

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510070

研究課題名(和文)若年時放射線被曝後のT細胞のp53遺伝子不安定性がもたらす免疫能低下機構の解析

研究課題名(英文)An analysis of the mechanisms of loss of immune system in T cell induced by p53 gene instability after irradiation at a young age

研究代表者

岡崎 龍史 (OKAZAKI, Ryuji)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：50309960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：若年時は放射線感受性が最も高く、被曝時年齢によって老年時でみられる影響が異なると考えられる。今回、p53+/-マウスの脾臓を用いて、8週齢、17週齢、30週齢及び41週齢にて線3Gyを照射し、56週齢におけるNF- κ B関連の炎症系サイトカインの解析を行った。CDK2, p21, phospho (p)-IKK, p-I κ B、p-p65、NF- κ B及びATPは8週齢照射群でのみ増加していた。これらの結果から、若年時に被曝すると老齢期においてNF- κ Bが活性化し、ATPレベルが亢進すると考えられた。NF- κ Bの亢進は炎症の継続であり、がんの誘発にも関係すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Radio-sensitivity is highest during young age, and radiation effects are different at old age depending on the age at the time of exposure.

In this study, we exposed p53+/- mice to a whole-body dose of 3 Gy at 8, 17, 30 and 41 weeks of age, and evaluated NF- κ B and the related genes of the spleen at 56 weeks of age. CDK2, p21, phospho (p)-IKK, p-I κ B, p-p65, NF- κ B and ATP were elevated only in the mice that were given a whole-body dose of 3 Gy at 8 weeks of age. Taken together, irradiation at a young age might elevate NF- κ B and ATP at old age. We suggest that the elevation of NF- κ B means the continuation of inflammation and is related to the induction of cancer.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：若年時放射線被曝 p53 NF- κ B 炎症

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、若年時の放射線被曝によって誘発されるT細胞の *p53* 遺伝子の不安定性によって、T細胞の突然変異率が経時的に増大し、免疫能が低下、さらには発がんに関連するかを検討することにある。*p53* 遺伝子は DNA 損傷細胞の修復とアポトーシスによる排除に関連しているが、若年時放射線被曝の後加齢とともに、このような機能を果たさなくなるため、突然変異率が増加すると思われる。腫瘍免疫の観点から、T細胞の異常は免疫能低下の一因であり、ひいては発がんに関与するのではないかと考えた。そこで今回の研究では、*p53*(+/+)マウス及び *p53*(+/-)マウスを用いて、8週齢にて線 3Gy 照射し、遅延的な突然変異のみられ始めた時期 (*p53*(+/+)マウスでは 60 週齢、*p53*(+/-)マウスでは 40 週齢)の前後において、脾臓における *p53* 遺伝子の存在する 11 番染色体の転座率、*p53* タンパクの発現の動態、*p53* 遺伝子配列あるいはメチル化を解析することにより、照射後の加齢に伴う *p53* 遺伝子自体の不安定性について検討する。また骨髄におけるリンパ球の細胞数および細胞周期、脾臓細胞(特にT細胞)の増殖能およびTregの発現状況、T細胞におけるNF- κ Bの発現等を解析する。さらにTreg発現に関与しているTGF- β やIL-2の発現を解析し、免疫能低下機構について検討する。

2. 研究の目的

若年時は放射線感受性が最も高く、被曝時年齢によって老年時でみられる影響が異なると考えられる。放射線被曝により炎症の継続は、加齢に伴い様々な疾患を誘発すると考えられる。NF- κ Bは炎症に関与するサイトカインである。今回、*p53*+/-マウスの脾臓を用いて、8週齢、17週齢、30週齢及び41週齢にて線 3Gy を照射し、56週齢におけるNF- κ B並びにNF- κ B関連遺伝子を、脾臓を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

p53+/-マウスを用いて、8週齢、17週齢、30週齢及び41週齢にて3Gy (0.82Gy/分)をセルにて照射し、56週齢において屠殺後、脾臓を採取し解析を行った。

CDK2, p21, phospho (p)-IKK, p-I κ B 及び p-p65 のそれぞれタンパクをウエスタンブロット法により解析した。

NF- κ Bの経路に関するIKK, I κ B 及

び p65 のリン酸化を PhosphoTracer NF- κ B pathway activation assays kit にて解析した。

NF- κ B の発現は、Electrophoretic mobility shift assay によって測定した。

IL-6 は ELISA 法にて測定した。

ATP levels は、Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay systemm を用いて測定した。

4. 研究成果

CDK2 と p21 は、8 週齢照射群においてのみ増強していた (Fig 1)。

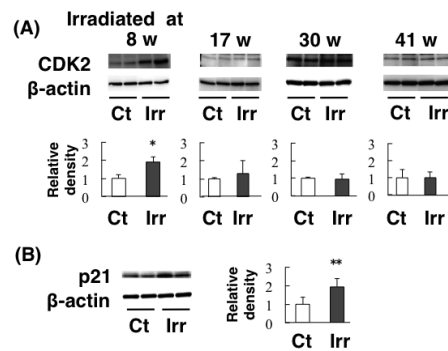


Fig 1. CDK2 and p21 expression greatly increased in old age after irradiation in young age

8 週照射群で、IKK は強くリン酸化され、これは I κ B がリン酸化されたことによる。また p65 のリン酸化もみられている (Fig 2)。

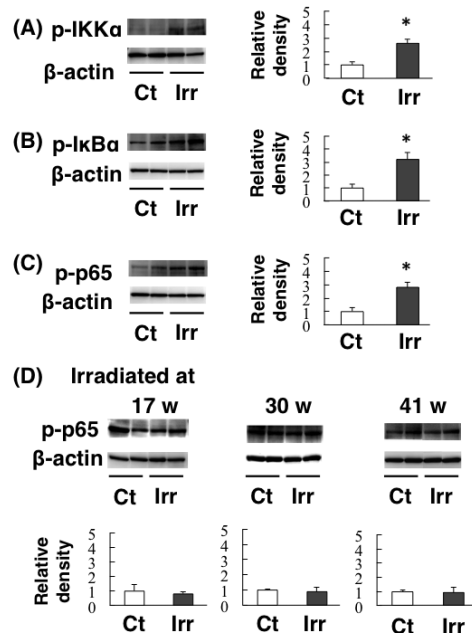


Fig 2. NF- κ B pathway-related molecules were activated in old age after irradiation in young age.

IKK , I B 及び p65 は、8 週齢照射群において増強していた (Fig 3)

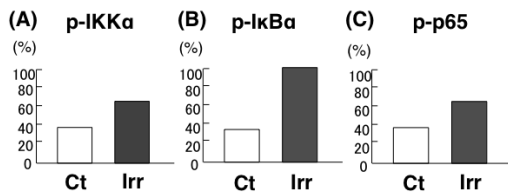


Fig 3. Phosphorylation of NF-κB pathway related molecules in old age was induced after irradiation in young age.

8 週齢照射群では NF- B の亢進がみられたが、41 週齢照射群では対照群レベルであった (Fig 4)。

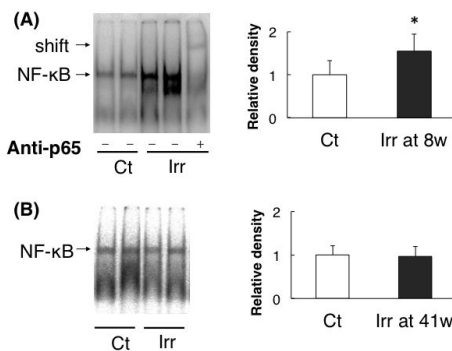


Fig 4. NF-κB active forms were induced in spleenocytes in old age after irradiation in young age.

8 週齢照射群では、IL-6 の発現が有意に増加していた (Fig 5)。

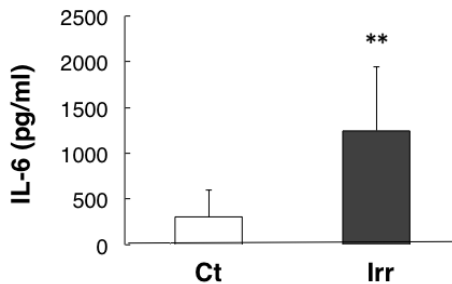
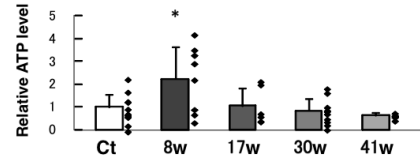


Fig 5. LPS-induced IL-6 production in spleenocytes increased in old age after irradiation in young age.

ATP levels は、メスでは 8 週齢照射群のみ、オスでは 8 週齢照射群と 17 週齢照射群で有意な増加をみた (Fig 6)。

(A) female



(B) male

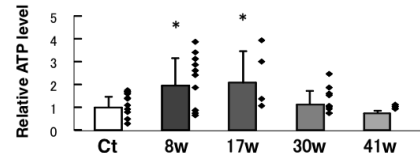


Fig 6. ATP level of splenocytes from irradiated mice was higher than that of splenocytes from non-irradiated mice in old age.

これらの結果から、若年時に被曝すると老齢期において NF- B が活性化し、ATP レベルが亢進すると考えられた。NF- B の亢進は炎症の継続であり、がんの誘発にも関係すると考えられる。NF- B と ATP を検索することは、照射による加齢変化を解析する上で、良い指標となる可能性があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Okazaki R, Ootsuyama A.

The p53 dependent delayed effects of radiation varied at the timing of irradiation in *p53*^{+/-} mice. J Radiat Res (Tokyo), 55(1): 25-31(2014)

[学会発表] (計 3 件)

岡崎龍史、大津山彰、鈴木光浩

低線量放射線照射後のメタボローム解析と血算の変動、第 50 回放射線影響懇話会、2013 年 7 月 27 日、佐賀

Okazaki R, Song Y, Yoshida Y, Kanazawa T, Ootsuyama A.

Irradiation of mice at a young age induces immune modulation of spleen cells in old age. 59th Annual Radiation Research Meeting, 2013 年 9 月 15-18 日、New Orleans, USA

大津山彰、岡崎龍史、猪狩和之

Pig-A 遺伝子をリポーターとして用いた in vitro 突然変異検出試験の高線量被曝環境作業者の健康影響評価応用への検討、第 31 回産業医科大学学会総会、

2013年10月26日、北九州

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 龍史 (OKAZAKI Ryuji)
産業医科大学・産業生態科学研究所・教授
研究者番号：50309960

(2) 研究分担者

大津山 彰 (OOTSUYAMA Akira)
産業医科大学・医学部・教育教授
研究者番号：10194218

吉田 安宏 (YOSHIDA Yasuhiro)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10309958

(3) 連携研究者

()

研究者番号：