

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22510056

研究課題名（和文） 放射線高感受性メダカ胚を用いた発生中の中枢神経で起こる貪食機構解明

研究課題名（英文） microglial behavior in irradiation-injured developing brain using medaka, a vertebrate model

研究代表者

保田 隆子（YASUDA TAKAKO）

東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：40450431

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の発達中の中枢神経は、化学物質や放射線などの悪影響に対して非常に感受性が高いことが知られている。外傷及び神経変性疾患によって脳や脊髄が損傷するとミクログリアが活性化され、損傷部位へ移動し、神経栄養因子やサイトカインを放出して神経保護作用を行うが、神経細胞の回復が不可能な場合には、細胞や残片を貪食して除去することが知られている。本実験ではメダカ胚をモデル生物として用いて、放射線被ばく後の神経細胞に誘発されるアポトーシスが照射時間経過とともにどのように変化するかを調べた。さらに、これらのアポトーシス細胞の消化吸收を調べるため、ミクログリアの消化活性により発現が上昇する ApoE 遺伝子発現を whole-mount in situ ハイブリダイゼーションにより調べ、ミクログリア細胞の食胞にアポトーシス細胞が 10-15 個集められその後それらが消化されること、ApoE 遺伝子の発現は、これらミクログリアの食胞に集められたアポトーシスの消化がかなり進行した段階で上昇することを明らかにした。さらに、貪食がほぼ終了した時点において、アポトーシスの消化が進行している時に認められた ApoE 陽性細胞の数よりも明らかにそれらが増えていること、p53 遺伝子欠損型メダカ胚では放射線照射により誘発されたアポトーシスの数が野生型照射胚よりも明らかに少ないにも関わらず、貪食がほぼ終了した時点で観察された ApoE 陽性細胞の数は両者同じ程度であったことから、ミクログリアの活性化にはアポトーシス貪食目的ではなく、貪食終了後に活性化される第二のシステムがプログラムされている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The developing central nervous system (CNS) of vertebrate embryos is highly susceptible to various hazardous factors, such as chemical toxicants and ionizing radiation (IR), and the injured neurons in embryonic brain are eliminated by apoptosis. Here, we induced neural injury by IR irradiation in developing brain of medaka embryo for investigating the neuronal damage by light and electron microscopy, and the microglial activity for disposal of damaged neurons by whole-mount in situ hybridization using Apolipoprotein E (ApoE) probe.

IR irradiation induced apoptotic neural cells in medaka embryonic brain and the activated microglia continued to express ApoE even after finishing digestion of phagocytosed apoptotic neurons. This microglial activation was induced in the same manner in the absence of p53 functions, although the number of IR-induced apoptotic neurons was remarkably less in p53 deficient embryonic brain. These results strongly suggest that the microglial activation in the developing medaka brain is induced by the presence of apoptotic neurons in the all or none manner through the p53 independent pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：神経細胞傷害、ミクログリア、アポトーシス、メダカ、放射線

1. 研究開始当初の背景

発達中の脳は、放射線や化学物質などの悪影響に感受性が高い組織であり、胎児の脳をこれらの悪影響から守ることは重要な課題として認識されている。発生中の神経細胞がこれらの悪影響に曝露された時、どのような損傷が誘発され修復されるのかを明らかにするため、我々はメダカをモデル実験動物として研究を行ってきた。又、細胞へ DNA 損傷を引き起こすファクターとして、定量化しやすく扱いやすい放射線を実験に用いてきた。

メダカの脳発生メカニズムは基本的に哺乳類のそれと同様であることはこれまでの研究から明らかになっている (Ishikawa et al., 2010)。メダカ胚は、体外で発生しかつ卵殻が透明なので、哺乳類の胎児では不可能な発生の全過程を生きたまま観察できるため、マウスでは不可能な胚の脳を生きたまま観察できる利点を有している。さらにその大きさが非常に小さく、容易に脳全体を観察することができる。ヒト胎児の脳に対する放射線影響は、広島・長崎の疫学調査より、器官形成期が終了し大脳皮質が形成される妊娠 8-15 週に被曝した胎児に高頻度の精神遅滞や小頭症などの悪影響が認められ、この時期が最も高感受性であることが判明している。そこで、この時期に相当するメダカ胚発生ステ

ジ 28 を用いて、発生に影響を及ぼさないような比較的低い線量(γ線 10Gy 以下)で脳に誘発される悪影響を調べたところ、メダカ胚でも哺乳類と同様、器官形成期直後の脳は感受性が高く、ヒトのモデルとなり得る結果が得られた)。これらの研究の中で、眼と中脳(視蓋)に起こる放射線誘発アポトーシスを簡便に検出するアクリジンオレンジアッセイ(AO-assay)の手法を開発した(Yasuda et al., 2008, 2009)。γ線 10Gy 照射後 AO-assay 法により眼、中脳(視蓋)に顕著なアポトーシスが検出されたが、孵化時にはこれらのアポトーシスがほぼ完全に除去され正常な脳の状態に修復されることを見出した。すなわち、中枢神経の放射線傷害はアポトーシスによってかなり効率よく除去され、その後正常に脳を再生できることが示唆された。

これまでは放射線被ばく後に発生中の脳で起こる脳傷害について、アポトーシスを指標として評価を行ってきたが、本研究では新たにこれらのアポトーシス細胞の消化吸収の役割をはたしている食細胞に着目し研究を開始した。

2. 研究の目的

アポトーシスの一連の過程(核の凝縮、核の断片化、貪食)の中で、特に貪食は重要な過程であるが未だ不明な点も多い。発生中の

脳で過剰に生産されるシナプスの除去にミクログリア細胞が関わっていることが多数報告されている (Schelegelmilch T. et.al., 2010)。その一方、外的な要因で引き起こされる脳傷害を除去するミクログリアの動態はほとんど知られていない。ヒトにおいて、食食過程の破たんにより自己免疫疾患 (SLE: 全身性エリテマトーデスなど) が引き起こされることが知られている。

そこで本研究では、放射線被ばくによる脳傷害発生時、それらの傷害を除去するミクログリア細胞の活性化を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、野生型、および p53 遺伝子欠損型メダカ胚を用いて、放射線誘発神経細胞傷害によって発生するアポトーシスを、アクリジンオレンジアッセイ、電子顕微鏡観察の手法により詳細に調べた。さらに、これらのアポトーシスを除去する役割を果たすミクログリア細胞の挙動を、ミクログリア細胞消化吸収時に発現上昇が観察される ApolipoproteinE (ApoE) 遺伝子発現細胞を whole-mount in situ ハイブリダイゼーション法 (WISH) によって放射線照射経過 0h, 12h, 24h, 42h 後に調べた。アポトーシス細胞消化進行と共にどのように ApoE 遺伝子発現が変化するかを明らかにすることに成功した。

4. 研究成果

野生型メダカ照射胚におけるアポトーシスの経時変化を調べた電顕観察から、照射 12 時間後、ミクログリアはその食胞にアポトーシス細胞を 10 個-15 個集めることが判明した (Fig. 1C)。この時点では、ApoE の発現上昇はまだ認められない。照射 24 時間後、電顕像からこれらのアポトーシス細胞の消化が進行していることが判明し (Fig. 1D)、この時点で ApoE 発現細胞は顕著に肥大化しそれらの数も増大することが明らかとなった。さらに照射 42 時間後、電顕観察像からアポトーシス細胞はほぼ全て断片化し (Fig. 1D)、アポトーシス細胞の消化がほぼ終了した状態であ

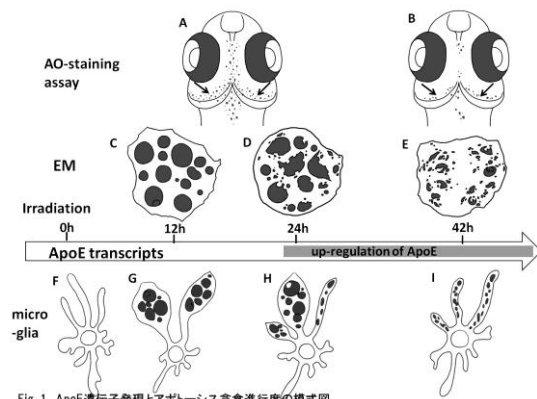


Fig. 1 ApoE 遺伝子発現とアポトーシス食食進行度の模式図

ることが判明した。この時点においても、ApoE 陽性細胞の増大が持続していることが WISH 法によって示された。このように、アポトーシス細胞消化進行と共に ApoE 遺伝子発現がどのように変化するかを詳細に明らかにすることに成功した (Fig. 1)。

これまで、ミクログリアのアポトーシス細胞消化吸収進行度に依存して ApoE 陽性細胞数が変化することは報告されておらず、胚の脳を可視化することが出来る上、その大きさが哺乳類と比較してかなり小さいため脳全体を丸ごと観察することが可能なメダカをモデル生物として用いることにより得られた成果である。

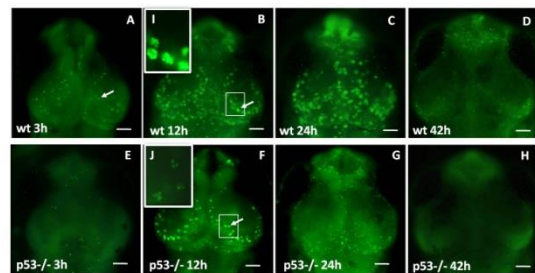


Fig. 2 野生型と p53 遺伝子欠損型メダカ胚の γ 線 100 Gy 照射後の AO-assay による経時観察

p53 遺伝子欠損型メダカ胚では野生型胚と比較してアポトーシスの発生がかなり少ないことがアクリジンオレンジアッセイによる経時観察から明らかになった (Fig. 2)。しかし、ミクログリアによるアポトーシス細胞の消化吸収がほぼ終了する時点である野生型メダカ胚照射 42h 後、p53 遺伝子欠損型メダカ胚照射 24h 後における ApoE 遺伝子の発現を WISH 法により調べ、比較したところ、野生型胚と p53 遺伝子欠損型メダカ胚両者の ApoE 陽性細胞数に大きな差は認められず (Fig. 3)、活性化されるミクログリア細胞の

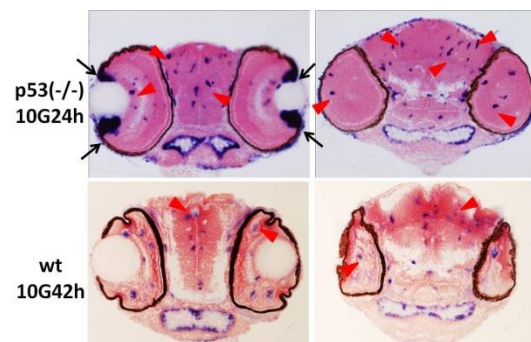


Fig. 3 食食終了時の p53 遺伝子欠損型、野生型メダカの WISH 染色胚総数は、神経細胞傷害を受けたアポトーシス生成頻度に依存せず、一定数のミクログリアが常に活性化する経路が存在する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計7件)

1. 第55回放射線影響学会 2012.9.6(仙台)
メダカ胚の脳に対する重粒子線マイクロビーム照射応答解析：保田隆子、尾田正二、日比勇祐、三谷啓志、舟山知夫、横田裕一郎、武藤康子、池田裕子、小林泰彦
2. アイソトープ研究会 2012.7.9 (東京大学)
メダカ胚の脳に対する重粒子線マイクロビーム照射応答解析：保田隆子、尾田正二、日比勇祐、三谷啓志、舟山知夫、横田裕一郎、武藤康子、池田裕子、小林泰彦
3. 第54回放射線影響学会 2011.11.18 (神戸)
メダカ胚を用いた脳の放射線傷害時におけるミクログリア細胞 3D イメージング：保田隆子、日比勇祐、朽名 夏磨、尾田正二、三谷啓志
4. 第54回放射線影響学会 2011.11.18 (神戸)
放射線誘発細胞死の in vivo イメージング：日比勇祐、保田隆子、尾田正二、三谷啓志
5. 小型魚類学会(基生研) 2011.9.8 Imaging of microglial phagocytosis in the gamma-ray irradiated developing brain in vivo using p53(-/-) medaka (*Oryzias latipes*), a vertebrate model:
Takako YASUDA, Yusuke HIBI, Shoji ODA, and Hiroshi MITANI
6. 第12回東京大学生命科学シンポジウム 2011.6.4
メダカ胚を用いた放射線誘発アポトーシスの食食 in vivo イメージング：保田隆子、日比勇祐、水谷治央、平田愛子、尾田正二、三谷啓志
7. 第53回放射線影響学会 2010.10.21 (京都)
p53(-/-)メダカ胚発生中の脳で起こる放射線誘発アポトーシス：保田隆子、日比勇祐、尾田正二、三谷啓志

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保田 隆子 (YASUDA TAKAKO)
東京大学大学院新領域創成科学研究科・
特任研究員
研究者番号：40450431