

令和元年6月19日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19866

研究課題名(和文)ドラッグリポジショニングによる放射線肺障害に対する予防・軽減薬の開発

研究課題名(英文)Drug repositioning for mitigation of radiation-induced lung injury

研究代表者

吉川 信彦 (Yoshikawa, Nobuhiko)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10719917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主目的である放射線による肺障害を予防、軽減する可能性がある既存薬の探索、実証を行い、日本でよく用いられる補中益気湯(TJ-41)を候補として挙げたが、放射線肺障害を軽減する傾向はあるものの、統計学的に有意差を認めなかった。またTJ-41投与群と非投与群でRNAシーケンシングによる遺伝子発現の差を解析したが、放射線肺障害の重症化に関係する遺伝子を見出すことはできなかった。副次的な研究結果としては動物用CTで撮影した画像を解析することで軽度の放射線肺障害の検出に有用であったこと、また放射線による皮膚障害が今回使用した薬剤で軽減されることが見い出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の主目的を達成する既存薬は見い出せなかったが、肺以外の臓器保護効果についても示唆されたため、新たな研究につながる可能性のある結果となった。また動物用CTによる肺障害の経過観察が可能となり、今後実験に用いるマウス数を減らすことができ倫理面でも大きな貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We had tried some drugs which may mitigate radiation-induced lung injury (RILI) in mice and determined a Japanese herbal medicine TJ-41 as a potential drug. The irradiated mice with TJ-41 were observed milder RILI than without TJ-41 but not statistically. We analyze the difference of gene expression level between the two groups, however, we couldn't list up the gene which may contribute to mitigate RILI. In secondary analysis, we found out two interesting facts. First, animal CT system were very useful for detecting mild RILI without sacrificing mice. So we can reduce the number of mouse in future study. Second, skin fibrosis in the group of irradiation + TJ-41 was milder than that of irradiation only by visual evaluation, and this may indicate TJ-41 has protective effects of other organs.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線治療 放射線肺障害 漢方薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年放射線治療の技術的進歩は著しく、がん治療における重要性は年々増している。一般的に放射線治療は外科的治療と比較して低侵襲かつ有害事象は少ないとされ、超高齢化社会となる我が国にとっては今後ますます放射線治療の重要性は増してくると思われる。しかしながら頻度は少ないものの致死的であったり、QOLを大きく下げる有害事象を経験する。胸部領域においては放射線肺障害(RILI)がその代表例であるが、重症化した場合は唯一の治療薬であるステロイドの効果も限定的で致死的となりうる。予防法としては残念ながら有効な薬剤はなく、現状では放射線治療計画による工夫にて肺に照射される線量、体積をできる限り少なくする以外に方法はない。肺癌に対する放射線治療の成績改善には、照射線量の増加が一手であるが有害事象も増加する。予防が可能となれば、安全かつより効果の高い治療が可能となりうる。

新規薬剤開発は莫大な開発コストと臨床応用まで長期を要するためハードルが高いが、既に実地臨床で使用されている薬剤に新たな効能・効果を見出し再承認を得るドラッグリポジショニングによる薬剤開発を目指す方法が注目されている。

2. 研究の目的

放射線肺障害を予防、軽減する可能性がある既存薬をマウスを用いた動物実験にて有効性を検証すること、また分子生物学的手法を用いて放射線肺障害の機序を解明することが目的である。

3. 研究の方法

以下の実験は動物実験委員会の承認のもとに行われた。

(1)候補薬剤の決定

我々の過去の研究において放射線照射後すぐに惹起される急性およびその持続する炎症の抑制がRILIの軽減に重要と考えられ、抗炎症作用を有し、長期投与において安全かつ安価な既存薬を検討したところ、日本で広く用いられる補中益気湯(TJ-41)を候補として挙げた。マウスを用いた予備実験にてRILIを軽減する傾向があり候補薬剤として決定した。

(2)放射線照射、薬剤投与

マウスは8週齢C57BL6を用いた。C群:照射(-)薬剤(-)他群照射後20週で肺摘出、E群:照射(+)薬剤(-)照射後4週で肺摘出、L群:照射(+)薬剤(-)照射後20週で肺摘出、T群:照射(+)薬剤(+)照射後20週で肺摘出に分けた。

ペントバルビタール腹腔内投与による鎮静下に自作のマウス固定具で固定し、マウスの胸部以外を鉛で遮蔽し胸部へX線20Gyの1回照射を行った。

TJ-41粉末をマウス飼料に混ぜ濃度は0.4%とし、薬剤投与群は照射直後より投与開始した。

(3)観察項目

各群の体重、脱毛・皮膚状態の観察を毎週行った。また2~3週間毎にイソフルレン吸入麻酔下に小動物用CT装置Latheta LCT-200(Hitachi-Aloka Medical, Tokyo, Japan)を用いて呼吸同期胸部単純CTを撮影した。

(4)肺摘出、組織標本作成およびRNA抽出

X線照射後20週目、安楽死直後にマウス肺を摘出、片肺をホルマリン固定、パラフィン包埋後、Hematoxylin-Eosin染色を行った。RILIの程度はmodified Ashcroft score(mAS)(1)を用いて、ランダムに抽出した8か所の平均をスコアとした。

(5)肺組織よりRNA抽出、RNAシーケンス、発現比較解析

もう片肺を摘出直後にホモジナイズし、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った。抽出したRNAはNGS core facility of the Genome Information Research CenterにRNAシーケンスを依頼した。発現比較は2 fold change、p値<0.05を有意差のある発現変化とした。パスウェイ解析はGene Cards®で行った。

(6)統計学的解析

肺組織標本やCT値変化において、2群間の差はWilcoxon順位和検定を行った。p値<0.05を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1)TJ-41のRILI軽減効果について

L群とT群の肺組織標本においてRILIをmASで評価し比較したところ、mASは低い傾向があったが、有意差は見られなかった。表1、p値=0.345

(2)TJ-41の皮膚線維化軽減効果について

マウス皮膚線維化の視覚的評価については広く用いられているものは検索できなかったため、Grade0:変化なし、Grade1:50%以下の永久脱毛、Grade2:50%以上の永久脱毛、Grade3:運動制限伴わない皮膚硬化、Grade4:運動制限伴う皮膚硬化と定義し評価した。TJ-41投与群でGradeが低い傾向であったが、有意差は見られなかった。表2、p値=0.29

表 1

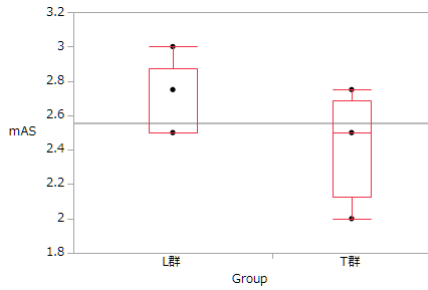
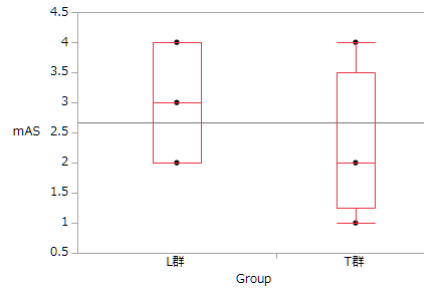


表 2



(3) 遺伝子発現解析

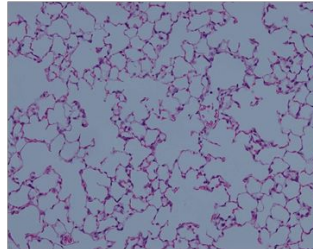
C 群と E および L 群との比較で肺線維化に関連する CXCR1, CXCR2, IL1B, MMP9 などの発現増加が見られたが、T 群と L 群の比較で肺線維化に関連する遺伝子に有意な発現差は見られなかった。

また C 群と E および L 群との比較で自然免疫系の pathway 亢進が強く見られ、やはり急性炎症の軽減がのちの線維化軽減に関連することが示唆された。

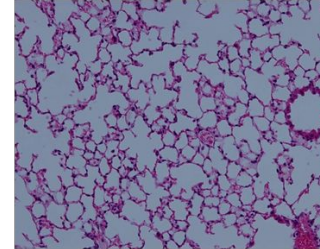
(4) CT 画像 (20 週目) と肺組織標本 照射群と非照射群の比較

RILI の組織学的変化は間質の肥厚、肺胞構造の乱れである。照射群の肺の大部分は mAS 3 点以下の軽度な肺障害 (上段) であったが、限局的にやや高度な肺障害 (下段) も散見された。

非照射群 x200

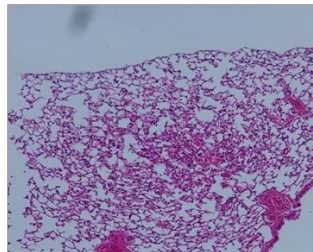


照射群 x200



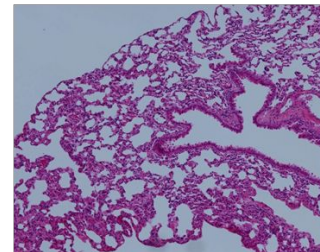
mAS 2~3pts

照射群 x100



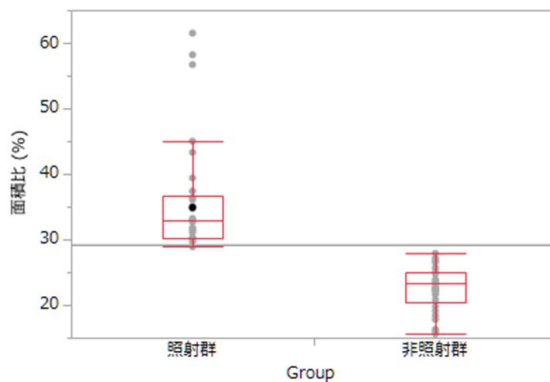
mAS 4pts

照射群 x100



mAS 5pts

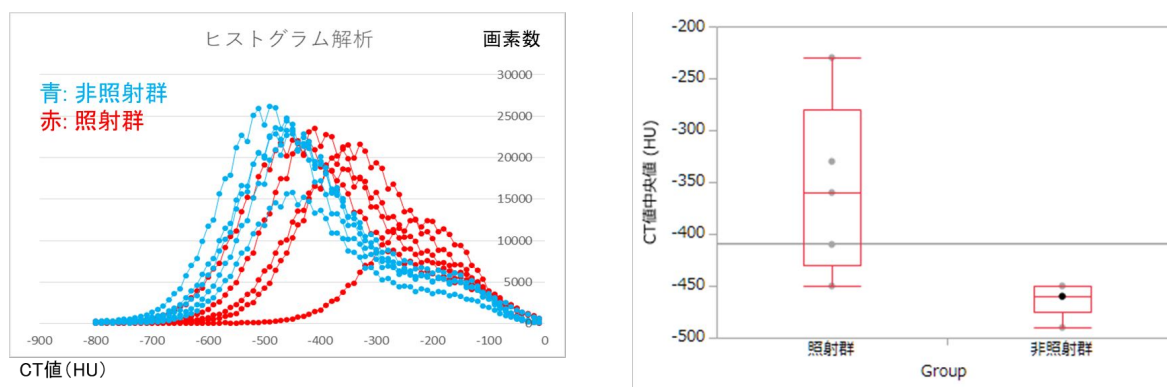
2 群の各標本からランダムに 6 視野選択し、間質部と肺胞部の面積比を計算した。2 群間で統計学的に有意差を認めた。(p<0.001)



しかしながら、CT 画像にて照射群で限局的な consolidation が散見されるも (図 A)、大部分は照射群 (図 B) と非照射群 (図 C) で視覚的に差を見出せなかった。



そこで肺野を抽出し CT 値のヒストグラム解析を行うと CT 値中央値は照射群で有意に上昇した (p=0.02)



我々の経験および諸家の報告からは、マウス胸部へ X 線照射し肺線維化を観察できるまで約 5~6 か月と比較的長期間を要するが、この時期は照射を受けたマウスの生存率が急激に低下する時期と重なり、晩期放射線肺障害を評価する適切なタイミングを計るのは難しい。そこで低侵襲な CT にて評価ができれば犠牲となるマウス数を減らせるが、視覚的な CT 画像評価では軽度の RILI は判別することは難しい。様々な照射条件を試したが、RILI はプレオマイシンなど薬剤性肺障害マウスモデルと比較して肺障害の程度は軽度であるため、視覚的な CT 画像評価は不適當である。

そこで今回、ヒストグラム解析することで軽度 RILI が判別可能であることを見出すことができた。

<引用文献>

R.H Huber, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. Bio Techniques 44:507-17, 2008.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

吉川信彦、動物実験用 X 線 CT 装置はマウスにおける軽度の晩期放射線肺障害の検出に有用である、第 54 回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2019 年

〔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〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡田 仁克

ローマ字氏名：Okada, Yoshikatsu

研究協力者氏名：野々口 直助

ローマ字氏名：Nonoguchi, Naosuke

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、研究者個人に帰属されます。