

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17887

研究課題名(和文)放射線誘発組織障害に対する組織修復幹細胞の治癒効果と分泌小胞の関与

研究課題名(英文) Mitigative effect of tissue repair stem cells and their secretory vesicles against radiation-induced tissue damage

研究代表者

山口 平 (Yamaguchi, Masaru)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：00782822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：放射線緩和剤ロミプロスチムを処置した致死線量放射線全身被ばく露マウスの脾臓では被ばく後に間葉系間質・幹細胞の増加が認められた。被ばく後に細胞外小胞(EVs)を回収し別の被ばく個体へ投与したところ、高い救命効果が認められた。そのEVsにはmiR-144-5pが高発現しており、EVsが脾臓もしくは肺から放出されている可能性が高い。KEGGパスウェイ解析ではHippo signal pathwayが、Gene Ontology解析では細胞死促進に関するGo termが候補に挙がり、miR-144-5pは細胞死誘導に関与する遺伝子群を標的とすることで放射線障害の軽減に寄与している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後の原子力の安全利用や福島第一原発を含めた廃炉作業、将来の宇宙開発や核テロの脅威等に対し、放射線被ばくへの適切な医療安全対策は必須である。グローバルな観点からみても原子炉の数は増え続ける一方であり、人類は放射線事故や放射線被ばくのリスクと常に隣り合わせにある。細胞外小胞には、由来する細胞の種類に依存した多様な種類の分子が含まれ、放射線損傷又は障害軽減応答に特異的な分子が内在している可能性があり、生体内分子を緊急被ばく医療対策に応用することを視野に入れた新たなアプローチとなる。

研究成果の概要(英文)：In cases of accidental high-dose total-body irradiation (TBI), acute radiation syndrome (ARS) can cause death. We investigated the radio-mitigative effects of extracellular vesicles (EV) on mice with severe ARS. C57BL/6 mice exposed to lethal TBI were treated with romiplostim (RP), and the EVs were isolated from the serum and intraperitoneally injected into other mice with severe ARS. The 30-day survival rate of lethal TBI mice drastically improved by 50-100% with the administration of EVs in the sera collected weekly from the mice in which radiation damage was alleviated and mortality was avoided by the administration of RP. Four responsive miRNAs showed significant expression changes in an array analysis. In particular, miR-144-5p was expressed only in the EVs of RP-treated TBI mice. Specific EVs may exist in the circulating blood of mice that escaped mortality with an ARS mitigator, and their endogenous molecules may be the key to the survival of mice with severe ARS.

研究分野：放射線科学、放射線生物学、放射線防護、被ばく医療

キーワード：急性放射線症候群 細胞外小胞 マイクロRNA 緊急被ばく医療 被ばく個体救命

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 今後の原子力の安全利用や福島第一原発を含めた廃炉作業、将来の宇宙開発や核テロの脅威等に対し、放射線被ばくへの適切な医療安全対策は国民の安心・安全に直結する国家的な命題である。グローバルな観点からみても原子炉の数は増え続ける一方であり、人類は放射線事故や放射線被ばくのリスクと常に隣り合わせにある。高線量放射線ばく露により免疫抑制や多臓器不全を特徴とする急性放射線症候群 (ARS) が発症する可能性があるが、現在でも個々の被ばく線量や重症度を特定する明確な診断法及びその治療法や予防戦略は限られている。

(2) ARS に対する医療対策確立の取り組みは 60 年以上も前から行われてきたが、致死線量の電離性放射線ばく露に対する有効かつ安全な対策は限られた数しか米国食品医薬品局 (FDA) に承認されていない。これらの取り組みの中で、国立アレルギー感染症研究所 (NIAID) が後援した研究では、もともと免疫性血小板減少症の治療のために 2008 年に認可されたアムジェン社の Nplate (ロミプロスチム; RP) の投与によって、致死線量放射線ばく露された前臨床モデルにおける血小板数の増加と生存率の向上が実証された。申請者らの研究グループにおいても、RP の ARS 緩和剤としての有効性を世界で初めて報告し、致死線量放射線ばく露個体の劇的な生存率の改善とともに多くの知見を得た (例: DNA 損傷修復の強化と抗酸化ストレス応答性転写因子の発現、造血組織における巨核球造血および間葉系間質/幹細胞 (MSC) の増加、血管内皮損傷の抑制、など)。これらは、“Animal Rule” に基づいて実施された一連の動物実験によって、造血系 ARS に対する放射線医療対策として FDA によって承認されたが、血中半減期がわずかに数十時間しかない RP の放射線軽減効果と救命効果の詳細な作用メカニズムは依然として不明であった。

(3) 近年の細胞生物学の進展により、エクソソームに代表される様々な細胞が分泌する直径 40 ~ 200 nm 程度の細胞外小胞 (EV) 内に、核酸やタンパク質等様々な分子が含まれ、近接又は遠距離細胞間の情報伝達に関与し、免疫応答、炎症反応、血液凝固反応等の生体現象を調節していることが明らかになってきた。細胞外小胞は、血中等でも分解されにくく安定的に存在し、小胞内部の mRNA や miRNA は別の細胞が取り込んだ後も機能する、といった性質が報告されている。放射線被ばくとそれに伴う EV 放出には様々調査されており、放射線被ばく後の血清 miRNA 発現が放射線被ばくのバイオマーカーとして有効であること、EVs を介した miRNA 転移が放射線誘発バースタンダー効果に関与していること、さらに MSC 由来の EV が ARS マウスモデルの生存率を改善させる、等報告されている。したがって、ARS 緩和剤としての RP の作用メカニズムは、放射線ばく露個体の細胞損傷修復や血小板産生等だけでなく、放射線障害軽減情報を反映させた EV とその内在分子が存在していると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、放射線誘発組織障害に対する EV の機能及び内在性因子との関与を検討し、新たな放射線被ばく治療戦略としての可能性を見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 8週齢の雌 C57BL/6JcI マウスに致死線量放射線照射 (TBI、X線 6.5 Gy、線量率 0.622 Gy/min、管電圧 160 kV、管電流 3 mA、1.0 mmAl フィルタ) 後、放射線緩和剤として RP (投与量 50  $\mu$ g/kg/day) を照射直後から 1日1回3日間連続で腹腔内投与した。また、比較対象として放射線防護剤アミフォスチン (AMF、投与量 150 mg/kg/day) を照射 30分前に単回投与、薬剤調製に使用した生理食塩水 (NSS) は照射直後から 1日1回3日間連続で腹腔内投与した。

(2) TBI 後 7、14、21、28 日目に、イソフルラン吸入液使用下でマウスから血清を回収し、MagCapture Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて EV を精製した。得られた EV の総タンパク質含有量を Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit を用いて測定し、その値をもとに FluoroCet Exosome Quantitation Kit を用いて EV 回収量を推定した。また、回収した EV の純度測定のため、CD9、CD63、CD81 といった EV の膜表面タンパク質を PS Capture Exosome Flow Cytometry Kit を用いて解析した。8週齢の雌 C57BL/6JcI マウスに (1) と同条件で X 線を照射し、回収した EV を 1日1回3日間連続で腹腔内投与した。1回当たりの EV の投与量は、約  $10^6 \sim 10^7$  粒子/100  $\mu$ L NSS とした。

(3) EV から microRNA Extractor SP Kit を用いて miRNA を抽出した。回収した RNA 濃度は、NanoDrop 分光光度計を用いて評価し、低分子 RNA のピークと濃度は Agilent 2100 Bioanalyzer および Agilent RNA 6000 Pico Kit を用いて確認した。Agilent miRNA マイクロアレイ解析を行ったうえ、発現プロファイリングは GeneSpring GX14.9 software にて実施し、TaqMan MicroRNA assay によりその再現性を検証した。さらにオンラインデータベースを用いたバイオインフォマティクス解析により、関連パスウェイ、生物学的機能情報、及び標的遺伝子を予測した。

### 4. 研究成果

(1) TBI 後 7、14、21、28 日目に RP 投与個体から EV 精製用サンプルとして血清を回収し、EVs を抽出後 (それぞれ D7-EV、D14-EV、D21-EV、D28-EV) 別の TBI 個体に投与して 30 日間生存率を評価した (図 1)。比較対象として EV の希釈に用いた NSS を投与した場合 16 日目までに全個体が死亡した一方、TBI+D7-EV、TBI+D14-EV、および TBI+D28-EV 投与個体の 30 日生存率はそれぞれ 100%、50%、および 75% (すべて  $P < 0.05$ )。TBI+D21-EV 投与個体の 30 日生存率は 50% だったが統計的有意差はなかった。

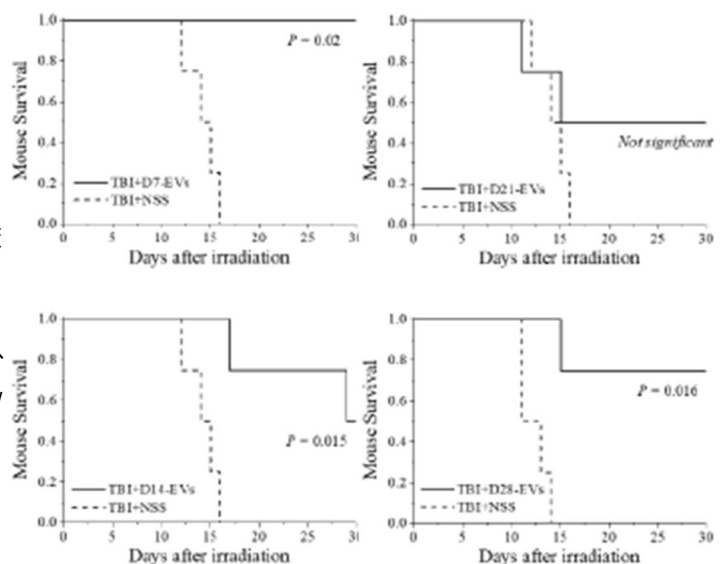


図 1 EVs による放射線ばく露個体救命効果

(2) 他の回収日に採取された EV と比較して D7-EV が TBI 個体に対して高い救命効果を示した

こと、また比較対象として EV の希釈に用いた NSS を投与した個体からも EV を回収できるタイミングであることから、TBI 後 7 日目に焦点を当て生存率の追加検証を行った。RP 投与した TBI 個体 (TBI+RP) に加えて、NSS 投与した個体 (0 Gy+NSS)、RP 投与した個体 (0 Gy+RP)、NSS 投与した TBI 個体 (TBI+NSS)、および AMF を事前投与した TBI 個体 (AMF+TBI) から照射後 7 日目に EV を回収し、それぞれを別の TBI 個体に投与して 30 日間生存率を評価した (図 2)。TBI+RP EV を投与した TBI 個体の 30 日間生存率は 75% まで改善した一方で ( $P < 0.05$ )、0 Gy+NSS EV、0 Gy+RP EV、TBI+NSS EV、および AMF+TBI EV を投与した TBI 個体の 30 日間生存率は 25% であったが統計的有意差はなかった。これらの結果は、ARS 緩和剤治療により死亡を免れたマウスの循環血液中に存在する EV が、放射線障害の軽減と生存率の改善に寄与している可能性を示唆した。

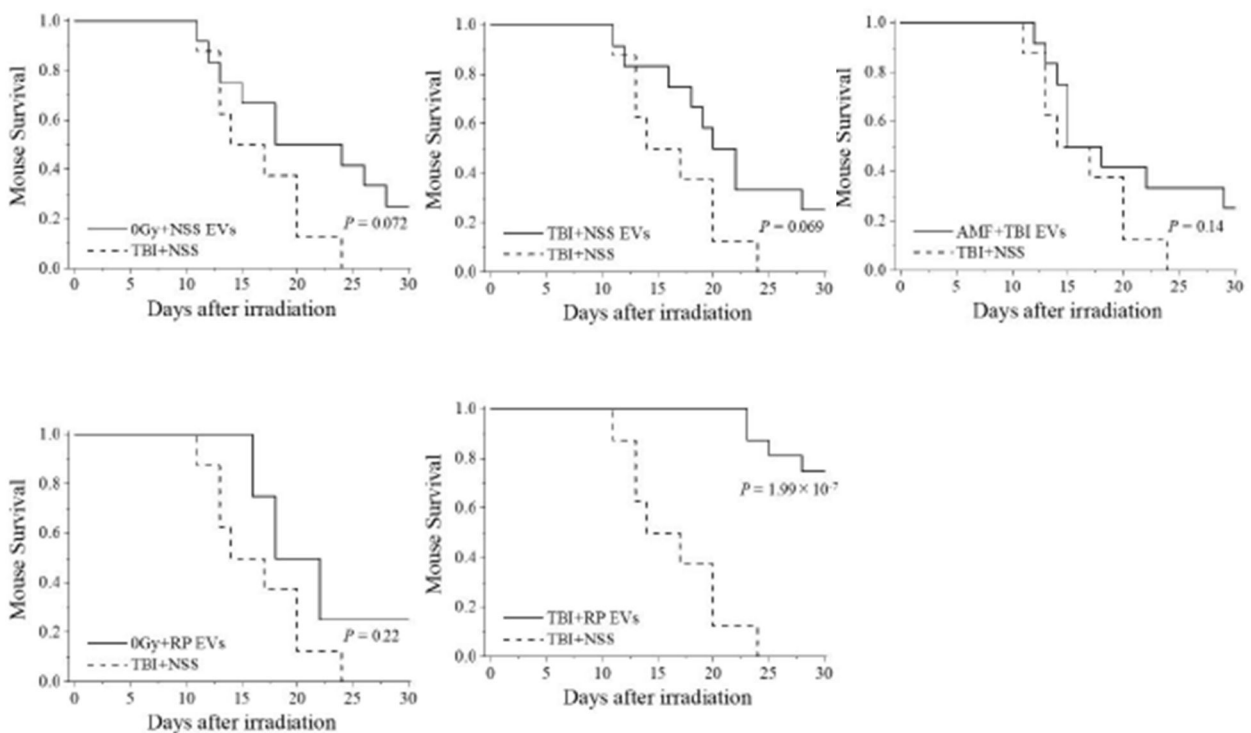


図 2 照射後 7 日目に回収した EV の放射線ばく露個体救命効果の比較

(3) 被ばく個体の救命効果に寄与する EV の内因性分子を解明するため、miRNA に焦点を当てた。TBI 個体に救命効果を示した TBI+RP EV およびその比較対象として救命効果を示さなかった TBI+NSS EV から miRNA を抽出し、両 EV における miRNA 発現の違いを確認するため Agilent マウス miRNA マイクロアレイアッセイを実行した (図 3)。その結果、 $P > 0.05$  かつ 2 倍以上の発現変動を満たす 14 種類の miRNA が同定され、特に miR-144-5p は救命効果を示した TBI+RP EV に、miR-6354 は救命効果を示さなかった TBI+NSS EV にのみ含まれていた (TBI+RP EV には miR-6354 は含まれず、同様に TBI+NSS EV には miR-144-5p が含まれていなかった)。RT-qPCR 解析による発現パターンの検証でも、その再現性が認められた。これら miRNA が、重度の ARS を患うマウスの放射線障害の軽減と生存率の向上に寄与している可能性が示唆された。

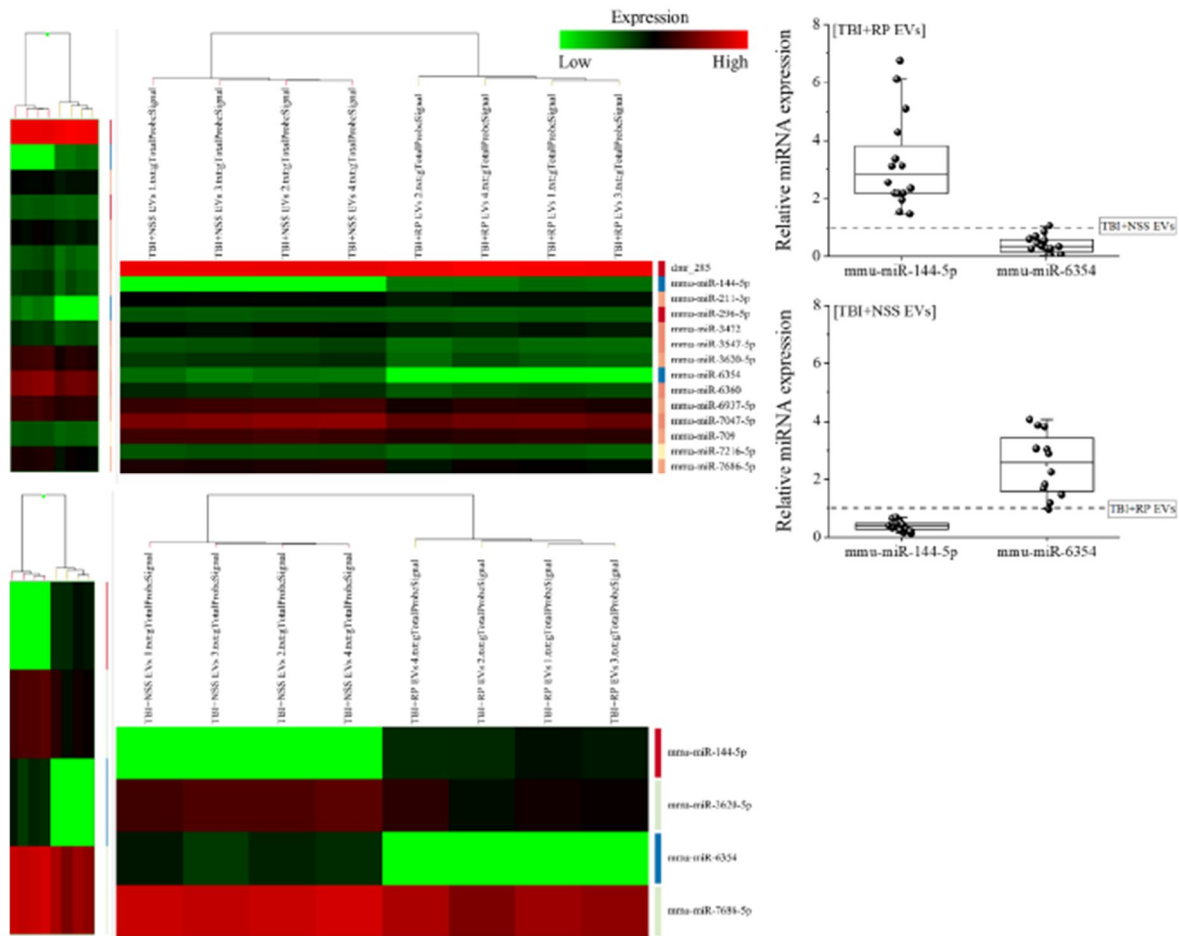


図3 EVに含まれるmiRNAの同定とその発現検証

(4) miR-144-5pの生体内での機能を推定するため、4つのオンラインデータベース(miRDB、microT、TargetScan、miRmap)を使用して、miRNAの標的遺伝子と各臓器におけるその標的遺伝子の発現レベルを予測したところ、脳で最も多く、次いで肺と脾臓となった(図4)。照射後7日目にTBI+RP個体の臓器(脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、十二指腸、大腿骨)中のmiR-144-5p発現を解析すると、脾臓と肺でmiR-144-5pの発現量が高く、miR-144-5pを含むEVがこれらの臓器から放出されていると考えられる。KEGGパスウェイ解析ではHippo signal pathwayが、Gene Ontology解析では細胞死促進に関するGo termが候補に挙がり、放射線障害軽減メカニズムの1つとして、miR-144-5pが細胞死誘導に関与する遺伝子を標的として抑制し、放射線障害の軽減にも寄与している可能性が示唆された。

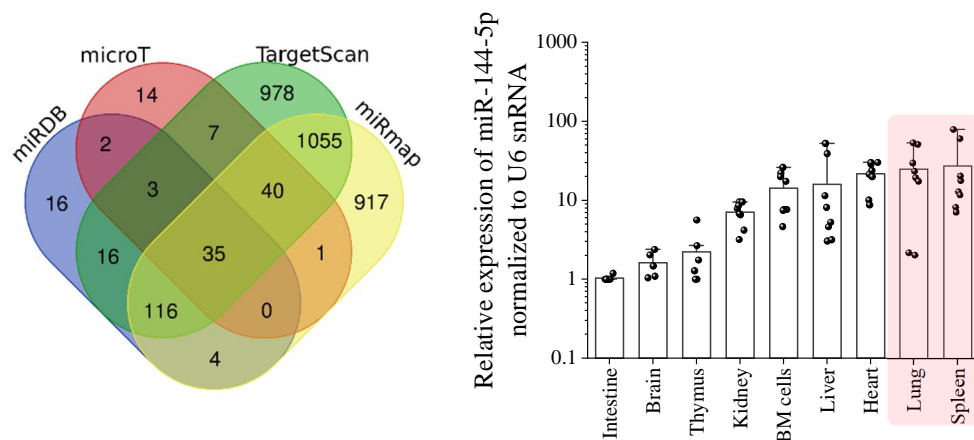


図4 miR-144-5pのバイオインフォマティクス解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamaguchi Masaru, Tatara Yota, Nugraha Eka Djatnika, Tamakuma Yuki, Sato Yoshiaki, Miura Tomisato, Hosoda Masahiro, Yoshinaga Shinji, Syaifudin Mukh, Tokonami Shinji, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Oxidative Modification Status of Human Serum Albumin Caused by Chronic Low-Dose Radiation Exposure in Mamuju, Sulawesi, Indonesia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 2384 ~ 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11122384	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 Yamaguchi Masaru, Tatara Yota, Nugraha Eka Djatnika, Sato Yoshiaki, Miura Tomisato, Hosoda Masahiro, Syaifudin Mukh, Tokonami Shinji, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum Proteomic and Oxidative Modification Profiling in Mice Exposed to Total Body X-Irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1710 ~ 1710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11091710	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 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 Sato Yoshiaki, Kashiwakura Ikuo, Yamaguchi Masaru, Yoshino Hironori, Tanaka Takeshi, Ikeda Ken, Ye Zhengmao, Komatsu Hirotsugu, Matsuzaki Takao, Hosoda Masato	4. 巻 18
2. 論文標題 Discovery of a Novel Small-molecule Interleukin-6 Inhibitor Through Virtual Screening Using Artificial Intelligence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 694 ~ 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1573406418666211116144243	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 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 1-16
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 Sato Yoshiaki, Yoshino Hironori, Ishikawa Junya, Monzen Satoru, Yamaguchi Masaru, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Prediction of hub genes and key pathways associated with the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells using integrated bioinformatics methods	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-37981-6	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 Yamaguchi Masaru, Kashiwakura Ikuo	4. 巻 13
2. 論文標題 The Acute Radiation Syndrome-Mitigator Romiplostim and Secreted Extracellular Vesicles Improved Survival in Mice Acutely Exposed to Myelosuppressive Doses of Ionizing Radiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 837 ~ 837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13050837	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10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山口平、他
2. 発表標題 細胞外小胞がもたらす致死線量放射線ばく露個体救命効果の基礎的検討
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 第59回生物部会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口平、他
2. 発表標題 ヒト血清タンパク質の酸化修飾に着目した慢性低線量放射線被ばく線量の検出
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura
2. 発表標題 Radio-mitigative effect of domestically approved drug Romiplostim and Extracellular Vesicles on mice exposed to lethal high-dose ionizing radiation
3. 学会等名 2021 KIRAMS-Hirosaki University Webinar on Radiation Emergency Medicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口平、他
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



1. 発表者名 Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura
2. 発表標題 The acute radiation syndrome mitigator Romiplostim and secreted extracellular vesicles improved survival in mice acutely exposed to myelosuppressive doses of ionizing radiation
3. 学会等名 online seminar for graduate students to exchange their academic information in the fields of radiation protection and/or radiation medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura
2. 発表標題 Mechanism of action of the thrombopoietin receptor agonist romiplostim in reducing radiation injury.
3. 学会等名 The 17th International Congress for Radiation Research (ICRR2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura
2. 発表標題 The acute radiation syndrome mitigator Romiplostim and secreted extracellular vesicles improved survival in mice acutely exposed to myelosuppressive doses of ionizing radiation
3. 学会等名 韓国原子力医学院 & 台湾・長庚記念醫院 & 弘前大学合同セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura
2. 発表標題 Radiation dose-dependent oxidative modification response of serum albumin
3. 学会等名 韓国原子力医学院 & 台湾・長庚記念醫院 & 弘前大学合同セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiaki Sato, Masaru Yamaguchi, Ikuo Kashiwakura
2. 発表標題 Prediction of hub genes involved in radiation response of hematopoietic stem/progenitor cells derived from human placental/umbilical cord blood
3. 学会等名 韓国原子力医学院 & 台湾・長庚記念醫院 & 弘前大学合同セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口平、他
2. 発表標題 Detection of biological responses to low-dose radiation in humans
3. 学会等名 第60回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 放射線被ばくバイオマーカー及び治療剤	発明者 山口平、柏倉幾郎	権利者 弘前大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-201663	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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

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