

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：81103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12330

研究課題名(和文) 低線量率放射線照射によるROS産生とインスリン抵抗性惹起機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of ROS production and induction of insulin resistance by low-dose-rate gamma ray irradiation

研究代表者

杉原 崇 (Sugihara, Takashi)

公益財団法人環境科学技術研究所・生物影響研究部・主任研究員

研究者番号：50715472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：B6C3F1メスマウスに低線量率放射線を照射すると高率で脂肪肝を発症するが、これには照射によるROS産生とこれに伴うインスリン抵抗性(IR)の惹起等の代謝変化が関係していると仮説を立てた。本研究では、3T3-L1細胞が脂肪細胞に分化する系を用い解析を行った。照射された細胞では、ROS産生に関わる遺伝子及び脂肪細胞分化に関与する遺伝子の両者が発現増加した。このうち、脂肪細胞分化に関与する遺伝子発現はDNAメチル化により制御されていた。また、別系統マウス(C3H)においても、照射によりIRが惹起されることが確認できたため、本研究で着目した事象は系統差によらないメスマウスで一般的な事象と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

福島第一原子力発電所事故などにより大きな関心が寄せられている低線量率放射線長期被ばくの健康影響を明らかにするためには、高線量率放射線の影響の研究のみでは不十分である。近年、低線量率放射線がとりわけ代謝に対して特徴的な影響を与える可能性が、国外の他の研究グループによっても指摘されるようになってきていることは、本研究の学術的、社会的な意義を浮き彫りにしていると考えている。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the high rate of fatty liver development in B6C3F1 female mice irradiated with low dose-rate radiation is related to the metabolic changes induced by irradiation, such as the production of ROS and the consequent induction of insulin resistance (IR). In this study, we analyzed 3T3-L1 fibroblasts differentiated into adipocytes as a model. In irradiated 3T3-L1 cells, the expression of both genes involved in ROS production and adipocyte differentiation was increased. Of these, gene expression involved in adipocyte differentiation was regulated by DNA methylation. Since IR was also induced by low-dose-rate irradiation in another strain of mice (C3H), we consider that the phenomenon observed in this study is general in female mice, independent of strain differences.

研究分野：放射線生物学

キーワード：低線量率放射線 インスリン抵抗性 3T3-L1細胞 脂肪細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高線量率放射線の単回照射により引き起こされる生体影響の研究は、放射線治療などのリスクに関する研究には有用であるものの、低線量率の長期間被ばくによる健康影響リスク推定には単純には応用できない。言い換えると、近年、福島第一原子力発電所事故などにより大きな関心が寄せられている継続的な低線量率放射線長期被曝の健康影響を理解するためには、これまでの高線量率放射線影響研究では不十分である。

線量率が低い場合の生物影響の研究として、環境科学技術研究所での B6C3F1 マウスを用いた長年にわたる研究が挙げられる。これまでに得られた低線量率放射線影響に関する知見の一つとして、21 mGy/22 時間/日の低線量率線を 400 日間連続で照射したメスマウスは肥満し、脂肪肝頻度の増加がみられた。

(1) 照射メスマウスにおける脂肪肝の発生を理解するためには、照射により細胞が脂肪を蓄積するようになる分子機構の理解が重要であると考えられる。そこで、本研究ではモデルとしてマウス線維芽細胞株 3T3-L1 (脂肪細胞に容易に分化する) を用いることとし、低線量率放射線照射が脂肪細胞への分化に影響を及ぼすのではないかと考え実験を計画した。

(2) 一方、マウス個体に関して観察すると、脂肪肝を持つマウスは肥満しており、インスリン抵抗性である可能性が推測された。そこで、照射マウスのインスリン抵抗性に関して解析を行い、このことを確認することとした。これは、B6 系統由来の遺伝子の影響を受けていると想定されており、他系統ではこのような現象が起きない可能性が想定されていた。そこで、本研究では、低線量率放射線を照射した C3H 系統マウスの解析も計画した。

2. 研究の目的

(1) 分化刺激を与えた 3T3-L1 細胞に低線量率放射線を照射し、脂肪細胞への分化にどのような影響を与えるかについての知見を得ることを目指した。これまでのマウス実験の結果から、低線量率放射線照射により、細胞レベルでインスリン抵抗性の誘導が引き起こされるのではないかと考えた。インスリン抵抗性の研究には、しばしば 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化の系が用いられており、本課題でも 3T3-L1 細胞に放射線を照射した際の分子応答を検討した。予想では、細胞レベルでも、低線量率放射線照射により脂肪細胞への分化が促進される方向への変化が引き起こされるのではないかと考えた。

(2) 今回、低線量率照射が個体レベルでマウスのインスリン抵抗性を引き起こす可能性があると考え、インスリン抵抗性試験を行った。B6C3F1 マウスに 400 日間低線量率照射を行い、試験前日より絶食を行い、インスリン抵抗試験を行った。一方、これまで、B6 系統とは異なりあまり肥満に関する知見がないとされる C3H 系統メスマウスを用いて、照射時のインスリン抵抗性についても解析し、系統差についても明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 3T3-L1 細胞に分化試薬を投与し、低線量率 (20 mGy/day) で 2 日間 (総線量: 40 mGy) 照射し、その変化を解析した。解析方法としては、リアルタイム PCR 及びマイクロアレイ法による遺伝子発現解析、NGS による DNA メチル化解析を実施した。DNA のメチル化の機能的な寄与を明らかにするため、分化試薬投与、照射開始と同時に培地に DNA メチル化阻害剤 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza) を加える実験も行った。DNA は照射開始後 2 日目にサンプリングし、RRBS

(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)法を用いてゲノムワイドに各 CpG 部位のメチル化率を決定した。分化試薬を添加しなかった細胞 1 サンプル、分化試薬を添加後、非照射条件のコントロール細胞を 2 サンプル、分化試薬を添加後、2 日間照射した細胞を 2 サンプルで解析を行った。RRBS 法による解析は費用の問題から、少ない n 数での実験となった。

一方、細胞形態観察及び発現解析用の RNA 採材に関しては分化誘導(2 日間)終了後から 7 日目に実施した。発現解析は、6 ウエルプレートの 3 ウエルを 1 群として、非照射群:5-Aza-, 非照射群:5-Aza+, 非照射群:5-Aza-, 非照射群:5-Aza+を比較する実験を行った。細胞照射実験のスケジュールをまとめると図 1 のようになる。

(2) 低線量率放射線照射によるインスリン抵抗性の惹起に関する系統差を検討するため、低線量率放射線照射によって体重増加しないとされている C3H/HeN マウスのインスリン抵抗性を確認する実験を行った。具体的には、C3H/HeN メスマウスを用いて、100 日おきに体重測定を行い、その後、試験前日から絶食を行いインスリン抵抗性試験を実施した。56 日齢から 456 日齢まで 400 日間低線量率照射を行い、この期間に 4 回、インスリン抵抗性試験を行った。そのスケジュールは図 2 に示す。

4. 研究成果

(1)細胞の形態変化

3T3-L1 の分化誘導時に低線量率放射線を照射した場合、照射群では非照射群に比べ脂肪滴形成の促進が確認された。これまでの研究により、3T3-L1 細胞の脂肪滴形成は細胞分化に伴う DNA メチル化変化と関係していることがメチル化阻害剤(5-Aza)添加実験により明らかにされているため、照射時にメチル化阻害剤(5-Aza)を添加した場合の脂肪滴形成を検討した。その結果、照射による脂肪滴形成が、メチル化阻害剤(5-Aza)添加により減少した。これは、照射が DNA メチル化の増加を引き起こし、一方、5-Aza 添加がこれを抑制したことの結果として理解できると考えている。

(2)遺伝子発現変化

低線量率放射線照射による脂肪滴形成の増加が確認されたため、細胞分化終了後 7 日目に RNA を抽出し、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化時に重要なマスター転写因子として働く *C/EBP* :*Cebpa*, *PPAR* :*Pparg*, 及びその下流で脂肪滴形成に重要な働きをする *Glut4*, *Adiponectin* の遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で確認した。その結果、これらの遺伝子の発現は全て照射群で増加していることを確認できた。また、これらの遺伝子発現増加はメチル化阻害剤(5-Aza)を添加した時に照射群で見られなくなった。この結果については、照射が DNA メチル化を引き起こし、脂肪細胞への分化を促進する遺伝子の発現を誘導していることを示唆している可能性を示すもの考えられる。マイクロアレイ解析の結果、ROS 産生に関わる遺伝子 *Bbc3(Puma)* 遺伝子の発現が低線量率照射群で増加していた。一方、メチル化阻害剤(5-Aza)を添加して照射した時でも *Bbc3* 遺伝子の発現が増加していたことから、この遺伝子の場合、DNA メチル化は制御に関与していないのかもしれない。

(3) DNA のメチル化解析

照射による脂肪細胞への分化は DNA メチル化を介して引き起こされている可能性が考えられたため、分化処理と照射を開始してから 2 日目の DNA メチル化を解析した。バイサルファイトシケンス法と NGS 解析の組み合わせにより DNA メチル化を明らかにする RRBS 法により、照射によって発現が変化していた *C/EBP* :*Cebpa*, *PPAR* :*Pparg* 遺伝子の転写領域の DNA メチル化率を解析した。その結果、*C/EBP* :*Cebpa* の Transcription Start Site(TSS)の近傍の上流域で照

射によってメチル化率が減少する領域が検出された。一方、*PPAR : Pparg* では大きく変化する領域は見られなかった。この結果は、照射による DNA メチル化率の変化が、細胞分化に部分的に関与していることを示すものかもしれない。ただし、今後、解析サンプル数や遺伝子数を増やして検討することが必要であると考えられる。

(4) 照射した C3H 系統メスマウスのインスリン抵抗性に関して

B6C3F1 メスマウスは、20 mGy/日の照射によって肥満し、また顕著なインスリン抵抗性の惹起が観察される。しかしながら、これは B6 系統の遺伝子を持つマウスにのみ起こる現象で、他の系統のマウスでは見られないと考えられていた。そこで、他系統のマウス (C3H/HeN) のインスリン抵抗性を調べることにした。予想と反して、C3H/HeN メスマウスでも 356 日齢から低線量率放射線によって有意に体重が増加していた。この結果は、これまで B6 あるいは B6C3F1 系統のみで起こると考えられていた低線量率放射線照射によるマウスの肥満が、C3H/HeN 系統でも起きていることを示す。また、同様にインスリン抵抗性についても 456 日齢で有意にインスリン抵抗性であることが示された。この現象は、必ずしもマウスの系統に依存するものではないと考えられる。

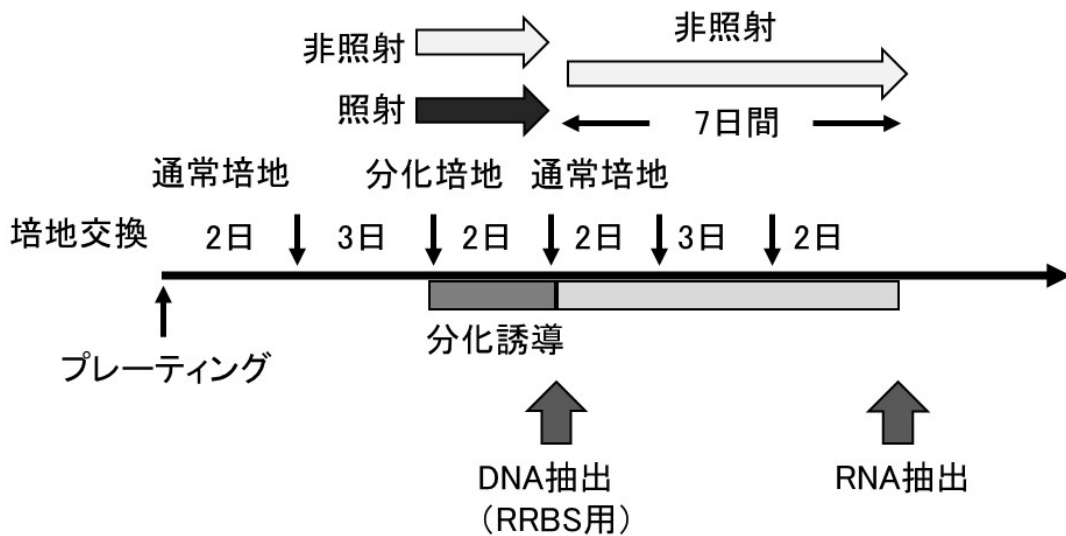


図 1：細胞分化実験の培養スケジュール

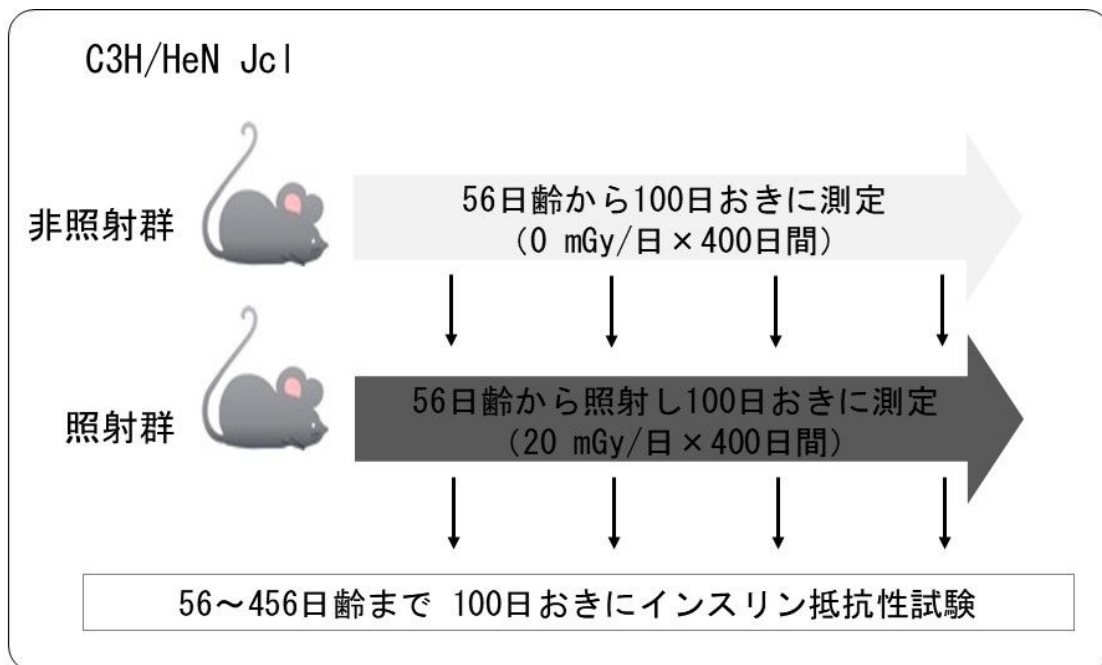


図2：インスリン抵抗性試験の実施スケジュール

<引用文献>

Braga-Tanaka, I. et al. "Experimental studies on the biological effects of chronic low dose-rate radiation exposure in mice: Overview of the Studies at the Institute for Environmental Sciences." *International Journal of Radiation Biology*, 94(5), 423-433, 2018

Nakamura, S. et al. "Adiposity in female B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate γ rays." *Radiation Research*, 173(3), 333-341, 2010

Rossi, A. et al. "In Vitro characterization of the effects of chronic insulin stimulation in mouse 3T3-L1 and human Sgbs adipocytes." *Adipocyte*, 9(1), 415-426, 2020

Meissner, A. "Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis." *Nucleic Acids Research*, 33(18), 2005, 5868-5877, 2005

Yii-Shyuan, C. et al. "Inhibiting DNA Methylation Switches Adipogenesis to Osteoblastogenesis by Activating WNT10A." *Scientific Reports*, 6(1), 2016

Fan, S. et al. "P53 activation plays a crucial role in Silibinin induced ROS generation via Puma and JNK." *Free Radical Research*, 46(3), 310-319, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉原崇、村野隼人、村野正子、小村潤一郎
2. 発表標題 Low dose-rate irradiation of pre-adipocyte cells in culture promotes their differentiation into adipocyte-like cells
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------