

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K15598  
研究課題名（和文）世界初の酸化的DNA損傷抗体を用いた肝動脈化学塞栓術におけるDNA損傷蓄積の評価  
  
研究課題名（英文）Evaluation of hepatic DNA damage accumulation in trans-arterial chemoembolization using a monoclonal antibody to oxidatively generated DNA damage  
  
研究代表者  
立元 将太（Tatsumoto, Shota）  
  
奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員  
  
研究者番号：50771854  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：種々の酸化ストレス疾患の発症・病態悪化に深くかかわるフリーラジカルと放射線医学で扱う血管内手技や磁気共鳴画像とを関連づける基礎研究を行った。具体的には、酸化的DNA損傷特異抗体を用いて肝動脈塞栓術で生じ得るDNA損傷の有無を検証した。また、同抗体を用いて、子宮内膜症性嚢胞内のヒドロキシルラジカル産生能を評価し、磁気共鳴画像で評価した内膜症の進展度との相関を検証し有用な基礎情報を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
血管内手技または医用画像と生体内レドックス代謝を関連付けた研究は殆ど行われていない。本研究では肝動脈塞栓術と子宮内膜症に焦点を当て、放射線医学の観点から生体内レドックス代謝との関連を検証し、基礎情報が取得できた。現在、基礎研究レベルで精力的に行われている酸化ストレスの画像診断が臨床応用された際に、今回の研究は重要な情報になると考える。

研究成果の概要（英文）：Free radicals are deeply involved in the pathogenesis and exacerbation of various oxidative stress diseases. We used oxidative DNA-damage-specific antibodies to determine the presence or absence of DNA damage that can occur during transarterial chemoembolization. In addition, we examined the correlation between the capacity to produce hydroxyl radicals in endometriotic cysts and the progression of endometriosis as assessed by magnetic resonance imaging, providing useful basic information.

研究分野：放射線医学

キーワード：酸化的DNA損傷 フリーラジカル 血管内治療 磁気共鳴画像 骨盤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌に対する肝動脈化学塞栓術 (TACE) は、本学の放射線医学教室により全世界に普及され、2000 年代初頭に標準治療となった。以後、研究代表者のグループは臨床・動物実験両方の側面から TACE の研究を継続し、局所制御率の向上を目指してきた (Nishiofuku et al., J Vasc Interv Radiol, 2013, Tanaka et al., Anticancer Res, 2014, Fukuoka et al., Cardiovasc Intervent Radiol, 2015)。一方、TACE 自身によってもたらされる虚血やドキソルビシンなどの抗癌剤曝露は大量の“活性酸素”を発生させることで正常肝細胞の DNA を傷つけ (酸化的 DNA 損傷)、再発や肝細胞機能低下の原因となり得るが、この問題に対する研究は進んでおらず対策も講じられていない。最大の原因は、高精度で、多くの研究者が利用可能な酸化的 DNA 損傷の検出系が確立されておらず、「TACE によってどれだけの酸化的 DNA 損傷が正常肝細胞内に生成・蓄積するのか」という問いに答えることができなかったためである。しかし、近年本学では酸化的 DNA 損傷の一つであるサイクロプリンに対する特異的モノクローナル抗体の樹立に成功した (Iwamoto et al., Photochem Photobiol. 2014)。酸化的 DNA 損傷サイクロプリンにはアデノシン部位に形成される Cyclo-dA とグアノシン部位に形成される Cyclo-dG があるが、これらは二重鎖 DNA を大きく歪ませるためヌクレオチド除去修復 (NER) で修復される。NER を欠損する代表的遺伝病は色素性乾皮症 (XP) であり、同疾患の一群で観察される重篤な神経障害は細胞代謝にて発生する活性酸素が酸化的 DNA 損傷サイクロプリンを発生させ、蓄積することで RNA 合成を阻害し細胞死に至るのが原因と考えられている。また、サイクロプリンの蓄積は発がんに関与すると考えられている。本抗体と動物実験を組み合わせることにより、上記の「問い」に答えることが可能となると考えられる。

### 2. 研究の目的

本学にて近年世界で初めて作製された酸化的 DNA 損傷サイクロプリンに対する特異抗体を用いて血管内治療、特に肝動脈化学塞栓術 (TACE) による酸化的 DNA 損傷の発生と蓄積を評価することが目的である。また、酸化的 DNA 損傷は血管内治療や放射線などの外因性以外に細胞代謝産物による内因性の要因でも生じ、発がんや加齢の原因の一つとして考えられている。本研究では酸化的 DNA 損傷が発がんに関与していると考えられている子宮内膜症に着目し、本抗体の臨床応用化の一環として子宮内膜症と酸化ストレスの関係を評価することも目的である。

### 3. 研究の方法

大きく分けて次の 2 つの研究方法で研究を遂行する。

#### (1) TACE 手技と ELISA 法による肝細胞中のサイクロプリンの定量評価

体重 3~4kg 程度の健康なニュージーランド・ラビットに、2~3mm 大のブロックに形成した VX2 腫瘍細胞を開腹下で肝左葉に移植する。移植から 2~3 週間経過した後、体表から超音波で腫瘍の存在・発育の程度を確認する。腫瘍が確認されたら、大腿動脈をカットダウンし、X 線透視下に 4 Fr-カテーテルを用いて腹腔動脈、上腸間膜動脈を選択造影する。肝動脈 1.7Fr-マイクロカテーテルを挿入して、X 線透視で観察しながら、リピオドール TACE を行う。TACE 48 時間後に動物を犠牲死させ、肝臓を摘出する。肝臓の組織片からエクストラクターキットにて DNA を抽出し、ELISA (三次抗体システム) にてサイクロプリンの測定を行う。

#### (2) 子宮内膜症性嚢胞の内容液中の酸化ストレスレベルと内膜症進展度の関係を評価

2014 年から 2015 年までに凍結保存された子宮内膜症性嚢胞の内容液中の酸化ストレスレベルをサイクロプリン特異抗体を用いて ELISA 法にて測定する。ELISA 法にて得られた結果は、液体クロマトグラフィー質量分析法にて作成した検量線を元に定量化する。内膜症の進展度評価は内膜症術前の MRI を用いて行う。

### 4. 研究成果

具体的に得られた成果を研究方法に記した項目に沿って示す。

#### (1) TACE における酸化的 DNA 損傷の発生と蓄積の評価

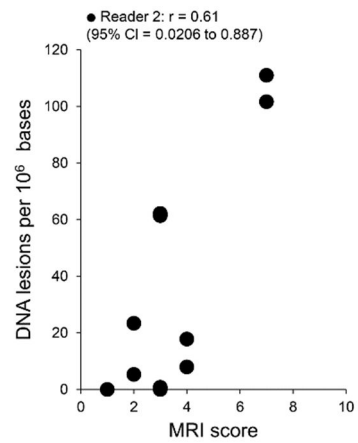
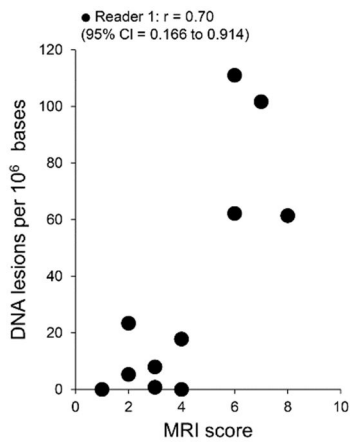
ヒト細胞 (Susa/T-n) に対して様々な濃度のドキソルビシンを投与、また様々な培養時間で評価を行ったが、再現性のある濃度依存的、時間依存的なサイクロプリンの上昇は認められなかった。また、動物を用いた実験でも TACE 後に再現性のあるサイクロプリンの上昇を検出できなかった。

#### (2) 子宮内膜症性嚢胞の内容液中の酸化ストレスレベルと内膜症進展度の関係を評価

鉄を豊富に含む内膜症性嚢胞の内容液と calf thymus DNA を反応させ、ヒドロキシラジカルのみで生成されるサイクロプリンがどの程度発生するか検討した。14 例の内膜症性嚢胞の内容液において、サイクロプリン発生量は個々の症例で異なることが分かった。また、内膜症の進展度を術前 MRI を用い 2 人の放射線科医が別々に評価し (11 症例) スコア化した。図 1 で示すように、内膜症性嚢胞中のサイクロプリンを発生させる活性の程度と、MRI で評価した内膜症の進展度は有意に相関した。

図 1. 内膜症性嚢胞によるサイクロブリン発生量と MRI を用いてスコア化した内膜症進展度の関係

また、内膜症の程度は骨盤 MRI を用いて評価しているが、研究を進める中で婦人科臓器以外にその後方臓器である直腸、肛門管の MR 画像において、解剖学的な特徴が描出されていることに気が付いたため、臨床的な有用性を検討しこちらについても報告した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tatsumoto, S., Itoh, T., Takahama, J. et al	4. 巻 38
2. 論文標題 Accuracy of magnetic resonance imaging in predicting dentate line invasion in low rectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 539, 546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1007/s11604-020-00933-5">https://doi.org/10.1007/s11604-020-00933-5</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 立元将太
2. 発表標題 子宮内膜症病変が有する DNA に対する酸化ストレスの定量評価と MRI所見との対比
3. 学会等名 第78回日本医学放射線学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----