と脳腫瘍細胞を比較した。神経幹細胞または脳腫瘍細胞に対してX線照射し、Acridine Orange及びEthidium Bromideの二重染色によってネクローシスとアポトーシス細胞の割合を測定した。その結果、神経幹細胞はアポトーシスによる細胞死の亢進が認められた。一方で脳腫瘍細胞はアポトーシスに対して抵抗性であった。また、神経幹細胞ではp53のリン酸化の亢進が認められた。さらに、バystander効果について解析したところ、神経幹細胞におけるX線誘発のアポトーシスの多くは直接効果によるという予備的な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the level of IR-induced cell death in neural stem and glioblastoma cells. To measure the type of cell death, i.e. necrosis and apoptosis, after IR, we carried out Acridine Orange and Ethidium Bromide assay. We observed that neural stem cells show greater IR sensitivity than glioblastoma cells. Importantly, neural stem cells preferentially undergo apoptosis after IR. Further, we observed greater p53 phosphorylation in neural stem cells compared with that in glioblastoma cells. In addition, we performed a preliminary study on the effect of bystander in these cells. We found less effect of bystander in terms of cell death in neural stem cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：神経幹細胞 脳腫瘍細胞 ネクローシス アポトーシス 放射線

1. 研究開始当初の背景

近年、日本の放射線治療は定位放射線治療を始め陽子・重粒子線治療等の先進的かつ革新的技術を次々に導入することで、癌治療成績を大きく改善し世界各国からも非常に高い評価を得ている。しかし一方で放射線療法の欠点は癌細胞特異性が低く、周辺正常細胞へのダメージを回避できないことであり、癌細胞特異的かつ低線量でも効果を発揮するための増感方法の開発が常に期待されている。

上記の理由から脳腫瘍に対する放射線治療の改善はこれまで多く試みられているが、未だ治療法として大きな改善は得られていない。その一つの理由に正常組織への放射線障害(脳壊死)の誘発が挙げられる。脳壊死は特に高線量の放射線照射により誘発することが報告されており、X線やγ線、陽子線だけでなく生物学的効果の高い重粒子線治療においても問題となると言われている。したがって、今後の脳腫瘍に対する放射線治療において、副作用緩和の治療法を考える上でも、放射線による脳壊死の誘発機序を明らかにすることは重要であると考えた。

脳壊死のメカニズムは、脳を構成する神経幹細胞やオリゴデンドロサイトの放射線による影響、血管やサイトカインの発現変化が関係していると考えられてきた。近年では、未熟な神経細胞に対する放射線の影響が関与しているという報告もある。また、放射線抵抗性として知られている成熟した神経細胞において、高線量放射線による細胞の形態変化に伴い、機能への影響を示唆する報告もある。このように、放射線が神経系細胞に影響を及ぼすことは明らかにされつつあるが、放射線によって脳壊死が誘発されるメカニズムは未だ明らかにされていない。

脳は、主に神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという3種類の細胞から構成されており、これらの細胞は神経幹細胞が分化することによって産生される。神経幹細胞は胎生期の脳だけでなく、成体期の脳でも存在していることが分かっている。申請者は以前に、X線照射後の神経幹細胞の増殖能と分化能への影響について研究を行いその成果を発表している。本研究では、X線照射を受けた神経幹細胞の増殖停止への影響を、細胞死の形態及びその分子メカニズムに着目した。

2. 研究の目的

脳壊死は、特に高線量の放射線照射により誘発することが報告されており、X線やγ線、陽子線だけでなく生物学的効果の高い重粒子線でも問題となる。したがって、脳腫瘍に対する放射線治療時の副作用緩和を考える上で、放射線による脳壊死の誘発機序を明らかにすることは重要であると考えた。

3. 研究の方法

X線を用いて、ヒト神経幹細胞(hNSCs)及び腫瘍細胞(A172)における増殖曲線を作成し、放射線感受性の違いを検討した。次に増殖曲線より得られた結果から、照射線量を設定し、Acridine Orange / Ethidium Bromideの二重染色によりネクロシス及びアポトーシスを検出し、それぞれの細胞死の誘発率を測定した。また神経幹細胞及び腫瘍細胞における細胞死シグナルを測定するため、p53及びATMのリン酸化レベルをウエスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

1) 神経幹細胞及び腫瘍細胞におけるX線照射後の増殖曲線の比較
放射線照射後の細胞生存率は、従来コロニー形成アッセイにより測定する。しかしながら、神経幹細胞はコロニー形成能が低く、特に放射線照射後にはほとんどコロニー形成能を失う。そのため本研究では、放射線照射後の細胞数を継時的にカウントすることにより増殖曲線を測定した。その結果、神経幹細胞におけるX線照射後の細胞増殖率は、脳腫瘍細胞と比較し有意に低下していた(図1)。

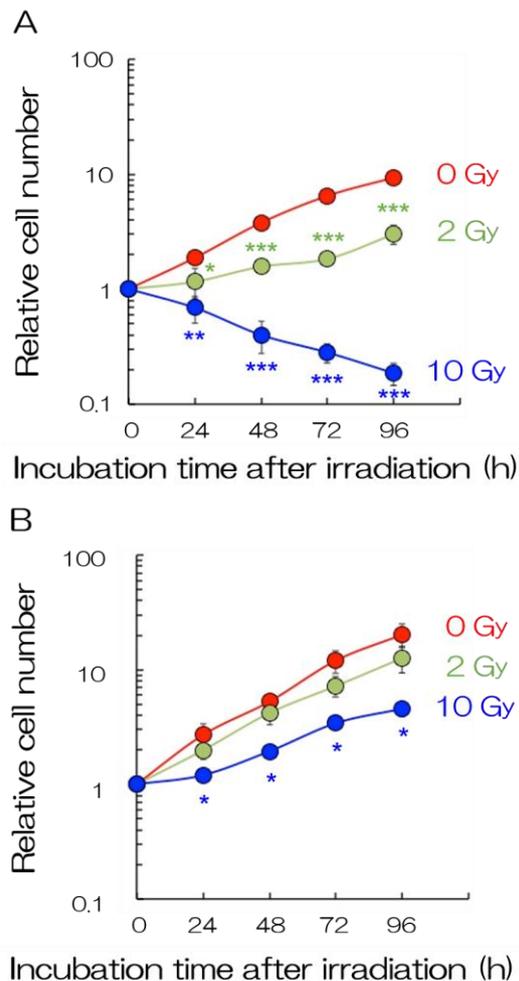


図1. X線照射後の増殖曲線

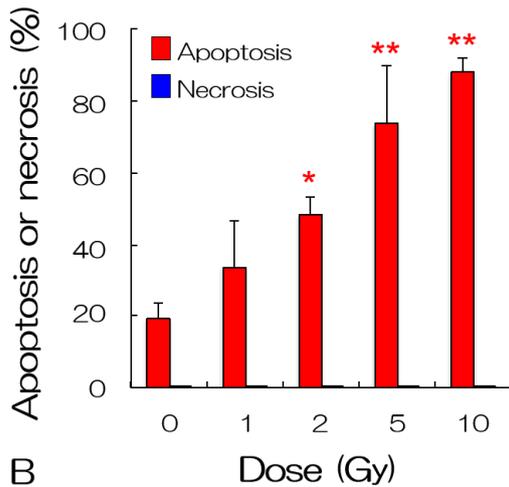
A: 神経幹細胞、B: 腫瘍細胞

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 、非照射細胞との比較

2) ネクロシス及びアポトーシス頻度の比較

X線照射を受けた神経幹細胞の増殖曲線の低下が、細胞死によるものかどうかを調べるため、Acridine Orange / Ethidium Bromide の二重染色による細胞死検出実験を行った。その結果、神経幹細胞はその多くがアポトーシスによる細胞死であることが明らかになった (図2)。

A



B

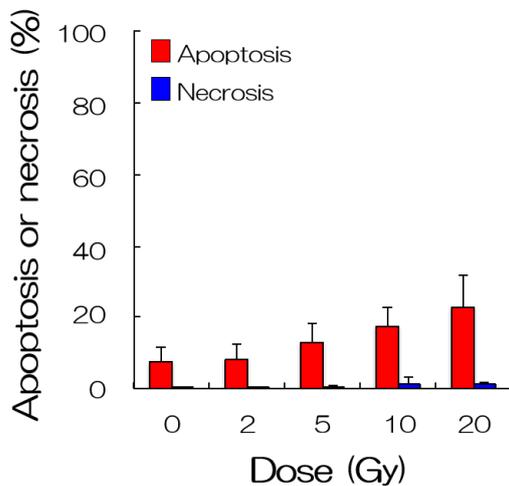


図2. X線照射後72時間でのアポトーシス及びネクロシス誘発率

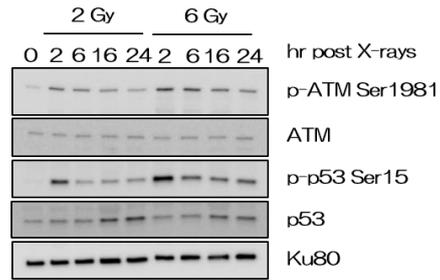
A: 神経幹細胞、B: 腫瘍細胞

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、非照射細胞との比較

3) p53 Ser15及びATM Ser1981のリン酸化解析

X線照射後の神経幹細胞及び腫瘍細胞におけるDNA損傷シグナルを検討するため、p53 Ser15及びATM Ser1981のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより解析した。その結果、細胞死のデータと一致して、神経幹細胞においてp53及びATMのリン酸化が有意に上昇していた (図3)。

A



B

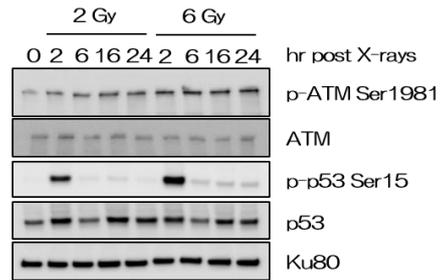


図3. X線照射によるDNA損傷シグナルの検出

A: 神経幹細胞、B: 腫瘍細胞

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) Mayu Isono, Yukari Yoshida, Akihisa Takahashi, Takahiro Oike, Atsushi Shibata, Yoshiki Kubota, Tatsuaki Kanai, Tatsuya Ohno, and Takashi Nakano. Carbon-ion beams effectively induce growth inhibition and apoptosis in human neural stem cells compared with glioblastoma A172 cells. *J. Radiat. Res.*, 2015.5.20 accepted. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 磯野真由、吉田由香里、八高知子、高橋昭久、尾池貴洋、柴田淳史、久保田佳樹、金井達明、大野達也、中野隆史、増殖率と細胞死を指標としたヒト神経幹細胞と神経膠芽腫細胞におけるX線と炭素線の感受性、第5回国際放射線神経生物学会 (招待講演)、群馬県、2015年2月21日

② 磯野真由、吉田由香里、八高知子、高橋昭久、尾池貴洋、柴田淳史、金井達明、大野達也、中野隆史、神経幹細胞および神経膠芽腫における増殖率を指標としたX線および炭素線の感受性、第57回日本放射線影響学会、鹿児島県、2014年10月3日

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://heavy-ion.showa.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯野 真由 (ISONO, Mayu)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・研究員

研究者番号：90713511

(2)研究分担者 該当なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 該当なし
()

研究者番号：