

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 murine ovary granulosa cell tumor cell line was significantly enhanced in syngeneic B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate (20 mGy/22h/day) gamma-rays to a total accumulated dose of 8000 mGy. Since the enhancement may be due to a chemokine/chemokine receptor system, we examined RNA expressions of chemokine receptors in blood cells of age-matched irradiated and non-irradiated control mice. Expression of chemokine receptor *Ccr5* gene was reduced in irradiated mice, and the low expression level of *Ccr5* may result in enhanced tumor transplantability. The alteration in expressions of chemokine receptors may play several important roles in response to low-dose-rate and continuous gamma-ray irradiation.

1. 目的

低線量率 (20 mGy/22 時間/日 ; 以下 20 mGy/日と表記) γ 線長期連続照射マウスで観察された(Takai *et al.* 2011) 移植腫瘍細胞生着率の有意な亢進をもたらす要因が、ケモカイン-ケモカインレセプター系にあると仮定し、照射マウスにおけるケモカインレセプター発現の変化が移植腫瘍に対する応答 (生着率) の差に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、移植腫瘍におけるケモカイン発現量の低下による応答 (生着率) の違いを調べた。

2. 方法

寿命試験(Tanaka *et al.* 2003)で用いられたマウスと同系のB6C3F1 メスマウスをSPF下で使用した。連続照射室に設置された¹³⁷Cs- γ 線源を用い、低線量率 (20 mGy/日) γ 線を約 400 日間連続照射 (集積線量 8.0 Gy) した。照射終了後に、照射及び非照射対照マウスの末梢血からRNAを抽出し、ケモカインレセ

プター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 マウスに自然発生した卵巣顆粒膜細胞腫由来の培養細胞株 (OV3121) を使用した。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、触診により腫瘍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OV3121 細胞にケモカインCCL5 遺伝子の発現低下を誘導し、移植実験に用いた。

3. 成果の概要

低線量率 (20 mGy/日) 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から眼窩採血により末梢血を約 0.1ml 採取した。血液細胞から RNA を採取し、逆転写定量リアルタイム PCR 法によりケモカインレセプター遺伝子 (*Ccr1*, *Ccr2*, *Ccr3*, *Ccr4*, *Ccr5*, *Ccr6*, *Ccr7*, *Ccr8*, *Ccr9*, *Ccr10*, *Cxcr1*, *Cxcr2*, *Cxcr3*, *Cxcr4*, *Cxcr5*, *Cxcr6*,

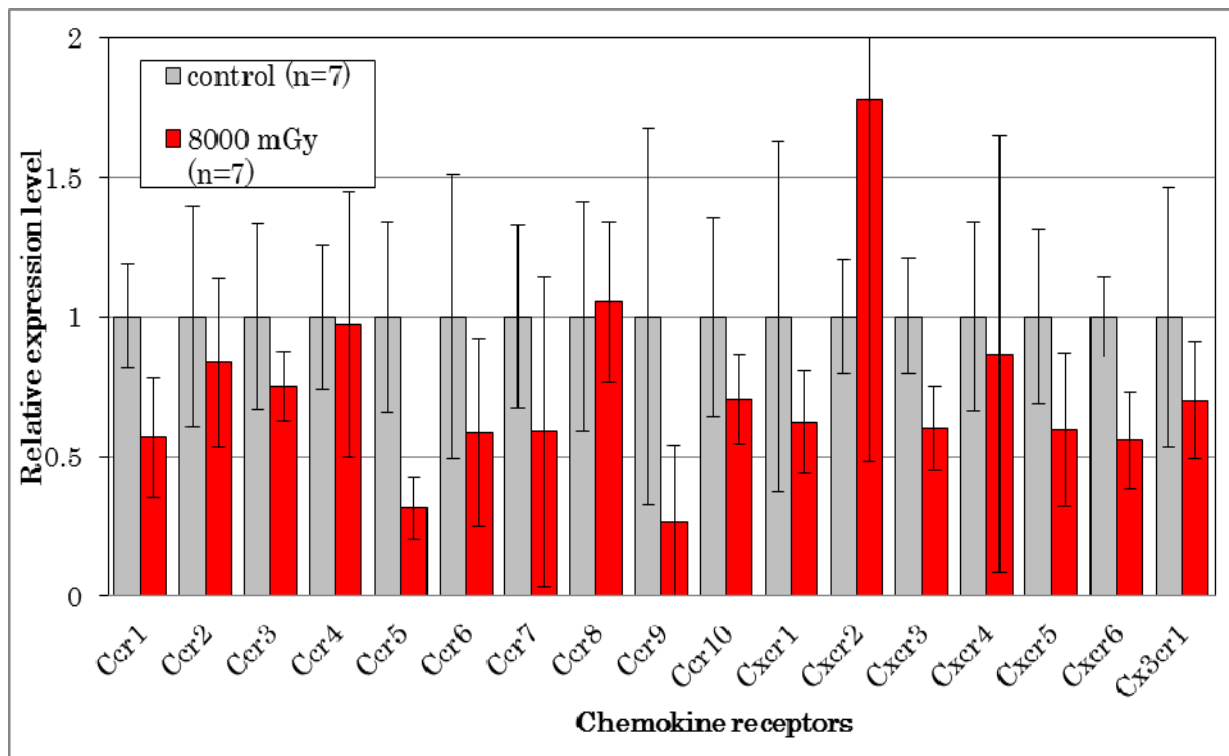


Fig. 1 Relative expression levels of chemokine receptors in blood cells of female B6C3F₁ mice. RNAs from blood cells of low-dose-rate (20 mGy/22h/day) gamma-irradiated mice (8000 mGy, red) and age-matched non-irradiated control mice (control, gray) were analyzed by quantitative real time PCR methods.

Cxcr7, *Cx3cr1*, *Xcr1* の発現量を定量し、照射・非照射群で比較した。その結果、*Cxcr7*, *Xcr1* の発現は検出できなかった一方で、Fig. 1 に示すように *Ccr5*,

Ccr9 遺伝子発現の顕著な低下が照射マウスで観察された。この結果から更に、マウスを *Ccr5*, *Ccr9* 遺伝子発現の多い群と少ない群に分けて、OV3121 細

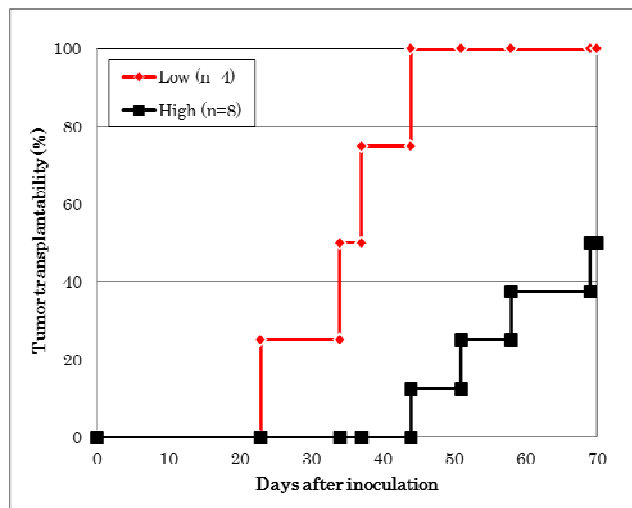


Fig. 2 Tumor cell transplantability in B6C3F₁ mice. Expression levels of chemokine receptor *Ccr5* in blood cells of mice were measured using the quantitative real time PCR method. Mice expressing low levels of *Ccr5* (Low; red line) and mice expressing high levels of *Ccr5* (High; black line) were inoculated with 10⁵ cells of OV3121.

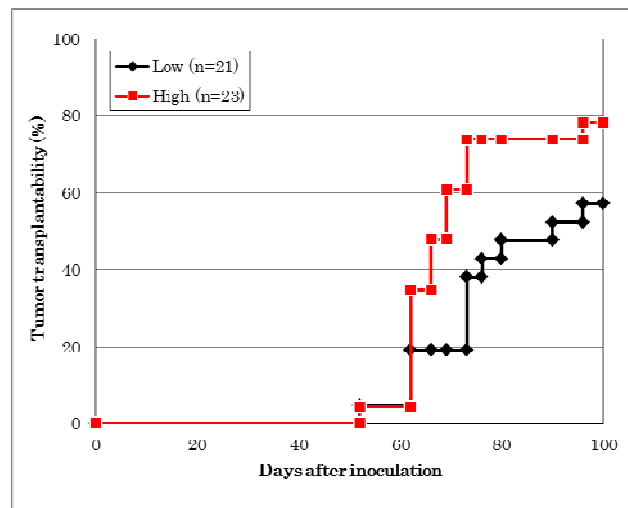


Fig. 3 Tumor cell transplantability in B6C3F₁ mice. Expression level of chemokine CCL5 in OV3121 cell was reduced by gene silencing methods. The cell clones with high (High; red line) or low (Low; black line) expression levels of CCL5 were inoculated into the mice.

胞の移植生着率を観察した。その結果、Fig. 2 のように、*Ccr5* 遺伝子発現の少ないマウスでのみ、移植腫瘍生着率の有意な亢進が観察された。*Ccr9* 遺伝子に関してはこのような生着率の違いは見られなかった。

ケモカインレセプターCCR5 と結合するケモカインリガンドとして CCL3, CCL4, CCL5 及び CCL8 が知られているが、CCL3 は移植に用いた OV3121 細胞で発現が認められなかった。そこで他の3つのケモカインリガンドを標的に、OV3121 細胞に遺伝子発現の低下を誘導するために、市販されている SureSilencing shRNA plasmid for CCL5 を OV3121 細胞に導入し、選択培養により遺伝子発現が低下した細胞を得た。この細胞を B6C3F1 マウス皮下に移植し生着率を対照細胞と比較したところ、Fig. 3 に示すように、移植腫瘍生着率の有意な抑制が観察された。

今回の結果から、低線量率 (20 mGy/日) γ 線連続照射マウスでケモカインレセプター遺伝子 *Ccr5* の発現の顕著な低下が観察され、また同時に *Ccr5* 遺伝子発現の低いマウスでの移植腫瘍生着率の有意な亢進が観察されたことから、以前の研究において観察された低線量率 (20 mGy/日) γ 線連続照射マウスにおける移植腫瘍生着率亢進が、ケモカインレセプター遺伝子 *Ccr5* の発現の低下によって引き起こされ

ている可能性が示唆された。

また、移植に用いた腫瘍細胞が発現し分泌しているケモカインリガンド CCL5 の発現の低下を誘導された細胞の移植生着率が抑制されたことは、予想とは逆の結果であった。これは CCL5 が腫瘍の生着に関わる効果がより強いことを示唆している。今後、ケモカインレセプターCCR5 と結合することが知られている他のケモカインリガンド CCL4, CCL8 についても、遺伝子発現の低下を誘導された細胞による移植生着率を比較する実験を行う予定である。

ケモカインシステム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系である。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。今回の結果から低線量率放射線の長期連続照射が生体に及ぼす影響にケモカインシステムの関与が強く示唆されたことから、今後低線量率放射線の生体影響を媒介する因子としてケモカインシステムに注目した解析をすすめる計画である。

引用文献

- Takai, D. *et al.* (2011) *Int. J. Rad. Biol.*, **87**, 729-735.
Tanaka, S. *et al.* (2003) *Radiat. Res.* **160**, 376-379.