

第5章 低線量率放射線被ばく影響の発現機序調査研究

5.1 細胞・分子・遺伝子への影響の解析

Analyze DNA Methylation in the Liver of Low Dose-Rate-Irradiated Mice

杉原 崇, 藤川 勝義, 田中 聡, 田中 イグナシヤ, 小村 潤一郎
生物影響研究部

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

Abstract

We have previously observed extensive alterations in gene expression in livers of mice exposed to low dose-rate radiation. The purpose of the present project is to identify epigenetic mechanisms (e.g., DNA methylation) responsible for these alterations in gene expression and their possible relationship to the development of diseases such as fatty liver. We have been collecting liver (normal and fatty) samples from both non-irradiated and low dose-rate (20 mGy/day) irradiated mice at various ages. Analysis of gene expression, in the samples so far obtained, by microarray and quantitative PCR suggested that changes in the expression of *Cidea* and *Cidec* (*cell death-inducing DFFA-like effector A and C*) genes are associated with the development of fatty liver disease. Further analysis showed high expression levels of the *Cidea* gene in severe fatty livers from irradiated mice. Preliminary analysis suggested that changes in DNA methylation in the *Cidea* and *Cidec* genes are age- and irradiation-related. In the next fiscal year, we will continue to collect tissue samples from mice for further DNA methylation analyses.

1. 目的

本調査では、低線量率放射線が、生物個体を構成する細胞、細胞を構成する分子、遺伝子に作用し、その結果、最終的に個体レベルの健康影響として現れてくる機序を解明する。これまでの解析では、遺伝子レベルの影響としては突然変異（DNA配列の変化）を、個体レベルの健康影響としてはがんを主な対象としてきた。今期調査では、近年重要性が指摘されているにもかかわらず未解明であるエピジェネティックな変化、すなわち遺伝子発現およびその制御機序（DNAメチル化や非コードRNAの発現等）の変化に、また遺伝子発現変化の結果として生じる細胞の性質の変化であり、がんよりも早期に発生する非がん病変（脂肪肝等の代謝異常）に焦点を当て、その機序を解明する。本年度は、前年度のフ

ィージビリティ試験の結果を受け、B6C3F1雌雄マウスへの低線量率放射線長期照射（20 mGy/日×400日、56日齢から照射開始）と経時的サンプリング（56～656日齢、100日ごと）および得られたサンプルのエピジェネティック解析を開始した。

ここでは、そのうちDNAメチル化に関する以下の解析結果を示す。次年度本格化する網羅的DNAメチル化解析を前に、これまでに環境研が実施してきた実験のアーカイブデータを用い、特に注目して解析すべき遺伝子（脂肪肝で発現変化が見られる遺伝子）を抽出した。また、そのような遺伝子に関して、網羅的DNAメチル化解析予備実験のデータを用い、メチル化レベルの決定を行った。

2. 方法

実験アーカイブにある低線量率放射線長期照射実験のマウスデータを、病理組織学的解析結果に基づき、非照射非脂肪肝群、照射非脂肪肝群、照射非脂肪肝群および照射脂肪肝群に分類し、肝臓cDNAを用いた発現マイクロアレイ解析の結果を再解析するとともに、新たに定量PCR解析を行った。また、環境研自主研究の実験で得られた、8匹のマウスの肝臓DNAのBisulfite-次世代シーケンス法による網羅的DNAメチル化予備解析データの再解析を行った。いずれの実験も、今期調査で用いるものと同様のマウス（ただしメスのみ）、同様の照射プロトコルを用いた。

3. 成果の概要

遺伝子発現マイクロアレイ解析データの病理組織学的分類による再解析および定量PCRによる追加解析を行った結果、脂肪肝発症に関連する遺伝子として、*Cidea*、*Cidec* (*cell death-inducing DFFA-like effector A and C*) 両遺伝子が抽出された。このうち特に*Cidea*遺伝子は、照射群の脂肪肝群で顕著に発現増加する遺伝子であった。非照射群と照射群の脂肪肝発症マウスを一定以上の*Cidea*遺伝子の発現レベルを持つマウスと持たないマウスに分類したうえで、脂肪肝

の重篤度との紐づけを行ったところ、*Cidea*陽性の脂肪肝は、照射群にのみ見られ、かつ重篤度が高いことが明らかになった (Fig. 1)。

そこで、これらの遺伝子の発現変化にDNAメチル化の変化が関与しているのではないかと考え、予備的解析を行った。具体的には、以前に環境研自主研究として実施した8匹のマウスの網羅的DNAメチル化解析の予備的解析実験のデータから*Cidea*、*Cidec*の遺伝子領域について再解析した。8匹のマウスの内訳は、63日齢マウス(2匹)、20 mGy/日で400日間照射し、その後656日齢まで飼育したマウス(3匹)、及び656日齢まで非照射条件で飼育したマウス(3匹)である。解析の結果、両遺伝子の領域のDNAメチル化頻度は加齢もしくは照射によって変化していた (Fig. 2)。

次年度は、マウス照射およびサンプリングを続行し、356、456日齢マウスのDNAメチル化のデータを取得する計画である。また、今年度既に得られている、0、256日齢のデータと合わせ詳細解析を行い、これらの領域におけるDNAメチル化変化が遺伝子発現にどのように関わっているか、脂肪肝発症にどのように関わっているかについて検討する。

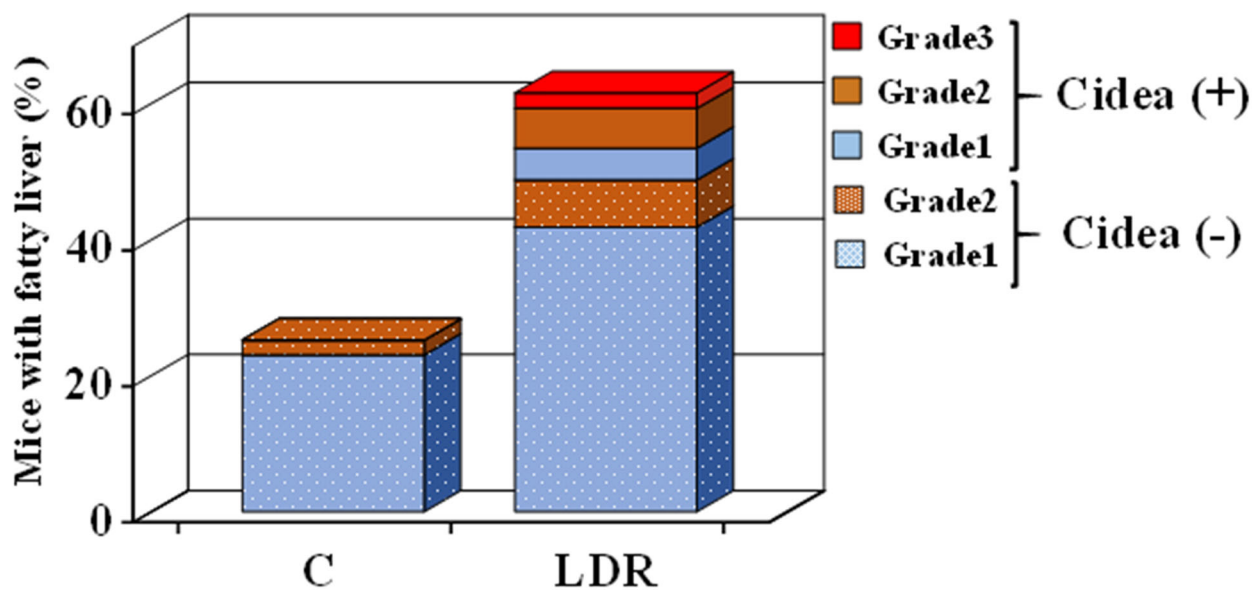
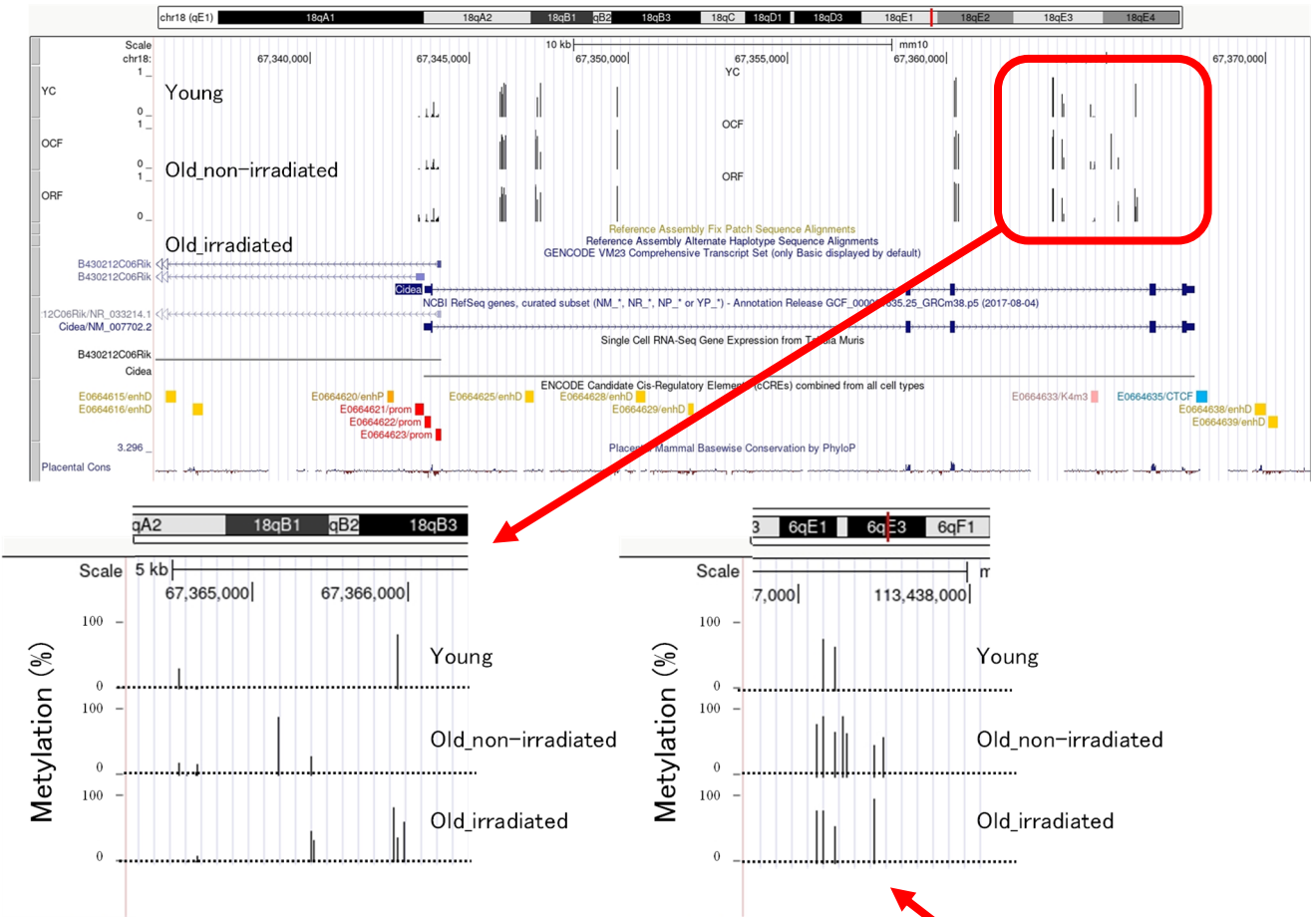


Fig. 1 *Cidea* gene expression and severity (grade) of fatty livers in non-irradiated (C) and irradiated (LDR) female mice.

Cidea



Cidec

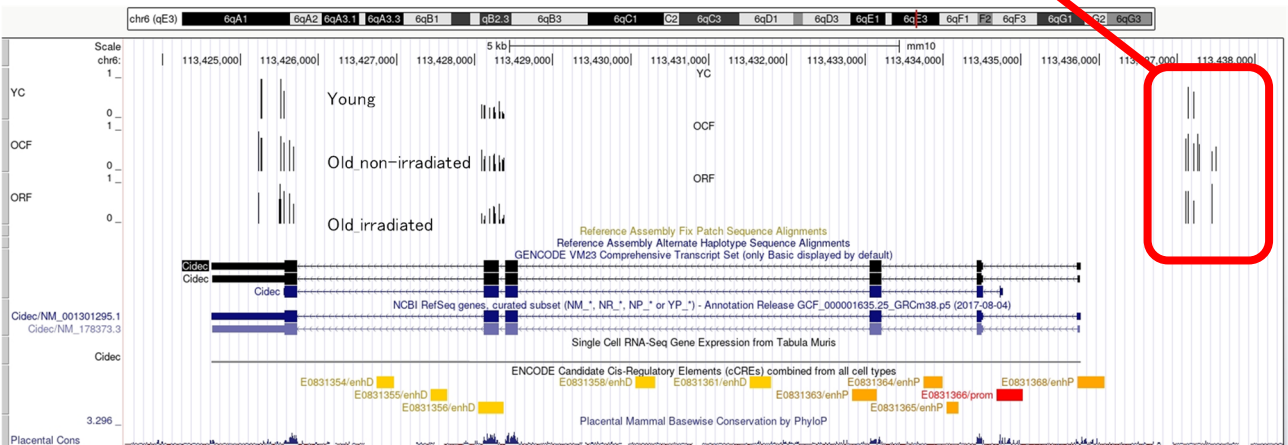


Fig.2 DNA methylation levels in the *Cidea* (top) and *Cidec* (bottom) gene regions.

Young (63 days old) non-irradiated mice, old (656 days old) non-irradiated mice, and old (656 days old) irradiated (at 20 mGy/day for 400 days from 56 days old) mice were used.