

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510066

研究課題名（和文）新規ビタミン E 誘導体の放射線防御作用機構の解明

研究課題名（英文）Reaction Mechanism of new vitamin E analog for protecting radiation injuries

研究代表者

安西 和紀（ ANZAI KAZUNORI ）

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70128643

研究成果の概要（和文）：いくつかの水溶性ビタミン E 誘導体の中から、 γ トコフェロールジメチルグリシンエステルが X 線あるいは炭素重粒子線の全身被爆後の投与で、マウスの骨髄死に対して著しい防御作用を示すことがわかった。この効果は、血液像変化や内因性コロニー形成能の結果より、血液系細胞の回復を増強することによることが明らかになった。また、腫瘍移植モデルを用いた検討より、この化合物は炭素重粒子線による腫瘍抑制効果には影響を与えないことが示された。

研究成果の概要（英文）：Several vitamin E analogs were examined against radiation-induced bone marrow death of mice and γ -tocopherol dimethylglycine ester was found to be most effective. It increased the survival of mice after whole body exposure of X-rays or carbon heavy atom radiation. The effect was found to be derived from the increase of the recovery of hematopoietic cells. The compound did not inhibit the control of tumor growth by local carbon heavy atom radiation using mouse xenograft model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：放射線防護剤、ビタミン E 誘導体、骨髄死

1. 研究開始当初の背景

放射線影響修飾剤研究は古くて新しい研究領域である。高齢化社会を迎えて増大しているガンとの戦いにおいて、放射線治療は外科手術などと比べて非侵襲的であり優れている。しかしながら、重粒子線治療をはじめとする物理工学的な装置の改良といった努力にもかかわらず、放射線治療に伴う正常組

織の障害は完全には克服されていなかった。そこで、化学的な防御法についても幅広く検討する必要がある。正常組織に対する有効な化学的防御法が確立すれば、ガンの放射線治療のさらなる高度化に資することができる。さらに、航空機テロを契機に、米国では核・放射線のテロへの恐怖も増し、新たな放射線影響修飾剤研究の必要性が示されてきた（Coleman 他, *Science*, **304**）

693-694, 2004)。

放射線の発見以来、放射線の有する有害作用をいかに防ぐかという研究努力がなされてきたが、薬剤（化学物質）を投与することによって放射線障害を防護・低減化する放射線影響修飾剤研究も長い歴史を持つ。半世紀以上前にチオール基を有するシステアミンが高い放射線防護作用を示すことが発見され、システアミンを基本骨格として一連の化合物の大規模スクリーニング研究により米国でアミフォスチン（開発コード名 WR-2721）が開発された。しかし、臨床的にはアミフォスチンの副作用は無視することはできず、放射線防護剤としては限定的な使用しか許可されていないという状況であった。

放射線障害を防護あるいは低減化する薬剤は、その使用時期と目的により以下の3つのカテゴリーに分類することができる。

(1) 放射線が照射される前に投与されて放射線障害を防御する防護剤。

(2) 放射線被ばく後の早いうちに投与されて障害の増悪化を防ぐ緩和剤。

(3) 放射線障害が惹起されてから投与されて障害を治療する治療剤。

申請者らはこれまで、抗酸化作用を有する化合物に注目して、(1)のカテゴリーに属する防護剤を研究してきた（例えば K. Anzai 他, *J. Radiat. Res.* **45**, 319 (2004)、K. Anzai 他, *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1170 (2006)）。ところが最近、我々は抗酸化剤ビタミンE（トコフェロール）の誘導体であるトコフェロールモノグリコシド (TMG) が(2)のカテゴリーに属する作用、すなわち放射線被ばく後に投与して放射線防御作用を示すことを見出した (M. Ueno 他, *Radiat. Res.* **172**, 519 (2009))。さらに、 γ -トコフェロール・ジメチルグリシン (γ -TDMG) をはじめとするいくつかのビタミンE誘導体でも、放射線被ばく後に投与してもマウスの30日生存率を著しく上昇させる作用があることを見出した (安西他、特許出願中：特願2006-325408)。また、亜鉛酵母熱処理粉末も同様な作用を有することも見出した (安西他、特許公開中：特開2007-176879、K. Anzai 他, *J. Radiat. Res.* **49**, 425-430(2008))。以上の結果は、これらの化合物は抗酸化作用以外の別な機構で作用していることを強く示唆している。しかしながら、それらの作用機構についてはほとんど解明されておらず、詳細な作用機構の検討が必要であった。

2. 研究の目的

申請者らは、放射線被ばく後に投与してもマウスの30日生存率を著しく上昇させる作用があるいくつかのビタミンE誘導体を見出している。しかし、その作用機構について

はほとんど解っておらず、詳細な作用機構の解明が必要である。そのために、構造活性相関の手法を用いて放射線照射後に投与して最大の防御活性を示す化合物を見出し、それによるマウス血液細胞系の変動、内因性コロニー形成能への影響、mRNA あるいは遺伝子産物の変動を解析することにより、作用標的および作用機構を明らかにする。また、将来的な実用へ向けての基礎基盤的研究をおこなう。申請者らが見出した化合物は小分子量の合成単一化合物であって取扱が容易であるという非常に優れた化学的性質を有する。この性質は放射線治療後の正常組織防護や被ばく事故後の利用という実用化を指向する場合に極めて有利である。

3. 研究の方法

- 1) 一連のトコフェロール誘導体を基盤として、構造活性相関をマウス30日生存率を指標とした *in vivo* アッセイ系を用いて検討し、活性部位に関する知見を得るとともに高活性の化合物を得る。
- 2) 高活性の化合物について、投与ルート、投与タイミングの影響、体内動態等を調べる。
- 3) マウスの血液像の変化、内因性コロニー形成能への影響、遺伝子発現変動解析、タンパク質発現変動解析等を用いて作用部位および作用機構を明らかにする。
- 4) 担癌マウスモデルを用いて放射線による腫瘍制御効果に対する影響の有無を明らかにするとともに、種々の放射線に対する効果の違いを調べる。

4. 研究成果

γ -トコフェロールジメチルグリシンエステル (γ -TDMG) の各種類縁体をメチルセルロース溶液に分散した試料について、X線全身被ばくによる骨髄死に対する放射線防御効果をマウスの30日生存率を指標にして比較した。 α -トコフェロールジメチルグリシンエステル、 α -トコトリエノールジメチルグリシンエステル、 γ -トコトリエノールジメチルグリシンエステルのいずれも、X線7.5 Gy(90%以上のマウスが死亡する線量)を全身照射した直後に100 mg/kgを腹腔内投与することにより、30日生存率が80%以上になり、強い防御効果が観察された。しかしながら、4種の中では γ -TDMGが最も強い防御効果を示した(生存率95%以上)。この結果は、 α 体と γ 体、およびトコフェロールとトコトリエノールという構造の違いは大きな影響を与えないことを示している。すなわち、ビタミンE一般のジメチルグリシン誘導体に大きな放射線防御効果があると言える。

放射線治療で最近注目されている重粒子線において、全身照射によるマウスの骨髄死に

に対する γ -TDMGの効果を、マウスの30日生存率から評価した。その結果、X線の場合と同様に炭素重粒子線でも、マウスを全身照射した直後に γ -TDMG (100 mg/kg)を腹腔内投与すると30日生存率が大きく上昇し、は被ばく後の投与でも炭素重粒子線による骨髓死に対して高い放射線防御効果を示すことが観察された。線量を変えて生存率を測定することにより線量低減効率 (DRF) を求めたところ、100 mg/kgの γ -TDMGの投与におけるDRFは1.15となり、これはX線の場合に得られているものと同様な値であった。

X線照射において、腹腔内投与の代わりに γ -TDMGをマウスに経口投与あるいは皮下投与したときの放射線防御効果を30日生存率から評価した。経口投与の場合は、有意な放射線防御効果は認められなかった。一方、腹腔内投与で効果が認められていた濃度の γ -TDMGを全身照射直後に皮下投与した場合、腹腔内投与には少し劣るが有意な放射線防御効果が見出された。将来的なヒトへの適用を考えた場合、最も容易な経口投与は残念ながら効果がなかったものの、次善の投与方法である皮下投与が有効なことがわかったことは希望が持てる。

γ -TDMGをがんの放射線治療時の正常細胞の障害防護に使用しようとする場合、もし放射線のがん組織への効果を減じてしまうとすれば不都合である。そこで、この点を確認するために、マウスに腫瘍を植え付け、そこへ放射線を局所照射して腫瘍の成長抑制を引き起こしたときの γ -TDMG投与の有無による効果の違いを調べた。その結果、炭素重粒子線局所照射直後に γ -TDMGをマウスに腹腔内投与しても、大腿部に植えつけた腫瘍に対する炭素重粒子線による腫瘍成長抑制効果を阻害することはなかった。すなわち、この結果は、 γ -TDMGを炭素重粒子線によるがん治療時に使用しても、炭素重粒子線によるがん細胞致死作用には影響を与えないことを示唆している。この結果がどのようなメカニズムによるものかは現在のところ不明であるが、投与した γ -TDMGが腫瘍組織に分布しているかどうかを調べる必要がある。

γ -TDMGの放射線防御効果のメカニズム解明のために、X線全身被ばく後のマウスの血液像が γ -TDMG投与によってどのように変化するかを調べた。C3Hマウスに6.0 GyのX線を全身照射し、その後の赤血球、白血球、および血小板の数を照射後28日まで調べた。マウスを群分けし、主にコントロール群 (照射+メチルセルロース溶液投与) と γ -TDMG投与群 (照射+ γ -TDMG投与) の2群を比較した。赤血球数においては、 γ -TDMG投与群とコントロール群のいずれにおいても、X線照射3日後に30-40%程度の上昇があり、その後減少して2週間後には25-40%になった。

γ -TDMG投与群ではその後、上昇に転じ、4週間後には80%程度まで回復した。一方、コントロール群ではさらに減少が続き、4週間後には20%以下になった。白血球数はいずれの群も照射3日後には10%以下に低下し、それが2週間まで続いた。 γ -TDMG投与群ではその後急激な回復があり、4週間後には完全に回復したが、コントロール群では若干の回復しかなかった。血小板数は白血球に比べて減少が遅く、1週間後程度で10%以下になり、いずれの群も2週間を過ぎてから回復が始まったが、コントロール群の回復はわずかであったのに対して γ -TDMG投与群では4週間後には60%以上に回復していた。これらの結果は、 γ -TDMGの放射線防御作用は血球系細胞の回復を増強させることによることを示している。内因性脾臓コロニー数を測定する実験においても、同様な機構を示す結果が得られた。 γ -TDMG投与によるサイトカイン量の変化を調べた結果、IL-6、KC、MCP-1といったサイトカイン量の増加が認められた。

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4件)

- 1) Kazunori Anzai, Megumi Ueno, Ken-ichiro Matsumoto, Nobuo Ikota, Jiro Takata: Gamma-tocopherol-*N,N*-dimethylglycine ester as a potent post-irradiation mitigator against total body X-irradiation-induced bone marrow death in mice, *J. Radiat. Res.*, in press. 査読有
- 2) Kazunori Anzai, Nobuhiko Ban, Toshihiko Ozawa, Shinji Tokonami: Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident: facts, environmental contamination, possible biological effects, and countermeasures, *J. Clin. Biochem. Nutr.* **50**, 2-8, 2012. 査読有
- 3) Cuiping Chi, Daisuke Hayashi, Masato Nemoto, Minako Nyui, Shiro Urano, Kazunori Anzai: Vitamin E-deficiency did not exacerbate partial skin reactions in mice locally irradiated with X-rays, *J. Radiat. Res.* **52**, 32-38, 2011. 査読有
- 4) Megumi Ueno, Kaori Imadome, Mayumi Iwakawa, Kazunori Anzai, Nobuo Ikota, Takashi Imai: Vascular Homeostasis Regulators, Edn1 and Agpt2, are Upregulated as a Protective Effect of Heat-treated Zinc Yeast in Irradiated Murine Bone Marrow, *J. Radiat. Res.* **51**, 519-525, 2010. 査読有

[学会発表] (計10件)

- 1) K. Anzai, M. Ueno, M. Nishimura, Y. Shimada: Effects of several antioxidants against X-ray-induced thymic lymphoma in

mice, Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting, 2012.9.6-9, London, UK.

2) 関根絵美子、上野恵美、下川卓志、松本謙一郎、中西郁夫、中村悦子、中渡美也子、今井高志、安西和紀、村上 健：迅速簡便な放射線防護剤スクリーニング法の確立、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、2012.6.7-8、徳島市

3) 安西和紀：水溶性ビタミン E 誘導体による放射線防護効果、機能性物質による被ばく低減化研究会第 1 回会合、2012.1.26、東京

4) Kazunori Anzai: Radiation Modifier:

Compounds, which modify radiation injuries, 中国輻射防護研究院セミナー、2011.11.24, 太原、中華人民共和国

5) Ikuo Nakanishi, Keiko Imai, Tomonori Kawashima, Kiyoshi Fukuhara, Shunichi Fukuzumi, Kazunori Anzai, Toshihiko Ozawa, Masataka Mochizuki, Ken-ichiro Matsumoto: Radical-scavenging activity of 6-chromanol derivatives with various substituents, SFRBM's 18th Annual Meeting, 2011.11.16-20, Atlanta, USA.

6) Kazunori Anzai, Megumi Ueno, Ken-ichiro Matsumoto, Jiro Takata: γ -Tocopherol-*N,N*-dimethylglycine ester is a potent radiation mitigator against bone marrow death of mice induced by total body irradiation of X-rays or carbon-beams, 14th International Congress of Radiation Research (ICRR2011), 2011.8.28-9.1, Warsaw, Poland

7) 中西郁夫、稲見圭子、大久保 敬、川島知憲、松本謙一郎、福原 潔、奥田晴宏、望月正隆、伊古田暢夫、福住俊一、小澤俊彦、安西和紀：ビタミン E および 6-クロマノール誘導体のラジカル消去反応における構造活性相関、日本薬学会第 131 年会、2011.3.29-31、静岡市

8) 安西和紀、上野恵美、松本謙一郎、高田二郎：炭素重粒子線によるマウス骨髄死に対する水溶性ビタミン E 誘導体の防御効果、第 22 回ビタミン E 研究会、2011.1.28-29、京都市

9) Kazunori Anzai, Megumi Ueno, Nobuo Ikota, Jiro Takata: A vitamin E analog (γ -Tocopherol-*N,N*-dimethylglycine ester) is a potent radiation mitigator against bone marrow death of mice induced by whole body irradiation of X-rays and carbon beams, International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine, 2011.1.20-22, Kyoto, Japan

10) Kazunori Anzai, Megumi Ueno, Nobuo Ikota, Jiro Takata:

γ -Tocopherol-*N,N*-dimethylglycine ester as

an potent post-irradiation radiation mitigator against total body X-irradiation-induced bone marrow death of mice, SFRRI's XV Biennial Meeting and SFRBM's 17th Annual Meeting, 2010.11.17-22, Orlando, USA.

10) 中西郁夫、稲見圭子、大久保敬、川島知憲、松本謙一郎、福原 潔、奥田晴宏、望月正隆、伊古田暢夫、福住俊一、小澤俊彦、安西和紀：密度汎関数計算に基づく新規ビタミン E 誘導体の分子設計とラジカル消去活性評価、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010.6.24-25、横浜市

〔図書〕 (計 1 件)

1) 小澤俊彦、安西和紀、松本謙一郎：放射線の科学 生体影響および防御と除染、東京化学同人、2012 年、109 頁。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安西 和紀 (ANZAI KAZUNORI)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70128643

(2) 研究分担者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO
KEN-ICHIRO)
放射線医学総合研究所・重粒子医科学
センター・チームリーダー
研究者番号：10297046
高田 二郎 (TAKATA JIRO)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：90122704

(3) 連携研究者

()

研究者番号：