

称号及び氏名 博士(理学) 柏木 裕呂樹

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 31 日

論 文 名 Characteristics of repair kinetics of DNA double strand breaks and incidence of apoptosis in mouse neural cells exposed to ionizing radiation
(X 線照射されたマウス神経系細胞における DNA2 本鎖切断の修復動態とアポトーシス誘発に関する研究)

論文審査委員 主査 児玉 靖司
副査 八木 孝司
副査 原 正之

Characteristics of repair kinetics of DNA double strand breaks and incidence of apoptosis in mouse neural cells exposed to ionizing radiation

(X線照射されたマウス神経系細胞における DNA2 本鎖切断の修復動態とアポトーシス誘発に関する研究)

柏木 裕呂樹 (放射線生物学分野)

1. 序論

ニューロンは、胎児期に神経幹細胞から分化し、個体の生涯にわたり維持される。大量のニューロン死は、アルツハイマー病、パーキンソン病、及びハンチントン病などの神経変性疾患の発症に繋がる。したがって、生体がニューロンの活動を生涯にわたって正常に維持するためには、様々な環境ストレスにより誘発される DNA 損傷を適切に処理することが重要である。興味深いことに、最近、マウスを馴染みの飼育環境から新しい環境に移して探索させると、直後に海馬の歯状回など学習・記憶に関わる脳組織のニューロンに DNA2 本鎖切断 (DSB)が生じることが明らかにされた。この事実は、外的ストレスだけではなく、内的要因によって日常的にニューロンに DSB が生じる可能性を示しており、生涯にわたるニューロン活動の維持機構を明らかにする上で、ニューロンが大量の DSB をどのように処理しているのかは重要な課題である。

DSB 修復は、非相同末端結合 (Non-homologous end joining : NHEJ)と相同組換え (Homologous recombination : HR)の 2 つの経路で行われる。NHEJ は、M 期を除くどの細胞周期でも働くが、修復エラーを起こしやすいと考えられている。一方、HR は、相同 DNA 鎖を鋳型として用いるために、その働きは S 期後期から G2 期に限定されるが、修復エラーは起こりにくいとされている。分化したニューロンは非分裂細胞であるため、DSB 修復は NHEJ のみで行われることになる。

以上のことから、ニューロンでは生理的条件下でも DSB が生じており、そのため、正確で効率的な DSB 修復が行われていると考えられる。しかしながら、ニューロンにおける DSB 修復機構に関しては未だ多くが不明のままである。そこで本研究は、ニューロンにおける X 線誘発 DNA2 本鎖切断 (DSB)修復の実態について明らかにすることを目的として行った。

2. 神経幹/前駆細胞 (Neural stem/progenitor cell, NSPC)からニューロンへの高率な分化培養法の確立

本研究で中心となる細胞であるニューロンを NSPC から分化させる *in vitro* 培養法を確立した。ICR マウス妊娠 14.5 日齢胎児の線条体より NSPC を採取した。NSPC を Neurobasal 培地中で 2 日間培養して分化させることにより、ニューロンを得た。ニューロンへの分化は、明視野による細胞形態、並びにニューロンマーカー β III-tubulin を蛍光免疫染色、及びウエスタンブロットを用いて検出することにより確認した。この方法で NSPC を分化させることにより、ニューロン様の形態変化が見られた。さらに、 β III-tubulin の発現は、ニューロ

ンでは NSPC に比べると 13 倍増加した。また、 β III-tubulin 陽性細胞の割合は、NSPC では 1.4% に対して、ニューロンでは 82.4% であり、有意に増加した。これらの結果は、本研究で確立した Neurobasal 培地中で 2 日間 NSPC を培養する方法が、NSPC からニューロンへの高い分化率を保持した分化培養法であることを示している。一方、ニューロンへの分化過程においてアポトーシスが高率 (37.0%) に生じることも明らかになった。また、本研究では同腹のマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) を神経系由来細胞以外の比較対照として用いた。

3. X 線誘発 DNA 2 本鎖切断 (DSB) 修復動態の解析

リン酸化 53BP1 (Ser25) は、DSB 部位に集積してフォーカスを形成するタンパク質であり、このフォーカス数を計測して DSB 修復動態を解析した。ニューロンの DSB 修復動態を明らかにするために、X 線 1 Gy 照射後、10 分から

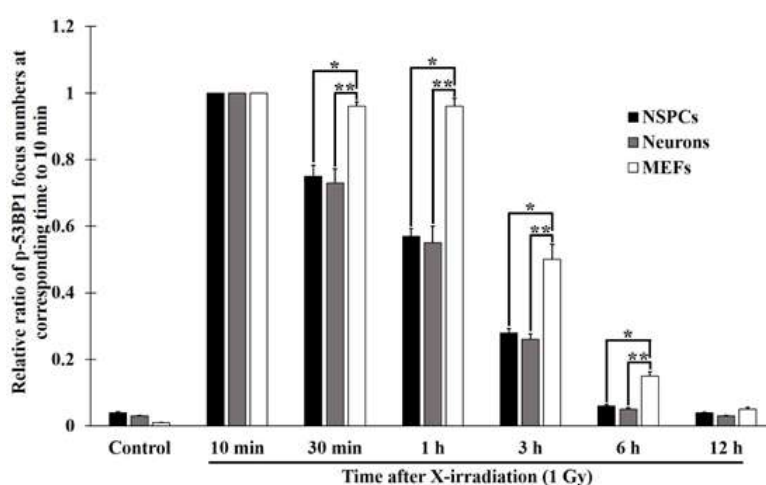


図1 細胞当たりの相対的リン酸化 53BP1 フォーカス

12時間までの経時的な細胞当たりのリン酸化 53BP1 フォーカス数を計測し、NSPC 及び MEF と比較した。細胞当たりのリン酸化 53BP1 フォーカス数で DSB を計測すると、ニューロン及び NSPC におけるフォーカス数は、MEF の 3 分の 1 程度であった。これは、ニューロン及び NSPC は MEF よりも細胞に厚みがあるため、核内の全てのリン酸化 53BP1 フォーカスを視覚化できていないことを反映していると考えられる。そこで、図 1 に示すように、各細胞のリン酸化 53BP1 フォーカス数が最大値を示す 10 分後を基準として相対値を求め、DSB 修復動態を比較した (図 1)。ニューロン及び NSPC では、X 線被ばく後 10 分から 12 時間で時間依存的にリン酸化 53BP1 フォーカスが減少した。一方、MEF では、X 線被ばく後 10 分から 1 時間ではリン酸化 53BP1 のフォーカス数に大きな変化はなく、3 時間後から時間依存的に減少した。これらのことは、ニューロン及び NSPC では、MEF よりも DSB 修復速度が速いことを示唆している。

次に、DSB 修復動態の差が生じる原因について調べた。ニューロンは非分裂細胞であるため、DSB 修復は NHEJ に依存している。そこで NHEJ で主要な働きをしている DNA 依存的プロテインキナーゼ触媒サブユニット (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit : DNA-PKcs) について、X 線 1 Gy 照射後、1 時間から 12 時間で経時的な発現量をウエス

タンブロットにより調べ、ニューロン、NSPC、及び MEF と比較した。また、X 線非被ばく時におけるニューロン、NSPC、及び MEF における DNA-PKcs の発現量をウエスタンブロットで調べた。ニューロン及び NSPC の発現レベルは同程度であったが、MEF はそれと比べて、約 40% 発現量が低いことが分かった。しかし、いずれの細胞でも X 線 1 Gy 照射後 1 時間から 12 時間において、DNA-PKcs の発現に変化はなかった。さらに、このニューロン及び NSPC における DNA-PKcs の高発現が DNA-PK 活性に寄与しているかを調べるため、ヒト p53 ペプチドに対するリン酸化量を評価することにより、DNA-PK 活性の高さを比較した。その結果、NSPC 及びニューロンでは、MEF に比べ、約 2 倍 DNA-PK 活性が高いことが分かった。ニューロン及び NSPC において、MEF と比較して DNA-PKcs の発現レベル、及び DNA-PK 活性が高いことは、前 2 者が後者に比べて DSB 修復速度が速い (図 1) ことの要因になっていると考えられる。

4. X 線誘発アポトーシスの解析

X 線 1 Gy 照射によるニューロンでのアポトーシス誘発を調べるために、ウエスタンブロットを用いてアポトーシスマーカーである活性型 caspase-3 を 10 分から 12 時間まで検出し、NSPC 及び MEF と比較した (図 2)。NSPC では、被ばく 6 時間後からアポトーシスが誘導され始めたのに対し、ニューロンでは、アポトーシス誘発がより早く、被ばく 3 時間後から始まり、しかも NSPC よりシグナルが強く、12 時間後まで持続した。一方、MEF ではアポトーシスは検出されなかった。さらに、いずれの細胞でも X 線被ばく後、p53 の蓄積と安定化 p53 を示すセリン 18 番目がリン酸化された p53 が検出さ

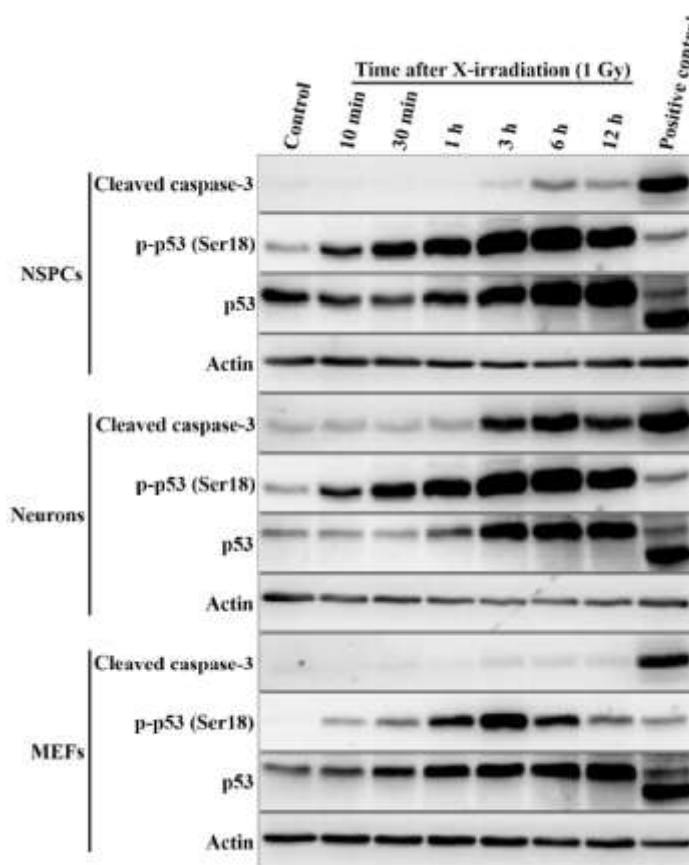


図 2 X 線 1 Gy 被ばく後の各細胞における活性型 caspase 3 の誘導と p53 タンパク質の蓄積

れた。また、増殖細胞集団を含む NSPC と MEF に比べて、ニューロンでは非被ばく状態での p53 の蓄積量が少ないことが分かった。さらに、アポトーシス誘導のもう一つの指標として、アポトーシスの際に生じる DNA 断片化を、DAPI 染色した核の凝縮として検出した。すなわち、X 線を 1 Gy、又は 2 Gy 照射 6 時間後に各細胞の凝縮核を計測し、アポトーシスを定量した。非被ばく及び 1Gy、2Gy 被ばくによるアポトーシス誘導率は、ニューロンで、50.7%、70.3%、80.3%と高レベルを示したのに対し、NSPC では 3.6%、13.4%、16.2%と低レベルであり、MEF では全て 1.5%以下であった。X 線 1 Gy により誘導されるアポトーシスは、NSPC では 9.8%、ニューロンでは 19.6%であり、2 Gy ではそれぞれ 19.6%及び 29.6%であった。これらの結果から、ニューロンにおいて、X 線照射により NSPC より多くの p53 依存的アポトーシスが誘導されることが明らかになった。

5. 総括

本研究では、NSPC 及び NSPC から分化したニューロンにおける X 線誘発 DSB 修復動態及びアポトーシスについて調べた結果、以下の成果を得た。

はじめに、NSPC からニューロンに分化する *in vitro* 培養法を確立した。本研究で確立した方法は、分化誘導 48 時間後の NSPC からニューロンへの分化率が 80%以上の高率であり、ニューロンにおける X 線誘発 DSB 修復動態を調べるのに適した培養系であることがわかった。

次に、神経系細胞である NSPC とニューロンが、MEF に比べて DSB 修復速度が速いことを明らかにした。さらに、NSPC 及びニューロンは、どちらも MEF よりも DNA-PKcs の遺伝子発現、及び DNA-PK 活性が高いことを明らかにした。このことが、NSPC 及びニューロンで MEF よりも DSB 修復速度が速い要因になっていると示唆される。

最後に、ニューロンにおいて、X 線によるアポトーシス誘発割合が、NSPC に比べて高いことを明らかにした。また、アポトーシス誘発のタイミングが、DSB の約 4 分の 3 が修復された 3 時間後であることは、ニューロンでは NSPC に比べて DSB の修復誤りが生じやすい可能性を示唆している。

以上のように、本研究は、ニューロン及び NSPC における X 線による DSB 修復とアポトーシス誘発について、これまでに知られていない特徴を明らかにする成果を得た。

文献

- 1) Kashiwagi, H., Shiraiishi, K., Sakaguchi, K., Nakahama, T. and Kodama, S. Repair kinetics of DNA double-strand breaks and incidence of apoptosis in mouse neural stem/progenitor cells and their differentiated neurons exposed to ionizing radiation. *Journal of Radiation Research*, in press, 2018.

参考文献

- 1) 柏木裕呂樹、児玉靖司 神経細胞における DNA2 重鎖切断蓄積とアルツハイマー病発症との接点、*放射線生物研究*、50 巻、163-173、2015 (総説、査読有).

学位論文審査結果の要旨

生涯にわたり神経活動を続けるニューロンの DNA2 本鎖切断 (DNA double strand breaks: DSB) 修復機構に関する情報は未だ不十分である。そこで本論文は、神経幹/前駆細胞 (neural stem/progenitor cells: NSPC) から分化させたニューロンの DSB 修復動態の特徴を調べた。

はじめに、ICR マウス胎児 (14.5 日齢) 線条体より採取した NSPC を培養系で分化させてニューロンを得る方法を確立した。この培養法では、増殖因子等を添加した neurobasal 培地で NSPC を 48 時間接着培養することにより、高い分化率 (82.4%) でニューロンを得ることができた。本研究では、マウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts: MEF) を対照細胞として用いた。まず、NSPC、ニューロン、及び MEF について、リン酸化 53BP1 フォーカスを DSB 数の指標にした際の X 線誘発 DSB 修復の経時的变化を調べた。その結果、NSPC とニューロンは、MEF に比べて DSB 修復速度が速いことを明らかにした。非分裂細胞であるニューロンでは、DSB は 非相同末端結合 (nonhomologous end joining: NHEJ) によって修復される。そこで、NHEJ で主要な働きをする DNA 依存的プロテインキナーゼ触媒サブユニット (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: DNA-PKcs) の遺伝子発現、並びに DNA 依存的プロテインキナーゼ活性を調べた。その結果、NSPC とニューロンでは、DNA-PKcs 遺伝子発現もキナーゼ活性も MEF より高いことを明らかにした。この結果により、MEF に比べて神経系細胞において DSB 修復速度が速い理由が説明される。さらに、X 線誘発アポトーシスを調べたところ、ニューロンでは NSPC に比べて高い誘発率を示すことを明らかにした。この結果は、ニューロンは NSPC に比べて DNA 損傷の修復誤りを起こしやすい可能性を示唆している。

本論文は、ニューロン及び NSPC における X 線誘発 DSB 修復とアポトーシス誘発について、これまでに知られていない特徴を明らかにする成果を得た点において、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
委員長 児玉 靖司
八木 孝司
原 正之