

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592201

研究課題名(和文) 放射線照射メダカによる骨代謝障害予防法の開発

研究課題名(英文)

Radiation effects in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

研究代表者

澤尻 昌彦 (SAWAJIRI MASAHIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20325195

研究成果の概要(和文)：

放射線生物学や環境変異原の研究にメダカが利用され、咽頭歯骨には破骨細胞の存在するため放射線照射後の破骨細胞性骨吸収における変化の解析を試みた。放射線照射メダカの破骨細胞の活性を経時的に計測した。炭素線照射メダカでは抑制され炭素線照射によって破骨細胞の活性は低下することが示された。免疫染色によって破骨細胞誘導因子を確認すると炭素線照射メダカの咽頭歯骨周辺では破骨細胞誘導因子が阻害されることが示された。

研究成果の概要(英文)：

In accord with recent biological analyses, medaka has been gained much attention as a model animal of human diseases whereby the genetic background of human diseases may be deduced. We investigated radiological effect on medaka with carbon ion and gamma ray irradiation. To establish the medaka as an animal model for irradiated bone response to evaluate the tolerance for and effectiveness of carbon ion radiation dose with bone metabolism. We irradiated whole body of medaka with carbon ions and gamma rays. Bone resorption in the pharyngeal bone was investigated by histological analysis. For histochemical localization of enzymatic activity of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), the main marker of osteoclasts, were performed on sections of pharyngeal bone. The carbon ion irradiated medaka showed reduced size and number of osteoclast compared with the gamma ray. The TRAP activities of carbon ion irradiated osteoclasts were more suppressed than gamma ray irradiated medaka. Carbon ion irradiation had a more marked effect on osteoclast activity, and suppressed their maturation to a greater extent than gamma irradiation. These observations suggest that carbon ion irradiation induces differential modulation of osteoclast growth factor expression. Medaka shares many cellular and morphological aspects with mammals and that will allow experimental approaches to identify novel factors in bone biology under normal and pathological conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学 がん治療 メダカ咽頭歯骨

## 1. 研究開始当初の背景

がん放射線療法は、手術療法、化学療法とならぶ悪性腫瘍に対する三大治療法の一つである。しかしながら、従来わが国では外科的切除が第一選択と考えられる傾向があったが、治療後の生活の質（QOL）の高い治療法が希望されるようになってきている。放射線療法の特徴を一言で言う、がん浸潤される骨の機能と形態の温存が出来るということにつきます。放射線療法はこのような時代の要求合致するがん治療法である。ここで問題になるのは放射線による骨組織の反応である。

骨は増殖因子に富む肥沃な環境であり、一般的にがん細胞が定着し増殖するために都合の良い組織と考えられている。近年、骨浸潤、骨転移における骨破壊はがん細胞により直接引き起こされるのではなく破骨細胞を介して起こる破骨細胞性骨吸収が重要な役割を演じていることが明らかとなっている。

骨代謝における骨芽細胞と破骨細胞をとりまく微小環境とサイトカイン・ネットワークや分化の調節にかかわる転写因子の解明が基礎分野で進んでいる。我々はガンマ線、炭素粒子線など放射線照射後の骨代謝におよぼす影響として、ラット脛骨、マウス骨芽細胞様細胞などに炭素粒子線、ガンマ線を照射してその結果を報告してきた。しかし、放射線照射後の骨芽細胞と破骨細胞をとりまく微細構造やサイトカイン・ネットワークや分化の調節にかかわる転写因子の関連については報告も少なく、解明が求められている。

## 2. 研究の目的

最近、国内外において、メダカ (*Oryzias*) など小型魚類を利用した遺伝学・生物学的研究や環境影響研究が盛んになってきている。放射線生物学の研究は一般にヒトへの影響を目的に検討していることが多いために、小型哺乳動物が多用されているが、環境の影響を直接受ける変温脊椎動物であるメダカは、近年さまざまな分野でも実験用動物として大きな意義を持っている。

がんの骨への浸潤増殖が破骨細胞性骨吸収に引き続いて起こることから、破骨細胞性骨吸収を標的とした治療法として放射線による骨転移巣でのがんの増殖や骨破壊を抑制する可能性が示されている。下図に示すようにメダカ咽頭歯骨内側等で破骨細胞が存在することが示されている。放射線照射後のメダカで破骨細胞を視覚化し、生体での骨・歯のリモデリングを詳細に明らかにしサイ

トカイン・ネットワークや分化の調節に関わる転写因子の関連を解明することでがん放射線治療における骨代謝障害の軽減に大きく貢献できると考えられる。

破骨細胞の分化と成熟に関わる様々なサイトカイン等のシグナル伝達物質に関する多くの研究が行われている。しかし、放射線照射が骨芽細胞、骨細胞、口腔ガン細胞の産生するサイトカイン・ネットワークにおよぼす影響に関しては多くはない。我々は今まで正常骨組織あるいは培養細胞実験においてガンマ線あるいは炭素粒子線照射によって破骨細胞の分化と成熟に与える影響が異なることを示してきた。

メダカ骨格においては従来、破骨細胞の存在がまれでしかも哺乳類の破骨細胞に見られるような多核化が少ないとされていた。しかし、咽頭歯骨内側において哺乳類に見られる多核化した破骨細胞の存在が認められ、放射線照射後の骨代謝のモデルとして採用した。

## 3. 研究の方法

(1) メダカに対してガンマ線、炭素粒子線の照射を行い、照射後の咽頭歯骨部における破骨細胞を特異的に染色する TRAP 染色、破骨細胞のマーカーである Cathepsin k の mRNA 発現を調査した。ガンマ線照射は広島大学工学部 RI センターにおいて、重粒子線照射は放射線医学総合研究所に於いて行った。使用するメダカは stage 43-44 の若いメダカを使用した。

照射後、経時的に固定した後脱灰し、通方に従いパラフィン切片を作製した。TRAP 染色を施しメチルグリーンによる対向染色を行った。咽頭歯骨部において破骨細胞マーカーである TRAP 活性が見られ骨代謝が観察されることが示された。



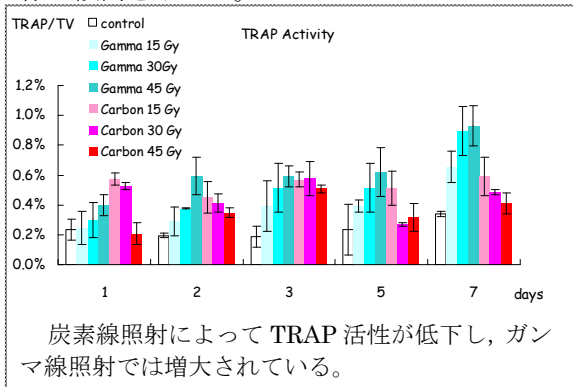
鰓の後方, neural arch の咽頭歯骨周囲に TRAP 染色により破骨細胞が赤く染色されている。

(2) 各々放射線を照射したメダカから咽頭歯骨を摘出して RNA を抽出し、通方に従い RT-PCR によって RANKL, OPG を初めとする各種骨代謝因子の発現状態を計測した。

(3) 魚類の骨代謝は哺乳類と異なり、破骨細胞多核化することも少ないと考えられていたが、咽頭歯骨部における破骨細胞を観察したところ多核化した破骨細胞が観察され、しかも炭素線では非照射、ガンマ線照射に比べて多核の破骨細胞数が少なく線質の違いによる異なった反応が観察されたために、破骨細胞の誘導因子である RANKL とこの拮抗因子である OPG の発現量と局在を調査し照射放射線の線質による違いを比較した。

#### 4. 研究成果

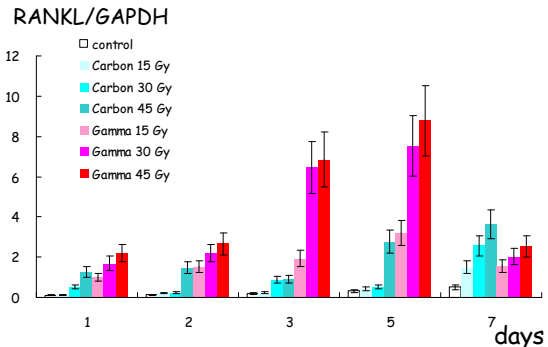
(1) 重粒子線がん治療において骨組織の反応が従来のガンマ線照射と異なることが指摘されてきたが、咽頭歯骨の咽頭歯周辺部の破骨細胞はガンマ線照射によって増加する傾向を示し、対照的に炭素粒子線照射によって減少した。線質の異なる放射線照射によって、メダカ咽頭歯骨の反応が異なることが確認された。炭素線照射によって下記のグラフのように破骨細胞数の減少だけでなく TRAP 活性の低下から破骨細胞の分化・成熟の抑制が認められた。Cathepsin K の発現状態も同様の傾向を示した。



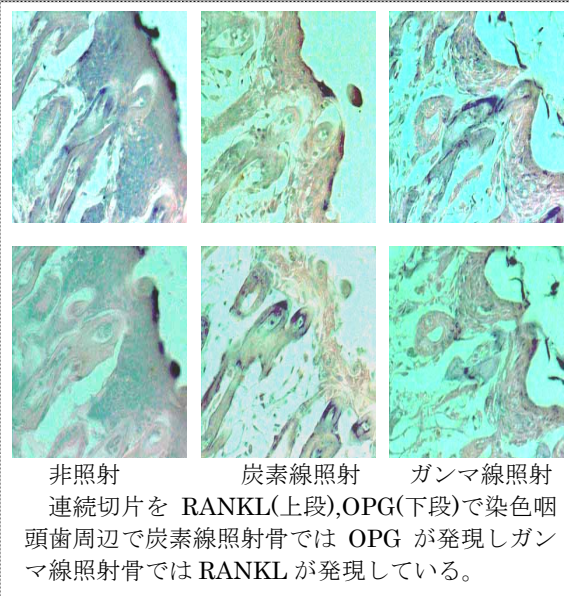
炭素粒子線はガンマ線に比べて破骨細胞の誘導を抑制して骨吸収を低くする可能性が示唆された。ガンマ線と炭素粒子線のように LET の違う放射線によって骨組織における骨代謝因子や骨芽細胞の成熟と分化における反応が異なることが示された。

また、メダカを用いた研究が放射線の生体骨組織におよぼす影響を調査する上で有用であることが示された。

(2) 放射線照射後のメダカ咽頭歯骨より抽出した mRNA における破骨細胞誘導因子 RANKL は放射線照射によって増強された。下記グラフに RANKL mRNA の発現状態を示す。ガンマ線照射によって 5 日目に極大となったことが判る。しかしながら、炭素線照射では増加は緩慢であった。これはがん放射線治療において周囲正常骨の吸収がガンマ線照射に比べて炭素線照射の方が少なかったことと合致する。骨吸収因子の発現が穏やかであったことで骨吸収が押さえられた一つの要因の可能性が示された。



(3) メダカに対する各種放射線（ガンマ線、重粒子線）の照射を行い、照射後の咽頭歯骨部における破骨細胞の形態的变化を観察し、免疫染色によって骨代謝因子の分布を観察したところガンマ線と炭素線では異なった変化が見られた。図は右から非照射、炭素線 45Gy 照射、ガンマ線 45Gy 照射した咽頭歯骨の連続切片に RANKL、OPG で免疫染色したものである。咽頭歯周辺で炭素線照射したものは OPG の発現が見られ、ガンマ線照射したものでは RANKL の発現が認められることから炭素線など高 LET 放射線では破骨細胞の分化誘導が抑制されることが示唆された。



本研究において *in vitro* の培養細胞で見られた放射線照射後のサイトカイン・ネットワークにおよぼす影響を *in vivo* のメダカの生体内における応答を容易に組織切片上に確認することが可能で、またメダカの咽頭歯部は短い期間でターンオーバーする組織のために生理的状態においても、リモデリングが盛んに起きているところである。そのため、

咽頭歯部のリモデリングは造骨・破骨細胞の活性変化を組織化学的に解析する格好のモデルとなることが示された。

がん細胞が直接あるいは PTHrP により骨芽細胞を介して破骨細胞を刺激して骨吸収すると考えられ、骨浸潤性がん治療の標的となる可能性が示唆されている。放射線治療においてがん細胞、骨・軟骨芽細胞そして破骨細胞は相互に影響しているが、従前から行っているガンマ線あるいは炭素線照射したマウスの骨細胞による実験において転移巣での癌の増殖や骨破壊の制御を行っていると言われてきた PTHrP の発現とこれによって誘導される破骨細胞誘導因子の発現も炭素線照射で抑制されことを示してきた。

これまでガンマ線あるいは炭素線照射した細胞における骨代謝因子の発現状況を調べてきたが生体における局在状態は未知なるものが多い。メダカの咽頭歯骨には破骨細胞の存在と哺乳類と類似した骨代謝が存在しメダカを用いた実験で重粒子線局所照射の安全性を評価出来るならば、がん治療への応用が期待できるのみならず、骨粗鬆症や宇宙線に曝露される宇宙飛行士の骨量減少の防止にも応用が期待できる。

#### 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 1 件)

1. Sawajiri M., Nomura Y., Banik S, Nishikiori R., Sonoda Y., and Tanimoto T., Irradiation Effect on Osteoclastogenesis Stimulated by Breast Cancer Cell, Health Physics Journal, in press.2011.査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 澤尻昌彦、野村雄二、滝波修一、谷本啓二、重粒子線の骨代謝におよぼす影響、日本放射線影響学会、広島、2009.11.11

2. Banik S., Sawajiri M., Takinami S., Nomura Y., Mizoe J. and Tanimoto K. Osteoclasts in the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) after irradiation of carbon ion and gamma ray. The 17th International DentoMaxillofacial Radiology, June 28, 2009 Amsterdam, Netherlands.

3. Banik S., Sawajiri M., Takinami S., Nomura Y., Mizoe J. and Tanimoto K. Expression of MMP-13 in chondroblast Cells and Rat Tibia after Exposure to Accelerated Carbon Ions or Gamma Rays.

The 7th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Radiology, November 20, 2008 Nara, Japan.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

澤尻 昌彦 (SAWAJIRI MASAHIKO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20325195

##### (2)研究分担者

野村 雄二 (NOMURA YUJI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：80218370

滝波 修一 (TAKINAMI SHUICHI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：60154952

谷本 啓二 (TANIMOTO KEIJI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：10116626

##### (3)連携研究者