

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310039

研究課題名(和文) 幹細胞における選択的染色体分配に対する放射線の影響評価

研究課題名(英文) Evaluation of the radiation effect on selective chromosome segregation in stem cells

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) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウスニューロスフェア細胞を用いて、選択的染色体分配に放射線が与える影響、及び選択的染色体分配を行う細胞数とp53タンパク質発現との関連性を探るために行った。その結果、選択的染色体分配を行う細胞数は、X線被ばく線量に依存して減少することが分かった。これは、線量依存的に幹細胞マーカーであるCD133陽性細胞の数が減少することと関連性があると考えられる。一方、選択的染色体分配を行う細胞は、p53ノックアウト(KO)マウス細胞ではみられず、また、その数はp53ノックダウン(KD)細胞では有意に減少していた。このことは、p53機能が選択的染色体分配制御機構に関与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We studied an effect of radiation on selective chromosome segregation and the relationship between the number of cells showing selective chromosome segregation and p53 expression in mouse neurosphere cells. The result revealed that the number of cells showing selective chromosome segregation was reduced depending on irradiated X-ray doses. This reduction may be related to the dose-dependent decrease in number of CD133 positive cells. In addition, the cells showing selective chromosome segregation were not observed in p53 knock out (KO) mouse neurosphere cells and the number of those cells was significantly reduced in p53 knock down (KD) neurosphere cells, suggesting that the p53 function is involved in the regulation of selective chromosome segregation.

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：生物影響 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、1) 発がんの起源になること、また、2) がん組織中にがん幹細胞が存在すること等の観点から、発がんの標的細胞として重要である。組織幹細胞は、幹細胞自身と分化移行細胞に非対称分裂することが明らかになっているが、そのメカニズムは未だ不明である。この組織幹細胞における非対称分裂に、1) p53 タンパク質の機能が関わること、また、2) 選択的染色体分配が関わる可能性が示唆する報告がなされた。

2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞を含むニューロスフェア細胞を用いて、幹細胞にみられる選択的染色体分配に p53 タンパク質が関わることを明らかにする。さらに、放射線被ばくが、選択的染色体分配にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞

胎齢 14.5 日の ICR マウス胎児脳から神経幹細胞を含むニューロスフェア細胞を採取して培養系に移し、増殖してくる細胞を実験に用いた。また、選択的染色体分配と p53 タンパク質機能との関係を探るために、p53 野生型マウス、及び p53 ノックアウト (KO) マウスからニューロスフェア細胞を分離した。

(2) 選択的染色体分配の検出

選択的染色体分配は、2 つの方法で検出した。1 つは 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) を用いたシングルラベル法である。ニューロスフェア細胞の DNA 鎖を EdU で 2 回ラベルし、その後細胞質分裂をサイトカラシン B で阻害して 2 核細胞を形成させた。細胞質は Lavacell を用いて染色した。さらに、選択的染色体分配をより厳密に検出することを目指して、EdU と BrdU を用いたダブルラベル法を試みた。すなわち、DNA 鎖を EdU で 2 回ラベル後、5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) で 1 回ラベルし、その後細胞質分裂をサイトカラシン B で阻害して 2 核細胞を形成させた。細胞質は Lavacell を用いて染色した。どちらの染色法においても、2 核細胞の一方の核だけが EdU ラベル陰性の場合に選択的染色体分配と判定した。

(3) p53 遺伝子のノックダウン (KD)

p53 siRNA を用いて p53 遺伝子の発現を特異的に抑制した。対照 siRNA、あるいは p53 siRNA をニューロスフェア細胞にセンダイウィルス由来細胞融合剤を用いて導入した。p53 タンパク質の発現抑制の程度はウェスタンブロットで確認した。

(4) X 線照射

X 線照射は、軟 X 線照射装置 (OM-B205; Ohmic) を用い、70kvp, 5mA, 0.5mm Al フィルターの条件下、線量率 0.66 Gy/min で照射した。

4. 研究成果

(1) 選択的染色体分配に対する X 線照射の影響

選択的染色体分配に対する X 線照射の影響を EdU シングルラベルで解析した。EdU 取込み量は EdU に蛍光物質を結合させて測定し、蛍光量の比が 6:4 以上に偏っているものを選択的染色体分配と判定した。X 線非照射の線維芽細胞では、選択的染色体分配を行う細胞はみられなかったのに対し、ニューロスフェア細胞では、その割合は 1%であった。次に、X 線を 1Gy、2Gy、3Gy 照射したニューロスフェア細胞では、選択的染色体分配を行う細胞の割合は、それぞれ、0.6%、0.37%、0.22%となり、線量依存的に低下することが分かった。そこで、幹細胞マーカー CD133 陽性ニューロスフェア細胞に対する X 線照射の影響を調べた。その結果、CD133 陽性細胞の割合は、非照射、1Gy、2Gy、及び 3Gy 照射の条件下で、それぞれ、1.4%、0.98%、0.68%、0.23%を示し、線量依存的に低下することが分かった。これらの結果は、幹細胞マーカー CD133 陽性細胞中に選択的染色体分配を行う細胞が存在すること、さらに放射線被ばくによる CD133 陽性細胞の存在割合の低下が、選択的染色体分配を行う細胞の存在割合低下と関連している可能性を示唆している。

(2) 選択的染色体分配に対する p53 タンパク質の関与

p53 ノックアウト (KO) マウス由来ニューロスフェア細胞を用いて、選択的染色体分配を調べたところ、p53 野生型線維芽細胞と同様に、選択的染色体分配を行う細胞は見られなかった。

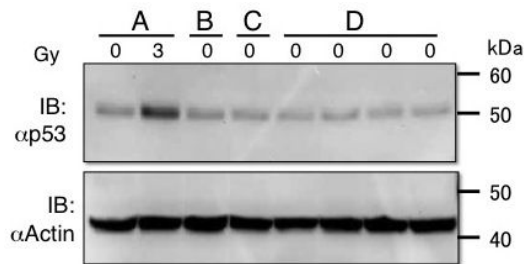


図 1 siRNA による p53 タンパク質の発現抑制 p53 (上段) とアクチン (下段) の発現をウェスタンブロットで検出した。Gy, 細胞に照射した X 線線量。A, p53 野生型細胞、B, センダイウィルス由来細胞融合剤だけを処理した細胞、C, 対照 siRNA を処理した細胞。D, p53 siRNA を処理した細胞 (独立した 4 種の条件を試した)

そこで、p53 siRNA を用いて p53 発現をノックダウン (KD) し、選択的染色体分配を行う細胞を EdU と BrdU を用いたダブルラベル法で調べた。まず、至適化した p53 siRNA 処理

条件により、p53 タンパク質の発現が 50%低下することを、ウェスタンブロット法で確認した(図 1)。この KD 条件下で、野生型 p53 細胞を用いて選択的染色体分配を行う細胞の存在割合を解析した結果、siRNA 未処理群で 2.3%、対照 siRNA 処理群で 2.5%、p53 siRNA 処理群で 0.9%であった。

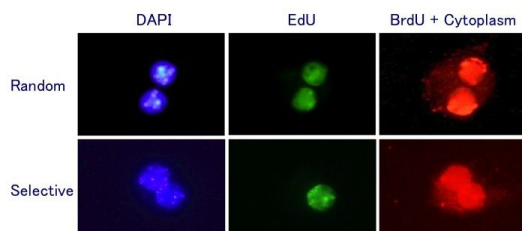


図 2 EdU と BrdU を用いたダブルラベル法による選択的染色体分配の検出 ランダムな染色体分配(上段)と選択的な染色体分配(下段)の例を示す。DAPI, DAPI による核の染色、EdU, EdU を取り込んだ DNA 鎖を含む核が染色される、BrdU+Cytoplasm, BrdU を取り込んだ DNA 鎖を含む核が染色される。また、2 核細胞であることの確認のために細胞質を LavaceII で染色した。

この結果は、p53 発現をノックダウンすることにより、siRNA 未処理群 ($p=0.0026$, カイ二乗検定)及び対照 siRNA 処理群 ($p=0.001$, カイ二乗検定)に比べて有意に選択的染色体分配を行う細胞数が減少したことを示している。この結果、並びに p53KO 細胞では選択的染色体分配を行う細胞数が 0%であったことは、p53 タンパク質がマウスニューロスフェア細胞における選択的染色体分配に関わっていることを示唆している。

(3) まとめ

マウスニューロスフェア細胞において、選択的染色体分配を行う細胞数は、X 線被ばく線量に依存して減少した。これは、線量依存的に幹細胞マーカーである CD133 陽性細胞数が減少することと関連性があると考えられる。

マウスニューロスフェア細胞における選択的染色体分配は、p53 ノックアウト(KO)マウス由来細胞ではみられなかった。また、p53 ノックダウン(KD)細胞では、選択的染色体分配を行う細胞数が有意に少なくなった。

本研究の結果は、p53 機能がマウスニューロスフェア細胞の選択的染色体分配制御機構に関わっていることを示唆している。

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 7 件)

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

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

Takeshita, S., Matsuda, N., Kodama, S., Suzuki, K., and Watanabe, M.: In vitro thermal effect on embryonic cells of endangered hawksbill turtle *Eretmochelys imbricate*. *Zool. Sci.*, 30, 1038-1043, 2013 (査読有)。

DOI:10.2108/zsj.30.1038

Yamamoto, M., Wakata, A., Aoki, Y., Miyamae, Y., and Kodama, S.: Induction of a whole chromosome loss by colcemid in human cells elucidated by discrimination between FISH signal overlap and chromosome loss. *Mutat. Res.*, 749, 39-48, 2013 (査読有)。

DOI:10.1016/j.mrfmmm.2013.06.001

Kashino, G., Suzuki, K., Kodama, S., Watanabe, M., and Prise, K. M.: Increased susceptibility to delayed genetic effects of low dose X-irradiation in DNA repair deficient cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 89, 295-300, 2013 (査読有)。

DOI:10.3109/09553002.2013.752596

Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S., Yamashita, S., and Watanabe, M.:

Persistent amplification of DNA damage signal involved in replicative senescence of normal human diploid fibroblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 20121, 1-8, 2012 (査読有).

DOI:10.1155/2012/310534

Suzuki, K., Yamaji, H., Kobashigawa, S., Kawauchi, R., Shima, K., Kodama, S., and Watanabe, M.: Epigenetic gene silencing is a novel mechanism involved in delayed manifestation of radiation-induced genomic instability in mammalian cells. *Radiat. Res.*, 175, 416-423, 2011 (査読有).

DOI:10.1677/RR2391.1.

[学会発表](計21件)

Ccdc85c欠損hhy突然変異マウス由来ニューロスフェア細胞の遺伝子発現特性,古川淳士,阿波谷貴代,白石一乗,児玉靖司,田中夏樹,桑村充,岡田圭輝,森展子,第36回日本分子生物学会年会(2013年12月3日~6日,神戸市)

Efficient disappearance of DNA lesions in neurosphere cells of mice irradiated with X-rays in utero, Seiji Kodama, Naoki Yamamura, Hiroki Kashiwagi, Maki Fukui, Kenta Sakaguchi, Kazunori Shiraishi, 日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

Induction and transmission of micronuclei with X-rays analyzed by live cell imaging, Kohei Hagiwara, Ai Kawakita, Kazunori Shiraishi, Kenji Sugimoto, Seiji Kodama, 日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

Radiation sensitivity of immortal mouse neurosphere cell lines that retain diploid karyotype, Tomoya Nakahama, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, 日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

神経幹細胞に蓄積する放射線損傷の影響,白石一乗,山村直己,柏木裕呂樹,福井真希,坂口健太,児玉靖司,日本放射線影響学会第56回大会(2013年10月18日~20日,青森市)

医療関係者に求められる放射線の人体影響に関する説明,児玉靖司,第49回日本医学放射線学会秋季臨床大会(2013年10月12日~14日,名古屋市)

UV-A照射染色体移入による非照射細胞の

不安定化,漆原あゆみ,児玉靖司,第71回日本癌学会学術総会(2012年9月19日~21日,札幌市)

長期継代培養により不死化したニューロスフェア細胞の性質解析,白石一乗,今西香絵,阿波谷貴代,原正之,児玉靖司,日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

Chromosome translocations in neural stem cells of mice irradiated in utero, Naoki Yamamura, Kazunori Shiraishi, Seiji Kodama, 日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市) マウス神経幹細胞における選択的染色体分配へのp53タンパク質の関与,近藤蓉子,白石一乗,原正之,児玉靖司,日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

X線照射による小核誘発のライブセルイメージングを利用した解析,萩原浩平,川喜多愛,白石一乗,杉本憲治,児玉靖司,日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

UV-A照射染色体の移入による遺伝的不安定性の誘発,漆原あゆみ,児玉靖司,横谷明德,日本放射線影響学会第55回大会(2012年9月6日~8日,仙台市)

マウス神経幹細胞における放射線応答,児玉靖司,白石一乗,寺本敬志,今西香絵,原正之,日本放射線影響学会第54回大会(2011年11月17日~19日,神戸市) 神経幹細胞における選択的染色体分配に対する放射線の影響,原條靖之,白石一乗,原正之,児玉靖司,日本放射線影響学会第54回大会(2011年11月17日~19日,神戸市)

2倍体を示すマウス不死化ニューロスフェア細胞の樹立,今西香絵,白石一乗,原正之,児玉靖司,日本放射線影響学会第54回大会(2011年11月17日~19日,神戸市)

ヒト線維芽細胞における低線量放射線超感受性に関する研究,岩井明乃,白石一乗,児玉靖司,日本放射線影響学会第54回大会(2011年11月17日~19日,神戸市) 定量的テロメアFISH法によるテロメア不安定化の評価,塚本淳,白石一乗,児玉靖司,日本放射線影響学会第54回大会(2011年11月17日~19日,神戸市)

テロメア配列を含むRNA分子(TERRA)の発現に対するX線及び紫外線の影響,徐子牛,白石一乗,児玉靖司,日本放射線影響学会第54回大会(2011年11月17日~19日,神戸市)

放射線被ばく染色体を介した染色体不安定性,児玉靖司,白石一乗,押村光雄,第70回日本癌学会学術総会(2011年10月3日~5日,名古屋市)

UVA照射染色体の移入による染色体不安定性の誘発,漆原あゆみ,児玉靖司,第

70 回日本癌学会学術総会(2011 年 10 月 3 日～5 日, 名古屋市)

- ⑳ Characterization of biological response to ionizing radiation in mouse neural stem cells, Seiji Kodama, Kazunori Shiraishi, Takashi Teramoto, Kae Imanishi, Masayuki Hara, 14th International Congress of Radiation Research(August 28 - September 1, 2011, Warsaw, Poland)

〔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・放射線生物学研究室のホームページ：
<http://chokai.riast.osakafu-u.ac.jp/%Ehousya6/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・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：00195744

(2) 連携研究者

白石 一乗 (SHIRAIISHI Kazunori)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：40347513