

6.3.2 低線量率 γ 線連続照射マウスにおける悪性リンパ腫等病変発生の早期

化の確認 -血清中のタンパク質を指標とした解析-

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

A previous life span study revealed that continuous low-dose-rate (LDR: 21 mGy/ 22hr/ day) gamma ray exposure in mice induced a shortening of the life span by approximately 120 days due to premature death from various neoplasms, mainly due to malignant lymphomas (MLs). Moreover, analysis of gene expressions using a microarray was performed to identify candidate bio-active molecules in sera from non-irradiated or irradiated mice with MLs. By stimulating mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with serum, *Nr3c1* was considered a candidate as predicted by transcription factor analysis in the IPA software. In 2012, we measured the quantity of cortisol, which is known to be a *Nr3c1* ligand, in mice sera. The amount of cortisol in LDR-irradiated mice sera was significantly decreased; thus these results suggested cortisol may have some roles in irradiated mice or mice with developed MLs. Furthermore, the quantity of alpha-fetoprotein (AFP) was measured, and we confirmed AFP in sera from mice which developed liver adenoma was increased. Therefore, we considered that the levels of hormones or proteins in mice sera may be used to analyze tumor developments or effects of LDR-irradiation in mice.

1. 目的

平成 22 年度に中線量率 (400 mGy/22 時間/日) γ 線を連続照射したマウスの血清を検定用の培養細胞に添加し、マイクロアレイ法を用いて、血清中の生理活性物質による培養細胞への活性を解析する新規の方法 (Cell-based-assay : CBA 法)を開発した。この方法を用いて、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を明らかにし、さらに、その変化を引き起こす原因となる物質の一つを同定した。平成 23 年度の調査では、低線量率 (20 mGy/22 時間/日) γ 線長期連続照射したマウスに生じた腫瘍の病理診断結果から悪性リンパ腫と同定されたマウスの血清を用い、遺伝子の発現変化を網羅的に解析する手法であるマイク

ロアレイ法を用いて、悪性リンパ腫発生あるいは低線量率放射線照射が原因でマウス血清中に放出された生理活性物質を変化させる転写因子を予測した。本年度は、昨年度 CBA 法にて低線量率 γ 線連続照射によって変化が生じると予測されたマウス血清中に存在する生理活性物質の量的変化を実際に ELISA 法等で解析し、昨年度に得られた予測結果を実証することを目的とした。

2. 方法

B6C3F1 メスマウスに低線量率 (20 mGy/22 時間/日) ^{137}Cs - γ 線を 400 日間連続照射した (集積線量は 8 Gy)。8Gy 照射後、非照射 SPF 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) を病理診断した結果、悪性リンパ腫と同等されたマウス (非照射群 5 匹、照射群 7 匹) と、悪性リンパ腫を持たないマウス (非照射群 32 匹、照射群 30 匹うち 6 匹は肝腫瘍を持つ) から心採血により血液を採取し、採取した血液から血清を分離し、ELISA 法による解析を行った。それぞれの個体から採取した血清 2.5 μ l は 245 μ l の AssayBuffer と混合し、ELISA 法による解析に供した。ELISA 法に用いた抗体は、昨年度に検出された NR3C1 (コルチコイドリセプター) のリガンドであるコルチゾールに対する抗体を用いた。さらに、肝アデノーマの血清中 AFP を測定するために、血清を ELISA 解析に供した。

3. 成果の概要

平成 23 年度に、低線量率 (20 mGy/22 時間/日) γ 線を連続照射した照射群マウス及びそれらと同日齢の非照射群マウスから採取した血清を検定用の ICR-MEFs 細胞に添加培養後、RNA を細胞から抽出し、照射群と非照射群の両群での網羅的な遺伝子発現量の差を比較した。その結果、低線量率 γ 線連続照射により発現変化を示した遺伝子 291 個を抽出した。有意差が検出された遺伝子群から 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、非照射群内で非悪性リンパ腫と悪性リンパ腫間で差のある遺伝子、照射群内で非リンパ腫と悪性リンパ腫間で差のある遺伝子、非悪性リンパ腫群内で照射と非照射間で差のある遺伝子、悪性リンパ腫群内で照射と非照射間で差のある遺伝子の 4 群についてパスウェイ解析を行った。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文献情報から予測する転写因子スコア (IPA 解析ソフトの一つのプログラムである Transcription Factors 解析を用い、その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、解析を行った。その結果、NR3C1、THRB 等のホルモンに関係した核内受容体が抽出された。これらの結果は、上記のホルモン受容体による転写因子制御を制御する血清中ホルモンなどの生理活性物質量が、低線量率 γ 線長

期連続照射されることで、あるいは悪性リンパ腫を発生することで変化した可能性を示している。そのため、平成 24 年度は平成 23 年度に照射群の血清中生理活性物質量的変化によって遺伝子発現が引き起こされたと予測された遺伝子 NR3C1 のリガンドであるコルチゾールに着目し、血清中のコルチゾール量を測定した。また、同時に、昨年度報告した肝細胞腺腫と正常肝臓組織の遺伝子発現をマイクロアレイで比較し変化が検出された α フェトプロテイン遺伝子 AFP に着目し、肝細胞腺腫マウスの血清中で AFP 量が変化しているかどうかについても測定を行った。

悪性リンパ腫を発生したマウス血清を Cell-based-assay(CBA)法とマイクロアレイ法を用いて解析した結果、照射群から生じた悪性リンパ腫を持つマウスの血清中には、NR3C1 や THRB 等の核内受容体の転写因子の活性化制御に関与する生理活性物質の存在が予測された。今年度は変化が予測された物質の一つである、グルココルチコイド受容体 (NR3C1) のリガンドであるコルチゾールに着目し解析を行った。グルココルチコイドは副腎皮質の束状層で産生される、副腎皮質ホルモンの一つである。3 種類あるグルココルチコイドの中でコルチゾールが最も生体内量に多く、グルココルチコイドの 95% はコルチゾールであると言われている。今回、CBA 法で予測されたマウス血清中の活性化物質がコルチゾールであることを明らかにするために、ELISA 法によってコルチゾール量を測定した。その結果、マウス血清中のコルチゾール量は照射群マウスで有意に減少していた (Fig. 1)。また、悪性リンパ腫を発生したマウスにおいても、有意に非照射正常群マウスよりも減少していた (Fig. 1)。これらの結果から、低線量率 γ 線長期連続照射マウスでは血清中コルチゾール量が減少すると考えられた。グルココルチコイド系ステロイドはリンパ球の走化性を抑え炎症を強力に抑制するなど、広く生体環境の恒常作用を有する。また、グルココルチコイドは悪性リンパ腫の治療薬として知られている。さらに、古くからマウスリンパ腫のアポトーシスをコルチゾールが誘導することが報告されている。コルチゾールが照射群で

減少する知見と、経時的解剖による病理解析の結果で悪性リンパ腫の早期発生が見られなかった結果を考慮すると、「低線量率照射によってグルコルチコイドが減少→悪性リンパ腫の増殖抑制能が減少→悪性化する→マウスの早期死」という仮説が考えられる。

平成 23 年度、肝細胞腺腫（アデノーマ）で発現変化の高い遺伝子を抽出したところ、AFP が低線量率 γ 線照射マウス由来の肝細胞腺腫において 288 倍高い発現を示す遺伝子として検出された。そのため、AFP タンパク質が、肝細胞腺腫を持つマウスの血清中のマーカータンパク質となる可能性を持つと考えた。そこで、本年度は実際にマウス血液中の AFP を調べて、肝細胞腺腫の診断が可能かどうかを検討した。低線量率 γ 線照射群に発生した肝細胞腺腫を持つマウスの血清中 AFP を ELISA 法によって解析したところ、血清中の AFP タンパク質が非照射肝アデノーマを持たない群に比較して、有意に増加することが分かった (Fig. 2)。この結果は、照射群に発生したマウスの血清中 AFP タンパク質を測定することで、肝細胞腺腫を持つマウスを診断できる可能性があることを示す。一方、AFP タンパク質以外にも

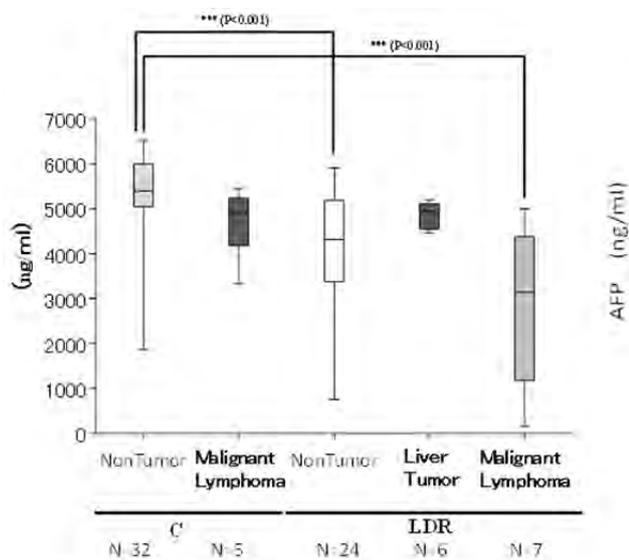


Fig. 1 ELISA analysis of cortisol in sera from irradiated or non-irradiated mice. LDR, Low-dose-rate irradiated; C, non-irradiated.

血液中に分泌されると考えられるいくつかのタンパク質の遺伝子が検出されている。この結果は、この方法で血清中の分泌タンパク質と予測されるタンパク質を発がんの解析に用いれば、肝細胞腺腫を同定できる可能性を示唆する。今後、AFP 以外の新規のマーカーとなるタンパク質も解析する予定である。また、今回、低線量率 γ 線照射によって肝細胞腺腫を持たないマウスの肝臓に影響を及ぼす遺伝子変化も検出した。そのため、これらの遺伝子発現に関しても解析を進め、照射によって変化する遺伝子群と肝細胞腺腫との関係についての解析を行い、低線量率 γ 線照射によって肝細胞腺腫が発生するメカニズムについても解析する必要があると考える。

これらの結果から、照射マウスの血清中コルチゾール量や AFP 量を調べることは、腫瘍や照射による影響を検出する方法として、利用できる可能性を持つと考えられた。

引用文献

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

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

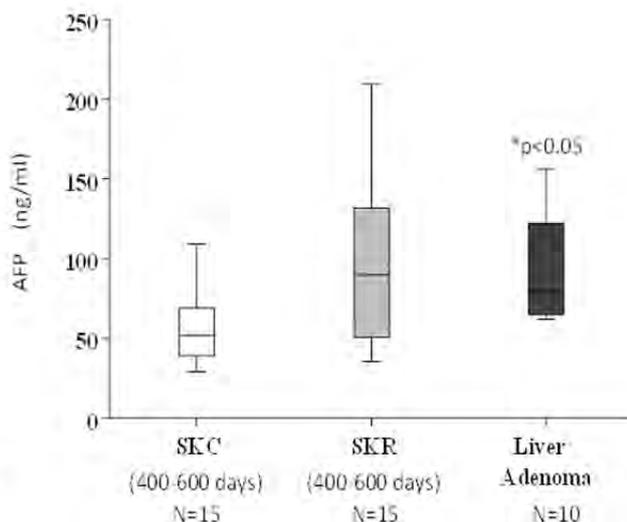


Fig. 2 ELISA analysis of alpha-fetoprotein (AFP) in sera from LDR irradiated mice or non-irradiated mice. SKC, non-irradiated mice; SKR, LDR irradiated mice, Liver adenoma, irradiated mice with liver adenoma.