

令和元年6月17日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19779

研究課題名(和文)急性被ばく腸管死を推定できる血液・糞便中microRNAバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for blood and fecal microRNA biomarkers that can estimate acute exposure to intestinal death

研究代表者

千葉 満 (Chiba, Mitsuru)

弘前大学・保健学研究科・講師

研究者番号：20583735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：高線量放射線被ばくは生命を脅かす重篤な腸管損傷を引き起こす。本研究では細胞から放出される細胞外microRNAに着目し、放射線誘発腸管損傷モデルマウスを使用して血清と糞便中で増加するmicroRNA種を明らかにし、腸管損傷の程度を評価できる新たなバイオマーカー候補の探索を試みた。腸管損傷マウスの血清と糞便のmicroRNAマイクロアレイを実施したところ、10 Gy照射群において2倍以上発現増加するmicroRNAは血清で21種類、糞便で119種類検出された。これらのうち、miR-375-3pは10 Gy曝露後の血清と糞便中で共に増加しており、腸管損傷バイオマーカー候補となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

被ばくによる死因が腸管損傷であるかどうかは、死後の病理組織学的診断にゆだねられており、存命中に腸管損傷の程度を客観的に評価することは困難となっている。本研究結果は血液や糞便といった採取上患者への負担の少ない生体検体を使用して、これまで不可能であった腸管損傷の程度の判断を行うものである。このようなアイデアはこれまでの放射線生物学分野にないもので、従来の生物学的被ばく線量評価法の方向性を変える非常に斬新な着想であるといえる。また、腸管損傷を予防・軽減するための放射線防護剤の効果を判断する評価指標にも利用できる可能性があり、本研究構想の実現は被ばく腸管損傷の診断や治療上に大きな意義を持っている。

研究成果の概要(英文)：Exposure to high-dose radiation causes life-threatening serious intestinal damage. Here we focused on extracellular microRNA released from cells and investigated microRNA species that increased or decreased in serum and feces using a radiation-induced intestinal injury mouse model. MiRNAs increased more than 2.0-fold in serum or feces following a 10 Gy radiation exposure were 21 in serum and 119 in feces by microarray analysis. In this study, miR-375-3p detected in serum and feces was identified as the strongest candidate for a high-dose radiation biomarker in serum and/or feces using a radiation-induced intestinal injury model.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：放射線被ばく 腸管障害 microRNA 血清 糞便 バイオマーカー 腸管損傷 腸管死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線被ばくによる症状と腸管障害

高線量放射線被ばくによって発症する急性放射線症候群 (ARS) は生命を脅かす危険性があり、その対応医療には迅速なトリアージ (識別救急) が必要となる。ARS の症状は、被ばく線量、個人差、生物種差によって異なるが、一般的にヒトの場合 0.2 Gy で白血球減少が見られ、1~10 Gy で骨髄死、10 Gy 以上で腸管死を引き起こす。骨髄死の場合、骨髄移植や造血因子・サイトカイン療法によって救命可能である [Hirouchi and Chiba *et al.* *Curr Pharm.* 2015. (PMID:26306743)]。しかし腸管死の場合、腸管上皮幹細胞が死滅してしまい、新たな腸管上皮細胞が供給されず現時点で救命は不可能である。

日本では、1999 年に茨城県東海村に所在する核燃料加工施設 JCO が起こした原子力臨界事故によって、作業員に重度な ARS 患者が 3 人発生した。このうち 2 名が 10 Gy 程度被ばくしたことが計算上推定されており、2 名とも腸管死により救命ができなかった。この事故により、被ばくによる腸管障害の新たな診断法や治療法の確立が強く求められるようになった。

(2) これまでの被ばく検査法の問題点

現在、放射線被ばくの生物学的被ばく線量評価は国際標準法である末梢血リンパ球の染色体異常検査によって行われている。しかしこの方法では腸管、特に腸管上皮幹細胞に直接どれほどの被ばくを受けたかの評価は全くできない。また、存命中の腸管組織生検による病理学的診断も現実的ではない。したがって、今後の予後を決定付ける致死的な腸管障害に至っているかを客観的に判断できる生物学的被ばく線量評価ツールの開発が必要不可欠である。

(3) 細胞外 microRNA について

microRNA は複数のタンパク質発現を制御する小分子リボ核酸である。近年、この microRNA が細胞外へ放出されていることが明らかになった。細胞外 microRNA は、エクソソームやアポトーシス小体などの細胞外小胞内や、RNA 結合タンパク質と結合して血液などの体液中に安定的に存在している [Chiba *et al.* *Oncol Rep.* 2015. (PMID:25394686)]。このような体液中の細胞外 microRNA が癌や神経変性疾患などの疾患診断バイオマーカーとなり得ることが近年報告されている [Melo *et al.* *Nature.* 2015. (PMID:26106858)]。

2. 研究の目的

本研究では、放射線による腸管損傷の程度を的確に判断できる血液・糞便中 microRNA バイオマーカーの発見を目指す目的で実施した。

3. 研究の方法

(1) マウスへの放射線照射

8 週齢の C57BL/6NJcl 雄マウス (日本クレア) に X 線発生装置 (MBR-1520R-3、日立) を用いて、管電圧 150 kVp、管電流 20 mA、線量率 1.0 Gy/min (遮蔽板: Al 0.5 mm + Cu 0.3 mm) で X 線の照射を行った。本研究は弘前大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 G12003)。

(2) 体重測定と生存解析

X 線 7 Gy および 10 Gy 照射後のマウスを用いて体重測定と Kaplan-Meier 法による生存解析を行った。

(3) 血清・糞便・小腸回収

非照射群と X 線照射 (7 Gy および 10 Gy) 群のマウス心臓から採血を行った。血液は凝固後に遠心し、血清を回収した。糞便は排泄直後に回収した。小腸は安楽死させたマウスから摘出した。

(4) 病理学的解析

マウスより回収した小腸を 4%パラホルムアルデヒド溶液で一晩浸透させ、パラフィン包埋ブロックを作成した。組織切片は HE 染色と TUNEL 染色に使用した。

(5) 蛍光 TUNEL 染色

X 線 7 Gy および 10 Gy 照射によって腸管上皮細胞に DNA 損傷が起こっているかを確認するため DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System(Promega)を用いて蛍光 TUNEL 染色を行った。

(6) 血清・糞便・小腸からの RNA 抽出とバイオアナライザ解析

血清、糞便、小腸から ISOGEN (ニッポン・ジーン)を使用して total RNA を抽出した。Agilent 2100Bioanalyzer と Agilent RNA 6000 Nano Assay(共に Agilent Technologies)を用いて 7 Gy および 10 Gy 照射マウスの血清、糞便、小腸の total RNA のバイオアナライザ解析を行った。

(7) miRNA マイクロアレイ解析

血清、糞便、小腸における microRNA 発現変化と X 線曝露への影響を調べるために、miRNA Complete Labeling and Hyb Kit(Aglient Technologies)を用いて miRNA マイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 50%生存期間は 7 Gy 照射で約 13 日、10 Gy 照射で約 9 日であった

高線量被ばくによる体重と生存期間変化の確認を行った。その結果、X 線 7 Gy および 10 Gy 照射数日後から体重の減少が見られた。生存解析を行ったところ 50%生存期間は 7 Gy 照射で約 13 日、10 Gy 照射群で約 9 日であった。

(2) X 線 7 Gy および 10 Gy 照射によって小腸の組織損傷が見られた

X 線 7 Gy および 10 Gy 照射による小腸組織の損傷を確認するため HE 染色にて組織像の観察を行った。その結果、非照射と比較して 7 Gy および 10 Gy 照射の小腸組織像では腸管上皮の組織損傷が確認された。

(3) 7 Gy および 10 Gy 照射によって小腸上皮細胞に DNA 損傷が見られた

7 Gy および 10 Gy 照射による小腸上皮細胞の DNA 損傷を確認するため、蛍光 TUNEL 染色を行った。その結果、7 Gy および 10 Gy 照射 72 時間後では TUNEL 陽性を示す緑色蛍光部位が増加し、特に小腸上皮幹細胞が多く存在すると予想される小腸小窩部位に多くの陽性像が認められた (図 1)。このことは X 線 7 Gy および 10 Gy 照射ではマウス腸管で細胞死が誘導されることを示唆した。

(4) 血清や糞便中には多くの small RNA が含まれていた

血清、糞便、小腸の RNA のクオリティーを確認するため、バイオアナライザ解析を行った。その結果、小腸組織では 18S と 28S のリボソーム RNA のピークが検出された。一方、血清と糞便には 18S と 28S のリボソーム RNA のピークは検出されず、25~200 ヌクレオチドの small RNA のピークが検出された (図 2)。また、飲水や動物試料中には RNA はほとんど検出されなかった。このことは血清や糞便中には多くの small RNA が含まれることを示唆した。

(5) 10 Gy 照射により発現変化する血清・糞便中 microRNA の同定

10 Gy 照射により発現変化する血清・糞便中 microRNA を調べるために microRNA マイクロ

アレイ解析を行った。その結果、非照射群と比較して 10 Gy 照射群において 2 倍以上発現が上昇した microRNA は血清では 21 種類、糞便では 119 種類検出された。またこれらの microRNA のうち小腸でも発現が認められる microRNA は血清で 4 種類、糞便で 19 種類検出された。これらの microRNA のうち、miR-375-3p は血清と糞便で共通に検出された。miR-375-3p の由来臓器を調べたところ miR-375-3p は膵臓に最も発現が高く、小腸や大腸も高発現であった。それゆえ 10 Gy 被ばく後に血清と糞便で増加する miR-375-3p には腸管由来のものが含まれることが示唆された。また、miR-375-3p は血清中のエクソソームのような細胞外小胞に内在することが明らかになった。10 Gy 被ばく後に血清と糞便で増加する microRNA のパスウェイ解析を実施したところ、細胞増殖、炎症反応、細胞接着能に関するパスウェイへの影響が予測され、腸管障害を推察できるものであった。これらの研究成果は現在論文 2 報を投稿中である。腸管損傷を推察できる microRNA を迅速に検出するための最適条件や検出方法は現在検討中であり、引き続き解析していく予定である。

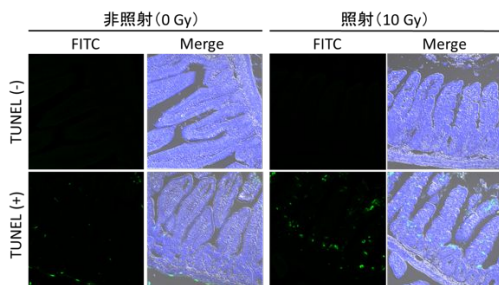


図 1 . 蛍光 TUNEL 染色

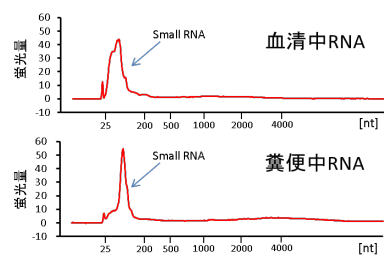


図 2 . 血清・糞便中 RNA のバイオアナライザ解析

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Mitsuru Chiba, Ikumi Niiyama, Haruka Uehara, Haruka Kuwata, Injured pancreatic cells enhance the release of miR-375-3p into the extracellular space, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 査読有、17 巻、2019、2815-2820
DOI: 10.3892/etm.2019.7276
2. Satoru Monzen, Mitsuru Chiba, Yasushi Mariya, Malondialdehyde: a urinary toxic biomarker for unexpected exposure to high-dose ionizing radiation, *Rinsho Byori*, 査読有、67 巻、2019、212-215
3. Mitsuru Chiba, Satoru Monzen, Chihiro Iwaya, Yuri Kashiwagi, Sunao Yamada, Yoichiro Hosokawa, Yasushi Mariya, Toshiya Nakamura, Andrzej Wojcik, Serum miR-375-3p increase in mice exposed to a high dose of ionizing radiation, *Scientific Reports*, 査読有、8 巻、2018、1302
DOI: 10.1038/s41598-018-19763-7
4. Satoru Monzen, Mitsuru Chiba, Tatsuya Ueno, Yuki Morino, Kenji Terada, Hiroki Yamaya, Yoichiro Hosokawa, A radioresistant fraction of acute promyelocytic leukemia cells exhibit CD38 cell-surface antigen and mRNA expression, *Oncology Letters*, 査読有、15 巻、2018、6709-6714
DOI: 10.3892/ol.2018.8099
5. 千葉 満, 門前 暁, 血液検体による放射線応答性マイクロ RNA の探索, *Cytometry Research*, 査読有、28 巻、2018、1-6
DOI: 10.18947/cytometryresearch.28.1_1
6. 千葉 満, 疾患バイオマーカーとしての体液中マイクロ RNA の探索研究, *臨床化学*, 査読

無、47 巻、2018、155-160

7. 千葉 満、久保田 栞、門前 暁、細胞外小胞の細胞内への取り込み機構、細胞、査読無、50 巻、2018、267-270
<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021598015>
8. 上野 達也、門前 暁、千葉 満、森野 友貴、細川 洋一郎、がん放射線療法における線量最適化のためのバイオマーカー探索、日本放射線技術学雑誌、査読有、74 巻、2018、459-464
DOI: 10.6009/jjrt.2018_JSRT_74.5.459

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 千葉 満、門前 暁、脩 細胞傷害は細胞外 miR-375-3p を増加させる、第 28 回日本サイトメトリー学会学術集会、2018
2. 森野 友貴、千葉 満、Wojcik Andrzej、門前 暁、放射線被ばくマウスにおける造血細胞の変化と損傷、第 28 回日本サイトメトリー学会学術集会、2018
3. 森野 友貴、寺田 賢司、佐藤 孝徳、千葉 満、Wojcik Andrzej、門前 暁、高線量率被ばくマウスの骨髄中造血前駆細胞の損傷の特徴、日本放射線影響学会第 61 回大会、2018
4. 千葉 満、門前 暁、脩 細胞傷害は miR-375-3p の細胞外への放出を増加させる、日本放射線影響学会第 61 回大会、2018
5. 森野 友貴、千葉 満、Andrzej Wojcik、真里谷 靖、門前 暁、急性放射線障害に対する医療技術の検討 ～骨髄障害の重症化軽減を目指して～、平成 30 年度放射線安全取扱部会年次大会、2018
6. 千葉 満、門前 暁、致死線量放射線被ばくバイオマーカーとしての血中循環 microRNA、第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会、2017
7. 上原 悠花、桑田 遥、新井山 育未、千葉 満、急性被ばく腸管障害を予測できる血液・糞便中 microRNA バイオマーカーの探索、第 12 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2017
8. Mitsuru Chiba、Satoru Monzen、Serum microRNAs for early diagnosis of acute radiation syndrome、第 9 回日本 RNAi 研究会・第 4 回日本細胞外小胞学会、2017
9. 千葉 満、放射線被ばくバイオマーカーとしての核酸代謝物の検討、日本臨床検査自動化学会第 49 回大会、2017
10. Mitsuru Chiba、Satoru Monzen、Chihiro Iwaya、Yuri Kashiwagi、Sunao Yamada、Yoichiro Hosokawa、Yasushi Mariya、Toshiya Nakamura、and Andrzej Wojcik、Serum microRNAs for early diagnosis of acute radiation syndrome、4th Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by young scientists (ESRAH2017)、2017
11. Mitsuru Chiba、Serum miR-375-3p as potential biomarkers of acute radiation syndrome in mice exposed to lethal dose、第 76 回日本癌学会学術総会、2017
12. 千葉 満、Serum miR-375-3p as potential biomarkers of acute radiation syndrome in mice exposed to lethal dose、第 57 回日本臨床化学会年次学術集会、2017
13. 上原 悠花、桑田 遥、新井山 育未、千葉 満、急性被ばく腸管障害を予測できる血液・糞便中 microRNA バイオマーカーの探索、第 6 回日臨技北日本支部医学検査学会、2017
14. 千葉 満、門前 暁、Serum miR-375-3p as potential biomarkers of acute radiation syndrome in mice exposed to lethal dose、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017

15. 上野 達也、門前 暁、千葉 満、細川 洋一郎、放射線治療の線量最適化のための細胞外 microRNA 発現の利用検討、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017
16. Mitsuru Chiba, Satoru Monzen, Yasushi Mariya, A biomarker of acute radiation syndrome: miR-375-3p increases in mouse serum by exposure to lethal/sublethal dose、第 29 回世界病理臨床検査医学会連合会議(WASPaLM2017)、2017
17. Satoru Monzen, Mitsuru Chiba, Yasushi Mariya, Urinary biomarkers of lethal/sublethal ionizing radiation doses、第 29 回世界病理臨床検査医学会連合会議(WASPaLM2017)、2017
18. 千葉 満、門前 暁、真里谷 靖、被ばくバイオマーカーとしての血中循環 microRNA の検討、第 64 回日本臨床検査医学会学術集会、2017
19. Mitsuru Chiba、急性放射線症候群の初期診断のための血清中マイクロ RNA、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：門前 暁

ローマ字氏名：Satoru Monzen

所属研究機関名：弘前大学

部局名：大学院保健学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：20514136

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。