

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に関わる因子の解析

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 reduced expression of Ccl8, known as a ligand of Ccr5, in the tumor cells enhanced the tumor transplantability. The alteration in chemokine axis of chemokine receptor Ccr5 and its ligand Ccl8 may play several important roles in the response to low-dose-rate and continuous gamma-ray irradiation.

1. 目的

低線量率 (20 mGy/22 時間/日) 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違いをもたらす要因が、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する。

2. 方法

寿命試験で用いられたマウスと同系統の SPF B6C3F1 メスマウスを使用した。連続照射室に設置された ^{137}Cs - γ 線源を用い、低線量率 (20 mGy/22 時間/日) γ 線を約 400 日間連続照射 (集積線量 8.0 Gy) した。照射終了直後の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逆転写定量リアルタイム PCR を行い、その発現量を非照射群と比較した。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。ケモカイン Ccl8 遺伝子の発現低下を誘導した OV3121 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。

3. 成果の概要

昨年度までに、低線量率 (20 mGy/22 時間/日) γ 線を長期連続照射 (集積線量 8.0 Gy) したマウスの免疫細胞ではケモカインレセプター Ccr5 の発現が抑制され (Fig. 1)、さらに免疫細胞のケモカインレ

セプターCcr5 の発現が低いマウスでは移植腫瘍生着率が有意に亢進していることが示された (Fig. 2)。

ケモカインレセプターCcr5 はケモカインリガンド Ccl3、Ccl4、Ccl5 及び Ccl8 と反応しそのシグナルを免疫細胞の細胞内に伝え、免疫細胞の遊走を刺激することが知られている。移植に用いた卵巣顆粒膜細胞腫由来の培養細胞 OV3212 細胞は、Ccl5 と Ccl8 を発現し、これらを細胞培養液中に分泌していることから、OV3212 細胞におけるこれらのケモカインリガンドの発現を抑制することにより、移植生着率にどのような影響が生じるかを観察した結果、ケモカインリガンド Ccl5 の発現を抑制した OV3212 細胞では移植生着率が正常な OV3212 の移植と比較し抑制されることが示された。そこで、今年度はケモカインリガンド Ccl8 の発現を抑制し、移植生着率への影響を観察した。

Fig. 3 に示したように、Ccl8 遺伝子の発現を抑制するようデザインした shRNA Plasmid を導入した OV3212 細胞で最も Ccl8 遺伝子の発現抑制が見られたクローンである Ccl8-2-4 細胞を B6C3F1 メスマウスの背部皮下に移植し腫瘍の形成を観察したところ、ケモカインリガンド遺伝子の発現が抑制されていない細胞 (Ccl8 が正常な OV3212) を移植した場合と比べて、有意な生着率の亢進が観察された。

これまでの結果から、低線量率 (20 mGy/22 時間/日) γ 線連続照射マウスの免疫細胞ではケモカインレセプターCcr5 遺伝子の発現が顕著に低下するこ

とが観察され、また同時に Ccr5 遺伝子の発現が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/22 時間/日) γ 線連続照射マウスにおける移植腫瘍生着率の亢進が、ケモカインレセプター Ccr5 遺伝子の発現が低下することによって引き起こされている可能性が示唆された。

また、今回、OV3212 細胞におけるケモカインリガンド Ccl8 の発現を抑制することにより、移植生着率の有意な亢進が観察されたことから、ケモカインリガンド (Ccl8) —ケモカインレセプター (Ccr5) の組み合わせが低線量率 (20 mGy/22 時間/日) γ 線連続照射マウスにおける移植腫瘍生着率の亢進の鍵である可能性が示唆された。

ケモカインシステムは生体内において免疫細胞等の腫瘍部位への遊走や浸潤等に関わっている。また、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腫瘍に対する生体の応答に及ぼす影響にケモカインシステムの関与が示唆されたことから、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。

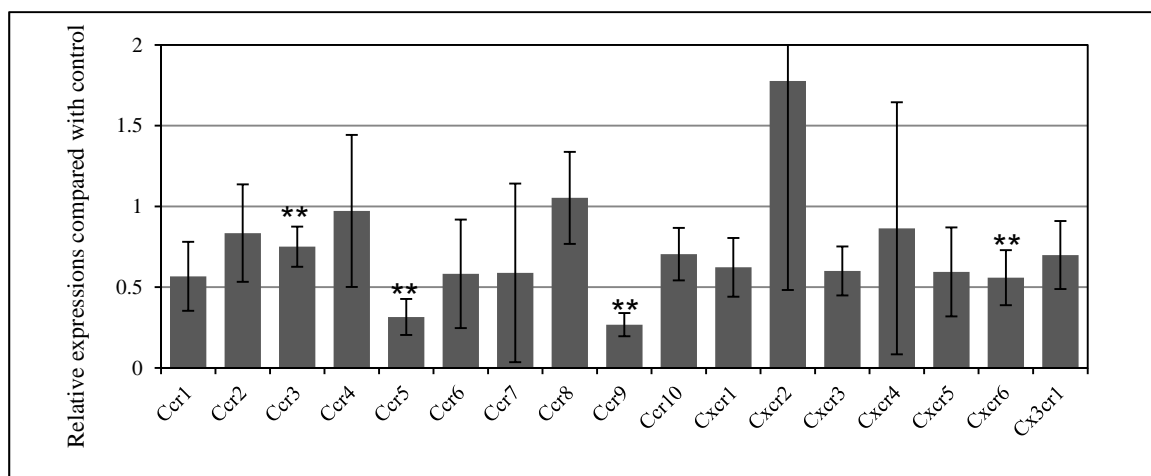


Fig. 1 Relative expressions of chemokine receptors in irradiated mice compared with non-irradiated control mice. RNAs were purified from peripheral blood cells of mice. Expressions were measured using real time quantitative RT-PCR. Error bars indicate mean \pm S.D. ** $P < 0.01$.

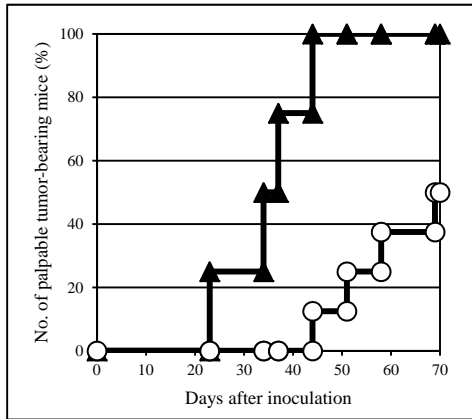


Fig. 2 Comparison of tumor transplantability. 5.0×10^5 OV3121 cells were inoculated into mice with high expression of Ccr5 (○) and mice with low expression of Ccr5 (▲). The number of tumor-bearing mice, wherein a palpable tumor was detected, was counted to assess transplanted tumor formation.

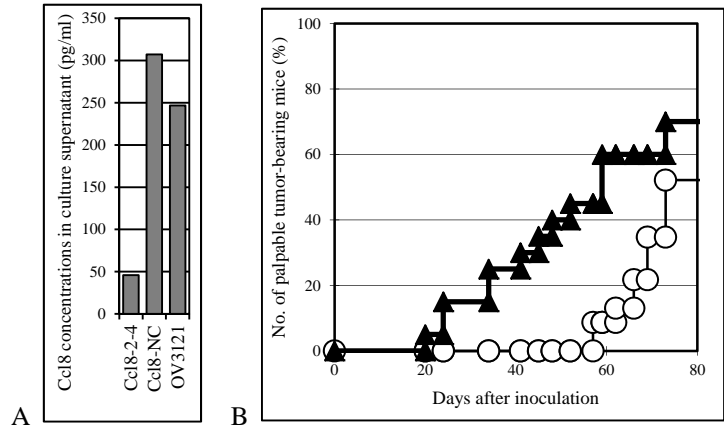


Fig. 3 Down-regulation of Ccl8 in OV3121 cells. A, SureSilencing shRNA Plasmid for Mouse CCL8 was introduced into OV3121 cells. Concentrations of Ccl8 in culture supernatant were measured using ELISA. B, 1.0×10^5 of Ccl8-2-4 cells (▲) and Ccl8-NC cells (○) were inoculated into mice. The number of tumor-bearing mice, wherein a palpable tumor was detected was counted to assess transplanted tumor formation.