

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02860

研究課題名(和文) 血清アルブミンの放射線による酸化修飾応答と線量・障害予測への応用

研究課題名(英文) Radiation-induced oxidative modification response of serum albumin and its application to dose/damage prediction

研究代表者

柏倉 幾郎 (Kashiwakura, Ikuo)

弘前大学・保健学研究科・特任教授

研究者番号：00177370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシア国内の高自然放射線地域(70 mSv/年)住民血液のLC/MS/MS解析から、血清アルブミン(SA)の34番目のシステイン(Cys-34)酸化とは別の線量依存的な酸化修飾ペプチドを複数個所特定した。この酸化修飾応答はマウスへの単回照射(0.5から3 Gy)でも観察され、急性の外部被ばくにおいてもSAの酸化修飾応答が観察された。その後、弘前大学病院に搬送の多発性外傷患者のCT検査前後のSAの酸化修飾応答を解析したところ、平均30 mSvの低線量においても特異的応答が観察された。以上の結果から、SAの酸化修飾応答は、急性の低線量被ばくの線量評価マーカーとしての活用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清中に最も高濃度に存在する血清アルブミン(SA)は、活性酸素種により酸化や糖化などの修飾を受け、特にSAの34番目のシステイン(Cys-34)が酸化される。我々は、SAのCys-34酸化とは別の線量依存的な酸化修飾応答を見出したが、放射線は強い酸化ストレスであり、他の酸化ストレス関連疾患(感染症、ガン、糖尿病や老化等)においても特異的な修飾応答が生じている可能性が強く示唆される。今後は、ヒトに特異的なSAの酸化修飾応答ペプチドの迅速かつ高精度な検出方法(デバイス等)開発や様々な疾患との関連性の検討が求められる。

研究成果の概要(英文)：LC/MS/MS analysis of blood from residents of high natural radiation areas (average 70 mSv/year) in Indonesia, mainly due to chronic inhalation exposure to radon and tron, identified several dose-dependent oxidative modification peptides, apart from the 34th cysteine (Cys-34) oxidation of serum albumin. This oxidative modification response of SA was also observed in mice after single irradiation (0.5 to 3 Gy), even in acute external exposure. Subsequently, when the oxidative modification response of SA was analysed before and after CT examinations of multiple trauma patients transported to the Hirosaki University Advanced Emergency Centre, a specific response was observed even at low doses averaging approximately equal to 30 mSv.

Based on these results, the oxidative modification response of SA is expected to be utilised as a biodosimetry marker for acute low-dose exposure.

研究分野：放射線生物学

キーワード：電離放射線 生物学的線量評価 血清アルブミン 酸化修飾応答

1. 研究開始当初の背景

五感では感じない放射線被ばくを迅速かつ精確に定量評価することは、放射線事故や災害での被災者の健康影響予測や、急性症状が現れる 0.5 Gy 以上の被ばく者の迅速かつ高効率なトリアージを行う上で極めて重要である。放射線事故や災害時での被災者の多くは線量計などを装着していないことが想定され、生体試料を用いた「生物学的線量評価」が必要不可欠である。特にリンパ球による「染色体異常解析」は最も信頼性の高い Gold standard として国際標準法に採用されている。しかしながら、この解析には高い専門性と数日の時間を要することや、0.5 Gy 以下の低線量域の評価には不向きであることから迅速なトリアージには不向きであり、多数検体解析が難しいいわゆるスループットが低いという問題がある。そのため、現時点では精確・迅速かつ大規模に生物学的線量評価が可能な方法は無い。

タンパク質は、酸化を受けやすいアミノ酸残基を多数含んでおり、生体内でヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)やペルオキシナイトライト($\text{ONOO}\cdot$)、一酸化窒素($\cdot\text{NO}$)などの産生が高まると様々な非酵素的酸化修飾を受ける。それゆえ、修飾タンパク質は生理的・化学的ストレス下の活性化学種増減に関する重要な情報を提供し、関連疾患・病態の重要な指標になり得る。ヒト血清アルブミン(human serum albumin, HSA)は血液中に約 40 mg/ml の高濃度で存在し、血漿タンパク質量の約 60%を占め最も豊富に含まれるタンパク質であり、各種活性化学種に高頻度でばく露されるため全身を循環する間に受けた酸化ストレスの情報を有する。そのため、慢性腎不全、肝不全や糖尿病などの患者では HSA の特異的な酸化修飾が生じるが、放射線ばく露に伴う具体的なアルブミンの酸化修飾応答の詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究は、放射線被ばく個体(マウス及びヒト)の SA の特異的な酸化修飾を液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS/MS)により解析し、線量・線量率や照射後の経過時間と血清アルブミンの酸化修飾応答の関連性を検討する。特異配列ペプチドに対するモノクローナル抗体の活用で、精確・迅速かつ大規模に被ばく線量を把握するハイスループットな生物学的評価法開発につなげ、新たな障害予測への応用を目指すことを目的とする。

この目的達成のため、これまでの知見をもとに下記 3 点に取組み、課題解決を目指す。

- 1) 線量・線量率や照射後経過時間と血清アルブミンの酸化修飾レベルとの関連性と特異配列の同定(マウスモデル)
- 2) CT 検査患者血清アルブミンの酸化修飾応答の解析と特異配列の同定
- 3) 特異配列ペプチドに対するモノクローナル抗体作製と、生物線量評価法として線量依存性及び障害予測の検証

3. 研究の方法

具体的な実験方法の概要は下記の通りである。

- マウス照射実験：C57BL/6J 雌マウスに対して、X 線発生装置を用いて 0.1 ~ 8 Gy の全身照射を行い、照射後一定間隔で抗凝固因子を含まない採血管内に採血し、室温で 30 分間静置後、1,200 g で 10 分間の遠心分離で血清を回収し、解析まで - 80°C で凍結保存する。併せて性差及び週齢との関連性も同様に検討する。各条件毎に 10 個体程度用意する。
- 高分解能質量分析装置を用いた定量的修飾オミックス解析：血清含有タンパク質を還元アルキル化処理後、トリプシン消化でペプチドに断片化し、質量分析を行う。ペプチド分画カラムはトラップカラムを接続した C18 逆相カラムを用い、質量分析器は TripleTOF6600 質量分析計(AB Sciex 社)を用いる。最初の測定で、タンパク質の網羅的な同定から SA の酸化修飾情報の集積ライブラリーを作製する。これに基づいて MRM 法の測定で特定の酸化修飾ペプチドのすべてを選択的・定量的に検出する。
- データー解析：得られたスペクトルデータ情報から、MultiQuant 3.0(AB Sciex 社)で SA の酸化修飾を、修飾ペプチドのピーク面積値として算出する。被ばく線量・線量率及び経過時間と酸化修飾との相関は、スピアマンの順位相関により解析する。
- HSA：HSA は弘前大学医学部附属病院・高度救命救急センターに搬送された患者で、CT 検査を実施した入院患者の診断治療過程で採血した血液の一部を用いる。該当する患者数は年間およそ 200 名程度あるが、共同研究者・伊藤医師の判断で交絡因子がより少ない患者からの検体を用いる。
- HSA の酸化修飾配列の比較：インドネシアスラウェシ島の高線量自然放射線地域住民で得られた酸化修飾の特徴と本研究で得られる配列応答と比較し、特徴の差異を確認する。
- モノクローナル抗体の作製：複数の酸化修飾ペプチドを抗原とするペプチド標準品を設計、作製する。次に抗原の検証を目的にウサギ等でのポリクローナル抗体を作製し、ポリクローナル抗体による反応性の検証を行う。次に特異的抗体作製の検証のため、ヒト抗原の場合はマウスもしくはラットでのモノクローナル抗体を作製し、同様に抗体による反応性の検証を行う。これらの作製はコスモバイオ(株)へ委託して調製した。

- モノクローナル抗体による障害予測：放射線照射マウスから経時的に採血（眼底）し、放射線照射後の血清に対するモノクローナル抗体の反応性から線量予測及びその後の障害を予測する。CT 検査患者由来ヒト血清についても同様な検証を行う。
- 生物学的線量評価法開発に向けた基礎的検討：作製したモノクローナル抗体による効率的な検出系の検討として、酵素免疫測定法（ELISA サンドイッチ法など）、イムノクロマト法やその他（ウエスタンブロット）検出系の条件について検討し、よりハイスループット解析法となりうる線量評価デバイス開発に関する基礎的データを収集する。

4. 研究成果

令和3年度からの3年間で3つの課題に取組み、**放射線ばく露に伴うSAにおける酸化修飾応答機構を明らかにした。特にCT検査程度の100 mSv以下の低線量域でも酸化修飾応答が生じることも明らかになった。これら知見は、OMSA解析は新たな低線量被ばくの評価法となることを意味し、今後の簡便、精確かつ迅速な生物学的線量評価方法になり得る可能性を示した。**

1) 線量・線量率や照射後経過時間と血清アルブミンの酸化修飾レベルとの関連性と特異配列の同定（マウスモデル）

- インドネシア西スラウェシ州マムジュ市周辺の2つの地域、すなわち高レベルの自然背景放射線地域（high-level natural background radiation area, HBRA）であるタンデ村（総実効線量の中央値約50 mSv/年）と、通常レベルのバックグラウンド放射線地域（normal-level natural background radiation area, NBRA）であるトポヨ地区（同1.2 mSv/年）の住民の血液試料をもとに、血清成分のプロテオーム解析を行った。この分析から2つの主要な結果が得られた。一つが、同定された19個のタンパク質のうち、Apolipoprotein B-100とHemoglobin subunit alpha 1はHBRA出身の方がNBRA出身者よりも有意に低かった。これは、両分子が低線量/低線量率放射線の慢性被ばくを予測するのに使える可能性を示唆している。さらに、Complement component 6およびAlpha-1-acid glycoprotein 2の発現は、HBRA住民の個人の総有効線量と正の相関があり、その傾向は放射線量とともに増加することが確認された。

二つ目は、血清アルブミン（SA）の特定の配列における用量依存的な酸化修飾の変化である。本研究では、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計（LS-MS/MS）を用いてoxidative modification of human SA (hOMSA)の38パターンをターゲットとするMRM-HR (high-resolution multiple reaction monitoring) 法を開発し、HBRAおよびNBRA出身者の血清試料を用いてアッセイを行った。その結果、hOMSA3, hOMSA9, hOMSA24, hOMSA34の4種類が放射線被ばくに特異的であり、特にhOMSA3は放射線被ばく線量予測だけでなく放射線被ばく評価のバイオマーカーとしても利用できることが示唆された [1]。

- 単回全身照射（0.5～3.0 Gy）マウスの血清成分のプロテオーム解析を行った。その結果、6つのタンパク質に有意な線量依存性の変動が認められた。これらのタンパク質のうち、Serpin A8, Odorant-binding protein 1A, PON1は減少し、他のタンパク質は増加した。特に、Serpin A3Kの発現は用量依存的に増加した。本タンパク質とOdorant-binding protein 1Aが放射線照射による発現変動に関する報告はなく新知見である。先の報告で、LS-MS/MSを用いて線量依存的なhOMSAを報告した。マウスSAの線量依存的なOMSA応答は、慢性低線量放射線被ばくの住民と同様に単回全身照射マウスでも観察された。この研究では、*in vivo* モデルで4配列（mOMSA9, mOMSA14, mOMSA20, mOMSA41）、*in vitro* モデルで2配列（mOMSA16, mOMSA33）が線量依存的に正の相関関係を示した。しかし *in vivo* モデルでは1配列（mOMSA3）、*in vitro* モデルでは5配列（mOMSA9, mOMSA13, mOMSA23, mOMSA25, mOMSA36）が負の用量依存性相関関係を示し、mOMSAと放射線応答との相関性は、*in vivo* モデルと *in vitro* モデルで異なることが示唆された [2]。

- 先に報告したインドネシアスラウェシ島マムジュのHBRA住民の被ばく線量を再評価した結果、HBRAにおける平均総実効線量は約69.6 mSv/年（範囲は47.1 mSv/年から115.2 mSv/年）となった。そこで、LS-MS/MSによるHBRA住民の血清成分のプロテオーム解析とOMSAプロファイリングを再評価した。ヒトSAの酸化修飾配列の解析から、放射線量と12の配列、特に111番目のメチオニン残基、162番目のチロシン残基、356番目のチロシン残基、および470番目のメチオニン残基の修飾との間に有意な中等度の相関があることが明らかになった。さらに、慢性低線量放射線被ばく住民の血清中では、血清成分の15種類のタンパク質に線量依存的な変化が検出された。これらの知見は、被ばくしたヒトのSAに見られる特定タンパク質の発現量の変化や酸化修飾反応が、慢性低線量放射線被ばくの生体への影響を考える上で重要な指標となる可能性を示唆しており、放射線量推定のバイオマーカーとしての応用の可能性が示唆された。

さらに、OMSAの用量依存的プロファイルは、全身照射マウスとヒトの慢性低用量被ばくでは異なっていたが、被ばくと相関するアミノ酸残基はすべてSAのドメインIBに位置していた。酸化反応に敏感なSAのドメインが一致していることは興味深い。生命現象のすべての情報を保持する遺伝物質であるDNAは、電離放射線の重要な生物学的標的であるが、電離放射線によるタンパク質の損傷についてもより詳細に検討する必要がある [3]。

- [1] M. Yamaguchi, Y. Tatara, E.D. Nugraha, Y. Tamakuma, Y. Sato, T. Miura, M. Hosoda, S. Yoshinaga, M. Syaifudin, **I. Kashiwakura*** and S. Tokonami. Detection of biological responses to low-dose radiation in humans. *Free Radic Biol Med* 184:196-207 (2022) (IF=7.4, Q1).
- [2] M. Yamaguchi, Y. Tatara, E.D. Nugraha, Y. Sato, T. Miura, M. Hosoda, M. Syaifudin, S. Tokonami and **I. Kashiwakura***. Serum proteomic and oxidative modification profiling in total body X-irradiated mice. *Antioxidants* 11(9):1710 (2022) (IF=5.3, Q1).
- [3] M. Yamaguchi, Y. Tatara, E.D. Nugraha, Y. Tamakuma, Y. Sato, T. Miura, M. Hosoda, S. Yoshinaga, M. Syaifudin, S. Tokonami, **I. Kashiwakura***. Oxidative modification status of human serum albumin caused by chronic low-dose radiation exposure in Mamuju, Sulawesi, Indonesia. *Antioxidants*, 11(12):2384 (2022) (IF=5.3, Q1).

2) CT 検査患者血清アルブミンの酸化修飾応答の解析と特異配列の同定

弘前大学医学部附属病院・高度救命救急センターに搬送された多発性外傷患者の CT 検査前後に採血した血液を用いて、血清アルブミンの酸化修飾を解析した。コロナ禍ということで予定していた 50 検体は収集できず、約 2 年間で 28 検体を確保し、そのうち照射線量が明確に特定出来た 21 検体についてプロテオーム及び OMSA 解析を行った。プロテオーム解析からは 434 種類のタンパク質が定量され、そのうち 44 種類が CT 検査前後に有意差が認められた。また OMSA 解析からは、15 箇所のペプチド配列に有意差が認められた。このうちインドネシアスラウェシ島マムジュで見出された配列のうち hOMSA9 に有意差が認められたが、hOMSA3, hOMSA24 及び hOMSA34 には差がなかった。CT 検査前後では特に hOMSA13, hOMSA20 及び hOMSA28 に P 値が 0.01 以下の有意差を認めた。また hOMSA23 は被ばく線量と最も高い相関を示した。この OMSA はインドネシアサンプルで有意差があった hOMSA24 と同じペプチド領域であった。

今後さらに検体数を増やし、他の OMSA の線量依存性を確認すると共に、学会発表や論文投稿による情報発信を予定している。

3) 特異配列ペプチドに対するモノクローナル抗体作製と、生物線量評価法として線量依存性及び障害予測の検証

インドネシアスラウェシ島マムジュ地区 HBRA 住民の解析から判明した OMSA のうち、hOMSA9 と hOMSA34 ペプチド配列に対するモノクローナル抗体作成を試薬企業の 1 つであるコスモバイオ(株)に委託したが、結果として ELISA アッセイ系の構築までは到達出来なかった。

そこで、安定同位体 (stable isotope, SI) を用いた LS-MS/MS による絶対定量法の確立を目指した。SI ラベル化ペプチドを用いて測定した絶対定量値でも、hOMSA9 では有意差が認められ、酸化修飾されていないペプチドのピーク面積値でノーマライズした半定量値のデータと同様の結果だった。一方で、半定量値のデータと同様に絶対定量値のデータでも被ばく線量と OMSA9 及び OMSA34 との間に相関性は認められなかった。この課題解決においても、検体数を増やした解析が必要であり、現在追加検体の確保に向けた倫理申請を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamaguchi Masaru, Tatara Yota, Nugraha Eka Djatnika, Ramadhani Dwi, Tamakuma Yuki, Sato Yoshiaki, Miura Tomisato, Hosoda Masahiro, Yoshinaga Shinji, Syaifudin Mukh, Kashiwakura Ikuo, Tokonami Shinji	4. 巻 184
2. 論文標題 Detection of biological responses to low-dose radiation in humans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 196 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Yoshiaki, Yamaguchi Masaru, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 12
2. 論文標題 An Analysis of the Serum Metabolomic Profile for the Radiomitigative Effect of the Thrombopoietin Receptor Agonist Romiplostim in Lethally Whole-Body-Irradiated Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 161 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo12020161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nugraha Eka Djatnika, Hosoda Masahiro, Kusdiana, Untara, Mellawati June, Nurokhim, Tamakuma Yuki, Ikram Abarrul, Syaifudin Mukh, Yamada Ryohei, Akata Naofumi, Sasaki Michiya, Furukawa Masahide, Yoshinaga Shinji, Yamaguchi Masaru, Miura Tomisato, Kashiwakura Ikuo, Tokonami Shinji	4. 巻 11
2. 論文標題 Comprehensive exposure assessments from the viewpoint of health in a unique high natural background radiation area, Mamuju, Indonesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93983-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokonami Shinji, Miura Tomisato, Akata Naofumi, Tazoe Hirofumi, Hosoda Masahiro, Chutima Kranrod, Kudo Hiromi, Ogura Koya, Fujishima Yohei, Tamakuma Yuki, Shimizu Mayumi, Kikuchi Kazutaka, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 50
2. 論文標題 Support activities in Namie Town, Fukushima undertaken by Hirosaki University	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of the ICRP	6. 最初と最後の頁 102 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/01466453211006806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsujiuchi Takakiyo, Suzuki Yoko, Sakamoto Mizuki, Narumi Kazuki, Ito Katsuhiro, Yasuda Hiroshi, Tokonami Shinji, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Simulation study on radiation exposure of emergency medical responders from radioactively contaminated patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85635-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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 山口平、柏倉幾郎
2. 発表標題 致死線量放射線ばく露個体に対する国内承認薬ロミプロスチム及び細胞外小胞の放射線緩和効果
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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 放射線被ばくを検出するためのバイオマーカー	発明者 柏倉幾郎、床次眞司、多田羅洋太、E.D. Nugraha他	権利者 弘前大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/026902	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	多田羅 洋太 (Tatara Yota) (00443995)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	
研究分担者	山口 平 (Yamaguchi Masaru) (00782822)	弘前大学・保健学研究科・助教 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	伊藤 勝博 (Ito Katsuhiro) (20322951)	弘前大学・災害・被ばく医療教育センター・教授 (11101)	
研究分担者	辻口 貴清 (Tsujiyuchi Takakiyo) (90737454)	弘前大学・災害・被ばく医療教育センター・助教 (11101)	

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