

研究成果報告書

研 究 題 目		想定外を想定する MALDI 質量分析を用いた低線量被ばく尿中バイオマーカー探索研究	実 施 年 度
			平成 27～28 年度
代 表 研 究 者	所 属	広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻	
	氏 名	泉 俊輔	印

1. 研究の目的・背景

原子力・放射線利用への依存が高まった現代社会では、福島原発事故でも明らかとなったように放射線被ばくの生物学的線量評価法（バイオドシメトリー）技術の開発とそれに基づくトリアージの確立が緊急の課題となっている。低線量生体被爆の問題は今後医療の現場でも、拡大するものと思われる。このように放射線被ばくのバイオマーカーを探索しそのメカニズム解析を行うことは、その分子を用いた高感度かつ迅速な次世代の生物学的線量評価法開発の基盤が構築され、障害発症の機構解析が行われてきた。しかしながら、本研究のような放射線被ばくの生体応答を尿中代謝産物の網羅的解析によって解明する試みはほとんどなされておらず、非常に緊急性があり、今必要時されている研究課題である。

原子力・放射線利用への依存が高まった現代社会では、福島原発事故でも明らかとなったように放射線被ばくの生物学的線量評価法（バイオドシメトリー）技術の開発とそれに基づくトリアージの確立が緊急の課題となっている。現在、ヒトの被ばく線量を推定する事が可能なバイオドシメトリーは、末梢リンパ球の染色体異常を計測するという煩雑な作業と熟練した技術を要する方法のみであり、広範な被ばく集団を対象に本手法でトリアージを行う事は極めて困難である。近年、バイアスをかけない生体データの網羅的解析技術の開発が急速に進められた。網羅的解析技術の進歩は目覚ましく、これまで検出できなかったバイオマーカーの同定が可能となっている（Witte JS, Nat Genet., 2007 など）。

最近、我々は前述の解析技術を用いて、放射線照射されたマウスの尿の代謝産物中に照射線量依存的・照射後の時間依存的に変化するペプチドやタンパク質を検出する事に成功した。そのうち、hepcidin-2 と呼ばれるペプチドは 0.1 Gy 以上の放射線被ばくにより有意に尿中で増加すること、線量によりその増加パターンが変化することを明らかにした（研究業績 4： Journal of radiation research (2016), 57(2), 142-9.）、それらのメカニズムは不明である。放射線被ばくにより尿中に特異的に検出される新たな分子(もっと低分子量化合物に至るまで網羅的な検索)が必要であり、それらを同定することにより、高感度かつ迅速な次世代の生物学的線量評価法開発の基盤と共にそのメカニズムの解明が期待される。

2. 研究成果及び考察（申請時の計画に対する達成度合を織込む）

ヒトの血清中には、アルブミンや免疫グロブリン、トランスフェリン等の他に、ペプチドホルモンやサイトカイン等の因子が極微量ながら約1万種類存在する。これらのタンパク質は腎臓を通過して尿中に排泄されるものもあり、尿中代謝産物を網羅的に解析する事で様々な疾病バイオマーカーの同定に利用されている。生体への放射線被ばくは、DNA 損傷と多種多様な酵素の機能、それに伴って生じる感受性の異なる細胞、組織、器官の機能に線量依存的に影響を与え、しかもそれぞれへの被ばく影響は経過時間に伴って変化する。その為、尿中代謝産物は放射線被ばくに対し、個体差には影響されない普遍的变化を含む非常に多くの経時的変化が存在するものと予想され、尿中に排泄される代謝産物についてプロファイリングし、その変動を解析してデータベース化する事で、確実な個々人の被ばく線量測定法の開発が可能になると考えられる。放射線事故・災害では、実際の被ばく者における障害の重要性はもとより、放射線のヒトの五感では検知されないと言う特徴から、放射線被ばくの有無、リスク評価を科学的根拠に基づいて証明する事が極めて重要となる。この事は、福島原発事故を見ても明らかであり、本研究で開発する技術は国際的に必要とされるものである。また、尿の採取は非侵襲的であり、大多数の被ばくを疑われるヒトに対し、被ばく線量を推定する上で血液を指標とするよりも迅速かつ簡便に行えると考えられる。前述の通り、これまで我々は hepcidin-2 をマウス放射線被ばくのバイオマーカーとして同定している。Hepcidin は体内の鉄代謝を制御することや急性期反応に関与することが知られている（Rivera S, Blood, 2005, Nemeth E, Blood, 2003）ことから、尿中に排出される鉄量の変化に注目し、マウスを用いて 4 Gy 被曝前後の尿中鉄量の変化を黒鉛炉原子吸光光度法を用いて観察した。測定結果から、被曝後 24 時間から 72 時間において尿中鉄量が増加すること、特に 24 時間後から 48 時間後にかけて被曝前と比較して約 2 倍に増加することが明らかとなった。

次いで、被曝後のマウス肝臓から蛋白質を抽出し質量分析を行ったところ、被曝後のマウス肝臓中から嫌気性解糖系に関わる酵素 Triokinase が検出された。このことから、被曝後に生体内で低酸素ストレスが進行していることが示唆された。そこで代表的な低酸素応答因子であり、低線量放射線被曝で活性化する HIF-1 の変化をウェスタンブロッティングを用いて観察した。その結果、被曝直後に減少した HIF-1 α の発現量が徐々に回復し、さらに 24 時間後から 72 時間後にかけてその量が増加することが明らかとなった。HIF-1 α は赤血球の生産を亢進することから、低線量放射線被曝は鉄代謝に影響していることが示唆される。さらに、尿中にその一端が現れることから、より簡便な放射線被曝の新規バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

3. 経費の使用状況（申請時の計画に対する実績を記述）

設備備品費、印刷費、旅費、謝礼金を申請時に計画していたが、別予算での執行とした。本経費の使用状況としては実験に用いる消耗品費をメインに執行した。

4. 将来展望（今後の発展性、実用化の見込み等について記述）

これまでに人類が経験したことがない低線量被爆に対して明確な指針を示すことはこの国の科学者の使命である。また、そこで動いている物質の同定は既知化合物であれ未知化合物であれ、天然有機化学者が後世の学者に笑われないような見落としのない仕事をしなければならない。何より原水爆の最初の犠牲者を出しているこの国において、低線量被爆による犠牲者を1人も出さないことがこの国の放射線医学者の責務である。

その為に我々は、島津製作所と共同で新たなマトリックスを開発した。それにより、今まで見逃していたペプチドの解析を試みる。例えば、疎水性の高いペプチドの分析の為に(研究業績 5 米国特許 2568293)やこれまでのマトリックスよりも感度の高い 3H4N(研究業績 2)や NO₂ 化されたペプチドを集中的に検出する(研究業績 1) マトリックスを合成し準備を重ねてきた。

今後、ここで作ってきた新しいマトリックスを用いて新たなバイオマーカーを見つけることが今後の課題である。

5. 成果の発表（学会での発表、学術誌への投稿等を記載。予定を含む）

1. Takahashi, Misa; Shigeto, Jun; Izumi, Shunsuke, Nitration is exclusive to defense-related PR-1, PR-3 and PR-5 proteins in tobacco leaves, *Plant Signaling & Behavior* (2016), 11(7), e1197464
2. Fukuyama, Yuko; Izumi, Shunsuke; Tanaka, Koichi, 3-Hydroxy-4-nitrobenzoic Acid as a MALDI Matrix for In-Source Decay, *Analytical Chemistry* (2016), 88(16), 8058-8063.
3. Fukuyama, Yuko; Nakajima, Chihiro; Izumi, Shunsuke; Tanaka, Koichi, Membrane Protein Analyses Using Alkylated Trihydroxyacetophenone (ATHAP) as a MALDI Matrix, *Analytical Chemistry* (2016), 88(3), 1688-1695.
4. Iizuka Daisuke; Yoshioka Susumu; Okazaki Emi; Kiriya Keita; Izumi Shunsuke; Kawai Hidehiko; Nishimura Mayumi; Shimada Yoshiya; Kamiya Kenji; Suzuki Fumio, Hepcidin-2 in mouse urine as a candidate radiation-responsive molecule, *Journal of radiation research* (2016), 57(2), 142-9.
5. Fukuyama Yuko; Nakajima Chihiro; Tanaka Koichi; Fukuyama Yuko; Tanaka Koichi; Izumi Shunsuke, Membrane Protein Analyses Using Alkylated Trihydroxyacetophenone (ATHAP) as a MALDI Matrix, *Analytical chemistry* (2016), 88(3), 1688-95.