

# 低線量率長期照射による個体レベルでの遺伝子発現変化の解析

(受託者) 国立大学法人東北大学

(研究代表者) 小野哲也 大学院医学系研究科

(再委託先) 独立行政法人放射線医学総合研究所

(研究開発期間) 平成21年度～23年度

## 1. 研究開発の背景とねらい

放射線による癌誘発や寿命短縮などの晩発性障害の発生メカニズムについては染色体異常や遺伝子変異などのゲノムの構造変化が重要と考えられてきたが、近年遺伝子発現の変化（エピジェネティックな変化）の重要性も注目され始めている。我々は低線量率放射線を長期照射したマウスでの mRNA と蛋白質の解析から、放射線作業従事者の許容線量（20 mSv/yr）、あるいは宇宙ステーションでの被ばくレベル（数 100 mSv/yr）といった非常に低い線量率の放射線でも遺伝子発現が変化することを明らかにした。しかもその変化からは細胞のストレス防護反応の増強だけでなく肥満や代謝異常といったこれまでに考えられていなかった生体機能の変化に結びつく可能性も示唆された。しかし、これらの変化は照射直後に解析したものであり、見出された変化がその後も長期間保たれるかどうかについては分かっていない。そこでこの点を明らかにするのが本研究の目的である。そもそも遺伝子発現の変化の多くは一時的なものと考えられ、変化のどれ程が持続的変化になるかはほとんど未解明である。この解析によって低線量率放射線によるエピジェネティックな変化がどのようなものかが明らかにできると考えている。解析の手法としてはマイクロアレイ解析、2次元電気泳動、抗体アレイ解析などの網羅的な解析を用い、全体像の把握を目指す。

## 2. 研究開発成果

### 2.1 低線量率長期照射による肝臓における mRNA の変化

この解析の為に平成21年9月から長期照射を始め、線量率 20 mGy/d で400日間連続照射を行い、平成22年度中に照射後0日、1日、12日、1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月の肝臓のサンプリングを行った。使用したマウスは C57BL/6J の雄で、照射群、対照群共に一群を6匹とした。今年度はそれらのサンプルを用いて照射後の遺伝子発現とタンパク質発現の変化が経時的にどう変わってゆくのかについて解析を続けている。最終報告に向けて研究は順調に進んでいる。

#### 2.1.1 照射直後にみられる mRNA 変化から推測される生体機能変化

今回の実験で長期照射直後にみられた mRNA の変化が、以前に同じような実験を行ったときの結果[1]と一部異なる結果を示していたので、今回の mRNA の変化から推測される生体機能変化について Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いた解析をおこなった。その結果、以下のようなものの関与が示唆された ; metabolic disease, endocrine system function, bile acid metabolism, membrane lipid metabolism, cholesterol metabolism, apoptosis, gene expression. これらのうち、脂肪代謝やアポトーシスのように以前の解析結果と重なるものもあるが、そうでないものもある。今後の解析において注意を要する。

#### 2.1.2 照射終了後短時間での mRNA 変化

前年度までに、長期照射直後に変化の見られる mRNA のほとんどがその後短時間の間に消失し

てしまうことを見いだしているが、本実験で新たに照射直後での変化が見いだされた2種類の遺伝子、Car3 と Ppp1r3c について、経時的な変化を RT-PCR 法により解析した。その結果、Car3 は4時間後では増加が減少に変わり、24時間では減少の程度が減弱していた。Ppp1r3c は照射終了後4時間で変化が見られなくなった。これらの結果は、長期照射直後にみられる mRNA の変化がその後経時的に消失していくという前年度までの観察をさらに確かめるものとなった。

### 2.1.3 長期照射後3ヶ月での mRNA の変化

平成22年度および本年度に行った長期照射後の短期的な遺伝子発現変化の解析結果より、まだ確定的ではないものの照射直後の発現変化は12日以内にほとんどが消失してしまうものと予想される。そこで、照射後さらに長時間を経た後での発現変化への影響を調べるため、照射後3ヶ月でのマイクロアレイ解析を行った。その結果、照射6個体で統計的に有意に発現が増加している遺伝子を37種類、減少している

遺伝子を20種類見いだすことができた。その中で発現変動が大きかった代表的なものを表1に示す。これらのうち Cyp8b1、BC031353 (発現増加)、Txnip (発現減少) の3つの遺伝子は照射直後でもわずかな発現の変動が見られたがその他のものは変化していないので、照射後長時間を経た時点で2次的もしくは間接的な変化として現れたと考えられる。次に、これら発現変化している遺伝子群から、どのような生物学的機能変化が推測されるかについて、IPA を用い機能解析を行ったところ、肝臓がんが最も強く示唆された(表2)。マウスでは、20 mGy/d の長期連続照射により肝臓がんの発生頻度が有意に上昇することが報告されており[2]、照射3ヶ月後の遺伝子発現変化からこのような結果が得られたことは非常に興味深い。

表2 照射3ヶ月後肝臓で統計的に有意に発現変動していた遺伝子

| Gene*           | Function   | Fold change |
|-----------------|--|-------------|
| Gm6958          | viral infectious cycle   | 2.3         |
| Mpa2l/Gbp10     | GTP binding  | 1.8         |
| Cyp2b13         | oxidation reduction  | 1.7         |
| Lcn2            | apoptosis, regulation of gene expression<br>immune response  | 1.7         |
| Usp18           | ubiquitin-dependent protein catabolism   | 1.6         |
| Srrm2           | mRNA splicing  | 1.5         |
| Apol9a/Apol9b   | lipoprotein metabolism   | 1.4         |
| Nnmt            | metabolic process, methylation   | 1.4         |
| Saa2            | acute-phase response   | 1.4         |
| Saa1            | cholesterol metabolism   | 1.4         |
| D630002G06Rik   | transmembrane transport  | 1.4         |
| Cep192          | microtubule nucleation, centriole replication<br>regulation of centrosome cycle  | 1.4         |
| <b>Cyp8b1</b>   | oxidation reduction, metabolic process   | 1.3         |
| <b>BC031353</b> | unknown  | 1.3         |
| Hsd3b5          | steroid biosynthesis, oxidation reduction  | -3.3        |
| Igfbp1          | regulation of cell growth, insulin receptor signaling  | -2.0        |
| Slco1a1         | ion transport, organic anion transport   | -1.6        |
| <b>Txnip</b>    | transcription, cell cycle, apoptosis,<br>platelet-derived growth factor receptor signaling   | -1.6        |
| Egfr            | MAPKK activity, signal transduction, apoptosis,<br>circadian rhythm, cell proliferation  | -1.5        |
| Mpp5            | guanylate kinase, protein binding  | -1.4        |
| 8430408G22Rik   | unknown  | -1.4        |
| Osgin1          | negative regulation of cell growth   | -1.4        |
| Acot1           | fatty acid metabolism, lipid metabolism  | -1.4        |
| Ctgf            | angiogenesis, cell growth, protein phosphorylation,<br>cell adhesion, gene expression, cell migration<br>fibroblast growth factor receptor signaling | -1.4        |
| Casc4           | unknown  | -1.4        |
| Slc12a2         | ion transport, gamma-aminobutyric acid signaling   | -1.4        |

\* 太字は照射直後でも変化していた遺伝子

表2 照射後3ヶ月の肝臓で発現変動している遺伝子から予想される生物学的機能

| Function              | p-value  | Gene  |
|-----------------------|----------|---|
| Liver tumor           | 1.59E-06 | Cyp2b9, Egfr, Eif2ak2, Fgl1, Gstm1, Nnmt, Pnrc1, Slc22a9, Slco1a1, Txnip              |
| Steroid metabolism    | 3.74E-05 | Abcg5, Cyp8b1, Egfr, Hsd3b4, Prlr, Saa2, Sc4mol                                       |
| Cell death            | 9.11E-05 | Ctgf, Ddx17, Egfr, Eif2ak2, Igfbp1, Lcn2, Lrp1, Serpina3, Slc12a2, Syvn1, Tfrc, Txnip |
| Tumor malignancy      | 1.37E-04 | Ccng1, Egfr   |
| Steroid transport     | 1.41E-04 | Abcg5, Lrp1, Saa2, Slco1a1  |
| Fatty acid metabolism | 1.07E-03 | Abcg5, Acot1, P Egfr, Lrp1, Mlxipl, Saa2, Sc4mol, Slco1a1                             |
| mRNA translation      | 1.22E-03 | Eif2ak2, Paip1  |
| Cell cycle arrest     | 1.99E-03 | Ccng1, Egfr, Eif2ak2, Osgin1, Tfrc, Txnip   |
| Hormone metabolism    | 2.32E-03 | Hsd17b11, Egfr, Hsd3b4, Prlr  |

Ingenuity Pathway Analysis による解析

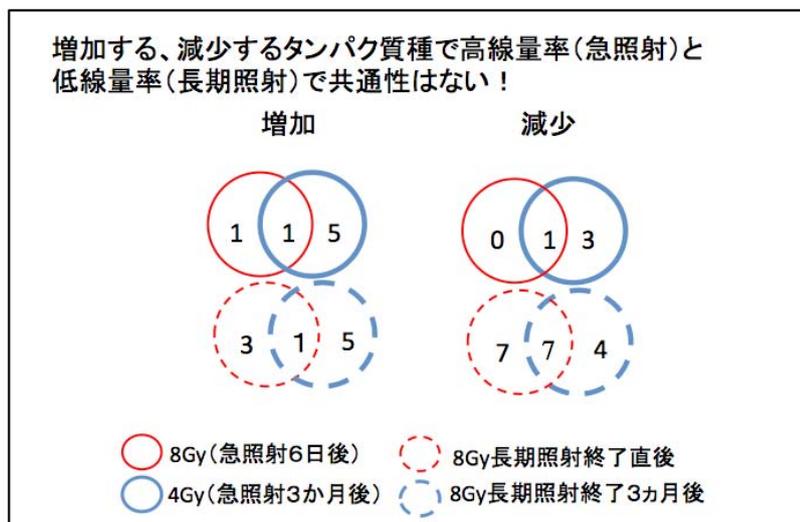
## 2.2 低線量率長期照射後の肝臓における蛋白質レベルでの変化

低線量率長期照射の生体影響を解明することを目的として、蛋白質レベルでの発現変化の照射後における経時的変化、安定性を解析するとともに、対照実験として高線量率 (0.5-0.7 Gy/min) 照射後の蛋白質発現変化を解析した。

### 2.2.1 低線量率長期照射終了後3か月での蛋白質の変化

低線量率放射線長期連続照射後 (400 日間照射、総線量 8Gy) のマウス肝臓蛋白質の変化については、昨年度に概略報告を行った抗体アレイ (フィルジェン社 Panorama Ab Microarray XPRESS Profiler 725) の結果についてさらに詳細な検討をおこなった。その結果、照射直後と3ヵ月後で共通して2倍以上増加する蛋白質が別に1種類あることを確認した。また昨年までは、蛋白質の発現変動を抗体ごとに集計していたが、今年度は同じ蛋白質を認識する抗体が複数ある場合は蛋白質種ごとに集計しなおした。そして、それらを含めて照射直後および3ヵ月後の少なくともどちらかで2倍以上増減する蛋白質について評価した (図1)。変動蛋白質の機能については炎症反応に関連するもの、アポトーシスに関与する蛋白質が多く含まれることが明らかになった。特に照射終了後3ヵ月で変化しているものはほとんどがアポトーシスに関わる蛋白質であった。

図1 高線量率照射と低線量率照射での変動タンパク質の比較



低線量率長期照射後の抗体アレイの結果を昨年度までに報告した高線量率照射後の結果と比較すると、2倍以上の変化をする蛋白質について、4 Gy 照射後3ヵ月、8 Gy 照射後6日の時点で見られたものと、長期照射直後、照射後3ヵ月で見られたものに共通する蛋白質は観察されなかった (図1)。

現在、低線量率照射後5ヵ月での抗体アレイの解析を行っている。またさらに詳細な経時的変動の解析のため照射5ヵ月後に加えて照射後12日、1ヵ月の蛋白質変動についても抗体アレイによる解析を進行中である。また抗体アレイの検出種類範囲に入らない顕著な変化をする蛋白質がないかどうかを確かめるため、低線量率放射線長期照射後5ヵ月のサンプルについて2次元電気泳動法による比較解析も行った。その結果、2種類の蛋白質の変動を確認した。このことは低線量率長期照射終了後長期間を経た後でも変動している蛋白質が存在することを示唆している。

今後、MALDI-TOF MS 分析を行い、変化している蛋白質の同定を試みる予定である。

### 2.2.3 高線量率放射線照射後の蛋白質の変化

高線量率放射線照射マウス肝臓における蛋白質変化の解析については、昨年度までに 4Gy 照射後 3 ヶ月で変化する蛋白質として MyD88, Epoxide hydrolase 2 (sEH) を見いだしたが、今年度はさらに長い経過時間での変化を解析した。照射後 6 ヶ月の時点でもこれら蛋白質の増加傾向が確認されたので、照射後 1.5 年のサンプルについてウェスタンブロット法により解析を行った。その結果、多少の個体差はあるものの両方の蛋白質とも 1.5 年後のマウスでは顕著な変動は確認されなかった。さらに 4Gy 照射後長期経過したマウスにおいて変化のある蛋白質を別の方法で検出することも試みた。二次元電気泳動法による比較解析を行った結果、顕著な変動蛋白質とみられるものは検出できなかった。この観察については現在、確認実験を行っている。

また、高線量率照射でみられた MyD88 の変動の 1.5 年後での消失について免疫組織化学的解析による変化の確認も進行中である。

### 2.2.4 変動を示す遺伝子群のプロモータの解析

プロモータの解析については、低線量率放射線長期照射後持続的な発現変動を示す遺伝子群ならびに長期間経過後はじめて変化を示す遺伝子群のプロモータ領域の DNA 配列について解析を行うため、どの時点で変化を解析したらよいか検討している。今後、共通な配列あるいは共通に作用する転写因子がないかどうか、遺伝子が近傍にあって同じインシュレーターに含まれる可能性はないかなどを探る予定である。

## 3. 今後の展望

これまでの mRNA と蛋白質を指標とした網羅的な解析から、低線量率放射線長期照射が遺伝子発現調節に対し短期的および長期的にどのような影響を及ぼすか、またそれが高線量率放射線照射時の影響とどう違うかについて概要が分かってきた。今後、これらの変化を全体的に理解できるようにデータを整理しながら実験を続けると同時にどのような生体機能の変化につながるのかについてまとめでゆきたい。

## 4. 参考文献

- [1] Y. Uehara, Y. Ito, K. Taki, M. Neno, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka, Y. Oghiso, K. Tanaka, T. Matsumoto, T. Paunesku, G.E. Woloschak, T. Ono, Gene expression profiles in mouse liver after long-term low-dose-rate irradiation with gamma rays. *Radiat. Res.*, **174**, 611-617, 2010.
- [2] I. B. Tanaka, S. Tanaka, K. Ichinohe, S. Matsushita, T. Matsumoto, H. Otsu, Y. Oghiso, F. Sato, Cause of death and neoplasia in mice continuously exposed to very low dose rates of gamma rays. *Radiat. Res.*, **167**, 417-437, 2007.