

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 Fatty Liver-related Genes

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 female mice to low dose-rate (LDR: 20 mGy/day) radiation induced various changes including obesity and fatty liver. To elucidate the molecular changes associated with the induction of fatty liver by LDR irradiation, we analyzed the expression of several metabolism-related genes in the liver of LDR-irradiated female mice. LDR irradiation did not change the expression of the genes for a fatty acid transporter and β -oxidation enzymes, which are controlled by the transcription factor Ppar α , whereas it changed the expression of the gene for Cidec, which is controlled by the transcription factor Ppar γ , and of the gene for Igfbp1. These results suggested that LDR irradiation to female mice might induce metabolic changes that resemble those reported for humans with type 2 diabetes.

1. 目的

「低線量放射線生体防御機能影響実験調査」(平成17~26年度)等により、低線量率放射線照射はメスマウスで肥満を誘発し脂肪肝を増加させる効果を持つことが明らかとなった。そこで、本調査では、「低線量率放射線長期照射がメスマウスの脂肪肝形成にどのように関わるか」という視点から、脂肪肝になる分子生物学的なレベルの原因を探索するために、継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、脂肪肝との関連が考えられる遺伝子の発現解析を行った。具体的には、脂肪肝との関連が指摘されている脂肪酸トランスポーター及び β 酸化酵素の遺伝子(これらは核内受容体 Ppar α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) の調節を受ける)の発現変化を解析した。また、以前に行った肝臓のマイクロアレイ解析によって低線量率放射線照射による発現変化があることが明らかになっており、脂肪肝との関連が報告されている代謝関連の遺伝子

Cidec (これは核内受容体 Ppar γ の調節を受ける)についても解析を行った。さらに、肝臓を含む全身の多くの臓器での糖代謝の調節を行う臓器である膵臓でのインスリン遺伝子発現を解析した。

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100-700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 -ガンマ線連続照射(20 mGy/日、集積線量 8000 mGy)を行い、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 マウス肝臓及び膵臓からの 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及び膵臓試料へ 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。FAT、Acox1、Mcad、Cidec、Igfbp1、Ins1、Ins2 遺伝子の発現変化を、Power SYBR Green PCR Master Mix (サーモフィッシャー) 及びユニバーサルプローブ (ロシュ)、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 低線量率放射線照射メスマウス肝臓における Ppar α 依存的に調節される脂肪酸トランスポーター及び β 酸化酵素遺伝子の発現変化

C 型肝炎ウイルスコアタンパク質 (HCVcp) トランスジェニックマウスは通常飼育環境下で 3 カ月齢から加齢に伴い顕著な脂肪肝の発生を示す脂肪肝モデルマウスであるが、このマウスの肝臓では、脂肪肝発生に伴い、Ppar α の継続的な活性化による脂肪酸のトランスポーター (Fatty acid translocase: FAT) と β 酸化酵素 (Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1: Acox1、Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase: Mcad) の発現上昇が報告されている。そこで、今年度の実験では、継時的剖検実験で低線量率放射線照射マウスに発生した脂肪肝が Ppar α 依存的に引き起こされる脂肪肝であるかどうかを判定するために、Ppar α 依存的な脂肪酸のトランスポーター (FAT) 及び β 酸化酵素 (Acox1、Mcad) 遺伝子について解析を行ったが、照射によるこれらの遺伝子の有意な発現変化は認められなかった (Fig. 1)。

3.2 低線量率放射線照射メスマウス肝臓における PPAR γ 依存的に調節される Cidec 遺伝子の発現変化

Cidec (Cell death-inducing DFFA-like effector C) 遺伝子の発現は、Ppar γ 依存的であり 2 型糖尿病モデルマウスの脂肪肝形成に重要であること、また、脂肪肝以外にも脂肪組織に著しい高発現が認められることが報告されている。そこで、今年度の実験では、継時的剖検実験マウス肝臓における低線量率放射線照射依存的な Cidec 遺伝子の発現の継時的な変化をリアルタイム PCR 法にて解析を行った。その結果、照射開始から 200 日目以降のすべての照射群で非照

射対照群と比較して Cidec 遺伝子の発現増加が見られた (Fig. 2)。また、この Cidec 遺伝子の発現増加パターンは肝臓脂肪変性の頻度や重篤度増加のパターンと類似していた。2 型糖尿病モデルマウスでは Igfbp1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1) の減少も報告されていることから、肝臓での Igfbp1 遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法にて解析した。その結果、予想された通り、照射開始から 200 日目から 400 日目及び 600 日目の照射群で Igfbp1 遺伝子の有意な発現減少が見られた。これらの結果から、低線量率放射線照射群で見られる脂肪肝は、2 型糖尿病モデルマウスで見られる Ppar γ 依存的な脂肪肝に類似している可能性が考えられた。

3.3 低線量率放射線照射メスマウス膵臓におけるインスリン遺伝子の発現変化

低線量率放射線の影響が 2 型糖尿病に似た傾向がある可能性を示唆したが、1 型糖尿病との関連性については不明である。1 型糖尿病は、膵臓の β 細胞が壊れインスリンの分泌が低下することが主な原因で起きるとされている。そこで、低線量率放射線によって誘発されたなんらかの影響が、膵臓に障害を与えインスリンの分泌を低下させている可能性を考え、メスマウス膵臓における 2 種類のインスリン遺伝子 (Ins1、Ins2) の発現量変化について調べた。解析の結果、非照射群と低線量率照射群間で Ins1、Ins2 共に照射開始から 100~700 日間の全ての解析日において遺伝子発現量の有意な差は見られなかった。これらの結果から、低線量率放射線照射が 1 型糖尿病に類似した影響を誘発している可能性は低いと考えられる。

3.4 考察

「低線量率放射線長期照射がメスマウスの脂肪肝形成にどのように関わるか」という視点から、Ppar α 依存的に調節される脂肪酸トランスポーター及び β 酸化酵素遺伝子の発現変化、Ppar γ 依存的に調節される Cidec 遺伝子の発現変化について解析し、低線量率放射線照射マウスに見られる脂肪肝は Ppar α ではなく Ppar γ 依存的であることを示唆する結果を得た。これに、Igfbp1 の遺伝子発現の減少という結果等を合わせると、低線量率放射線長期照射により

ヒトの生活習慣病である2型糖尿病に関連するとされる生化学的経路が動いている可能性、言い換えると、低線量率放射線長期照射がヒトの生活習慣病で

ある2型糖尿病の憎悪因子となる可能性が示唆されたと総括することができる。

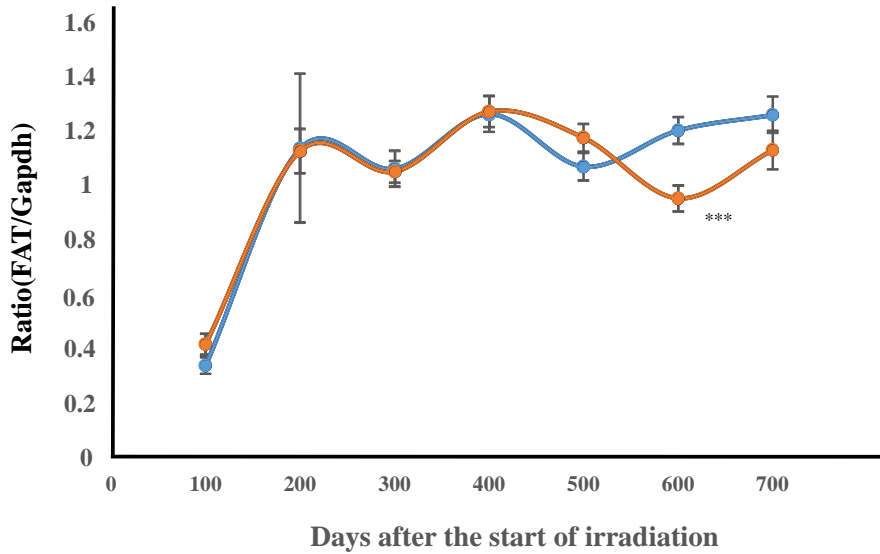


Fig.1 Changes in the expression of the gene for FAT (fatty acid translocase).
 Blue: non-irradiated (n=20-30); orange: irradiated, (n=20-30).
 ***: P<0.001.

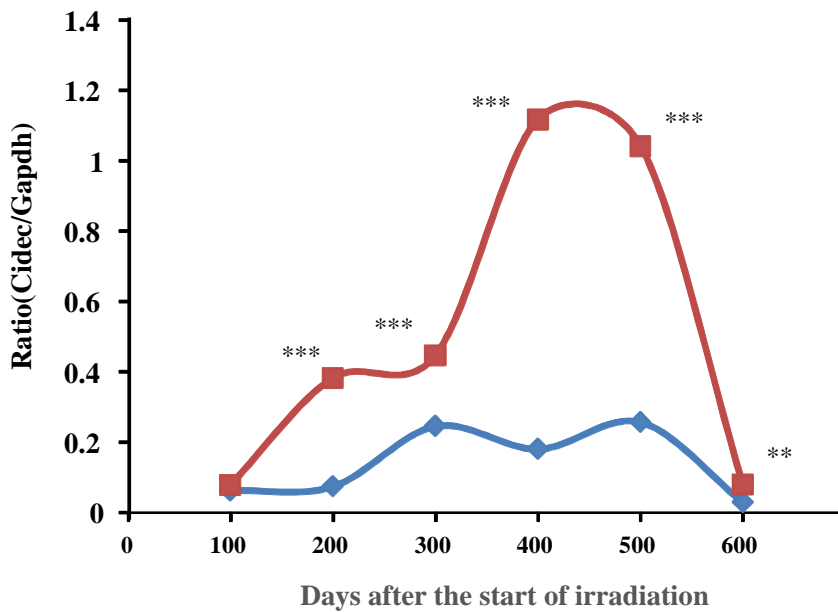


Fig.2 Changes in the expression of the gene for Cidec (cell death-inducing DFFA-like effector C).
 Blue: non-irradiated (n=20-30); orange: irradiated (n=20-30).
 : P<0.01, *: P<0.001.