

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860980

研究課題名(和文)放射線照射による記憶障害とその保護：シナプスタンパク質局在変化に着目した解析

研究課題名(英文)Memory dysfunction caused by irradiation and its protection: analysis focusing on the distribution change of synaptic proteins

## 研究代表者

小金澤 紀子 (Koganezawa, Noriko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90643114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部への放射線療法を適用し現れる記憶障害は放射線の脳神経細胞への影響が表れているものと考えられるが、従来の研究報告では細胞死に着目したものが多かった。そこで本研究では記憶・学習のような高次脳機能において重要な役割を果たしている樹状突起スパインに着目した解析を中心に行った。その結果、X線・重粒子線照射によりスパイン形態のダイナミクスに影響を及ぼすアクチン線維結合タンパク質・ドレブリンの集積変化が一過性に引き起こされることを明らかにした。加えて同じ時間系列で行動実験による記憶障害も見出し、放射線照射による急性記憶障害の神経基盤にはシナプスタンパク質のダイナミクスが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cranial X-irradiation is often used for the treatment of brain tumors; however, radiation-induced brain injury, including both anatomical and functional changes, is sometimes observed after the irradiation. The main underlying cause of radiation-induced brain injury is thought to be cell death. Therefore in this study we focused on the effect of irradiation on synaptic function mainly analyzing dendritic spines which plays an important role in the higher brain function. We found that immunostaining intensity of drebrin, which affects dynamic morphological changes of dendritic spines, decreased transiently after the irradiation. In line with this, behavioral study revealed that there were transient memory deficits after the irradiation. Our study suggests that the irradiation-induced synaptic dysfunction likely causes a transient memory deficit, which coincides with a change in drebrin immunostaining in the hippocampus, a structure critical for fear memory formation.

研究分野：神経科学

キーワード：ドレブリン 細胞骨格 樹状突起スパイン HDAC阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

記憶に関わるシナプス機能解析のアプローチ法の1つとして、記憶障害のメカニズムを解明することが挙げられる。記憶障害は様々な病の症状や脳の外傷の結果として現れるが、放射線療法の副作用によるものも知られている。放射線療法はがん治療では広く使われている治療法で、比較的周囲組織に対して保存的な治療法であることから、頭頸部腫瘍などのように切除術により著しく生活の質の低下を生じる疾患の第一選択の治療とされる場合が多いのが特徴である。しかし脳の発達障害や、エピソード記憶の損失・情報処理能力の低下といった認知機能の低下が見られることが報告されている。放射線照射による障害は、電離作用によるDNAなどマクロ分子の直接的破壊と二次的に生成されるラジカルなどによる間接的障害の二種が想定されるが、脳神経系に対する障害メカニズムは不明なままとなっている。頭部へ放射線療法を適用し現れる記憶障害は放射線の脳神経細胞への影響が表れているものと考えられるが、これまでの研究報告ではほとんどが細胞死に着目したものであった。我々はこれまで、*in vitro*系でのX線照射による脳神経細胞への影響を解析しており、X線照射により培養細胞の樹状突起スパイン密度が低下することやその形態が変化すること、シナプスタンパク質の集積具合が変化していることを報告している (Shirai et al., 2013)。このことからX線照射による記憶障害の基盤にはシナプスを担うタンパク質の動態が関与している可能性を考えた。

樹状突起スパインは興奮性シナプスのシナプス後細胞側の情報受容部位であるが、その形態学的可塑性は記憶・学習のような高次脳機能において重要な働きをしている。スパイン形態のダイナミクスはスパインに高密度で存在しているアクチン細胞骨格に依存している。ドレブリンは主要なアクチン線維結合タンパク質で、成熟した神経細胞に発現しているA型アイソフォームは神経細胞特異的タンパク質として樹状突起スパインに局在しており、シナプス機能の指標の一つとされている (Sekino et al., 2007)。

### 2. 研究の目的

本研究では放射線療法による記憶障害の神経基盤解明にはシナプスを担うタンパク質への影響を検証することが不可欠と考え、放射線がシナプスタンパク質へ及ぼす影響、およびそれに付随して起こるスパイン形態・機能変化について解析し記憶障害の神経基盤の一端を解明することを目的とした。加えて、放射線による影響からの保護作用についても検討を行うこととした。具体的には以下の5点に焦点を絞った。

(1) 放射線照射による記憶障害を動物行動実験にて検証する。放射線療法の副作用同様、動物行動実験でもX線照射により記憶学習障

害が表れることが知られている。その実態を把握するために行動実験をまず行う。これまでの研究では慢性効果の報告が多く、急性効果については臨床の報告があるにもかかわらず研究が進んでいない。そこで本研究では放射線照射後数時間単位でその効果を時系列的に解析する。

(2) *in vivo*系で放射線照射後数時間単位(行動実験と同様の時系列)でのシナプスタンパク質への影響を検証する。シナプスタンパク質としては、ドレブリン(シナプス後部)およびシナプシンI(シナプス前部)を用いる。

(3) *in vivo*系で細胞体への影響についても新生ニューロンに着目した解析を行う。細胞体への影響は新生ニューロンに着目した研究がこれまでも報告されており、X線照射により海馬歯状回の新生ニューロンではアポトーシスが増加しその細胞数が減ることが報告されている。同様の結果が我々の実験系でも見られるか、検証が必要である。

(4) *in vitro*系でマウス海馬由来神経培養細胞に放射線を照射したときのシナプスタンパク質の局在変化を解析する。また、神経細胞体への影響も検討する。

(5) *in vivo*系で過剰発現によりスパインの減少を引き起こすことが知られているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は記憶障害を引き起こす要因の一つとも考えられているが、その阻害剤であるスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)により症状が改善される。そしてHDAC阻害剤は放射線から正常細胞を保護するという報告もあることから、放射線により引き起こされるシナプス機構の変調がSAHA等のHDAC阻害剤で保護可能かについても検討を進める。

### 3. 研究の方法

これまでにX線照射により培養細胞のスパイン形態が変化すること、ならびにドレブリンの集積具合が変化することが明らかになっているが、これは30Gyという非常に強いX線を照射したときの結果である(Shirai et al., 2013)。本研究ではマウスまたはマウス海馬由来の神経培養細胞を用いるが、X線量は10Gyを用いた。目的の項目で示した5点について、具体的な方法を下記の通り示す。

(1) 放射線照射による記憶障害を動物行動実験にて検証：記憶障害の検証のために恐怖条件付を用いる。放射線照射後7時間または24時間で条件付を行うグループと、条件付直後に放射線を照射する3つのグループに分けてその効果を検証した。

(2) 放射線照射によるシナプスタンパク質への影響(*in vivo*系): マウス頭部半球照射を行い、照射後2・8・24時間で動物を固定。脳スライス切片を用いて免疫組織化学的手法により、ドレブリンおよびシナプシンIの染色を行う。照射側と非照射側での染色輝度を比較し、放射線照射の影響を検証する。

(3) 放射線照射による神経細胞体への影響を検証 (in vivo 系): 新生ニューロンのマーカーであるダブルコルチンを用いてその数の変化を放射線照射後 2・8・24 時間で計測し、放射線の新生ニューロンへの影響を検証する。

(4) 放射線によるスパインのシナプスタンパク質局在変化を検証 (in vitro 系): 放射線照射後、2・8・24 時間で培養神経細胞を固定し、免疫細胞化学的手法を用いて drebrin を中心としたシナプスタンパク質を染色し、その局在がどのように変化するかを観察した。局在変化の指標として、クラスター数の変化を計測した。シナプスタンパク質は、シナプス前部のマーカーとしてシナプシン I、シナプス後部のマーカーとして drebrin を用いた。また細胞体への影響としては、DNA 損傷のマーカーである  $\gamma$ H2AX 抗体を用いた検証を行った。

(5) SAHA による保護効果の検証 (in vitro 系): 放射線照射 1 時間前に SAHA を培養液中に添加し、放射線照射後 2・8・24 時間で培養細胞を固定した場合のクラスター数変化を (4) 同様に計測する。

#### 4. 研究成果

(1) 放射線照射後 7 時間で条件付を行ったグループ、および条件付直後に放射線を照射したグループにおいては、記憶障害が表れることが示された。一方、放射線照射後 24 時間で条件付を行ったグループでは、記憶障害が見られなかった。(図 1 A. 実験デザイン。条件付 (training) からさらに 24 時間後に文脈記憶 (context) テストを行った。B. 動物の行動軌跡例。すくみ行動 (freezing) を示すと動きが少ない。C. 条件付直後および、条件付 7 時間前での放射線照射動物群ですくみが少ないが、条件付 24 時間前の照射動物群ではすくみの減少が見られない。)

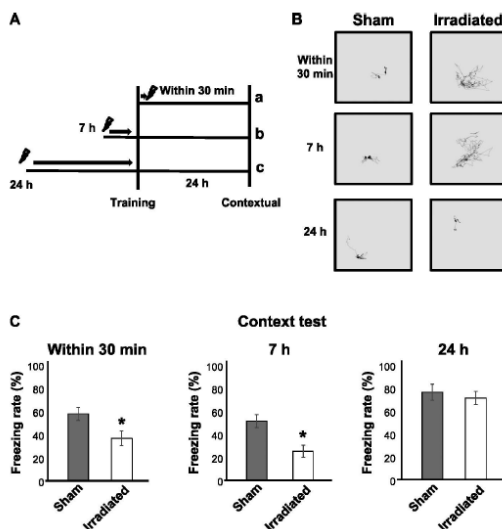
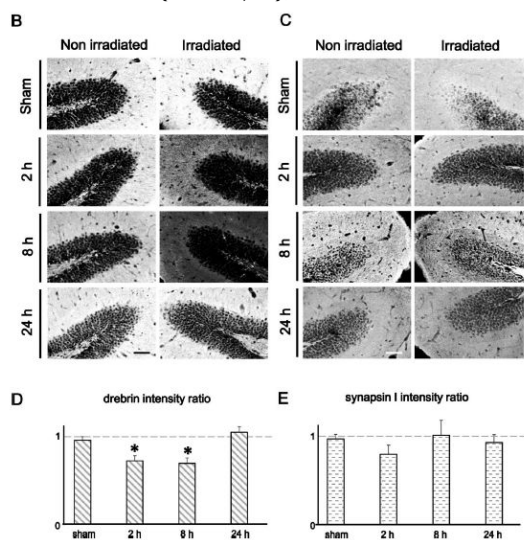


図 1 行動実験結果

(2) 放射線照射後 2 時間と 8 時間の脳切片

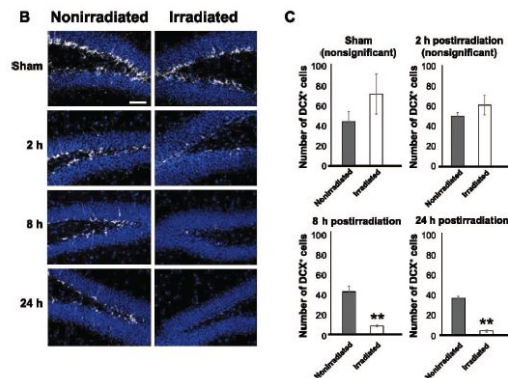
において、照射半球側の drebrin 輝度の著しい低下が認められた (図 2B,D)。興味深いことに、この低下は 24 時間後の切片では見られなかった。また、シナプシン I の染色については照射側と非照射側での差は認められなかった (図 2C,E)。



(Puspitasari et al., 2016)

図 2 放射線のシナプスタンパク質への影響

(3) 放射線照射後 8 時間と 24 時間の脳切片において、新生ニューロンマーカーであるダブルコルチン陽性細胞の数が減っていた (図 3)。



(Puspitasari et al., 2016)

図 3 放射線の新生ニューロンへの影響

(4) 培養神経細胞を用いた in vitro 系の実験においては、in vivo 系の免疫組織化学的手法による解析同様、放射線照射後 2 時間と 8 時間で drebrin クラスター数の減少が見られ、24 時間後には照射前のレベルにまで回復していることが認められた。一方、シナプス前部のマーカーであるシナプシン I については in vivo 系の結果とは異なり、放射線照射後 8 時間からクラスター数の減少が認められ、24 時間後でも減少傾向のままであった。また、DNA 損傷については in vivo 系同様に照射後 8 時間から増加し、24 時間でも損傷細胞数は多いままであった。

(5) 培養神経細胞に放射線照射1時間前に低濃度の SAHA (0.1 $\mu$ M) を投与した細胞群では(4)で見られたようなドレブリンクラスター数の一過性の低下が認められなかった。加えて、シナプシン I のクラスター数低下も認められなかった。

行動実験と in vivo 系、in vitro 系の実験結果を時系列に沿ってまとめると、行動実験では放射線照射後7時間の条件付では記憶障害が見られ、この時ドレブリンの染色輝度やクラスター数の低下があったと考えられる。放射線照射後24時間では記憶障害が見られなかったが、この時ドレブリン輝度やクラスター数は照射前のレベルに戻っていた。一方でこのタイミングでは細胞死が認められていたことから、放射線照射による急性記憶障害の神経基盤には、細胞死よりもシナプスタンパク質の影響が大きく現れることが示唆された。我々はさらに、放射線照射後8時間でのドレブリンとシナプシン I の発現量をウエスタンブロットングにより定量しているが、その量に変化は認められなかった(図4)。このことから一過性に認められたドレブリンの染色輝度やクラスター数の低下は、ドレブリンの発現量を反映しているものではなく、その局在が変化したことが考えられる。また、HDAC 阻害剤の1つである SAHA が放射線照射によるドレブリン集積低下を阻害したことから、SAHA は放射線照射による急性記憶障害に対する保護作用を持つことが示唆された。

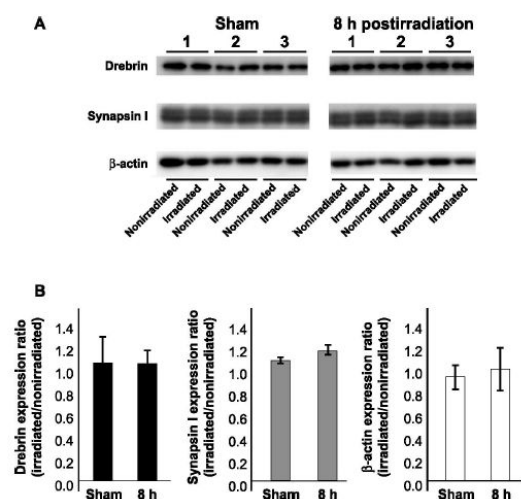


図4 ウエスタンブロットング結果 (Puspitasari et al., 2016)

ドレブリンは通常、樹状突起スパインに集積しており、NMDA 受容体を介したカルシウムイオン流入によりその局在を変化させることが知られている。本研究により、放射線照射はドレブリンの局在を変化させると考えられ、そのメカニズムの1つには放射線が NMDA 受容体へ影響を及ぼすことが考えられるが、今後更なる検討が必要である。

## 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 2 件)

Puspitasari A, Koganezawa N, Ishizuka Y, Kojima N, Tanaka N, Nakano T, Shirao T. "X Irradiation Induces Acute Cognitive Decline via Transient Synaptic Dysfunction." *Radiat Res.* 査読有 185; 2016; 423-30. doi: 10.1667/RR14236.1.

Ohara Y, Koganezawa N, Yamazaki H, Roppongi RT, Sato K, Sekino Y, Shirao T. "Early-stage development of human induced pluripotent stem cell-derived neurons." *J Neurosci Res.* 査読有 93; 2015; 1804-13. doi:10.1002/jnr.23666.

〔学会発表〕(計 13 件)

The 6th International Society of Radiation Neurobiology Conference 2016.2.12-13 長崎大学(長崎県長崎市)"Acute X-irradiation effects on synaptic function from in vivo to in vitro analyses." Puspitasari A, Koganezawa N, Shirao T.

The 6th International Society of Radiation Neurobiology Conference 2016.2.12-13 長崎大学(長崎県長崎市)"HDAC inhibitors prevent synaptic dysfunction elicited by X-irradiation." Hiruma T, Koganezawa N, Puspitasari A, Shirao T.

第 58 回日本神経化学学会大会 2015.9.11-13 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)"The acute immediate effect of X-irradiation and Carbon ion-irradiation on synaptic function and fear memory formation." Puspitasari A, Koganezawa N, Kajita Y, Shirao T.

第 58 回日本神経化学学会大会 2015.9.11-13 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)"Effect of histone deacetylase inhibitor on synaptic dysfunction elicited by X-irradiation" Hiruma T, Koganezawa N, Puspitasari A, Shirao T.

The 25th ISN-APSN Biennial Meeting 2015.8.23-27 ケアンズ(オーストラリア)"Transient effect of X-irradiation and Carbon ion-irradiation on

synaptic function.” Puspitasari A, Koganezawa N, Kajita Y, Shirao T.

The 25th ISN-APSN Biennial Meeting 2015.8.23-27 ケアンズ (オーストラリア) “Slow axonal growth of human iPSCs-derived neurons.” Koganezawa N, Ohara Y, Yamazaki H, Roppongi RT, Sato K, Sekino Y, Shirao T.

第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18-20 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) “The time-dependent radiotoxicity effects on fear memory and synaptic proteins.” Koganezawa N, Puspitasari A, Hiruma T, Kojima N, Shirao T.

The 5th International Society of Radiation Neurobiology Conference 2015.2.21 高崎シティギャラリー (群馬県高崎市) “The irradiation effects on higher brain function with low LET radiation and high LET radiation.” Puspitasari A, Koganezawa N, Kojima N, Isono M, Yoshida Y, Kanai T, Shirao T.

Society for Neuroscience 2014 2014.11.15-19 Washington DC, USA “Axonal polarity formation in human iPSCs-derived neurons” Koganezawa N, Ohara Y, Yamazaki H, Roppongi RT, Sato K, Sekino Y, Shirao T.

Society for Neuroscience 2014 2014.11.15-19 Washington DC, USA “Acute effect of X-irradiation and carbon ion-irradiation on fear memory formation and its underlying mechanism” Puspitasari A, Koganezawa N, Kojima N, Isono M, Yoshida Y, Shirao T.

第 57 回日本神経化学会大会 2014.9.29-10.2 奈良県文化会館 / 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市) 「放射線による恐怖条件付とシナプスタンパク質への時間依存的影響」小金澤紀子、Anggraeini Puspitasari、児島伸彦、磯野真由、吉田由香里、白尾智明

ISN Special Conference 2014.9.20-22 東京大学弥生講堂 / 一条ホール (東京都文京区) “Nanoscale organization of an actin-binding protein, drebrin” Koganezawa N, Shimizu H, Shirao T.

第 37 回日本神経科学大会 2014.9.11-13 パシフィコ横浜 (神奈川県

横浜市) “Acute effect of carbon ion irradiation on hippocampal neuronal cell death and fear memory formation” Puspitasari A, Koganezawa N, Kojima N, Isono M, Yoshida Y, Shirao T.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

小金澤 紀子 (KOGANEZAWA, Noriko)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90643114

### (4) 研究協力者

Anggraeini Puspitasari  
田中 夏女 (TANAKA, Natsume)