

2. 4 低線量率放射線に対する分子細胞応答影響実験調査

2. 4. 1 低線量率放射線照射による細胞応答分子への影響解析

Analysis of Biological Responses to Low Dose-rate Radiation at the Molecular Level - Expression of Senescence Marker Proteins

杉原 崇, 田中 聡, 田中 イグナシヤ, 小村 潤一郎
生物影響研究部

Takashi SUGIHARA, Satoshi TANAKA, Ignacia TANAKA, Jun-ichiro KOMURA
Department of Radiobiology

Abstract

Previously, we have shown that the exposure of mice to low dose-rate (LDR; 20 mGy/day) radiation shortens the life span and induces early emergence of some neoplasms and non-neoplastic lesions, which seems to support the hypothesis that radiation accelerates aging. To further study the influence of LDR radiation on aging, we examined the expression of the genes for senescence marker proteins-2 and -30 (Smp2 and Smp30) in livers of LDR-irradiated mice. Liver samples for RNA extraction were collected every 100 days (beginning at day 100 from the start of irradiation to day 700) from female SPF B6C3F1 mice irradiated at 20 mGy/day for 400 days from 8 weeks of age. Using real-time PCR to analyze the RNA, we observed that the expression of the Smp2 gene, which has been reported to increase with age, was significantly decreased in irradiated mice beginning at day 300 from the start of irradiation. This result is inconsistent with the hypothesis of radiation-accelerated aging and may indicate that the expression of the Smp2 gene is influenced by other factors such as androgen levels. On the other hand, the expression of the Smp30 gene, which has been reported to decrease with age, was significantly decreased in irradiated mice from day 400, and is consistent with the hypothesis of radiation-accelerated aging. The Smp30 protein has been also reported to be an enzyme necessary for the synthesis of vitamin C, which is thought to be an anti-aging substance.

1. 目的

環境研は、「低線量率放射線生物影響実験調査（寿命試験）」（平成7年度～15年度）において、マウスに低線量率（20 mGy/日）放射線を400日間連続照射すると寿命が約100日短縮すること、またこれが腫瘍死の早期化によるものであることを報告した。また、「DNA修復関連遺伝子への低線量率放射線影響実験調査」（平成22～26年度）において行われた経時的剖検実験の結果、低線量率放射線照射マウスには様々な種類の腫瘍及び非腫瘍性病変の早期発生が起こることを見だしている。古くから、「放射線の生物効果は非特異的な加齢促進として捉えることが

できる」と論じられているが、上記の寿命試験や経時的剖検実験で得られた知見も、「低線量率放射線長期照射の影響は非特異的な加齢促進として捉えることができる」という可能性を示唆している。そこで、この仮説を検討することを目的として、経時的剖検実験で得られたメスマウス肝臓サンプルを用いて、加齢に関与することが示されている遺伝子の発現解析を行った。具体的には、過去の文献において加齢に伴い発現が変化するタンパク質として同定されている加齢指標タンパク質2（SMP-2、Senescence marker protein-2、遺伝子名：Sult2a1）及び加齢指標タンパク質30（SMP-30、Senescence marker protein-30、

遺伝子名：Smp30) の遺伝子発現変化を解析した。

2. 方法

2.1 B6C3F1 メスマウスへの照射と臓器試料の採取

6 週齢の Specific pathogen free (SPF) B6C3F1 メスマウス 420 匹 (日本クレア) を非照射群、低線量率照射群に分け、2 週間の検疫の後、8 週齢から 100、200、300、400、500、600、700 日間 SPF 環境下で飼育した。低線量率照射群は 8 週齢から 400 日間 ^{137}Cs - γ 線連続照射 (20 mGy/日、集積線量 8000 mGy) を行った。各実験群 (30 匹ずつ) は 100 日おきに解剖して、肝臓等の臓器試料を得た。

2.2 マウス肝臓からの cDNA 合成とリアルタイム PCR 法による発現解析

採取したマウス肝臓試料 ($\sim 5 \text{ mm}^3$) へ 500 μl の Trizol 液 (サーモフィッシャー) を加えてホモジナイズした後、RNA を抽出、精製した。得られた RNA 試料の精製度、収量は Nanodrop 分光光度計 (サーモフィッシャー) で測定した。RNA 試料 1 μg から SuperScriptII 逆転写酵素 (サーモフィッシャー) を用いて cDNA を合成し、 -80°C で保存した。SMP-2 及び SMP-30 の遺伝子の発現変化を、Power SYBR Green PCR Master Mix (サーモフィッシャー)、7500 Real Time PCR System (サーモフィッシャー) を用いてリアルタイム PCR 法により解析した。

3. 成果の概要

3.1 低線量率照射メスマウス肝臓における加齢指標タンパク質 2 (SMP-2) 遺伝子の発現変化

SMP-2 タンパク質は、スルホトランスフェラーゼ (硫酸基転移酵素) ファミリーに属し、機能としては、デヒドロエピアンドロステロンや胆汁酸の硫酸抱合に関与していることが知られている。疾患に関しては、多嚢胞性卵巣症候群における副腎アンドロゲン過剰産生に関与している可能性が考えられている。元来、SMP-2 遺伝子はオスラット肝臓で加齢に伴い発現が減少する遺伝子として知られていたが、メスマウスでは加齢に伴い発現が増加する遺伝子であることが報告されている。また、この遺伝子の発現は、加齢の他、性ホルモンによっても複雑に影響

を受けることが知られている。卵巣を摘出したメスラットでの SMP-2 遺伝子の発現を調べた実験では、卵巣摘出のみでは、SMP-2 遺伝子の発現は抑制されないが、卵巣摘出に加えアンドロゲン注射を行うことで抑制されることが示された。

今回、非照射群と低線量率 (20 mGy/日) 放射線照射群のメスマウス肝臓における SMP-2 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で経時的に解析した。非照射群では、実験開始から 100~400 日の間、発現が増加していた (Fig. 1)。この結果は、この遺伝子の発現がメスマウスにおいて加齢に伴い増加するという報告と符合する。一方、非照射群と照射群を比較すると、照射開始から 200 日目までは、有意な発現差は確認できなかったが、照射開始から 300 日目以降に、照射群で有意な SMP-2 遺伝子発現の減少が見られた。この結果は、低線量率放射線による加齢促進という観点では理解しにくい。むしろ、照射による性ホルモンレベルの変化の結果として起こる発現変化と捉えるべきかもしれない。これまでの環境研の調査 (低線量放射線生体防御機能影響実験調査、平成 17~26 年度) において、低線量率 (20 mGy/日) 放射線照射がメスマウスに生殖腺の内分泌機能の変化 (卵巣萎縮と早期閉経) を誘発するという知見が得られているので、これに加えて照射メスマウスでアンドロゲンレベルが変化している可能性の検討が今後の課題であろう。

3.2 低線量率照射メスマウス肝臓における加齢指標タンパク質 30 (SMP-30) 遺伝子の発現変化

SMP-30 は、加齢に伴ってラット肝臓での発現が著しく減少するタンパク質として発見された。加齢に伴う発現変化を示すタンパク質の多くは、先に示した SMP-2 のように性ホルモンの影響を受け、雌雄で異なる発現変化を示すが、SMP-30 は、性ホルモンの影響を受けず、雌雄共に加齢に伴って減少するのが特徴である。そのため、加齢影響の評価のためには、より適していると考えられる。ちなみに、SMP-30 はビタミン C 合成経路の酵素としての機能も持っており、SMP-30 ノックアウトマウスは早期に老化すると報告されている。そこで、SMP-30 遺伝子について、非照射群と低線量率 (20 mGy/日) 放射線照射群のマ

ウス肝臓における発現をリアルタイム PCR 法で経時的に解析した。非照射群と照射群を比較すると、照射開始から 300 日目までは有意な発現差は確認できなかったが、400 日目以降で有意な発現減少が見られた (Fig. 2)。この結果は、SMP-30 遺伝子の欠損が早期老化を引き起こすという知見に照らせば、低線量率放射線の長期にわたる照射により加齢の促進が起きていると解釈することができる。

3.3 考察

「低線量率放射線長期照射の影響を非特異的な加

齢促進として捉えることができるか？」という視点から、2 種の加齢指標タンパク質遺伝子の発現パターンを解析した。SMP-30 に関してはそのように解釈しうる結果が得られたが、SMP-2 に関してはホルモン等他の要因の影響を強く受けている可能性もあり、明確な結論は得られなかった。この問題は、低線量率放射線リスクを理解し評価していく上で根本的な問題であるので、今後、さまざまな指標を用いて多方面から注意深く検討していく必要がある。

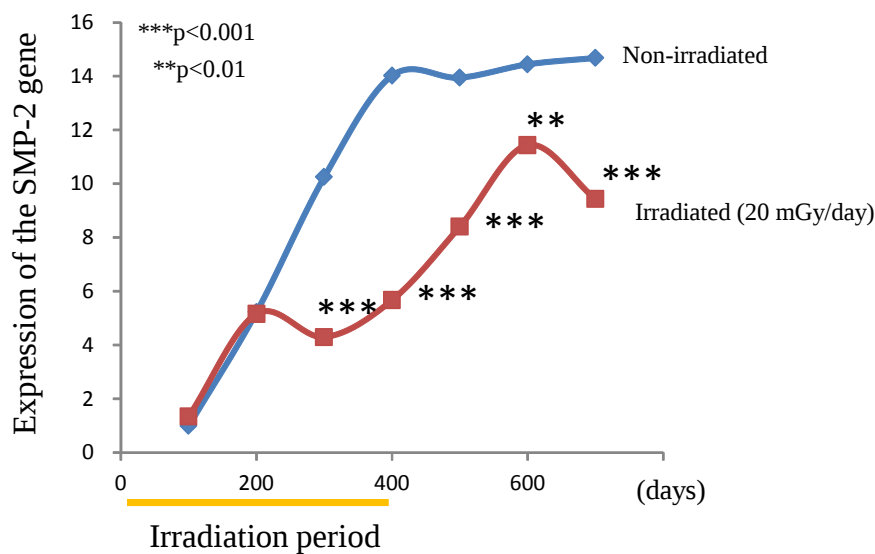


Fig. 1 Expression of the gene for the senescence marker protein-2 (SMP-2) in the liver of B6C3F1 female mice. The SMP-2 expression level is normalized using the Gapdh gene as a control.

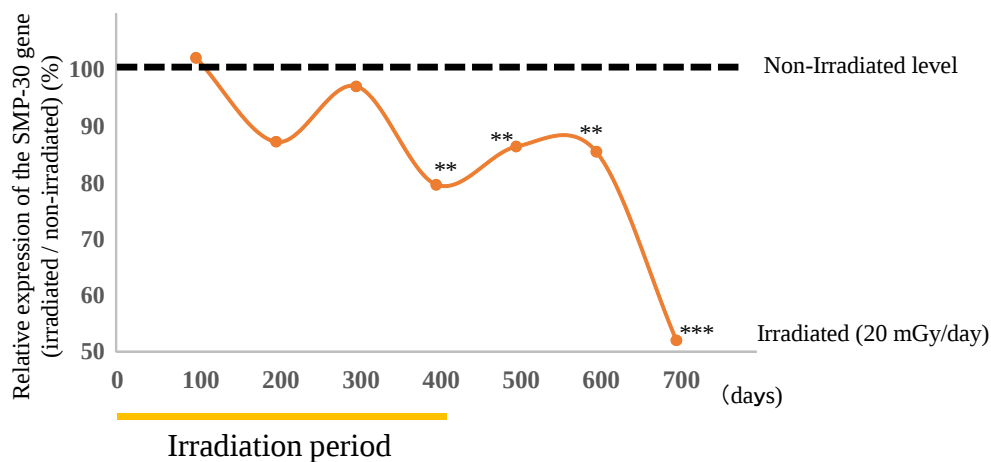


Fig. 2 Relative expression of the gene for the senescence marker protein-30 (SMP-30) in the liver of B6C3F1 female mice.