

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550032

研究課題名(和文)胎内及び新生児被ばくマウスにおけるDNA損傷の低減メカニズムの解明

研究課題名(英文)A mechanism for the reduced DNA damage in mice irradiated in fetuses and newborns

研究代表者

児玉 靖司(KODAMA, Seiji)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00195744

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):胎内被ばくでは、成体被ばくと同程度にはリンパ球の染色体転座が増加しないことが、ヒトとマウスで報告されている。本研究は、2GyのX線に胎齢14.5日で被ばくし、6週齢に達した仔マウスとその母マウスについて、神経幹/前駆細胞に残存するDNA2本鎖切断数と染色体転座数を比較した。その結果、X線によるDNA2本鎖切断数は、被ばくした仔と母の神経幹/前駆細胞に残っておらず、両者に差はなかった。一方、X線による染色体転座数は、リンパ球だけでなく、神経幹/前駆細胞において母に比べ仔では有意( $p=0.0247$ , Yates補正法によるカイ2乗検定)に低いことが分かった。

研究成果の概要(英文):Fetal irradiation of humans and mice do not induce persistent chromosome translocations in lymphocytes similar to the level after adult irradiation. In the present study, we scored DNA double strand breaks and chromosome translocations in neural stem/progenitor cells of mice at 6 weeks of age and their mothers after they were exposed to 2 Gy of whole-body X-irradiation when the gestation period was 14.5 days. The results indicated that X-ray-induced DNA double strand breaks were not persistent in neural stem/progenitor cells of both offspring and their mothers, resulting in no difference between them. In contrast, the frequency of X-ray-induced chromosome translocations in offspring was significantly lower ( $p=0.0247$ , Chi-square with Yates' correction) than that of mothers in neural stem/progenitor cells in addition to lymphocytes.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線損傷 胎内被ばく DNA2本鎖切断 染色体転座 神経幹/前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

原爆の胎内被曝者では、母親ではみられるリンパ球中の放射線誘発染色体転座がみられないことが知られている<sup>1)</sup>。さらに、マウスでは、胎内及び新生児被ばくでも、母に比べて仔のリンパ球中の染色体転座頻度が低くなることが明らかにされている<sup>2)</sup>。一方、この放射線誘発染色体転座の消失は、ラット乳腺上皮細胞では見られないことが明らかにされている<sup>3)</sup>。これらの事実は、胎内被ばくによって生じる染色体転座の残存数は、組織によって異なる可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

上述したように、胎内被ばくにより誘発される染色体転座は、リンパ球と乳腺上皮細胞では残存頻度が異なり、前者では被ばくの影響が残らない。そこで本研究は、胎内被ばくしたマウスについて、特に神経幹/前駆細胞における DNA 損傷が被ばく後どのように推移するのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用マウスと X 線照射

B6C3F1 胎児マウスに X 線を照射後、すぐに胎児から神経幹/前駆細胞 (NSPC) を採取して 2 日間培養し、スフェア形成した細胞について、DNA2 本鎖切断 (DNA double strand breaks: DSB) 数を、核当たりのリン酸化ヒストン H2AX (-H2AX) フォーカス数を計測することによって定量した。X 線は、260kV、12mA、0.3mm Cu + 0.5mm Al フィルターの条件下、線量率 0.5Gy/min で照射した。

### (2) -H2AX フォーカスの定量的解析

マウスから得た NSPC をカバーガラスに固定し、抗 -H2AX 抗体を用いて免疫蛍光染色した。細胞核上の -H2AX フォーカスを定量するために、顕微鏡下、ステージ Z 軸を動かして動画撮影することで、3 次元的に存在するフォーカス画像全てを取得した。その後、画像解析ソフトウェア Image J を用いてフォーカスの大きさを規格化して計測し、解析者によるバラツキを最小限に抑える計測法を確立した。

### (3) 染色体転座の解析

胎齢 14.5 日の B6C3F1 マウスに 2Gy の X 線を照射し、出生後 6 週齢になった時点で、母マウスと仔マウスからそれぞれ NSPC と脾臓リンパ球を採取して培養した後、染色体標本を作成した。1 番染色体と 3 番染色体を、それぞれ FITC (緑)、及び Cy3 (赤) でラベルした whole chromosome painting (WCP)-FISH を行い、染色体転座を検出した (図 1)。

## 4. 研究成果

### (1) -H2AX フォーカスの定量的解析法確立

マウス胎児に X 線を照射し、直後に胎児から神経幹/前駆細胞 (NSPC) を採取して 2 日間培養し、抗 -H2AX 抗体を用いた免疫蛍光染色により、細胞核当たりの -H2AX フォー

カスを検出した。これらのフォーカスを顕微鏡下で観察すると、神経幹/前駆細胞の厚みのために、顕微鏡ステージ Z 軸方向のどの位置で画像を取得するかによって、フォーカス数にバラツキが生じた。そこで、このバラツキを少なくするために、Z 軸方向に画像をスキャンして全てのフォーカスを動画撮影し、その後画像解析ソフトウェアを用いてフォーカス数を数値化した。最初に検出するのに最適な蛍光強度とピクセル数を決定した。この条件下で、X 線照射による DNA2 本鎖切断 (DSB) 数の線量依存性について NSPC で検討したところ、X 線未被ばくで細胞当たり 1.6、1 Gy、2 Gy 被ばくで、それぞれ 11.2、20.3 を示し、少なくとも 2 Gy までは線量に比例してフォーカスが増加することを確認した。細胞の厚みを考慮した DSB 数の定量的検出系が確立されたので、以後はこの検出系を用いて実験を進めた。

### (2) 胎内被ばくによる DNA2 本鎖切断 (DSB) 数に関する母と仔の比較

胎齢 13.5 日、及び 14.5 日の B6C3F1 胎児マウスに X 線を 2Gy 照射し、直後に解剖して胎児由来 NSPC を採取し、2 日間培養してスフェア形成させ、細胞当たりのフォーカス数を調べた。その結果、フォーカス数は、非被ばくでは、13.5 日齢と 14.5 日齢でそれぞれ、1.1 と 1.6、2Gy 被ばくではそれぞれ 1.9 と 2.3 であった。どちらも 2Gy 被ばくで有意にフォーカス数は増加したが、13.5 日齢と 14.5 日齢胎児の NSPC に放射線感受性の差は見られなかった。次に、13.5 日齢で 2Gy 被ばくし、6 週齢に成長したマウス NSPC に残存するフォーカス数を母マウスと比較した。その結果、非被ばくでは、仔マウスと母マウス NSPC の細胞当たりのフォーカス数は、1.1 と 1.6 であり、2Gy 被ばくでは、それぞれ 0.9 と 1.4 で、どちらも胎内被ばくによる DSB は残存していなかった。すなわち、胎内被ばくにより NSPC に誘発される DSB は、被ばく直後は検出されるが 6 週間後には残っていないことが明らかになった。同様に母マウスでも被ばく 6 週間後の NSPC には DSB は残っていなかった。したがって、-H2AX フォーカス数を指標とした場合、NSPC における残存 DNA 損傷数に、母と仔マウスによる違いは見られないことが分かった。

### (3) 胎内被ばくによる染色体転座数に関する母と仔の比較

胎齢 14.5 日で 2Gy の X 線に被ばくし、生後 6 週齢になった仔とその母マウスの NSPC 並びにリンパ球について、WCP-FISH により染色体転座を調べた (図 1)。リンパ球については、100 細胞当たりの染色体転座数が母と仔でそれぞれ、 $5.3 \pm 1.2$ 、 $0.52 \pm 0.30$  であり、仔で有意に低いことが分かった ( $p < 0.0001$ 、

Yates 補正法によるカイ 2 乗検定)。NSPC については、100 細胞当たりの染色体転座数が母と仔でそれぞれ、 $2.2 \pm 0.84$ 、 $0.36 \pm 0.26$  であり、やはり仔で有意に低いことが分かった ( $p=0.0247$ , Yates 補正法によるカイ 2 乗検定)。以上の結果から、胎内被ばくにおいては、リンパ球だけでなく、神経幹/前駆細胞 (NSPC) においても、母マウスに比べて仔マウスでは、染色体転座頻度が低くなる可能性が示された。

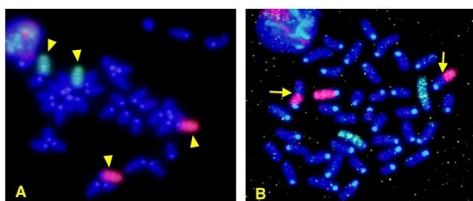


図 1 WCP-FISH による染色体転座の検出  
1 番染色体を FITC (緑)、3 番染色体を Cy3 (赤) でラベルしたプローブを用いて検出した。A, 神経幹/前駆細胞の転座がみられない中期分裂像。B, リンパ球の分裂像。3 番染色体に転座がみられる (矢印)。

#### (4)まとめ

神経幹/前駆細胞 (NSPC) の厚みを考慮して、核当たりの DNA2 本鎖切断 (DSB) 数を -H2AX フォーカス数として計測する定量系を確立した。この系を用いて、2Gy の X 線による胎内被ばく後 6 週齢での NSPC における残存 DSB 数を母と仔で比較したところ、どちらも X 線誘発 DSB は残っており、母と仔に違いは見られなかった。一方、胎内被ばく後 6 週齢でのリンパ球と NSPC における染色体転座を解析したところ、どちらの細胞でも母に比べて仔では転座頻度が低かった。このことは、母と仔の NSPC において、同線量 (2Gy) の X 線でほぼ同じレベルの DSB が生じるが、それらの DSB 修復過程で生じる染色体転座数は、母より仔が少ないことを示している。

#### <引用文献>

- (1) Ohtaki, K. et al., Human fetuses do not register chromosome damage inflicted by radiation exposure in lymphoid precursor cells except for a small but significant effect at low doses. *Radiat. Res.*, 161, 373-379, 2004.
- (2) Nakano, M. et al., Chromosome aberrations do not persist in the lymphocytes or bone marrow cells of mice irradiated *in utero* or soon after birth. *Radiat. Res.*, 167, 693-702, 2007.
- (3) Nakano, M. et al., Fetal irradiation of rats induces persistent translocations in mammary epithelial cells similar to the level after adult

irradiation, but not in hematolymphoid cells. *Radiat. Res.*, 181, 172-176, 2014.

#### 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 3 件)

Ariyoshi, K., Suzuki, K., Watanabe, M., and Kodama, S. Promoted instability in an X-ray irradiated chromosome transferred into Werner syndrome cells. *Radiat. Emer. Med.*, 4, 40-46, 2015(査読有).

<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020370750>

Yamamoto, M., Wakata, A., Aoki, Y., Miyamae, Y., and Kodama, S. Chromosome loss caused by DNA fragmentation induced in main nuclei and micronuclei of human lymphoblastoid cells treated with colcemid. *Mutat. Res.*, 762, 10-16, 2014 (査読有) .

DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.02.002

Urushibara, A., Kodama, S., and Yokoya, A. Induction of genetic instability by transfer of a UV-A-irradiated chromosome. *Mutat. Res.*, 766, 29-34, 2014 (査読有) .

DOI: 10.1016/j.mrgentox. 2014.02.005

##### [学会発表](計 13 件)

白阪耀介、坂口健太、白石一乗、児玉靖司、胎内被ばくマウスにおける DNA 損傷の解析、日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ、2015 年 10 月 16-17 日、富山大学黒田講堂 (富山県、富山市)。

西田拓馬、白石一乗、児玉靖司、G1 期及び S/G2 期に移入された X 線被ばく染色体の安定性の解析、日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ、2015 年 10 月 16-17 日、富山大学黒田講堂 (富山県、富山市)。

山田聖、白石一乗、児玉靖司、マウス神経幹/前駆細胞における X 線誘発 DNA 損傷の新しい検出系開発、日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ、2015 年 10 月 16-17 日、富山大学黒田講堂 (富山県、富山市)。

Seiji Kodama, Tomoya Nakahama, Hiroshi Kashiwagi, Kae Imanishi, Takayo Awatani, Kazunori Shiraishi. Establishment and radio-biological characterization of immortal mouse neural stem cell lines. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan).

Hiroki Kashiwagi, Tomoya Nakahama, Yosuke, Shirasaka, Kenta Sakaguchi,

Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama. Repair of DNA double strand breaks induced by X-irradiation in mouse neurons. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan).

Kenta Sakaguchi, Hiroshi Kashiwagi, Yosuke Shirasaka, Maki Fukui, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama. Development of an image-J based program for counting -H2AX foci in mouse neurosphere cells. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto International Conference center (Kyoto, Japan).

Shohei Okamoto, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama. X-ray induced chromosome segregation errors analyzed by live cell imaging. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan).

Yuki Hirakawa, Masateru Tanabe, Takuma Nishida, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama. Chromosomal instability transmitted by a microcell exposed to X-rays. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan).

Seiji Kodama, Kohei Hagihara, Kazunori Shiraishi, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kenji Sugimoto. P53 dependent timing of DNA synthesis in main nuclei and micronuclei. 日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1-3 日、かごしま県民交流センター（鹿児島県、鹿児島市）。

Yuki Hirakawa, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama. Chromosome instability transmitted by a microcell exposed to ionizing radiation. 日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1-3 日、かごしま県民交流センター（鹿児島県、鹿児島市）。

Shohei Okamoto, Ai Kawakita, Kaori Murata, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama. X-ray-induced chromosome bridges analyzed by live cell imaging. 日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1-3 日、かごしま県民交流センター（鹿児島県、鹿児島市）。

Hiroki Kashiwagi, Tomoya Nakahama, Kenta Sakaguchi, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama. DNA double-strand break repair in mouse neurons. 日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1-3 日、かごしま県民交流センター（鹿児島

県、鹿児島市）。

Tomoya Nakahama, Hiroki Kashiwagi, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama. Establishment and radio-biological characterization of immortal mouse neural stem cell lines. 日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1-3 日、かごしま県民交流センター（鹿児島県、鹿児島市）。

〔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生物科学専攻・放射線生物学のホームページ：  
<http://chokai.riast.osakafu-u.ac.jp/~ho-usya6/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・理学系研究科生物科学専攻・教授  
研究者番号：00195744

### (2) 研究協力者

坂口 健太 (SAKAGUCHI, Kenta)  
大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・博士後期課程 3 年

柏木 裕呂樹 (KASHIWAGI, Hiroki)  
大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・博士後期課程 3 年

白阪 耀介 (SHIRASAKA, Yosuke)  
大阪府立大学・理学系研究科生物科学専攻・博士前期課程 2 年