

鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書（環境部門）

研究期間（3年目/3年間）

研究者 又は 研究代表者	氏名	(ふりがな) くりまさ あきひろ 栗政 明弘
	所属研究機関 部局・職	鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授 電話番号 0859-38-6432 電子メール kurimasa@med.tottori-u.ac.jp
研究課題名	放射線DNA損傷の検出による放射線生物影響評価システムの構築	
研究結果	<p>放射線で生体の細胞に生じるDNA損傷とその修復を観察し評価するバイオセンサーを開発し、放射線の生物影響を直接的に評価するシステムを構築する。バイオセンサーは、鳥取大学で開発したDNA2本鎖切断損傷に特異的に集積する53BP1を蛍光タンパク質GFPと融合させた人工タンパク質を用いる。これをヒトがん細胞ならびにマウス正常組織・細胞内で安定に発現させ、生きた細胞でDNA損傷部位を緑色蛍光で発光させる。培養顕微鏡で検出した細胞内DNA損傷を、高感度・高効率にかつ自動化して検出する画像解析ソフトウェアを米子高専・地元企業との共同研究で開発し、バイオセンサー統合解析システムを構築する。</p> <p>緑内障は網膜神経節細胞が障害を受ける疾患であり、現在は眼圧下降が唯一の治療法になっている。日本人では40歳以上の約5%が緑内障であり、総計400万人の罹患が推定されている。また、我が国における失明原因の第1位を占めており、日本の社会において、大きな問題として位置づけられている。緑内障の有病率は、年齢とともに増加することが知られており、日本の少子高齢化に伴って、今後ますます患者数が増えていくことが予想されている。</p> <p>眼圧だけでなく循環障害、近視、高齢、角膜厚が薄いことなどが緑内障の危険因子であることが疫学的研究から明らかにされている。近視、高齢、角膜厚が薄いことは眼球壁の物理特性が緑内障発症に関与していることを示している。眼圧、培地の硬さ、伸展、圧縮および低酸素などの物理条件の上昇を含めた神経節細胞に対する物理的刺激が、どのように緑内障の本態である網膜神経節細胞の細胞死を引き起こすかは、未だ十分に解明されていない。特に最近になり、広島原爆被爆者において正常圧緑内障の発生頻度の上昇が明らかにされている。放射線影響の現れやすい臓器として、白内障の原因である水晶体だけでなく、網膜の重要性が認知されてきている。</p> <p>今回、網膜神経節細胞での放射線の直接的な作用を観察する目的で、バイオセンサーを導入したマウスの網膜より網膜神経節細胞(RGC)の培養を行った。RGCは、目的とする細胞以外に複数の細胞が混じっているために、特殊な抗体を用いても目的とする細胞のみを選別・精製する必要がある。東大の眼科並びにアイソトープセンターの研究者との共同研究により、Huettnnerらの方法(Huettnner JE and Baughman RW, J. Neurosci 1986)を改変した方法を用いてマウス網膜の神経節細胞の培養を試みた。得られた神経節細胞に、放射線類似作用を持つネオカルシノスタチン(NCS)を投与することで、放射線と同じ作用を引き起こし、RGCで起こる細胞の変化を、導入したバイオセンサーを用いて観察を行った。</p>	

研究結果	<p>BRCA1遺伝子に変異を持った乳がん細胞株に対するバイオセンサーの導入は成功し、その細胞を用いたタイムラプス撮影実験を施行した。この乳がん細胞株はBRCA1遺伝子に変異があり、DNA修復機構の一部が機能しないために、タイムラプス撮影でも通常の細胞と比べてかなり脆弱で、長期間の撮影ができないことが明らかとなった。ただ、短時間では観察は可能であり、条件を変更した方法での実験を進めている。</p> <p>撮影とデータ収集は行ったが、まだ画像解析は終了していない。今後、薬剤によるDNA損傷誘発とその後の細胞内フォーカス形成の変化を検討していく。</p> <p>画像解析のためのソフトウェアの作成に関しては、動き回る細胞を輝度の明るいものから選択し、その後選択した画像を消去し、さらに輝度のくらい細胞を選別するという、多段階の細胞自動追尾・選択ソフトウェアの開発を進めている。まだ完成はしていないが、これから1年以内の完成を目指している。</p>	
研究成果	<p>今回の研究で、神経細胞や網膜などの分化した細胞でのDNA損傷応答が、これまでに観察されてきた培養細胞のものとは異なる可能性が示唆された。新たな知見が得られたのではと考えている。</p> <p>放射線損傷応答のみならず、最近の画像撮影技術の発達に伴い、人の目によらない画像解析ソフトウェアによる新しい画像解析技術が求められている。このためのソフトウェア開発を進めてきた。今回は、培養細胞のタイムラプス画像に特化したものだが、今後この研究で得られた知見は、人ごみを連続的に撮影したビデオ画像の解析など、一般の人が目にできる多量のビデオ画像の自動解析にも応用可能となっていくと考えられている。</p>	
次年度研究計画	<p>網膜神経節細胞と乳がん細胞株に導入したバイオセンサーを用いた解析は、今後も継続して行い、それらの細胞におけるDNA損傷応答メカニズムを明らかにしていく。</p> <p>画像解析ソフトウェアに関しても、継続して開発を続けて、バイオセンサーの統合的解析システムを構築していく。</p>	
報告責任者	所属・職氏名	<p>国立大学法人鳥取大学研究協力課研究助成係・朝野弘昭 電話番号 0857-31-5494 電子メール h-asano@adm.tottori-u.ac.jp</p>

- 注1) 表題には、環境部門、地域部門、北東アジア学術交流部門のいずれかを記載すること。
- 2) 「研究期間（ 年目/ 年間）」及び「次年度研究計画」は、環境部門のみ記載すること。
- 3) 研究者の知的財産権などに関する内容等で、非公開としたい部分は、罫線で囲うなど明確にし、その理由を記すこと。
- 4) 研究実績のサマリーを併せて提出すること。

平成28年3月15日

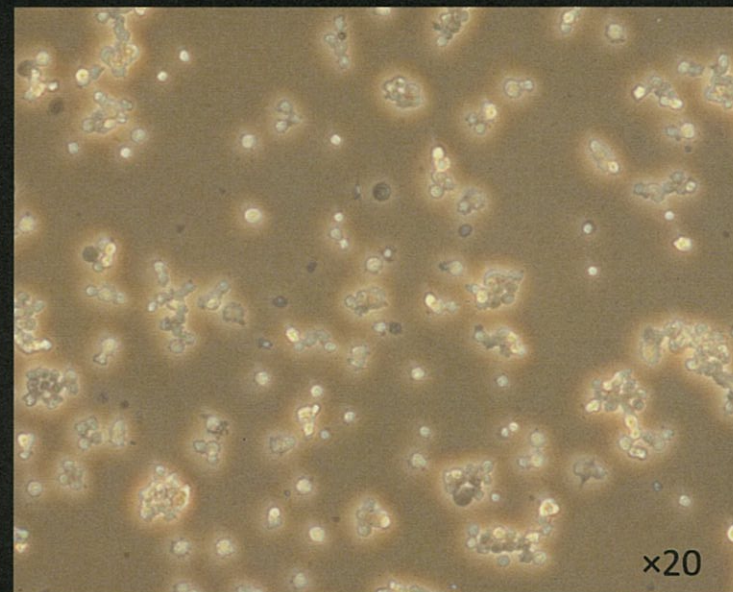
5daysの仔7匹(全てGFP+)の網膜を取出し網膜幹細胞培養実験

Thy-1抗体に付いていない(剥がれてしまったこと)をふまえThy-1チューブから取り出した細胞液を別に培養

培養初日(3時間後)



A

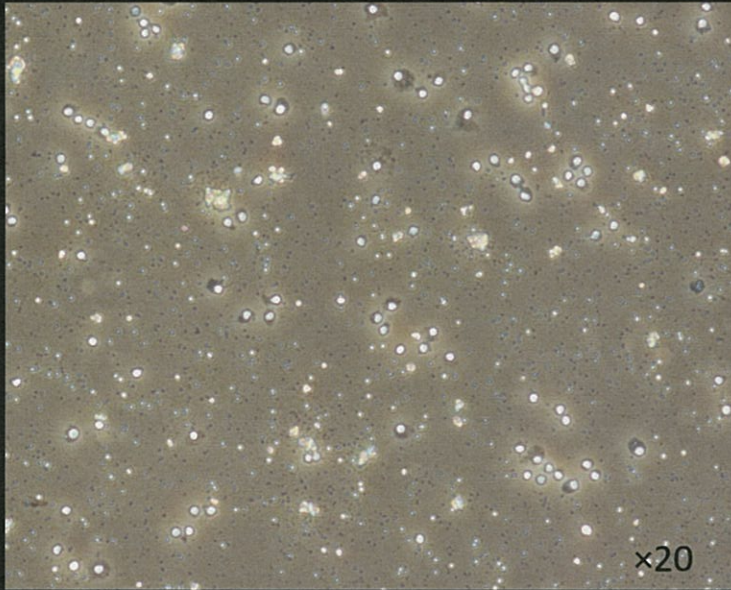


B

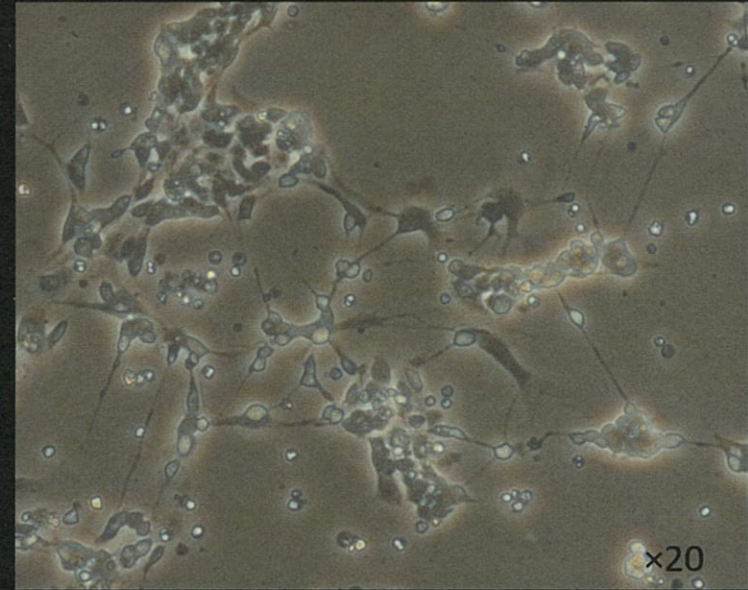
Thy-1抗体チューブ付着液・・・A Thy-1チューブより取り出し細胞液・・・B

培養3日目

A



B

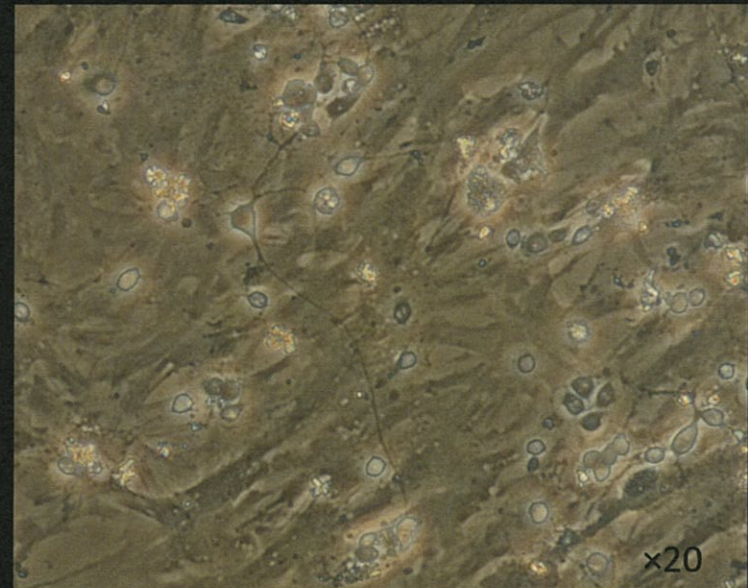


培養9日目

A



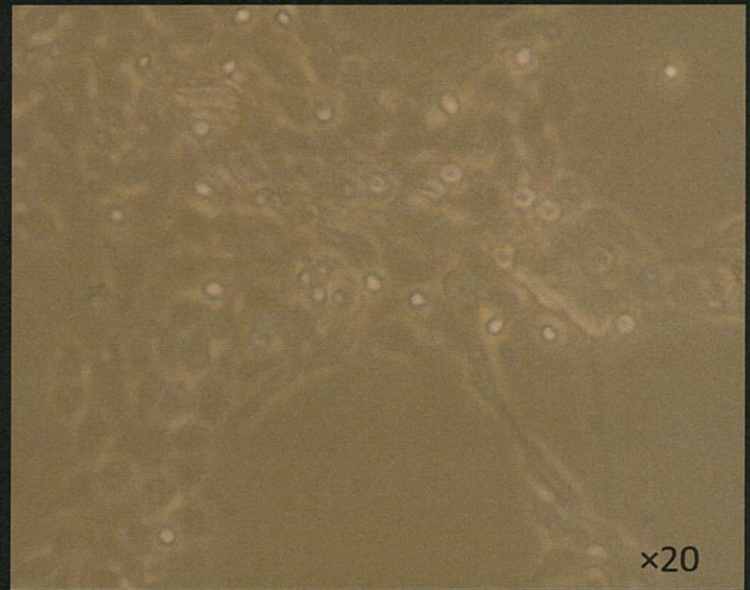
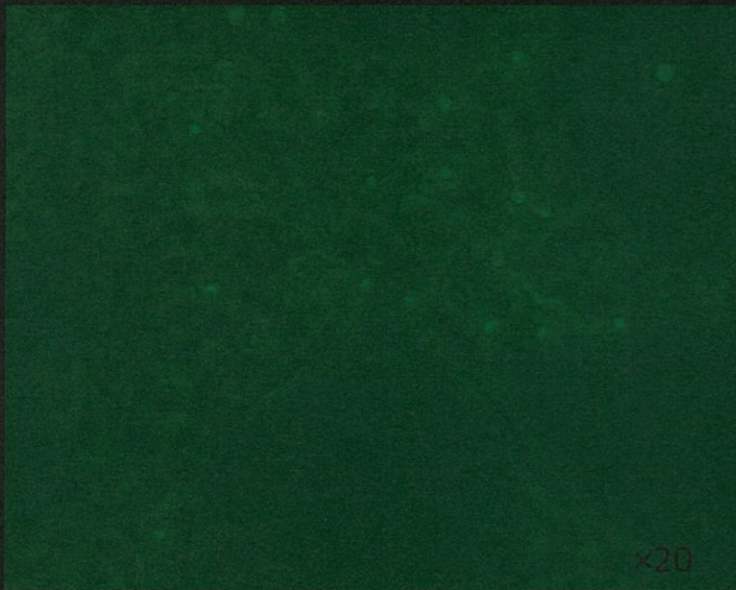
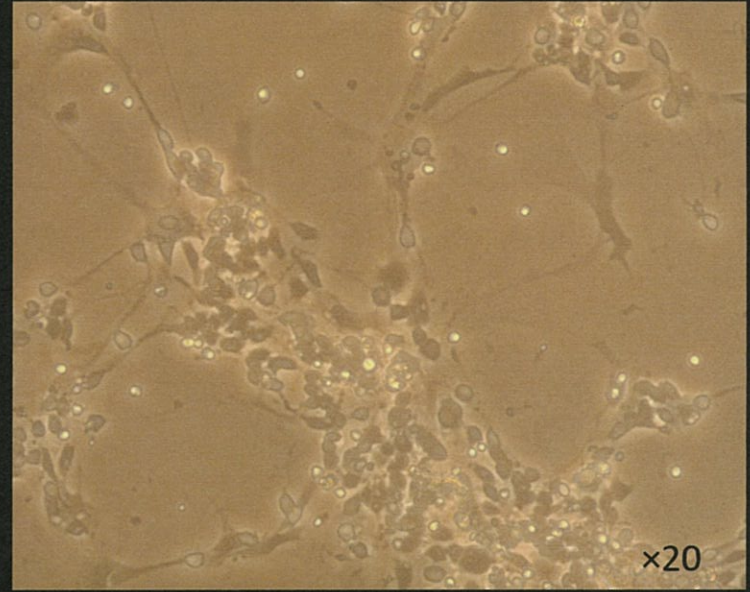
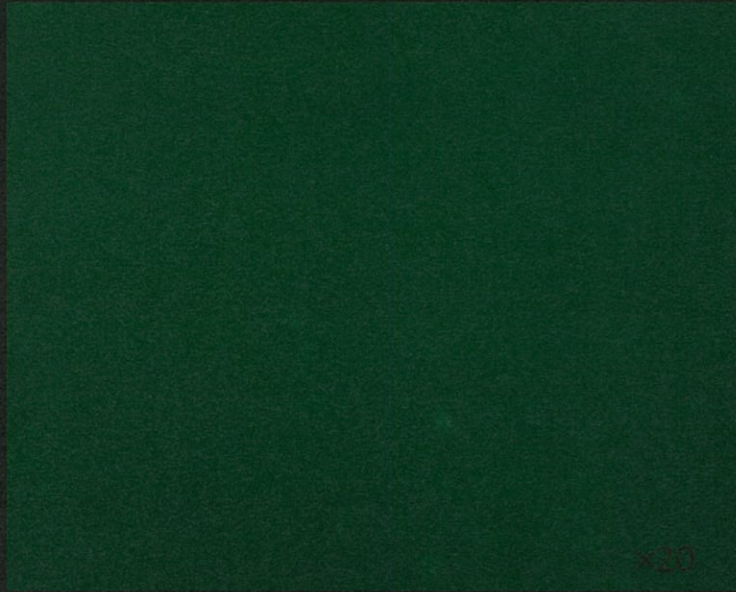
B



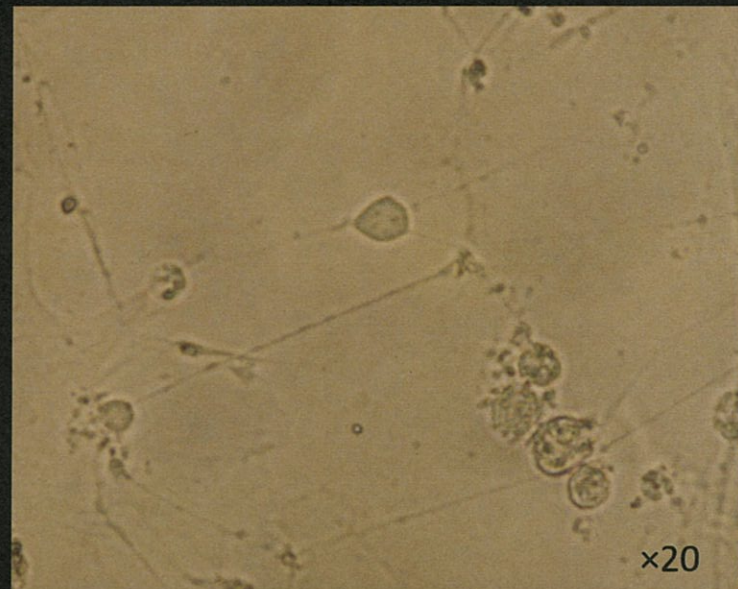
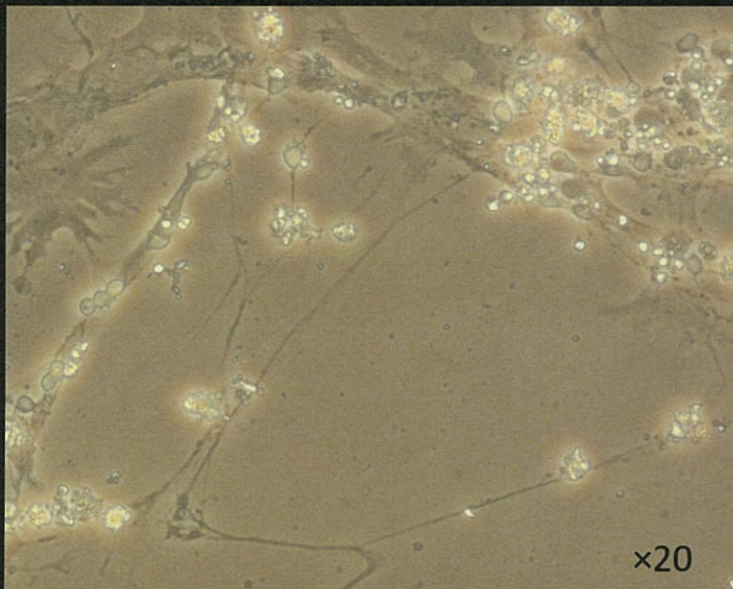
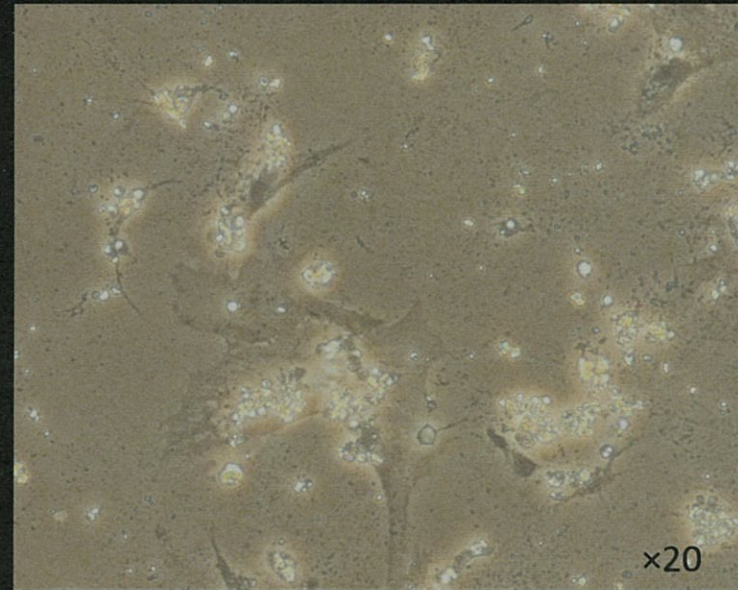
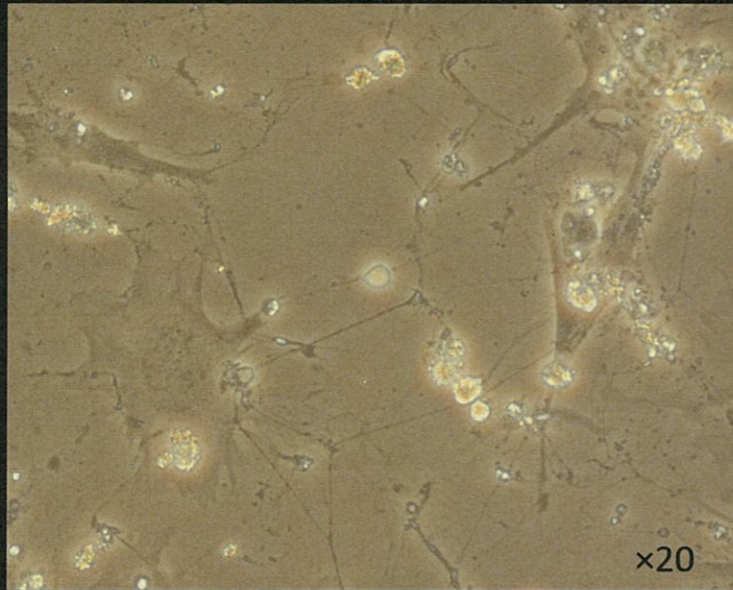
Thy-1抗体チューブ付着液・・・A

Thy-1チューブより取出し細胞液・・・B

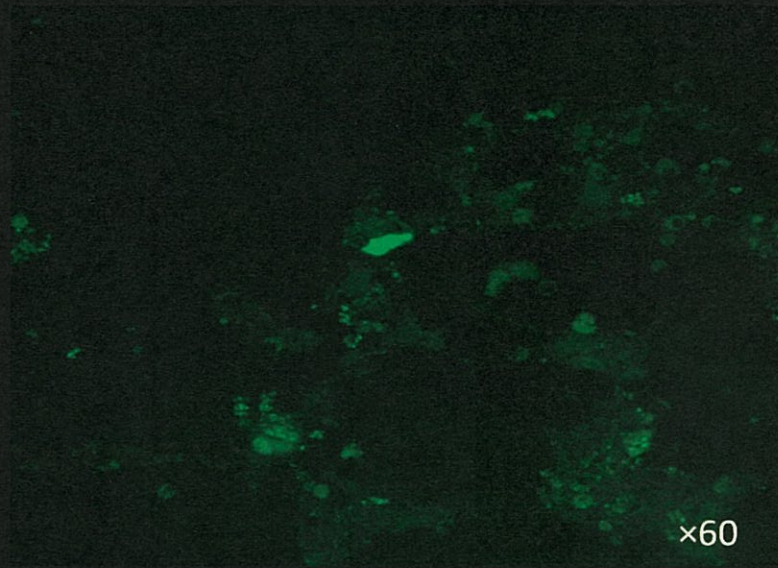
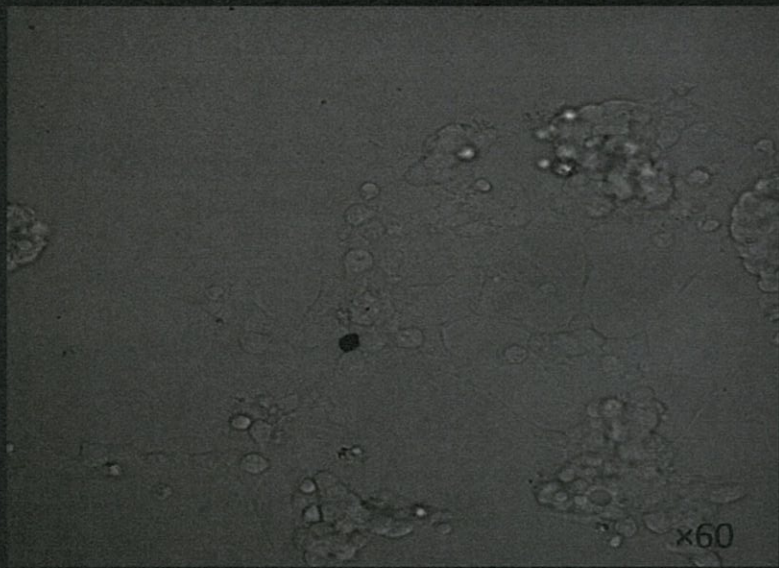
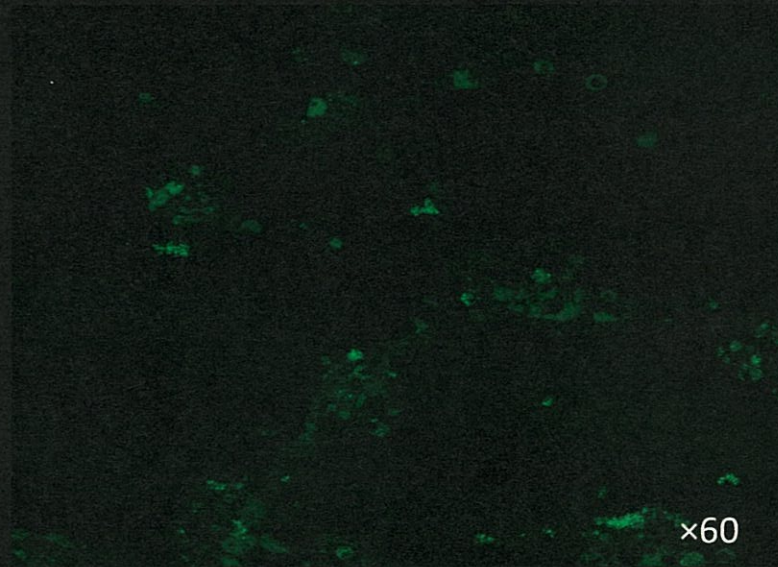
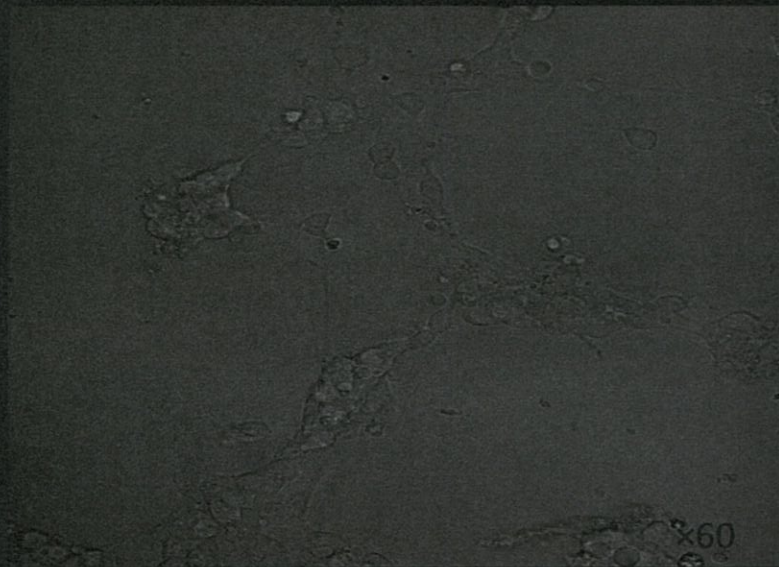
B 培養4日目(培養室顕微鏡)



B 培養15日目(培養室顕微鏡)



B 培養4日目(共焦点顕微鏡)



B 培養4日目(共焦点顕微鏡)

