

継時的観察による 線・紫外線誘発細胞死の形態比較

2006年3月修了
先端生命科学専攻 動物生殖システム分野

46545 日高 征幸

指導教員 三谷 啓志 教授

キーワード：放射線、DNA 損傷、アポトーシス

【序論】

アポトーシスは生理的条件下で厳密に制御される能動的な細胞死と位置づけられており、細胞構造が単に崩れてしまった結果のネクローシスとは「形態的变化」と「生化学的变化」によって区別されてきた。しかし、生体内で能動的な細胞死を厳密に制御していくための様々な因子の役割が研究されていくにつれ、アポトーシスにも多様性があることが明らかになり、これまでのアポトーシスの概念だけでは対応できなくなりつつある。そのために、細胞の動き、形、状態、時間的な変化を通して、細胞死という現象の実態を視覚的、時空的に解析していくことは生化学的な解析とともに重要である。

電離放射線や紫外線により DNA に損傷を受けた細胞は、損傷を修復するか、アポトーシスの過程で核を壊して細胞自体を消去する機構を発動させ、個体レベルの「死」を逃れる。損傷が残ると個体死や、癌や老化の原因につながる。従って電離放射線や紫外線により DNA が損傷を受けた場合の現象を明らかにしていくことは重要である。

野生型メダカ CAB 系統から作成された 3 つの放射線高感受性変異体のうち ric1 は DNA 二本鎖切断修復機構に欠損があり、ric2、3 では、より軽度の修復不全であることが、当研究室において示唆されている。また、CAB 系統と RIC1 変異体に 線 (2.5 Gy) を照射した場合、照射 24 時間後において、CAB 系統の精巣では精原幹細胞の細胞死が多く検出されたが、RIC1 変異体ではほとんど検出されず、照射 3 日後に多くの細胞死が検出されたことが、当研究室において明らかになった。したがって、CAB 細胞と RIC 細胞を用いた、細胞死の比較は興味深いテーマである。

そこで、本研究ではメダカ胚体由来培養細胞に IR や紫外線で損傷を与えた場合、どのような現象が見られるのか、特にどのような形態変化の過程を経て細胞死を迎えるのか、time-lapse 観察による解明を試みた。

【方法】

野生型メダカ CAB、Hd-rR、Kaga 系統と、CAB より作成された 線高感受性突然変異体メダカの RIC1、RIC2 系統それぞれの胚体由来培養細胞を用いた。これらの培養細胞に、線、UVC、UVA をそれぞれ照射し、細胞の形態変化、増殖の進行度を観察した。観察方法は、照射後数日間培養し、断片的に細胞の状態を見る静止画像解析と、照射直後から 24 時間連続観察する time-lapse 解析を行った。また、UVA を照射した RIC2 細胞の核の状態を見るために、UVA 照射 4 時間後 DAPI で染色し、蛍光観察を行った。

【結果と考察】

野生型の CAB 細胞に 線 (20 Gy) を照射して 5 日間培養した場合、凝縮し丸くなった細胞や

巨大細胞が見られ、また、増殖進行の停止が見られた。

CAB 細胞に 線、または UVC を照射して、time-lapse 観察を 24 時間続けた結果、細胞分裂が次第に停止し、照射 2-4 時間後から細胞が縮小して dish 底面から離れ、断片化する様子が見られ始めた。また、 線照射後すぐに細胞分裂が停止したが、UVC 照射の場合、照射直後しばらく細胞分裂が見られた後に、分裂の停止が見られた。この結果から、 線照射の場合、G2-M チェックポイントがかかり、UVC は S 期でチェックポイントがかかることが示唆される。

一方、ENU による突然変異誘発技術により CAB から作成された 線高感受性メダカ RIC1、RIC2 の胚体由来細胞に 線、または UVC を照射して、同様に観察した場合、形態変化を起こす細胞は少なく、また、形態変化を起こしてもほとんどが断片化まで実行されなかった。 線を照射した RIC1 細胞、RIC2 細胞において、このような断片化が途中で止まったような形態変化（不完全断片化）は、完全に断片化する形態変化が本当に途中で停止したか、あるいは別の形態変化が起きたか、二通りの解釈が可能である。しかし、 線照射の CAB 細胞では、不完全断片化を起こした細胞は見られず、また、CAB 細胞における完全な断片化細胞の出現パターンと、RIC 細胞における不完全断片化細胞の出現パターンとは似た傾向があることから、 線照射の RIC 細胞は、完全に断片化する途中で形態変化が止まったことが考えられる。更に、RIC1、RIC2 細胞に 線を照射した場合において、照射 14-18 時間後の早い段階で細胞分裂の再開が見られた。この結果から、RIC1、RIC2 は、 線照射による DNA 損傷によって発動したチェックポイントの解除機構にも異常があることが示唆された。しかし、 線を照射して 5 日間培養した場合、RIC1 の増殖率が最も低かった。RIC1 細胞は、 線照射後 24 時間以降に遅いアポトーシスを起こしたか、あるいは、再び細胞分裂の停止が見られたということが考えられる。

CAB 細胞、RIC1 細胞、RIC2 細胞にそれぞれ UVA を照射した場合、ブレbbingを起こして死ぬ細胞と、接着したまま細胞を縮小させて核を明瞭化させて死ぬ細胞が多く見られた。RIC2 細胞は後者の形態変化を起こす細胞がほとんどだった。UVA 照射の RIC2 細胞は、ほとんどが照射直後急激に形態変化を起こしているの、DNA 損傷によるアポトーシス誘導により細胞死を起こしたというより、細胞膜に障害を受けて、その結果、形態変化がおきて死にいたったと考えられる。

これらの結果は、メダカ培養細胞において、細胞死に至る形態変化が、 線、UVC、UVA で大きく異なり、 線と UVC に関しては、RIC1 細胞、RIC2 細胞は早い細胞死を引き起こしにくいことを示している。

