

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550031

研究課題名(和文)放射線被ばく尿中バイオマーカーによる線量評価法の開発

研究課題名(英文)Development of bio-dosimetry methods using radiation responsive urinary biomarker

研究代表者

神谷 研二(Kamiya, Kenji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：60116564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線被ばくによる生体影響は、その被ばく線量により異なることから、正確な被ばく線量の評価法が必要である。現在、最も信頼性の高い末梢血リンパ球における染色体異常の評価法は煩雑で熟練を要するため、多数の被ばくを疑われる人に対し実施するのに適当ではない。そこで本研究の最終目標は、非侵襲的検体を用いた簡便かつ精確な生物学的放射線被ばく線量測定・リスク評価技術の開発である。マウスにおいて、尿中Adipsinたんぱく質の糖鎖が0.25 Gy以上の被ばくで切断され、それが被ばく後、8時間から48時間の間で主として観察されることが明らかとなった。今後、糖鎖の切断を指標とした評価法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：The different biological effect of radiation exposure is induced by different radiation doses. From this viewpoint, the rapid, accurate dose estimation is anticipated when radiation accident is occurred. Until now, counting chromosome aberration in peripheral blood lymphocyte is the most accurate method for evaluating exposed dose, but this method is time consuming and requires expert skills. Our final goal is to establish rapid, high-throughput radiation bio-dosimetry/radiation risk assessment method using noninvasive specimen materials. The glycosylation status of mouse urine Adipsin protein was modulated for 8 to 48 h after 0.25 to 6 Gy of radiation exposure. The establishment of radiation bio-dosimetry method using the protein glycosylation status will be expected in the future.

研究分野：放射線生物学

キーワード：生物影響 生物学的線量評価法 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

2011年3月に発生した東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所事故においては、大量の放射性物質が環境中に放出された。その結果、放射線被ばくを余儀なくされた人々に加え、五感で感じることができない放射線の特性により、放射線被ばくしたかもしれないという心理的な影響を受けた人々が多数いたことは事実である。放射線被ばくは前述の通り、五感で感じることができないのに加え、被ばく線量により異なる疾患が引き起こされる。これらのことから、被ばく線量の正確な評価が実際の被ばく事故では最も重要である。現在、最も信頼性の高い被ばく線量評価法は末梢血リンパ球を用いた染色体異常を指標とした方法である。本評価法は正確に被ばく線量を推定できることが知られているが、血液の採取から判定まで数日を要すること、染色体異常の評価は熟練を要することなどから、多数の被ばくを疑われる人々に対し実施することは現実的ではない。本評価法の迅速化や自動化の研究開発が行われているが、一方で、トリアージなどに用いることができる簡易的な被ばくの有無を判定できるような新たな指標の開発が期待されている。

近年、LC/MS(液体クロマトグラフィー質量分析計)、MALDI TOF/MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計)やESI/MS(エレクトロスプレーイオン化質量分析計)の開発ならびにその技術革新は目覚ましく、これまで同定することが困難であった様々な生体分子の同定に寄与している。

これまで我々は質量分析計を用いて、放射線被ばくしたマウス尿中で特異的に変化する分子の探索を行い、hepcidin-2と呼ばれるペプチドを同定することができた。hepcidin-2は0.1 Gy以上の被ばくしたマウス尿中で増加することが明らかにされている。面白いことに0.25 Gyや0.5 Gyの被ばくでは被ばく後、おおよそ8時間と5~7日で増加する二相性を示すのに対し、それ以上の被ばく(~4 Gy)では被ばく線量に依存して、尿中での最大値を示す時間が遅延することが明らかになっている。また、放射線被ばくにより肝臓でhepcidin-2遺伝子が増加することを見出している。hepcidinは体内の鉄代謝に関与するとともに、急性期反応に関与する遺伝子として知られている。ヒトやラットではhepcidin-1のみが存在しているが、マウスではhepcidin-1に加え、hepcidin-2が存在する。そして、hepcidin-2は生物学的な機能がほとんど明らかになっていない。これらのことから、我々が明らかにしたhepcidin-2の放射線被ばくバイオマーカー候補の可能性はそのままヒトにあてはめることはできないが、今後、この遺伝子の機能が明らかになることで、同様の機能を持つヒトに存在する分子を見出すことは可能であると推測で

きる。

このように放射線被ばくのバイオマーカー候補となる分子の探索とメカニズム研究を行うことで、メカニズムに基づく放射線被ばくの線量測定・リスク評価技術の開発が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では非侵襲的検体を用いた簡便かつ正確な生物学的放射線被ばく線量測定・リスク評価技術の開発を最終目標とし、放射線被ばくの新規バイオマーカー探索とそのメカニズム研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では9週齢B6C3F1マウス(オス)に対し、ガンマ線照射装置を用いて、0.05 Gyから6 Gyを全身に照射した。照射前と照射後、継時的にマウスを保持することによる直接採尿を行い、凍結保存した。質量分析計などによる解析に加え、その分子のメカニズム研究のために、放射線被ばくしたマウスから血漿や肝臓などの臓器を継時的に採取し、同様に凍結保存した。血漿中での網羅的な糖鎖修飾の変化はレクチンアレイ(グライコテクニカ社)を用いた解析を行った。また、肝臓での糖鎖付加などにかかわる遺伝子発現の変化は、あらかじめ肝臓組織からmicroRNaseyを用いた全RNAの抽出を行った後に、mouse glycosylationアレイ(Qiagen)を用いた解析を行った。

4. 研究成果

ペプチドマスフィンガープリンティングにより、放射線被ばくしたマウス尿中で、Adipsinたんぱく質に修飾される糖鎖が切断される現象を見出している。この現象における線量依存性について検討をおこなったところ、0.25 Gyから6 Gyまでの被ばく線量でAdipsinたんぱく質の糖鎖が切断されたが、その程度は被ばく線量に依存せず、同程度引き起こされることが示唆された。次にこのAdipsin糖鎖の継時変化について、個体差はあるが主として被ばく後、48時間程度まで観察されることが明らかとなった。一方で、0.05 Gyや0.1 Gyの被ばくでは本現象は観察されなかった。一般に、放射線被ばくで引き起こされるDNA損傷はその被ばく線量に依存して増加することが知られている。これらのことから、マウス尿中Adipsinの糖鎖の切断はDNA損傷に直接起因するものではないと推測される。

放射線被ばくによるマウス尿中Adipsinの糖鎖の切断に与える系統の影響について、C57BL/6などの他の系統でも被ばくによりAdipsinの糖鎖が切断されることが明らかとなった。Adipsinは補体因子Dとも呼ばれ、補体活性化に関与することが知られている。Adipsinの糖鎖修飾の様態はヒトとマウスで異なるため、本研究で得られた知見をそのま

まヒトに当てはめることはできない。

放射線被ばくにより、体内に存在する多くのたんぱく質の糖鎖修飾に変化が引き起こされることが示唆されたため、血清中の糖鎖を網羅的に検出できるレクチンアレイを用いて検討を行った。その結果、放射線被ばくによりシアル酸の変化が観察された。

肝臓は血清たんぱく質の主な産生母地であり、さらに一部の血清たんぱく質は糖鎖修飾を受けることが知られている。そこで、肝臓中の糖鎖に関する遺伝子発現を網羅的に解析したところ、一部の糖鎖修飾に関する遺伝子が放射線被ばくにより変化していたものの、その他の多くの遺伝子に変化は観察されなかった。

これらのことから、体液中に存在するたんぱく質に対し、放射線被ばくで修飾された糖鎖に影響が出ていることが示唆され、これらを指標とした放射線被ばくの簡易的線量測定・リスク評価法の開発が期待される。

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 9 件)

1. Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L, Tateishi S, Shimura T, Li J, Iizuka D, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Kamiya K. RAD18 activates the G2/M checkpoint through DNA damage signaling to maintain genome integrity after ionizing radiation exposure. PLoS One. 査読有, 10(2), 2015, e0117845.
2. Cao L, Kawai H, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F. A novel ATM/TP53/p21-mediated checkpoint only activated by chronic γ -irradiation. PLoS One. 査読有, 9(8), 2014, e104279.
3. Imaoka T, Okutani T, Daino K, Iizuka D, Nishimura M, Shimada Y. Overexpression of NOTCH-regulated ankyrin repeat protein is associated with breast cancer cell proliferation. Anticancer Res. 査読有, 34(5), 2014, 2165-71.
4. 飯塚大輔, 河合秀彦, 泉俊輔, 神谷研二, 鈴木文男. 迅速・簡易的線量評価法開発を目指した放射線被ばくのバイオマーカー探索. 放射線生物研究. 査読有, 49, 2014, 382-395.
5. Shimura T, Hamada N, Sasatani M, Kamiya K, Kunugita N. Nuclear accumulation of cyclin D1 following long-term fractionated exposures to low-dose ionizing radiation in normal human diploid cells. Cell Cycle. 査読有, 13(8), 2014, 1248-55.
6. 笹谷めぐみ, 徐衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二. 白血病モデル

マウス (Bcr-Abl トランスジェニックマウス) を用いた放射線発がん高感受性マウスの開発. 広島医学. 査読無, 67(4), 2014, 340-342.

7. Nagataki S, Takamura N, Kamiya K, Akashi M. Measurements of individual radiation doses in residents living around the Fukushima Nuclear Power Plant. Radiat Res. 査読有, 180(5), 2013, 439-47.
8. Gu Y, Wang J, Li S, Kamiya K, Chen X, Zhou P. Determination of the biochemical properties of full-length human PIF1 ATPase. Prion. 査読有, 7(4), 2013, 341-7.
9. Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto K, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M. A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. Nucleic Acids Res. 査読有, 41(14), 2013, 6930-41.

[学会発表](計 24 件)

1. 笹谷めぐみ, 徐衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 神谷研二. BCR-ABL トランスジェニックマウスを用いた放射線発がんの分子機構解明. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 2 日, 鹿児島.
2. 曹麗麗, 河合秀彦, 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 稲葉俊哉, 神谷研二, 鈴木文男. 線照射環境での線量率依存的な老化様細胞増殖停止は ATM/TP53/P21 経路依存性である. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 2 日, 鹿児島.
3. Yanbin Xu, Sasatani M, Kawai H, Lili Cao, Iizuka D, Kamiya K. RAD 18 mediates DNA damage signaling to activate G2/M checkpoint for maintaining genome integrity after ionizing radiation exposure. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 2 日, 鹿児島.
4. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二. 乳腺幹細胞における低線量放射線被ばく影響解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 3 日, 鹿児島.
5. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, Mary Helen Barcellos-Hoff, 神谷研二. Radiation exposure increases mammary stem cell self-renewal in Balb/c mice. 60th Annual International Meeting Radiation Research Society. 2014 年 9 月 22 日, ラスベガス (USA).
6. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二. 乳腺幹細胞頻度から見た乳がんリスク評価の試み. 第 157 回日本獣医学会学術集会.

- 2014年9月10日, 札幌.
7. 徐衍賓, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 飯塚大輔, 神谷研二. E3 ユビキチンライゲース RAD18 が放射線損傷応答におよぼす寄与. 第 55 回原子爆弾後障害研究会, 2014年6月1日, 長崎.
 8. 曹麗麗, 河合秀彦, 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 神谷研二, 鈴木文男. 線照射環境下での線量率依存的な細胞運命決定とその分子機構の解析. 第 55 回原子爆弾後障害研究会, 2014年6月1日, 長崎.
 9. 飯塚大輔, 桐山慧太, 岡崎恵美, 河合秀彦, 泉俊輔, 神谷研二. 糖鎖修飾の変化を指標とした放射線被ばくのバイオマーカー探索. 第 55 回原子爆弾後障害研究会, 2014年6月1日, 長崎.
 10. Y. Xu, M. Sasatani, H. Kawai, K. Kamiya. Function of RAD18 on radioresponse. The 3rd International Symposium Phoenix Leader Education Program(Hiroshima Initiative) for Renaissance from Radiation Disaster -Nature, Human being, and Radiation-, 2014年2月15日, 広島.
 11. H. Kawai, L. Cao, D. Iizuka, H Matsui, A. Kanai, T. Inaba, M. Sasatani, K. Kamiya, F. Suzuki. A combination of experimental and bioinformatics approaches for assessing the biological effects of ionizing radiation. 4th International Symposium of RIRBM -Hiroshima-Nagasaki Collaborative Research on Radiation Disaster Medicine-, 2014年2月14日, 広島.
 12. A. Nakamura, M. Sasatani and K. Kamiya. The use of γ -H2AX assay for validation of novel radioprotector against both acute and chronic low-dose radiation exposure. 4th International Symposium of RIRBM -Hiroshima-Nagasaki Collaborative Research on Radiation Disaster Medicine-, 2014年2月14日, 広島.
 13. T. Shimura, M. Sasatani, K. Kamiya, N. Hamada, N. Kunugita. Cyclin D1 as a molecular marker and possible molecular radioprotection target for long-term exposure to low-dose ionizing radiation. 4th International Symposium of RIRBM -Hiroshima-Nagasaki Collaborative Research on Radiation Disaster Medicine-, 2014年2月14日, 広島.
 14. 河合秀彦, 曹麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男. 線照射環境下における細胞応答の線量率依存性の解析. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013年10月19日, 青森.
 15. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 神谷研二. 白血病モデルマウスを用いた放射線発がんの分子機構解明. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013年10月19日, 青森.
 16. 飯塚大輔, 桐山慧太, 河合秀彦, 泉俊輔, 鈴木文男, 神谷研二. 量的・質的变化に着目した放射線被ばくの尿中バイオマーカー探索. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013年10月18日, 青森.
 17. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二. Bcr-Abl トランスジェニックマウスは、放射線誘発胸腺リンパ腫発症を促進させる. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013年10月5日, 横浜.
 18. Iizuka D, Kiriyama K, Kawai H, Izumi S, Sasatani M, K Kamiya. Identification of urinary biomarker of radiation exposure using mass spectrometry. 59th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 2013年9月18日, ニューオーリンズ (USA).
 19. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 李建祥, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二. BCR-ABL トランスジェニックマウスを用いた放射線発がん高感受性マウスの開発. 第 38 回中国地区放射線影響研究会, 2013年7月26日, 広島.
 20. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 飯塚大輔, 渡邊敦光, 神谷研二. 白血病モデルマウス (Bcr-Abl トランスジェニックマウス) を用いた放射線発がん高感受性マウスの開発. 第 54 回原子爆弾後障害研究会, 2013年6月2日, 広島.
 21. 曹 麗麗, 河合秀彦, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男. 恒常的な放射線被曝環境下のゲノム安定性維持には ATM- p53- p21 経路の活性化が必要である. 第 54 回原子爆弾後障害研究会, 2013年6月2日, 広島.
 22. 飯塚大輔, 桐山慧太, 河合秀彦, 泉俊輔, 鈴木文男, 神谷研二. 新規放射線被ばく生体応答因子の同定. 第 54 回原子爆弾後障害研究会, 2013年6月2日, 広島.
 23. Y Xu, M Sasatani, H Kawai, D Iizuka, K Kamiya. Rad18 Facilitates DNA damage repair after ionizing radiation. The 3rd Asian Congress of Radiation Research, 2013年5月10日, 北京 (中国).
 24. D Iizuka, S Yoshioka, H Kawai, K Kiriyama, S Izumi, M Nishimura, Y Shimada, K Kamiya, F Suzuki. Mouse Urinary Hcpidin-2 is a potential biomarker of radiation exposure. The 3rd Asian Congress of Radiation

Research, 2013 年 5 月 10 日, 北京 (中国) .

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/exponc/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神谷 研二 (KAMIYA KENJI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：60116564

(2)研究分担者

飯塚 大輔 (IIZUKA DAISUKE)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：00455388

笹谷 めぐみ (豊島めぐみ) (SASATANI
MEGUMI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：80423052