

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08130

研究課題名(和文)放射線効果修飾薬のマウスモデルによるスクリーニングシステム構築

研究課題名(英文)Development of a Screening System Using Mouse-model for Chemical Modifiers of Radiation Response

研究代表者

笹井 啓資 (Sasai, Keisuke)

順天堂大学・医学部・客員教授

研究者番号：20225858

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)：予備実験で放射線防護作用を確認したエダラボンを材料として、薬剤の正常組織および腫瘍組織に対する放射線効果への修飾作用をシステムティックに評価するシステムを構築した。C3H/HeNS1cマウスを用い、エダラボンの放射線効果に対する作用を正常組織としての空腸および同マウス可殖SCCVII腫瘍を用いて評価した。空腸への効果は空腸を摘出し組織学的に各指標から定量的に求めた。腫瘍への効果はコロニー形成試験による腫瘍細胞生存率から求めた。100mg/kgのエダラボン投与はマウス空腸へは放射線防護効果を示し、腫瘍へは効果を認めなかった。同系マウス正常組織および腫瘍を用いたシステムは簡便で有効に機能した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高精度放射線照射技術により病変へ1回線量を増加させながら周囲の正常組織への線量を低減することが可能となった。一方で、病変に接する正常組織への線量は低減することは困難なため、放射線による重篤な副作用も経験される。より高い放射線治療効果を得るためには、放射線治療の副作用を軽減することのできる有効な放射線防護剤の開発や、逆に、放射線線量を増加させることなく、腫瘍への放射線効果を高める放射線増感剤の開発が待たれる。

本研究では、腫瘍と正常組織への相反する効果を同時に評価する薬剤のin vivoでスクリーニングシステムが構築でき、今後の薬剤開発の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed a systematic screening method to identify candidate chemicals that influenced the radio-sensitivities of normal organs and tumors, using a promising compound, edaravone. The effects of the compound on the normal jejunum and transplantable SCC VII tumors of C3H/HeNS1c mice were evaluated.

We found that the intestinal colony-forming ability following 15 Gy of X-irradiation was significantly higher in the 100 mg/kg edaravone group than in the control group. Furthermore, the number of apoptotic cells in the villi immunohistochemically stained with cleaved caspase-3 was significantly lower in the 100 mg/kg edaravone group than in the control group. This compound exhibited no radioprotective effects on SCC VII tumors. Thus, 100 mg/kg of edaravone exerts protective effects on small intestinal injuries without interfering with the antitumor effects of radiation.

Therefore, this screening method is simple and beneficial.

研究分野：放射線科学

キーワード：エダラボン 放射線防護剤 スクリーニングシステム 薬剤開発

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高精度放射線照射技術により病変へ 1 回線量を増加させながら周囲の正常組織への線量を低減することが可能となった。一方で、病変に接する正常組織への線量は低減することは困難なため、放射線による重篤な副作用も経験される。

より高い放射線治療効果を得るためには、放射線治療の副作用を軽減することのできる有効な放射線防護剤の開発や、逆に、放射線線量を増加させることなく、腫瘍への放射線効果を高める放射線増感剤の開発が待たれる。

これらの薬剤は腫瘍、正常組織のそれぞれに効果を示すため、放射線防護剤であれば腫瘍への抑制効果を上回る正常組織への防護効果が必要であり、増感剤ではその逆が求められる。今後、有効な防護剤や増感剤を開発するためには、腫瘍と正常組織への相反する効果を同時に評価する薬剤の *in vivo* でのスクリーニングシステムが必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、予備実験で放射線防護作用を確認した **Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one; Radicut®)** を材料として、これらの薬剤の正常組織および腫瘍組織にたいする放射線効果への修飾作用をシステムテックに評価するシステムを構築する。

電離放射線の主な作用機序である **reactive oxygen species (ROS)** による細胞障害に対して **antioxidant** の有効性が示されている。特に **Edaravone** は急性脳梗塞、筋萎縮性側索硬化症に臨床応用され、さらにその放射線防護効果も示唆されている。

Anzai らはマウスを用いた全身照射後の防護効果を示している (1)。また、放射線による海馬萎縮、口腔粘膜炎、卵巣障害への防護効果も報告されている (2, 3)。しかし、消化管障害防護効果をもたらす適正投与量は不明で、また腫瘍に対する防護効果の有無も明らかでない。本研究では定位放射線照射を前提として、大線量照射時の消化管への放射線防護効果を得るために必要な薬剤量および腫瘍に対する防護効果の有無を検討した。

3. 研究の方法

In vivo での研究

動物

8-10-週齢 **C3H/HeNSlc** 雌マウス (20 g; Sankyo Labo Service Corporation Inc.) を用いた。本実験はすべて順天堂大学動物実験実施規定に準じて行った。

X 線照射は電圧 **150 kV**、電流 **5 mA** で **Al 0.5 mm** のフィルターを用い線量率 **1.5 Gy/min** で行った。

Edaravone 原末を **1M** の **NaOH** で溶解し、**1 M** の **HCl** で **pH** を **7** に調整した後、生理食塩水でそれぞれ **1.5, 3, 10 mg/ml** 調整した。マウスには放射線照射 **30** 分前に **15, 30, 100 mg/kg** を腹腔内投与した。

空腸の組織学的検討

照射後 **3.5** 日で頸椎脱臼により安楽死させた後、空腸を摘出し、検体を **10%** 中性緩衝ホルマリンで固定し、脱水し、パラフィン包埋した。パラフィン切片を **HE** 染色し、組織学的変化を評価した。腸管の横断像における全周の生残腸陰窩数を数え、**S = -ln((A-x)/A)** の式により、腸コロニー形成能を求めた。ここで **S** は **survival of crypts per circumference** (腸管の横断像における全周の陰窩生存)、**A** は非照射群の腸管の横断像における全周の陰窩数、**x** は照射群の腸管の横断像における全周の陰窩数である (4)。

空腸組織の障害は **Park's injury score** を用いて評価した (5)。すなわち **10** 横断面を用いて **0** (正常) - **8** (腸管壁全層梗塞) 段階で評価した。

アポトーシス細胞は **カスパーゼ 3** 免疫組織染色を用い絨毛内陽性細胞比率を算出した。

マウス可殖腫瘍での検討

腫瘍への放射線防護効果は **C3H/He** 由来扁平上皮癌様腫瘍である **SCC VII** 腫瘍 (東京医科歯科大学三浦教授供与) を用いた。**SCCVII** 腫瘍は **10%** 牛胎仔血清を含む **minimal essential medium** (Thermo Fisher Scientific) を用いて培養した。**In vitro** では **monolayer** を形成しながら増殖する。トリプシンを用いて細胞浮遊液を作成し、**1*10⁵** 個を **C3H/SeNSlc** 雌マウス大腿部に移植した。**14** 日後、約 **200 mm³** に達した時点で実験に供した。

放射線照射直後にマウスを安楽死させ、無菌的に腫瘍を摘出した。腫瘍を裁断し、トリプシンを用いて単細胞を浮遊させた。ペトリディッシュに播種後培養し、コロニー法を用いて細胞生存率を求めた (6)。

統計学的検討

統計的比較は **nonparametric one-way Kruskal-Wallis ANOVA** を用いた。

In vitroでの研究

*In vivo*の研究に加えて、薬剤作用のメカニズムを探るため *in vitro*でも研究を追加した。正常細胞モデルとして C3H マウス由来線維芽細胞 2 種類 A9 (JCRB 供与)、C3H/10T1/2-clone 8 (clone 8 JCRB 供与) を用いた。A9 はコロニー形成能を有し、一方 clone 8 はコロニー形成試験不能であった。腫瘍細胞は *in vivo* 試験で用いた SCCVII 腫瘍を用いた。A9、SCCVII 細胞では放射線照射後の細胞生存率はコロニー形成試験で求めた。Clone 8 はコロニーを形成しないため、さらに A9、Clone 8、SCCVII 細胞を用いて細胞増殖能を CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay キット (Promega) を用いて測定した。効果のメカニズムを明らかにする目的で edaravone 暴露後の GSH、SOD 様活性をそれぞれ GSH-Glo Glutathione Assay キット (Promega)、SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用いて測定した。

4. 研究成果

In vivoでの成果

体重の変化

X 線 15Gy の全身照射により非照射群 に比して体重減少を認めた (表 1)。非照射群では 100mg/kg edaravone 投与は影響を及ぼさなかった。

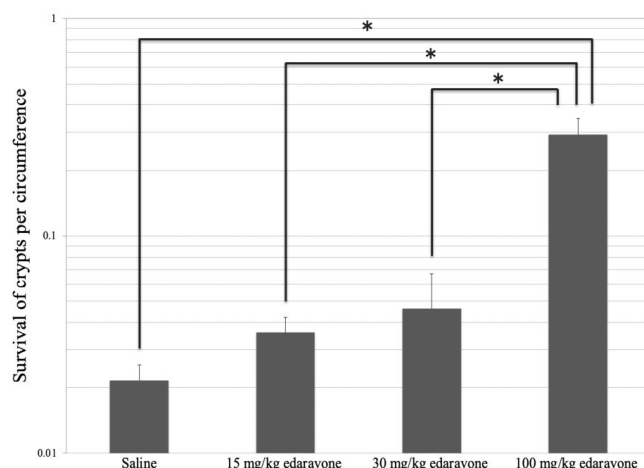
表 1 全身照射後のマウスに対する edaravone の防護効果

X 線線量 (Gy)	edaravone (mg/kg)	体重変化	陰窩細胞コロニー形成能	The Park's injury mean score	cleaved caspase-3 陽性細胞 (%)
0	0	-0.075 (0.29)		0.12 (0.048)	1.1 (0.46)
15	0	-3.6 (0.2)	0.022 (0.0039)	5.74 (0.085)	6.9 (0.88)
15	15	-3.5 (0.2)	0.036 (0.006)	5.43 (0.14)	5.6 (0.63)
15	30	-3.48 (0.18)	0.046 (0.021)	5.35 (0.51)	5.1 (0.84)
15	100	-3.2 (0.11)	0.29 (0.054)	3.62 (0.39)	1.2 (0.38)
0	100	0.1 (0.27)		0.15 (0.029)	

() 内は standard error

15 Gy 全身照射後の空腸陰窩細胞コロニー形成能 (表 1) は 100 mg/kg 投与群は他の処置群に対して有意 ($p=0.031, 0.021, 0.021$) に高値を示した (図 1)。

図 1 空腸陰窩細胞コロニー形成能

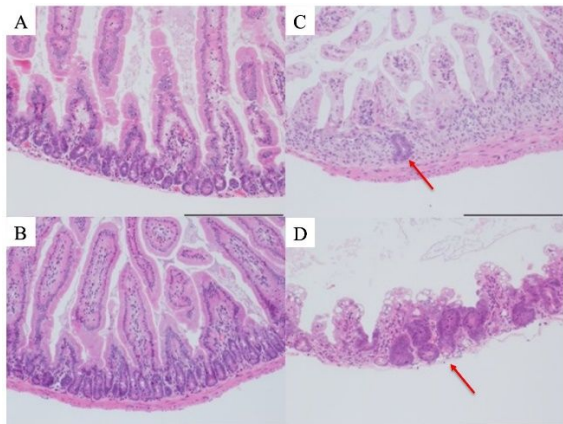


Kawamoto T, Sasai K. *Curr Issues Mol Biol.* 2023 Jun 28;45(7):5362-5372 より転載 (7)

The Park's injury score で示した組織学的障害を処置別に表 1 に示す。組織障害は 15Gy 照射群で生理食塩水投与群に比較して edaravone 100mg/kg 投与群で有意 ($p = 0.008$) に軽度であった。図 2 に HE 染色像を示す。非照射群では edaravone の投与の有無 (A, B) で差を示さなかったが、15Gy 照射群(D)では edaravone 100mg/kg 投与による障害が非投与群(C)に比して軽減

されている。

図 2 HE 染色による空腸放射線障害に対する 100 mg/kg edaravone の効果



(A) 非照射、生理食塩水投与 (B) 非照射、100 mg/kg edaravone 投与 (C) 15Gy 照射、生理食塩水投与 (D) 15Gy 照射、100 mg/kg edaravone 投与 赤矢印は生残した陰窩

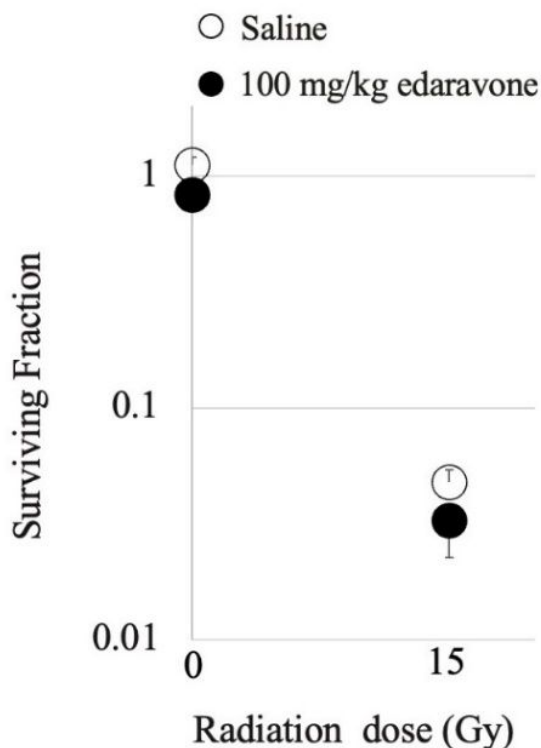
次に免疫組織染色による絨毛内 cleaved caspase-3 陽性細胞比率を示す表 1 に示す。15Gy 照射後の cleaved caspase-3 陽性細胞は 100 mg/kg edaravone 投与群で、その他の群に比較して有意に低下していた。また 15mg/kg、30mg/kg edaravone 投与群でも非投与群に比較して cleaved caspase-3 陽性細胞は少ない傾向を示した。

腫瘍に対する 100 mg/kg edaravone 投与の効果

SCCVII 腫瘍を用いた *in-vivo in-vitro* assay による 100 mg/kg edaravone 投与の効果を図 3 に示す。非照射群では 100 mg/kg edaravone 投与は細胞生存率に効果を示さなかった。さらに 15Gy 照射群でも細胞生存率に差を認めなかった。

C3H/HeNS1c マウスを用い、正常組織としての空腸、腫瘍モデルとして可殖 SCCVII 腫瘍を用いる系は、比較的簡便に薬剤の効果を評価できるシステムと考えられた。以上 *in vivo* 研究成果の一部は *Curr Issues Mol Biol* 誌に発表した(7)。

図 3 SCCVII 腫瘍に対する放射線照射および edaravone 100mg/kg の効果



***In vitro*での結果**

A9 および **SCCVII** によるコロニー形成試験では **0.1mM 4** 時間暴露後の放射線防護効果は認めなかった。細胞増殖能試験では **edaravone 0.1 mM 4** 時間暴露は **SCCVII**、**A9** では、放射線防護効果は認めなかったが、**clone 8** では照射 5 日目および 7 日目で防護効果を認めたが、実験間の差異が大きく最終的な結論は得られなかった。

clone 8 および **SCCVII** における **edaravone** の **GSH**、**SOD** 様活性に対する影響をそれぞれ **Assay** キットを用いて求めた。**GSH** は同一細胞数では **SCCVII** 細胞が **clone 8** に対して有意に活性が高かったが、**0.1 mM 4** 時間暴露では効果を認めなかった。また **SOD** 様活性でも **0.1 mM 4** 時間暴露による効果は認めなかった。

以上 ***in vitro*** の研究では一定の結論が得られなかった。

参考文献

- 1) Anzai K, Furuse M, Yoshida A, et al. In vivo radioprotection of mice by 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (edaravone; Radicut), a clinical drug. *J Radiat Res* 2004, 45, 319-323.
- 2) Kudo K, Abe Y, Tarusawa K, et al. Effects of EGF, Melatonin, Edaravone on Mouse Intestinal Injury by Whole Body X-ray Irradiation. *Bull Health Sci Hirosaki* 2005, 4, 109-113.
- 3) Nakajima N, Watanabe S, Kiyoi T, et al. Evaluation of edaravone against radiation-induced oral mucositis in mice. *J Pharmacol Sci* 2015, 127, 339-343.
- 4) Withers, HR, Elkind, MM. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1970, 17, 261-267.
- 5) Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Fält K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990, 107, 574-580.
- 6) Sasai K, et al. A fluorinated 2-nitroimidazole, KU-2285, as a new hypoxic cell radiosensitizer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1991, 20, 1249-1254.
- 7) Kawamoto T, Sasai K. Edaravone Exerts Protective Effects on Mice Intestinal Injury without Interfering with the Anti-Tumor Effects of Radiation. *Curr Issues Mol Biol.* 2023, 45, 5362-5372.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamoto Terufumi, Sasai Keisuke	4. 巻 45
2. 論文標題 Edaravone Exerts Protective Effects on Mice Intestinal Injury without Interfering with the Anti-Tumor Effects of Radiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 5362 ~ 5372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cimb45070340	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
研究 分 担 者	川本 晃史 (Kawamoto Terufumi) (60862167)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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
---------	---------