

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790907

研究課題名（和文） 放射線による臓器障害・繊維化のメカニズムの解析  
-HGF 投与による放射線障害抑制-研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of radiation-induced organ injury and  
fibrosis -Protection against radiation injury by treatment with HGF

研究代表者

上竹 亜記子（UETAKE AKIKO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30383706

研究成果の概要（和文）：

急性の合併症の実験として、Wistar rat 6 匹に、生理食塩水、及び、HGF を 0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g、2  $\mu$ g、4  $\mu$ g、8  $\mu$ g を溶解した生理食塩水を尾静脈より投与し、1 時間後に各ラットの両肺に放射線を 15Gy 照射し、24 時間後にラットを開胸し、肺を摘出した。アポトーシスを解析では、HGF 2  $\mu$ g、4  $\mu$ g 投与群でアポトーシス誘導の低減が認められた。HGF 量の定量では 4  $\mu$ g、8  $\mu$ g 投与群で有意な上昇を認めた。慢性の合併症の実験として、Wistar rat 9 匹を治療群と非治療群および対照群の 3 群に分け、治療群 3 匹には、HGF を生理食塩水に溶解して尾静脈より投与し、非治療群 3 匹には、生理食塩水のみを投与し、その 1 時間後に、右肺にのみ放射線を 3Gy 照射した。対照群 3 匹には生理食塩水の投与のみを行い、照射はしない。週に 5 日間連続して行い、3 週間、合計 45Gy の照射を行う。照射終了後 10 週後に開胸し、肺を摘出し固定した。治療群と非治療群で右肺に病理学的に炎症性細胞の増多と炎症性変化（一部繊維化）を認めた。しかしながら HGF 投与群と非投与群で明らかな差異は認めなかった。照射線量を 1 回 4Gy に増量して、計 60Gy として同様の実験を行い 10 週後に同様に肺の摘出を行ったが、HGF 投与群で非投与群に比較して、肺の繊維化が目立たない傾向も認められた。

研究成果の概要（英文）：

An experiment of acute radiation effects was first performed. HGF (0.5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, and 8  $\mu$ g) was dissolved in physiological saline; each dissolved HGF solution or physiological saline was administered via the tail vein to a different Wistar rat. One hour later, radiation was delivered at a dose of 15 Gy to the both lungs. Twenty-four hour later, the chest was opened to extirpate the lung. The results revealed that apoptosis was inhibited in the 2  $\mu$ g and 4  $\mu$ g HGF-treated rats and that the level of HGF was significantly increased in the 4  $\mu$ g and 8  $\mu$ g HGF-treated rats. For an experiment of chronic radiation effects, 9 Wistar rats were divided into the HGF-treated group, the

non-treated group, and the control group. In the treated group, HGF solution dissolved in physiological saline was administered via the tail vein and in the non-treated group, physiological saline was administered, and one hour later, 3 Gy of radiation was delivered 5 times weekly for 3 weeks (a total of 45 Gy) to the right lung. And in the control group, physiological saline alone was administered without irradiation. Ten weeks after the completion of irradiation in the treated and non-treated groups, the chest was opened and the lung was extirpated and fixed. The results revealed an increased number of inflammatory cells and inflammatory changes, including fibrosis in some area, in the irradiated lung in both the HGF-treated and non-treated groups; however, there was no obvious difference between the two groups. A similar experiment was performed by increasing the radiation dose in one fraction to 4 Gy (a total of 60 Gy). Ten weeks after the completion of irradiation, the lung was extirpated in a similar manner. The results revealed that lung fibrosis tended to be less common in the HGF-treated group than in the non-treated group.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線照射 放射線肺臓炎 幹細胞増殖因子（HGF）

1．研究開始当初の背景

医学の発展とともに高齢化が進み、死因の中で悪性新生物の占める割合が大きくなってきた（人口動態統計 厚生労働省）。手術の進歩・抗癌剤の開発により、各種癌の治療は飛躍的に進歩し、生存率が改善されてきた。しかし、副作用や侵襲が強く、全身状態によっては治療適応外となる例も少なくない。放射線治療は、癌の種類によっては、手術や抗癌剤と同等の治療効果を期待できる事が報

告されている。我が国でも悪性新生物が死因の第1位となった1980年代より国策として癌対策が推進され、近年では、手術に比べて侵襲が少なく、QOLの期待できる放射線治療が注目されている。しかし、放射線治療は正常臓器への障害も避けることができず、しばしば、臓器障害が治療の弊害となっている。放射線治療における臓器障害は数日から数ヶ月内に起こる急性障害と数ヶ月から数年以上経過後に現れる晩期障害に分類

される。急性障害は、投薬により緩和することができることが多く、臨床で大きな問題となるのは主に晩期障害であり、晩期障害を予防するために照射量を少なくしたり、照射範囲を縮小したりするなどの対応が取られている。照射量を減らすことは腫瘍への効果も十分に得られなくなるため、原発のコントロール不良、再発につながっている。放射線障害は一般には照射範囲に局限するとされるが、放射線肺臓炎は照射野に含まれない領域にも起こることが臨床的によく経験される。このことから、放射線による臓器障害、とりわけ肺臓炎では、放射線による臓器への直接作用のみならず、何らかのサイトカインの関与が示唆されている。腫瘍については、p53や survivin などの遺伝子が放射線によるアポトーシスに関与することが解明されているが、正常臓器実質障害に関与するサイトカインについて詳細な報告は多くない。肝細胞増殖因子（HGF）は肝線維化治療薬として期待されているが、近年、HGFにより放射線による肝線維化を抑制することができると報告された（World J Gastroenterol. 2005;11(10):1496-502）。HGFは、肝細胞の増殖因子ではあるが、肺など肝臓以外の臓器でも発現することが知られている。肺におけるHGFの発現は、放射線照射により低下することが報告されたが（Eur Respir J. 1997;10(11):2539-44）、放射線肺臓炎との関与についての詳細な報告はまだない。肺におけるHGFの役割として、肺のmyofibroblastのアポトーシスに関与することが示され（FASEB J. 2005;19(6):580-2. Epub 2005 Jan 21）、肺線維化についても大きく関与していることが示され、ごく最近の報告ではブレオマイシンによる肺線維化が抑制されること（Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;292(2):L529-36）が示され

た。HGFが肝臓のみならず肺についても薬剤性線維化を抑制すること、放射線照射肺ではHGFの発現が正常肺より低下することから、HGFの投与により放射線肺臓炎を抑制できると仮定するに至った。

## 2．研究の目的

HGF投与・非投与の条件で、放射線1回照射によるHGFの発現変化について解析する。ほか、アポトーシスや組織変化、線維化に関与するTGF- $\beta$ ・activinなどのサイトカインの発現変化を解析する。また、晩期障害に対するHGF投与の影響を解析する。また、肺への照射時の、肝臓への影響について解析する。安定的にHGFを投与するため、ベクターを作成する。ベクターを筋肉注射および静脈注射し、HGF発現を臓器別に解析する。発現レベルが投与方法により異なれば、将来的に、標的臓器に応じた投与方法の選択に通ずると思われる。ベクターによるHGF投与による放射線障害への影響および副作用について解析する。第2の目標として、HGF投与と放射線照射に伴う遺伝子プロファイル変化を解析し、放射線障害に関与している遺伝子・蛋白を検討する。将来的には関与する遺伝子から、放射線障害を抑制する薬剤の開発を目指す。

## 3．研究の方法

放射線肺臓炎モデルとして、ラットの片肺照射モデルを作成する。治療群についてHGFを投与し、対照群に対しては生理食塩水を投与する。照射した肺と、照射していない肺とを採取し、線維化の程度を解析する。また、他臓器への影響を評価するため、肝臓も摘出し、線維化マーカーやサイトカインの変化について解析する。

### <平成20年度>

**（急性障害）[アポトーシス抑制効果とHGF至適投与量決定]**300gのWistar rat 6匹を準備し、生理食塩水、及び、HGFを0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g、2  $\mu$ g、4  $\mu$ g、8  $\mu$ gを溶解した

生理食塩水を尾静脈より投与する。1時間後に各ラットの両肺に放射線を 15Gy 照射する。24時間後にネンブタール麻酔下に各ラットを開胸し、肺を摘出する。TUNEL法により、アポトーシスを解析し、もっともアポトーシスを抑制する投与量を求める。また、EIA法により、その投与量における臓器中のHGF量を測定する。

**[放射線障害急性期モデル]**次に 300g の Wistar rat 5匹を準備し、2匹にHGFを生理食塩水に溶解して尾静脈より投与し、非治療群には生理食塩水を投与する。投与1時間後に計4匹のラットの右肺に放射線を15Gy照射する。照射2時間後に各々の群のラット1匹ずつをネンブタール麻酔下に開胸し、下静脈より採血後、右肺を摘出し、3等分する。1切片はホルマリン固定し、2切片は凍結保存する。照射6時間後に残りのラット1匹ずつをネンブタール麻酔下に開胸し、右肺を摘出し、3等分する。1切片はホルマリン固定し、2切片は凍結保存する。1匹は対照群として、無処理のまま、ネンブタール麻酔下に開胸し、右肺を摘出し、3等分する。1切片はホルマリン固定し、2切片は凍結保存する。

**[組織学的解析]**ホルマリン固定した左右肺、肝臓組織切片よりプレパラートを作成し、HE染色・MT染色のほか、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、HGF、HGF受容体、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 受容体の免疫染色を行う。

**[タンパク発現解析]**凍結切片より、フィブロネクチン、HGF、TGF- $\alpha$ の発現について、解析する。

#### <平成21年度>

**(晩期障害)[放射線晩期障害モデル]**300g の Wistar rat 9匹を治療群と非治療群および対照群の3群に分ける。治療群3匹には、HGFを生理食塩水に溶解して尾静脈より投与し、その1時間後に、右肺にのみ放射線を3Gy照射する。非治療群3匹には、生理食塩水のみを投与し、同様に右肺に照射を行う。対照群3匹には生理食塩水の投与のみを行

い、照射はしない。週に5日間連続して行い、3週間、合計45Gyの照射を行う。照射終了後10週後にラット9匹にネンブタールにて麻酔下で開腹し、肝臓を摘出後に開胸し、左右の肺を摘出する。左右の肺はそれぞれ3等分し、1切片はホルマリン固定し、2切片は凍結保存する。肝臓は5mm角のブロックを3つ作成し、1切片はホルマリン固定し、2切片は凍結保存する。

**[組織学的解析]**ホルマリン固定した左右肺、肝臓組織よりプレパラートを作成し、HE染色・MT染色のほか、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、HGF、HGF受容体、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 受容体の免疫染色を行う。また、TUNEL法により、アポトーシスの解析を行う。

**[タンパク発現解析]**凍結切片より、フィブロネクチン、HGF、TGF- $\alpha$ の発現について、解析する。

#### 4. 研究成果

放射線肺臓炎モデルとして、ラットの片肺照射モデルを作成し、治療群についてHGFを投与、対照群に対しては生理食塩水を投与した。照射した肺と、照射していない肺とを採取し、線維化の程度を解析した。急性の合併症の実験として、Wistar rat 6匹に、生理食塩水、及び、HGFを0.5 $\mu$ g、1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、4 $\mu$ g、8 $\mu$ gを溶解した生理食塩水を尾静脈より投与し、1時間後に各ラットの両肺に放射線を15Gy照射し、24時間後にネンブタール麻酔下に各ラットを開胸し、肺を摘出した。TUNEL法により、アポトーシスを解析し、EIA法により、その投与量における臓器中のHGF量を測定した。アポトーシスを解析では、HGF2 $\mu$ g、4 $\mu$ g投与群でアポトーシス誘導の低減が認められた。HGF量の定量では4 $\mu$ g、8 $\mu$ g投与群で有意な上昇を認めた。さらに条件を変えて実験を重ねなければならないと考えている。慢性の合併症の実験として、Wistar rat 9匹を治療群と非治療群およ

び対照群の3群に分け、治療群3匹には、HGFを生理食塩水に溶解して尾静脈より投与し、その1時間後に、右肺にのみ放射線を3Gyを照射した。非治療群3匹には、生理食塩水のみを投与し、同様に右肺に照射を行った。対照群3匹には生理食塩水の投与のみを行い、照射はしない。週に5日間連続して行い、3週間、合計45Gyの照射を行う。照射終了後10週後に肝臓を摘出後に開胸し、左右の肺を摘出し固定した。計3回の実験を行った。治療群と非治療群で右肺に病理学的に炎症性細胞の増多と炎症性変化（一部繊維化）を認めた。しかしながらHGF投与群と非投与群で明らかな差異は認めなかった。肝臓では照射された部位に炎症性細胞の増多が認められたが、これもHGF投与の有無で変化が認められなかった。照射線量を1回4Gyに増量して、計60Gyとして同様の実験を行ったが、HGF投与群で非投与群に比較して、肺の繊維化が目立たない傾向にあり、さらに追加実験を行いたい。タンパク発現に関する解析が現在進行中である。

#### 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0件）

〔学会発表〕（計1件）

和泉亜記子 他：照射野肝臓に一致して再燃した骨髓腫症例：照射肝内再燃機序の検討

・第67回日本医学放射線学会

平成20年4月4日 横浜

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

上竹 亜記子（UETAKE AKIKO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30383706

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし