

称号及び氏名 博士(理学) 坂口 健太

学位授与の日付 平成 30 年 9 月 25 日

論 文 名 Delayed appearance of DNA double strand breaks in neural stem/progenitor cells of fetal, newborn and adult mice exposed to ionizing radiation
胎児期、新生児期、及び成体期に放射線被ばくしたマウスの神経幹/前駆細胞に出現する遅延性 DNA2本鎖切断に関する研究

論文審査委員 主査 児玉 靖司
副査 原 正之
副査 佐藤 孝哉
副査 川西 優喜

Delayed appearance of DNA double strand breaks in neural stem/progenitor cells of fetal, newborn and adult mice exposed to ionizing radiation

胎児期、新生児期、及び成体期に放射線被ばくしたマウスの神経幹/前駆細胞に出現する遅延性 DNA 2 本鎖切断に関する研究

坂口 健太 (放射線生物学分野)

1. 序論

これまでに齧歯類を用いて調べられた染色体異常を指標とした研究では、胎内被ばく後、成体に生育したマウス、またはラットのリンパ球、乳腺上皮細胞、及び甲状腺細胞における染色体転座頻度は、成体被ばくした個体と比較して、低いか、もしくは同程度であり、必ずしも高感受性を示さない。一方、マウスを用いた放射線発がんの年齢依存性を調べた研究では、新生児マウスが、胎児や成体マウスより、様々な放射線誘発がんに対して高感受性であることを示している。

そこで本研究は、新生児マウス（生後3日以内）の神経幹/前駆細胞(NSPC)における放射線誘発遅延性 DNA 2 本鎖切断(DSB)の感受性を明らかにするために、胎児、新生児（3日齢以内、1週齢、及び2週齢）、及び成体マウスに誘発される DSB 数と比較して解析した。DSB 数を精度高く計測するために、最初にリン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) フォーカス数を自動計測するコンピュータープログラムを開発し、それを用いてそれぞれの条件下で放射線により誘発された NSPC 核内における遅延性 DSB 数を定量した。

2. DNA 2 本鎖切断数の高精度な計測プログラム開発

染色体に DNA 2 本鎖切断 (DSB) が発生した場合、DSB 修復機構の第一段階として DSB 部位のヒストン H2AX がリン酸化され、フォーカスを形成することが知られている。このフォーカスは γ -H2AX フォーカスとよばれ、この数を計測することにより、DSB 量を定量することができる。本研究では、米国国立衛生研究所 (NIH) で開発された ImageJ の Plugin として γ -H2AX フォーカスの自動計測プログラムを開発し、高精度に DSB 数を定量するシステムを構築した。まず、 γ -H2AX フォーカスの撮影方法を改良し、従来の任意の枚数を撮影する 2D 写真撮影を、核の上部から下部まで顕微鏡のサンプルステージを上下に移動させながら動画で全てのフォーカスを撮影する 3D 方法に変更した。 γ -H2AX フォーカス自動計測プログラムは、(1)核の自動認識、(2)フォーカスの強調、(3)ノイズ除去、及び(4)フォーカスの計数の4つの過程により構成される。すべての処理過程において、もし負数が発生した場合は 0 に置換した。まず、(1)核の自動認識の手順は、3D 動画を 2D に投影して核の信号を加算してから、(a) Gaussian blur with radius 2.00、(b) make binary、(c) unsharp mask、(d) erode、(e) dilate、(f) erode、(g) watershed の処理を順次行い、核の辺縁強調を行った。その後、(h) analyze particles 処理で核を認識し、核の中心座標、横径、縦径を求めた。次に、(2)フォー

カスの強調の手順は、核の中心座標と横径、縦径を基に 3D 動画から核を切り出し、(i) unsharp mask、(j) 3D blur filter、(k) 3D edge filter を順次適用してフォーカスの強調を行った。さらに、(3)ノイズ除去の手順は、(l) threshold、(m) erode、(n) dilate、(o) watershed を順次適用してノイズ除去を行い、残った信号をフォーカスとした。最後に、(4)フォーカスの計測は、(p) connected-component labeling with 6-connectivity for 3D-images 処理を用いた。上記処理のフローチャートを図 1 に示した (図 1)。

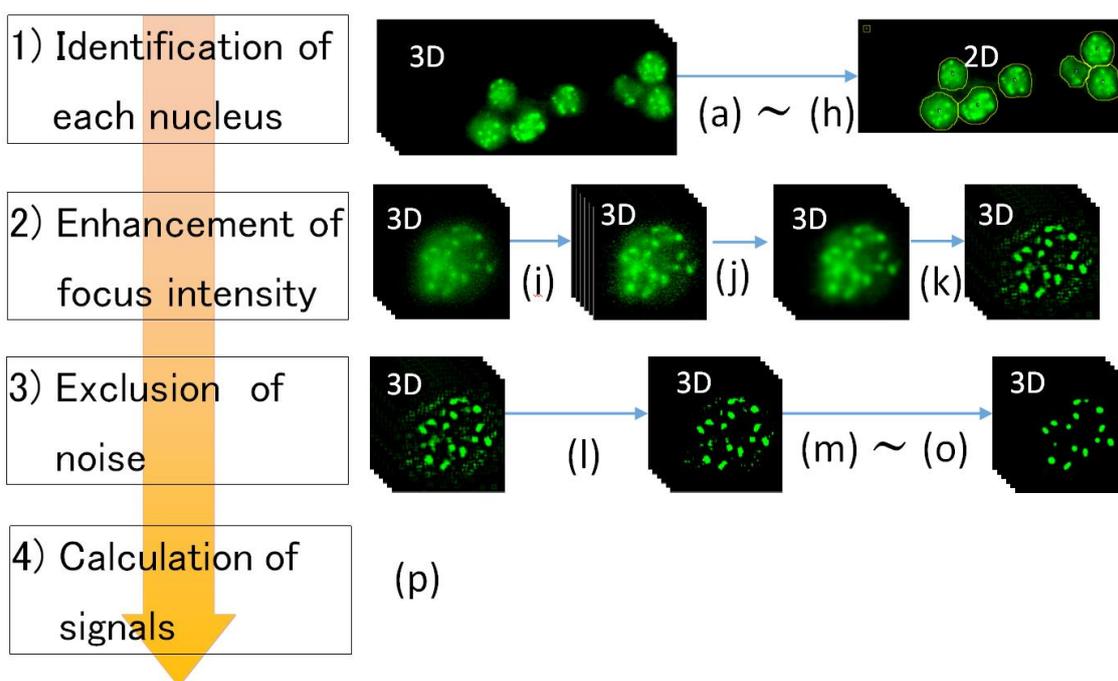


図 1 γ -H2AX フォーカス自動計数プログラムのフローチャート
(a)~ (p) の操作内容はテキスト中に示した。

上記手順で開発した DSB 数の計測プログラムの有用性を評価するために、ICR マウスより単離した NSPC を 5 つのグループに分けて培養し、それぞれ 0、0.5、1.0、1.5、2.0 Gy の X 線を照射した。その後、 γ -H2AX フォーカスを蛍光免疫染色し、自動計数プログラムと人の目による計数を行い、両者の核当たりのフォーカス数を比較し、結果を図 2 に示した (図 2)。

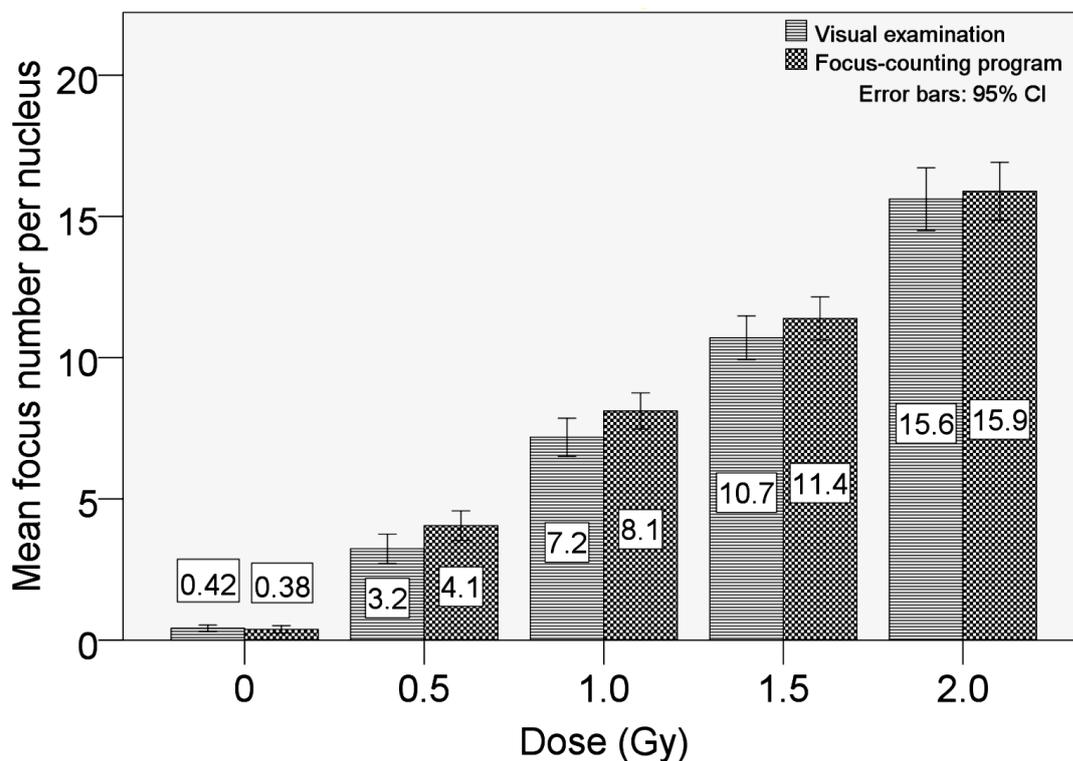


図2 γ -H2AX フォーカス数と吸収線量の線量応答関係

フォーカス計測プログラムでの計測数と目視による計測数を比較して示した。

その結果、フォーカス計測プログラム及び目視によるフォーカスの計測数の線形回帰式(y切片に0 Gyのフォーカス数を採用)はそれぞれ以下の通りであった。

$$\text{Focus-counting program: } 7.20 D (\text{Gy}) + 0.42 (R^2=0.998)$$

$$\text{Visual examination: } 7.61 D (\text{Gy}) + 0.38 (R^2=0.988)$$

R^2 値は、両者とも非常に高い線形性を示し、核当たりのフォーカス数も両者でよく一致した。さらに、このフォーカス計測プログラムは、目視による計測よりも速く、再現性が高く、バラツキが小さい結果が得られる点で有用性が高いことが分かった。

3. マウス神経幹/前駆細胞における X 線誘発遅延性 DNA 2 本鎖切断 (DSB) の解析

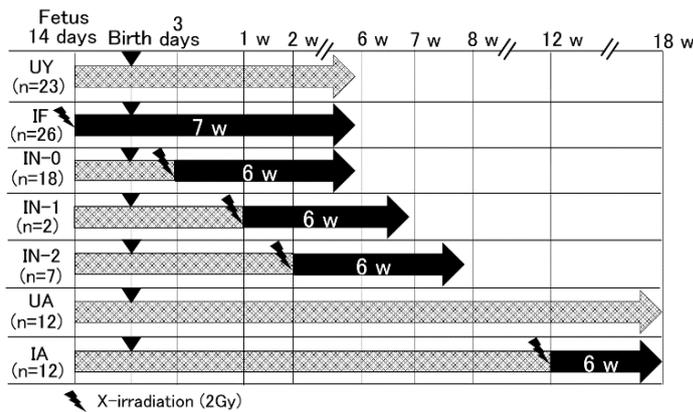
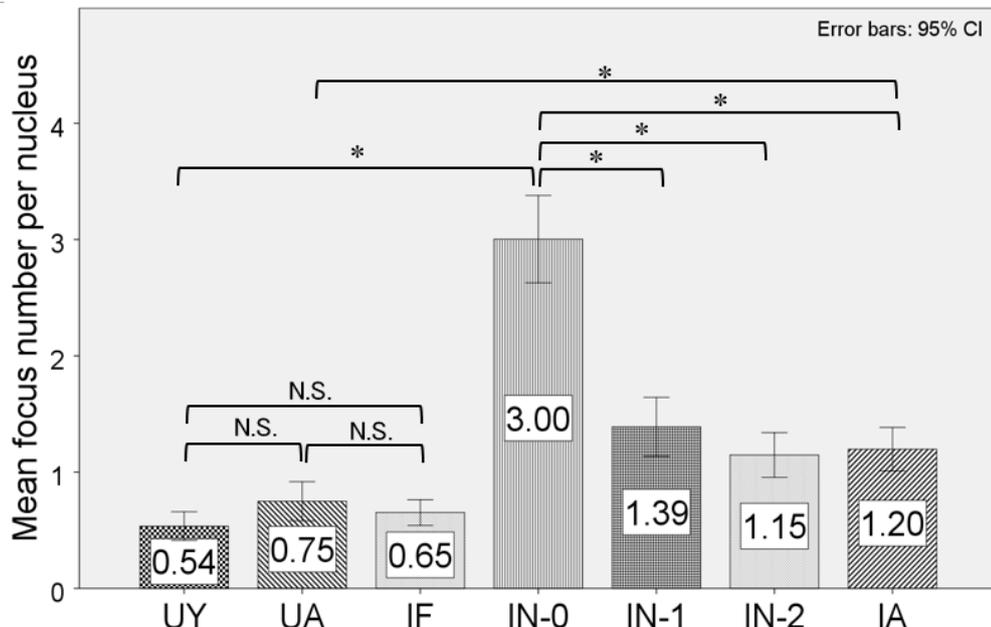


図3 被ばくマウスの神経幹/前駆細胞における遅延性 DNA 2 本鎖切断検出の実験スケジュール

また、C57BL/6N 雌マウス（12 週齢：IA 群）に 2 Gy の X 線を照射後、6 週間後に DSB 数を調べた。非照射対照群として、B6C3F1（6 週齢：UY 群）及び C57BL/6N（18 週齢：UA 群）マウスを用いた。さらに、IF 群、IN-0 群、IA 群の一部のマウスについては、照射 48 時間後の DSB 数を調べた。それぞれのマウスから増殖するニューロスフェアを採取し、 γ -H2AX フォーカスを蛍光免疫染色後、フォーカス数を開発したフォーカス計測プログラムを用いて定量した。結果の有意差検定にはクラスカル・ウォリス検定を用い、 $p < 0.001$ を有意差ありと判定した。

解析結果を図 4 に示した。非被ばく条件下では、6 週齢（UY）と 18 週齢（UA）マウス



	UY	UA	IF	IN-0	IN-1	IN-2	IA
Dose (Gy)	0	0	2	2	2	2	2
Age at irradiation	(6 w)	(12 w)	E 14	< 3 d	1 w	2 w	12 w
Age at dissection(w)	6	18	6	6	7	8	18
Interval (w)	(-)	(-)	7	6	6	6	6

*:Significant ($p < 0.001$)

胎児期、新生児期、及び成体マウスの NSPC における X 線誘発遅延性 DSB 数を調べるために、図 3 に示すように B6C3F1 マウスを 5 群、及び C57BL/6N マウスを 2 群用意した (図 3)。胎児 (14 日齢：IF 群)、新生児 (3 日齢以内：IN-0 群)、1 週齢 (IN-1 群)、及び 2 週

齢 (IN-2 群) 新生児からなる B6C3F1 マウス各群に 2 Gy の X 線を照射後、6~7 週間後に DSB 数を調べた。また、C57BL/6N 雌マウス (12 週齢：IA 群) に 2 Gy の X 線を照射後、6 週間後に DSB 数を調べた。

図4 X線照射されたマウスのNSPCにおける遅延性DSBの出現

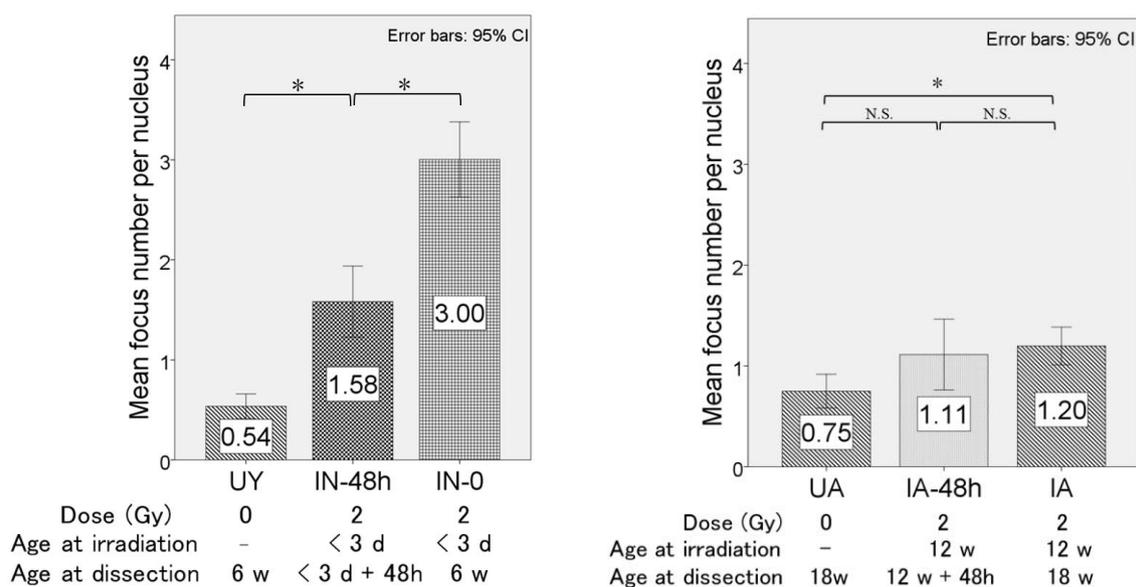
X線被ばく6~7週間後のマウスのNSPCに出現するDSB数を計測した。

のNSPC核当たりの平均フォーカス数は、それぞれ0.54と0.75であり、両者に有意な差はみられなかった。また、胎児期被ばく(IF)マウスにおける平均フォーカス数は0.65であり、非被ばく群のUY(0.54)及びUA(0.75)と有意差はみられなかった。この結果は、14日齢胎児のNSPCにはX線誘発遅延性DSBは生じないことを示している。次に、新生児期被ばく(3日齢:IN-0)マウスでは、平均フォーカス数は3.00で、IA群のフォーカス数1.20に対して2.5倍の値を示し、有意に高いことが分かった。一方、IN-1群及びIN-2群のフォーカス数は1.39、1.15であり、IA群と有意な差は確認されなかった。これらの結果は、生後3日以内の新生児期NSPCが、X線誘発遅延性DSBの生成に対して、極めて高い放射線感受性を示すことを示している。

次に、遅延性DSB数と比較するために、X線被ばく48時間後のNSPCにおけるDSB数を解析した。新生児期(3日齢以内)に被ばくし、48時間後(IN-48h)のNSPCの核当たりDSB数は1.58であり、非被ばく(UY群)よりは有意に高いが、6週間後(IN-0群)よりは有意に低いことが分かった(図5A)。一方、成体期(12週齢)に被ばくし、48時間後(IA-48h)のDSB数は1.11であり、非被ばく群(UA)及び6週間後(IA群)と差がみられなかった(図5B)。これらの結果は、少なくとも新生児被ばくで6週間後にみられるDSBは、被ばく時にできたDSBが残存したものではないことを意味しており、おそらくニューロスフェア増殖の過程で生じるDSBであることを示唆している。

A

B



* : Significant (p<0.001) N.S. : Not Significant

図5 : 被ばく48時間後の平均フォーカス数 (A : 新生児期被ばく、B : 成体被ばく)

4. 総括

本研究では、 γ -H2AX フォーカスの撮影法を写真から動画に変更し、その数を自動計数するプログラムを開発した。これにより、被ばく細胞における DNA 2 本鎖切断 (DSB) を高精度で定量化するシステムを確立した。

また、胎児期 (14 日齢)、新生児期 (3 日齢以内、1 週齢、2 週齢)、及び成体期に被ばくしたマウスの神経幹/前駆細胞 (NSPC) における遅延性 DNA 2 本鎖切断 (DSB) 生成を解析した結果、3 日齢以内の新生児期被ばく群の DSB 誘発が一番高感受性を示すことが分かった。この結果は、新生児の被ばくにより、NSPC にゲノム不安定性が誘発されている可能性を示唆している。マウスを用いた放射線発がん実験では、新生児期の被ばくが他の被ばく児期に比べて最も発がんリスクが高くなることが示されており、本研究でみられたゲノム不安定化が発がんの高感受性に寄与している可能性が示唆される。

5. 文献

Sakaguchi K, Shiraishi K and Kodama S. High susceptibility of mouse newborns to delayed appearance of DNA double-strand breaks in neural stem/progenitor cells exposed to ionizing radiation. *J Radiat Res* 2018 (<https://doi.org/10.1093/jrr/rry069>).

学位論文審査結果の要旨

これまでの動物実験から、胎内被ばく後、成体に生育したマウス、またはラットのリンパ球、乳腺上皮細胞、及び甲状腺細胞における染色体転座頻度は、成体被ばくした個体と比較して、低いか、もしくは同程度であり、必ずしも高感受性ではないことが示されている。一方、マウスを用いた放射線発がんの年齢依存性を調べた研究より、新生児マウスが、胎児や成体マウスより、様々な放射線誘発がんに対して高感受性であることが報告されている。そこで本論文は、胎児期及び新生児期（3日齢以内、1週齢、及び2週齢）被ばくにおける神経幹/前駆細胞 (NSPC) の感受性について、X線による遅延性 DNA 2本鎖切断 (DSB) を指標として調べ、成体期被ばくにおける NSPC の感受性と比較解析した。DSB 数を精度高く計測するために、最初に DSB マーカーであるリン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) フォーカス数を計測するコンピュータープログラムを開発した。このフォーカス計測プログラムの特徴は、3次元 (3D) 的に分布するフォーカスを顕微鏡ステージを上下方向に移動させて動画モードで撮影し、3D から 2D に投影せずに 3D のまま計測する点にある。これにより、従来の 3D から 2D に投影するプログラムと比べて、シグナルの重なりや偽陽性シグナルを低減させることに成功した。その結果、開発したフォーカス計測プログラムは、線量 2 Gy まで高い線形性を示し、目視による計測よりも速く、再現性が高く、しかもバラツキが小さいことから、有用性が高いことが解った。そこで次に、このプログラムを用いて被ばくマウスの NSPC に出現する被ばく 6~7 週間後の遅延性 DSB 数を解析した。その結果、胎児期被ばくでは、被ばくの影響がみられないことが解った。これに対し、新生児期と成体期被ばくでは、X線により遅延性 DSB 数は有意に増加した。特に、生後 3 日以内の新生児は感受性が高く、成体期被ばくの 2.5 倍高い値を示した。一方、被ばく 48 時間後における DSB 数は、胎児期、新生児期 (< 3 日齢)、及び成体期被ばくの間で有意な差はみられなかった。本論文は、マウス新生児 (< 3 日齢) が、放射線による遅延性 DSB 誘発に対して高感受性であることを示した初めての報告であり、その新奇性において高く評価できる。

以上の結果を踏まえて、本委員会は、当該学位論文が博士（理学）の学位を授与するに相当すると判断した。

学位論文審査委員会

児玉 靖司

原 正之

佐藤 孝哉

川西 優喜