

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00545

研究課題名(和文) 持続的な低線量放射線照射は中枢神経細胞の分化過程に影響を及ぼすか？

研究課題名(英文) Whether sustained low dose radiation affect the differentiation process in central nerve cells?

研究代表者

加藤 真介 (Kato, Shinsuke)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50214375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：X線照射装置および放射性セシウム線源を用いて、低線量の放射線照射が神経の成長過程に対してどのような影響を及ぼすのかを培養皿中で維持した細胞を用いて調べた。その結果、一過性のX照射(100～500 mSv/5分)と極低線量率下の持続的線照射(200 mSv/年)では神経の成長過程がわずかに促進されることが分かった。一方、異なる低線量率下での持続的線照射(200 mSv/5日)の場合、神経の成長過程は明らかに抑制されていた。以上の結果は、低線量率照射の神経成長過程に対する効果は、線量率により異なることを示しており、神経の成長が盛んな胎児への環境放射線影響の調査における有益な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Using X ray-irradiation equipment or radioactive cesium gamma-source, the effect of low dose or low dose rate irradiation on the neuronal differentiation process was examined in the cultured cells. A transient low dose X ray-irradiation (100～500 mSv / 5 min) or a chronic gamma-irradiation under very low dose rate (200 mSv / year) slightly promoted the neuronal differentiation process. However, the chronic gamma irradiation under different low dose rate (200 mSv / 5 days) obviously suppressed the process. These results indicate that the low dose irradiation induces the opposite effect on the neuronal differentiation process depending on the dose rate. This study provides the useful information for the investigation of the effect of environmental radiation on the fetus growing with an active neuronal differentiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：低線量率放射線 低線量放射線 セシウム137 PC12細胞 神経分化 神経軸索伸長

### 1. 研究開始当初の背景

放射線は、生体分子を直接的または間接的に電離・励起することにより種々のフリーラジカルを産生し、周囲の細胞や組織を傷つけると考えられている。しかしながら、中枢神経系は、生体において放射線に対する感受性が極めて低いとされているため、低線量放射線の影響について検討された例は少ない。

一方で、低線量の放射線照射がその動物の行動や脳内の活動電位に影響を与えること<sup>1)</sup>や脳スライス切片を用いた実験<sup>2)</sup>で、低線量照射が神経細胞における活動電位の発火を増加させることなどの報告がなされている。これらの知見は、低線量の放射線照射が中枢神経活動に影響を与えている可能性を提示している。しかしながら、その後、この可能性について検討した報告はない。

申請者は、神経細胞の分化モデルとして知られている PC12 細胞における神経軸索伸長が、低線量の X 線や  $\gamma$  線、活性酸素種によって制御される可能性を見出している。このことは、低線量の放射線が、ニューロンの成長過程、機能の発現過程、軸索伸長やシナプス形成といったネットワーク形成過程に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、一過性の、あるいは持続的な低線量放射線照射がニューロンの分化過程に影響を及ぼすか否かを検証することである。このような環境にさらされた神経系細胞の軸索伸長や細胞内シグナルの活性化状況を観察し、通常環境下におけるそれと比較し評価する。得られた知見は、そのような放射線環境が胎児、新生児における中枢神経系の分化過程にどのような影響を与えるかを推測する際の重要なデータとなる。さらに福島県における“放射性セシウムによる低線量  $\gamma$  線への持続的曝露が健康にどのような影響をもたらすか”という問題に対して、有益な情報の提供を行えるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では、低線量の放射線照射がニューロンの分化過程に影響を与える否かを評価するため、中枢神経細胞の分化モデルとして頻繁に使用されている PC12 細胞の神経成長因子 (NGF) 誘導の神経軸索伸長を用いた。この現象に対する低線量放射線照射の影響を、以下の 3 つの方法で評価した。

1) 細胞を NGF で刺激した直後に一過性の低線量 (100 mSv ~ 500 mSv/5 分) の X 線を照射し、その影響を観察した。

2) Cs-137 密封線源を用いて、NGF で刺激後に約 200 mSv/年の極低線量率  $\gamma$  線を持続的に照射し、その影響を観察する。

3) Cs-137  $\gamma$  線の照射施設において、NGF 刺激後に約 200mSv/5 日の低線量率  $\gamma$  線を持続的に照射し、その影響を観察する。

さらに各々の照射による細胞内の情報伝

達機能の活性化状況を観察した。

### 4. 研究成果

#### 1) 低線量 X 線の一過性照射の影響:

照射の NGF の刺激によって、PC12 細胞は神経軸索を伸長し、5 日後には明らかに神経細胞様に分化した。このとき、NGF の添加直後に X 線照射を 5 分間行ったところ、この NGF による神経軸索伸長作用は、X 線の線量に依存して増強された。これらの結果における軸索伸長の程度を解析ソフトで定量化したところ、500 mGy (mSv) の X 線照射によって、軸索の長さおよび数は、未照射群と比較してそれぞれ約 1.4 倍および約 2.5 倍増加していることが明らかとなった (図 1)。

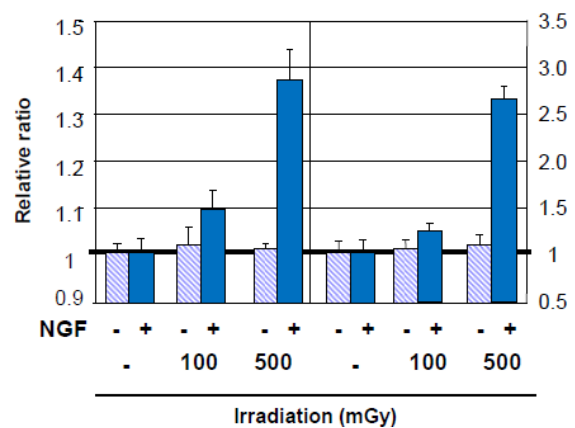


図 1

次に、照射による軸索伸長の亢進効果をタンパク質量より確認するために、神経軸索を構成している主要タンパク質の一つである MAP2 の発現量を観察したところ、X 線照射によって増加していることが確認された。この結果は、先の照射による形態学的変化を支持するものである。以上の結果から、X 線の照射は、PC12 細胞における NGF 誘導の軸索伸長を促進することが示唆された。

次に照射が NGF による情報伝達シグナルの活性化に影響を与えているか否かを確認するために、リン酸化された NGF 受容体の量を観察した。その結果、NGF 刺激時に観察された NGF 受容体のリン酸化量は、X 線照射によって変化しないことがわかった。次に NGF 受容体よりも下流のシグナルタンパク質である ERK のリン酸化状況を観察したところ、NGF 刺激時に観察された ERK のリン酸化は照射によってさらに亢進していることが確認された。これらの結果は、NGF 誘導の神経軸索伸長における照射による促進効果は、NGF 受容体のシグナルが増強されるのではなく、その下流におけるシグナルの活性化によるものと示唆された。

そこで、ERK の活性化による相対効果に

よる可能性を確認するため、EGF 受容体のリン酸化状況を観察したところ、照射による EGF 受容体のリン酸化の亢進が確認された。さらに、このリン酸化を EGF 受容体チロシキナーゼ阻害剤である AG1478 で抑制したところ、NGF 誘導の神経軸索伸長における照射による促進効果が消失することが明らかとなった。以上の結果から、X 線照射によって引き起こされる NGF 誘導の神経軸索伸長に対する促進効果は、EGF 受容体の活性化を通じて引き起こされていることが示唆された。

以前、照射による EGF 受容体の活性化が、PI3K-Akt シグナルの刺激を介して細胞生存維持を促進することが報告されている。これに対して、EGF による細胞増殖作用を低線量の放射線が促進するとの報告は見られない。これらのことから、EGF 受容体のリガンドによる活性化と照射による活性化では、その後のシグナルが異なる経路をたどっているものと示唆される。実際、照射によるもののようなリガンド非依存性の EGF 受容体の活性化は、細胞増殖ではなく、遺伝毒性を引き起こすような刺激に伴って起こる DNA の修復に関与しているとの報告がなされている<sup>3)</sup>。従って、本研究で観察された照射の効果は、NGF による最初のシグナルを強めたのではなく、NGF 由来の ERK の活性化を、EGF 受容体を介した ERK の活性化が相加的に増強することで発揮されたものと示唆される。その結果、ERK の持続的な活性化が増強され、最終的に NGF 誘導の軸索伸長を亢進したものと考えられた(図2)。

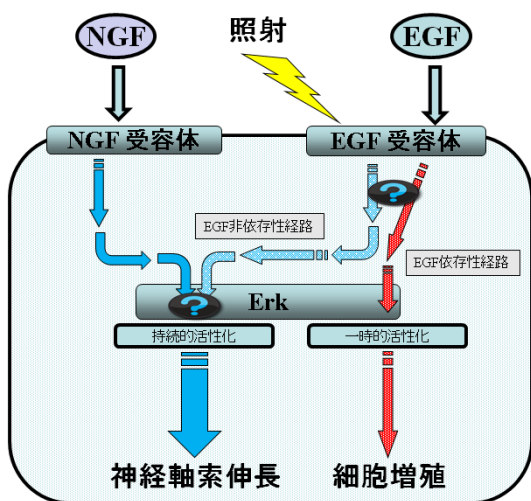


図 2

2) 極低線量率 線 (200mSv/年) の持続的照射の影響:

NGF 刺激の 7 日後, Cs-137 線照射群における神経軸索の伸長が対照群と比較してわずかに亢進していることが明らかになった(図3)。

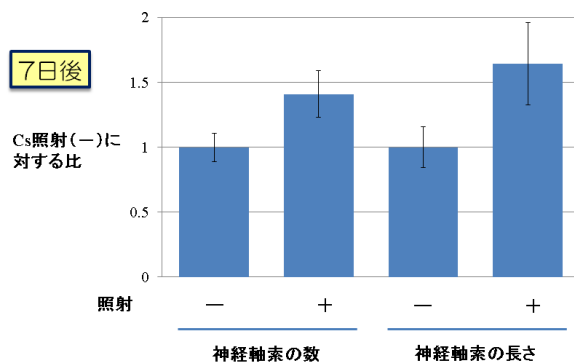


図 3

このときの代表的活性酸素種であるスーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )の分解酵素(SOD)の発現を mRNA レベルで確認したところ、照射群におけるそれが、対照群よりもわずかに低下していた。この傾向は NGF 刺激 1 日後においても同様であった。しかしながら、SOD の基質である  $O_2^-$  の実際の産生量を調べたところ、照射による影響は観られなかった。次にもう 1 つの代表的活性酸素種である一酸化窒素の合成酵素(NOS)の発現を mRNA レベルで確認したところ、NGF 刺激 1 日後に神経型の NOS (nNOS) の発現が、また 7 日後に誘導型の NOS (iNOS) の発現が、照射群において各々亢進していた。さらに NO の実際の産生量を調べたところ、照射群の NGF 刺激 1 日後において増加していた(図4)。

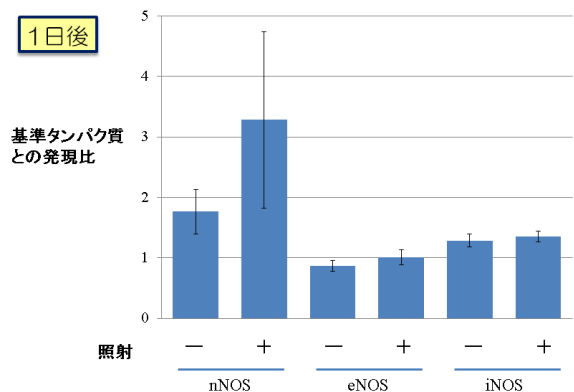


図 4

次にこれらの細胞内における情報伝達系の活性化状況を調べたところ、Erk-MAPK 経路の活性化に対する照射の影響は観られなかったものの、NGF 刺激 7 日後における PI3K-Akt 経路の活性化は照射によって低下していた(図5)。

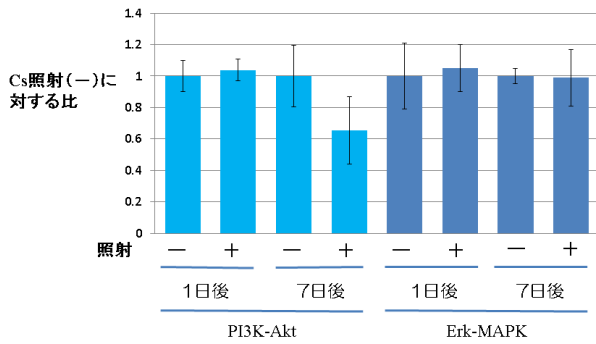


図 5

以上のことは、低線量率の Cs-137 線照射により NO 産生が誘導され、それが細胞死抑制シグナルの低下を招き、結果的に細胞生存維持につながる神経分化シグナルを亢進させたことを示しているのかもしれない。

### 3) 低線量率 線 (200mSv/5 日) の持続的照射の影響:

低線量率 線の持続的な照射 (200mSv/5 日) は、NGF 誘導の神経軸索伸長を明らかに抑制した。このときの NGF 受容体のリン酸化状況を調べたところ、照射は NGF による NGF 受容体の活性化には影響を与えていなかった。そこで、受容体の下流にあるシグナルタンパク質である Erk のリン酸化状況を調べたところ、照射によって Erk の活性化は阻害されていなかった。このことは、照射による抑制効果が、NGF の主要シグナルである Erk 経路の阻害によって引き起こされているのではないことを示している。そこで、Erk を介さずに軸索伸長に寄与すると考えられている Akt-Rac-1 経路に対する照射の影響を調べた。

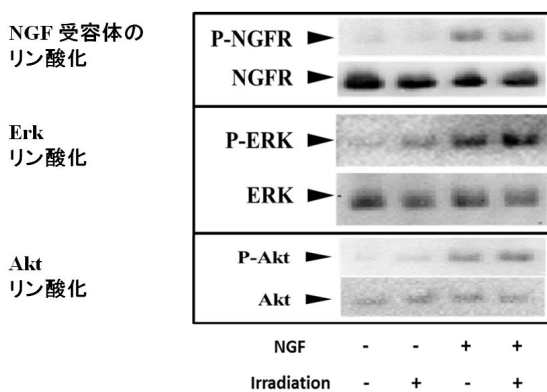


図 6

その結果、照射による Akt の活性化抑制は観られなかったが (図 6)、その下流にある Rac-1 活性の抑制が確認された (図 7)。このことは、Akt とは別に照射によって活性が変

動する、Rac-1 活性に影響を与えるシグナル分子の存在を示唆している。

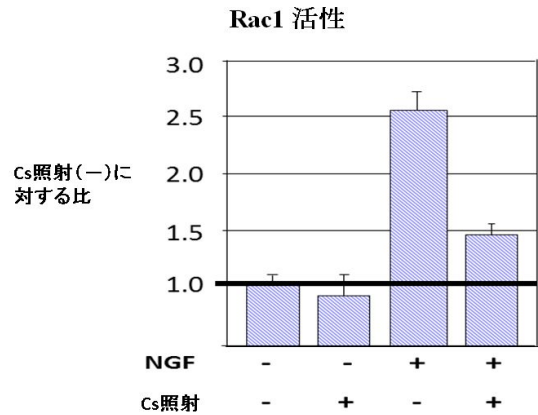


図 7

Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) は、照射によって活性化されることが知られているシグナル分子であるが、これを高発現させた細胞では、Erk と Akt の関与なく NGF 誘導の神経軸索伸長が促進されることが報告されている<sup>4-5)</sup>。照射による軸索伸長抑制における CaMKII の関与を調べるために、この分子の活性を特異的阻害剤で抑制したところ、照射による Rac-1 活性の低下は消失し、軸索伸長の抑制もキャンセルされた (図 8)。

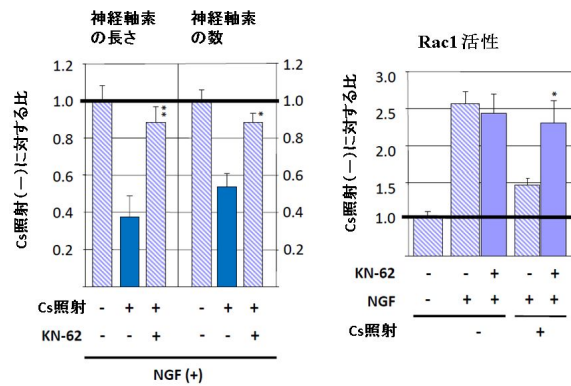


図 8

以上の結果は、低線量率の Cs-137 線の持続的な照射は、CaMKII を活性化することで Rac-1 の活性を制御し、NGF によって誘導される神経軸索伸長を抑制している可能性を提示している。

本研究によって得られた知見は、低線量の放射線照射の神経成長過程に対する効果は、線量率によって全く異なる結果を引き起こすことを示している。さらにこのことは、神経

の成長が盛んな胎児の発生過程に対する環境放射線の影響が、その線量率によって大きく異なってくる可能性を示唆している。

以上のことより、本研究は低線量放射線の生体影響に関する調査に対して有益な情報を提供するものといえる。

#### <引用文献>

Mullin MJ, Hunt WA, Harris RA. *J Neurochem.* **47**, 489-95 (1986).

Peimer SI, Dudkin AO, Swerdlov AG. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* **49**, 597-600 (1986).

Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D. J., Kehlbach, R Rodemann, H. P. *J. Biol. Chem.*, **280**, 31182–31189 (2005).

Masse T, Kelly PT. *J Neurosci.*, **17**, 924-931(1997).

Kutcher LW, Beaman SR, Gruenstein EI et al. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **284**, C1334-345(2003).

#### 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)

Chronic irradiation with low-dose-rate  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$  rays inhibits NGF-induced neurite extension of PC12 cells via  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II activation. Katoh Shinsuke, Kobayashi Junya, Umeda Tomonobu, Kobayashi Yoshiko, Izumo Nobuo and Suzuki Takahiko. *Journal of Radiation Research*, **58**, 809–815 (2017).

doi.org/10.1093/jrr/trx032

中枢神経系の発生・分化過程における低線量率放射線の影響 - X線照射によるPC12細胞における神経成長因子誘導の神経軸索伸長の促進 - . 加藤真介、小林芳子、梅田知伸、鈴木崇彦、小林純也 . Annual Report 京都大学・放射線生物研究センター (2015-2016年報告) 57 (2017).

Xray Irradiation Promotes Nerve Growth

Factor-induced Neurite Extension in PC12 Cells.

Katoh Shinsuke, Kobayashi Junya, Umeda Tomonobu, Kobayashi Yoshiko, Izumo Nobuo and Suzuki Takahiko. *RADIOISOTOPES*, **65**, 137–143 (2016).

doi: 10.3769/radioisotopes.65.137

[学会発表](計10件)

Katoh Shinsuke, Kobayashi Yoshiko, Umeda Tomonobu and Suzuki Takahiko. Differential response to radiation in the progression of neurite extension in PC12 cells. the 8th International Society of Radiation Neurobiology Conference (2018).

加藤真介、小林純也、梅田知伸、小林芳子、出雲信夫、鈴木 崇彦 . NGF 誘導神経軸索伸長に対する低線量率 線照射の抑制効果 . 日本放射線影響学会 第 60 回大会 (2017).

加藤真介、梅田知伸、小林芳子、鈴木崇彦 . 神経軸索伸長過程の進行レベルによる放射線応答の違い . 第 54 回アイソトープ・放射線研究発表会 . (2017).

加藤 真介、小林 純也、梅田 知伸、小林 芳子、鈴木 崇彦 . 低線量率  $^{137}\text{Cs}$  線の慢性照射による CaMKII の活性化を介した神経軸索伸長抑制作用 . 日本保健物理学会 第 50 回研究発表会 (2017)

菊池陽介、近藤裕美、鈴木美紗、高松志保、中村祐輝、小林芳子、梅田知伸、鈴木崇彦、加藤真介 . PC12 細胞の放射線に対する応答の分化レベルによる違い . 日本薬学会第 137 年会 (2017).

Katoh Shinsuke, Kobayashi Junya, Umeda Tomonobu, Kobayashi Yoshiko, Izumo Nobuo and Takahiko Suzuki. Chronic irradiation with low-dose-rate  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$  rays inhibits NGF-induced neurite extension of PC12 cells via  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II activation. the 7th International Society of Radiation Neurobiology Conference (2017).

加藤真介、梅田知伸、小林芳子、鈴木崇彦、小林純也 . X 線照射による NGF 誘導神経軸索伸長の促進 . 第 53 回アイソトープ・放射線研究発表会 (2016).

加藤 真介、出雲 信夫、梅田 知伸、小林 芳子、鈴木 崇彦 . 低線量率  $^{137}\text{Cs}$ - 線照射の神経軸索伸長過程への影響 . 日本保健物理学会 第 49 回研究発表会 (2016).

Katoh Shinsuke, Kobayashi Yoshiko, Umeda Tomonobu and Suzuki Takahiko. Effects of low-dose-rate  $^{137}\text{Cs}$  gamma irradiation on neurite extension in PC12 cells. the 6th International Society of Radiation Neurobiology Conference (2016).

Katoh Shinsuke, Kobayashi Yoshiko and Sakurai Toshihiro. Promotion of nerve growth factor-induced neurite extension by X-ray irradiation in PC12 cells. 15th International Congress of Radiation Research. (2015).

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 真介 (KATOH, Shinsuke) 横浜薬科大学・健康薬学科・教授  
研究者番号 : 50214375