

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：	13401
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2009 ～ 2011
課題番号：	21651019
研究課題名（和文）	NO ラジカル発生剤による放射線防護作用の機構解明
研究課題名（英文）	Elucidation of mechanisms for protective effects of NO-generating agents against radiation
研究代表者	松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI) 福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授
研究者番号：	40142377

研究成果の概要（和文）：

汎用されている狭心症治療薬・血圧降下剤等から、ニトロプルシドナトリウム、硝酸イソソルビド、ニトログリセリン、ニコランジル、ニプラジロールの5種を選択し、ヒト正常線維芽細胞（AG1522細胞）を用いてX線による放射線障害防護能試験および毒性試験を行い、全ての薬剤に放射線障害防護能を認め、3 μMの濃度までは全ての薬剤において毒性は認められなかった。

さらに正常マウス（jcl:ICR、8週齢、♂）を用いてX線、混合放射線（γ線＋中性子線）および中性子線による放射線障害防護能試験および毒性試験を行った。X線による放射線障害防護能がニトロプルシドナトリウムに認められ、また造血系および免疫系の回復促進によることが明らかになった。混合放射線（γ線＋中性子線）による放射線障害に対してもニトロプルシドナトリウムは有効であったが、中性子線単独による放射線障害に対しては有効性が認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Among the drugs for angina pectoris and hyperpiesia, sodium nitroprusside, isosorbide dinitrate, nitroglycerin, nicorandil, nipradilol were selected and examined for the presence of protective activities against X-rays-induced injury and toxicities using normal human fibroblasts, AG1522 cells. All drugs possessed protective activities against radiation and indicated non-toxicities up to 3 μM.

Furthermore, 5 drugs were examined for the presence of protective activities against X-rays, mixed radiation (γ-rays and neutron) or neutron-induced injury and toxicities using normal mice (jcl:ICR, 8 weeks old, male). All drugs were non-toxicities. However, Sodium nitroprusside only possessed protective activities against the injury induced by X-rays and it is due to promoting of restoration of hematopoietic and immune functions. Sodium nitroprusside was effective in the injury induced by mixed radiation, but not by neutrons alone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野： 複合新領域
 科研費の分科・細目： 環境学、放射線・化学物質影響科学
 キーワード： 防護、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、細胞が生合成する一酸化窒素 (NO) および投与した NO 発生剤を細胞が分解する際に発生する NO の両者とも、低濃度の場合には放射線障害に対する防護機能を誘導する以下の二つの現象を見出していた (図 1)。

(1) 放射線誘発防護的バイスタンダー応答のイニシエータ/メディエータの一つが NO である。

ヒト神経膠芽腫細胞 (A-172 細胞) に変異型 p53 遺伝子を導入した A-172/mp53 細胞に放射線を照射し、未処理の A-172 細胞と共培養すると A-172 細胞において放射線に対する防護反応が誘導され、放射線抵抗性となること、NO 発生剤処理によっても同様の応答が誘導されること、および NO 補足剤の培養液への添加によりその応答が抑制されることを見出した (Matsumoto H. *et al.*: *Radiat. Res.*, 155: 387-396, 2001)。

(2) 放射線適応応答の誘導には NO が必須である。

ヒト非小細胞肺癌細胞 (H1299) に正常型 p53 遺伝子を導入した H1299/wtp53 細胞に予め低線量 (0.02 Gy) の放射線を照射し、数時間後に高線量 (1 Gy 以上) の放射線を照射すると、直接高線量の放射線を照射する場合より放射線抵抗性となり、この応答は NO 補足剤の添加により抑制されること、予め低線量放射線照射の代わりに低濃度の NO 発生剤で細胞を処理すると放射線抵抗性となることを見出した (Matsumoto H. *et al.*: *Cancer Res.* 67: 8574-8579 2007)。

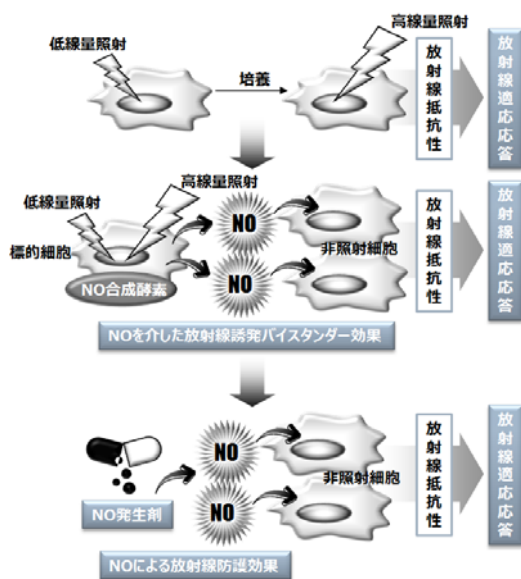


図 1. 当該研究の着想に至った経緯

これらの知見から、NO は放射線に対する防御反応において重要な役割を果たしていることが示唆され、NO には細胞・組織・器官・個体を放射線障害から防護する作用、あるいは放射線障害の回復を促進する作用があるのではないかと考え、当該研究を開始した。

2. 研究の目的

NO ラジカル発生剤による一過性の放射線抵抗性獲得という細胞の応答現象において、その NO ラジカル発生剤の種類・至適濃度・処理時間等の薬理的解析、NO ラジカルにより誘導される細胞内シグナル伝達系・活性化分子等の分子生物学的解析、NO ラジカルによる DNA 塩基損傷・DNA 鎖切断・クロマチンの構造変化・染色体異常誘発率等の分子遺伝学的解析により NO ラジカルが有する放射線防護作用のメカニズムを解明し、実用可能な放射線防護剤を提案することを本研究の目的とする (図 2)。



図 2. NO 発生剤の放射線防護剤としての提案

3. 研究の方法

- (1) 培養細胞：正常ヒト線維芽細胞 (AG1522 細胞) を Eagle's minimum essential medium に 15% 牛胎子血清および抗生剤を添加したもので培養したものを実験に用いた。
- (2) マウス：ICR マウス (日本クレア, jcl:ICR、8 週齢、♂) を通常飼育したものを実験に用いた。
- (3) 狭心症治療薬の調製：ニトロプルシドナトリウム (SNP, ニトロプロ持続静注液, 丸石製薬), 硝酸イソソルビド (ISDN, ニトロール注, エーザイ), ニコランジル (NC, シグマート注, 中外製薬), ニトログリセリン (NG, ミリスロール注, 日本化薬) およびニプラジロール (NP, ニプラジロール液, 日本点眼薬研究所) の 5 剤を選択し、生理的食塩水により各濃度に希釈した後濾過滅菌し、培養液に添加またはマウスへ腹腔内投与した。
- (4) X 線照射：X 線発生装置 (MBR-1520A-3、日立メディコ (株)) を用い、線量率 0.5 Gy/min で、細胞には 0.5 mm のアルミニウム

- ム・フィルターを介して 3.5 Gy 照射した。マウスには 0.5 mm アルミニウム/0.3 mm 銅・フィルターを介して 6.5 Gy 照射した。
- (5) マウス末梢血の採取および血球成分の解析：X線照射から 14 日後に、麻酔下において眼窩から末梢血を採取し、血球成分検査を行った。
- (6) マウス小腸での TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の解析：X線照射から 36 時間後に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、小腸を摘出し、中性ホルマリン後パラフィン切片を作製し、TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 毒性試験 (図 3)：正常ヒト線維芽細胞 (AG1522 細胞) を 200 ~ 1,000 細胞ずつディッシュに播種し、15 時間培養した後に、培養液に SNP、ISDN、NC、NG および NP を 0.3 ~ 30 μM となるように添加し、コロニー形成法により上記 5 種の薬剤の毒性を検討した結果、ISDN、NC、NG および NP においては、何れの濃度においても毒性は認められなかった。

SNP においては、3 μM までは毒性は認められなかったが、10 および 30 μM では顕著な毒性が認められた。これはこの化合物に含まれるシアンによる毒性であることが示唆された。

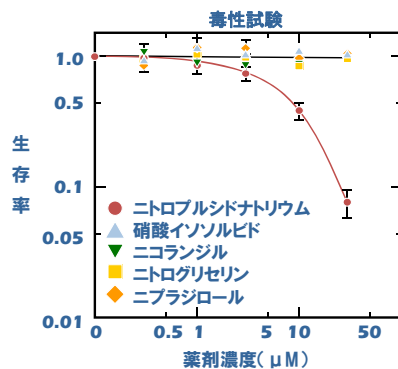


図 3. AG1522 細胞を用いた毒性試験

- (2) 培養細胞を用いた放射線障害防護能試験 (図 4)：AG1522 細胞を 200 ~ 1,000 細胞ずつディッシュに播種し、15 時間培養した後に、培養液に SNP、ISDN、NC、NG および NP を 0.3 ~ 30 μM となるように添加し、2 時間後に X 線を 3.5 Gy 照射した。その後コロニー形成法により上記 5 種の薬剤の放射線障害防護能を検討した。

薬剤処理を行わなかった場合、AG1522 細胞は 3.5 Gy の X 線に対して約 10% の生存率を示した。一方、薬剤処理を行った場合には、全ての薬剤において 0.5 ~ 1.0 μM の濃度で顕著な放射線障害防護能 (生存率の上昇) が認められ、最も効果が著しかったのは SNP であった。しかしなが

ら、SNP を 10 および 30 μM 添加した場合には顕著な毒性が認められ、生存率は薬剤処理を行わなかったものよりも低値を示した。これもこの化合物に含まれるシアンによる毒性であることが示唆された。

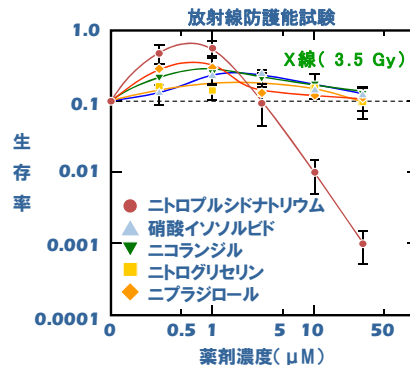


図 4. AG1522 を用いた放射線障害防護能試験

- (3) マウスを用いた放射線障害防護能予備試験 (図 5)：ICR マウスに X 線 6.5 Gy を照射し、照射直後、照射 1 日後、2 日後および 7 日後に 5 種の薬剤を体内濃度が 30 μM になるように腹腔内投与し、生存率を求めることにより、5 種の薬剤の放射線障害防護能試験を行った (n=3)。X 線を照射せず、上記スケジュールで薬剤のみを投与した場合、何れの薬剤にも毒性は認められなかった。X 線を照射した場合には、ISDN、NC、NG および NP には救命効果は認められなかったが、SNP へのみ救命効果が認められ、SNP について詳細に検討した。

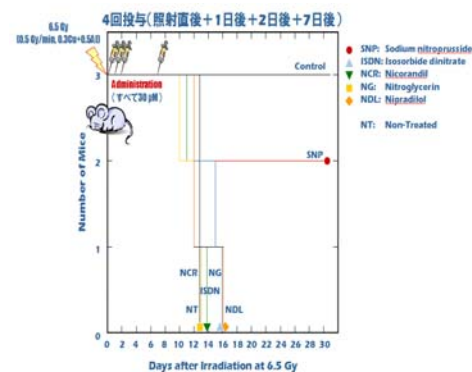


図 5. ICR マウスを用いた放射線障害防護能試験

- (4) マウスを用いた放射線障害防護能試験 (図 6)：ICR マウスに X 線 6.5 Gy を照射し、照射直後、照射 1 日後、2 日後および 7 日後に SNP を体内濃度が 30 μM になるように腹腔内投与し、生存率を求めることにより、この薬剤の放射線障害防護能を精査した (n=50)。

SNP を投与しなかった場合の生存率は約 40% であった。照射後、計 4 回の SNP

を投与した場合の生存率は約 80%にまで上昇し、SNP の放射線障害防護能が実証された。

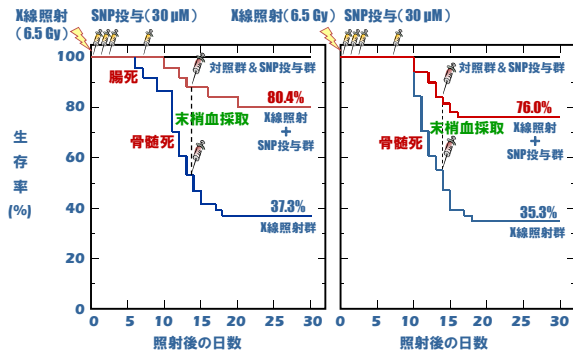


図 6. ニトロプルシドナトリウムによる放射線障害防護能

- (5) マウス末梢血の血球成分検査 (図 7) : ICR マウスに X 線 6.5 Gy を照射し、照射直後、照射 1 日後、2 日後および 7 日後に SNP を体内濃度が 30 μM になるように腹腔内投与し、照射 14 日後に麻酔下において眼窩から末梢血を採取し、血球成分検査を行った (n = 10)。

SNP を投与しなかった場合には、白血球および血小板がほぼ枯渇状態であり、造血機能および免疫機能の障害が認められた。一方、SNP を投与した場合には、白血球数および血小板数共に顕著に回復し、SNP により X 線照射により障害されていた造血機能および免疫機能の回復が促進されていること、およびこれが救命効果の一因であることが示唆された。

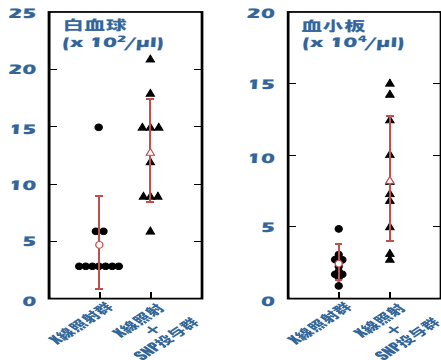


図 7. ニトロプルシドナトリウムによる造血系・免疫系の回復促進

- (6) マウス小腸におけるアポトーシス細胞の解析 (図 8) : ICR マウスに X 線 6.5 Gy を照射し、照射直後、照射 1 日後、2 日後および 7 日後に SNP を体内濃度が 30 μM になるように腹腔内投与し、照射 36 時間後に小腸を摘出し、TUNEL 染色によりアポトーシス細胞の分布を観察した (n = 5)。

SNP を投与しなかったマウスの小腸では、小腸腺窩の基部に局在して各腺窩あたり 3~4 個の TUNEL 陽性細胞が認められ、X 線被ばくによる小腸吸収上皮での

アポトーシス誘導が確認された。これらのアポトーシス細胞の分布は、小腸幹細胞の位置と非常によく一致しており、小腸幹細胞において特異的にアポトーシスが誘導されていることが示唆された。

一方、SNP を投与したマウスの小腸では、やはり小腸腺窩の基部に局在して各腺窩あたり 1~2 個程度の TUNEL 陽性細胞が観察され、X 線被ばくによる小腸吸収上皮でのアポトーシス誘導が SNP により抑制されていることが明らかとなった。従って、SNP の放射線障害防護能の作用機構の一つとして、小腸吸収上皮再生の源となる小腸幹細胞での X 線誘発アポトーシスの抑制が示唆された。

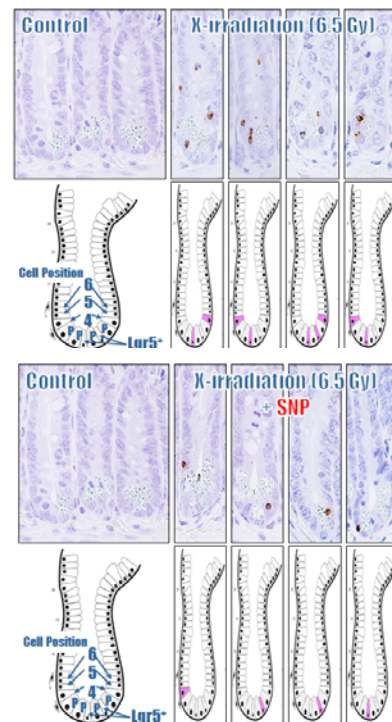


図 8. ニトロプルシドナトリウムによる小腸腺窩でのアポトーシスの抑制

以上の結果から、

- ① X 線被ばくしたマウスへの SNP の投与により、白血球および血小板産生機能の回復が促進される。
- ② X 線被ばくしたマウスへの SNP の投与により、小腸吸収上皮細胞のアポトーシスが抑制される。

ことが明らかとなった。

また、これらの結果から、

- ① X 線被ばくしたマウスへの SNP の投与による造血機能および免疫機能の回復促進
- ② X 線被ばくしたマウスへの SNP の投与による小腸吸収上皮幹細胞のアポトーシス抑制

という、放射線障害の回復過程において非

常に興味深いことが示唆され、放射線障害による腸死および骨髄死のしくみの解明にも迫ることが出来るかも知れない。

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 6 件)

1. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M., Hamada, N.: Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses. *Curr. Mol. Pharmacol.*, 査読有, 4, 2011, 126 ~ 134.
[DOI: 10.2174/1874467211104020126](https://doi.org/10.2174/1874467211104020126)
2. Kawashima, D., Soga, M., Takeuchi, R., Matsumoto, H., Ohtsuka, K.: Molecular chaperone inducers facilitate the functional restoration of temperature-sensitive mutant p53 protein. *Thermal Med.*, 査読有, 26, 2010, 1 ~ 17.
[DOI: 10.3191/thermalmed.26.1](https://doi.org/10.3191/thermalmed.26.1)
3. Narita, N., Fujieda, S., Kimura, Y., Ito, Y., Imoto, Y., Ogi, K., Takahashi, N., Tanaka, T., Tsuzuki, H., Yamada, T., Matsumoto, H.: Suppression of histone deacetylase 3 (HDAC3) enhances apoptosis induced by paclitaxel in human maxillary cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 396, 2010, 310 ~ 316.
[DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.089](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.089)
4. 松本英樹: がん温熱化学療法を増感メカニズムの再考. 福岡医学雑誌, 査読有, 100, 2009, 95 ~ 103.
<http://hdl.handle.net/2324/14755>
5. 松本英樹: NO を介したバイスタンダー応答の適応応答への寄与. *Isotope News*, 10 月号, 2009, 5 ~ 8.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10025536194/>
6. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam research. *J. Radiat. Res.*, 査読有, 50, Suppl, 2009, A67 ~ A79.
[DOI: 10.1269/jrr.09003S](https://doi.org/10.1269/jrr.09003S)

[学会発表] (計 27 件)

<特別講演>

1. 松本英樹: Radiosurgery のための Radiation Biology. 第 3 回放射線外科学会. 大阪市, 1/24, 2012.
2. 松本英樹: NO をメディエータとする生体応答—基礎研究からイノベーションまで—. 第 17 回浜松自由基研究会. 浜松市, 12/6, 2011.

3. 松本英樹, 畑下昌範: 陽子線がん治療における低線量被ばくによる正常組織反応の機構解明. 第 13 回若狭湾エネルギー研究センター研究報告会. 福井市, 10/27, 2011.
4. 松本英樹, 富田雅典, 大塚健介, 前田宗利, 舟山知夫, 横田裕一郎, 武藤泰子, 坂下哲哉, 小林泰彦: アルゴン・マイクロビーム照射による放射線適応応答の誘導. 第 6 回高崎量子応用シンポジウム. 高崎市, 10/14, 2011.
5. 松本英樹: 原発事故による緊急被ばくに対する救急処置薬の開発. 福井大学新技術説明会. 東京都, 8/23, 2011.
6. 松本英樹: 放射線によるシグナル伝達の修飾. 第 2 回放射線生物学セミナー. 東京都, 2/5, 2011.
7. 松本英樹: ラジカル発生剤による放射線増感の可能性. 第 40 回放射線による制癌シンポジウム. 札幌市, 7/9, 2010.
8. 松本英樹: 生体の放射線応答機構の鍵を握る一酸化窒素(NO)-バイスタンダー応答/適応応答の機構解明からイノベーション創出—. 第 56 回生命科学先端研究センター学術セミナー. 富山市, 4/14, 2010.
9. 松本英樹: 放射線によるシグナル伝達の修飾. 第 1 回放射線生物学セミナー. 東京都, 3/13, 2010.
10. 松本英樹: 粒子線誘発バイスタンダー応答と適応応答. 第 6 回日本粒子線治療臨床研究会. つくば市, 11/20, 2009.
11. 松本英樹: NO を介したバイスタンダー応答の適応応答への寄与. 第 46 回アイソトープ・放射線研究発表会. 東京都, 7/1, 2009.

<シンポジウム>

12. 松本英樹: 放射線によって誘発される適応応答とバイスタンダー応答. 日本物理学会第 67 回年次大会. 西宮市, 3/24, 2012.
13. 前田宗利, 松本英樹, 宇佐美徳子, 小林克己, 富田雅典: X 線誘発バイスタンダー応答による自然発生突然変異の抑制. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 神戸市, 11/18, 2011.
14. 大塚健介, 浜田信行, 馬替純二, 松本英樹, 塚本徹哉, 星裕子, 野村崇治, 富田雅典, 前田宗利, 吉田和生, 丹羽太貴, 岩崎利泰: 腸管組織の幹細胞ターンオーバー. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 神戸市, 11/18, 2011.
15. 松本英樹, 渡邊正巳, 田内広, 立花章, 鈴木啓司, 宇佐美徳子, 松本義久: 影響学会 Q&A 活動を通して見た社会的影響. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 神戸市, 11/18, 2011.
16. 松本英樹, 富田雅典, 大塚健介, 前田宗

利, 畑下昌範: 話題提供: エネルギーの異なる重粒子線照射によるバイスタンダー応答と適応応答. 日本放射線影響学会第54回大会. 神戸市, 11/17, 2011.

17. 松本英樹: 放射線誘発バイスタンダー応答研究の展望. 日本放射線影響学会第53回大会. 京都市, 10/20, 2010.
18. 松本英樹, 大塚健介, 富田雅典, 畑下昌範: 粒子線誘発バイスタンダー応答による小腸および精巣でのアポトーシス. 日本放射線影響学会第53回大会. 京都市, 10/21, 2010.

<国際学会>

19. Matsumoto, H.: How to approach the microbeam experiments. -from broad- to micro-beams. The 2nd Microbeam Experiment Training Course in the 10th International Workshop for Microbeam Probes of Cellular Radiation Response. New York (USA), 3/19, 2012. (invited)
20. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Maeda, M., Hatashita, M.: Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses. The 14th International Congress of Radiation Research. Warsaw (Poland), 9/1, 2011.
21. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: Radioadaptive response can be induced even after priming irradiation of a limited number of cells with charged heavy particles. The 56th Annual Meeting of Radiation Research Society. Maui, Hawaii (USA), 9/29, 2010. (Invited)
22. Matsumoto, H.: A redox status of tumor microenvironment in cancer therapy. The 5th Asian Congress of Hyperthermic Oncology (ACHO) The 27th Japanese Congress of Thermal Medicine (JCTM). Fukuoka, 9/11, 2010. (Invited)
23. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: A new paradigm in radioadaptive response developing from charged heavy particle microbeam research. The 9th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response. Darmstadt (Germany), 7/16, 2010.
24. Narita, N., Matsumoto, H., Yamamoto, H., Kimura, Y., Fujieda, S.: Analysis of molecular targets to overcome cisplatin-resistance in human maxillary cancer. The 23rd Congress of the European Rhinologic Society (ERS), The 29th International Symposium of Infection and Allergy of the Nose (ISIAN). Geneva

(Switzerland), 6/21, 2010.

25. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K.: A new paradigm in radioadaptive response developing from charged heavy particle microbeam research. The 5th NIRS International Open Laboratory Workshop on Advances in Dosimetry and Health Effects Associated with Exposure to Particles of Space Radiation Environment. Chiba, 1/13, 2010. (Invited)
26. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam researches. International Workshop on Radiation Biology and Radiation Protection. Shanghai (China), 10/15, 2009. (Invited)
27. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: Radiation-induced bystander and adaptive responses: emergent paradigm derived from fruitful microbeam biological research. The 2nd Asian Congress of Radiation Research. Seoul (Korea), 5/19, 2009. (Invited)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 放射線障害防護剤

発明者: 松本 英樹

権利者: 福井大学

種類: 特願

番号: 2010-079150

出願年月日: 平成22年3月31日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<新聞掲載>

1. 化学工業日報(朝刊) 平成23年8月 29日(月)掲載。「緊急被ばくにSNP」
2. 日経産業新聞(朝刊) 平成23年8月 29日(月)掲載。「狭心症薬が防護」

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号: 40142377

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし