

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、財団法人環境科学技術研究所

(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といった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、近年遺伝子発現の持続的変化(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(図1)。我々はこれまでに低線量率放射線を長期間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線量限度(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[1～3]。しかもその変化からは細胞のストレスに対する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晩発性障害につなが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について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た。また、低線量率放射線の影響が高線量率放射線の影響と異なるかどうかについても比較検討した。

特に高線量率で0.1 Gyの照射が脳にアルツハイマー様の変化をもたらすかどうかについては、その重要性を考え、詳細な解析を行った。解析の手法としてはマイクロアレイ解析、二次元電気泳動、抗体アレイ解析などの網羅的な解析を用い、全体像の把握をめざした。

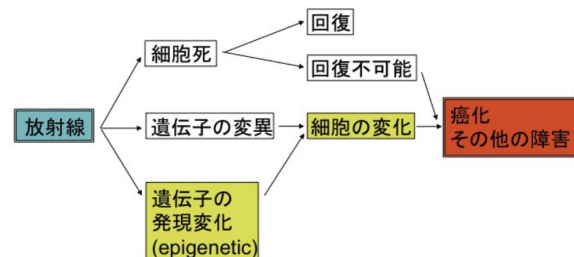


図1. 放射線の晩発性障害発生過程のモデル

2. 研究開発成果

2.1 高線量率放射線 0.1 Gy 照射による脳での変化

2009年、Loweらはマウスに0.1Gyの放射線を照射した後4時間でみられる脳でのmRNAの変化がヒトのアルツハイマー病で変化のみられるmRNAとかなり重複していることを報告した[4]。これは0.1Gyという低線量放射線がアルツハイマー病を引き起こすかも知れないとして注目された。その理由は、0.1GyがCT検査などでも被曝する量であり、もしこの報告が正しいとすると放射線診断の領域でも大きな問題になるからである[5]。我々はまず、この信憑性について確かめるべく、C57BL/6Jマウスに0.1Gyの放射線を照射後4時間におけるmRNAの変化を調べた。ただし、Loweらは海馬を含む大脳の1/3をサンプルとして用いたのに対し、我々はアルツハイマー病で最初に変化を示すことが分かっている海馬部位だけを分離してマイクロアレイによる解析を行った。その結果、50種類のmRNAに1.5倍以上の変化がみられた。これらの遺伝子の生体内での機能を探るためにIngenuity Pathway Analysis(IPA)を用いて解析すると14種類の機能がリス

トアップされた。これらのうち3種類についてはアルツハイマー病での変化及びLoweらの見出した変化と重複していたが、他の11種類については関連性がなかった。しかも重複している3種類の機能はいずれも細胞の基本的な機能であり、アルツハイマー病に関連するとは考えにくいものであった。さらに、0.1 Gy 照射後1年目と2年目における記憶力、脳のPET画像、アミロイド沈着、APP 蛋白の変化などを解析したが、非照射マウスと比べ何の変化も見られなかった(図2には2年目の記憶、PET、蛋白質の解析結果を示す)。これらのことから0.1 Gy 照射がアルツハイマー病を引き起こすことはない結論した。

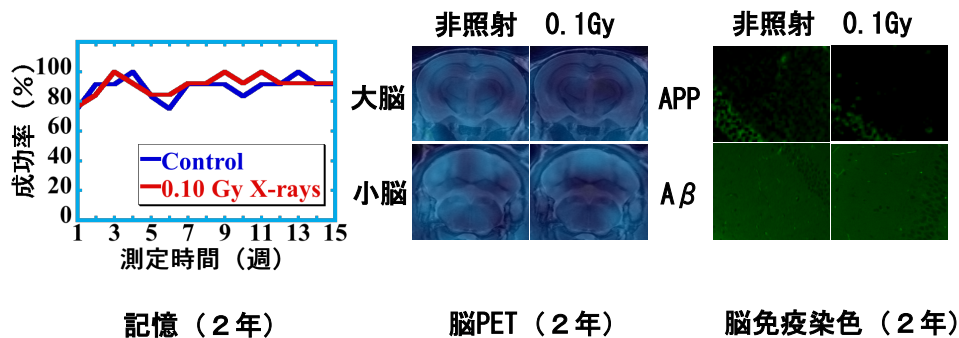


図2. 0.1 Gy 照射後2年を経た時点での記憶力、大脳、小脳のPET画像、及びアルツハイマー関連蛋白質 (APP と A β) の発現解析。非照射のマウスと変わらない。

2.2 低線量率放射線長期照射による mRNA の変化

2ヶ月齢のC57BL/6J雄マウスに線量率20 mGy/dで400日間の連続照射を行い、照射直後から5ヶ月後までのいくつかの時点でサンプリングを行った。肝臓のmRNAについてマイクロアレイ解析及びRT-PCR解析を行った結果以下のことが明らかになった。

(1) 照射終了直後には調査した約3万5千種類のmRNAのうち数10種類のmRNAに増加か減少がみられたが、そのすべてはその後の数時間から1ヶ月の間に変化がみられなくなった。ただし、Cyp8b1, BC031353(機能は未解明), Txnipの3種については短時間で一度変化が消失したあと3ヶ月後でもう一度変化が見られるようになった。しかし5ヶ月後になるとこの3種のうちの2種のmRNAの変化はまた消失していた。Cyp8b1は増加が減少に変わっていた。3ヶ月後と5ヶ月後ではそれぞれの時期にだけ変化している遺伝子が数10種類みられた。これらのことから、照射によって一部の遺伝子発現が変化しているという状況は持続するものの、どの遺伝子が変わるかというその中身は変遷あるいはfluctuateしていることが分かった。

(2) 照射終了直後、3ヶ月後、5ヶ月後のそれぞれの時期に変化している遺伝子から推測される生体機能についてIPAを用いて解析すると脂質代謝異常が3つの時期で共通に現れた。3ヶ月後では癌とアポトーシスも示唆された。なお、照射直後と3ヶ月後に減少していたTxnip遺伝子は癌抑制遺伝子であり発癌との関連性が考えられるので、個々の肝細胞での発現量を免疫組織化学法によって調べた。しかし照射による影響は確認できなかった。

(3) 低線量率長期照射による遺伝子発現変化と高線量率(0.72 Gy/min)4 Gy照射後3ヶ月目で見られる遺伝子発現変化を比較したところ同じものは一つもなかった。これは両者の影響がmRNAで見る限り全く異なることを示唆している。

2.3 低線量率放射線長期照射による蛋白質の変化

mRNA の解析に用いたマウス肝臓の別の部位を用い蛋白質レベルでの変化を調べた。解析には主に二次元電気泳動法と抗体アレイ法を用いた。因に二次元電気泳動法では約1000種類の蛋白質を、抗体アレイ法では約700種類の蛋白質を同時に解析出来る。

(1) 低線量率放射線長期照射直後、12日後、1ヶ月後、3ヶ月後、5ヶ月後の5つの時点で発現量に変化の見出された蛋白質はそれぞれ、19種類、3種類、1種類、18種類、3種類であった。それらのうち、8種類については直後と3ヶ月後に共通して見られ、1種類(E2F6)は直後、12日後、3ヶ月後、5ヶ月後の4つの時期で増加していた。ただし、照射後1ヶ月では変化がみられなかった。また別の蛋白質14-3-3は直後と3ヶ月後で減少を示し、12日、1ヶ月、5ヶ月では増加していた。照射直後には変化が見られず時間が経過してからはじめて変化を示す遺伝子も多くみられた。図3にE2F6、14-3-3及びHDAC10蛋白質についての経時変化を示した。

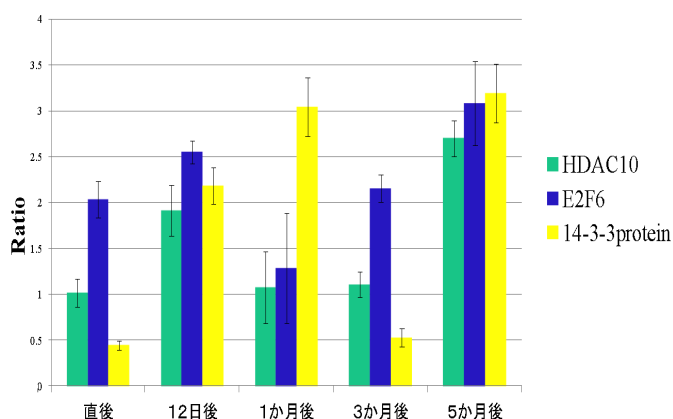


図3. 400日連続照射直後から5ヶ月後までに見られる3種類の蛋白質の発現変化。非照射マウスとの比較。

(2) 低線量率放射線長期照射直後と3ヶ月後、5ヶ月後で変化していた遺伝子から推測される生体機能を調べた結果アポトーシスが3つの時期に共通して示された。特に3ヶ月後では変化を示した18遺伝子中15種類がアポトーシスに関与しているものであった。

(3) 高線量率放射線4Gy照射後3ヶ月の時点でもいくつかの蛋白質に量的な変化がみられたが、それらの中に低線量率放射線長期照射時にみられた蛋白質と同じものはなかった。従って、蛋白質レベルでも高線量率放射線と低線量率放射線の影響は異なるものであることが分かった。

2.4 プロモータ等の解析

低線量率放射線長期照射によって mRNA レベルが変化することの原因を探るため、照射直後に変化を示す遺伝子群に共通な特性がないかについて解析した。具体的には、変化を示す遺伝子と変化を示さない遺伝子の発現制御領域における各種転写因子の結合配列についてその存在頻度に差がないかどうかをコンピュータプログラム TFSEARCH をもちいて検索した。その結果 21種類の転写因子の関与が示唆された[6]。これは放射線の影響の一部が既知の転写因子を介して行われている可能性を示している。他方、変化を示す遺伝子のゲノム内での位置を調べた所、特定の狭い範囲に集中していることはなく、インシュレータなどの関与は否定された。

3. 今後の展望

今回の解析によって、低線量率放射線長期照射による遺伝子発現変化はかなり複雑であることが分かった。当初考えていたシナリオは、長期照射による遺伝子発現変化の大部分は照射終了後の時間経過とともに消失するであろうが、一部分の変化は維持され、それが放射線のエピジェネ

ティックな影響の実体を示すと考えた。しかし、今回の解析の結果分かったことは、想定されていたような長期的に維持される変化は見出せず、照射終了直後に見られる変化のすべてが数時間から1ヶ月の間に消失していた。さらに照射終了後3ヶ月、5ヶ月を経ると、それまでに変化のみられなかった遺伝子の変化が現れてきた(図4)。それらの中には照射終了時に変化を示していたものも含まれるがその数は少ない。

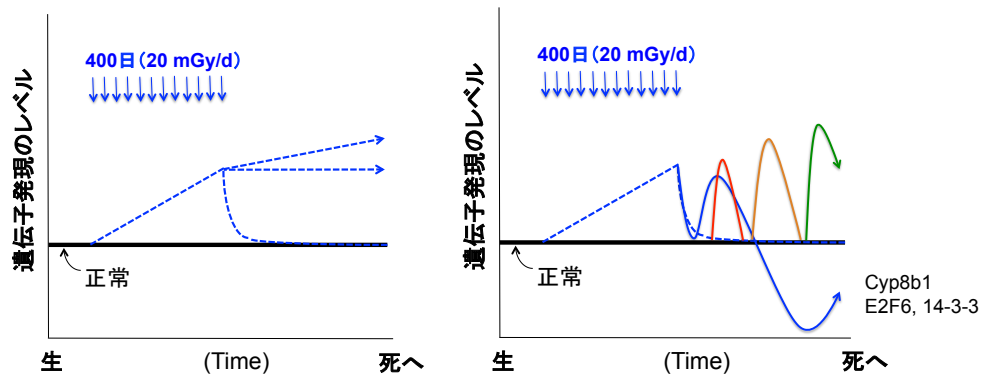


図4. 低線量率放射線長期照射による遺伝子発現変化の模式図。

左は研究開始前に予想していた変化であり照射終了直後に見られる変化の一部が残存すると考えた。遺伝子発現レベルの変化は、増加と減少をまとめて上方への変化として示した。右は今回の研究により分かったことで、照射終了後変化のすべてが収束し、一部が再び変動し始めること、また時間を経ると直後には変化していなかった遺伝子の変化も現れるようになることを示している。

これらの事実は、低線量率放射線長期照射による遺伝子発現への影響がかなり複雑であり、新たな視点から解析する必要性を示している。また、今回 mRNA と蛋白質を同時に解析したが、両方で共通して見られる変化はひとつも見出せなかったことから、低線量率長期照射による遺伝子発現の変化はセントラルドグマ(遺伝子 → mRNA → 蛋白質)を介したものではなく、それぞれの代謝回転速度の変化や修飾反応によると推測される。遺伝子発現の変化は経時的に変遷するものの、それらの遺伝子から示唆される生体機能のなかには一貫して脂質代謝の変化とアポトーシスが含まれていたことは表現形としての影響を理解する上で興味深い。

4. 参考文献

- [1] T. Nakajima, et al. (2008) Journal of Radiation Research, 49: 661-666
- [2] K. Taki, et al. (2009) Journal of Radiation Research, 50: 241-252.
- [3] Y. Uehara, et al. (2010) Radiation Research, 174: 611-617. (Corrections; Radiation Research, 174: 786.)
- [4] X. R. Lowe, et al. (2009) Radiation Research 171: 53-65.
- [5] N. Begum, et al. (2012) Journal of Radiation Research, in press.
- [6] G. Vares, et al. (2011) Journal of Radiation Research, 52:249-256.