

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670264

研究課題名(和文) 体液中エキソソーム内在性RNAによる新たな迅速内部被ばく線量評価法の開発

研究課題名(英文) The development of novel internal radiation dosimetry using circulating exosomal RNAs into body fluids

研究代表者

千葉 満 (Chiba, Mitsuru)

弘前大学・保健学研究科・講師

研究者番号：20583735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では放射線被ばくさせたマウス血清中で著しく増加するmicroRNAの探索を行った。マウスに7GyのX線を照射後に血清分離を行った。得られた血清からRNAを抽出してmicroRNAマイクロアレイを行い、発現変化を比較した。その結果、X線非照射群(0Gy)に比べて、X線照射群(7Gy)の血清において1.5倍以上変化するmicroRNAは58個存在した。これらのうち血清中miR-375-3pは7GyのX線照射後24時間、48時間、72時間後にそれぞれ1.9倍、5.4倍、12.7倍増加した。このことは血清中miR-375-3pが放射線被ばくにおけるバイオマーカー候補になることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to identify increasing serum microRNAs within three days using mice exposed to ionizing radiation (IR). The sera of mice were collected at 24 h, 48 h, and 72 h after exposure to a 7 Gy dose of X-ray irradiation. The microRNAs extracted from the sera were labeled with Cyanine-3 (Cy3) fluorescent dye, and the profiles of microRNA expression in the sera were performed using the Agilent SurePrint G3 Mouse microRNA microarray slide and Cy3-labeled microRNAs. Fifty-eight microRNAs were found to be expressed differentially in the sera of IR-exposed mice (7 Gy), with a magnitude of more than 1.5-fold change as compared to the sera of IR-unexposed mice (0 Gy). Among them, miR-375-3p increased 1.9-, 5.4-, and 12.7-fold change at 24 h, 48 h, and 72 h after exposure to 7 Gy dose of X-ray irradiation, respectively. This suggests that miR-375-3p in serum has the potential to be used as a biomarker to identify exposure to IR.

研究分野：分子生物学

キーワード：放射線被ばく 血清中microRNA バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

世界的なエネルギー問題に直面している現代において、原子力発電の重要性が再認識されており、原子力発電所における被ばく事故に対して予め十分な対応策を整備することが重要である。被ばく事故に対応するために緊急被ばく医療が不可欠であり、治療以外にも患者搬送、患者看護、汚染対策や除染、線量測定などに加えて、被ばくによる患者のダメージや被ばく線量を把握するための特殊臨床検査が重要である。現在、世界的な被ばくの影響評価法として末梢血白血球を用いた染色体異常試験が用いられているが (IAEA, 2001 年) 染色体異常の解析技術を有する専門家は世界的にも極めて少なく、結果が出るまで数日の時間を有することから、放射線被ばく事故直後に被ばく線量を迅速に評価できる新たなスクリーニング技術の開発が望まれている。

近年、Blakely らは放射線照射によって様々な血清タンパク質成分 (CRP, SAA, IL-6 など) の量的変化が起こることを報告しており、それらのモニタリングが新たな生物学的放射線被ばく線量評価マーカーになる可能性が示唆されている (Int J Radiat Biol. 85:837-50, 2009)。また、Cha らは放射線に感受性の高いヒト B 細胞系細胞株にガンマ線を照射すると、アポトーシス、細胞周期、DNA 損傷修復に関連する microRNA として miR-202 や miR-572 が発現変化することを報告した (Int J Oncol. 34:1661-8, 2009)。microRNA は主にゲノムの遺伝子間領域にコードされており、microRNA 前駆体が 20~25 塩基にプロセッシングされて成熟型の microRNA が形成される。miR-202 や miR-572 の microRNA は相補性を有するアポトーシス、細胞周期、DNA 損傷修復に関連する標的 mRNA のタンパク質への翻訳を抑制することで放射線照射による遺伝子発現の調節を行っていると考えられる。一方、申請者はこれまで Cha らと同じヒト B 細胞系細胞株に X 線を照射すると、細胞周期停止に関わる *MDM2* と *CDKN1A* 遺伝子から non-coding RNA の一種であるアンチセンス RNA が放射線量依存的に発現上昇することをはじめ明らかにした (Mol Med Rep. 5:1151-7, 2012)。アンチセンス RNA とは遺伝子の遺伝座の反対鎖側の DNA から転写される RNA のことで、遺伝子発現の調節を行っていると考えられており、実際に培養細胞や動物組織中に発現することが確認されている (Biomed Rep. 2:918-22, 2014; Biomed Rep. 1:383-8, 2013)。

上記の報告から、microRNA やアンチセンス RNA のような non-coding RNA (タンパク質に翻訳されない RNA 種の総称) の発現変化が放射線被ばく線量評価において重要な指標になる可能性が示唆される。しかしながら、これらの放射線による non-coding RNA の発現変化は細胞内における現象であり、迅速検査への利用を目指すには血清や尿のような液

性成分におけるバイオマーカーの同定を検討する必要がある。

近年、細胞内の様々な RNA やタンパク質がエキソソーム内に封入されて細胞外に分泌されることが明らかになってきた。エキソソームはほとんどの細胞から分泌される 40~200 nm 程度の膜小胞のことで、血液、尿、羊水、腹水などの体液や細胞培養上清中に存在する。近年、Valadi らは肥満細胞の培養液からエキソソームを単離し、その中に約 1300 種類の mRNA と 121 種類の microRNA が存在することを報告した (Nat Cell Biol. 9:654-9, 2007)。細胞外へ分泌されたエキソソーム内成分は細胞内成分の特徴を持つため、疾患バイオマーカーとしての利用が期待されている。Taylor らはヒト卵巣癌患者血漿からエキソソームを単離してその中に内在する microRNA を調べ、卵巣癌バイオマーカーとして有用な microRNA を 8 つ同定した (Gynecol Oncol. 110:12-21, 2008)。一方、Moon らは IgA 腎症患者の尿中エキソソーム内成分を解析し、疾患特異的なエキソソーム内在性タンパク質を同定した (Proteomics 11:2459-75, 2011)。

これらの報告から、様々な疾患患者の体液中エキソソーム内在性成分の探索を行うことにより、診断に有用な新規疾患バイオマーカーが発見される可能性がある。しかしながら、体液中エキソソームに着目した放射線被ばく線量評価マーカーの探索研究はこれまで全く行われていない。

## 2. 研究の目的

現在の放射線被ばく評価法は末梢血白血球からの染色体異常検査が主流である。しかしこの方法は評価を下すのに時間がかかり、またモニタリング試験としては不向きである。本研究ではこれらの問題を克服できる被ばく時に特異的に出現する血清エキソソーム内在性 non-coding RNA を同定し、迅速な被ばく線量評価法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスへの X 線照射

本研究に使用した 8 週齢オス C57BL/6NJc1 マウスは日本クレア社から購入した。マウスへの X 線照射は放射線照射装置 (MBR-1520R-3, 日立) を用いて 0.5mm Al + 0.3mm Cu フィルタの条件下で 7 Gy 照射した。照射条件は電圧 150 kVp、管電流 20 mA、線量率 1.0 Gy/min とした。X 線をマウスに全身照射後 24、48、72 時間後に全血を採取した。コントロールとして非照射マウスから全血を採取した。全血を凝固させ、遠心分離により血清を採取した。本実験は、弘前大学動物実験委員会での承認を受け、「弘前大学動物実験に関する規程」および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を厳守して行われた。

## (2) 血清 RNA 抽出

マウス血清 200  $\mu$ l から Isogen II とエタ沈メイト (共にニッポン・ジーン社) を使用して RNA を抽出した。抽出された RNA 濃度は Quant-iT RiboGreen RNA Reagent and kit (Thermo Scientific 社) を使用して測定した。抽出された RNA のサイズを確認するために Agilent 2100 Bioanalyzer と Agilent RNA 6000 Pico kit (共に Agilent Technologies 社) を使用して電気泳動した。

## (3) マイクロアレイ解析

マウス血清 5 ng をテンプレートに、miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb kit (Agilent Technologies 社) を使用して、Cyanine-3 (Cy3) 標識 microRNA を合成した。方法は業者説明書に従って行われた。Cy3 標識 microRNA 溶液と Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies 社) を使用してハイブリダイゼーション溶液を調製した。このハイブリダイゼーション溶液を SurePrint G3 mouse microRNA microarray slide (8 $\times$ 60 K, Ver.19.0) にのせ、65 で 24 時間インキュベーションした。ハイブリダイゼーション後、スライドを専用の wash buffer で洗浄した。スライドの Cy3 蛍光は SureScan microarray scanner (Agilent Technologies 社) によって検出した。Cy3 蛍光の数値化は Feature Extraction version 11.0 software (Agilent Technologies 社) を使用して行った。

得られた発現データは GeneSpring GX12.6 software (Agilent Technologies 社) を使用して 90%パーセントシフトの条件で正規化した。Raw data が 50 以上のデータを選択し、さらに 0 Gy (非照射群) に対して 7 Gy の X 線照射後 24、48、72 時間のいずれかで 1.5 倍以上発現変化する遺伝子を選択した。また、階層クラスタリング解析をあわせて行った。

## (4) cDNA 合成

血清中 microRNA として筆者らが以前に検出したことのある miR-638 のコピー数定量を検討した。cDNA の合成は TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit と TaqMan MicroRNA Assays, miR-638 RT primer (共に Life Technologies 社) を使用して行われた。検量線用の合成 miR-638 (北海道システムサイエンス社) を用意し、その合成 miR-638 溶液の吸光度を測定した。RNA 濃度と分子量 (MW 8178.5) から合成 miR-638 溶液のモル濃度を計算した。既知コピー数の合成 miR-638 希釈系列を用意してそれぞれ cDNA 合成に使用した。血清 RNA および合成 miR-638 溶液はそれぞれ 5  $\mu$ l 使用し、合計 15  $\mu$ l で cDNA 合成反応を行った。

## (5) リアルタイム PCR とアガロースゲル電気泳動

miR-638 由来 cDNA 溶液 1  $\mu$ l、2 $\times$  FastStart TaqMan probe master (Roche Diagnostics 社) 10  $\mu$ l、20 $\times$  TaqMan MicroRNA Assays, miR-638 probe (Life Technologies 社) 1  $\mu$ l、RNase-free water 8  $\mu$ l 加えて混合した。リアルタイム PCR は StepOne Plus real-time PCR system (Life Technologies 社) を使用して 95 で 10 分間インキュベーション後、95 で 15 秒間と 60 で 60 秒間のインキュベーションを 45 サイクル行った。得られた PCR 産物を 4%アガロースゲルにより電気泳動と臭化エチジウム染色を行い、UV 照射によりバンドを検出した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス生存と体重変化

マウスに 7 Gy の X 線を照射し、0、24、48、72 時間後に体重を測定したが、有意な変化は認められなかった。また 7 Gy の X 線を照射後すぐに死亡するマウスはなく、すべての個体で生存した。

### (2) マウス血清中 small RNA の検出

マウス血清 200  $\mu$ l から抽出された RNA 溶液 (RNase-free water 50  $\mu$ l に溶解) を 1  $\mu$ l 使用して Agilent 2100 Bioanalyzer による解析を行った。その結果、すべてのマウス血清 RNA から 25 から 200 ヌクレオチド (nt) の small RNA のピークが検出された。

### (3) X 線被ばくによって増減する血清中 microRNA の同定

0 Gy (非照射群) に対して 7 Gy の X 線照射後 24、48、72 時間のいずれかで 1.5 倍以上発現変化する遺伝子を選択したとき、58 種類の microRNA が同定された (図 1)。これらのうち血清中 miR-375-3p は 0 Gy に対して 7 Gy 照射 24、48、72 時間後でそれぞれ 1.9、5.4、12.7 倍増加した。この結果は血清中 miR-375-3p は放射線被ばくのバイオマーカー候補になることが示唆された。

### (4) 血清中 microRNA コピー数の絶対定量の予備検討

マウス血清に存在することが明らかな miR-638 コピー数の定量を予備的に行うために、既知コピー数の合成 miR-638 をテンプレートにして cDNA を合成し、リアルタイム PCR により検量線を作成した。検量線の傾きは -3.507 となり、PCR の増幅効率 (Eff%) は 92.824 となり高い増幅効率を得られた (図 2)。血清から得られた miR-638 由来 cDNA をテンプレートにリアルタイム PCR を行ったとき、検量線より miR-638 コピー数は血清 1  $\mu$ l 当たり平均 29.397、標

準偏差 10.317 であった。増副産物をアガロースゲルで電気泳動するとすべてのサンプルで miR-638 の増幅産物のバンドが確認された。現在、7 Gy の X 線を照射したマウス血清から同様の方法で miR-375-3p コピー数の定量解析を行っている。

本手法では血清から RNA を抽出しているが、臨床応用を目指すにはさらに操作法の省略や反応時間の短縮を行う必要がある。今後は血清から直接 cDNA を合成し、リアルタイム PCR で評価できるプロトコルを検討していきたい。

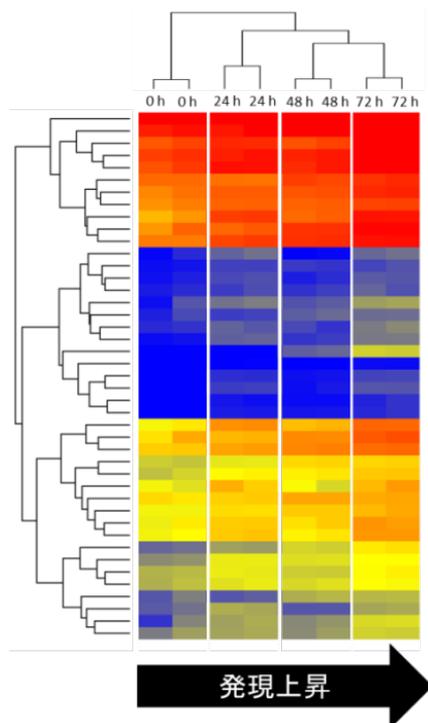


図 1. 放射線被ばくにより血清中で増加する microRNA

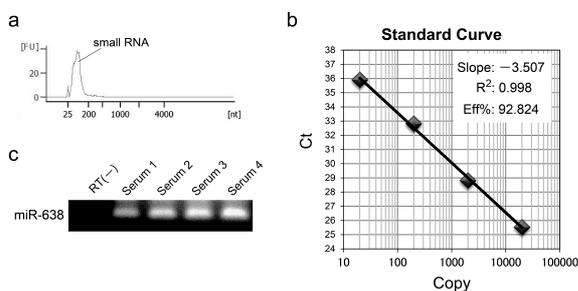


図 2. 血清中 microRNA コピー数定量法の検討

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 3 件)

1. Shiori Kubota, Mitsuru Chiba, Miki Watanabe, Maki Sakamoto, Narumi Watanabe: Secretion of small/microRNAs including miR-638 into extracellular spaces by sphingomyelin phosphodiesterase 3. *Oncol Rep* 33:67-73, 2015. (査読有) DOI: 10.3892/or.2014.3605
2. Masahiro Hosoda, Hironori Yoshino, Masaru Yamaguchi, Takakiyo Tsujiguchi, Mitsuru Chiba, Toshiya Nakamura: The report of the 1st Educational Symposium on Radiation and Health by Young Scientists (ESRAH2014). *Japanese Journal of Health Physics in press.* (査読有)
3. 千葉満、久保田菜、門前暁、丸山敦史、血清エキソソームの回収法と microRNA 解析法について、検査と技術 査読有、印刷中

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Mitsuru Chiba, Satoru Monzen, Ikuo Kashiwakura, Toshiya Nakamura: Serum microRNAs as potential biomarkers in mice exposed to ionizing radiation. *The 2nd Educational Symposium on Radiation and Health by Young Scientists (ESRAH2015)*, May 23-24, 2015, Hirosaki University, Hirosaki-shi, Aomori.
2. Mitsuru Chiba, Satoru Monzen, Ikuo Kashiwakura, Toshiya Nakamura: Serum microRNAs as potential biomarkers in mice exposed to ionizing radiation. *15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015)*, May 25-29, 2015, Kyoto International Conference Center, Kyoto-shi, Kyoto.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/kouhou/hg/web/gakubu/teacher\\_detail03.html?id=87](http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/kouhou/hg/web/gakubu/teacher_detail03.html?id=87)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中村 敏也 (NAKAMURA, Toshiya)  
弘前大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：00155847

門前 暁 (MONZEN, Satoru)  
弘前大学・大学院保健学研究科・助教  
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