

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293256

研究課題名(和文) トロンボポエチン受容体作動薬による放射線曝露個体の救命効果と作用機序解明

研究課題名(英文) Life-saving effect and mechanism of action of thrombopoietin receptor agonist in radiation-exposed individuals

研究代表者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA, IKUO)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00177370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請時に4年間の研究計画目標として挙げたのは以下の3点である。
放射線曝露個体に対する作動薬の最適な投与方法の確立。放射線曝露個体における作動薬の致死回避の作用機序解明。作動薬で救命した個体の長期観察による有害事象発生の検証。平成25年度からの研究開始からおおよそ3年間で予定した計画は概ね達成出来た。TPO受容体作動薬ロミプロスチムは曝露後3日間が至適投与であること、作用機序としては未熟造血幹細胞や腸管の生体幹細胞に作用して放射線障害の軽減や再生を促進する事、長期観察による有害事象は見られない事等の成果を得る事が出来た。今後はロミプロスチムの作用機序解明が求められる。

研究成果の概要(英文)：The following three points were cited as research targets
1) Establishment of an optimal administration method of a thrombopoietin (TPO) receptor agonist in radiation-exposed individuals 2) Elucidation of the mechanism of action of lethal evasion of agonists in radiation-exposed individuals 3) Verification of the occurrence of adverse events in radiation-exposed individuals using a TPO receptor agonist romiplostim (RP) as a life-saving agent by long-term observation
The planned schedule for 3 years from the start of the research was largely adhered to. Administration of RP is optimal for 3 days after radiation exposure. RP acts on immature hematopoietic stem cells and vital stem cells of the gastrointestinal tract to promote long-term radiation reduction and regeneration. No adverse events were observed in radiation-exposed individuals using RP. Thus, we suggest that RP acts on recovery and regeneration of the hematopoietic and gastrointestinal systems from radiation damage.

研究分野：放射線生物学

キーワード：被ばく医療 TPO受容作動薬 造血幹細胞 急性放射性症候群

1. 研究開始当初の背景

トロンボポエチン (TPO) 受容体作動薬は、2010 年以降日本においても特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 治療薬として承認され、TPO ペプチド及び TPO 非ペプチド型類似薬が利用されている。TPO は巨核球系細胞の分化と血小板の産生を担うサイトカインとして 1994 年に初めて単離され、直ちに遺伝子組み換え TPO 製剤が開発された。その後 TPO は巨核球系のみならず血液幹細胞にも作用する事が見出されている。然しながら、健常人に対する臨床試験において、TPO 製剤に対して中和抗体が誘導され、逆に血小板数が減少する有害事象が出現し、TPO 製剤の開発は直ちに中止となった。その後 TPO の受容体結合部位の探索から受容体作動薬開発へと繋がった。

我々はこれまで、致死線量の放射線曝露個体に、特発性血小板減少性紫斑病治療薬であるトロンボポエチン (TPO) 受容体作動薬を照射後 3~5 日間投与すると、30 日以内の致死マウスを 100% 生存させる作用を見出した。本剤と同類の化合物には一部放射線防護効果も報告されているが、完全致死個体を完全回避させた報告は無い。作用機序として血小板産生促進や腸管障害治癒再生が考えられるものの、詳細な作用機序については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、放射線曝露マウスモデルにより、TPO 受容体作動薬の最適な投与方法の確立、TPO 受容体作動薬の致死回避の作用機序解明を目的とする。本研究の成果は、緊急被ばく医療への応用に加え、がん放射線治療に伴う骨髄抑制等の副作用軽減への適応等、研究成果の社会的及び医学的な還元が期待される。

3. 研究の方法

本研究の目的は、TPO 受容体作動薬 (以下「作動薬」) による放射線曝露個体の救命効果と作用機序解明にある。この目的達成のため、致死放射線曝露マウスモデルを用い、造血・免疫機能及び消化管機能を指標に本剤の許容線量、至適投与量、投与方法の検討から標準となる投与プロトコルを確立する。次に、標準プロトコルをもとに本剤の作用機序について検討する。具体的には、薬物代謝、組織移行及び分布、各種生体幹細胞への作用、2 次的なサイトカイン産生の促進効果について検討する。さらに、標的組織や細胞における遺伝子発現の変化についても評価解析する。併せて本剤投与生存個体の長期間観察を行い、致死を回避した個体における白血病などの発がん等晩発的な有害事象発生の有無を染色体や遺伝子レベルで検討する。

4. 研究成果

(1) 7Gy 線照射マウスは、照射後約 10% が

27 日間生存し、30 日目には全て死亡した。照射個体に c-mpl 作動薬であるロミプロスチム (RP) を単回投与 (50 µg/Kg) した場合、30 日目で 87.5% のマウスが生存し、3 日間あるいは 5 日間連続投与すると全マウスが生存した。

(2) 7Gy 照射後 20 日目までは、RP 非投与群と投与群いずれも強い骨髄抑制が見られたが、30 日目では投与群で統計的有意差がなくなるまで回復した。骨髄細胞の細胞表面発現抗原解析から、造血前駆細胞や骨髄系前駆細胞分画にその傾向が強く認められ、なかでも赤血球系、顆粒球・マクロファージや NK 細胞分画の細胞数で有意な回復が見られた。

(3) 致死線量 7 Gy 照射マウスへ RP 50 µg/Kg を照射後 3 日間連続投与し、照射後 30 分、1 日、4 日及び 14 日目の生存個体骨髄細胞を用いて DNA 損傷及び DNA 修復状態を共焦点顕微鏡により解析した。その結果、DNA2 重鎖切断初期応答において切断部位にフォーカスを形成する γ-H2AX は 1 日目に RP 投与で有意な発現減少が認められた一方、2 重鎖切断損傷応答の非同相末端結合修復経路において機能する因子 53BP1 は薬剤投与により有意な集積の増加が認められ、NHEJ 修復による DNA 修復が亢進していると考えられた。

(4) 骨髄細胞におけるアポトーシスを共焦点顕微鏡及び FACS による解析を行ったところ、1 日目及び 14 日目において照射マウスへの RP 投与による骨髄細胞死の抑制が確認された。

(5) 十二指腸組織標本のヘマトキシリン染色による病理学的解析では、致死線量照射非投与マウスでは細胞の萎縮や絨毛の並びの不均一さ、形態の歪みが目立つ一方、RP 投与個体では非照射コントロールと同様の形態が観察され、RP は造血系及び消化器系の放射線障害からの回復・再生に作用する可能性が示唆された。

(6) 投与量について検討した結果、7Gy 照射個体では RP 50 µg/Kg の 3 日間投与が至適投与量であり、100% の 30 日生存をもたらしたが、照射線量が 8 Gy 以上では完全に致死を回避出来ず、投与量を 10 倍に増加させても救命出来ない事が明らかとなった。しかしながら、投与回数を 1 日 2 回に増やして 3 日間投与したところ、8 Gy 曝露個体は全例 30 日間の生存が認められた。

(7) RP 投与救命個体の長期観察による有害事象発生について検討した。200 日間の検証の結果、生存率は 83% に低下したが、生存個体に明らかな有害事象は認められなかった。

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 14 件)

1. H. Yoshino, Y. Kumai, I. Kashiwakura. Effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis induction in radioresistant macrophages. *Mol. Med. Rep.*, 2017, 15(5), 2867-2872, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1173>, 査読有.
2. S. Fukushi, H. Yoshino, A. Yoshizawa, I. Kashiwakura. p53-independent structure-activity relationships of 3-ring mesogenic compounds' activity as cytotoxic effects against human non-small cell lung cancer lines. *BMC Cancer*, 2016, 16(1), 521, 査読有.
3. K. Yokoyama, M. Yamaguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, A. Tanaka, M. Hosoda, I. Kashiwakura. Radiomitigative Effects of *Grifola frondosa* Preparations on Mice Exposed to Lethal Ionizing Irradiation. *J J Food Nutri*, 2016, 2(3),22-25, 査読有.
4. T. Tsujiguchi, T. Hirouchi, S. Monzen, Y. Tabuchi, I. Takasaki, T. Kondo, I. Kashiwakura. Expression analysis of radiation-responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiat Res.* 2016, 57(1), 35-43, doi: 10.1093/jrr/rrv071. Epub 2015 Dec 9, 査読有.
5. M. Chiba, N. Watanabe, M. Watanabe, M. Sakamoto, A. Sato, M. Fujisaki, S. Kubota, S. Monzen, A. Maruyama, N. Nanashima, I. Kashiwakura, T. Nakamura. Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol.*, 2016, 48(1), 305-312, doi: 10.3892/ijo.2015.3255. Epub 2015 Nov 19, 査読有.
6. T. Hirouchi, K. Ito, M. Nakano, S. Monzen, H. Yoshino, M. Chiba, M. Hazawa, A. Nakano, J. Ishikawa, M. Yamaguchi, K. Tanaka, I. Kashiwakura. Mitigative Effects of a Combination of Multiple Pharmaceutical Drugs on the Survival of Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2015,17(2), 190-199, 査読有.
7. H. Yoshino, T. Saitoh, M. Kozakai, I. Kashiwakura. Effects of ionizing radiation on retinoic acid-inducible gene-1-like receptors. *Biomed Rep.*, 2015, 3(1), 59-62, 査読有.
8. A. Nishiyama, M. Yamaguchi, T. Tsujiguchi, S. Murakami, I. Kashiwakura. Evaluation of oxidative stress markers in plasma derived from individuals exposed to ionizing radiate

on. *Exp. Ther. Med.*, 2015, in press, 査読有.

9. H. Yoshino, K. Chiba, T. Saitoh, I. Kashiwakura. Ionizing radiation affects the expression of Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytic cells through c-Jun N-terminal kinase activation. *J Radiat Res.*, 2014, 55(5), 876-884, 査読有.
10. M. Yamaguchi, T. Hirouchi, M. Nakano, H. Yoshino, M. Chiba, J. Ishikawa, A. Nishiyama, S. Murakami, K. Ito, I. Kashiwakura. Long-lasting Radioprotective Effects of a Combination of Pharmaceutical Drugs on the Survival of Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation. *Radiat Emerg Med.*, 2014, 3(1), 50-55, 査読有.

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 三浦 柁太, 伊藤 優樹, 山口 平, 千葉 満, 柏倉 幾郎. 高線量放射線ばく露マウス血清中の microRNA 発現変化の被ばくマーカーとしての可能性の検討. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 2016 年 10 月 26 日 ~ 28 日, JMS アステールプラザ(広島県広島市).
2. M. Yamaguchi, K. Yokoyama, Y. Ito, S. Miura, M. Chiba, I. Kashiwakura. The mitigative effect of romiplostim, a recombinant c-mpl agonist, on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation. The 3rd Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by Young Scientists(ESRAH2016), 2016 年 10 月 1 日 ~ 2 日, 北海道大学(北海道札幌市).
3. M. Yamaguchi, T. Hirouchi, M. Chiba, S. Monzen, H. Yoshino, J. Ishikawa, T. Tsujiguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, J. Komura, I. Kashiwakura. Thrombopoietin-mimetic romiplostim confers the complete survival rate to mice exposed to lethal ionizing radiation. 57th American Society of Hematology(ASH2015), 2015 年 12 月 5 日 ~ 8 日, Orlande, USA.
4. 横山 昂生, 山口 平, 辻口 貴清, 柏倉 幾郎. エルトロンボパグの放射線防護効果の探索. 日本放射線影響学会第 1 回放射線ワークショップ-未来に繋ぐ放射線研究-, 2015 年 10 月 16 日 ~ 17 日, 富山大学五福キャンパス黒田講堂(富山県富山市).
5. M. Yamaguchi, T. Hirouchi, M. Chiba, S. Monzen, H. Yoshino, J. Ishikawa, T. Tsujiguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, J. Komura, I. Kashiwakura. Effects of a c-mpl

- agonist on mice exposed to lethal ionizing radiation, 15th International Congress of Radiation Reseach (ICRR), 2015年5月25日～29日, 京都国際会館(京都府京都市)
6. K. Yokoyama, A. Nishiyama, T. Tsujiguchi, S. Murakami, M. Yamaguchi, I. Kashiwakura. Expression analysis of c-myc in bone marrow cells of mice exposed to ionizing radiation. The 2nd Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by Young Scientists(ESRAH2015), 2015年5月23日～24日, 弘前大学保健学研究科(青森県弘前市).
 7. 山口 平, 廣内 篤久, 石川 純也, 西山 彩香, 村上 翔, 柏倉 幾郎. 致死線量放射線ばく露マウスへの国内承認医薬品の投与効果. 日本放射線影響学会第57回大会, 2014年10月1日～3日, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市).
 8. M. Yamaguchi, T. Hirouchi, M. Chiba, S. Monzen, H. Yoshino, J. Ishikawa, T. Tsujiguchi, A. Nishiyama, S. Murakami, J. Komura, I. Kashiwakura. Effect of a c-mpl receptor agonist on mice exposed to lethal ionizing radiation. The 9th International Symposium on the Natural Radiation Environment. 2014年9月22日～26日, ホテルニューキャッスル(青森県弘前市).
 9. T. Tsujiguchi, T. Hirouchi, S. Monzen, Y. tabuchi, I. Takasaki, T. Kondo, I. Kashiwakura. Expression analysis of radiation responsive genes in human hematopoietic stem/progenitor cells. The 1st Educational Symposium on RADIATION AND HEALTH by Young Scientists, 2014年9月21日～22日, ホテルニューキャッスル(青森県弘前市).
 10. 村上 翔, 吉野 浩教, 山口 平, 西山 彩香, 横山 昂生, 柏倉 幾郎. マウス骨髄細胞由来肥満細胞の分化・増殖に対する放射線の影響. 第43回制癌シンポジウム・第52回生物部会学術大会, 2014年7月11日～12日, メルパルク京都(京都府京都市).
 11. 石川 純也, 廣内 篤久, 伊藤 巧一, 千葉 満, 門前 暁, 吉野 浩教, 羽澤 勝治, 中野 光, 山口 平, 田中 公夫, 柏倉 幾郎. 致死線量放射線ばく露マウスに対するC-Mpl 作動薬の作用. 日本放射線影響学会第56回大会, 2013年10月18日, ホテルクラウンパレス青森(青森県青森市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 放射線被ばく治療剤及び放射線被ばく治療方法
 発明者: 柏倉幾郎他
 権利者: 弘前大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2012 - 250880 (特許査定)
 出願年月日: 平成 24 年 11 月 15 日
 国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~kashiwakura/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA, Ikuo)
 弘前大学・大学院保健学研究科・教授
 研究者番号: 00177370

(2)研究分担者

伊藤 巧一 (ITO, Koichi)
 弘前大学・大学院保健学研究科・教授
 研究者番号: 90398579

門前 暁 (MONZEN, Satoru)
 弘前大学・大学院保健学研究科・講師
 研究者番号: 20514136

吉野 浩教 (YOSHINO, Hironori)
 弘前大学・大学院保健学研究科・助教
 研究者番号: 10583734