

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15443

研究課題名(和文) エキソソーム内在分子の被ばく線量評価マーカーへの応用

研究課題名(英文) Application of exosomal molecules as exposure dose assessment markers

研究代表者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA, IKUO)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00177370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1～5Gy X線全身照射マウス血清中microRNA(miRNA)アレイ解析を行い線量や照射後の時間との関連性を検討した結果、照射直後に線量依存的に発現が増加したmiRNAを1種類、24時間後で増加の11種類と減少の9種類を其々同定した。だが当初の総RNA回収法は数匹のマウス血液を必要とし個体差変動が見られず結果の再現性が得られなかったためqualityの高いRNAを各個体から抽出、解析可能な方法を見出した。現在改良法でmiRNA解析を進行中。又miRNAアレイ解析から階層的クラスタリング分析を行った処、血小板機能に関する遺伝子がまとまって発現変動していることが解明された。更なる検討を進める。

研究成果の概要(英文)：We performed array analysis of microRNA(miRNA) in serum obtained from 1-5 Gy X-ray whole-body irradiated mice and examined the relationship of miRNA expression after irradiation with dose and time. We identified one type of miRNA whose expression increased in a dose-dependent manner immediately after irradiation and 11 others whose expression decreased 24 h after irradiation. However, in the initial method employed for total RNA recovery, we used blood from several mice; as a result, we were unable to observe differences in miRNA expression among individual mice and obtain reproducible results. Therefore, we found a method that can extract and analyze high-quality RNA from individual mice. We are currently advancing miRNA expression analysis using an improved method. In addition, hierarchical clustering analysis based on array analysis of miRNA has revealed fluctuating expressions of genes associated with platelet function. Further investigation is underway.

研究分野：放射線生物学

キーワード：被ばく医療 マイクロRNA 染色体異常解析 被ばくマーカー

#### 1. 研究開始当初の背景

エキソソームは細胞から分泌されるエンドソーム由来の直径 40~200 nm 程度の膜内小胞で、血液、尿、母乳や唾液など様々な体液や細胞培養上清中に存在する。このエキソソーム内には核酸やタンパク質が含まれており、別の細胞に取り込まれることで細胞間のコミュニケーション、生体現象の調節が行われていることが明らかになってきている。最近の研究では、腫瘍由来のエキソソームは、腫瘍形成メディエーターであることも明らかにされている。エキソソームは、比較的安定に存在するため、様々な応用が期待されているが、放射線被ばくとの関連性は不明である。放射線被ばく事故のような場合、必ずしも個人線量計を装着しているとは限らないため、個々の被ばく線量評価が繰り返し問題となってきた。また、染色体異常解析には高い専門性と数日の時間を要する為「迅速性」、「簡便性」や「汎用性」といった点で難があり、さらに低線量域での評価には適さない。これまでも様々な「被ばく線量評価マーカー」の探索が試みられてきたが、未だ染色体法に代わる信頼性の高い方法や生体内分子は見出されていない。

#### 2. 研究の目的

本研究は、エキソソームのもつ多様な内在分子情報に着目し、放射線曝露個体由来の「エキソソーム解析」と「染色体異常解析」を同時に行い、エキソソームの新たな線量評価マーカーへの応用の可能性検討を目的とする。

#### 3. 研究の方法

マウスに致死線量の 7 Gy 放射線照射後、各処理個体からヘパリン採血を行い、血漿を分離する。血漿から Total Exosome Isolation (Life Technologies 社) によってエキソソームを回収し、RNA とタンパク質を抽出する。得られた RNA を使用して microRNA および mRNA などのマイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR による絶対定量解析を行う。また得られたタンパク質は二次元電気泳動を行い、質量分析法を行う。これらの解析により、放射線曝露個体に特異的な血漿およびタンパク質を定性、定量する。併せて、同様に処理したマウス末梢血リンパ球を用いた染色体解析も行い、放射線応答エキソソーム分子の関連性について評価する。

#### 4. 研究成果

いくつかの miRNA が線量依存的に変動し、その相互の発現比に有意な相関が認められた。得られた成果について特許申請に向けた手続き準備中。

#### 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. H. Yoshino, Y. Kumai, I. Kashiwakura. Effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis induction in radioresistant macrophages. *Mol. Med. Rep.*, 2017, 15(5), 2867-2872, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1173>, 査読有.
2. K. Yokoyama, M. Yamaguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, A. Tanaka, M. Hosoda, I. Kashiwakura. Radiomitigative Effects of *Grifola frondosa* Preparations on Mice Exposed to Lethal Ionizing Irradiation. *J J Food Nutri*, 2016, 2(3),22-25, 査読有.
3. T. Tsujiguchi, T. Hirouchi, S. Monzen, Y. Tabuchi, I. Takasaki, T. Kondo, I. Kashiwakura. Expression analysis of radiation-responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiat Res.* 2016, 57(1), 35-43, doi: 10.1093/jrr/rrv071. Epub 2015 Dec 9, 査読有.
4. M. Chiba, N. Watanabe, M. Watanabe, M. Sakamoto, A. Sato, M. Fujisaki, S. Kubota, S. Monzen, A. Maruyama, N. Nanashima, I. Kashiwakura, T. Nakamura. Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol.*, 2016, 48(1), 305-312, doi: 10.3892/ijo.2015.3255. Epub 2015 Nov 19, 査読有.
5. T. Hirouchi, K. Ito, M. Nakano, S. Monzen, H. Yoshino, M. Chiba, M. Hazawa, A. Nakano, J. Ishikawa, M. Yamaguchi, K. Tanaka, I. Kashiwakura. Mitigative Effects of a Combination of Multiple Pharmaceutical Drugs on the Survival of Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2015,17(2), 190-199, 査読有.
6. A. Nishiyama, M. Yamaguchi, T. Tsujiguchi, S. Murakami, I. Kashiwakura. Evaluation of oxidative stress markers in plasma derived from individuals exposed to ionizing radiation. *Exp. Ther. Med.*, 2015, in press, 査読有.

[学会発表](計12件)

1. 三浦 柁太, 伊藤 優樹, 山口 平, 千葉 満, 柏倉 幾郎. 高線量放射線被ばくマウス血清中の microRNA 発現変化の被ばくマーカーとしての可能性の検討. 日本放

- 射線影響学会第 59 回大会, 2016 年 10 月 26 日 ~ 28 日, JMS アステールプラザ (広島県広島市) .
2. 山口 平, 廣内 篤久, 横山 昂生, 千葉 満, 柏倉 幾郎. 致死線量放射線ばく露マウスに対するトロンボポエチン受容体作動薬の放射線緩和効果. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 2016 年 10 月 26 日 ~ 28 日, JMS アステールプラザ (広島県広島市) .
  3. 阿部 悠, 三浦 富智, 吉田 光明, 氏家 里沙, 黒須 由美子, 柳 亜希, 津 山尚宏, 川村 文彦, 藤岡 来実, 稲葉 俊哉, 神谷 研二, 坂井 晃. 低線量 線による細胞遺伝学的線量評価用線量応答曲線の作製. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 2016 年 10 月 26 日 ~ 28 日, JMS アステールプラザ (広島県広島市) .
  4. M. Yamaguchi, K. Yokoyama, Y. Ito, S. Miura, M. Chiba, I. Kashiwakura. The mitigative effect of Romiplostim, a recombinant c-mpl agonist, on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation. The 3<sup>rd</sup> Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by Young Scientists(ESRAH2016), 2016 年 10 月 1 日 ~ 2 日, 北海道大学 (北海道札幌市) .
  5. 山口 平, 廣内 篤久, 千葉 満, 門前 暁, 吉野 浩教, 小村 潤一郎, 柏倉 幾郎. 致死線量放射線ばく露マウスに対する c-mpl 作動薬の作用. 日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ-未来に繋ぐ放射線研究-, 2015 年 10 月 16 日 ~ 17 日, 富山大学五福キャンパス黒田講堂 (富山県富山市) .
  6. 横山 昂生, 山口 平, 辻口 貴清, 柏倉 幾郎. エルトロンボパグの放射線防護効果の探索. 日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ-未来に繋ぐ放射線研究-, 2015 年 10 月 16 日 ~ 17 日, 富山大学五福キャンパス黒田講堂 (富山県富山市) .
  7. M. Yamaguchi, T. Hirouchi, M. Chiba, S. Monzen, H. Yoshino, J. Ishikawa, T. Tsujiguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, J. Komura, I. Kashiwakura. Thrombopoietin-Mimetic Romiplostim Confers the Complete Survival Rate to Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation. 57<sup>th</sup> American Society of Hematology(ASH2015), 2015 年 12 月 5 日 ~ 8 日, Orlande, USA.
  8. M. Yamaguchi, T. Hirouchi, M. Chiba, S. Monzen, H. Yoshino, J. Ishikawa, T. Tsujiguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, J. Komura, I. Kashiwakura. Effects of a c-mpl agonist on mice exposed to lethal ionizing radiation, 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (ICRR), 2015 年 5 月 25 日 ~ 29 日, 京都国際会館 (京都府京都市) .
  9. M. Chiba, S. Monzen, I. Kashiwakura, T. Nakamura. Up-regulated and Down-regulated Cis-natural Antisense transcripts in the Human B Lymphoblastic Cells after X-ray Irradiation. 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (ICRR), 2015 年 5 月 25 日 ~ 29 日, 京都国際会館 (京都府京都市) .
- 〔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  
<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~kashiwakura/>
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者  
 柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA, Ikuo)  
 弘前大学・大学院保健学研究科・教授  
 研究者番号 : 0 0 1 7 7 3 7 0
- (2)研究分担者  
 三浦 富智 (MIURA, Tomisato)  
 弘前大学・大学院保健学研究科・准教授  
 研究者番号 : 2 0 2 6 1 4 5 6

千葉 満 (CHIBA, Mitsuru)  
弘前大学・大学院保健学研究科・講師  
研究者番号：20583735

(3)連携研究者

門前 暁 (MONZEN, Satoru)  
弘前大学・大学院保健学研究科・講師  
研究者番号：20514136

吉野 浩教 (YOSHINO, Hironori)  
弘前大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：10583734