

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09824

研究課題名(和文)ラジカル捕捉剤edaravoneと脂肪幹細胞分泌物によるX線誘発唾液腺障害の軽減

研究課題名(英文)Study of effects of radical scavenger edaravone and adipose stem cell exosome on X-Ray induced salivary gland damages

研究代表者

那須 優則 (Nasu, Masanori)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：50130688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はエダラボンのフリーラジカル除去能に着目し、放射線療法の際に正常細胞への放射線障害の影響に対する軽減効果について研究を行った。そこで本研究では、X照射を行った血管内皮細胞に対するエダラボンの放射線防護作用について調べた。その結果、エダラボン自体が細胞毒性を有していたものの、放射線防護作用を示す濃度域を明らかとした。また、活性酸素種を検出する試薬であるCellROXを用いてX線を照射した細胞から発生する活性酸素を測定した結果、エダラボンの添加により有意に発生が抑えられていることを明らかとした。エダラボンの放射線防護作用の有用性について示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は本研究において、エダラボンの放射線治療における放射線障害の軽減作用について検討を行った。エダラボンは脳梗塞時の能保護やALSの治療薬として、ラジカルスカベンジャーで唯一承認された薬品である。承認済み薬品のため、安全性の検討が広くなされ、放射線障害軽減も認められると、非常に有用な薬品となる。またエダラボンは脂肪親和性が強くこれまで投与ルートも点滴に限られてきたが、昨年、懸濁状態を変え、経口投与が可能となった製剤が承認された。今後のエダラボンの臨床使用の範囲拡大が期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on the free radical scavenging ability of edaravone and studied its mitigating effect on the effects of radiation injury on normal cells during radiotherapy. In this study, we investigated the radioprotective effect of edaravone on X-irradiated vascular endothelial cells. As a result, although edaravone itself was cytotoxic, the concentration range of edaravone that exhibited radioprotective effects was clarified. In addition, the reactive oxygen species (ROS) produced by cells irradiated with X-rays were measured using CellROX, a reagent that detects ROS species. The results suggest the usefulness of edaravone as a radioprotective agent.

研究分野：放射線

キーワード：エダラボン 培養細胞 放射線 X線防御効果

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

放射線が生体高分子に吸収されるとフリーラジカルが産生されるが、現在までに、放射線防護剤として開発されたラジカル捕捉剤は副作用が強く、臨床で日常的に使用されているものはほとんどない。日本で医療用医薬品として認可されている唯一のラジカルスカベンジャーは脳保護剤または ALS 治療薬であるエダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one [MW:174.20]、MCI-186、図 1) である。エダラボンは脳梗塞急性期に、ペナンプラ領域を含む梗塞部位周囲の活性酸素の働きを抑え、脳内の血管内皮細胞・神経細胞の酸化障害を防ぐ。その結果、脳浮腫、脳梗塞、神経症候などの虚血性脳血管障害の発現及び増悪を抑制することにより脳保護作用を示す。

がん治療には大きく分けて 3 つの治療法がある。手術療法、化学療法、そして放射線療法である。放射線療法は、手術療法のように臓器を取り除くことなく治療できる。腫瘍に局所的に照射し、細胞の DNA に損傷を与え、がん細胞を殺傷する。放射線は、がん細胞のような細胞分裂の活発な細胞ほど影響を受けやすいため、正常な細胞には、あまり影響を与えずにがん細胞を殺傷することができる。しかし、局所照射した腫瘍部位周辺の正常細胞への放射線の影響も確認されている。正常細胞には自己修復の機能が備わっているが、被曝によってその機能が損傷すると二次がんを発症する可能性がある。そのために、放射線治療時における放射線防護戦略の確立が重要となる。

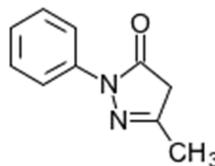


図 1 エダラボンの構造

(<https://www.genome.jp/kegg/compound/>)

2. 研究の目的

我々はエダラボンのフリーラジカル除去能に着目し、放射線療法の際に正常細胞への放射線障害の影響を軽減できないかと考えた。笹野らは、エダラボンがヒト血球系細胞である MOLT-4 において、X 線照射が誘導するアポトーシスを抑制することで放射線防護作用を示すことを報告している。血管は血液を身体各所に送るための通路であり、全身へ酸素や栄養分、水分、体温、老廃物を運ぶ。放射線照射された血管内皮細胞の機能の改善は全身の血管機能を維持し、さらに臓器・組織に対する放射線障害の軽減をもたらすと考えられる。本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、細胞増殖率を指標として、エダラボンの放射線防護作用について解析した。

3. 研究の方法

HUVECs の培養

HUVECs は Lonza より購入し、その培養は製造者のマニュアルに従って行った。下に簡単に述べる。培養液として EBM™-2 培地 (Lonza) を使用し、37℃、5% CO₂ で培養した。培地は使用前に 30 分以上、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で平衡化させた。培養開始から 16~24 時間で培地交換を行い、48 時間毎に培地交換を行った。細胞の回収は培養中の細胞から培地を除き、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。トリプシン/EDTA (Lonza) を 1 mL 加え 37℃、5% CO₂ で 5 分間処理し細胞を浮遊させた。トリプシン中和溶液 (Lonza) を加えてトリプシンを中和した後に、EBM™-2 培地を 10 mL 加えた。ピペティングし、遠心分離を行った。その後、セルカウントを行い 24 ウェルプレートに 5 × 10³ cells / well で播種した。

エダラボン溶液の調製

ジメチルスルホキシド (DMSO)を溶媒として、エダラボン溶液を調製した。エダラボン (FUJIFILM Wako Chemicals) を 15 mL チューブに 50 mg 量り、5.74 mL DMSO (FUJIFILM Wako Chemicals) をチューブに添加後、ボルテックスでよく攪拌し、溶解した。これを原液とし (50 mM) 0.45 μm のフィルターユニット (Merck) でフィルトレーションした。その後、培地で段階希釈を行い、20, 10, 1.0, 0.1, 0.01 mM の溶液を作製した。DMSO の細胞増殖への影響をみるため、40, 20, 2.0, 0.2, 0.02 % の DMSO 溶液を作製した。

X線照射とエダラボン添加

HUVECs を播種した 1 日後に、エダラボン溶液を含む培地に交換し、各々の X 線を X 線照射装置 (日立メディコ, 150 kV, 20 mA, 1.80 Gy/分) で照射した。10 分間インキュベートしたのちに、通常の培地に交換した。

撮影・観察方法

0~5 日目まで、同時刻に位相差顕微鏡で倍率 $\times 40$ で撮影した。細胞を観察、撮影する位相差顕微鏡は Diaphot 300 (Nikon) を用いた。ランダムに 1 mm \times 1 mm の領域を選び、経時的にセルカウントを行った。4 辺の境界線上にある細胞は、2 辺のみを選択しカウントした。0 日目の細胞数を 1 として、細胞数の比率による細胞増殖率を算出した。

活性酸素種の定量

細胞を 10 ウェルスライドチャンバー (Greiner Bio-one) に播種した。翌日、播種した細胞が接着していることを確認し実験を行った。まず、CellRoxTM Orange (ThermoFisher SCIENTIFIC) を最終濃度が 5 μM になるように培地で希釈した。そして細胞の培地を CellRoxTM Orange を添加した培地に置換し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 で 30 分間培養した。HEPES (Lonza) で一度洗浄し、0.1 mM エダラボン/培地に置換した直後に X 線照射装置 を用いて 2 Gy 照射し 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 で 10 分間インキュベートした。HEPES で一度洗浄後、培地に置換し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) で撮影した。撮影した画像は ImageJ を用いて輝度を測定した。

統計解析

一元配置分散分析、二元配置分散分析、もしくはクラスカル-ウォリス検定を行い、その後の

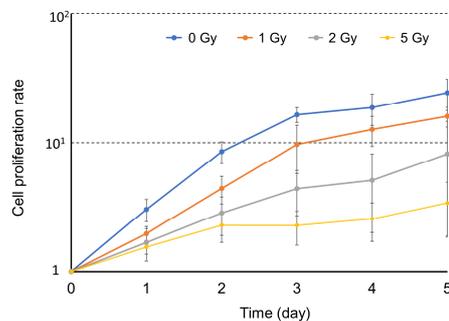


図 2 HUVECs の増殖に対する X 線照射の影響

検定として、チューキーの方法、またはスティーラー・ドゥワース検定を用いた。n = 2 ~ 3 で解析を行い、p < 0.05 を統計的有意差ありとして判定した。統計解析ソフトは SPSS Statistics version 25

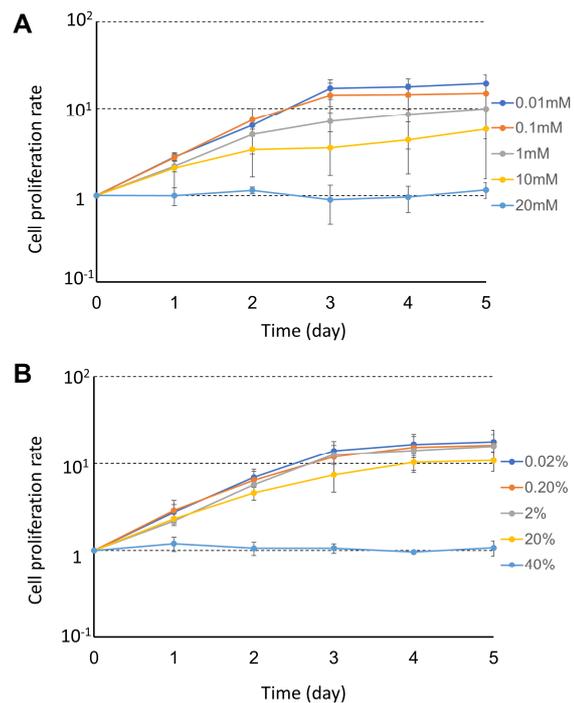


図 3 HUVECs の増殖に対するエダラボン投与の影響 DMSO 有 (A) or DMSO 無 (B) での HUVECs の増殖曲線

(IBM)または KyPlot6.0 (KyensLab)を用いた。

4. 研究成果

HUVECs の増殖に対する X 線の影響

HUVECs を 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^3 cells で播種し、その 1 日後に、それぞれ 0、1、2、5 Gy の X 線を照射し、5 日間決められた区画の細胞数をカウントすることにより、増殖を調べた。0 日の細胞数を 1 として、細胞増殖率を計算し、プロットした (図 2)。

その結果、1 Gy 照射群で、すでに増殖の抑制がみられ、2 Gy、5 Gy と線量依存的に細胞増殖が強く抑制されることが観察された。

エダラボンの至適濃度の決定

エダラボンは細胞増殖の抑制活性を持つことが報告されている。そこで我々はエダラボンの HUVECs に対する至適濃度を調べるために、様々な濃度のエダラボンで処理をした細胞の増殖を調べた。その為に、HUVECs を 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^3 cells 播種し、播種 1 日後、DMSO に溶解したエダラボンを添加した培地 (0、0.01、0.1、1、10、20 mM) で 10 分間処理し、その後 5 日間の増殖を調べた。コントロールとして対応する溶媒濃度で処理をした細胞についても観察を行った (図 3)。

エダラボン添加では、0.1、0.01 mM ではほとんど細胞毒性は観察されなかったが、10 ~ 20 mM では細胞増殖率が抑制された (図 3A)。その反面、DMSO のみを添加した実験では、最大濃度のエダラボンを溶解するために使用した 40 % の DMSO で処理をしたときのみ、増殖抑制が起こった (図 3B)。これらの結果から、X 線照射障害を軽減するエダラボンの効果を調べるためには、0.1 mM が適当であると判断した。

エダラボンの放射線防護作用の解析

HUVECs を 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^3 cells を播種し、その 1 日後に 0.1 mM のエダラボンの添加培地に交換し、X 線 (0、1、2、5 Gy) を照射した。10 分後に培地を通常培地に交換して、5 日間増殖を調べた (図 4)。

その結果、0、1、2 Gy は

エダラボン無添加 (溶媒のみ添加) より、エダラボン添加の細胞増殖率が低い傾向であった。この結果は、これらの線量では、エダラボンの毒性がより強く影響していることを示唆している。5 Gy 照射では、エダラボン添加の細胞増殖率が無添加より高い傾向を示した。統計

解析を行った結果、エダラボン添加は 0 Gy と 5 Gy で増殖に有意差が認められなかったが、エ

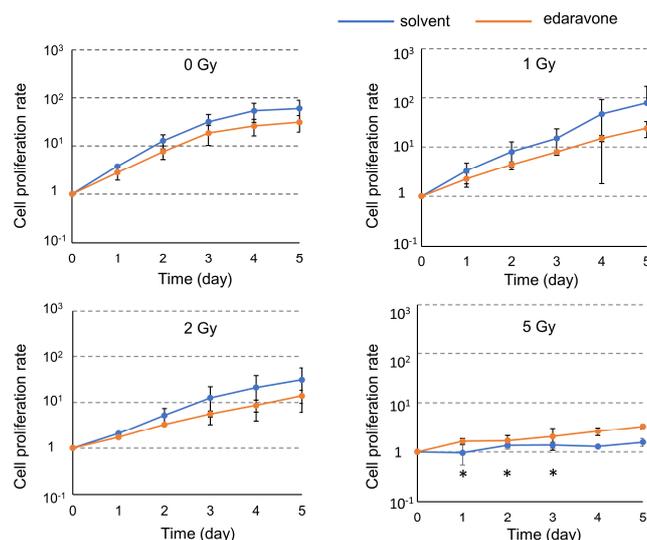


図 4 X 線照射された HUVECs に対するエダラボン投与の効果
HUVECs の増殖曲線(0.1 mM エダラボン有 (橙)・無し (青)、X 線照射量を図中に示す。 (*: $p < 0.05$)

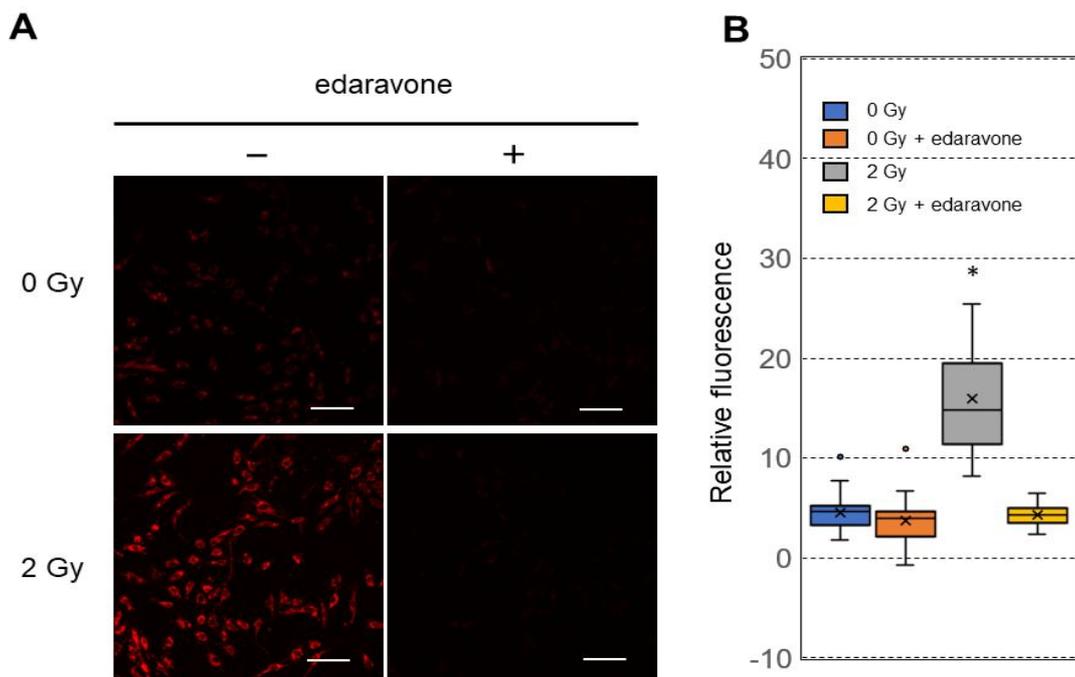


図 5 CellRox™ Orange を用いた活性酸素種の測定 (A) X 照射または非照射群を CellRox™ Orange により染色し蛍光顕微鏡で観察した (スケールバー: 100 μm). (B) 蛍光強度を定量化し、グラフ化した。(*: $p < 0.05$)

エダラボン無添加では有意に増殖に差があった (*: $p < 0.05$)。このことから X 線照射の影響をエダラボン添加により有意に軽減したと考えられる。

次に X 線照射により生じる活性酸素について、活性酸素と反応すると蛍光を発する CellRox™ Orange を用いて調べた (図 5)。2 Gy 照射のエダラボン無添加は強く活性酸素が検出されるが、エダラボン添加では、2 Gy 照射でも活性酸素は検出されなかった (図 5A)。得られた画像を定量化し、プロットした。その結果、エダラボン添加は有意 ($p < 0.05$) に細胞内の活性酸素種の産出を抑制することが明らかとなった (図 5B)。

結論

我々は本研究において、X 線照射した HUVECs に対するエダラボンの効果について検討した。エダラボンは脳梗塞時の脳保護および ALS 治療薬であり、すでに承認済み薬品のため、安全性が高く、放射線治療時における放射線障害軽減効果が認められれば非常に有望な薬剤となる。これまでにも、HUVECs とは異なるヒト培養細胞を用いて、エダラボンを放射線防御剤として用いる試みは積極的に行われている。どの報告でもある程度、エダラボンの細胞毒性について報告されているため、今回の結果も踏まえて、投与方法、用量についての慎重な検討が必要だと考えられる。エダラボンは DMSO の他にエタノールや酢酸にも溶け易いとされているため、今後は溶媒の検討も行う必要がある。加えて、エダラボンの濃度についても、より薬効の高い濃度を同定するための培養細胞レベルでの条件検討が必要だと考えられる。また、エダラボンは脂溶性が強くこれまで投与ルートも点滴に限られてきたが、最近、懸濁状態を変え、経口投与が可能となった製剤が承認された。本研究のような試みが継続されていけば、より放射線防護効果の高い投与方法が開発されることが大きく期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江哲郎, 三橋扶佐子, 那須優則
2. 発表標題 顎下腺由来細胞株の放射線障害に対するラジカルスカベンジャーの効果
3. 学会等名 第36回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	堀江 哲郎 (Horie Tetsuro) (10508675)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	
研究分担者	三橋 扶佐子 (Fusako Mitsuhashi) (60187896)	日本歯科大学・生命歯学部・助教 (32667)	
研究分担者	井出 吉昭 (Yoshiaki Ide) (70409225)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	
研究分担者	小林 朋子 (Tomoko Kobayashi) (10548283)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	

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
---------	---------