

6.3.2 γ 線連続照射マウス血清中の生理活性物質の変化を検出する方法の開発

Measuring of Physiological Activities of Substances in Serum from Chronic Gamma-Ray-Irradiated Mice

杉原 崇, 田中 公夫
生物影響研究部

Takashi SUGIHARA, Kimio TANAKA
Department of Radiobiology

Abstract

In previous experiments, we observed p53-dependent decrease of numbers of white blood cells in mice irradiated with gamma-rays at medium-dose-rate (MDR) (400 mGy/22h/day (18.2 mGy/h)). However, the biological effects of secreted molecules in serum from mice irradiated with low-dose-rate (LDR) or MDR gamma-rays were not well investigated. Serum samples from mice irradiated with LDR or MDR gamma-rays were characterized by cell-based-assay using mouse embryonic fibroblasts (MEFs), which is a new method for measuring physiological activity of substances in serum. Genes having two-fold higher expressions levels in MDR-irradiated mice to compare with those in non-irradiated mice were analyzed by gene-expression profiles. Moreover, the serum samples from LDR-irradiated mice ((20 mGy/22h/day (0.91 mGy/h) for 400 days in total) were also used for the analysis. Numbers of identified genes in mice irradiated with MDR gamma-rays for 10 and 20 days were 613 and 1202, respectively. These results are indicating that the method is applicable for quantitative measurements of bio-activity. Activity of secreted molecules in serum induced by chronic gamma ray irradiations will need further qualitative analysis.

1. 目的

平成7年度から15年度にかけて行った環境研での寿命試験では、低線量率(20 mGy/22h/日) γ 線の8Gyまでの長期連続 γ 線照射で早期腫瘍死による寿命短縮が認められ、腫瘍の早期発症による早期の腫瘍死が引き起こされることが示された。人の健康診断では採取の簡便さと得られる情報量が多いことから血液検査が用いられている。そのため、我々は放射線照射マウス血清中のタンパク質を用いることで、寿命試験で得られたマウスの低線量率放射線影響を調べるのが可能ではないかと考えた。本調査ではマウスへの低線量率(20 mGy/22h/日) γ 線の照射開始後から100日ごとに経時的な解剖を行い、病理学的解析や血清等のマーカーを用いることにより悪性

リンパ腫の早期発生の出現時期を調べる。本テーマは病理診断の結果、悪性リンパ腫と診断されたマウスの血清中の生理活性物質の変化量を調べ、それを指標とすることにより、低線量率放射線照射により悪性リンパ腫が早期に発生することを確認する事を目的とした。本年度はまず生体への放射線影響が顕著に見られる中線量率(400 mGy/22h/日) γ 線を照射したマウスの血清タンパク質を用い、低線量率連続放射線照射の影響を調べる方法として有効な手法であるかどうかについて検討した。

2. 方法

本実験方法が有効な手法であるかどうかを検討するため、10日間と20日間(集積線量がそれぞれ4 Gy

と 8 Gy) の中線量率 (400 mGy/22h/日) ¹³⁷Cs- γ 線照射で放射線影響が、以前の実験において顕著に見られたC3H/HeNマウス (連続照射した群、及びそれらの群と同日齢の非照射群:照射 10 日間の非照射対照群は 5 匹、照射 20 日間の非照射対照群は 7 匹) の心臓から血液を採取した。それぞれの個体から採取した血清 30 μ l を 2 ml の無血清培地中に加えて、その後各個体の血清入培地を用いてICR系マウスの胎仔線維芽 (ICR-MEFs) 細胞を 37°C、5%CO₂下で、一日間培養した。培養後、それぞれのICR-MEFs細胞にトリゾール液を加え、RNAを抽出し、マイクロアレイ (Agilent社) 解析及び、リアルタイムPCR解析法により遺伝子発現解析を行った。

3. 成果の概要

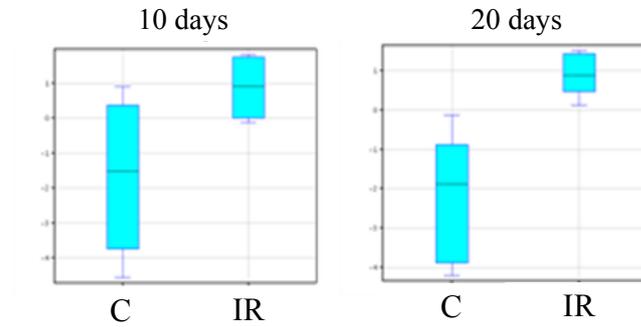
中線量率 (400 mGy/22h/日) γ 線を 10 日間と 20 日間連続照射した群と同日齢の非照射群マウスから採取した血清入培養液を ICR-MEFs に加え 1 日間培養後にこれらの細胞から RNA を抽出後、照射群及び非照射群の血清を添加した ICR-MEFs 細胞間で遺伝子発現量に大きな違いが見られる遺伝子を抽出した。検出する遺伝子は 4 Gy、8 Gy のそれぞれの線量において照射群と非照射群間で遺伝子発現量の差が 2 倍以上あり、かつ照射群と非照射群を比較して有意差が $p < 0.01$ レベルのものとした。その結果、10 日間の照射 (集積線量 4 Gy) では 613 個の遺伝子を、20 日間の照射 (集積線量 8 Gy) では 1202 個の遺伝子を抽出した。また、10 日間と 20 日間の γ 線連続照射で共通して有意差が検出された遺伝子数は 38 個であった。10 日間と 20 日間の γ 線連続照射で発現量の差が 2 倍以上あるすべての遺伝子群リストを IPA ソフトウェアのバイオマーカー解析にかけたところ、バイオマーカー候補として 70 個の遺伝子が抽出された。中線量率 γ 線連続照射マウスの生体内で増加した生理活性物質を含む培地を添加することにより、検知用のマウス培養細胞の遺伝子発現量が 2 倍以上の変化を有することが観察された (Fig.1 上)。この現象は、生体内の生理活性物質を同定しなくても、これらの遺伝子発現量の変動を指標とすることで生体内物質の増加を予測できる有用な方法である

ことが確認された。中線量率 (400 mGy/22h/日) の γ 線を照射した群で非照射群と比べて遺伝子発現量変化が 2 倍以上あった 70 個の遺伝子のうち *Lipocalin2* (*Lcn2*) に注目した。この遺伝子に着目した理由は、Roudkenar 等によって、高線量率 γ 線を 8.5 Gy 照射 24 時間後に C3H/HeX マウスの肝臓、腎臓、心臓で *Lcn2* 遺伝子の発現が上昇することが報告されているためである (Roudkenar *et al.*, 2007)。*Lcn2* は腎機能の保護作用、腎分化誘導作用をもつ分泌蛋白で、腎不全の新規バイオマーカーとして注目されている。また、鉄イオンと結合したバクテリアのシデロフォアを取り込み、バクテリアの増殖を抑える機能も持つことが知られている。中線量率 (400 mGy/22h/日) γ 線の 10 日間及び 20 日間照射マウスから採取した血清を培地に加えて培養した ICR-MEFs 細胞における *Lcn2* 遺伝子の発現量変化をリアルタイム PCR 法で確認したところ、マイクロアレイ遺伝子解析の結果と同様に遺伝子発現量が上昇していた (Fig. 1 下)。今後、今回開発した実験方法を低線量率 γ 線長期連続照射によって生じる悪性リンパ腫の腫瘍マーカーを探索することに応用する計画である。

引用文献

- Sugihara, T. *et al.* (2011) *Radiat. Res.*, **175**, 328-335.
Roudkenar MH. *et al.* (2007) *J. Radiat. Res.*, **48**, 39-44.

Microarray analysis for a gene expression of *Lcn2*



Real Time PCR data

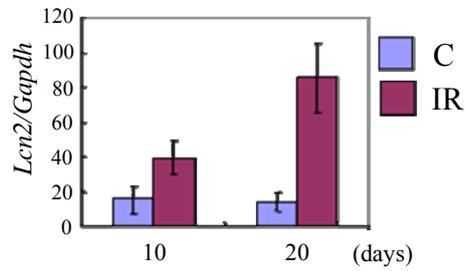


Fig. 1 Gene expressions of lipocalin2 (*Lcn2*) detected by a microarray method at medium-dose-rate (400mGy/22h/day) γ -ray irradiation (Up). The expression of *Lcn2* in the irradiated mice group was higher than that in the non-irradiated group. Gene expressions of *Lcn2* were detected by real-time PCR (Low). The gene expression of *Lcn2* by real-time PCR was confirmed by the microarray results. Quantity of *Lcn2* expression was divided by that of *Gapdh* expression to obtain the relative ratio (*Lcn2/Gapdh*). C: Non-irradiation, IR: Medium-dose-rate irradiation.