

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2020
 課題番号：17K17890
 研究課題名(和文)好中球エラスターゼ阻害薬は放射線照射による致死性の肺障害を軽減することができるか
 研究課題名(英文)Can the fatal lung injury be improved by administering neutrophil elastase inhibitor?
 研究代表者
 玉置 幸久(Tamaki, Yukihisa)
 島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授
 研究者番号：40457099
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの両肺に放射線照射12Gyを1回施行し6時間後に好中球エラスターゼ阻害剤(NEI)を腹腔内に投与し、その効果を検討した。照射1日後の体重(g)及び体重当たりの肺重量(g/g)値は、コントロール群、照射群、照射後NEI投与群の3群間で有意差は認められなかった。次に、好中球抗体Ly6Gを用いた免疫染色を行い、image Jにより陽性細胞の定量を施行したが、3群間で有意差は認められなかった。また、末梢好中球マーカータンパクLy6G、マクロファージマーカータンパクF4/80、サイトカインIL-1、IL-6のmRNA発現をrealtime PCRにて比較したが、3群間で有意差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 今回の結果では有意差は認められなかったが、今後の課題として照射線量を多くしたり、あるいは1日後の評価でなく数日後の評価で行うことなどが挙げられる。放射線肺障害の病態は依然として解明されておらず、これからもこれらの課題を生かしながら、研究方法や材料を工夫しながら、引き続き研究に取り組んでいく。

研究成果の概要(英文)：Both lungs of the mice were irradiated once with 12 Gy, and 6 hours later, a neutrophil elastase inhibitor (NEI) was intraperitoneally administered, and the effect was examined. There was no significant difference in body weight (g) and lung weight (g / g) per body weight 1 day after irradiation among the three groups: control group, irradiation group, and NEI administration group after irradiation. Next, immunostaining with the neutrophil antibody Ly6G was performed, and positive cells were quantified by image J. As a result, there was no significant difference among the three groups. In addition, the mRNA expression of peripheral neutrophil marker protein Ly6G, macrophage marker protein F4/80, cytokine IL-1, and IL-6 was compared by real-time PCR. However, no significant difference was observed among the three groups.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線防護 肺癌 放射線肺障害

1. 研究開始当初の背景

近年の放射線療法の進歩は著しく、早期肺癌に対する定位放射線治療 (Stereotactic Radiation Therapy, SRT) の治療成績は従来の標準治療である手術成績とほぼ同等であり (Nagata Y, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 93: 989-998, 2015)、強度変調放射線治療 (Intensity Modulated Radiation Therapy, IMRT) により従来は正常組織の耐容線量の制約のため十分な治療が困難であった脊髄近傍の腫瘍や広範な胸膜・胸壁などに対する照射が可能となっている。しかし、放射線治療の有害事象として発症する急性肺障害は、多くは一過性で軽症であるが時に照射した範囲を超えて炎症が急激に広がって重篤化し致死的となるため、放射線治療を完遂するための大きな障害となっている (Allen AM, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 65: 640-645, 2006)。

急性放射線肺障害の原因には放射線による物理的な障害を契機とする高サイトカイン血症の可能性が考えられており、TNF- α 、IL-1 α 、IL-6 などのサイトカインが一過性に上昇することが実験的に証明されている (Movsas B, et al. Chest. 111: 1061-1076, 1997)。しかし、その後の致死的な急性肺障害への進展の機序は明らかではない。

生体に対する様々なストレスがもたらす臓器不全には好中球エラスターゼが深く関わっていることが知られており、TNF- α 、IL-1 α 、IL-6 などのサイトカインの上昇が好中球を活性化し、活性化した好中球が肺へ集積、エラスターゼを放出し、肺血管内皮障害および上皮障害を引き起こして放射線肺障害をも起こすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、C57BL/6 マウスを用いて肺に放射線照射を行い、好中球エラスターゼ阻害剤の投与による致死的な肺障害の防止効果について、肺組織浸潤好中球の免疫組織による分析を行い、急性肺障害との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

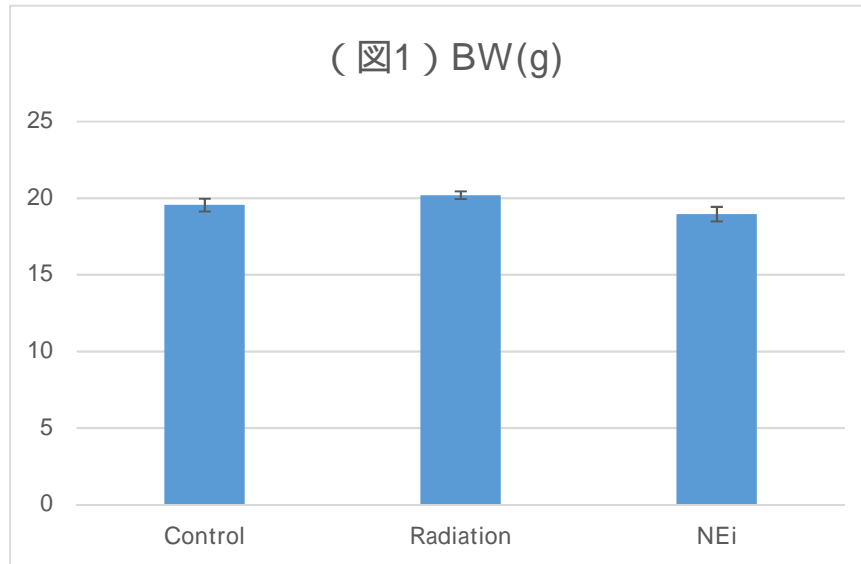
10 週齢の C57BL/6J 雌マウス (CLEA Japan) の両肺に放射線照射 12Gy を 1 回施行した後、6 時間後に好中球エラスターゼ阻害剤 (neutrophil elastase、商品名: シベレスタットナトリウム水和剤) を腹腔内に投与し、放射線肺臓炎に対する好中球エラスターゼ阻害剤の効果を検討した。

放射線照射後にシベレスタットナトリウム水和剤 (30 mg/kg) を投与した NEi 群の照射 1 日後の体重、肺重量、肺組織の障害の程度を、無照射で生食を投与した Control (C) 群および照射後に生食を投与した Radiation (R) 群と比較した。肺組織の障害の程度を、組織の免疫染色と real-time PCR 法にて検討した。組織学的検討では、採材した肺の 5 μ m パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色および好中球抗体 Ly-6G (GeneTex; 1:250000) を用いた免疫染色を行った。Real-time PCR では、肺組織から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) にて cDNA を作成後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用い Thermal Cycler Dice Real Time System TP900 (タカラバイオ) にて PCR 反応を行った。プライマーは、actin: Fw; 5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3', Rv; 5'-TTTGTATGTCACGCACGATTT-3', Ly6G: Fw; 5'-TGGACTCTCACAGAAGCAAAG-3', Rv; 5'-GCAGAGGTCTTCCTTCCAACA-3', F4/80:

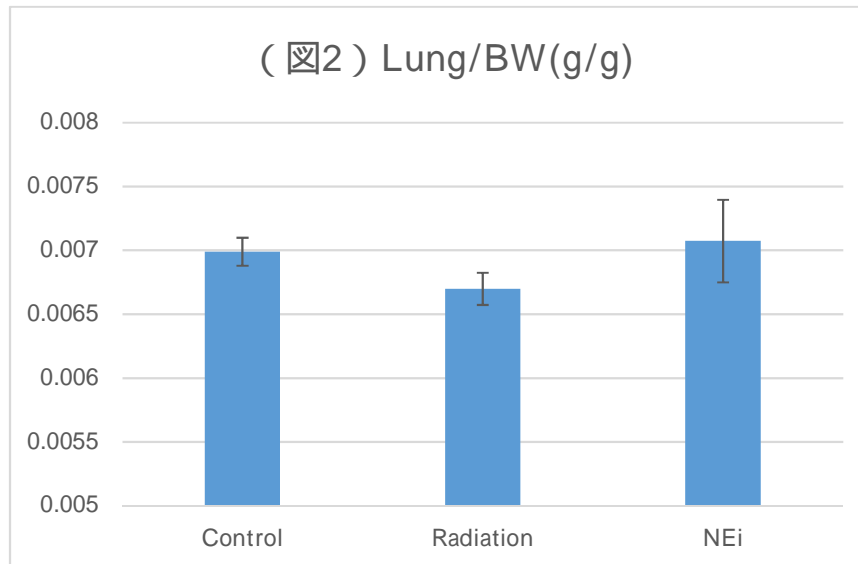
Fw ; 5'-CTCTGTGGTCCCACCTTCAT-3'、 Rv ; 5'-GATGGCCAAGGATCTGAAAA-3'、 IL-1 : Fw ; 5'-CTTCAGGCAGGCAGTATCACTC-3'、 Rv ; 5'-TGCAGTTGTCTAATGGGAACGT-3'、 IL-6 : Fw ; 5'-ACAACCACGGCCTTCCCTAC-3'、 Rv ; 5'-TCTCATTCCACGATTTCCCAG-3'を用い、結果は比較 Ct 法にて検討した。

4 . 研究成果

照射 1 日後の体重 (g) は 3 群間で変化は認められなかった (図 1)。



体重当たりの肺重量 (g/g) の平均値は R 群が一番低値であったが、3 群間で有意差は認められなかった (図 2)。



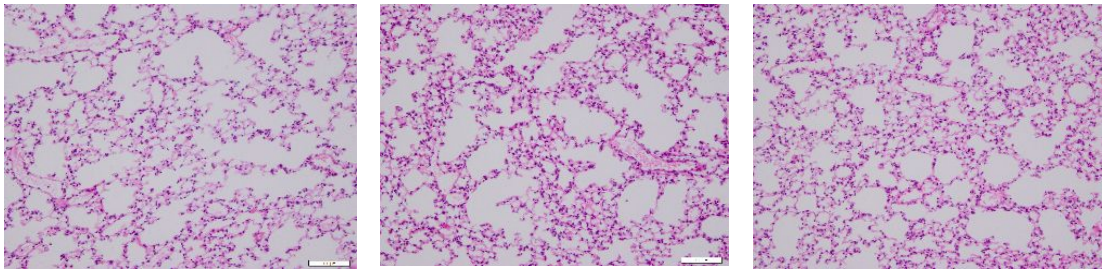
HE 染色による組織の障害の程度の確認では、R 群と NEi 群に肺胞腔内へのマクロファージ浸潤、肺胞壁内の単核球浸潤、肺胞壁や肺胞腔内の浮腫、肺胞腔内のフィブリン沈着などの急性期放射線肺臓炎の明らかな病理所見は認められなかった (図 3)。

(図 3)

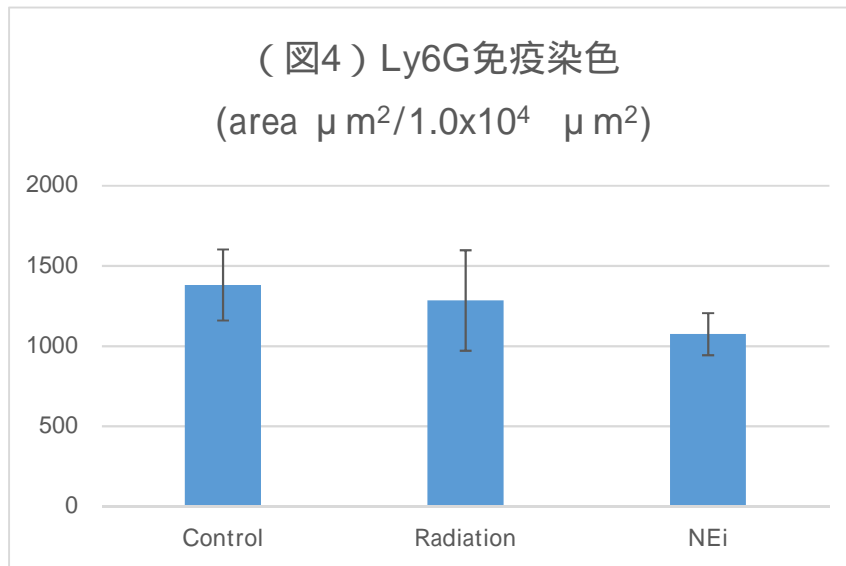
Control 群

Radiation 群

NEi 群



そこで、好中球抗体 Ly-6G を用いた免疫染色を行い、image J により陽性細胞の定量を施行したが、3 群間で有意差は認められなかった（図 4）。



次に、末梢好中球マーカータンパク Ly6G、マクロファージマーカータンパク F4/80、サイトカイン IL-1、IL-6 の mRNA 発現を real-time PCR にて比較したが、3 群間で有意差は認められなかった（表 1）。

（表 1） Relative Quantitation to Control

	Ly6G	F4/80	IL-1	IL-6
Control	1.00 ± 0.53	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.43
Radiation	4.90 ± 1.52	11.35 ± 2.30	2.73 ± 1.35	9.80 ± 7.31
NEi	7.35 ± 0.19	5.19 ± 5.37	3.27 ± 0.57	12.82 ± 15.82

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------