

7.3.3 低線量率 γ 線連続照射マウスの脾臓組織のリンパ球で発現する遺伝子の解析

Gene Expression Analysis of Splenic Lymphocytes from Mice Irradiated with Low-Dose-Rate Gamma-Rays

杉原 崇, 田中 公夫, 小木曾 洋一
生物影響研究部

Takashi SUGIHARA, Kimio TANAKA, Yoichi OGHISO
Department of Radiobiology

Abstract

Gene expressions of *p21* and *CyclinG1* were up-regulated by p53 activation in spleens of C3H mice irradiated with medium-dose-rate (MDR: 400 mGy/22h/day; 18.2 mGy/h) ^{137}Cs γ -ray, but gene expressions of *p21* and *CyclinG1* were not changed in spleen of mice irradiated with low-dose-rate (LDR: 20 mGy/22h/day; 0.91 mGy/h) γ -ray. T-lymphocytes were separated by magnetic beads from spleens, and gene expressions of *p21*, *CyclinG1*, *Bax* and *Mdm2* were examined by real-time PCR method after irradiation at 20 mGy/22h/day. Gene expressions of p53 targeted genes, *Bax*, *Mdm2* and *CyclinG1*, were not increased in splenic T-lymphocytes after LDR-irradiation, while *p21* alone was up-regulated. No increase in gene expression of *p21* was confirmed in splenic T-lymphocytes of p53-deficient mice after LDR-irradiation, indicating that gene expression of *p21* in T-lymphocytes is regulated by p53 activation in mice irradiated at LDR, similar to irradiations at MDR and high-dose-rate (HDR).

1. 目的

これまで、高線量率 X 線や γ 線照射した細胞やマウスへの影響を調べた研究から、高線量率照射に対する応答機構は ATM 経路を介した p53 の活性化によって説明されてきた(Canman *et al.* 1998)。しかしながら、低・中線量率照射による放射線応答機構が高線量率照射で見られる応答機構と同じかどうかはよくわかっていない。さらに、低線量率から中線量率にかけての放射線連続照射では、使用する線量率によって単位時間あたりの DNA 損傷の程度や培養細胞の増殖能も異なるため、p53 の活性化と線量率や照射時間との関与についてもよくわかっていない。

平成 19 年度までに行ったマイクロアレイ実験の結果、中線量率 γ 線照射マウス線維芽細胞株 (NIH/PG13Luc 細胞) で発現量が大きく変化する遺伝子は、放射線照射によって p53 依存的に発現変化

を示すことが知られている *p21* 遺伝子と *CyclinG1* 遺伝子であった(Sugihara *et al.* 2004, 2008)。また、この照射線維芽細胞において発現量の増加が見られた *p21* 遺伝子と *CyclinG1* 遺伝子について、1 日から 40 日間の中線量率(400 mGy/22 h/day) γ 線照射したマウスの脾臓から抽出した RNA を用いて調べたところ、培養線維芽細胞と同様にこれらの遺伝子発現量が増加していることがわかった。また、p53 遺伝子欠損マウス (C3H/p53 KO) へ中線量率 γ 線を連続照射する実験では、*p21* 遺伝子と *CyclinG1* 遺伝子の発現量の増加が観察されなかったことから、中線量率 γ 線照射された正常マウスの脾臓での *p21* 遺伝子と *CyclinG1* 遺伝子の発現量増加は、高線量率 γ 線照射と同様に p53 の活性化を介して制御されていることがわかった。しかし、この中線量率よりも 20 倍低い低線量率(20 mGy/22 h/day) γ 線照射したマウスの

脾臓では *p21* 遺伝子と *CyclinG1* 遺伝子の有意な発現量増加は見られなかった。この理由として、脾臓には、元来遺伝子発現量の多い細胞や、放射線感受性は低いが多量に遺伝子を発現している細胞が複数種混在しているため、全組織の遺伝子発現量を調べたときでは、低線量率 γ 線照射により生じたわずかな遺伝子発現量の変化が検出できなかった可能性がある。そこで、脾臓中に存在するリンパ球は放射線感受性が高いため、リンパ球を分離して遺伝子発現量を測定すれば、低線量率 γ 線により誘導されるわずかな遺伝子発現の変化を検出できるのではないかと考え、脾臓から分取した T リンパ球画分の遺伝子発現量を解析した。

2. 方法

C3H/HeN 雌雄 SPF マウス (8 週齢) を低線量率 (20 mGy/day) ^{137}Cs - γ 線で約 104 日間 (集積線量 2080 mGy) 連続照射した。照射群と非照射群それぞれ各 5 匹ずつのマウスを用いた。また、低線量率 γ 線を 10 日間 (集積線量 200 mGy) 連続照射した *p53* 遺伝子欠損型 SPF 雌マウス (C3H/*p53* KO) と *p53* 野生型 SPF 雌マウス (C3H/*p53* WT) 各 5 匹を用いた。照射終了後 120 分以内にマウスを解剖し、脾臓を摘出した後、死細胞除去キット (ミルティニー社) により死細胞の除去を行った後、 CD4^+ 細胞抽出キット (ミルティニー社)、あるいは CD8^+ 細胞抽出キット (ミルティニー社) を用いて、磁気ビーズによる T リンパ球画分の分取を行った。細胞を Trizol 試薬で溶解後 RNA を抽出し cDNA 化した後、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現量を定量的に解析した。平成 19 年度までに行ったマイクロアレイ実験の結果 (平成 17-19 年度低線量放射線のがん遺伝子影響実験調査報告書) に基づき、*p53* 依存的に発現する 4 個の遺伝子 (*p21*, *CyclinG1*, *Bax*, *Mdm2*) について遺伝子発現量を調べた。

3. 成果の概要

低線量率 γ 線を約 104 日間連続照射 (集積線量 2080mGy) した脾臓の $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ T リンパ球では *p21* 遺伝子の発現が増加することから、低線量率 γ 線照

射による *p21* 遺伝子の発現が *p53* の関与を明らかにするために、10 日間低線量率 γ 線連続照射 (集積線量 200mGy) した *p53* 遺伝子欠損型マウス (C3H/*p53* KO) 脾臓の $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ T リンパ球の *p21* 遺伝子の発現量変化について調べた。その結果、*p53* 遺伝子欠損型マウス (C3H/*p53* KO) 脾臓の $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ T リンパ球では *p21* 遺伝子発現量の上昇が全く見られなかった (図 1)。しかし、*p53* 野生型マウス (C3H/*p53* WT) に 10 日間の低線量率 γ 線照射を行うと、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ T リンパ球の *p21* 遺伝子の発現量は上昇した (Fig.1)。

中線量率 γ 線照射では見られた *CyclinG1* の遺伝子発現量の増加は低線量率 γ 線を 104 日間連続照射した *p53* 野生型マウス (C3H/*p53* WT) 脾臓の $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ T リンパ球では見られなかったことから、低線量率と中線量率 γ 線連続照射では *p53* による *CyclinG1* に対する転写機構が異なっている可能性がある。そこで、高線量率放射線照射後 *p53* に依存して遺伝子発現が上昇することが知られている 2 つの *p53* 依存的な遺伝子 (*Bax*, *Mdm2*) の発現量が低線量率 γ 線により変化するかについて調べた。その結果、*CyclinG1* 遺伝子の結果と同様に、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ T リンパ球での *Bax* 遺伝子、*Mdm2* 遺伝子の発現量は変わらなかった (Fig.2)。

10 日間の低線量率 γ 線照射による *p21* 遺伝子発現量の上昇は *p53* 遺伝子欠損型マウス (C3H/*p53* KO) では見られないことから、低線量率 γ 線で見られた *p21* 遺伝子の発現は *p53* に制御されていると考えられる。しかし、*p53* 依存的な *Bax* 遺伝子、*MDM2* 遺伝子の発現量が低線量率 γ 線連続照射によって変わらなかったことから、低線量率 γ 線連続照射によって活性化された *p53* は *p53* 依存的な 4 つの遺伝子 (*p21*, *CyclinG1*, *Bax*, *MDM2*) のうち *p21* 遺伝子のみの発現量増加を引き起こす可能性がある。

引用文献

- Canman, C.E. et al. (1998) *Science* **281**: 1677-1679.
Sugihara, T. et al. (2004) *Radiat Res.* **162**: 296-307.
Sugihara, T. et al. (2008) *J. Radiat. Res.* **49**: 231-240.

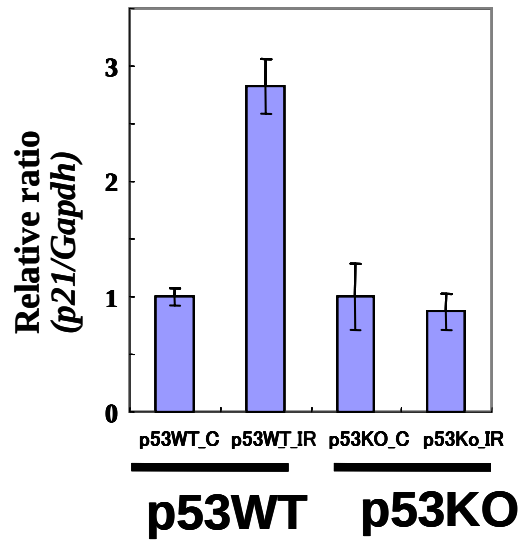


Fig. 1 Gene expressions of *p21* in CD4⁺CD8⁻ T-lymphocytes of spleens from wild type and p53-deficient mice irradiated at LDR (20 mGy/22h/day) for 10 days. p53WT_C: Non-irradiated p53-wild type mice, p53WT_IR: LDR-irradiated p53-wild type mice, p53KO_C: Non-irradiated p53-deficient mice, p53KO_IR: LDR-irradiated p53-deficient mice.

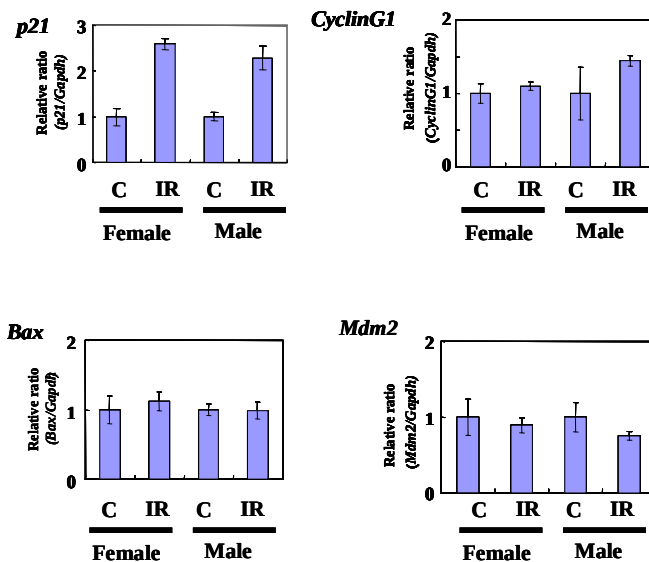


Fig. 2 Gene expressions of *p21*, *CyclinG1*, *Bax* and *Mdm2* in CD4⁺CD8⁻ T-lymphocytes of spleens from wild type mice irradiated at LDR (20 mGy/22h/day) for 104 days. C: Non-irradiated mice, IR: LDR-irradiated mice.