

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29日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650076

研究課題名（和文）放射線感受性による神経細胞分化の脳内マッピング

研究課題名（英文） Mapping of the developmental stages of neurons in the brain using the radiosensitivity as an index.

研究代表者

白尾 智明 (SHIRAO TOMOAKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20171043

研究成果の概要（和文）：

10週齢のWistarラット頭部の片側のみに10 GyのX線を照射し、照射2日後の脳室下帯から嗅球あるいは梨状葉に向かう新生神経細胞の移動経路と海馬歯状回を免疫組織化学法により解析し、「神経細胞における放射線感受性は、成熟過程のある分化段階を境として、all or none 的に変化する」ことが示唆された。本成果を応用して、照射後の細胞数の減少を指標として、脳内の神経細胞の成熟マップの作成を目指したが、細胞移動のスピードを考慮する必要が出現し、未だ作成途上である。

研究成果の概要（英文）：

Hemispheres of 10-week-old rat brains were irradiated by 10-Gy Xray. Then after two days, we analyzed immunohistochemically the newly-generated migrating neurons to find whether they were survived in the rostral migratory stream from the subventricular zone to the olfactory bulb or to the piriform cortex, and in the hippocampal dentate gyrus. Consequently it was suggested that the radiosensitivity of neurons were determined in an all-or-none manner when those before and after an certain developmental stages were compared with each other. Although this result further had suggested that the decrease of the cell number after the irradiation might be used as an index of the developmental stage of each neuron, it was difficult to be accomplished until the migrating speed of neurons would be clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：放射線神経生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：成熟脳神経細胞分化、放射線、神経細胞移動、アクチン、ドレブリン、ダブルコルチン

1. 研究開始当初の背景

細胞の放射線感受性は一般的には分裂能の有無により all or none 的に感受性が変化する

ることが知られている。しかし我々は、神経細胞は最終分裂終了後もしばらくの間は放射線感受性が比較的高いままであることを

明らかにした (Sihrai et al., 2006)。また最近、成体脳における側脳室下帯から嗅球へ移動中の新生神経細胞の放射線感受性を解析し、移動終了間際に放射線感受性が大きく変化することが示唆され、「神経細胞の分化段階を知ることができればその細胞の放射線感受性をかなり正確に予想できる」こと、またさらに、「神経細胞の放射線感受性の変化を調べることにより、その神経細胞の分化段階をかなり正確に知ることが出来る」ことを示していた。

2. 研究の目的

本研究はまず、神経細胞における放射線感受性は、成熟過程のある分化段階 X を境として、all or none 的に変化するかどうかを明らかとし、次にその研究成果を応用して、各週齢のラットにおける神経細胞の成熟過程を放射線感受性の有無により表現する三次元脳内マップを作成することを目的とした。

3. 研究の方法

X線照射: ペントバルビタールを腹腔注射 (50~100 mg/kg ラットの体重) し、全身麻酔をしたラットの痛覚反射が完全に消失後、脳定位装置 (ナリシゲ, 東京, 日本) にて固定した。そして、X線照射装置 (スタビリパン 2、シーメンス旭メディック, 東京, 日本) の下部に運び、頭部の左側のみをタテ 4 cm × ヨコ 3 cm 露出させ、その他全身に厚さ 1 cm 以上 2 cm 以下の鉛板を重ねて遮蔽した。X線は 10 Gy (0.87 Gy/分 × 11 分 40 秒) 照射した。照射後、脳定位装置から外して、元のケージに戻して回復させた。

免疫染色法: 照射 2 日後、ラットを 2.5% アバチン (50% 第三アミルアルコール, 50% トリブロモメチルアルコール) (15 ml/kg body weight) を腹腔内注射し、深麻酔後、ヘパリンナトリウム (1000 unit/kg body weight) 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (PB, pH 7.4) 50 ml をペリスタポンプを用いて、流速 10ml/min で注入した後、4% PFA 含有 0.1 M PB を 100 ml 注入して灌流固定を行った。脳摘出後、4% PFA 含有 0.1 M PB 中で後固定 (4°C, 12 h) を行った後、30% スクロース含有 0.1 M PB に置換した (4°C, 24 h)。その後、O.C.T. コンパウンドを使用し、液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。脳をクライオスタット (Leica CM3000, Leica Microsystem, Nussloch, Germany) を用いて、SGZ 及び SVZ-RMS を含む範囲を前顎断で長軸方向に、それぞれ 120 μ m、240 μ m 間隔で厚さ 10 μ m の凍結切片を作成した。また矢状断でも SVZ-RMS を含む範囲を同様に厚さ 10 μ m の凍結切片を作成した。SGZ は脳マップでブレグマ-1.34 mm から -3.64 mm (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates) に相当する範囲の切片を使用

した。SVZ、RMS はブレグマ 2.10 mm から -0.22 mm に相当する範囲の切片を使用した。また、RMS の吻側部と尾側部の区別はブレグマ 1.70 mm に相当する部位で行った。切片をシランコーティング済みのスライドガラス (武藤ガラス, 東京, 日本) 上に貼り付け、保存 (4°C, over night) した。SGZ 及び SVZ-RMS を含む切片を 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、0.1 M PBS に溶かした 0.1% Triton X-100 含有 0.1 M PBS で前処理 (15 min) し再び、0.05 M PBS で洗浄した。その後、3% ウシ血清アルブミン含有 0.1 M PBS でブロッキング (1 h) を行った後、一次抗体で一晩反応させた一次抗体は、抗 DCX 抗体、抗ドレブリン抗体 (M2F6)、抗ドレブリン A アイソフォーム特異的抗体 (DAS2) を使用した。二次抗体は、M2F6 抗体、抗ドレブリン A 抗体、抗 DCX 抗体にそれぞれ、蛍光標識抗マウス IgG 抗体 (1: 200)、蛍光標識抗ヤギ IgG 抗体 (1: 100) を使用した。

蛍光顕微鏡による画像取得: 染色した組織切片を観察するために CCD カメラ (Cool Snap fx, Photometrics, Tucson, AZ, USA) を装着した蛍光顕微鏡 (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Germany) を用いた。40 倍レンズで MetaMorph software (Meta Imaging software, Universal Imaging, West Chester, PA, USA) を用いて画像の取得を行った。画像取得の際に、側脳室の撮影は脳室の縁に沿った領域を全て含む 40 枚前後を撮影した。RMS では経路を中心にして、その周辺を含む 10 枚から 30 枚の画像を撮影した。嗅球では中心領域から顆粒細胞層までの領域を 50 枚前後の画像を撮影した。

画像解析と定量法: MetaMorph を用いて撮影した画像のうち、ドレブリン E (DE) とドレブリン A (DA) の双方を標識する M2F6 抗体で染色した画像から DA を標識する DAS2 抗体で染色した画像を差し引くことで、DE+DA-画像を作成した。細胞数を数えるに当たって、DE+DA-, DCX, DAPI のそれぞれについて、シグナル強度の最小値をモニター上でシグナルが観察しやすい値に設定し、DE+DA-を緑、DCX を赤、DAPI を青で各画像を重ね合わせた。そして Adobe Photoshop を用いて各画像を並べた後に、定量化を行なった。

定量化は DE+DA- と DCX, DAPI の三つのシグナルが重なっている細胞と、DCX と DAPI の二つが重なっている細胞の二種類を数え上げ、それぞれを移動中の新生ニューロン、成熟中の新生ニューロンとした。定量化の際、MetaMorph を用いて撮影した画像を 150% に拡大し、核マーカである DAPI の輪郭を約 1/3 以上なぞるシグナルを陽性であると判断した。また、DAPI が無いものであっても明らかに回りの細胞と同様に核の輪郭をなぞるようなシグナルを持つものは陽性であると判

断した。遮蔽側で塊状に集まって存在する場合、DAPI のシグナルから定量した。照射側では遮蔽側と同等のシグナル強度を持たないものであっても、核をなぞっていると判断できるものは陽性であると判断した。照射側で核の上に点状のシグナルが多数含まれる場合、陽性であると判断し、点状のシグナルが3、4つ程度では含めなかった。

4. 研究成果

1) 側脳室から嗅球の系における移動中の新生ニューロンはX線照射により減少した。側脳室における新生ニューロンについて、これまでに正常ラットで報告してきた (Song et al., 2008) ように、遮蔽側の側脳室では免疫組織染色によってDCX陽性でDE+DA-シグナルを持つ移動中の新生ニューロンが観察された。これら遮蔽側で多く見られた移動中の新生ニューロンは照射側では激減した。照射側で存在した移動中の新生ニューロンの細胞密度を定量化したところ 29.1 個/mm²であり、遮蔽側の細胞密度 (279.2 個/mm²) の 89.3%が消失していた。

Rostral Migratory Stream (RMS) は側脳室から嗅球までの途中経路である。ここでも遮蔽側において細胞体に DCX と DE をもつ移動中の新生ニューロン (Song et al., 2008) が数多く観察された。RMS の現在解析している領域 (Bregma 3.2~3.7 mm) は、移動中の新生ニューロンが嗅球方向に向かっているため、冠状切片では細胞体から突起を伸ばしている細胞はほとんど見られなかった。一部の DCX 陽性で DE+DA-シグナルを持たない成熟中の新生ニューロンは、単極、双極に突起を伸ばしていた。RMS の照射側の移動中の新生ニューロンは、遮蔽側に比べて激減していた。成熟中の新生ニューロンも一部存在したが、シグナル強度は低下していた。細胞体から伸びている突起は確認できないものが多かったが、一部、突起を伸ばしている細胞も存在した。また、点状のシグナルも多数残存していたが、これが新生ニューロンの突起を冠状に切ったためのものかは確認できなかった。

照射側で残存した細胞数を定量的解析したところ、移動中の新生ニューロンは、遮蔽側で 4870.9 個/mm²であり、照射側では、47.1 個/mm² で、遮蔽側の 99%が減少していることが明らかとなった。新生ニューロン全体でも、遮蔽側に比べて照射側で細胞数が大きく減少していた (遮蔽側 5399.7 個/mm²、照射側 323.1 個/mm², 94%減少) が、その中の一部の成熟中の新生ニューロンについては、減少率が低かった (遮蔽側 528.7 個/mm²、照射側 281.6 個/mm², 47%減少)。またDAPIを用いた核染色から、新生ニューロンを含むRMSにおける細胞の総数についても減少しているようだった。

RMSからの出口である嗅球の中心領域では、ほぼ全てが最終分裂後の細胞である (Altman et al., 1969)。この中心領域に存在する移動中の新生ニューロンは、側脳室からRMSを通過して移動してきた新生ニューロンである。ここでは多くの新生ニューロンが密集して存在し、一方、成熟中の新生ニューロンの存在はわずかだった。これら中心領域の新生ニューロンの核の大きさは顆粒細胞層の細胞のものより一回り小さく、球状に観察されるものが多かった。また、突起を伸ばしている細胞も多数存在し、それらの細胞体に DEシグナルは見られたが、突起にDCXシグナルだけを持つ細胞も存在した。嗅球の中心領域における照射側では、移動中の新生ニューロンはほぼ全てが消失し (遮蔽側 1882.3 個/mm²、照射側 0.0 個/mm², 100% 減少)、核の数も遮蔽側に比べて少なかった。残存した細胞は成熟中の新生ニューロンのみで、遮蔽側の 38.2%であった (遮蔽側 217.4 個/mm²、照射側 83.0 個/mm²)。

2) 顆粒細胞層では、嗅球の中心領域から放射状に移動してきた新生ニューロンより成る。この領域における細胞の大多数は、細胞体からDEを消失してDCXのみを持つものが放射状に存在した。中心領域に近くでは、DEをもつ新生ニューロンが複数見られた。この照射側では、シグナル強度の下がっている成熟中の新生ニューロンが遮蔽側とほぼ同じ数が残存した。また、照射後であってもDCXシグナル強度の強い新生ニューロンも多く見られた (図 7) これらの成熟中の新生ニューロンを定量化すると、遮蔽側で 3344.7 個/mm²、照射側 3371.1 個/mm² であり、ほぼ同密度であった。移動中の新生ニューロンは遮蔽側で、照射側ではほとんど見られなかった (遮蔽側 145.4 個/mm²、照射側 0.0 個/mm²)。

3) 海馬における新生ニューロンは照射側でほとんど見られなかった。成体脳でニューロン新生が生じるもう一つの場合として海馬歯状回がある。これまでに海馬歯状回において、DCX と DE の両方を持つ新生ニューロンが顆粒細胞下において存在し、DCX 陽性の新生ニューロンが顆粒細胞層で先端樹状突起を伸ばして存在することを示した。照射側においてこれらの新生ニューロンは DE 陽性細胞、DCX 陽性細胞の両方とも消失していた。

4) 嗅皮質ではX線照射側でも移動中の新生ニューロンが多く見られた
これまでに我々は嗅皮質において DCX のみを持つ神経細胞と、DE と DCX の両方をもつ神経細胞がいることを示しており、この DE 陽性細胞は移動中の新生ニューロンであると考えられる。照射側においてこれら移動中の新

生ニューロンはDCX陽性の細胞とともにいくつか確認された。DE陽性細胞の形態は、多数突起を伸ばしている細胞や、突起のない、または短い突起を単極や双極に伸ばしている細胞などが残存していた。これらの照射側で存在したDE陽性細胞は、遮蔽側に比べて数は少し減少しているが、シグナル強度は高いものが多かった。

以上の研究により、成熟脳新生ニューロンの発達過程において、放射線感受性が急激に変化することが明らかとなった。側脳室で生じた新生ニューロンがRMSを経て嗅球の中心領域に至るまで放射線感受性が高く細胞数がX線の照射により激減した。しかし、嗅球の顆粒細胞層にまで移動して成熟し始めると放射線感受性が低くなり照射側でも細胞数は変化しなかった。この経路における新生ニューロンの放射線抵抗性の獲得は、新生ニューロンの移動停止の前後、つまり細胞体からDEを消失すること同時であると捉えることが出来る。また、その他の領域における新生ニューロンは側脳室-嗅球の系とは異なる時期に放射線感受性が変化することが明らかとなった。

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13件)

1. Tanaka K, Sato K, Yoshida T, Fukuda T, Hanamura K, Kojima N, Shirao T, Yanagawa T, and Watanabe H. "Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication." *Muscle and Nerve*, 査読有 44:968-977 2011
2. Okamoto T, Endo S, Shirao T, and Nagao S. "Role of Cerebellar Cortical Protein Synthesis in Transfer of Memory Trace of Cerebellum-Dependent Motor Learning" *J. Neurosci.* 査読有 31:8958-8966 2011
3. Kaminuma T, Suzuki Y, Shirai K, Mizui T, Noda S, Yosida Y, Funayama T, Takahashi T, Kobayashi Y, Shirao T, Nakano T. "Effectiveness of carbon-ion beams for apoptosis induction in rat primary immature hippocampal neurons" *J. Rad. Res.* 査読有 51:627-631 2010
4. Hanamura, K, Mizui T, Kakizaki T, Roppongi TR, Yamazaki H, Yanagawa Y, Shirao T. "Low accumulation of drebrin at glutamatergic postsynaptic sites on GABAergic neurons" *Neuroscience* 査読有 169: 1489-1500 2010
5. Kojima N, Hanamura K, Yamazaki H, Ikeda T, Itohara S, Shirao T. "Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood" *Neuroscience* 査読有 165: 138-150 2010

[学会発表] (計45件)

1. Y. Suzuki, M. Hino, K. Shirai, Y. Yoshida, T. Mizui, K. Hanamura, T. Shirao, T. Nakano. ASTRO' s 53rd Annual Meeting, 2011, "X ray Irradiation Induces Acute Depolymerization of Axonal and Dendritic Microfilaments in Cultured Neuron." Oct. 2-6.2011 Miami Beach, FL, (マイアミ、アメリカ)
2. 梶田裕貴、三輪美樹、児島伸彦、中村克樹、白尾智明「マーモセット脳におけるドレブリンの免疫組織化学的解析」第58回北関東医学会総会 2011年9月29日～30日 群馬大学刀城会館 (群馬県)
3. 田邊和也、山崎博幸、浅田明子、斉藤太郎、白尾智明、久永眞一「Cdk5に依存したDrebrinのリン酸化」第54回日本神経

- 化学会大会 2011年9月26日～28日
瑠璃光 (石川県)
4. 梶田裕貴、児島伸彦、白尾智明
「Newly-generated neurons are decreased in the adult hippocampus of drebrin-null mutant mice」 第34回日本神経科学大会 2011年9月14日～17日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
5. Shirao T., The Synapse-From physiology to pathology, 2011,.
“Activity-dependent accumulation of F-actin associated with drebrin A facilitates spine formation.”
September 4-7, 2011 Stresa, Italy, (ストレーザ、イタリア)
6. 白尾智明「成体脳における新生神経細胞の発達過程と放射線感受性の関連について」第20回日本定位放射線治療学会、2011年7月29日 ウィンクあいち (愛知県)
7. 梶田裕貴、白尾智明「ドレブリンノックアウトマウスを用いた海馬成体新生ニューロンの解析」神経組織の成長・再生・移植研究会 第26回学術集会 2011年6月25日 東京医科大学病院 (東京都)
8. Shirao T. “Radiosensitivity of newly-generated neurons in the adult brain” First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. January 29, 2011. 群馬大学刀城会館 (群馬県)
9. 鎌田洋輔、花村健次、山崎博幸、白尾智明「スパイン内のアイソフォーム特異的なドレブリン動態のアクチン細胞骨格による制御機構」 First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. January 29,
2011. Maebashi, Japan, 群馬大学刀城会館 (群馬県)
10. 石塚 佑太、花村健次、児島 伸彦、白尾智明、武井延之 「X線照射による脳におけるmTORシグナル及びタンパク質合成の変化」 First annual meeting of International Radiation Neurobiology, January 29, 2011. Maebashi, Japan, 群馬大学刀城会館 (群馬県)
11. Kojima N, Hanamura K, Shirao T. “Acute effect of X-irradiation on conditioned fear memory” First annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology. January 29, 2011. Maebashi, Japan, 群馬大学刀城会館 (群馬県)
- [その他]
ホームページ等
<http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
白尾 智明 (SHIRAO TOMOAKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20171043
- (2) 研究分担者
平成23年度
児島 伸彦 (KOJIMA NOBUHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80215251
- 平成22年度
花村 健次 (HANAMURA KENJI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40361365
- (3) 連携研究者
()
研究者番号：