

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17143

研究課題名(和文) 腸管の放射線耐性を飛躍的に向上させるp53調節剤の開発

研究課題名(英文) Development of p53 regulators increasing radioresistance of the intestinal tissue

研究代表者

西山 祐一 (NISHIYAMA, Yuichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：80730598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制因子として知られるp53は、放射線腸管障害に対する抵抗性因子として機能することが知られている。本研究では、放射線腸管障害を効果的に防ぐp53制御性の防護剤候補化合物として見出された5-キノキサリノール(5QX)について、放射線防護活性評価、ならびに作用機序解析を行った。5QXはp53依存的に放射線細胞死を抑制し、細胞死に拮抗するp53標的遺伝子であるp21の発現を増加させるなど、放射線腸管障害に対する有効性を示唆する成果が得られた。さらに、マウス放射線胃腸管症候群を再現良く誘導可能な照射系が構築できたことから、現在、放射線腸管障害に対する本化合物の有効性について検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線腸管障害は現代医療をもってしても克服が困難とされ、骨盤部放射線治療において根治に必要な投与線量を大きく制限する要因となっている。この制限を克服するために、腫瘍には作用せず、正常組織にだけ効果を発揮する放射線防護剤の開発が求められている。5QXは放射線細胞死をp53依存的に抑制し、放射線腸管障害に有効とされるp21の発現を増加させるなど、骨盤部放射線治療における有望な防護剤としての可能性が示された。今後、マウスを用いた個体レベルでのp53依存的な腸管保護効果を実証することで、当該治療における理想的な防護剤候補化合物としての有用性を実証できるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Tumor suppressor p53 is known as a protective factor against radiation-induced intestinal injury. In this study, we investigated the radioprotective activity and action mechanism of 5-quinoxalino (5QX) that is discovered as a candidate for novel p53 regulatory agent effectively suppressing the injury. 5QX inhibited radiation cell death in a p53 dependent manner and upregulated CDKN1A encoding radioprotective p53-target gene p21, which suggested that 5QX is effective for suppressing the injury. Furthermore, we developed an irradiation system that reproducibly induces radiation gastrointestinal syndrome in mice. Detailed investigations are currently in progress to demonstrate protective effect of 5QX against the injury in mice.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線防護剤 p53 細胞死 放射線腸管障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線災害時の放射線障害の防止や、放射線療法における正常組織の防護の観点から、効果的な放射線防護剤の開発は重要である。特に骨髄、腸管は放射線高感受性の組織として知られ、これらを効果的に保護する防護剤が求められる。被ばく後の生体内初期応答因子として知られる p53 は、細胞の自滅であるアポトーシスを誘導し、骨髄抑制などの障害発生に關与する。研究代表者の所属研究室では先行研究によって強力な p53 阻害作用をもつオルトバナジン酸ナトリウム(バナデート)が見出され、マウス全身照射後の骨髄死に対して生存率を劇的に改善させることなどが明らかにされていた(Morita A *et al.*, *Cancer Res.* 70, 257-265, 2010)。他方、腸上皮において p53 は非アポトーシス性の分裂死に対する抵抗性因子として機能するとされる(Kirsch DG *et al.*, *Science* 327, 593-596, 2010)。したがって、バナデートのような p53 阻害性の防護剤は、放射線腸管障害に対して高い有効性が期待できないと示唆された。そこで、研究代表者の所属研究室では、p53 分子内の亜鉛結合部位を標的とする化合物の合成・探索を進め、24Gy の高線量照射後でも腸管障害を効果的に防ぐことができる 5-クロロ-8-キノリノール(5CHQ)を見出した(Morita A *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 17, 432-442, 2018)。5CHQ は p53 標的遺伝子のうち、放射線細胞死を抑制する p21 の発現を亢進させ、細胞死を促進する PUMA の発現を抑制する「p53 調節剤」として作用する。この成果から、放射線腸管障害を防ぐためには p53 の転写因子としての機能を調節することが有効であると考え、より効果的に腸管障害を防ぐ新規 p53 調節剤の探索に着手した。

2. 研究の目的

本研究課題では、5CHQ 以上に放射線腸管障害を効果的に抑制可能な p53 調節剤候補化合物として見出された、5CHQ 誘導体である 5-キノキサリノール(5QX)(図 1A)について、放射線防護剤としての有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 5QX の放射線防護活性評価と作用機序解析

研究協力者である青木 伸 教授(東京理科大学)より、5CHQ に類似した化学的性質を有する新規防護剤候補化合物として 5QX が提供され、詳細な活性評価を実施した。ヒト T 細胞白血病細胞株(MOLT-4, p53 野生型)およびその形質転換細胞株を用い、種々の分子生物学的手法によって 5QX の詳細な放射線防護活性評価ならびに作用機序解析を行った。すなわち、色素排除試験により 5QX の抗放射線細胞死活性を評価し、また p53 をノックダウンした形質転換細胞株を用いてその活性が p53 依存性であるかを調べた。さらにウェスタンブロッティング、qRT-PCR により X 線照射後の 5QX 処理細胞における p53 標的遺伝子発現について調べた。

(2) 放射線腸管障害を誘導する照射系の構築

5QX の腸管保護効果を個体レベルで検証するため、マウスに対して放射線腸管障害を誘導する照射系の構築に取り組んだ。腸管障害はマウス全身を均一に照射する全身照射、または腹部を局所的に照射する腹部照射によって誘導できるが、前者の方法では腸管障害と骨髄障害が併発する。全身照射後の腸死は骨髄移植によって抑制でき、骨髄障害は腸死を増悪する要因であると考えられている(Terry NH and Travis EL. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 17, 569-573, 1989)。したがって、腸死相当量の全身照射後の生存率上昇を防護効果の指標とした場合、使用する防護剤が骨髄組織あるいは腸組織のいずれに対して保護効果を有しているのかなど、実験結果の解釈が複雑化する。そこで、骨髄障害を回避しつつ腸管障害を再現良く誘導可能な照射系として亜全身照射法を構築し、その妥当性を評価した。すなわち、1.8 cm 厚の鉛で雌性 ICR マウスの前半身を覆いつつ、背腹方向に X 線を亜全身照射した(図 2A)。照射後の生存率、骨髄および腸管組織の病理所見などを指標に、腸死を特異的に誘導できるか検討した。

4. 研究成果

(1) 5QX の p53 依存性放射線防護活性と p53 標的遺伝子発現への影響

培養細胞を用いた抗放射線細胞死活性の評価では、5QX は 5CHQ と同等の防護効果を示すことがわかった(図 1B)。また、5QX 単独で処理した培養細胞について、p53 標的遺伝子の mRNA 発現を解析したところ、放射線腸管障害の抑制に有効とされる p21 をコードする *CDKN1A*、細胞死促進性分子である PUMA をコードする *BBC3* の発現が増加するなど、5QX は p53 を作用標的としている可能性が示唆された(図 1C)。そこで、MOLT-4 とその形質転換体を用いた防護活性評価を実施したところ、5QX は p53 依存的に防護効果を発揮することがわかった(図 1D)。さらに、5QX で処理した照射細胞における p53 標的遺伝子の発現を調べたところ、5QX は p21 を増加させる一方で、PUMA を減少させるなど、5CHQ と同様に p53 標的遺伝子を放射線防護的に発現調節する作用を有することがわかった(図 1E)。

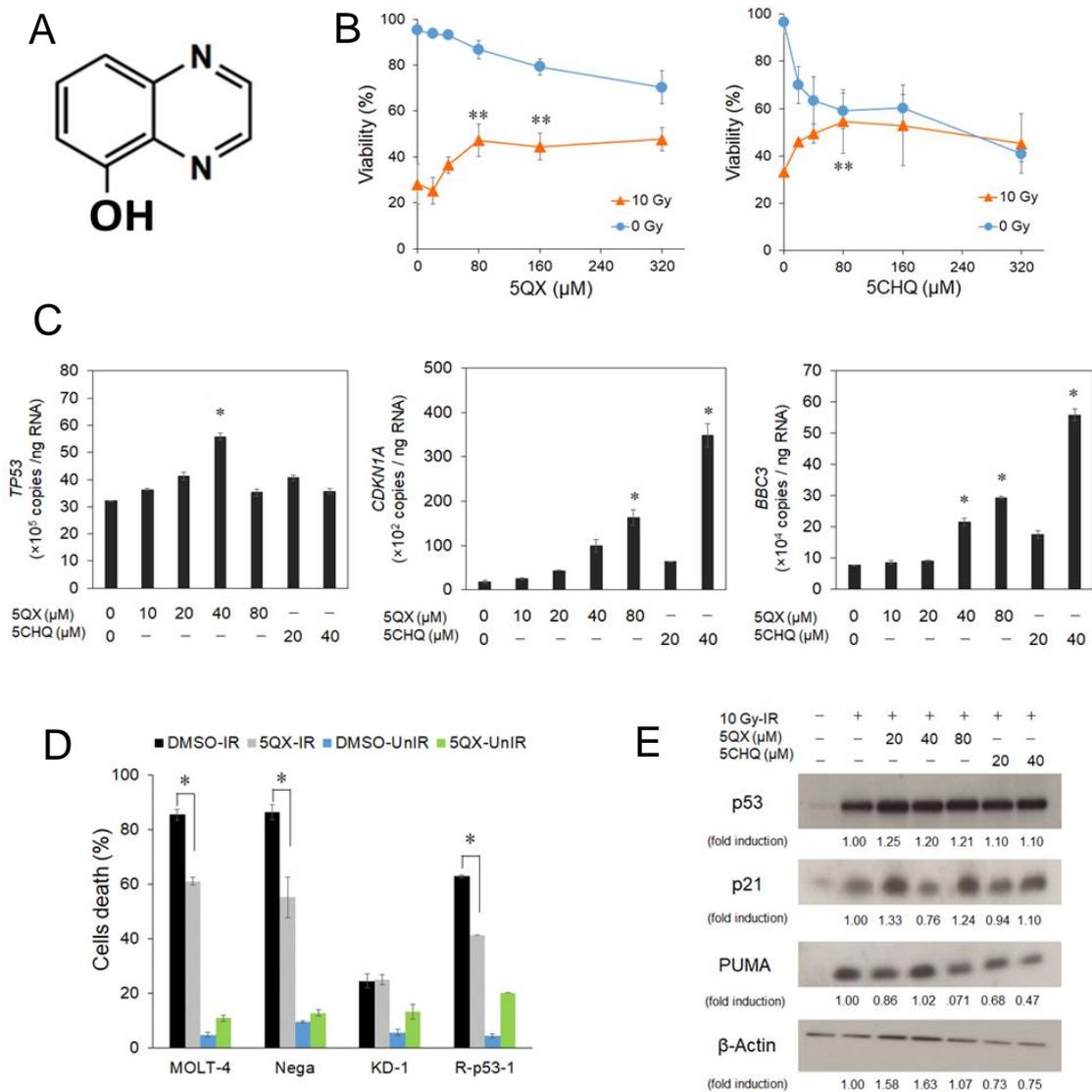


図1 5QXの放射線防護活性評価とp53標的遺伝子発現への影響

- A: 5QXの化学構造。
 B: MOLT-4を用いた色素排除試験により、5QXおよび5CHQの高放射線細胞死活性について比較評価した ($P^{**} < 0.01$)。
 C: MOLT-4とその形質転換体である、既知の遺伝子配列と相補鎖を形成しないshRNA発現ネガティブコントロール細胞株 Nega, shRNA発現ベクターによってp53をノックダウンさせたKD-1, KD-1株にshRNA抵抗性p53発現ベクターを導入し再びp53を発現させたR-p53-1を用い、10 Gy-X線照射に対する5QX (80 μM)のp53依存的防護活性の有無を調べた ($P^* < 0.05$)。
 D: 5QXまたは5CHQで処理したMOLT-4にX線照射を行い、p53標的遺伝子発現の変化をウェスタンブロッティングで調べた。
 E: 5QXまたは5CHQ単独で処理したMOLT-4について、p21をコードする*CDKN1A*, PUMAをコードする*BBC3*のmRNA発現量をqRT-PCRによって調べた ($P^* < 0.05$)。

(2) 亜全身照射による放射線腸管障害の誘導

構築した照射系によって亜全身照射されたマウスは放射線腸死が生じる典型的な時期(照射後10日付近)で死亡した(図2B)。鉛でマウス前半身を覆うことで、顕著な腸管障害および後脚骨髄損傷を誘導しつつも、前脚骨髄組織は良好に維持されたことから、本照射系では骨髄死に至る全身的な骨髄抑制を回避し、腸管障害を誘導できると考えられた(図2C, 2D)。現在、本照射系において5QXの防護活性を個体レベルで詳細に検討している段階である。さらに、全身的にp53を欠損する遺伝子改変マウスを用い、その防護効果がp53依存的であるかについても検討を進めている。

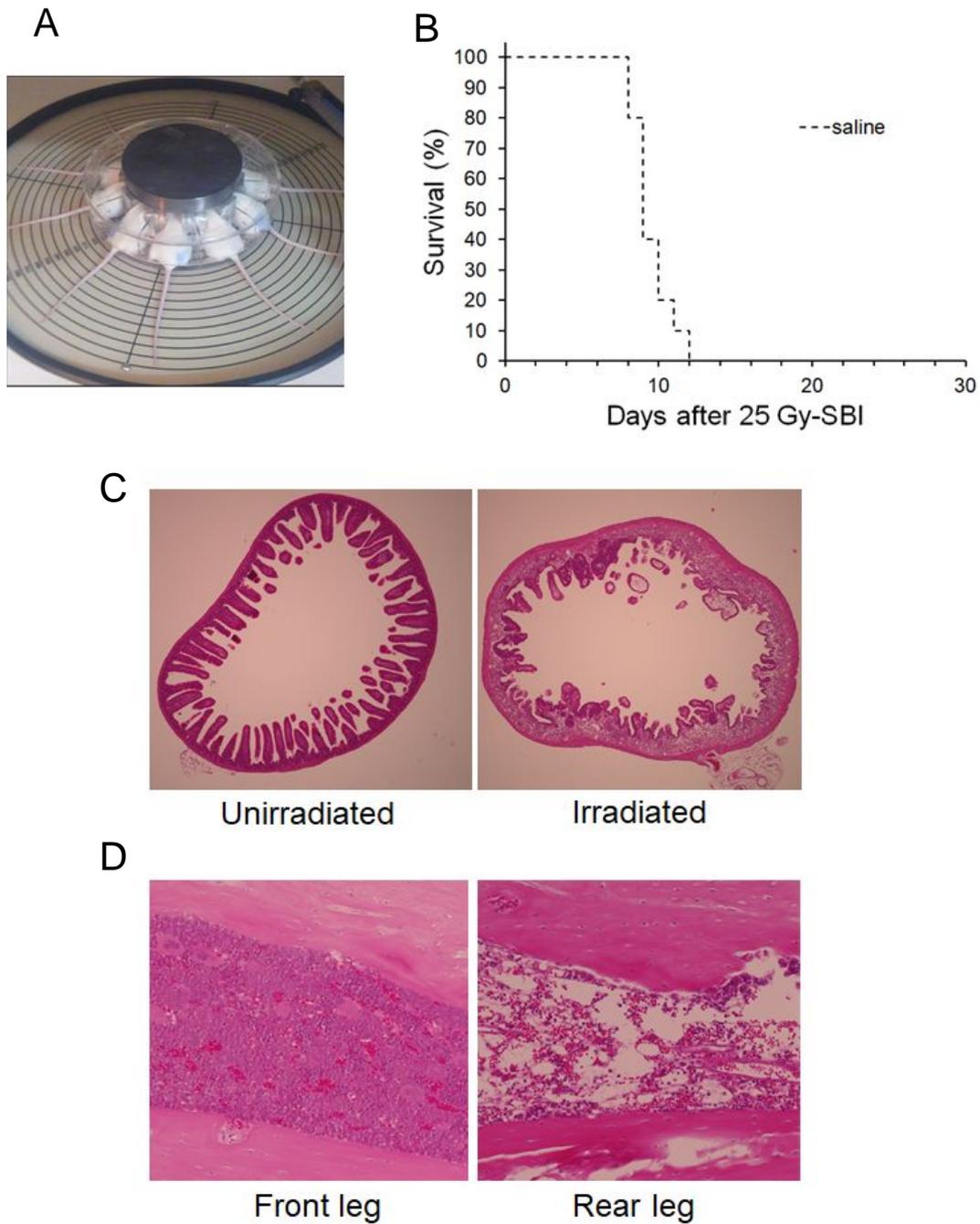


図2 亜全身照射による放射線腸管障害の誘導

- A: 深麻酔下のマウス前半身を 1.8 cm 厚の鉛で覆い，背腹方向に X 線を亜全身照射した。
- B: 生理食塩水を投与したマウスは 25 Gy の亜全身照射後に腸死の典型的な時期に死亡した。
- C: 25 Gy 亜全身照射 7 日後に空腸組織の HE 染色を行った。亜全身照射により空腸上皮は激しく損傷していた。
- D: 亜全身照射 7 日後に前脚および後脚の骨髄組織の HE 染色を行った。亜全身照射により後脚骨髄細胞はほぼ完全に消失していたが，前脚骨髄細胞は良好に維持されていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 西山 祐一, 森田 明典	4. 巻 54
2. 論文標題 p53制御による放射線感受性修飾にもとづく防護剤開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 237-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Akinori, Wang Bing, Tanaka Kaoru, Katsube Takanori, Murakami Masahiro, Shimokawa Takashi, Nishiyama Yuichi, Ochi Shintaro, Satoh Hidetoshi, Neno Mitsuru, Aoki Shin	4. 巻 8
2. 論文標題 Protective Effects of p53 Regulatory Agents Against High-LET Radiation-Induced Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Public Health	6. 最初と最後の頁 601124-601124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpubh.2020.601124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akinori Morita, Tatsuta Shogo, Sakaue Masahiro, Fujita Ria, Hanaya Kengo, Sugai Takeshi, Yuichi Nishiyama, Ochi Shintaro, Sakai Takuma, Wang Bing and Aoki Shin
2. 発表標題 Evaluation of the radioprotective effects of flavonoids.
3. 学会等名 The 62th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi Nishiyama, Akinori Morita, Sakai Takuma, Ramadhani Dwi, Satoh Hidetoshi, Kawabata Ryoya, Tanaka Kaoru, Sasatani Megumi, Ochi Shintaro, Neno Mitsuru and Aoki Shin
2. 発表標題 The p53 inhibitor sodium orthovanadate is not effective in relieving acute gastrointestinal syndrome of subtotal-body irradiated mice.
3. 学会等名 The 62th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai Takuma, Akinori Morita, Kanai Akinori, Wang Bing, Enomoto Atsushi, Ujita Shohei, Aoki Shin, Sato Hidetoshi, Kawabata Junya, Sakaue Masahito, Yuichi Nishiyama and Inaba Toshiya
2. 発表標題 The radioprotector 5CHQ upregulates gene expression of radioprotective humoral factors in acute radiation-injured murine intestinal epithelium.
3. 学会等名 The 62th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 明典, 王 冰, 田中 薫, 勝部 孝則, 村上 正弘, 西山 祐一, 越智 進太郎, 寺岡 達朗, 佐藤 秀哉, 川端 凌矢, 下川 卓志, 根井 充, 青木 伸
2. 発表標題 p53制御による重粒子放射線防護効果
3. 学会等名 第57回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井 卓磨, 西山 祐一, 森田 明典, 王 冰, ラマダニー ドゥウィー, 佐藤 秀哉, 川端 凌矢, 田中 薫, 笹谷 めぐみ, 越智 進太郎, 根井 充, 青木 伸
2. 発表標題 p53阻害剤パナデートは垂全身照射後のマウス腸管障害を促進する
3. 学会等名 第57回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	森田 明典 (MORITA Akinori)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	青木 伸 (AOKI Shin)		
研究協力者	王 冰 (WANG Bing)		
研究協力者	笹谷 めぐみ (SASATANI Megumi)		

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			
インドネシア	インドネシア原子力庁			