

6.3 低線量放射線の DNA 修復関連遺伝子に与える影響調査

6.3.1 低線量率 γ 線連続照射マウスに生じた悪性リンパ腫におけるマイクロサテライト不安定性の解析

Microsatellite Instability in Malignant Lymphomas Developed from Mice Continuously Exposed to Low-Dose-Rate Gamma-Rays

藤川 勝義, 田中 聡, タカ イグナシヤ III ブラガ, 一戸 一晃, 田中 公夫
生物影響研究部

Katsuyoshi FUJIKAWA, Satoshi TANAKA, Ignacia BRAGA-TANAKA III,
Kazuaki ICHINOHE, Kimio TANAKA
Department of Radiobiology

Abstract

We previously found that the life-shortening in B6C3F1 mice continuously irradiated at a low-dose-rate (LDR: 20 mGy/22h/day) accumulating to a high dose of 8000 mGy for about 400 days was due to earlier death from a variety of neoplasms including malignant lymphomas (MLs). Clustering analysis of gene expression data was performed using the 44k format of whole mouse genome array (Agilent), which suggested that MLs from irradiated and non-irradiated mice could be classified into two types (named A MLs and non-A MLs). In the present study, we investigated microsatellite instability (MSI) of 35 MLs from 19 irradiated and 16 non-irradiated mice. MSI was assessed using five selected suitable markers (D7Mit123, mBat-37, A27, Cyp1a2, and D7Mit17), and classified into three statuses as MSS (microsatellites stable, 0 markers unstable; n=7), MSI-L (microsatellites instable-low, 1 or 2 markers unstable; n=19), and MSI-H (microsatellites instable-high, 3 or more markers unstable; n=9). As a result, MSI-H MLs were found in 31.6% of the irradiated group and 18.8% of the non-irradiated group ($p=0.62$). In contrast, MSI-H MLs were found in 40.0% of A MLs and in 20.0% of non-A MLs ($P=0.052$). No MSS MLs were found in A MLs. These results suggest that DNA repair activities such as DNA mismatch repair might be reduced more in A MLs.

1. 目的

低線量放射線生物影響実験調査（寿命試験；平成7年度～平成15年度）で、低線量率(20 mGy/22h/day) γ 線を約400日間連続照射（集積線量8000 mGy）したB6C3F1マウスで悪性リンパ腫等による早期の腫瘍死とそれによる寿命短縮が認められ、低線量率 γ 線長期連続照射により早期にがんが発生あるいは進展した可能性が示唆された。

また、平成21年度に終了した低線量放射線がん遺伝子影響実験調査では、寿命試験と同様の条件で γ 線照射（20 mGy/22h/day、集積線量8000 mGy）したB6C3F1マウスから得た悪性リンパ腫試料を用いて、

マイクロアレイ法による遺伝子発現解析、オリゴアレイ CGH 法によるゲノム解析を行い、細胞増殖に関わる遺伝子群の他に、ミスマッチ修復をはじめとしたDNA修復に関わる遺伝子群にも特徴的な遺伝子発現を示す悪性リンパ腫のクラスターをみつけた。この群は低線量率放射線照射群で有意に多く観察され、A群悪性リンパ腫と呼ぶことにした。

ミスマッチ修復遺伝子群の機能低下や突然変異頻度を調べてA群悪性リンパ腫の性質をより明らかにするため、今年度は、ミスマッチ修復機能と関連しているマイクロサテライト不安定性(MSI)をマウス悪性リンパ腫試料で検出し、照射群と非照射群並び

に A 群と非 A 群の悪性リンパ腫間で高い MSI を持つ腫瘍が存在する頻度を比較した。

2. 方法

8 週齢の SPF B6C3F1 メスマウス (C57BL/6N/Jcl × C3H/HeN/Jcl) に低線量率 ^{137}Cs - γ 線連続照射 (20 mGy/22h/day、400 日間で集積線量 8000 mGy) を行った。低線量率 γ 線照射群、非照射群共に毎週 1 回、健康状態の観察を行って悪性リンパ腫が疑われるマウスを剖検し、悪性リンパ腫に侵襲されたリンパ節を採取・凍結保存した。悪性リンパ腫試料から抽出したゲノム DNA 試料を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により MSI の検出を行った。悪性リンパ腫を含むマウスの腫瘍についてこれまでに文献に報告されている 10 個の領域の MSI マーカーを事前に検討して、この調査の MSI の検出のために感度の高い 5 個の領域のマーカーを選定した。

3. 成果の概要

悪性リンパ腫を発生したマウスから得られたリンパ節試料合計 35 検体 (照射群 19 検体、非照射群 16 検体) の MSI を調べた。マウスの悪性リンパ腫試料で MSI 頻度の高い 5 領域 (D7Mit123、mBat-37、A27、Cyp1a2、D7Mit17) を使用した。MSI の異常頻度を基にして MSS (安定)、MSI-L (不安定-弱)、

MSI-H (不安定-強) の 3 段階に分けた。5 領域の MSI のうち全て陰性だった検体を MSS、1 ないし 2 領域が陽性だった検体を MSI-L、3 領域以上が陽性であった検体を MSI-H と判定した。

その結果、MSI-H は照射群から生じた悪性リンパ腫の 31.6% (19 検体中 6 検体)、非照射群から生じた悪性リンパ腫の 18.8% (16 検体中 3 検体) で観察され、低線量率 γ 線照射群に MSI-H を示す検体が有意ではないがやや多い傾向がみられた ($p=0.62$) (表 A)。一方、A 群と非 A 群の悪性リンパ腫間で比較すると、A 群の 40% (10 検体中 4 検体)、非 A 群の 20% (25 検体中 5 検体) で MSI-H が観察され、有意ではないが A 群で MSI-H を示す検体が多かった ($P=0.054$) (表 B)。また、A 群悪性リンパ腫では MSI はいずれも MSI-H、または MSI-L を示し、MSS を示す検体が 1 例もみられなかった。このことから A 群悪性リンパ腫は、非 A 群悪性リンパ腫よりも高い MSI を示すことが示唆された。

以上の結果から、低線量率 γ 線連続照射群に生じた A 群の悪性リンパ腫ではミスマッチ修復遺伝子等の DNA 修復関連遺伝子の異常がより多く生じている可能性があり、今後、ミスマッチ修復に関連したタンパク質の発現量や機能について検討が必要である。

Table 1 Microsatellite instability (MSI) status in mice malignant lymphomas (MLs). A) Low-dose-rate (LDR) γ -ray irradiated group and non-irradiated group. B) A MLs and non-A MLs.

A) MLs from LDR γ -ray irradiated group and non-irradiated group

	Total	Number of MLs (%)		
		MSI-H	MSI-L	MSS
irradiated	19	6(31.6)	9(47.4)	4(21.1)
non-irradiated	16	3(18.8)	10(62.5)	3(18.8)

B) A MLs and non-A MLs

	Total	cases (%)		
		MSI-H	MSI-L	MSS
group A	10	4(40.0)	6(60.0)	0(0.0)
non group A	25	5(20.0)	13(52.0)	7(28.0)

MSI-H: microsatellite instable-high, ≥ 3 markers unstable; MSI-L: microsatellite instable-low, 1 or 2 markers unstable; MSS: microsatellite stable, 0 markers unstable. Numbers in parentheses show percentage in each MSI status.

