

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16690

研究課題名（和文）放射線照射によるシナプス形態形成への影響

研究課題名（英文）Effects of irradiation on synaptogenesis

研究代表者

六本木 麗子（Roppongi, Reiko）

群馬大学・未来先端研究機構・助教

研究者番号：80719857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞はグリア細胞や血管内皮細胞よりも放射線抵抗性が高い。しかし、治療のための中枢神経系（CNS）への急性・慢性照射は、記憶障害や言語障害などの副作用を引き起こされる。我々は、既に知られているX線照射による神経細胞の形態変化と比較して、より効果的な放射線治療である炭素線照射による神経細胞の形態変化について解析した。結果として、炭素線は細胞死を誘導するが、細胞の発達には影響を与えないことが示唆された。また、炭素線が未熟な神経細胞に影響を与え、DNA損傷、シナプス蛋白質の発現レベルの低下を引き起こした。これらの結果から炭素線照射による神経細胞の機能低下はDNA損傷が引き金であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者の増加に伴い、放射線治療は広くわたって知られるようになった今、放射線治療による副作用があることも事実である。様々ながんの中でも脳腫瘍による放射線治療の副作用は極めて重い。副作用は患者の年齢や照射範囲によって個人差はあるが、特に問題となっているのが認知機能障害（高次機能障害）である。しかしながら、脳腫瘍には放射線治療が有効なのが実情。本研究課題、放射線照射による正常の脳神経細胞にどのような影響を与えるのかを明らかにすることで、治療の向上や副作用を最小限に抑える治療薬の開発となる基礎研究につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Neurons are known to be more radioresistant than glial and vascular endothelial cells. It has been thought that relates to differences in non-dividing and dividing cells. However, both acute and chronic irradiation of the Central Nervous System (CNS) for therapy induces side effects that can cause memory deficits and speech disorders. We analyzed the morphological changes of neurons induced by carbon beam irradiation, which is known to be an effective radiotherapy, in comparison with the already known morphological changes of neurons induced by X-irradiation. Results suggest that carbon irradiation induces cell death but does not affect cell development. Carbon irradiation also affected immature neurons, causing DNA damage and decreased expression levels of synaptic proteins. These results suggest that DNA damage is the trigger for carbon irradiation-induced neuronal dysfunction.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線照射 シナプス シナプス形態形成 細胞死 DNA 損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん患者の増加に伴い、放射線治療は広くわたって知られるようになった今、放射線治療による副作用があることも事実である。様々ながんの中でも脳腫瘍による放射線治療の副作用は極めて重い。副作用は患者の年齢や照射範囲によって個人差はあるが、特に問題となっているのが認知機能障害(高次機能障害)である。しかしながら、脳腫瘍には放射線治療が有効なのが実情。放射線治療は脳腫瘍に集中して放射線を照射しがん細胞を死滅させていますが、照射されていない周りの正常の神経細胞にも死滅あるいは破壊されている状況がみられる。この影響が認知機能の低下につながっていると考えられる。近年、神経科学分野においてアルツハイマー病などの精神疾患による認知機能が低下するメカニズムが多くの研究論文によって解明されつつある。そこで放射線照射が引き金で起こる認知機能障害のメカニズムもあると考えられるが、まだ不明である。これまで、照射後に起こる細胞死について多く報告されている。その細胞死は照射の吸収線量(Gy: グレイ)の上昇とともに多くなる。一般的に照射による細胞死が起こる原因として細胞のDNA損傷が挙げられる。しかし、細胞のDNA損傷だけが副作用である認知機能の低下を引き起こすことは考えにくい。認知機能を司っているのが神経ネットワークであり、個のニューロン同士がシナプスによって情報伝達して記憶・学習ができるシステムとなっている。本研究ではそのシナプスに着目して放射線治療による認知機能が低下するメカニズムを解明したいと考えている。

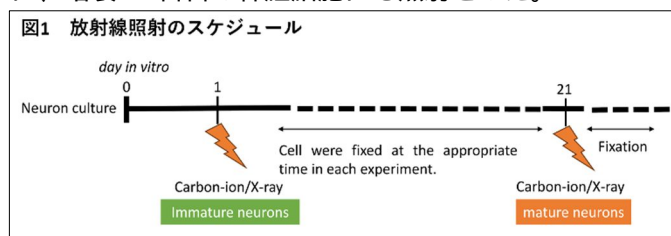
近年、我々のグループは X 線照射後のマウスで急性の認知機能が低下したことや一過性のシナプスたんぱく質レベルの低下を報告した(Puspitasari et al., 2016)。そして現在 Minor Revision である作成中の論文では、マウス海馬の神経培養細胞を用いて、培養直後に X 線照射して神経細胞の増殖や分化について 7, 14 と 21 日目で観測した。その結果、照射された群では増殖と分化の速度が抑制されることが分かった。また未熟性の神経細胞において照射後の 21 日目でシナプスたんぱく質の減少がみられた。これは 2016 年に報告した成熟性の細胞を照射した結果と時間軸が違ってきている。このことから神経細胞の未成熟性と成熟性とで放射線感受性に違いがあることが示唆された。放射線感受性が神経細胞の発達段階で違いがあるならシナプス形態形成においても放射線照射の影響が及ぶと考えられる。シナプス形態形成において重要視とされているのがアクチン細胞骨格構造である。この細胞骨格構造を制御しているのが AMPA(amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 受容体と NMDA(N-methyl-D-aspartate)受容体であることが知られている (Takahashi et al., 2009, Kennedy 2000)。本研究では細胞膜上の受容体の活性化によるシナプス形態形成の変化が放射線照射による認知機能を低下させている可能性について検討する。

2. 研究の目的

放射線治療による副作用である認知機能低下についてシナプスたんぱく質レベルからアプローチしてそのメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究での *in vitro* 実験では主にげっ歯類の凍結した海馬神経培養細胞を用いて、1 日目に放射線照射(X 線または炭素線、線量: 0 Gy, 0.5Gy, 1 Gy)をし、培養 7 日目、14 日目と 21 日目ごとに細胞免疫染色法によるシナプス形態形成について測定する(図 1)。また未熟細胞と成熟細胞を比較するために、培養 21 日目の神経細胞にも照射をした。



4. 研究成果

炭素線照射が未熟及び成熟神経培養細胞に与える影響

未熟な神経細胞に炭素線を照射すると、0.5Gy と 1Gy の線量で照射から 12 時間後に細胞数が大きく減少した(図 2A)。この細胞数の減少は、培養を続けた 21 日後でも続いた(図 2B)。また、細胞死のマーカである Caspase-3 陽性細胞は、1Gy の照射後 12 時間のみ確認され、その後は有意な差は認められなかった(図 2C)。一方、成熟した神経細胞では、炭素線照射後の 12 時間、24 時間、48 時間のいずれの時点でも、細胞数に変化は見られなかった(図 2D)。また、成熟細胞における Caspase-3 陽性細胞の数も増加も認められなかった(図 2E)。このことから、未熟な神経細胞は炭素線によるダメージを受けやすく、細胞死が起こりやすい一方で、成熟した神

経細胞は炭素線の影響を受けにくいことが分かった。

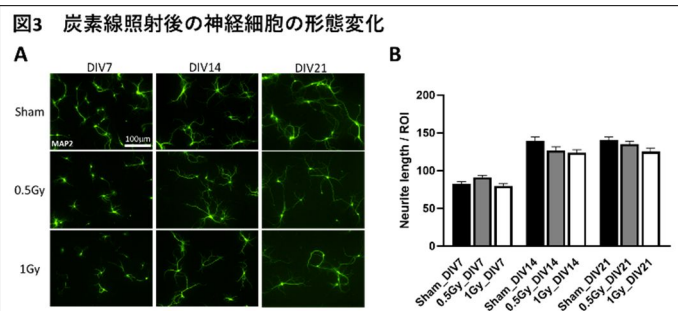
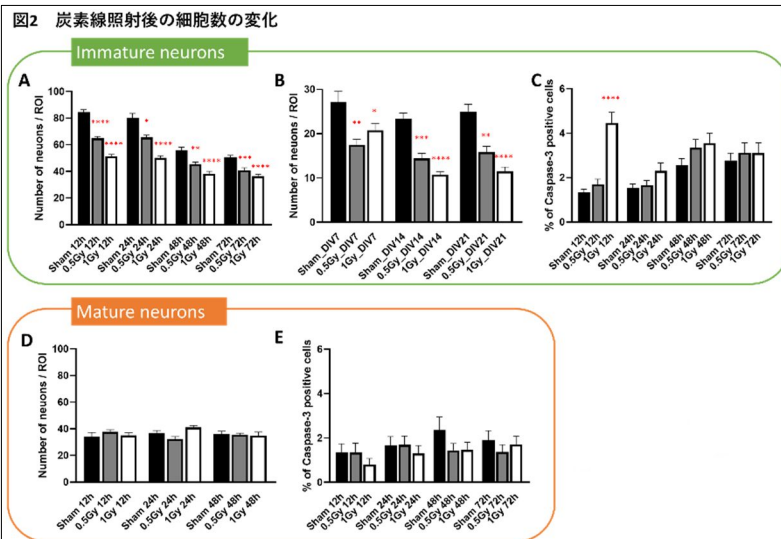
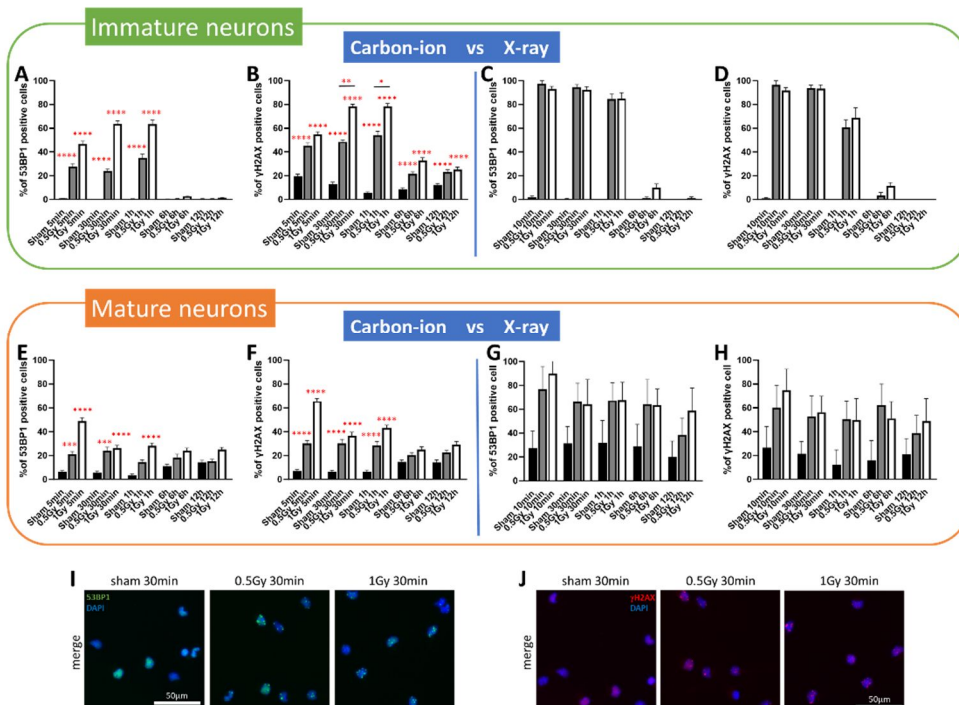
図3では、炭素線照射が神経細胞の発達に与える影響も観察した。細胞の形態を調べるために、抗MAP2抗体で細胞を染色し、細胞体から伸びるニューライトの長さを測定した(図3A)。その結果、培養7日目、14日目、21日目のいずれにおいても、炭素線を照射した細胞とコントロール群との間で有意な差は見られなかった(図3B)。以上のことから、炭素線照射は神経培養細胞の数には影響を与えるものの、神経細胞の形態形成(ニューライトの成長)には影響を与えなかったことが明らかになった。

DNA 損傷レベルで炭素線とX線との比較

炭素線とX線の照射により、未熟な神経培養細胞でアポトーシスが誘導され、細胞数が減少した。放射線によるアポトーシスの原因として、DNA 損傷が関与していると考え、DNA 損傷マーカーである抗53BP1抗体と抗H2AX抗体を用いて解析を行った。その結果、未熟な神経培養細胞に炭素線を照射した場合、DNA 損傷が照射後5分、30分、1時間、6時間、12時間まで観察された(図4A-B)。一方、X線照射では、1時間後までDNA 損傷が見られたものの、6時間以降には消失した(図4C-D)。また、成熟した神経培養細胞では、炭素線とX線のいずれの場合でも、12時間までDNA 損傷が持続していた(図4E-H)。

これらの結果から、炭素線とX線の照射が未熟な神経培養細胞に強い影響を与え、DNA 損傷を介してアポトーシスを引き起こし、細胞死やシナプス蛋白の発現減少をもたらしていることが示唆された。特に、未熟な神経細胞におけるこの影響は、海馬の機能障害を引き起こす可能性があると考えられる。よって、放射線照射は未熟な神経培養細胞に長期的なダメージを与え、これが神経細胞の損失や脳機能に悪影響を与える可能性があることが示唆された。

図4 炭素線とX線照射における神経培養細胞のDNA損傷レベルの比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Reiko T. Roppongi
2. 発表標題 Carbon-ion irradiation causes immature neuron loss, altered levels of synaptic proteins and DNA damage
3. 学会等名 17th International congress for radiation research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Reiko T. Roppongi
2. 発表標題 Effect of carbon-ion irradiation on immature hippocampal neurons
3. 学会等名 ISRN 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Reiko T. Roppongi
2. 発表標題 Effect of carbon-ion irradiation on hippocampal neurons
3. 学会等名 RRS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Gunma University Initiative for Advanced Research
<https://www.giar.gunma-u.ac.jp/eng/laboratory/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Department of Radiation Oncology	Massachusetts General Hospital	Harvard Medical School