

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510062

研究課題名(和文)放射線照射によって概日リズム関連遺伝子発現が変化するメカニズムの解明

研究課題名(英文)Expression analysis of circadian genes in mouse liver exposed to ionizing radiation

研究代表者

上原 芳彦(Uehara, Yoshihiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30223499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射により概日リズムが変化することも報告されているがその詳しいメカニズムについては分かっていない。本研究では、マウス肝臓における網羅的な発現解析により概日的に発現が変動する遺伝子の中から放射線照射によってその発現が変動するものを見出した。しかし、それらの中から放射線照射によって概日的な発現が変化することに主要な役割を果たしている遺伝子は見つけられなかった。

研究成果の概要(英文)：Although it is reported that radiation exposure induces the phase shift of circadian rhythm, the mechanism responsible for it is not understood. In this research, we found several circadian genes in which the phase of expression was shifted in the mouse liver using microarray analysis. However, we could not find any essential genes that plays in phase shifting of expression by irradiation in the mouse liver.

研究分野：放射線生物学

キーワード：概日リズム 遺伝子発現 放射線

1. 研究開始当初の背景

電離放射線は癌の誘発、寿命短縮などさまざまな障害を引き起こすことが分かっているが、そのメカニズムとしてこれまでは主に遺伝子の突然変異により説明されてきたが、近年 epigenetic な変化による遺伝子発現の変化の重要性も明らかになりつつある。我々は、放射線作業従事者の許容線量 (20mGy/年) 宇宙ステーションでの被ばくレベル (数 100mGy/年) 程度の低線量率放射線を長期照射 (約 400 日) したマウス肝臓での遺伝子発現変化についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、低線量率放射線によって発現が変動する遺伝子を見出した (Radiat. Res., 174, 611 (2010))。それらの遺伝子の発現変化からどのような生物学的な影響が推測されるかについて調査した結果、それらの遺伝子のほとんどがマウス肝臓において概日リズムで発現が変化する遺伝子群 (J. Biol. Chem., 278, 41519 (2003)) に含まれていることが判明した。生物は 24 時間周期の概日時計を持っており、マウス、ヒトなどの脊椎動物では、概日リズムは睡眠・覚醒や体温、血圧などを制御しており、その周期の乱れは肥満、発癌やホルモン・代謝異常などの疾患に関与していることが明らかになってきている (Science, 330, 134 (2010), Nat. Rev. Endocrinol., 7, 98 (2011))。放射線による損傷修復にも概日リズム遺伝子が関与していることが考えられているが、放射線が概日リズムおよびその関連遺伝子の発現に関するメカニズムの全体像はまだ全く分かっていない。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではまずマウス肝臓において概日的に発現が変動する遺伝子群の中で放射線照射によりその発現リズムが変化する遺伝子を網羅的解析により明らかにすることを第一の目的とした。我々はこれまでに低線量率放射線長期照射によってその発現が変動する遺伝子を見出したがその数は少なく、放射線照射が概日リズム遺伝子発現におよぼす影響の全体像を明確にとらえるためには不十分と考え、高線量の放射線 (4Gy) を照射してマイクロアレイ解析により発現リズムが変化する遺伝子を選別する。

次に、放射線照射による概日リズム発現の変動を制御している可能性のある遺伝子の発現レベルを下げることにより、概日リズムの中心的制御遺伝子の発現リズムが放射線照射により変化しないかどうかについて培養細胞を用いて明らかにすることで放射線が概日リズムおよびその関連遺伝子の発現に関するメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

マウス肝臓において概日的に発現が変動

する遺伝子、及びその概日発現遺伝子群の中で放射線照射によりその発現リズムが変化する遺伝子をマイクロアレイ解析によるスクリーニングによって見つけ出す。具体的には、概日的に発現している遺伝子を選出するために概日リズムを安定させる 12 時間明期 12 時間暗期の環境でマウスを 2 週間飼育した後、最初の明期が始まって 6 時間後 (概日 6 時:午後 1 時) に 4Gy の X 線を照射した。放射線の効果が光刺激により同調し失われるのを防ぐために、照射後 6 時間 (概日 12 時:午後 7 時) から継続的な暗期状態で 48 時間飼育し、照射後 3 日目の概日 0 時、6 時、12 時にマウスから肝臓を摘出した。肝臓から RNA を抽出し、マイクロアレイによる概日時間経時的な発現解析を行い、放射線照射によりその概日発現リズムが変化する遺伝子を選別した。

次に、それらの遺伝子の中からその発現変動を制御している可能性のある候補遺伝子を機能アノテーション解析による絞り込みから選択し、その遺伝子の発現レベルを下げることにより、概日リズムの基本的制御遺伝子の発現リズムが放射線照射により変化しないかどうかについて培養細胞を用いて調査した。具体的には、概日リズムの基本的制御遺伝子である Per プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして連結し、その発現パターンを生細胞測定用リアルタイムルミノメータによって測定した。上記の選択したいくつかの候補遺伝子の siRNA を一過的に培養細胞内で発現させて、Per プロモーターの発現周期が変化しないかどうかを調べた。

4. 研究成果

本研究では、網羅的な発現解析により、マウス肝臓において概日的に発現が変動する約 1600 個の遺伝子の中から放射線照射によりその発現パターンが変動する 32 個の遺伝子を選別した (表 1)。

次に、これらの遺伝子の機能アノテーション解析を行って候補遺伝子の絞り込みを行い、さらに siRNA によるそれら候補遺伝子の発現低下が培養細胞における基本的な概日リズム制御遺伝子プロモーターの発現周期に影響を及ぼすかどうかについて調べた。しかしながら、調べた範囲の遺伝子の中ではそのプロモーターの発現周期パターンを変化させる遺伝子の存在は確認できなかった。

これにより、「肝臓において放射線照射によって変化する概日リズム遺伝子の発現は自律的に制御されており、またその制御遺伝子も概日的に発現している」という仮説は間違いである可能性が高いという結論となった。

表 1 . マウス肝臓内で概日的な発現を示す遺伝子の中で放射線照射によってそのパターンが変化する遺伝子

Probe Name	Gene Symbol	Public ID
1417025_at	H2-Eb1	NM_010382
1417828_at	Aqp8	NM_007474
1418028_at	Dct	NM_010024
1418918_at	Igfbp1	NM_008341
1419394_s_at	S100a8	NM_013650
1419748_at	Abcd2	NM_011994
1422155_at	Hist2h3c2	BC015270
1422997_s_at	Acot2/Acot1	NM_134188
1424140_at	Gale	BC027438
1425645_s_at	Cyp2b10	AF128849
1427638_at	Zbtb16	Z47205
1437667_a_at	Bach2	AW553304
1448950_at	Il1r1	NM_008362
1454838_s_at	Pkdcc	BB323985
1429351_at	Klhl24	AK018314
1429639_at	Prei4	AK009137
1434520_at	Sc5d	AU067703
1435452_at	Tmem20	BM121082
1442051_at	Hist1h	BE691662
1442351_a_at	BC029214	BB313029
1443147_at	—	BB505010
1447936_at	—	AA939619
1448092_x_at	Serpina4-ps1	AA267743
1416840_at	Mid1ip1	NM_026524
1423797_at	Aacs	BC026817
1423828_at	Fasn	AF127033
1448185_at	Herpud1	NM_022331
1448698_at	Ccnd1	NM_007631
1452417_x_at	Igk	AV057155
1456319_at	—	BG065719
1439617_s_at	Pck1	AI265463
1443889_at	9030619P08Rik	AI789751

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4件)

1 . Y. Uehara, M. Inoue, K. Fukuda, H. Yamakoshi, Y. Hosoi, H. Kanda, M. Oshima, Y. Iwabuchi, H. Shibata, Inhibition of β -catenin and STAT3 with a curcumin analog suppresses gastric carcinogenesis in vivo. (2015) *Gastric Cancer*, **18**: 774-778. (査読有)

2 . Y. Murata, Y. Uehara, Y. Hosoi, Activation of mTORC1 under nutrient

starvation conditions increases cellular radiosensitivity in human liver cancer cell lines, HepG2 and HuH6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015) **468**: 684-690. (査読有)

3 . Wang B, Tanaka K, Ji B, Ono M, Fang Y, Ninomiya Y, Maruyama K, Izumi-Nakajima N, Begum N, Higuchi M, Fujimori A, Uehara Y, Nakajima T, Suhara T, Neno M, Low-dose total-body carbon-ion irradiations induce early transcriptional alteration without late Alzheimer's disease-like pathogenesis and memory impairment in mice. *J. Neurosci. Res.*, (2014) **92**: 915-926. (査読有)

4 . Wang B, Tanaka K, Ji B, Ono M, Fang Y, Ninomiya Y, Maruyama K, Izumi-Nakajima N, Begum N, Higuchi M, Fujimori A, Uehara Y, Nakajima T, Suhara T, Ono T, Neno M, Total body 100-mGy X-irradiation does not induce Alzheimer's disease-like pathogenesis or memory impairment in mice. *J. Radiat. Res.* (2014) **55**: 84-96. (査読有)

[学会発表](計5件)

1 . Y. Uehara, Y. Murata, Y. Hosoi, Synergistic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ionizing radiation on ICAM-1 expression in HUVECs., 15th International Congress of Radiation Research, 2015年5月25日, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

2 . Y. Murata, Y. Uehara, Y. Hosoi, Effects of nutrient starvation condition on radiosensitivity of culture cells., 15th International Congress of Radiation Research, 2015年5月25日, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

3 . 上原芳彦, 村田泰彦, 細井義夫 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は放射線と相乗的に作用してヒト血管内皮細胞における ICAM-1 の発現を亢進させる 日本放射線影響学会第57回大会 2014年10月2日 鹿児島県民交流センター (鹿児島)

4 . 上原芳彦, 王冰, 中島徹夫, 根井充, 中村慎吾, 田中聡, 一戸一晃, 田中公夫, 松本恒弥, 小木曾洋一, 小野哲也, 細井義夫 低線量率長期照射によるマウス肝臓での遺伝子発現変化の経時的解析 日本放射線腫瘍学会生物部会第51回学術大会, 2013年7月5日 東北大学(仙台)

5 . 上原芳彦, 王冰, 中島徹夫, 根井充, 小野哲也, Kinetic analysis of gene expression profiles in mouse liver after long-term low-dose-rate irradiation. 日本放射線影響学会第55回大会

2012年9月7日 東北大学(仙台)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 芳彦 (UEHARA YOSHIHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30223499

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：