

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21日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710058

研究課題名（和文） X線が哺乳動物の着床前期受精卵に及ぼす影響の研究

研究課題名（英文） Study on the effect of X-irradiation to mammalian preimplantation embryo

研究代表者

吉田 周平（YOSHIDA SHUHEI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20363997

研究成果の概要（和文）：放射線による DNA 損傷が受精卵に及ぼす影響は、出産を望む夫婦にとって重要な問題である。申請者は、X線を照射したマウス着床前期受精卵において、受精卵の細胞分裂が遅延すること、照射線量の増加に伴いハッチング率が低下すること、アポトーシスが誘導されること、そして DNA 切断部位周辺に DNA 修復因子が集合することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It is important to analyze the effect of X-irradiation to mammalian fertilized eggs for people hoping childbirth. We found that in X-irradiated mouse preimplantation embryo, cell division was delayed, hatching rate was decreased, Apoptosis was induced, and DNA repair factors were assembled at double strand breaks by X-irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響学

キーワード：生物影響

1. 研究開始当初の背景

受精卵や胎児は細胞分裂や器官・形態形成を盛んに行うため、放射線や化学的・物理的要因に対して感受性が高くなる。特に、放射線は多くの治療や検査に用いられるため、放射線が受精卵に及ぼす影響は、出産を望む夫婦にとって重要な問題である。受精卵が母親の胎内で育つことを子宮内発生といい、この発生の段階は、「着床前期」、「器官形成期」、「胎児期」の3つの時期に区別することがで

きる。そして、放射線が受精卵や胎児に及ぼす影響は、放射線を受けた時期によって大きく異なる。「着床前期」に高線量の放射線を被ばくした場合は胚は死亡し、「器官形成期」や「胎児期」に被ばくした場合は奇形・発育遅延・神経性の障害などが起こる。このような放射線が受精卵の発生と胎児の発育に及ぼす影響は、放射線による DNA 損傷とその不完全な修復が関わっていると考えられる。増殖能を持つ正常な細胞では DNA 損傷が

生じると、がん抑制遺伝子 p53 が DNA 損傷に反応して下流の遺伝子発現を制御し、細胞周期の停止、DNA 修復の促進、アポトーシスの誘導を行うことで、細胞を DNA 損傷から防御する。しかし、その過剰な活性化は生存にとって危険となる。そのため、細胞分裂が盛んに行われ、容易に p53 が活性化される着床前期受精卵では、p53 に結合してその転写活性化能を抑制する CHD8 が高発現し、p53 の活性を調節している。このような p53 が抑制された状態は、DNA 損傷への反応に影響を及ぼすことが予想される。

2. 研究の目的

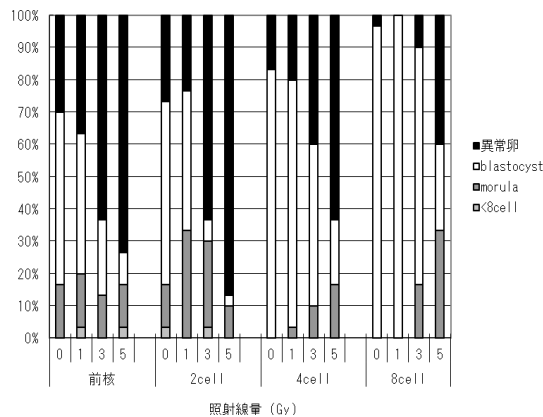
- (1) X線照射による DNA 損傷が着床前期受精卵の発生に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) 着床前期受精卵における DNA 修復関連遺伝子の動態を明らかにする。
- (3) 着床前期受精卵における DNA 損傷によるアポトーシスの誘導を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) X線照射したマウス受精卵における発生の進行を解析し、DNA 損傷が発生の進行に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) X線照射したマウス受精卵における DNA 修復関連遺伝子の発現と局在を解析し、受精卵における DNA 修復関連遺伝子の動態を明らかにする。
- (3) X線照射したマウス受精卵におけるアポトーシスの誘導を解析し、受精卵における DNA 損傷によるアポトーシスの誘導を明らかにする。

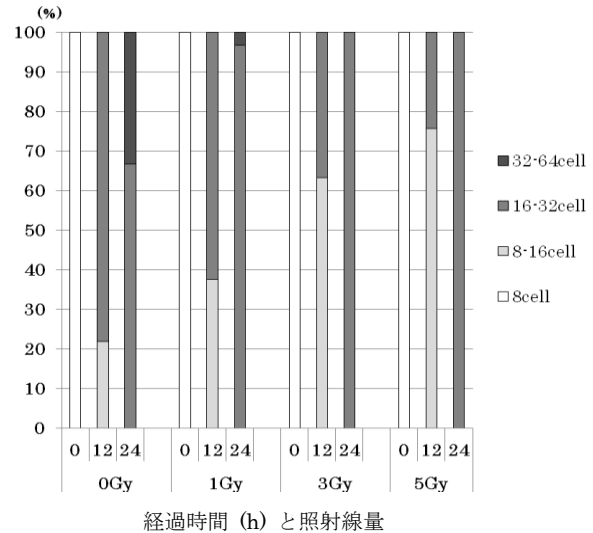
4. 研究成果

- (1) マウス着床前期受精卵（前核期～8細胞期胚）に X線照射し、その初期発生を解析すると、1Gy までの X線照射では未照射な受精卵と同程度まで受精卵の発生が進行するが、3Gy、5Gy の中線量～高線量の X線照射では形態的に異常となる受精卵の割合が増加していた（図 1）。



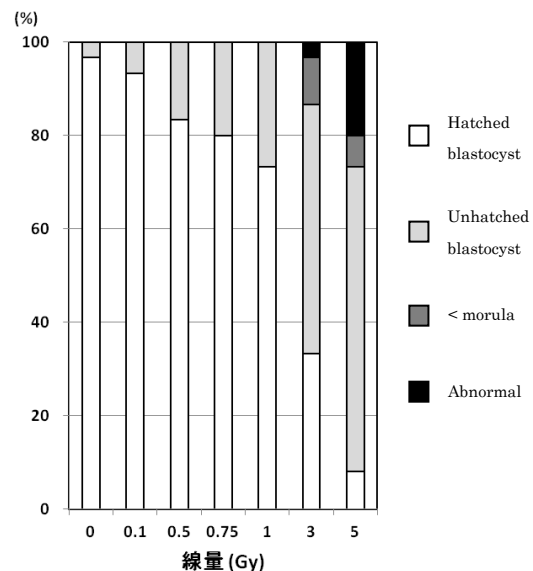
(図 1) X線照射着床前期受精卵の発生の進行

また、マウス 8細胞期胚に X線照射し、その後の細胞数を染色した DNA より求めると、X線の照射線量の増加に伴い、細胞分裂の遅延が起こっていた。この時細胞分裂の遅延は 1Gy の X線照射した受精卵においても観察された（図 2）。



(図 2) X線照射 8細胞期胚の細胞分裂

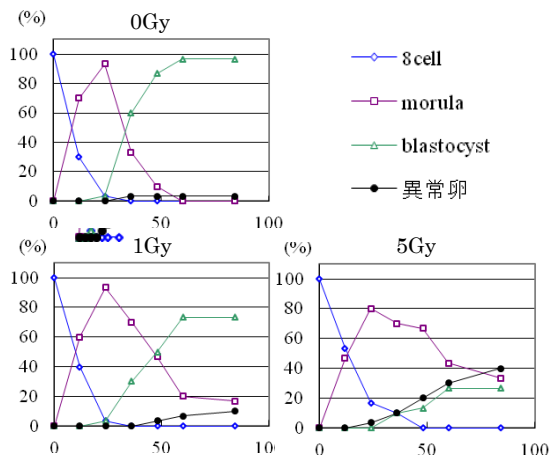
そして、X線を照射した 8細胞期胚は、1Gy までの X線照射では受精卵のほとんどが Blastocyst まで発生が進行していたが、子宮に着床するために必要な受精卵が透明帯を突き破って外に出るハッチングを行う受精卵の割合が 1Gy 以下の X線照射においても照射線量の増加に伴い低下していた（図 3）。



(図 3) X線照射 8細胞期胚のハッチング

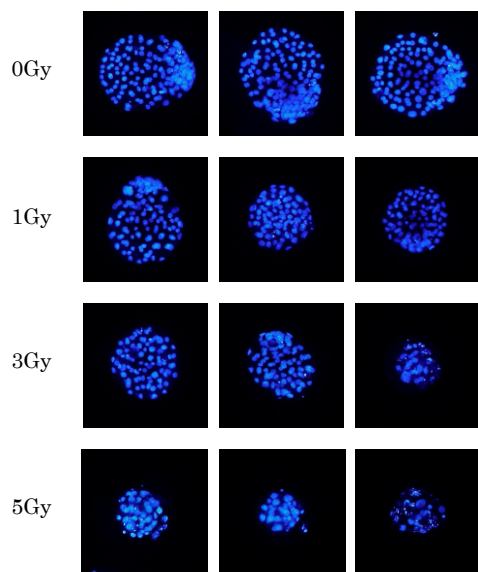
(2) マウス着床前期受精卵に X 線を照射し、X 線照射による DNA の二重鎖切断部位周辺でリン酸化されるヒストン H2AX と、DNA 修復に機能する 53BP1 タンパク質の抗体を用いた免疫染色を行ったところ、X 線照射によりリン酸化されたヒストン H2AX と重なるように 53BP1 タンパク質の局在が観察された。

(3) マウス 8 細胞期胚に X 線を照射し、その後の発生を観察すると、3Gy と 5Gy の X 線照射受精卵では未照射受精卵が Blastocyst に発生する時期に形態的に異常な受精卵が観察された (図 4)。



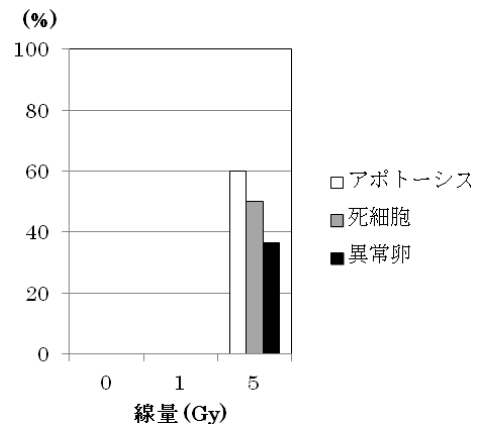
(図 4) X 線照射受精卵

そして、細胞の DNA を DAPI 染色により観察すると、中線量～高線量の X 線照射受精卵においては DNA が凝集し、小さな塊になった細胞が観察された (図 5)。



(図 5) X 線照射受精卵の DNA

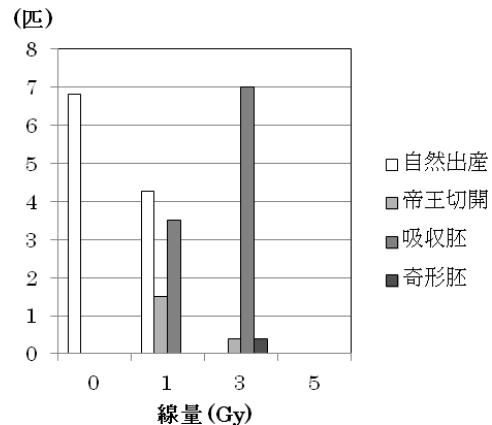
また、マウス 8 細胞期胚に X 線を照射し、アポトーシス検出試薬を用いて検出したところ、高線量の X 線照射により観察される凝集した DNA を持つ細胞においては、アポトーシスが誘導されていた (図 6)。



(図 6) X 線照射受精卵とアポトーシス

p53 の転写活性化能が抑制されている哺乳動物の着床前期受精卵においても細胞分裂の遅延、DNA 修復因子の DNA 損傷部位への集合、そしてアポトーシスの誘導が観察された。また X 線を照射された受精卵ではハッチングを行う受精卵の割合が低下しており、p53 の転写活性化能が抑制されていても異常を含んだ受精卵が着床することが妨げられていることが予想される。

そこで、X 線を照射した 8 細胞期胚を偽妊娠マウスの子宮に移植し、その出産を解析したところ、未照射な受精卵を移植した偽妊娠マウスが自然出産しているのに対し、X 線照射した受精卵を移植した偽妊娠マウスでは帝王切開が必要なマウスが多く、帝王切開した妊娠マウスにおいては着床した受精卵が胎児まで発生できずに形成される吸収胚が観察された。そして、照射線量の増加に伴い胎児の数は低下していた (図 7)。



(図 7) X 線照射受精卵移植マウスのお産数

今後、X線照射による細胞分裂の遅延やアポトーシスの誘導とハッチングの関係、ハッチングできない受精卵の個体発生能について考察したい。

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1件)

Yoshida K., Yoshida S., Eguchi-Kasai K., Morita T.

Study on the effect of space Radiation on mouse ES cells.

Biological Sciences in Space.

査読有、Volume 24、2010、11-15

[学会発表] (計2件)

①吉田佳世、吉田周平、笠井清美、森田 隆
マウス万能細胞を用いた宇宙環境の影響の
解析

日本宇宙生物科学会 (第24回大会) 2010年
9月17-18日

②Yoshida, K., Yoshida, S., Eguchi-kasai, K., Morita, T.

Study on the effect of space radiation to mammalian ES and iPS cells to their development.

21st Annual NASA space radiation Investigator's Workshop、2010 May 17.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/molecular-genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 周平 (YOSHIDA SHUHEI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20363997

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし