

## 6.3.2 低線量率 $\gamma$ 線連続照射マウスにおける悪性リンパ腫等腫瘍の早期発生

### の確認 -血清中のタンパク質を指標とした解析-

#### Latency Period of Malignant Lymphoma and Potential Biomarkers in Mice Exposed to Continuous Low-Dose-Rate Gamma-Rays -Analysis of Serum Proteins-

杉原 崇, 田中 聡, 田中 イグナシヤ, 田中 公夫  
生物影響研究部

Takashi SUGIHARA, Satoshi TANAKA, Ignacia TANAKA, Kimio TANAKA  
*Department of Radiobiology*

#### Abstract

Previously, a life span study revealed that low-dose-rate (LDR: 21 mGy/ 22 h/ day) gamma-rays induced a shortening of the life span by approximately 120 days due to premature death from various neoplasms, mainly due to malignant lymphomas (ML). We analyzed serum proteins from LDR gamma-ray irradiated mice using cell-based assays, a newly developed method for measuring the physiological activity of substances in sera, combined with gene expression analyses of mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Gene expressions using a microarray were performed to identify candidate bio-active molecules in sera from non-irradiated or irradiated mice with ML. When the gene expressions from the LDR irradiated groups were compared to those of the non-irradiated groups, 291 genes were found to be changed significantly by LDR irradiation. Moreover, Ppar $\gamma$ , Nr3c1, Thrb and Myc were considered as bio-active candidate molecules based on prediction of transcriptional analysis using IPA software that stimulates MEFs with serum proteins. These results suggest that irradiated mice or mice that developed ML may have bio-active molecules in their serum.

#### 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 (21 mGy/ 22 時間/ 日)  $\gamma$ 線の8Gyまでの長期連続 $\gamma$ 線照射で早期腫瘍死による寿命短縮が認められ、腫瘍の早期発生による早期の腫瘍死が引き起こされることが示唆された (Tanaka *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 2007)。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事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 $\gamma$ 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。昨年度まで、中線量率 (400 mGy/ 22 時間/ 日)  $\gamma$ 線連続照射を行ったマウス血清をマウス線維芽細胞 (MEFs) の培養液中に添加し、マイクロアレイ法で解析し、特徴的な遺伝子発現から血清中の生理活性物質を予測する新規の方法 (Cell-based assay : CBA 法) の開発を行った。この方法により、放射線の連続照射によって生体内に生じた生理活性物質の量的な変化を検出できること、さらに、その変化を引き起こす原因とな

った物質の一つを同定した。今年度は、低線量率 $\gamma$ 線を長期連続照射し、悪性リンパ腫を生じたマウスの血清中に分泌された生理活性物質を、CBA法により解析し、悪性リンパ腫を発生したマウス血清中の生理活性物質による培養細胞への影響を明らかにすることを旨とする。

## 2. 方法

B6C3F1メスマウスに低線量率（20 mGy/ 22 時間/日） $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ 線を400日間照射し、その後、非照射条件下で100, 200, 300日間飼育したマウス（すなわち、照射開始から500, 600, 700日後のマウス）の中から病理診断の結果、悪性リンパ腫と同定された8匹（照射群：4匹、非照射群4匹）と、悪性リンパ腫を持たない11匹（照射群：5匹、非照射群：6匹）のマウスから心採血により血液を採取し、CBA法による解析を行った（Fig. 1）。24wellプレート中でICR系マウスの胎仔線維芽細胞（ICR-MEFs）をFBS10%入の基礎培地（A-DMEM）に加え37°C、5%CO<sub>2</sub>下で一日培養した。次に、各well中の細胞の培養液を各マウス個体から採取した血清15 $\mu$ lを含有した1mlの基礎培地にそれぞれ交換し、さらに、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で一日培養した。培養後、各マウス血清を添加培養したICR-MEFsの遺伝子発現を調べるために、トリゾール液を加え、RNA抽出後、マイクロアレイ（Agilent社）解析、リアルタイムPCR解析を行った。

## 3. 成果の概要

低線量率（20 mGy/ 22 時間/日） $\gamma$ 線を400日間連続照射したマウス及び同日齢の非照射群のそれぞれのマウスの血清をICR-MEFs細胞に添加して1日培養後RNAを細胞から抽出し、網羅的な遺伝子発現変化の結果を得た。このデータに2 Way Anova法とBenjamini Hochberg法による統計解析を適用して有意差（ $p < 0.05$ ）のある遺伝子を抽出した。その結果、低線量率連続照射により発現変化が見られた遺伝子291個を抽出した。そのうち、照射と非照射群由来の悪性リンパ腫陽性群間の比較で、照射によって2倍以上影響を受ける遺伝子の数は4個、同様な群由来の悪性リンパ腫陰性群間の比較で照射によって2

倍以上影響を受ける遺伝子の数は1個であった。次に、悪性リンパ腫であることで特徴的に発現変化を示す遺伝子1969個を抽出した。そのうち、非照射群由来の悪性リンパ腫で2倍以上変化する遺伝子の数は24個、照射群由来の悪性リンパ腫で2倍以上変化する遺伝子の数は72個であった。次に、有意差が検出されたこれらの遺伝子群を一つにまとめ、IPA解析ソフトにより発現量差が1.3倍以上のものを抽出して、非照射群由来の非悪性リンパ腫と悪性リンパ腫間で差のある遺伝子、照射群由来の非悪性リンパ腫と悪性リンパ腫間で差のある遺伝子、非悪性リンパ腫群であり照射と非照射間で差のある遺伝子、悪性リンパ腫群であり照射と非照射間で差のある遺伝子の4群について、それぞれパスウェイ解析を行った（Table 1）。発現アレイ法で分類された遺伝子群の中から上流の因子を推測するために、遺伝子群の発現変化を引き起こすことを予測する転写因子スコア（IPA解析ソフト中の一つのプログラムであるTranscription Factors解析によって得られるRegulation Zscoreの絶対値が2以上となる指標）を用いて解析を行った。この結果、血清を培養液中に添加した刺激によってICR-MEFsの遺伝子発現変化に影響を及ぼすと予測されるPPAR $\gamma$ やMyc等の細胞内転写因子を検出した（Table 1）。

本調査で行った経時的解剖実験の病理学的解析では、低線量率 $\gamma$ 線長期連続照射による悪性リンパ腫の早期発生は見られないことから、悪性リンパ腫の腫瘍細胞が速く増殖している可能性がある。この血清解析の結果も早期発生よりもむしろMyc等による悪性リンパ腫細胞の増殖促進が早期腫瘍死に関与していることを示唆する。その他に、PPAR $\gamma$ 、NR3C1、THRB等の核内受容体であるホルモンリセプターが活性化している可能性が示された。これら転写因子のリガンドである5-デオキシ- $\Delta$ 12, 14-プロスタグランジンJ2、ニトロリノール酸、酸化LDL（oxLDL）等のホルモン量が、低線量率 $\gamma$ 線長期連続照射によってマウス血清中に分泌されているのかもしれない。今後、低線量率 $\gamma$ 線長期連続照射マウスの経時的解剖実験の病理学的解析により、低線量率 $\gamma$ 線長期連続照射により早期発生が見られた肝細胞腺腫等の

CBA法を用いた血清解析も行う計画である。

Tanaka, S. *et al.* (2003) *Radiat. Res.*, **160**,376-379.

Tanaka, I.B. III *et al.* (2007) *Radiat. Res.*, **167**,417-437.

引用文献

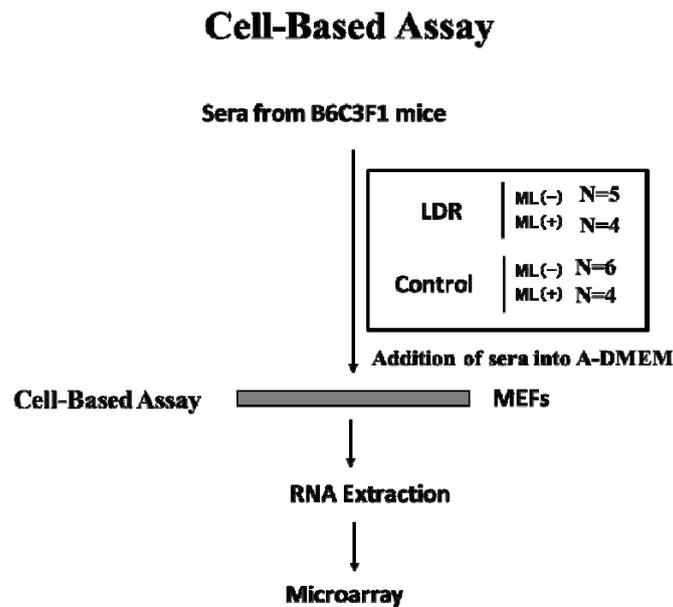


Fig. 1 Cell-based assay (CBA) using sera from irradiated mice. Legend: LDR, Low-dose-rate; ML, Malignant Lymphoma; A-DMEM, Advanced DME medium.

Table 1 Candidate bio-active molecules detected by addition of sera from 4 different groups in the transcription factor analysis of IPA. Legend: LDR, Low-dose-rate; ML, Malignant Lymphoma.

ML(-) vs ML(+)		LDR(-) vs LDR(+)	
LDR(-)	LDR(+)	ML(-)	ML(+)
<i>Pparg</i>	<i>Cebpb</i>	<i>Myc</i>	<i>Pparg</i>
	<i>Spi1</i>	<i>Nr3c1</i>	<i>Stat3</i>
	<i>Notch1</i>	<i>Thrb</i>	
	<i>Nr3c1</i>	<i>Cebpb</i>	