

6.2 低線量放射線の生体防御機能に与える影響調査

6.2.1 低線量率 γ 線連続照射マウスの移植腫瘍細胞に対する応答の解析

Response of B6C3F1 Mice Continuously Irradiated with Low-Dose-Rate Gamma-Rays to Transplanted Tumor Cells

高井 大策, 一戸 一晃, 田中 公夫, 小木曾 洋一
生物影響研究部

Daisaku TAKAI, Kazuaki ICHINOHE, Kimio TANAKA, Yoichi OGHISO
Department of Radiobiology

Abstract

Transplantability of a cell line from a murine ovary granulosa cell tumor was significantly enhanced in syngeneic B6C3F₁ mice continuously irradiated with low-dose-rate (20 mGy/22h/day) gamma-rays accumulating to a high dose (8000 mGy). To understand the mechanisms for the enhanced tumor transplantability, we examined RNA expression profiles of age-matched irradiated and non-irradiated control mice. Reduced expressions of some chemokine receptors could contribute to the enhanced transplantability. Moreover, we established cell lines derived from fibrosarcoma that arose in a non-irradiated female B6C3F₁ mouse and leiomyosarcoma that arose in a female B6C3F₁ mouse irradiated with low-dose-rate gamma-rays continuously. The enhanced transplantability of the fibrosarcoma cell line was observed in syngeneic B6C3F₁ mice continuously irradiated with the low-dose-rate gamma-rays.

1. 目的

低線量率(20 mGy/22h/day) γ 線長期連続照射マウスで観察された移植腫瘍細胞生着率の有意な亢進をもたらす要因を明らかにすることを目的として、移植腫瘍の生着率が有意に異なるマウスの遺伝子発現パターンの比較を行い、移植腫瘍に対する応答差を解析した。さらに、移植腫瘍の種類による応答の違いを調べるため、B6C3F1 マウスに発生した腫瘍から腫瘍細胞株を樹立し、移植実験を行った。

2. 方法

低線量放射線生物影響実験調査(身体的影響に係る実験; 寿命試験)で用いられたマウスと同系のSPF B6C3F1 メスマウスを使用した(Tanaka *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 2007)。連続照射室に設置された¹³⁷Cs- γ 線源を用い、低線量率(20 mGy/22h/day) γ 線を約400日間(集積線量8.0 Gy)連続照射した。照射終了後に、照射及び非照射対照マウスの耳朶からRNAを抽出

し、遺伝子発現パターンを比較した。さらに特定の遺伝子について定量PCRを行い、その発現量を比較した。移植腫瘍細胞株としてB6C3F1 マウスに生じた卵巣顆粒膜細胞腫由来の培養細胞株(OV3121)を使用した(Yanagihara *et al.* 1995)。培養した腫瘍細胞を回収・計数した後、生理食塩水に懸濁し、マウスの背部皮下に接種した。以後毎週2回観察を行い、触診により腫瘤形成が確認された場合に腫瘍が生着したと判断した。更にB6C3F1 マウスに発生した腫瘍を無菌的に摘出、細切後、培養シャーレ上に塗布後培養し、腫瘍細胞株の樹立を行った。

3. 成果の概要

低線量率(20 mGy/22h/day) γ 線を長期連続照射(集積線量8.0 Gy)したマウス及び同日齢非照射対照マウスにそれぞれOV3121細胞を背部皮下接種した後、60日間皮下腫瘤の形成を観察した(Takai *et al.* 2011)。皮下腫瘤の形成が観察された非照射対照マウスのう

ち、観察期間が短い順に3匹(C-Acc群)、皮下腫瘍の形成が観察されなかった非照射対照マウス4匹(C-Rej群)、皮下腫瘍の形成が観察された照射マウスのうち、観察期間が短い順に3匹(R-Acc群)、皮下腫瘍の形成が観察されなかった照射マウス1匹(R-Rej群)をそれぞれ選び、あらかじめ採取・保存しておいたRNAを用いて遺伝子発現アレイ解析を行い、それぞれの群に特徴的な遺伝子の選出を試みたが、マウス間の個体差が大きく、有意な差を持つ遺伝子を選び出すことができなかった。そこで、腫瘍

に対する免疫細胞の応答に関わると考えられるケモカインレセプターについて、RT-PCR法によりその発現量を比較したところ、Table 1に示すように、移植腫瘍を受容した照射マウス(R-Acc群)で、2つのケモカインレセプター遺伝子(Ccr1及びCcr4)の発現が、有意ではないが減少傾向を示した。

非照射B6C3F1メスマウス(556日齢)に生じた線維肉腫及び低線量率(20 mGy/22h/day)γ線を400日間連続照射(集積線量8000 mGy)後300日間非照射環境下で飼育されたB6C3F1メスマウス(756日齢)

Table 1 Relative expressions of chemokine receptors in 4 groups of mice.

Group	chemokine receptors			
	Ccr1	Ccr3	Ccr4	Cxcr3
C-Rej (n=4)	1.17	0.96	1.08	1.17
C-Acc (n=3)	0.88	0.99	0.93	0.87
R-Rej (n=1)	1.16	0.52	1.14	0.99
R-Acc (n=3)	0.79	1.13	0.91	0.93

OV3121 cells were inoculated into age-matched irradiated and non-irradiated B6C3F1 female mice. 4 groups of mice were selected. C-Rej, the non-irradiated mice that rejected tumor; C-Acc, the non-irradiated mice that accepted tumor; R-Rej, the irradiated mice that rejected tumor; R-Acc, the irradiated mice that accepted tumor.

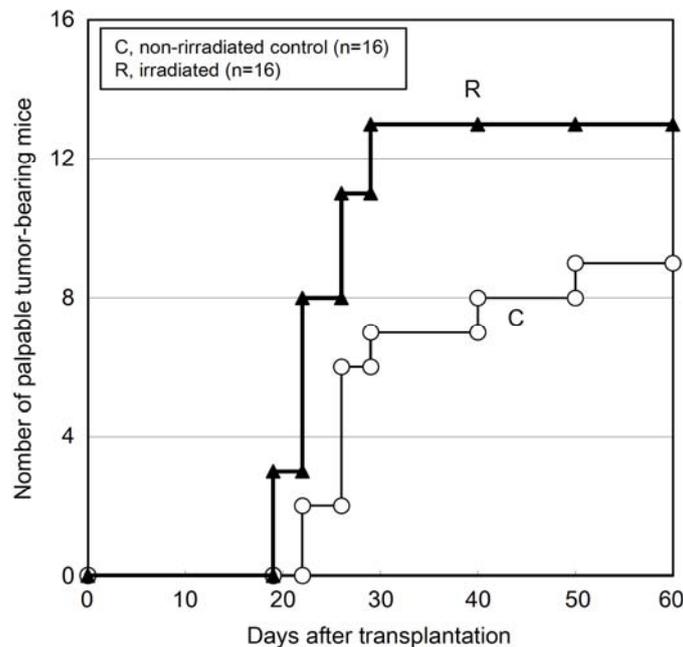


Fig. 1 Tumor cell transplantability in B6C3F1 mice. SK-167-4 cells were inoculated into age-matched, non-irradiated control (C, open circle) and irradiated (R, closed triangle) mice on 400 days after continuous gamma-ray irradiation with a total accumulated dose of 8000 mGy.

に生じた平滑筋肉腫から培養細胞株を樹立した。線維肉腫由来の培養細胞株(SK-167-4)を、低線量率(20 mGy/22h/day) γ 線を約400日間連続照射したB6C3F1マウスと同日齢非照射対照マウスにそれぞれ同数の細胞を移植し、非照射環境下で飼育・観察を行ったところ、Fig.1に示すように、照射マウスで有意($p=0.016$)な生着率の亢進が観察された。

これらの結果から、低線量率(20 mGy/22h/day) γ 線連続照射マウスへの移植腫瘍生着率の亢進をもたらす因子の候補として、腫瘍免疫に関わるケモカイン系遺伝子の発現変化があることが示唆された。ケモカインは生体内において免疫細胞等の遊走や腫瘍部位への浸潤等に関わるタンパク質である。腫瘍細胞や腫瘍周辺の細胞により産生されるケモカインは免疫細胞表面に発現しているケモカインレセプターと結合し、機能することが知られている。低線量率放

射線照射によるケモカインレセプター発現変化に着目した研究は少なく、今後低線量率放射線が生体に及ぼす影響を媒介する因子として解析をすすめる計画である。

B6C3F1マウスに生じた腫瘍由来の培養細胞を新たに樹立することができた。このうち線維肉腫細胞はこれまで用いてきた細胞と同様に、低線量率 γ 線連続照射マウスにおいて移植腫瘍生着率の亢進が観察されており、今後の研究に利用可能である。

引用文献

- Tanaka, S. *et al.* (2003) *Radiat. Res.*, **160**, 376-379.
Tanaka, I. B. III *et al.* (2007) *Radiat. Res.*, **167**, 417-437.
Yanagihara, K. *et al.* (1995) *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 347-356.
Takai, D. *et al.* (2011) *Int. J. Radiat. Biol.*, **87**, 729-735.