

7.3.3 低線量率及び中線量率 γ 線連続照射マウスの脾リンパ球における

遺伝子発現変化

Gene Expression Changes of Splenic Lymphocytes from Mice Continuously Irradiated with Low-Dose-Rate or Medium-Dose-Rate Gamma-Rays

杉原 崇, 小木曾 洋一, 田中 公夫
生物影響研究部

Takashi SUGIHARA, Yoichi OGHISO, Kimio TANAKA
Department of Radiobiology

Abstract

Gene expressions of *p21* and *CyclinG1* were up-regulated by p53 activation in spleen cells of C3H mice irradiated with medium-dose-rate (MDR: 400 mGy/22h/day; 18.2 mGy/h) ^{137}Cs γ -rays, but were not up-regulated in mice irradiated with low-dose-rate (LDR: 20 mGy/22h/day; 0.91 mGy/h) γ -rays. Then, T- and B-lymphocytes in spleen cells from mice irradiated at the LDR (20 mGy/22h/day) were separated using magnetic beads, and each gene expression of *p21*, *CyclinG1*, *Bax* and *Survivin* was examined by the real-time PCR method. Gene expression of *Bax* was increased in B-lymphocytes at 10 and 40 days after LDR irradiation, although it was not increased in T-lymphocytes. Furthermore, gene expression of *p21* was up-regulated in T-lymphocytes at 10 days after the LDR irradiation and in B-lymphocytes at 10 and 40 days after LDR irradiation. No increase of gene expression of *p21* was observed in either T- or B-lymphocytes of p53-deficient mice irradiated at the LDR, which indicates that both gene expressions of *p21* in splenic lymphocytes are regulated by p53 activation in mice irradiated with γ -rays at LDR, the same as at MDR and high-dose rate.

1. 目的

低線量率 (6 mGy/h 以下) や中線量率 (6~6000 mGy/h) 放射線の連続照射実験では照射時間が長期に及ぶため、照射時間が細胞応答に及ぼす影響を考慮する必要がある。適応応答、バイスタンダー効果、放射線超高感受性(hyper-radio-sensitivity)等、高線量率放射線照射とは異なる細胞応答が低線量放射線を照射した細胞に観察されている(Takahashi 2002; Sugihara *et al.* 2004; Sugihara *et al.* 2008)。高線量率 X 線や γ 線照射による細胞やマウス個体への影響を解析したこれまでの研究から、細胞の応答機構には ATM 経路を介した p53 の活性化が重要な働きをしていることがわかっている(Canman *et al.* 1998; Lee *et al.* 2007)。しかしながら、高線量率放射線照射で見

られるこの活性化が低・中線量率放射線連続照射した細胞や個体の放射線応答でも同じように関与しているかどうかについては殆ど調べられていない。そこで、低・中線量率放射線照射がマウス細胞での p53 の活性化が生じているかどうかを明らかにするために、脾臓から放射線感受性が高いことが知られているリンパ球を分離して遺伝子の発現量を調べた。

2. 方法

C3H 雌マウスに中線量率(400 mGy/22h/day) γ 線を 10, 20, 40 日間連続照射 (集積線量は 4,000, 8,000, 16,000 mGy)、または低線量率(20 mGy/22h/day) γ 線を 10, 40, 100 日間連続照射 (集積線量 200, 800、

2,000 mGy) し、脾臓 T リンパ球 (CD4+/CD8-、CD4-/CD8+) と B リンパ球について、p53 タンパク質に制御されている 3 つの遺伝子 (細胞周期に関わる *p21*、*CyclinG1* 遺伝子及び細胞死に関与する *Bax* 遺伝子) の発現量を調べた。また、*p53* 遺伝子欠損マウスでも同様の実験を行った。他に *p21* 遺伝子と相互作用を持つ、細胞死に関与する *Survivin* 遺伝子についても調べた。

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)、CD8⁺細胞抽出キット (ミルティニー社)、B 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、B 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。

3. 成果の概要

中線量率連続照射群での T リンパ球と B リンパ球の *p21*、*Bax* 遺伝子発現量は、非照射群に比べて増加していた。一方、*CylinG1* 遺伝子は 10 日間照射 (4000 mGy) した時のみ、マウス T リンパ球と B リンパ球で有意に高い発現量の上昇が見られた。

中線量率連続照射 10、20 日目 (集積線量は 4000、8000 mGy) における T リンパ球における *Survivin* 遺伝子発現量は非照射群よりも有意な減少が見られたが、40 日目 (集積線量は 16000 mGy) では照射群の発現量が顕著に高かった。一方、B リンパ球では、10 日間照射したマウスでの *Survivin* 遺伝子の発現量は有意に増加し、20、40 日間の連続照射では減少した。

低線量率連続照射群の CD4+/CD8- T リンパ球及び CD4-/CD8+ T リンパ球は、10 日間の連続照射で *p21* 遺伝子の有意な発現量増加が見られた (Fig. 1)。また、104 日間の連続照射では *p21* 遺伝子と *Survivin* 遺伝子の有意な発現量増加が見られた。

低線量率連続照射 10 日目で発現量の増加が見られた T リンパ球の *p21* 遺伝子は *p53* 遺伝子欠損マウスでは有意な増加が見られなかった (Fig. 1)。従っ

て、低線量率放射線連続照射マウスの T リンパ球の *p21* 遺伝子の発現量増加は *p53* によって制御されていることがわかった。

低線量率連続照射 10、40 日目でのマウス脾臓 B リンパ球では *p21*、*Bax* 遺伝子の発現量の増加が見られた (Fig. 2)。また、*p53* 遺伝子欠損マウスではこれらの遺伝子の発現量の増加は見られなかった (Fig. 2)。そのため、低線量率放射線連続照射マウスの脾臓 B リンパ球で見られるこれらの遺伝子発現量の増加も、*p53* によって制御されていることがわかった。

今回の観察で、低・中線量率放射線連続照射マウスの脾臓リンパ球では細胞周期や細胞死に関与する遺伝子の発現量が増加していることがわかった。この事象はゲノム異常の増加やがん化の初期過程に関与しているのかもしれない。また、低線量率照射でも高線量率照射と同様に、*p53* の活性化が関与して遺伝子発現量変化に影響を及ぼしていることが分かった。

引用文献

- Takahashi, A. (2002) *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **43**, 1-9.
Sugihara, T. et al. (2004) *Radiat. Res.*, **162**, 296-307.
Sugihara, T. et al. (2008) *J. Radiat. Res.*, **49**, 231-240.
Canman, C.E. et al. (1998) *Science*, **281**, 1677-1679.
Lee, J.H. et al. (2007) *Oncogene*, **26**, 7741-7748.

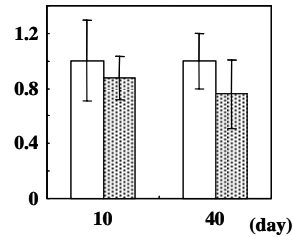
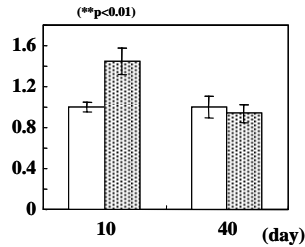
CD4⁺/CD8⁻T-lymphocytes

□ Non-IR
 ▨ LDR

p53WT

p53KO

p21
 (*Cdkn1a*)



CD4⁺/CD8⁺T-lymphocytes

□ Non-IR
 ▨ LDR

p53WT

p53KO

p21
 (*Cdkn1a*)

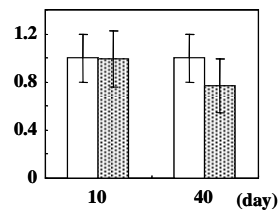
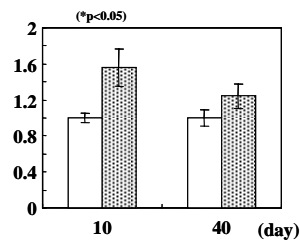


Fig. 1 Gene expressions of *p21* in CD4⁺/CD8⁻ and CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocytes isolation from spleens of wild type or p53-deficient mice continuously irradiated by γ -rays at LDR (20 mGy/22h/day) for 10 and 40 days. p53WT, p53-wild type mice; p53KO, p53-deficient mice; Non-IR: not irradiated. Statistical analysis was by the *t*-test.

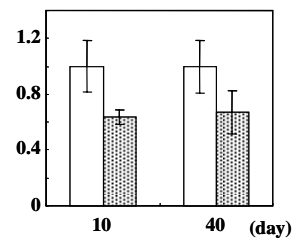
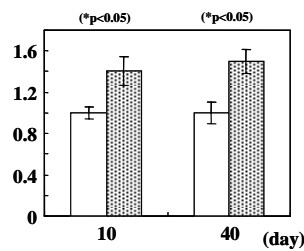
B-lymphocytes

□ Non-IR
 ▨ LDR

p53WT

p53KO

p21
 (*Cdkn1a*)



Bax

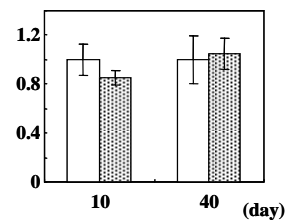
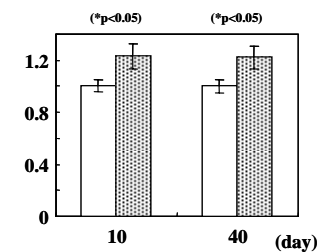


Fig. 2 Gene expressions of *p21* and *Bax* in B-lymphocytes isolated from spleens of wild type or p53-deficient mice continuously irradiated by γ -rays at LDR (20 mGy/22h/day) for 10 and 40 days. p53WT, p53-wild type mice; p53KO, p53-deficient mice; Non-IR: not irradiated. Statistical analysis was done by the *t*-test.