

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82629

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22590571

研究課題名（和文）：放射線被ばくのバイオマーカーとしてのメタロチオネインアイソフォーム遺伝子の利用

研究課題名（英文）：Experimental verification for utilization of expression profiles of human metallothionein isoforms as a biomarker for X-ray irradiation

研究代表者：三浦 伸彦（労働安全衛生総合研究所・健康障害予防研究グループ・主任研究員）
研究者番号：20229644

研究成果の概要（和文）：

放射線被ばくのバイオマーカーとしてヒトメタロチオネインアイソフォーム遺伝子の利用を考え、ヒト培養細胞に X 線を照射（1 Gy～16 Gy）して 24 時間後のメタロチオネイン遺伝子の発現パターンを調べた結果、メインアイソフォームである MT-2A や MT-1X などほとんどのアイソフォームが抑制を受ける一方、マイナーアイソフォームである MT-1H 及び MT-4 は明らかに誘導されることを見出した。今までに知られる金属や酸化ストレスによる発現パターンとは明らかに異なり、X 線被ばくのバイオマーカーになる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the expression profile(s) of human metallothionein isoform genes after X-ray irradiation, human cultured cells irradiated by X-ray (1 Gy to 16 Gy) were collected at 24 h after the irradiation. The expression levels of each gene were estimated by real-time PCR. Most of isoform genes including the main isoform genes such as MT-2A and MT-1X were inhibited of their expression, while induced of them for MT-1H and MT-4. This expression pattern was different from the induction pattern by heavy metals, suggesting be a biomarker for X-ray irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：放射線・メタロチオネイン・バイオマーカー

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

わが国における放射線作業従事者 45 万人のうち、作業人口の最も多い職業は医療関係の 23 万人であり、その数は原子力産業（8 万人）を大きく上回る。また多量の被ばくは医療従事者に多い（平成 18 年度・原子力安全基盤機構調べ）。そこで我々は国内病院における循環器内科医師への被ばく量実態調査を行った。その結果、防護衣の内側においても相当量の被ばくを検出した。このレベルは電離放射線障害防止規則による年間線量限度（50 mSv）を超える恐れがあり、生体影響を考慮すべきと考える。しかし放射線被ばくの簡便かつ精度の高いバイオマーカーは開発されていないのが現状である。

ところで我々は、重金属毒性をはじめ放射線などの酸化ストレスに対する重要な生体防御因子であるメタロチオネインに注目し、メタロチオネイン遺伝子の発現がこれら外的ストレスにより転写誘導されることから、メタロチオネイン遺伝子の発現変動をバイオマーカーとして利用する可能性を考えてきた。着眼点として以下の 3 点が挙げられる。

(1)メタロチオネイン遺伝子は放射線照射によって転写誘導される、(2)ヒトには多くのメタロチオネインアイソフォーム遺伝子が存在し、負荷する外的ストレスによってそれらの誘導パターンが異なる、(3)複数のバイオマーカーを測定することによりばく露量および、ばく露程度を推測するための精度が高まると期待される。

以上のことから、ヒトメタロチオネインアイソフォーム遺伝子の発現変動を放射線被ばくのバイオマーカーとして利用することを計画した。

2. 研究の目的

ヒトには 10 種類以上のメタロチオネインアイソフォーム遺伝子が存在する。しかし放射線被ばくによる個々のメタロチオネインアイソフォームの発現誘導を詳細に検討した例は無い。既に我々はこれらヒトメタロチオネインアイソフォーム遺伝子（10 種）を特

異的に増幅するプライマーを設計し、リアルタイム PCR 法により各アイソフォーム遺伝子の発現量を定量する方法を確立している。そこで本研究では X 線照射によるメタロチオネインアイソフォームの発現パターンを解析するために、ヒト培養細胞を用いて X 線照射後の個々のメタロチオネインアイソフォーム遺伝子の発現量を定量する。得られた結果をパターン化することにより、ヒトメタロチオネインアイソフォーム発現量の、放射線バイオマーカーとしての可能性を探る。

また骨髄中メタロチオネイン量を増加させることで、放射線の骨髄障害が防止できることを我々は既に明らかにしている。上記の解析から、放射線照射により効率良く転写誘導されるアイソフォームが明らかになれば、そのアイソフォームは放射線障害を効率的に防御すると考えられる。そこで当該アイソフォームを高発現した細胞を作製し放射線防御能を確認すると共に、そのアイソフォームを効率良く誘導する物質の検索を行うことで効率的な放射線防護剤の開発を試みる。

3. 研究の方法

細胞はヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用い、10%ウシ血清(CS)を含む D'MEM 培地で維持をした。またヒト白血病細胞(HL-60 細胞)およびヒトリンパ芽球細胞(TK6 細胞)についても検討したが、それぞれの細胞は 10%ウシ胎児血清(FCS)含有 RPMI1640 培地あるいは 10%ウシ胎児血清(FCS)含有 D'MEM 培地で維持・照射を行った。

照射実験は、HeLa 細胞を 35 mm ディッシュに 5×10^5 細胞播種し、24 時間後に X 線を照射（1 Gy～16 Gy）してその 6 時間後あるいは 24 時間後に細胞から RNA を抽出した。照射実験は放射線医学総合研究所（放医研）の協力のもと、放医研設置の X 線発生装置 TITAN-320 型 (ISOVOLT)を使用した。線量率は 3.45 Gy/min で、照射は室温で行った。対照群として非照射のディッシュを用意し、照射時には X 線発生装置室まで運搬して照射群と同様の時間を CO₂インキュベーター外に置き

た。RNA 抽出は自動 RNA 抽出装置 MagNA Pure (Roche 社製)を用い、RNA 抽出時には細胞に MagNA Pure 専用の RNA 抽出溶解液を加えて溶解した。得られた RNA を逆転写反応により cDNA とした後、10 種類のヒトメタロチオネインアイソフォーム遺伝子 (1A, 1B, 1E, 1F, 1G, 1H, 1X, 2A, 3 and 4) について、それぞれの発現量をリアルタイム PCR 装置 (LightCycler 480; Roche 社製)を用いて解析した。

細胞生存率は、セパレート型 96 穴プレート (ビーエム機器)に 1×10^4 個の細胞を播種して、その 24 時間後に X 線を照射し、照射 24 時間後に Alamar Blue 試薬 (ミトコンドリアの還元能を利用; life technologies) を培地の 1/10 量添加して 1 時間後の蛍光強度を測定することで調べた。なお、照射時にはセパレートした各スリットに通気性タイプのプレート用シール (AeraSeal; ビーエム機器) を貼付し落下細菌等のコンタミネーションを防いだ。

4. 研究成果

我々はヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞を用い、重金属によるヒトメタロチオネイン遺伝子の誘導パターンは既に掴んでいる。そこで本研究では、放射線被ばくの生体影響を知るバイオマーカーとしての可能性を探るために、HeLa 細胞に X 線照射後の各メタロチオネインアイソフォーム遺伝子の変動を解析し、重金属曝露による誘導パターンと比較した。

先ず医療現場での被ばく線量を考慮し、低線量域(30~100 mGy)および高線量域(2~8 Gy)照射後の発現解析を行った。重金属では添加 6 時間後にはメタロチオネイン遺伝子の顕著な誘導が認められることから、照射 6 時間後の発現量を解析した。ヒトメタロチオネインのメインアイソフォームである MT-2A および MT-1X は重金属による誘導が著しいことから、これらアイソフォームを指標に解析を進行させたが、本検討における照射条件ではいずれのアイソフォームも発現量はほとんど変化せず、対照群との有意な差は認められなかった。なおこの時、照射 24 時間後に調べた細胞生存率は最高照射量 8 Gy で約

85%であった。ところで細胞の培地に含まれるフェノールレッドは抗酸化作用を示すことが知られている。放射線の間接作用としてフリーラジカルの関与が知られているが、培地中フェノールレッドがフリーラジカルを消去するためにメタロチオネインの発現誘導が生じない可能性がある。そこでフェノールレッド不含の D'MEM 培地を購入し、同様に 30 mGy~8 Gy での照射実験を行ったが、この条件においても MT-2A, MT-1X の誘導は観察されなかった。なお、培地中の血清たんぱく質が放射線の間接作用を減弱させる可能性から、無血清培地で照射を行う系も頻繁に行われているが、*in vivo* の系を考慮すると無血清条件は極端な実験系であり、本研究では検討は加えなかった。次に放射線によるメタロチオネイン誘導が重金属ほど迅速ではない可能性を考え、同様の照射量 (30 mGy~8 Gy) で照射 24 時間後の MT-2A, MT-1X の変動を調べた。その結果、両アイソフォーム遺伝子は生じたが、誘導ではなくむしろ発現量が抑制される傾向にあることが判明した。

そこで照射量を上げ、1 Gy~16 Gy の照射量で照射 24 時間後のメタロチオネイン遺伝子発現量を調べた。その結果、16 Gy の照射により MT-2A および MT-1X の発現量は有意に抑制された (それぞれ約 45%及び約 40% : 図 1-a)。従って X 線照射によりこれらのアイソフォームの発現はむしろ抑制を受けると結論付けた。なお、発現抑制が認められた照射量での細胞生存率は 85%以上であり (図 1-b)、また mRNA 量の内在性コントロールとして定量した b-アクチンの mRNA 量は 16 Gy 照射で対照群の 98%程度であったことから、MT-2A および MT-1X の発現抑制は細胞障害による可能性は低いと考えられる。ところで本検討では MT メインアイソフォームの誘導条件を見出す必要があると考え、解析費用の面から他のマイナーアイソフォームの解析を見合わせていた。しかしメインアイソフォームは発現抑制を受けると結論付けたことから、次に、得たサンプルについてマイナーアイソフォーム遺伝子について発現量の定量解析を行った。その結果、メインアイソフォーム (MT-2A, および MT-1X) が抑制を受ける 16 Gy の照射量で、MT-1H 及び MT-4

の明らかな誘導が認められた (図 1-a)。

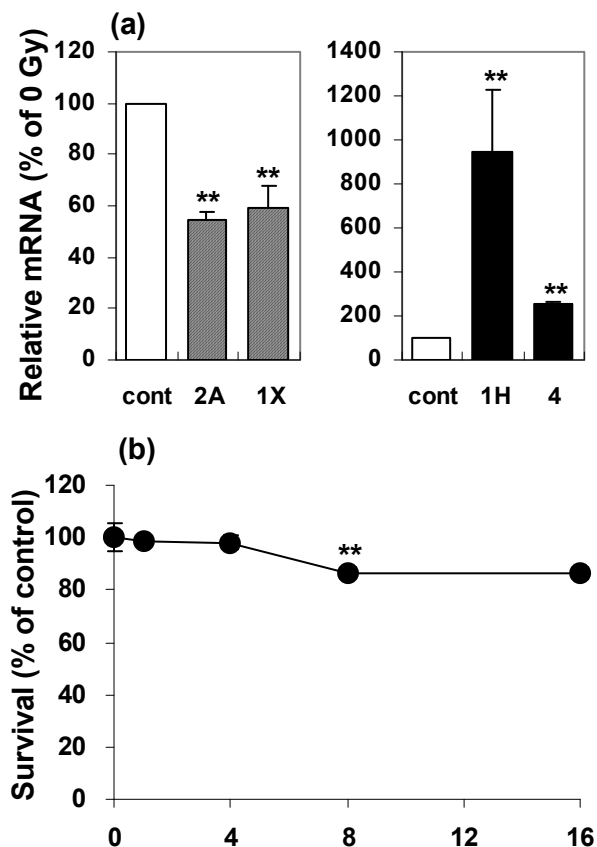


図1 X線照射24時間後のメタロチオネインアイソフォームmRNA量(a)、及び細胞生存率(b)

**： 各対照群に対する有意差(p<0.01)

例えば我々が既に検討を加えてきたカドミウムでは、程度の差はあるものの全てのMT アイソフォーム遺伝子の発現が誘導される。しかしX線照射では、抑制アイソフォーム(MT-2A, -1X)、無変動アイソフォーム(MT-1G)、誘導アイソフォーム(MT-1H, MT-4)に分類された。この結果は、MT アイソフォームの発現パターンがX線照射による生体影響を反映するバイオマーカーになる可能性を示す。なお、ヒト白血病細胞(HL-60細胞)およびヒトリンパ芽球細胞(TK6細胞)について同様の検討を加えたが、TK6細胞ではMT-1H, MT-4を含むマイナーアイソフォームをほとんど検出できず、またHL-60細胞ではMT-1Hの発現はHeLa細胞と同様に誘導傾向にあったものの、MT-4の検出が困難であった。これらの細胞を用いる場合、あるいはヒトへの応用を考える場合、検出感度を高める

工夫(スタートマテリアルとしてのRNA量を増やす、PCR条件を変えるなど)が必要と考えられる。さらに、MT-1H及びMT-4はX線照射により効率良く転写誘導されるアイソフォームであり、放射線障害を効率的に防御する可能性がある。その可能性を確かめるために、それぞれのアイソフォームを高発現した細胞を作製しており、現在複数コロニーを得ている段階である。各アイソフォームの発現量を確認した上で放射線防御能を調べていくが、本研究のフォローアップとして進め、一定の段階で論文にまとめ成果を発信する予定である。なお、医療現場での発現パターン解析は共同研究者(元研究分担者：木村真三)の所属先変更に伴い実施が困難となり、本研究期間では実現しなかった。

放射線被ばく量の測定はガラスバッジ等を用いて可能であるが、被ばくによる生体影響程度を知るための簡便なばく露影響指標(バイオマーカー)は現時点で開発されていない。本研究で見出した、メインアイソフォーム(MT-2A, MT-1X)は抑制されるがマイナーアイソフォーム(MT-1H, MT-4)は誘導されるというパターンは重金属による変動パターンとは明らかに異なっている。従って今後さらに詳細な検討を加えることで、メタロチオネインアイソフォーム遺伝子発現パターンの利用が放射線被ばくによる生体影響を知るバイオマーカーの一つの候補となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[研究発表] (計1件)

生体と金属・化学物質に関する研究会(2011)、三浦伸彦、放射線ばく露のバイオマーカーとしてのメタロチオネイン発現

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 伸彦 (Miura Nobuhiko)

労働安全衛生総合研究所・健康障害予防研究グループ・主任研究員

研究者番号：20229644