

令和 2 年 7 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01964

研究課題名(和文) 低線量放射線被ばく尿からのバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for biomarkers from low dose radiation exposure urine

研究代表者

泉 俊輔 (izumi, shunsuke)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授

研究者番号：90203116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：全身ガンマ線照射されたマウス(4 Gy)から得られた尿は、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で各フラクションを分析して、放射線応答モルを特定します。ヘプシジン2と腎臓のアンドロゲン調節タンパク質(KAP)のペプチドフラグメントの2つの候補を特定しました。KAPペプチド断片の割合は、放射線量との相関関係を示さなかった。さらに、比較的低い線量(0.25および0.5 Gy、それぞれ)への曝露後のヘプシジン-2の増加は二相性でした(照射後、8-48時間および120-168時間で)。ヘプシジン2の増加は、肝臓のヘプシジン2遺伝子(Hamp2) mRNAレベルの増加と並行していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、私達の生活は放射線によって豊かになっています。しかし、低線量被曝の生体への影響は明らかになっておらず、医療現場などでも低線量被曝は問題になっています。放射能事故が起こった場合にそれを患者の重症度に基づいて、治療の優先度を決定して選別を行うことが、必要である。それを尿検査などの方法によって医療に負担をかけず行うことが重要である。この研究の延長線上にはこのような方法論に答えるための基礎研究である。

研究成果の概要(英文)：Urine obtained from whole-body gamma-irradiated mice (4 Gy) is analyzed for each fraction by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to identify radiation-responsive moles. We identified two candidates for hepcidin-2 and a peptide fragment of the renal androgen regulatory protein (KAP). The proportion of KAP peptide fragments showed no correlation with radiation dose. Furthermore, the increase in hepcidin-2 after exposure to relatively low doses (0.25 and 0.5 Gy, respectively) was biphasic (at 8-48 and 120-168 hours after irradiation). The increase in hepcidin 2 paralleled the increase in liver hepcidin 2 gene (Hamp2) mRNA levels.

研究分野：質量分析学

キーワード：hepcidin-2 鉄イオン MALDI-TOF-MS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線への曝露は、生物にさまざまな有害な影響を与える可能性があります。これらの影響は、放射線量だけでなく、他の要因にも依存します。したがって、正確な線量推定は、治療方針に関する決定を行う上で不可欠です。一般に、生体物質を使用して放射線量を推定すること(すなわち、生体線量測定)は、日常的に個人線量計を携帯していない患者に適用できます。末梢血リンパ球の染色体異常の評価は、放射線被ばく線量を推定するための最も信頼できる方法です。

放射線による DNA 損傷は遺伝子発現を変化させる可能性があります。最近、放射線被ばくは非コード RNA の細胞レベルも変えることが示されました。発現の量的変化を誘発することに加えて、放射線曝露は、DNA (例えばメチル化) および/またはヒストン (例えば、アセチル化およびメチル化) のエピジェネティックな共有結合修飾を引き起こす可能性があり、したがってクロマチン構造および/または機能を変更する可能性があります。

特定のタンパク質は、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、リン酸化、アセチル化などの翻訳後修飾を受け、これらの修飾は放射線によって変化する可能性があります。タンパク質のグリコシル化は重要な翻訳後修飾であり、さまざまなグリコシル化パターンがタンパク質の機能に大きく影響する可能性があります。ほとんどの血清タンパク質は肝臓でグリコシル化され、血液に輸送されます。

次に鉄イオン濃度を計測するために黒鉛炉原子吸光分析法を用いたマウス尿中の鉄の定量手順が開発されました。マウスの尿サンプルにはマトリックスに多くの有機化合物が含まれており、その濃度は約 20% で、その値は人間の尿に含まれるものと比較して 30 倍高くなっています。また、1 回の排尿あたりのサンプル量は 0.2mL 以下の尿しか得られませんでした。体積が小さいため、サンプル中の有機物を鉍酸と酸化剤を使用した湿式分解で分解することは困難でした。この実験では、分析のために生尿サンプルをグラファイト管状炉に直接入れました。有機物は予熱段階で単純に灰化された。炉内の灰化を促進するために、アルゴンガスの流れを遮断することにより、周囲から空気が侵入した。原子吸収は 248.3270 nm (原子吸収の波長) で測定され、バックグラウンドは 247.0658 nm (バックグラウンド補正の波長) でモニターされました。最適化された機器操作条件は、化学修飾技術の使用を妨げました。使用した分析手順は非常に簡単です。つまり、生尿サンプルのアリコートグラファイト管状炉に直接注入し、化学修飾剤を使用せずに適切な加熱プログラムを実行しました。したがって、この方法は、繊細な化学実験に慣れていない科学者に役立ちます。提案された分析方法は、全身に 4 Gy のガンマ線を照射したマウスの尿サンプル中の鉄濃度を測定することにより、一種のバイオマーカーとして適用されました。

2. 研究の目的

現在、私達の生活は放射線によって豊かになっています。しかし、低線量被曝の生体への影響は明らかになっておらず、医療現場などでも低線量被曝は問題になっています。そこで、本研究では全身被曝における 60 日以内の半数致死量である 4 Gy を低線量被曝と定義し、マウスを用いて低線量被曝の生体への影響を観察し、これまでに低線量の被曝で尿中に Hepsidin2 が放出されること。被曝後に肝臓中で Hepsidin2 の遺伝子が 2 度に渡って増加するのに対し、尿中に排出される Hepsidin2 の増加が一度しか起こらないことを報告しています。また、この Hepsidin2 類は体内の鉄のバランスを保つホルモンです。放射線による生体影響は不明な点が多く残されています。

そこで、本研究では鉄代謝の変化とそれに伴う蛋白質またはその代謝物の挙動の変化の解析を行いました。

3. 研究の方法

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(MALDI-TOF-MS)とエレクトロスプレーイオン化フーリエ変換 MS を使用して、ヘプシジン-2、肝臓ペプチド、およびヒスタミンのレベルを示し、マウスの尿中の代謝物である 1-メチルヒスタミンは、全身線照射後に変化しました。尿中のこれらの分子の量は、おそらく鉄代謝、免疫反応、および炎症の変化を介して、放射線被ばく後に増加しました。さらに、我々は最近、MALDI-TOF-MS と組み合わせたペプチド質量フィンガープリンティングに従って、その発現に影響を与えずに 0.25 Gy の線の脱グリコシル化マウス尿アディプシンを照射したことを報告しました。

次に鉄イオン濃度を計測するために多くの実験動物が、生物学的に関連するさまざまな実験のモデルとして使用されています。ほとんどすべてのこれらの実験は、次のように簡単に要約できます。外因性刺激が動物に投与され、結果として生じる応答がさまざまな高度な機器を使用して観察または監視されます。一般的に使用される動物モデルには、昆虫、魚、両生類、爬虫類が含まれます。低次の動物で観察された結果の応答または症状は、哺乳類のそれに非常に近いと推定されました。フォローアップ研究では、安全性が確立された後、人間は同じ刺激にさらされます。ただし、哺乳類と上記の動物モデルの反応にはわずかな違いがあります。さらに、他の哺乳

動物で得られた結果は、同じ刺激と条件でも人間に必ずしも変換されないことはよく知られています。さらに、人間を含む実験には多くの制限が課されており、合法性、医療倫理、および道徳の面で適切でない研究もある。したがって、マウスは医学的試験のための代表的な哺乳動物として利用されており、刺激に対するそれらの応答は、一般的に哺乳動物に拡張することができます。病気を診断するために、体液中の鉄濃度がしばしば評価されます。赤血球は主にヘモグロビンの複合体として鉄を含んでいます。動物が障害に苦しんでいるとき、または外因性刺激が投与されているとき、鉄は赤血球から血清中に放出されることがあります。全血からの血清の分離は比較的簡単です、血清に含まれる鉄は、高濃度でも分析できます。したがって、血清サンプルとその鉄含有量は、動物の健康状態の良い指標です。たとえば、血清中の鉄濃度は、人間の血清または血液サンプルの場合、医師の要求に応じて担当医がサンプルを収集する必要があるため、通常、サンプリングプロセスはより複雑になります。コレイア等および Donnici et al 原子吸光分析 (AAS) によるヒト血清の分析のための簡略化された迅速なアプローチを提案しました。

45 種類のレクチンを含むマイクロアレイを分析して、全身線に曝露したマウスの血清糖タンパク質のグリコシル化の全体的な変化を特定しました。結果は、放射線被ばくが -2,3-および -2,6-シアル酸の相対量をそれぞれ増加および減少させることを示した。肝臓における -2,3-および -2,6-シアリルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を分析して、それらの発現の変化がシアル酸の変化の原因であるかどうかを決定しました。 -2,3-シアル酸の増加は、放射線被曝後の St3gal5 のアップレギュレーションと相関していた。

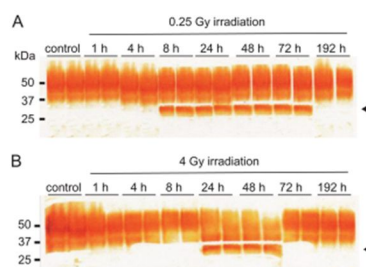
モデル FLA-1000 グラファイトファーネスオートマイザーとモデル AS-301 オートサンプラーを備えた日本ジャレルアッシュモデル AA8200 原子吸光分析計を使用しました。L'Vov プラットフォームなしの熱分解グラファイトチューブ (日本 Jarrell-Ash、部品番号 228-3115、内径 3.6 mm、外径 10.2 mm、長さ 29.55 mm、投与穴サイズ 2.8 mm x 5.8 mm) をすべての実験に使用しました。浜松ホトニクス (豊岡、日本) モデル L233-26NU 鉄ホローカソードランプとミトリカガラス (日本、水戸) 重水素アークランプを光源として使用した。オートサンプラー内の容器として、船越 (東京、日本) モデル Mu-1553-00 スクリューバイアル (0.6 mL、ポリプロピレン)、モデル Mu-1549-00 スクリューキャップを使用しました。

4. 研究成果

-2,3-シアル酸の増加は、放射線被曝後の St3gal5 のアップレギュレーションと相関していた。ただし、St6gal1 発現の減少は認められなかった。照射されたマウスの肝臓で発現した遺伝子の PCR アレイの分析は、照射が含まれた遺伝子のほとんどの発現を変えなかったことを明らかにしました。これらの結果は、レクチンマイクロアレイを使用した血清糖タンパク質のグライコミックスクリーニングが、糖部分のタンパク質への翻訳後付加における放射線誘発性変化を特定するための強力なツールになり得ることを示唆しています。さらに、この結果は、糖タンパク質のシアリル化の変化が急性放射線被ばくに対する最初の反応である可能性があることを示しています。

以前の研究では、MALDI TOF-MS と組み合わせペプチド質量フィンガープリントを使用し、マウスの全身線照射後に脱グリコシル化 (26 kDa) 型の尿アディプシンが蓄積することを示しました。マウスのアディプシンは、ペプチド N グリコシダーゼ F を使用して脱グリコシル化した後、アディプシンの分子量に有意なシフトを示すウエスタンブロッティングによって決定されるように、強く N グリコシル化されています。0.25 Gy または 4 Gy の線を照射したマウスの血清からのアディプシンも脱グリコシル化されることを観察し (Fig 1.) 放射線曝露が血清糖タンパク質のグリコシル化状態に全体的な変化を引き起こす可能性があることを示唆しています。

Fig. 1. Representative western blot of adipsin from the serum of mice irradiated with (A) 0.25 Gy or (B) 4 Gy of ...



したがって、45 種類のレクチンを含むレクチンマイクロアレイを分析して、6 Gy の線を照射した 24 時間後のマウスの血清糖タンパク質レベルの違いを特定しました。10 個のレクチンは、血清糖タンパク質のレベルの変化に関連し、変動係数 <0.1 の基準を満たしました。10 のレクチンのうち、4 つの [Maackia amurensis leucoagglutinin I (MAL-I)、Trichosanthes japonica agglutinin I (TJA-I)、Sambucus nigra agglutinin (SNA) および Sambucus sieboldiana agglutinin (SSA)] は、シアル酸誘導体を結合します。 -2,3-シアル酸に結合する MAL-I に関連するマイクロアレイ強度はより高かったが、 -2,6-シアル酸に結合する TJA-I、SNA および SSA に関連する強度は血清サンプルでより低かった対照群/非照射群のマウスよりも放射線に曝された群のマウス。レクチン Datura stramonium 凝集素 (DSA)、Lycopersicon esculentum レクチン (LEL) および Solanum tuberosum レクチン (STL) に関連する血清 GlcNAc レベルの変化も観察されました。

提案された方法は、外因性刺激として全身に 4 Gy のガンマ線を照射した後のマウス尿中の鉄測定に使用されました。照射は、以前の研究に記載されていると同様の方法で行われた。提案された分析方法では、1つの尿サンプルに数十マイクロリットルしか必要としないため、排尿ごとに鉄濃度を決定できます。外的刺激の適用前後の鉄濃度の変化を Fig 2 に示します。サンプル数が不十分なため、正確な結論を出すことができませんでした。ただし、マウス B の尿サンプルの測定された鉄濃度の例外的なエラーは、外因性刺激の適用の 2 日前に観察されました。つまり、鉄濃度の予期しない増加が観察されました。まれですが、ヒトの血尿と同様の状態がこの結果を引き起こす可能性があります。上記のサンプルを除いて、各マウスの尿中の鉄の定常状態濃度は約 52 および 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ でした。

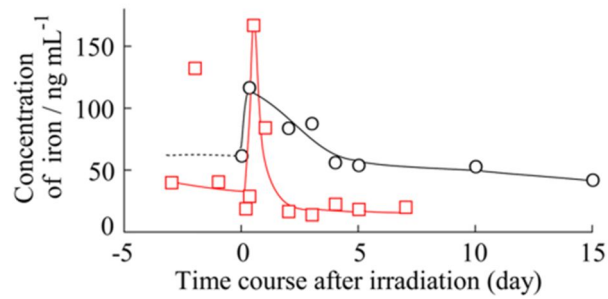


Fig 2. The concentration of iron in mice urine as a function of experimental duration after irradiation. Duration of "0" is just before the gamma ray irradiation of 4 Gy was administered to the mice. After 8 h of the application of extrinsic stimulus, the concentrations of iron in the urine increased temporarily, then decreased to the previously determined steady states. (Empty circles) mouse A; (empty squares) mouse B

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiyama, Makoto; Okamoto, Yasuaki; Izumi, Shunsuke; Iizuka, Daisuke	4. 巻 30
2. 論文標題 Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometric Evaluation of Iron Excretion in Mouse Urine Caused by Whole	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological Trace Element Research	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12011-018-1589-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iizuka D, Yoshioka S, Kawai H, Izumi S, Suzuki F, Kamiya K.	4. 巻 58
2. 論文標題 Metabolomic screening using ESI-FT MS identifies potential radiation-responsive molecules in mouse urine.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of radiation research	6. 最初と最後の頁 273-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrw112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉山 諒, 飯塚大輔, 岡本泰明, 七種和美, 泉 俊輔
2. 発表標題 鉄代謝を中心とした放射線被曝による生体応答解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会,
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉山諒・飯塚大輔・岡本泰明・七種和美・泉俊輔
2. 発表標題 鉄代謝を中心とした放射線被曝による生体応答解析
3. 学会等名 放射線影響学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto Yoshiyama1, Daisuke Iizuka, Yasuaki Okamoto, Kazumi Saikusa and Shunsuke Izumi
2. 発表標題 Biological response analysis by radiation exposure with a focus on the iron metabolism
3. 学会等名 For the Establishment of the Science of Resilience (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----