

# 尾関 あゆみ 論文内容の要旨

主 論 文

Acceleration of astrocytic differentiation in neural stem cells surviving X-irradiation

放射線照射による神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導促進機構

尾関あゆみ、鈴木 啓司、鈴木 正敏、小澤 寛樹、山下 俊一

NeuroReport、掲載予定年月日未定

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻  
(主任指導教員：永山 雄二 教授)

## 緒 言

成人の中枢神経系は、神経幹細胞から分化した細胞によって構成されているため、放射線抵抗性を示す器官であると一般的に考えられている。しかしながら、中枢神経系の構成組織である脳には分化した細胞だけではなく、増殖能と多分化能を有する神経幹細胞が脳室下帯や海馬歯状回に存在することが明らかとなり、放射線による神経幹細胞への影響が注目を集めている。これまでの研究から、脳腫瘍の放射線治療に伴う副作用としての認知機能障害には、海馬に存在する神経幹細胞が関与することが明らかにされている一方で、知能障害などの原因になりうる大脳皮質における神経幹細胞に対する放射線の影響は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、*in vitro* で培養された大脳皮質由来神経幹細胞が、分化誘導刺激により神経細胞やグリア細胞であるアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへと分化する過程に及ぼす放射線の影響について検討した。

## 対象と方法

細胞は、胎生 18 日のラット大脳皮質由来神経幹細胞を用いた。神経幹細胞に X 線 5 Gy を照射し、DNA 二重鎖切断修復キネティクス、およびアポトーシス誘導能について、リン酸化 H2AX および 53BP1 に対する特異的抗体を用いた蛍光染色法にて経時的に検討した。その後、増殖条件下で単層培養した神経幹細胞に X 線 5 Gy を照射し、増殖培地あるいは分化誘導培地で 7 日間培養後の細胞における分化マーカーの発現を検討した。ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへの分化は、それぞれの分化マーカーである  $\beta$ -III チューブリン、GFAP および O4 に対する特異的抗体を用いた蛍光染色法にて確認した。放射線照射による分化誘導促進メ

カニズムの検討は、NF- $\kappa$ B の活性化を特異的リン酸化抗体で、また、その有無について阻害剤を用いて行った。

## 結 果

X 線照射後の神経幹細胞における DNA 二重鎖切断について経時的に検討を行った結果、照射後 4 時間から 12 時間まではすべての細胞においてリン酸化 H2AX のフォーカスが認められた。また、細胞核あたりのリン酸化 H2AX フォーカス数も照射 4 時間後に最大値を示した。その後のリン酸化 H2AX フォーカス陽性細胞数と細胞核あたりのリン酸化 H2AX フォーカス数は経時的に減少し、照射 120 時間後では 25 % 程度の細胞において 1 ~ 2 個程度のリン酸化 H2AX フォーカスが残存していた。さらに、X 線照射によって神経幹細胞のアポトーシスが誘導されるか否かについて検討を行ったところ、放射線照射後持続的にアポトーシスが引き起こされており、照射 7 日後には 80 % 近い細胞が死滅した。

次に、X 線照射後に残存していた生存細胞における分化誘導能について検討を行った。その結果、照射後に増殖培地あるいは分化誘導培地で培養された生存細胞におけるニューロンおよびオリゴデンドロサイトへの分化の程度は、照射による影響はほとんど認められなかった。しかしながら、大変興味深いことに、増殖培地中では GFAP 陽性細胞がほとんど認められなかったのに対し、照射後に増殖培地で培養された生存細胞では、50 % 程の細胞において GFAP の発現が認められた。

X 線照射によるアストロサイト分化促進の詳細な分子機構を解明する目的で、X 線照射後の STAT3 および NF- $\kappa$ B の活性化について検討を行った結果、NF- $\kappa$ B の活性化が認められた。さらに、NF- $\kappa$ B の阻害剤処理により、X 線照射後の GFAP 陽性細胞数は約 50 % 減少した。また、X 線マイクロビーム照射により細胞集団の一部を局所照射し、照射野近傍の非照射神経幹細胞における GFAP の発現を検討したところ、GFAP 陽性細胞数の著しい増加が認められ、同時に NF- $\kappa$ B の阻害剤処理により分化が抑制された。

## 考 察

本研究の結果から、増殖条件下で培養している大脳皮質由来神経幹細胞に X 線を照射すると DNA 二重鎖切断が誘導されるが、細胞にはその損傷を修復する能力があることが明らかとなった。また、海馬由来神経幹細胞と同様に、アポトーシスによる細胞死の誘導が顕著であることが示された。さらに、放射線照射生存細胞では、増殖環境下でも GFAP 陽性細胞の割合が増加することを発見し、放射線照射がアストロサイトへの分化を促進すると結論づけた。また、X 線照射による分化促進には、NF- $\kappa$ B の活性化が一部関与していること、さらに、局所照射の実験から、被照射細胞からのシグナルにも NF- $\kappa$ B の活性化が関与していることをつきとめた。以上の結果から、放射線照射は細胞死を誘導すると同時に、生存細胞では機能細胞への分化を促進して脳機能を回復させるように働いていることが示された。

(備考) □日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。