

着床前期の胚における放射線に対する防御機構の解明

(受託者) 公立大学法人大阪市立大学

(研究代表者) 吉田佳世 大学院医学研究科

(研究開発期間) 平成22年度～23年度

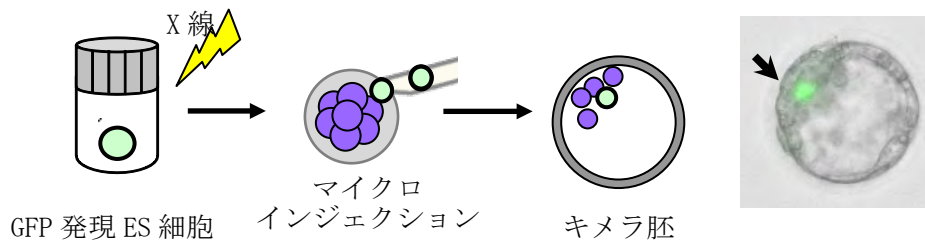
1. 研究開発の背景とねらい

本事業では、原子力の安全対策にとって、人体に対する放射線の影響を解析することは重要であり、特に妊婦に対しては、母体のみならず胎児への継世代的な影響の評価が必要であるという考えに基づき、初期胚の中でも特に着床前期の胚におけるX線に対する防御機構の解明を目的として実施する。哺乳動物の初期胚では、一部の細胞が放射線などによる損傷を受け修復できない場合、アポトーシスを起こして排除され、他の細胞が排除された細胞の役割を補完するが、アポトーシスで排除されない場合、修復できていない細胞が増殖し奇形胚となると考えられている。このように、損傷を受けた初期胚は、複雑なメカニズムの中で、修復、アポトーシスによる排除、異常発生による奇形という3つの運命を選択することとなる。本事業では、放射線照射したマウスの胚性幹細胞 (ES 細胞) を正常な8細胞期胚に注入し、ES細胞と胚がどのように変化するかを解析する。またアポトーシスに関連する遺伝子やDNA修復遺伝子を欠損したマウスES細胞を用いて、X線に対する感受性を比較検討し、初期胚におけるこれらの遺伝子の役割を解析する。

2. 研究開発成果

(1) 初期胚及びES細胞の放射線感受性の解析

マウス初期胚 (8細胞期胚) にX線を照射後、胚盤胞期胚までの発生を経時的にタイムラプス顕微鏡を用いて形態を観察した結果、X線の線量の増加に伴い、正常発生率は低下し、異常発生率、死亡率が増加した。複数の細胞の集合体である8細胞期胚では、X線の線量により異常の程度が異なることから、細胞同士の連携や細胞の代替により生き延びることが示唆される。また、マウスの受精卵よりES細胞を樹立し、初期胚由来の細胞と区別するためにGFP発現ベクターを導入した。GFPを発現しているES細胞にX線を照射し、マウス初期胚 (8細胞期胚) にマイクロインジェクションしたキメラ胚 (図-1) について、X線照射したES細胞の影響が胚発生に影響するかタイムラプス顕微鏡を用いて解析した結果、正常発生率がわずかに低下した。初期胚に直接X線を照射した場合に比べ、X線に対する感受性が低下したことから、ES細胞へのX線の影響は、導入先の胚細胞全てに影響するわけではなく、胚の細胞が発生を補い、相互に影響していることが示唆される。



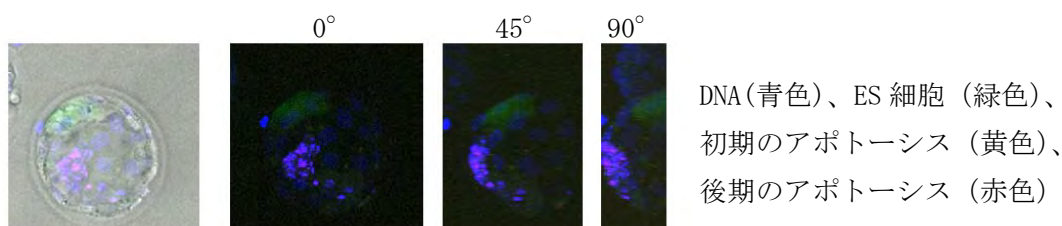
(図-1) X線照射したES細胞の初期胚への導入

(2) 放射線照射した ES 細胞の初期胚への影響の解析

GFP を発現している ES 細胞に X 線を照射し、マウス初期胚 (8 細胞期胚) にマイクロインジェクションしたキメラ胚について、アポトーシスを起こしているのかをキットを用いて解析した結果、異常な胚や死亡した胚でアポトーシスを確認できた。予想に反し、X 線未照射のキメラ胚でも一部の細胞がアポトーシスを起こしていた。また、アポトーシス関連遺伝子の影響を解析するために、アポトーシス関連遺伝子欠損マウスから、ES 細胞を樹立し GFP 発現ベクターを導入した。この ES 細胞に X 線を照射後、マウス初期胚 (8 細胞期胚) へマイクロインジェクションしたキメラ胚について、タイムラプス顕微鏡を用いて経時的に観察した結果、正常発生率の低下はごくわずかであった。このようなキメラ胚でもアポトーシスを起こしていたことから、この遺伝子以外の遺伝子によりアポトーシスが誘導された、あるいは、導入された初期胚により誘導されたことが示唆される。

(3) 放射線照射細胞と周辺の非照射細胞の細胞間コミュニケーションの解析

X 線を照射したアポトーシス関連遺伝子欠損 ES 細胞を初期胚に導入した場合、GFP の発現を伴う内部細胞塊が見られ、同時に別の位置にアポトーシスを起こしている細胞が見られた。このような局在の違いにより、異常なアポトーシスを起こした細胞に対し物理的な排除を行う防御機構があると考えられる (図 2)。また、アポトーシスを起こしている細胞では、GFP の発現が低いことから、X 線照射された ES 細胞からの細胞間コミュニケーションの影響を受けた胚細胞である可能性と ES 細胞そのもののアポトーシスによる排除の可能性が示唆される。



(図 2) キメラ胚におけるアポトーシスを起こした細胞の局在

(4) 胚発生における修復遺伝子の機能解析

初期胚において、X 線による損傷に対する DNA 修復は防御機構として重要であるため、修復関連遺伝子を欠損したマウスを作製し、このマウスの受精卵より樹立した ES 細胞に GFP 発現ベクターを導入した。この細胞に X 線を照射後、マウス初期胚 (8 細胞期胚) にマイクロインジェクションし、タイムラプス顕微鏡で観察した結果、アポトーシスを起こしており、そのような細胞は GFP の発現が弱く、胚の外側に位置していた。この場合、異常な細胞はアポトーシスにより排除されやすく、同時にそのような細胞は塊となり、胚の外側に排除されることが考えられる。

3. 今後の展望

アポトーシス関連遺伝子や修復関連遺伝子を欠損させた ES 細胞をさらに樹立することにより、複雑な初期胚における細胞間コミュニケーションを明らかにすることが期待され、初期胚における放射線に対する防御機構を解明できると考えられる。また、マウスさらにヒトの iPS 細胞を用いることにより、ヒトへの影響を検討できると考えられる。