

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20733

研究課題名（和文）プリンヌクレオチドGTPおよび神経栄養因子MANFによる放射線障害抑制効果の解明

研究課題名（英文）Study of radioprotective effect of purine nucleotide GTP and neurotrophic factor MANF

研究代表者

北畠 和己（KITABATAKE, KAZUKI）

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：40910732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：放射線治療は効果的ながん治療法であるが、放射線は骨髄細胞、特に造血幹細胞を障害する可能性があり、これらの障害は骨髄抑制などの副作用を引き起こす。この問題を解決するためには骨髄細胞の障害を軽減する薬剤の開発が重要である。本研究では中脳アストロサイト由来神経栄養因子（MANF）とグアノシン三リン酸（GTP）が骨髄細胞における放射線照射誘導の細胞死を抑制することを示し、MANFやGTPを放射線障害モデルマウスに投与することで骨髄抑制を改善することを明らかにした。これよりMANFやGTPが放射線障害を軽減する新規薬剤の候補となる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は放射線による副作用を軽減することで、より効果的な放射線治療の確立を目指した研究です。放射線はがん細胞だけではなく、正常な細胞、骨髄の細胞などを障害する可能性があり、これらは全身の免疫機能の低下を引き起こすため、放射線治療の継続が困難になります。そのため骨髄の細胞の放射線による細胞死を軽減する薬剤の開発が重要です。本研究では神経栄養因子（MANF）やグアノシン三リン酸（GTP）が骨髄細胞の放射線照射後の細胞死を抑制し、放射線照射後にMANFやGTPを投与することで放射線障害を改善できることを明らかにしました。本研究の生かすは今後の放射線治療の発展に役立つと考えられます。

研究成果の概要（英文）：Radiation therapy is an effective cancer treatment, but radiation damages bone marrow cells, especially hematopoietic stem cells, and these damages cause side effects such as myelosuppression. It is important to develop drugs that reduce damage to bone marrow cells. In this study, we showed that mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) and guanosine triphosphate (GTP) inhibit radiation-induced cell death in bone marrow cells, and it was clarified that administration of MANF and GTP to radiation injury model mice improved myelosuppression. Thus, we clarified the possibility that MANF and GTP may be candidates for new drugs that alleviate radiation damage.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 骨髄抑制 造血幹細胞 中脳アストロサイト由来神経栄養因子 グアノシン三リン酸 DNA損傷
修復 リンパ球 放射線防護剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

[放射線治療と放射線防護剤]

放射線治療は腫瘍細胞の DNA 損傷を引き起こして腫瘍成長を抑制するがん治療法で、非侵襲性・局所治療のため患者の QOL が高い。一方で放射線は腫瘍以外にも増殖が盛んな骨髄細胞・上皮細胞に放射線障害を引き起こし、これらは放射線感受性の細胞といわれる。中でも白血球・赤血球・血小板に分化する造血幹細胞の障害は免疫細胞の急激な減少（骨髄抑制）を引き起こし、感染症のリスクを高めるため放射線治療の継続が困難となる。放射線治療では正常組織の障害を防ぐことが重要であり、放射線の正常組織への障害を軽減する放射線防護剤の開発が求められる。現在まで放射線防護剤の候補が提案されてきたが、薬剤自身の副作用の大きさから、いまだに临床上に放射線防護剤は存在しない。そこで従来とは異なるメカニズムに着目して、新規放射線防護剤の標的を見出す必要がある。

[GTP および MANF による放射線防護効果]

当研究室では刺激により ATP が細胞外に放出、受容体を活性化させるプリンシグナリング[引用文献 1]や小胞体ストレス[引用文献 2]が放射線細胞応答に重要であることを報告している。申請者は ATP・ADP が気道上皮細胞の放射線障害を軽減させることを報告した[引用文献 3]。また当研究室では中脳アストロサイト由来神経栄養因子（MANF）が放射線照射後の小胞体ストレス反応を介して細胞外に放出、障害から細胞を保護することも明らかにした[引用文献 2]。一方、グアノシン三リン酸（GTP）の放射線細胞応答への関与は不明である。また MANF 添加による放射線防護効果についても不明である。最近、申請者は GTP や MANF の添加が骨髄細胞、特に造血幹細胞やリンパ球、気道上皮細胞の放射線障害を ATP や ADP より強力に軽減するという大変興味深い実験結果を得た。そこで本研究では、生体内分子（GTP および MANF）の添加による正常組織の放射線防護効果を利用し、放射線治療の副作用を予防する革新的な薬剤が開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、正常細胞への障害を軽減した放射線治療を目指し、放射線による正常組織の障害を軽減する新規薬剤の開発を目的とする。申請者は、放射線細胞応答に関与すると思われるプリンシグナリング GTP および神経栄養因子 MANF を添加することで放射線感受性の正常組織の放射線障害を軽減するという、これまでにない新薬の開発に向けた基盤研究を行う。当研究室では世界で初めて ATP と放射線細胞応答に注目し、申請者も ATP やアデノシンの放射線細胞応答への寄与を報告した[引用文献 3, 4, 5, 6]。一方で GTP の細胞外の機能は不明な点が多く、GTP が放射線障害から細胞を保護するという報告はない。MANF は小胞体ストレスにより細胞外に放出、様々な細胞で保護作用を持ち、当研究室では MANF の放射線細胞応答への関与を世界で初めて報告した[引用文献 2]が、MANF 添加の正常組織の放射線障害への影響は不明である。GTP および MANF の放射線防護効果については世界でも研究されておらず、まだ注目されていない。本研究では先駆けて、GTP と MANF が正常組織の放射線障害を軽減する因子である可能性に着目し、GTP および MANF が放射線照射した骨髄細胞、リンパ球、の放射線障害を軽減する新規薬剤となることを解明する。今まで提案された放射線防護剤は正常組織を防護する一方で、がん細胞も防護することが懸念される。一方でがん細胞において放射線抵抗性因子のアデノシンへと代謝されることのない GTP や MANF の添加はがん細胞に影響を与えずに正常組織の障害を軽減できる画期的治療法となる可能性が期待される。放射線の正常組織への障害は、放射線治療だけではなく、放射線業務の従事者の被ばくも懸念され、これを防ぐ薬剤は開発されていない。GTP や MANF が放射線防護剤となれば、放射線環境の公衆衛生を改善するという、大きな波及効果も期待される。そこで本研究では、GTP および MANF が放射線による正常組織の障害を軽減させる世界で初めての放射線防護剤として、がん医療での貢献のみならず、将来的には、放射線被ばくの公衆衛生も改善する薬剤としての適応も目指していく。

3. 研究の方法

本研究は、2 年間で、GTP および MANF による正常組織への放射線防護効果を *in vitro*、*ex vivo* 実験により明らかにし、マウスへの放射線障害への軽減効果について *in vivo* 実験で明らかにする。放射線照射は、線照射装置（¹³⁷Cs 線源 0.69 Gy/min）を用いる。初年度にマウス由来の骨髄細胞や造血幹細胞、脾リンパ球への GTP の放射線防護効果とメカニズムを解明後、放射線をマウスに照射して引き起こした骨髄抑制に対する GTP の障害軽減効果を *in vivo* 実験で明らかにする。2 年目に MANF の放射線防護効果についても同様に明らかにする。（次項図 1 参照）

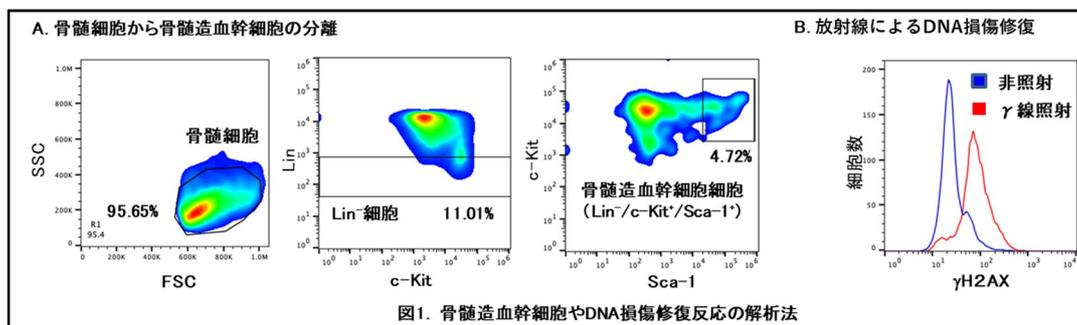
・使用細胞・動物：C57BL/6 雄マウス由来骨髄細胞（下肢大腿骨・脛骨から採取）・脾リンパ球（*ex vivo*）と C57BL/6 マウス雄（*in vivo*）を用いる。

・初年度「造血幹細胞、脾リンパ球における GTP による放射線防護効果」

・次年度「造血幹細胞、脾リンパ球における MANF による放射線防護効果」

1. 骨髄造血幹細胞（造血幹細胞マーカー Lin⁻/c-Kit⁺で標識）脾リンパ球の放射線誘導の細

- 胞死の解析 (MTT 法、PI 取り込み) (図 1 A)
- DNA 損傷修復 (γ H2AX の focus 形成) の変化の解析 (蛍光免疫染色法) (図 1 B)
 - p38 MAPK などの細胞内シグナルの解析 (Flow cytometry)
 - 放射線により C57BL/6 マウスに骨髄抑制 (骨髄、脾臓、全血の細胞数減少) を誘導し、GTP および MANF の障害軽減効果の解明 (in vivo)



4. 研究成果

(1) 造血幹細胞、脾リンパ球における GTP による放射線防護効果

マウス由来骨髄細胞において、放射線照射後に生存率の低下が示された。照射後に ATP や GTP などのプリンヌクレオチドやその代謝物であるヌクレオシドを添加したところ、特に GTP によって放射線照射誘導の細胞死が抑制された。次にマウスに γ 線を全身照射し、照射後 24 時間後と 48 時間後においてマウスの骨髄、脾臓および全血中の細胞数は顕著に減少した。また造血幹細胞 (Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺) の割合の減少、リンパ球 (T 細胞および B 細胞) の減少が引き起こされ、 γ 線の全身照射によるマウスの骨髄抑制が確認された。 γ 線照射後にマウスに GTP を投与したところ、照射誘導の骨髄、脾臓および全血中の細胞数、造血幹細胞の割合、リンパ球の減少は軽減された。これより GTP の放射線による骨髄抑制を抑制する効果 (放射線防護効果) が示された。また造血幹細胞において、GTP は γ 線照射後の細胞死、細胞周期の異常、p38 MAPK のリン酸化は抑制し、DNA 損傷修復を促進した。GTP は照射後の p38 MAPK のリン酸化の抑制や DNA 損傷修復の促進により照射誘導の細胞死を抑制することが示された。これらの結果より、GTP は造血幹細胞の放射線照射誘導の DNA 損傷を軽減することで細胞死を抑制し、放射線防護効果を示すことが明らかになった。(論文投稿準備中)

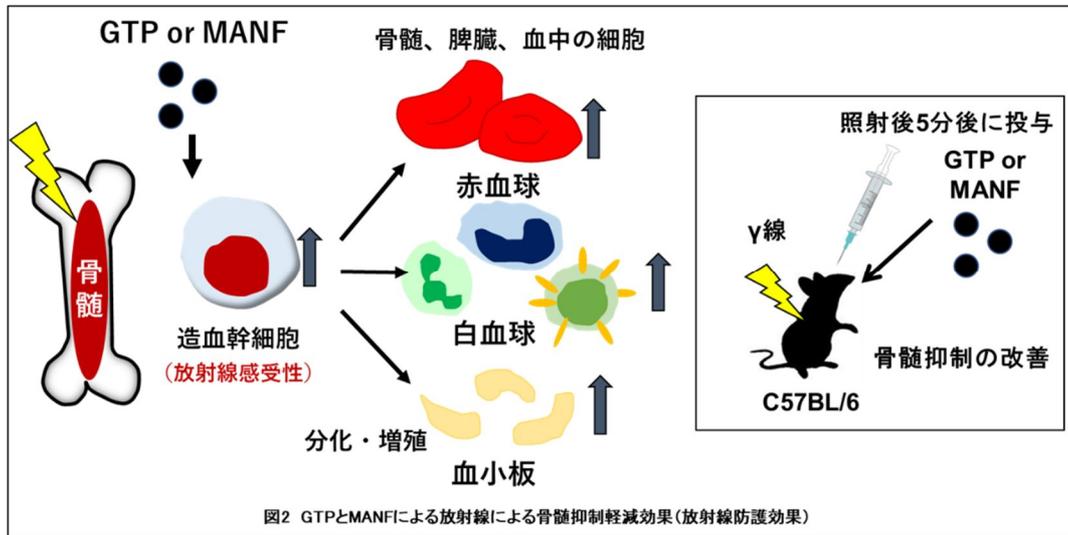
(2) 造血幹細胞、脾リンパ球における MANF による放射線防護効果

GTP と同様に MANF による放射線防護効果について検討を行った。MANF の添加は γ 線照射後の骨髄細胞の細胞死を抑制した。マウスへの放射線全身照射による骨髄抑制も MANF の添加によって顕著に軽減された。さらにマウスに全身照射して 24 時間後、48 時間後に摘出した骨髄の細胞に MANF を添加したところ造血幹細胞の割合が増加した。造血幹細胞の放射線誘導の細胞死や細胞周期の異常も MANF は軽減した。これより MANF の放射線防護効果が示された。さらに興味深いことに、非照射の骨髄細胞に MANF を添加したところ造血幹細胞の割合は増加した。MANF は造血幹細胞の分化などに関与する可能性があることも明らかになった。(論文投稿準備中)

(3) まとめ

本研究では、プリンヌクレオチドである GTP と神経栄養因子である MANF が放射線誘導の骨髄抑制を軽減する効果 (放射線防護効果) を持つことを明らかにした。これらのメカニズムとして骨髄に含まれる造血幹細胞の細胞死や細胞周期の異常、DNA 損傷修復の調節が示された (図 2)。また MANF は放射線の照射がなくても、骨髄内の造血幹細胞の割合を増加させることが見出され、これは当初予期していたものではなかったが、本研究の過程で新たに解明された研究成果である。

本研究は放射線照射による骨髄細胞、特に造血幹細胞の細胞死を GTP や MANF が抑制し、結果的にマウスへの全身照射による骨髄抑制を軽減できることを初めて明らかにしたものであり、学術的に大変重要な研究成果である。本研究により、がんの放射線治療時や放射線被ばく時に GTP や MANF を投与することで、放射線による骨髄抑制などの放射線障害を軽減できることを示し、GTP や MANF が現在の放射線治療の副作用の問題を解決、放射線被ばく時の放射線障害を治療する放射線防護剤の候補となる可能性を示した。さらに MANF は非照射時の造血幹細胞の割合の調節をおこなうことも明らかになった。今後、GTP や MANF の放射線防護剤の詳細なメカニズムと放射線照射時の細胞応答における役割を明らかにして、放射線防護剤としての開発に向けた研究を行っていく予定である。



引用文献

1. Nishimaki N, Tsukimoto M, Kitami A, Kojima S. Autocrine regulation of γ -irradiation-induced DNA damage response via extracellular nucleotides-mediated activation of P2Y6 and P2Y12 receptors. *DNA Repair (Amst)*. 1;11(8) (2012) 657-65.
2. Tanaka Y, Takenouchi T, Tsukimoto M. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is a novel radioresistance factor in mouse B16 melanoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 16;524(4) (2020) 869-875 (2020).
3. Kazuki Kitabatake, Toshiyuki Kaji, Mitsutoshi Tsukimoto, ATP and ADP enhance DNA damage repair in γ -irradiated BEAS-2B human bronchial epithelial cells through activation of P2X7 and P2Y12 receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*. (2020) 407 (2020) 115240.
4. Kazuki Kitabatake, Eiko Yoshida, Toshiyuki Kaji, Mitsutoshi Tsukimoto, Involvement of adenosine A2B receptor in radiation-induced translocation of epidermal growth factor receptor and DNA damage response leading to radioresistance in human lung cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1864(1) (2020)129457.
5. Yuta Tanaka, Kazuki Kitabatake, Ryo Abe, Mitsutoshi Tsukimoto, Involvement of A2B Receptor in DNA Damage Response and Radiosensitizing Effect of A2B Receptor Antagonists on Mouse B16 Melanoma. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. (2020) 43(3) (2020) 516-525.
6. Kazuki Kitabatake, Toshiyuki, Kaji, Mitsutoshi Tsukimoto, Involvement of CD73 and A2B receptor in radiation-induced DNA damage response and cell migration in human glioblastoma A172 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 44(2) (2021) 197-210.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 北畠 和己、竹之内 敬人、月本 光俊 |
| 2. 発表標題 中脳アストロサイト由来神経栄養因子 MANFによる放射線骨髄毒性の軽減効果 |
| 3. 学会等名 日本薬学会142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 北畠 和己、月本光俊 |
| 2. 発表標題 細胞外グアノシン三リン酸（GTP）による電離放射線照射後の骨髄細胞の細胞死の調節 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 守屋 有悠、北畠 和己、月本光俊 |
| 2. 発表標題 細胞外ヌクレオチドによる放射線誘導の骨髄細胞における細胞死の軽減効果 |
| 3. 学会等名 日本薬学会143年会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|