

6.3.3 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-

Latency Period of Malignant Lesions 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

Our previous study has revealed that exposure of mice to continuous low dose-rate gamma-rays (LDR: 21 mGy/22 h/day) shortens the life span by approximately 120 days due to premature death from various neoplasms including malignant lymphomas. We have been performing gene expression analyses using microarray to search for bio-active molecules that are serologically detectable in LDR-irradiated mice or in mice that develop neoplasms after LDR-irradiation. Results of the microarray analyses, which were focused on liver adenoma, suggest that alpha-1B-glycoprotein (A1BG) may be a good marker of LDR radiation-induced liver tumors. The concentration of A1BG in sera of mice with liver adenomas after irradiation was lower compared to mice not exposed to radiation. Therefore, we conclude that A1BG is usable as a serological marker to analyze radiation-induced liver tumor development in LDR-irradiated mice.

1. 目的

平成7年度から15年度にかけて行った寿命試験において、低線量率(20 mGy/22 時間/日)放射線を400日間連続照射することで腫瘍死による寿命短縮が認められることが示された。本課題では寿命短縮の原因及び死亡前の影響を明らかにするために、低線量率(20 mGy/22 時間/日)放射線照射開始から100日ごとにマウスを経時的に解剖し、病理学的解析結果を基に悪性リンパ腫や肝腫瘍等に関与する血清中因子の解析を行った。平成22年度にガンマ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、悪性リンパ腫に着目し、病理診断で悪性リンパ腫と同定されたマウスの血清をCBA法で解析し、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血清中への放出量が増加する生理活性物質を予測した。また、その血清中の量的変化をELISA法によって解析した。本年度は、昨年度に引き続き、低線量率 γ 線連続照射によってリンパ腫を発症したマウスで血清中の量が減少することがCBA法で予測されたコルチゾールについて、ELISA法により再度解析した結果を報告する。また、肝腫瘍に着目し、肝腫瘍に関わる血清中因子のスクリーニングを行い、低線量率放射線と肝腫瘍及び肝臓疾患との関わりを明らかにすることを目指した。

2. 方法

B6C3F1 メスマウスに低線量率（20 mGy/22 時間/日）¹³⁷Cs-ガンマ線を 400 日間連続照射した（集積線量は 8 Gy）。照射開始後、非照射 SPF 条件下で 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 日間飼育したマウスから心採血し、採取した血液から血清を分離後、ELISA 法によって解析した。今年度、新たに肝腫瘍に関わる遺伝子 A1BG（アルファ 1-B グリコプロテイン）を同定したため、血清中の A1BG タンパク質量を ELISA 法により測定した。また、ビジコムジャパンより購入した倫理審査済みのヒト血清（60 歳以下の正常女性及び 60 歳以下の肝臓癌女性の血清）を用いて、ELISA 法により A1BG 量を測定した。さらに、昨年度に報告した 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の血清中濃度を明らかにするために、経時的解剖実験第 2 群のマウスすべての血清を ELISA 法により解析した。肝腫瘍マーカー探索のため、低線量率（20 mGy/22 時間/日）ガンマ線により照射開始から 500-700 日間たったマウス個体（計 20 匹）から採取した血清を CBA 法で解析した。病理診断により、肝腫瘍と同定されたマウスと正常マウスの血清それぞれ 30 µl を 2 ml の無血清培地中に加えて、37℃、5%CO₂ の条件下で、初代肝細胞を一日間培養した。培養後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）及びリアルタイム PCR により遺伝子発現解析を行い、上流因子の予測を行った。

3. 成果の概要

昨年度からの予備実験で肝細胞腺腫（アデノーマ）で発現変化の大きい遺伝子を抽出し解析したところ、AFP（アルファフェトプロテイン）が低線量率γ線照射マウス由来の肝細胞腺腫において正常組織部位より 288 倍高い発現を示す遺伝子としてマイクロアレイ法によって検出された。リアルタイム PCR 法にてマウス数を増やし詳細に解析したところ、同様にマウス由来の肝細胞腺腫において高い遺伝子発現が示された。また、遺伝子発現と同様に血清中 AFP タンパク質が増加すると考え、ELISA 法で実験検討を行い、血清中 AFP タンパク質が有意に増加すること

を示した。これらの結果は、照射群のマウス血清中 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マイクロアレイ解析の結果、肝細胞腺腫を持つマウスで有意な A1BG（アルファ 1-B グリコプロテイン）遺伝子発現量低下が見られた。A1BG は血清中に分泌されているタンパク質としてよく知られていることから、マウス数を増やしリアルタイム PCR 法にて詳細に解析した。その結果、マイクロアレイ法と同様に、リアルタイム PCR 法によってもマウス由来の肝細胞腺腫において有意に低い遺伝子発現結果が得られた。次に、この A1BG タンパク質を照射によって発生した肝腫瘍のマーカーとして使用できるかを ELISA 法によって検討した。解析の結果、血液中の A1BG は低線量率照射/肝腫瘍群で有意に減少していた（Fig. 1）。また、低線量率照射/非肝腫瘍群においても有意に A1BG 量は減少しており、この結果から肝腫瘍発生前から A1BG 量の減少が肝腫瘍発生に何らかの形で関与している可能性が考えられた。また、ヒトの肝臓癌患者の血清中の A1BG 量を測定したところ、正常対照群と比較して、有意な減少が見られた。以上の結果から、マウスの血液中の A1BG を測定することにより、低線量率放射線誘発肝臓腫瘍を予測・確認できる可能性があると考えている。

低線量率ガンマ線照射によって正常マウスの肝臓に誘発される遺伝子発現変化を検出したところ、高線量率放射線応答の際に、アポトーシスや細胞周期抑制に働く重要な転写因子 p53 による発現制御を受ける Phlda3 の発現上昇が確認できた。Phlda3 は細胞の代謝制御を行う Akt1 活性の抑制に関与することが知られているため、低線量率照射によって引き起こされる p53 の活性化が Phlda3 の発現上昇を引き起こし、解糖系やインシュリン代謝などの代謝機構に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そのため、今後は、低線量率照射がこの経路の起点にあたる p53 の活性化を引き起こしているかを確認する必要があると考えている。

初代肝細胞を用いた CBA 法により肝腫瘍に関わるマウス血清中の生理活性物質を探索したが、腫瘍

化の原因となる生理活性物質は予測できなかった。一方、肝腫瘍ではなく照射によって変化すると考えられる血清中生理活性物質として、インヒビンや成長ホルモン量の変化が予測された。今後、低線量率照射による、これらの血清中生理活性物質質量変化に関して解析を行っていきたい。

一方、悪性リンパ腫を発生したマウスの血清解析を CBA 法により行ったところ、照射群中の悪性リンパ腫を持つマウスの血清中には、NR3C1 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。そこで、昨年度はグルココルチコイド受容体である NR3C1 に着目し解析を行った。グルココルチコイドは、副腎皮質ホルモンの一つであり、副腎皮質の束状層で産生される。3 種類あるグルココルチコイドの中でコルチゾールの生体内量が最も多く、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。今年度は、マウス数を増やして解析を行うため、経時的解剖実験第 2 群で使用した全マウスの血清中コルチコイド量を測定した。解析の結果、コルチゾール量はすべて

の解剖時期において照射群マウスで有意に減少していることを確認した。また、悪性リンパ腫を持つマウスの解析数を昨年度より増やして実験を行ったところ、昨年度の報告結果と同様に、照射条件下で悪性リンパ腫を発生したマウスのコルチゾール量が、非照射の悪性リンパ腫を持つマウスよりも減少していることが明らかになった。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。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。また、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。これらの知見と、ここで観察された照射群におけるコルチゾール量減少および照射群中でリンパ腫を発生した個体におけるコルチゾール量のさらなる減少結果から、照射によるコルチゾールの減少が悪性リンパ腫発生に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

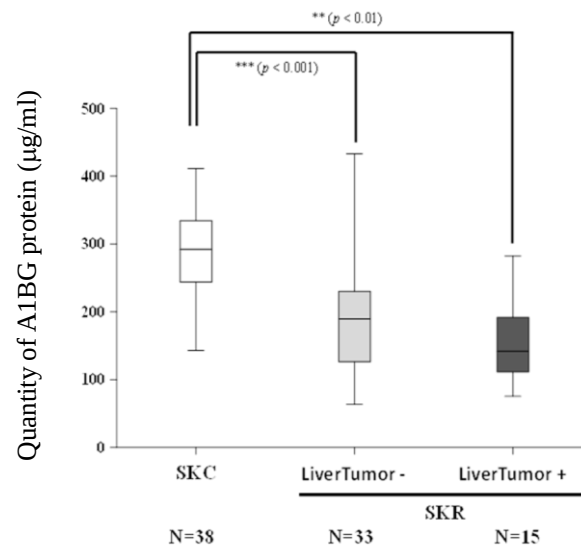


Fig. 1 Quantitative analysis of A1BG protein in mice sera.
SKC: Non-irradiated mice, SKR: LDR (20 mGy/22h/day)
-irradiated mice