

## 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

#### 2.3.1.1 低線量率放射線長期照射マウス肝臓の網羅的遺伝子発現解析

#### Genome-wide Gene Expression Analysis of the Liver from Low Dose-rate-irradiated Mice

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 reported life span shortening and increased incidences of cancer and non-cancer diseases in B6C3F1 mice irradiated with gamma-rays at 20 mGy/day for 400 days. In the present study, we investigated the genome-wide gene expression profile of the liver from male and female mice irradiated at 20 mGy/day for 100, 200, 300 and 400 days. In the Ingenuity Pathway Analysis, no significant alteration was found in the “p53 signaling” pathway. Instead, female mice irradiated at 20 mGy/day for 200 and 300 days showed prominent upregulation of several pathways related to lipid metabolism, such as “Cholesterol biosynthesis” and “Adipogenesis” pathways. In male mice, however, alterations in these pathways were not conspicuous. These results may correspond to the increased incidence of fatty liver and obesity, which may promote hepatocarcinogenesis, in low dose-rate-irradiated female mice.

#### 1. 目的

本調査では、平成 27~28 年度に、前調査の「経時的解剖実験」で得られた低線量率放射線照射マウス肝臓サンプルを用いて、定量 PCR 法による個別の遺伝子の発現解析を行った。平成 29 年度からは、本調査の照射実験で得たマウス肝臓サンプルを用い、マイクロアレイ法による詳細な網羅的遺伝子発現解析を行っている。昨年度は、集積線量を同じにした低線量率照射群（20 mGy/日×100 日、集積線量 2,000 mGy）及び中線量率照射群（400 mGy/日×5 日、集積線量 2,000 mGy）の比較を行い、線量率による遺伝子発現の違いを明らかにした。今年度は、低線量率照射各群（雌雄、20 mGy/日×100、200、300 もしくは 400 日、集積線量 2,000、4,000、6,000 もしくは 8,000 mGy）のサンプルがそろったことから、低線量

率長期連続照射の遺伝子発現への影響及びその性差について概括的な解析を行った。

#### 2. 方法

##### 2.1 マウス照射と臓器試料の採取

6 週齢の Specific pathogen free (SPF) B6C3F1 マウス雌雄各 64 匹（日本クレア）を、8 匹ずつ雌雄各 8 組の実験群に分け、2 週間の検疫の後、SPF 環境下で飼育した。LD100、LD200、LD300、LD400 群には、8 週齢からそれぞれ 100、200、300、400 日間  $^{137}\text{Cs-}\gamma$  線連続照射（線量率 20 mGy/日）を行った。これらの照射群に対応する同日齢の対照群（C100、C200、C300、C400 群）を、非照射環境下で飼育した。全てのマウスは、解剖日の前日から 22 時間絶食させ、照射終了後速やかに解剖して肝臓サンプルを

得た。

## 2.2 マイクロアレイ解析

採取したマウス肝臓 (~5 mm<sup>3</sup>) へ 500 $\mu$ l の ISOGEN 液 (ニッポンジーン) を加えてホモジナイズした後、-20 度で凍結保存した。保存試料から RNeasy (キアゲン) を用いて mRNA を抽出、精製した。得られた RNA 試料の精製度、収量は 2100 Bioanalyzer (アジレント) および Nanodrop 分光光度計 (サーモフィッシャー) で測定した。遺伝子発現マイクロアレイ解析は、アジレントの 1 色法プロトコルに従って行った。mRNA 試料 400 ng を、Low Input Quick-Amp Labeling Kit (アジレント) を用い Cyanine-3 蛍光標識した。標識された cDNA 試料を、8 $\times$ 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 G4852B、アジレント) にハイブリダイズした。蛍光シグナルの検出には、DNA マイクロアレイスキャナー (アジレント) を用い、取り込んだ画像データの数値化には、数値化ソフトウェア FeatureExtraction (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 GeneSpringGX (アジレント) 及びパスウェイ解析ソフトウェア Ingenuity<sup>®</sup> Pathway Analysis (IPA、キアゲン) を用いた。

## 3. 成果の概要

### 3.1 低線量率放射線照射マウス肝臓で発現変化する遺伝子の解析

B6C3F1 マウスの雌雄各 8 つの実験群 (C100~400 群、LD100~400 群) 各 8 匹の肝臓サンプルから得られた 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。非照射群に比べて有意 ( $p < 0.05$ , fold change  $\geq 1.5$ ) に発現変化する遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子について、IPA によるパスウェイ解析 (遺伝子を機能および活性化経路ごとにグループ化して発現変動を解析) を行った。各照射群で有意な変動を示した遺伝子群のうち上位に来るものがどのようなものであるかを検討したが、特にメス LD300 群の解析で顕著な結果が得られた。Fig. 1 には、メス LD300

群での発現変動の有意性が高かった遺伝子群上位 10 個について、LD100、LD200、LD300、LD400 群での発現変動の有意性を示した。メス LD300 群に加え LD200 群でも、コレステロール生合成関連遺伝子群や脂質代謝関連遺伝子群の有意な変動が検出された。Fig. 2 は、コレステロール生合成酵素の遺伝子 3 種 (Cyp51、Sqle、Fdps) について個別の変動を表したものである。これらの酵素遺伝子については、メスの非照射群では加齢に伴う発現上昇がみられたが、照射群 (LD200、LD300) では非照射群に比べて有意に発現上昇していた。これらの加齢や照射による遺伝子発現変動は、オスでは認められなかった。一方、酵素ではなく脂質代謝制御因子の遺伝子 (Srebf1、Pparg) の発現量を個別に検討したところ、メスでは加齢に伴う発現上昇がみられ、また LD200 以降の照射群で非照射群に比べて有意に発現上昇していた。オスにおいても、これら制御因子の遺伝子の場合、酵素の遺伝子の場合とは異なり、加齢や照射による発現上昇が認められた。上記のメス照射群におけるコレステロール生合成関連遺伝子群や脂質代謝関連遺伝子群の発現変動は、これまで環境研で行われた調査 (寿命試験、経時的剖検実験、低線量放射線生体防御機能影響実験調査、低線量率放射線に対する生理応答影響実験調査) で明確になった照射メスマウスにおける肥満と関連していると考えられる。

オスマウスのパスウェイ解析の結果、コレステロール生合成関連遺伝子群の変化が一部認められるものの、メスほど顕著ではなかった。一方、DNA 複製・修復関連の遺伝子群の有意な発現変動が認められた。DNA 複製・修復に関与する主要なタンパク質の遺伝子のいくつか (Mcm4、Rpa1、Lig4、Chaf1a、Gtf2h5) は、オス LD300 群で有意に上昇していたが、他の群では変動は顕著ではなかった。また、遺伝子発現の変動が認められた二つの DNA 修復経路 (ミスマッチ修復、Mismatch Repair 及びヌクレオチド除去修復、NER) は、放射線の生物作用を考える上で最も重要とされる DNA 損傷 (二本鎖切断) を修復するための経路ではないことから、これらの意義についてはさらに検討する必要があると考えられる。

上記の雌雄の LD300 群での発現変動の有意性の

高さによって検出されてきた遺伝子群の多くは、LD400 群では有意性を示さなくなっており (Fig. 1)、総線量 (照射期間) が増加するとともに影響が顕著になって行くものではないことが示唆される。

今後、これまでに検出された経時的変動や性差のより詳細な解析を行うとともに、これらの変動のうちどれが低線量率放射線の影響として本質的なものであるかを検討していく必要があると考えられる。

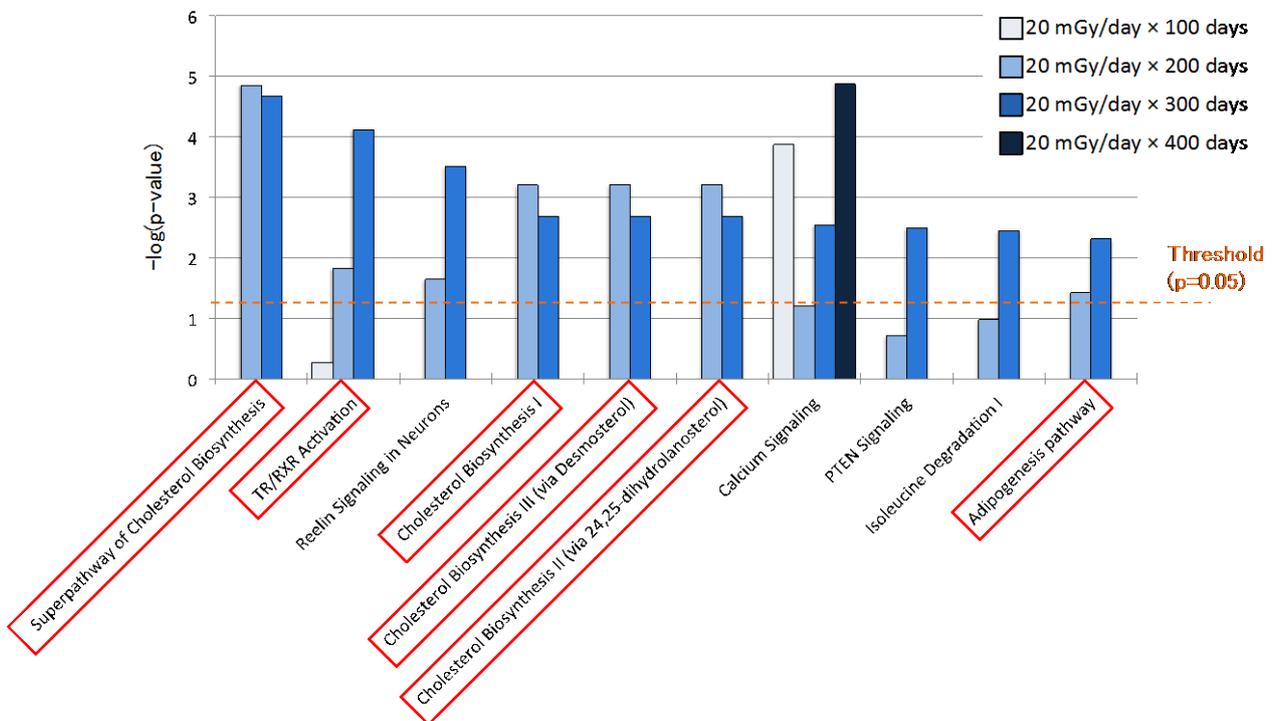


Fig. 1 Alterations in gene expression in low dose-rate-irradiated female mice. Ten most significantly altered canonical pathways in the liver from female mice irradiated for 300 days were identified by the gene ontology algorithm of Ingenuity Pathway Analysis. Columns represent groups with different irradiation periods. The y-axis represents the negative log of the p-value from Fisher's exact test. The dashed line indicates a p value of 0.05 as a threshold of significance. The pathways related to lipid metabolism are marked by red boxes.

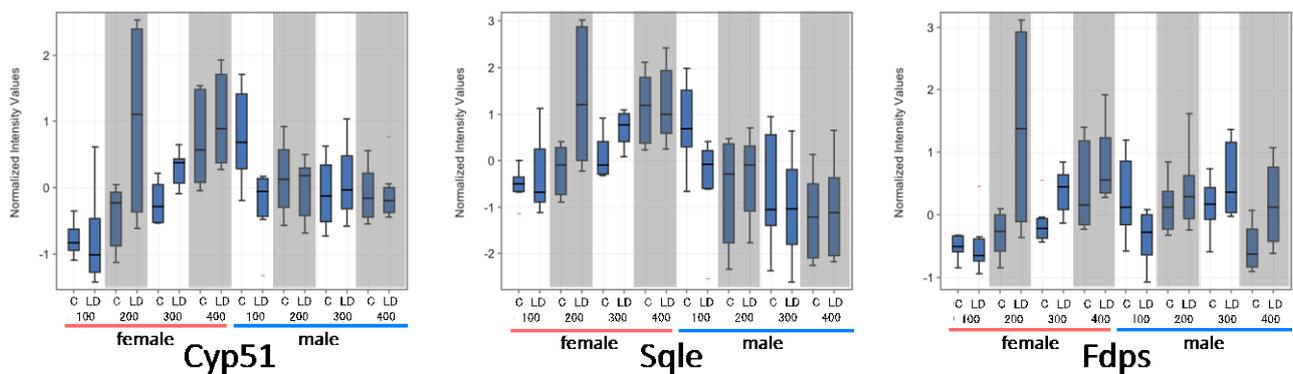


Fig. 2 Box-and-whisker plots of the expression of the genes encoding cholesterol biosynthesis enzymes. The y-axis indicates normalized gene expression signals processed by GeneSpring. Tiny red lines in graph areas indicate outliers.