

メダカ胚を用いた発達中の中枢神経系における放射線誘発アポトーシスの発生とその食食過程

動物生殖システム分野 47-106341 日比 勇祐

指導教員 三谷 啓志

キーワード メダカ、アポトーシス、食食

【序論】

生体の中でも特に発達中の中枢神経系は放射線に対して高感受性である事が多数報告されている。したがって、発達中の中枢神経系に与える放射線の影響がどのように生じ、修復されるか、またそれらが最終的に個体にどのような影響を与えるかを明らかにすることは非常に重要な課題である。哺乳類の発生は母胎内で進行し、生きたままその過程について詳細に観察することは極めて困難である。そこで本研究においては、卵殻が透明で胚の発生を容易に観察できるメダカ胚をモデル生物として用い、発達中の中枢神経系に対する放射線影響について解析をおこなった。先行研究によりメダカ胚が放射線高感受性を示す st. 28 の時期に放射線を照射すると中脳視蓋周辺部にアポトーシス細胞が生じ、時間を経る事でそれらアポトーシス細胞が消失することが明らかとなっている。本研究では、p53 遺伝子欠損胚を用いて、放射線により誘発されるアポトーシスの発生とそれらアポトーシス細胞の食食・除去、及びアポトーシス発生後の脳の再生に p53 遺伝子がどのように関与しているかを明らかにすることを目的に研究を行った。

【結果および考察】

1. 放射線誘発アポトーシスの発生と形態観察

発達中の中枢神経系に生じる放射線影響を解析するため、放射線高感受性を示す時期のメダカ胚 st.28 に γ 線(10Gy)を照射し、 γ 線照射 24 時間後にアクリジンオレンジ(AO)染色によってアポトーシス細胞の検出を行った。その結果、野生型胚の中脳視蓋周縁部において小さなアポトーシス細胞と小さなアポトーシス細胞が複数集積した塊(以下、ロゼット状のアポトーシス細胞と呼ぶ)が検出された(Fig. 1)。それら AO 染色により観察された二種類のアポトーシス細胞を電子顕微鏡を用いて詳細に観察すると、小さなアポトーシス細胞は単一の核凝縮したアポトーシス細胞であり、ロゼット状のアポトーシス細胞は単一の核凝縮したアポトーシス細胞が複数集積しそれらが膜に包まれている形態であることが明らかとなった。

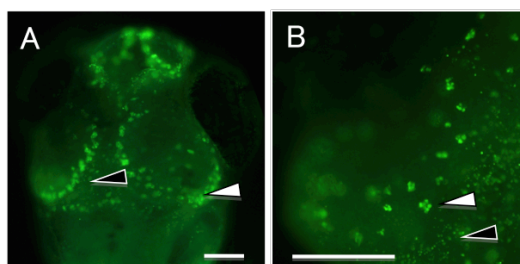


Fig.1 中脳視蓋周縁部で生じる二種類のアポトーシス細胞
小さなアポトーシス細胞を黒矢頭でロゼット状のアポトーシス細胞を白矢頭で示した。
(scale bar=100 μ m)
(A) γ 線(10Gy)照射メダカ胚頭部で誘発されるアポトーシス像
(B)中脳視蓋周縁部で観察される小さなアポトーシス細胞とロゼット状アポトーシス細胞

呼ぶ)が検出された(Fig. 1)。それら AO 染色により観察された二種類のアポトーシス細胞を電子顕微鏡を用いて詳細に観察すると、小さなアポトーシス細胞は単一の核凝縮したアポトーシス細胞であり、ロゼット状のアポトーシス細胞は単一の核凝縮したアポトーシス細胞が複数集積しそれらが膜に包まれている形態であることが明らかとなった。

2. 放射線誘発アポトーシスと p53 遺伝子

発達中の中枢神経系で生じる放射線誘発アポトーシスにおける p53 遺伝子の機能を明らかにするため、st. 28 の野生型胚と p53 遺伝子欠損胚に γ 線(10Gy)を照射し、 γ 線照射 3 時間後から 48 時間後まで 3 時間毎に、アポトーシス細胞の経時変化を AO 染色法により解析した。その結果、p53 遺伝子欠損胚では野生型胚と比較して、アポトーシス細胞の発生に遅延が生じており、アポトーシス細胞が観察される期間が顕著

に短いことが明らかとなった (Fig. 2A)。また、野生型胚と p53 遺伝子欠損胚で誘発された中脳視蓋におけるロゼット状のアポトーシス細胞数を定量化した。その結果、p53 遺伝子欠損胚では野生型と比較して発生するアポトーシス細胞の頻度が有意に減少する事が明らかとなった (Fig. 2B)。よって、発達中の中枢神経系において誘発されるアポトーシス細胞の発生過程に p53 遺伝子は重要な役割を果たしていると考えられる。

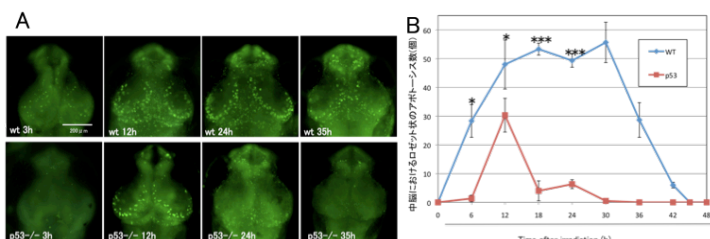


Fig.2 放射線誘発アポトーシスとp53遺伝子
(A)野生型胚とp53遺伝子欠損胚で誘発されるアポトーシス細胞の経時変化
(B)野生型胚とp53遺伝子欠損胚で誘発されるアポトーシス細胞数の定量化結果
*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001

3.放射線誘発アポトーシスの貪食除去過程

放射線により誘発されたアポトーシス細胞の貪食分解過程に着目し解析をおこなった。野生型胚にγ線(10Gy)照射12、24時間後の中脳視蓋周縁部に生じるアポトーシス細胞を電子顕微鏡により観察した。その結果、ロゼット状のアポトーシス細胞の内部でアポトーシス細胞が分解されている様相が確認された。よってロゼット状のアポトーシス細胞は、食細胞がアポトーシス細胞を集積し形成されたものである事が強く示唆された。次に中枢神経系において食細胞として機能するミクログリア細胞に着目し、ミクログリア細胞特異的に発現する遺伝子 apolipoproteinE(apoE)遺伝子を probe とした whole-mount in situ hybridization(WISH)法をメダカ照射胚に行った。その結果、野生型照射胚と p53 遺伝子欠損照射胚ともに、非照射胚と比較して、apoE 遺伝子のシグナルはγ線照射によって脳全体に位置するようになり、そのシグナルの大きさは肥大化した (Fig. 3)。WISH 染色したメダカ胚の組織切片を作製し、apoE 遺伝子発現部位とアポトーシス部位の局在を解析すると、それらの部位は共局在していることが明らかとなった (Fig. 4)。これらの結果により、食細胞としてミクログリア細胞がアポトーシス細胞を多数集めた後、貪食を進行させる可能性が示唆された。

【結論】 本研究により発達中の中枢神経系において誘発されるアポトーシス細胞の発生過程に p53 遺伝子が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。また、発達中のメダカ胚の中脳視蓋周縁部においてミクログリア細胞が放射線により誘発された複数のアポトーシス細胞を一カ所に集積した後に、その細胞中でアポトーシス細胞の分解が進行することを見出した。

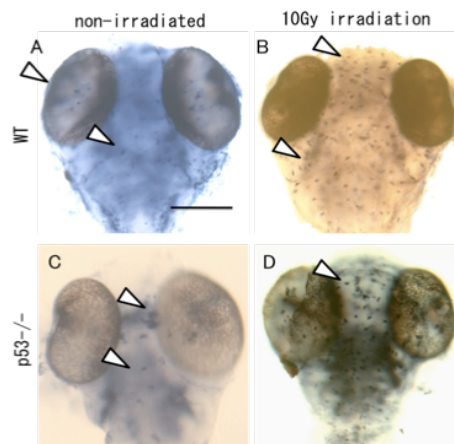


Fig.3 野生型胚とp53遺伝子欠損胚におけるapoE遺伝子のWISH結果(scale bar=200μm)
白矢頭はapoE遺伝子の発現を示す。

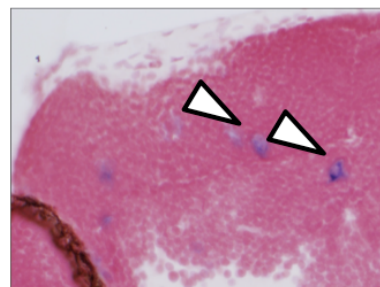


Fig.4 apoE遺伝子のWISH染色した胚の組織切片
p53遺伝子欠損胚にγ線(10Gy)照射24時間後、apoE遺伝子をprobeとしたWISH染色を施し、アポトーシス部位とapoE遺伝子の発現部位を解析した。それらが共局在した部位を白矢頭で示す。