

## 2.3 低線量率放射線に対する分子細胞応答影響実験調査

### 2.3.1 低線量率放射線照射による応答分子への影響解析

#### Analysis of Biological Responses to Low Dose-rate Radiation at the Molecular Level

藤川 勝義, 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

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

#### Abstract

Previously, we have shown that irradiation at a low dose-rate (LD; 20 mGy/day for 100 days; total dose: 2,000 mGy) or a middle dose-rate (MD; 400 mGy/day for 5 days; total dose: 2,000 mGy) significantly alters the genome-wide gene expression profile in the liver of male mice. This year, we performed pathway analysis of these data. In the liver of the LD mice, 15 significantly altered pathways were identified, including “Calcium signaling” and “PKC $\theta$  signaling in T lymphocytes”. In the MD mice, 19 significantly altered pathways were identified, including “Paxillin signaling” and “p53 signaling”. These results suggest that, even though the total dose is the same, low dose-rate radiation and middle dose-rate radiation might have quite different effects on gene expression.

#### 1. 目的

本調査では、低線量率放射線の影響発現の機構を細胞・分子レベルで明らかにすることを目的として、低線量率放射線照射されたマウスの臓器を材料とした遺伝子発現解析を行っている。本年度は、線量率の異なる放射線を照射されたマウス肝臓を材料として、詳細な網羅的遺伝子発現解析を行った。

昨年度までに、オスマウスを用いて、集積線量を同じにした低線量率および中線量率照射実験を行い、ここで得られた、8週齢から100日間にわたり20 mGy/日の $\gamma$ 線連続照射（集積線量2,000 mGy）を行った群（LD群）および100日間のうち5日間のみ400 mGy/日の照射（集積線量2,000 mGy）を行った群の肝臓を材料として、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を開始した。昨年度の予備的な解析において、中線量率照射を100日間の飼育期間のうち最初の5日間のみ行なった群では非照射対照群（C群）に比べて発現変動がほとんど認められず、

一方、最後の5日間のみ中線量率照射を行った群（MD群）とLD群についてはかなりの発現変動が認められたことから、今年度は、これらの2群について詳細な解析を行った。

#### 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オスマウス32匹（日本クレア）を8匹ずつの実験群（C群、LD群、MD群）に分け、2週間の検疫の後、SPF環境下で飼育した。LD群は8週齢から100日間 $^{137}\text{Cs-}\gamma$ 線連続照射（線量率20 mGy/日、集積線量2,000 mGy）を行った。MD群は8週齢から100日間の飼育期間のうち96~100日目の5日間 $^{137}\text{Cs-}\gamma$ 線連続照射（線量率400 mGy/日、集積線量2,000 mGy）を行った。全ての実験群は解剖日の前日から22時間絶食させ、100日目に解剖して肝臓、精巣等の臓器試料を得た。

## 2.2 遺伝子発現解析

採取したマウス肝臓試料 (~5 mm<sup>3</sup>) へ 500µl の ISOGEN 液 (ニッポンジーン) を加えてホモジナイズした後、RNA を抽出、精製した。RNA から合成して得られた cDNA 試料 400 ng を Low Input Quick-Amp Labeling Kit (アジレント) にて Cyanine-3 標識し、8×60K フォーマットのマウスカタログアレイ (SurePrintG3 Mouse GE マイクロアレイ G4852A、アジレント) にハイブリダイズした。蛍光シグナルの検出、数値化には、DNA マイクロアレイスキャナー (アジレント)、及び数値化ソフトウェア Feature Extraction9 (アジレント) を用いた。数値化された遺伝子発現データの解析 (発現量に基づく遺伝子情報の抽出や統計解析等) には統計解析ソフトウェア GeneSpring13 (アジレント) 及びパスウェイ解析ソフトウェア Ingenuity® Pathway Analysis (QIAGEN) を用いた。

## 3. 成果の概要

### 3.1 低線量率および中線量率放射線照射オスマウス肝臓で発現変化する遺伝子

B6C3F1 オスマウスの3つの実験群 (C群、LD群、MD群) 各8匹の肝臓試料から得られた mRNA を用いた遺伝子発現マイクロアレイ解析により、各群の遺伝子発現プロファイルを得た。昨年度報告したように、C群に比べて LD群で有意 ( $p < 0.05$ 、fold change  $\geq 1.5$ ) に発現変動した遺伝子の数は、2,128、MD群で有意に発現変動した遺伝子の数は、2,781であった。今年度は、これら LD群、MD群で発現変動した遺伝子について詳細な解析を行った。LD群、MD群で特異的に変化した遺伝子 (LD群とMD群に共通な662遺伝子を除いた、それぞれ1,466、2,119個) について、これらの抽出された遺伝子リストに頻出する遺伝子の機能や種類を統計的に調べるために、オントロジー解析を行った。その結果、LD群では "Arrest in hematopoiesis of liver"、MD群では "Lipoapoptosis of hepatocytes"、"Expansion of hepatic progenitor cells" に関わる遺伝子群が変動している傾向が示された。また、両照射群に共通して変動した遺伝子群のオントロジー解析では "Regeneration of

hepatocytes" に関わる遺伝子群が変動していることが示唆された。

次に、各照射群で有意に発現変動した遺伝子群がどのような生体分子経路にマップされるか、タンパク質間相互作用や遺伝子発現制御などの情報を考慮したパスウェイ解析を行った。その結果、MD群では "Paxillin signaling"、"p53 signaling" など19個のパスウェイが有意に変動していることが示唆された。なかでも "Paxillin signaling" の活性予測では p38MAPK を介した細胞増殖が亢進していることが示唆され、"p53 signaling" では p73, p63, BAX など介した細胞死 (アポトーシス) が亢進していることが予測された (Fig. 1)。一方、LD群では "Calcium signaling"、"PKC  $\theta$  signaling in T lymphocytes" など15個のパスウェイが有意に変動していることが示唆されたが、総じてその傾向は弱かった。そのなかで "Calcium signaling" の p 値は良好だったが、活性予測をみると CAMK を介した細胞増殖のパスウェイが弱く示唆された以外には意味のある結果は得られなかった。"PKC  $\theta$  signaling" の活性予測では、CALN, NFAT5 や MEKK, IKK を介した "Immune response" のパスウェイが亢進していることが示唆された (Fig. 2)。

### 3.2 考察

以上の結果から、中線量率照射では細胞死や細胞増殖等に関わる遺伝子群が変動する可能性があり、低線量率照射では中線量率照射とは異なる肝造血に関わる細胞増殖シグナルの変化が起きている可能性が示唆された。これらの結果は、遺伝子発現レベルで「線量率効果」のようなものが存在していることを示唆すると考えられる。今回のLD群は100日間、積算2,000 mGy照射されたサンプルだが、今後200、300、400日間 (それぞれ積算4,000、6,000、8,000 mGy) 照射したサンプルを得る予定である。積算線量が増加したときにこれらの遺伝子群がどのように変動するか、これら経時解剖群の遺伝子発現プロファイルを解析し、パスウェイの変化の特徴を明らかにする。また、100~400日間照射したメスマウスのサンプルも使い、低線量率照射による遺伝子発現変化の雌雄差についての解析を行う。

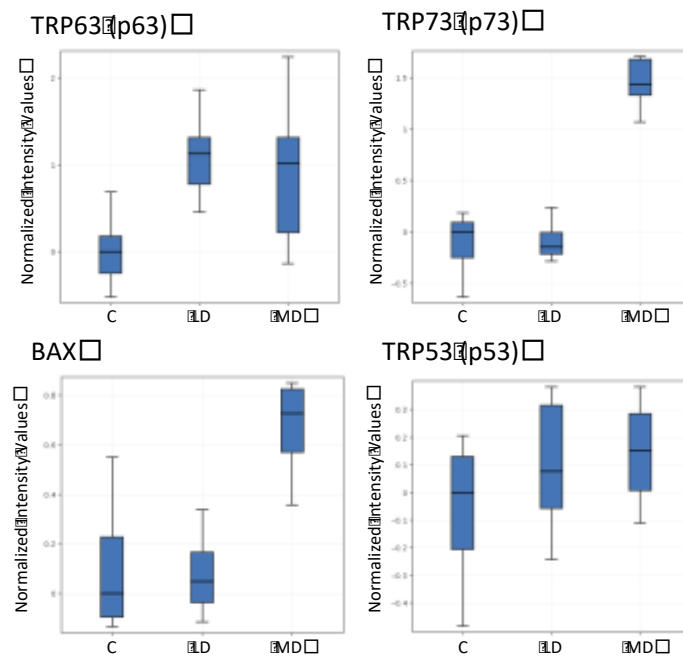


Fig. 1 Expression of 4 genes in the p53 signaling pathway in the liver of non-irradiated (C), low dose-rate-irradiated (LD) and medium dose-rate-irradiated (MD) mice. These genes showed significant alterations in expression in the MD mice.

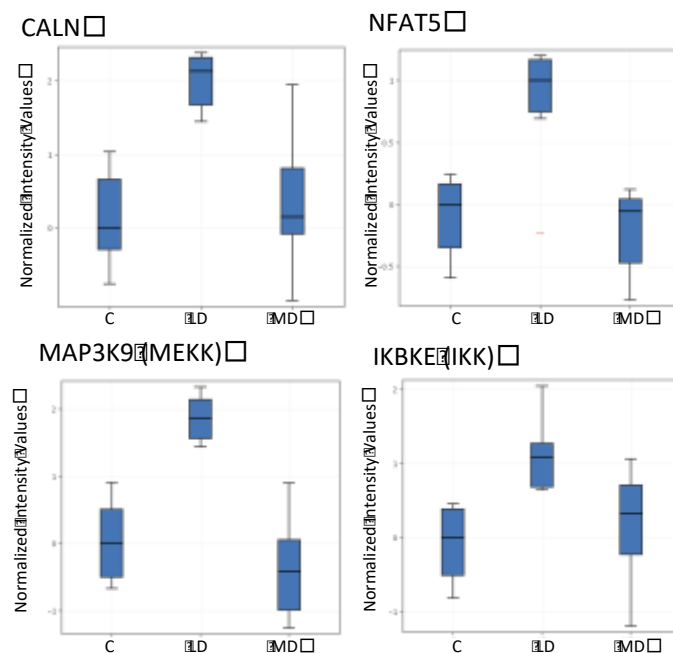


Fig. 2 Expression of 4 genes in the PKC $\theta$  signaling pathway in the liver of non-irradiated (C), low dose-rate-irradiated (LD) and medium dose-rate-irradiated (MD) mice. These genes showed significant alterations in expression in the LD mice.