

令和 2 年 6 月 1 0 日現在

機関番号：3 2 5 1 1

研究種目：若手研究

研究期間：2018 ~ 2019

課題番号：1 8 K 1 5 6 4 4

研究課題名（和文）放射線照射による骨髄抑制の新規予防法開発のためのTRPM2を介した発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of TRPM2-mediated pathogenesis of radiation-induced myelosuppression

研究代表者

石橋 正祥（ISHIBASHI, MASAOKI）

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号：8 0 7 7 1 5 3 4

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、活性化によって細胞死を誘導することが知られているTRPM2と放射線による骨髄抑制の発症との関連を明らかにすることを目的として実施した。しかし、放射線照射によって生じたCFU-GMコロニー数の減少は野生型マウスとTRPM2欠損型マウスの間に差が認められず、TRPM2と放射線による骨髄毒性は関連性が低いことが示唆された。また、抗がん剤のドキソルビシン（DXR）による骨髄抑制についても併せて検討したが、同様の結果であった。放射線、DXRによる骨髄抑制とTRPM2の関連性を示すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療における抗がん剤、放射線による骨髄抑制は、重要な有害事象である。そのため、詳細な発症機構を明らかにすることで、がん治療における有害事象の軽減を実現することに繋がると考えられる。本研究では、放射線・DXRによる骨髄抑制の発現とTRPM2の関連性が低いとの結論に至った。しかし、検討の過程でDXRが過酸化水素によるTRPM2の活性化を増強させる可能性を見出した。DXRによる有害事象には、心筋症、血管外漏出、手足症候群などが挙げられる。本研究の結果は、DXRの有害事象の発症機構におけるTRPM2の関連を解明するために有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the relationship between TRPM2, which is known to induce cell death, and the development of radiation-induced myelosuppression. However, the reduction of CFU-GM colony numbers caused by irradiation were not different between wild-type (WT) and TRPM2 knockout (TRPM2KO) mice. These results were suggesting that TRPM2 was may not contribute to radiation-induced bone marrow toxicity. The association between doxorubicin (DXR)-induced myelotoxicity and TRPM2 were also studied. The reduction of CFU-GM colony numbers caused by DXR administration were not different WT and TRPM2KO mice. We were unable to indicate an association between radiation or DXR-induced myelosuppression and TRPM2.

研究分野：医療薬学

キーワード：TRPM2 放射線 骨髄抑制 マウス ドキソルビシン

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

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄細胞、好中球、単球、マクロファージといった血球系細胞には Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) チャネルが発現している。TRPM2 チャネルは、酸化ストレス (ROS) 感受性の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性非選択的カチオンチャネルである。放射線による TRPM2 の活性化には細胞内での ROS 産生や放射線による直接の DNA 傷害による poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) の活性化が関与することが知られている。PARP-1 活性化に伴い、ADP-ribose (ADPR) が細胞内に遊離し、TRPM2 の C 末端側に存在する NudT9-H ドメインに作用し、TRPM2 を介して細胞外から細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$  流入が生じ、細胞死を引き起こすことが明らかになっている [Hara et al., Mol. Cell. 2002; Takahashi et al., Cell Calcium 2011; Huber et al., Biochim. Biophys. Acta. 2015]。

申請者は、5-フルオロウラシル (5-FU) 誘導骨髄抑制に酸化ストレスが関与しているとの報告 [Numazawa et al., Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011] から、酸化ストレスが関与する骨髄抑制には、TRPM2 の機能が関連している可能性があると考え研究を進めている。我々は、これまで、5-FU 誘導マウス骨髄抑制モデルにおいて TRPM2 欠損 (TRPM2KO) マウスの末梢血白血球減少、CFU-GM コロニー数減少は、野生型 (WT) マウスに比較して軽減されることを観測してきた。放射線は、細胞内での活性酸素種の産生や直接の DNA 傷害によって TRPM2 チャネルを活性化させることが知られているが、放射線による骨髄抑制と TRPM2 の機能の関連は明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

放射線による骨髄抑制と TRPM2 の関連

骨髄抑制の中でも白血球減少は患者を易感染状態に陥らせ、重篤な場合、発熱性好中球減少症の発症に繋がり、患者の生命に影響する。放射線による TRPM2 の活性化に伴う細胞死の機構と骨髄毒性の発現の関連を検討することを目的とする。

ドキソルビシン (DXR) による骨髄抑制と TRPM2 の関連

2018 年度に、マウスに対して、放射線照射によって骨髄毒性を誘導した結果、WT と TRPM2KO における CFU-GM コロニーの数に差が認められず、放射線によるマウス骨髄抑制の発現において、TRPM2 が寄与する可能性が低いとの結論に至った。そこで、骨髄毒性への TRPM2 の関与が 5-FU による骨髄毒性のみに認められる現象であるかを検証するために、5-FU と同様に細胞内の酸化ストレスを上昇させることが知られている DXR を用いて、骨髄毒性と TRPM2 の関与について検討することとした。

## 3. 研究の方法

・マウスに対する放射線照射による骨髄抑制の誘導

卓上型 X 線照射装置 MX-80Labo (メディエック株式会社) を用いてマウスにエクソ線照射を行った。マウスへの照射は線源から 180 mm の位置で実施した。照射設定は 80 kV、1.25 mA とし、照射時間を変更することで照射量を調整した。この照射線量と照射時間の計算は機器の専用ソフトウェアによる設定に基づき、実施した。

・骨髄毒性の評価

マウスの大腿骨から骨髄細胞と採取し、MethoCult® M3534 (StemCell Technologies) を用いて CFU-GM コロニーアッセイによる CFU-GM コロニー数の変動を測定した。

・細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の測定

細胞に Fura2-AM を処置した後、蛍光画像解析システム MetaFluor (version 7.8.13.0 Molecular devices 社) を用いて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定を実施した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は 340 nm と 380 nm の励起光を交互に照射し、生じた蛍光 (510 nm) の強度を測定し、各励起光による蛍光強度の比 (340 nm/380 nm) で示した。また、各細胞における刺激薬処置後の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の最大値から刺激薬処置前の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の平均値を引いた値を  $\Delta\text{Ratio}$  として示した。

・細胞内酸化ストレスの評価

Muse oxidative stress kit を用いて細胞内酸化ストレスの測定を行った。

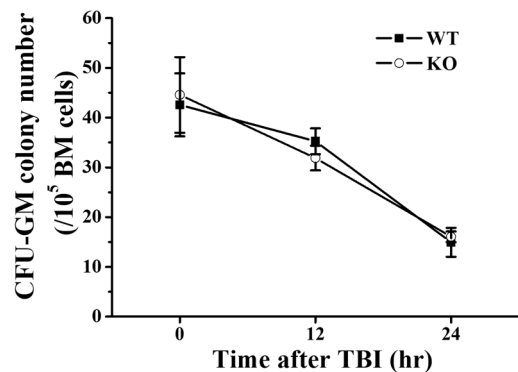


図1 放射線照射 (1 Gy) による

CFU-GM コロニー数の変化

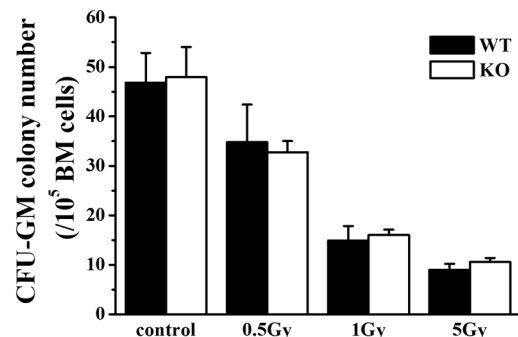


図2 放射線照射 24 時間後の CFU-GM コロニー数

#### ・マウスに対する DXR 投与による骨髄抑制の誘導

生理食塩液（大塚製薬工場）に溶解した DXR（東京化成工業）を 0.1 mL/10gBW の容量になるように腹腔投与した。

#### 4. 研究成果

##### マウスの Hematopoietic stem cells (HSCs)、Hematopoietic progenitor cells (HPCs) における TRPM2 mRNA の発現

放射線、抗がん剤によるがん治療における骨髄抑制の発現は、各種治療による骨髄の造血幹細胞の障害が寄与していると考えられている。そのため、HSCs、HPCs における TRPM2 の発現を検討するために、骨髄細胞に CD117 microbeads (Miltenyi 社) を処置し、Magnetic cell sorting (MACS) 法にて CD117<sup>+</sup>細胞を抽出した。CD117<sup>+</sup>細胞に対し、TaqMan Fast Universal Master Mix と gene-specific TaqMan primer probe sets (TRPM2: Mm01177249\_g1) を用いて real-time PCR を実施した。その結果、WT マウスの骨髄から抽出した CD117<sup>+</sup>細胞における TRPM2 mRNA の発現を確認することができた。TRPM2KO マウスにおける CD117<sup>+</sup>細胞には TRPM2 mRNA は検出されなかった。

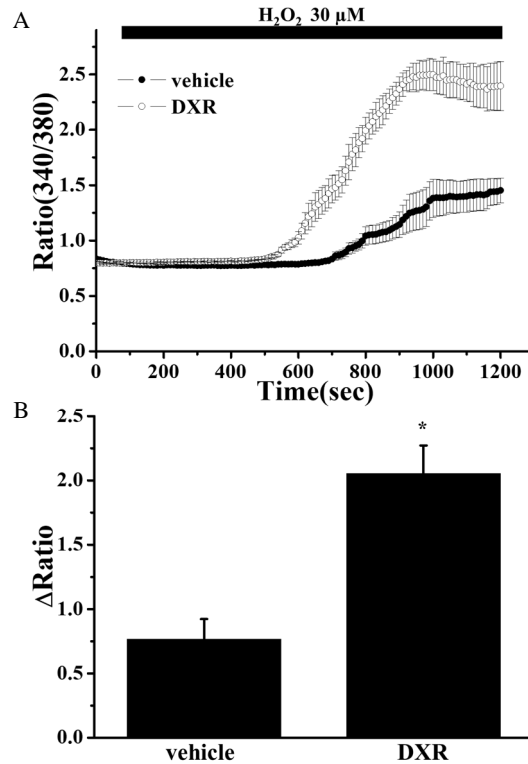


図3 TRPM2/HEK における過酸化水素による $[Ca^{2+}]_i$ 変化

##### 放射線による骨髄毒性の発現と TRPM2 チャンネルの関連

マウスに 1 Gy 照射後、12 時間、24 時間に骨髄細胞を採取した。しかし、CFU-GM コロニー数の減少は、WT、TRPM2KO の間に差が認められなかった（図 1）。放射線の強度を 0.5、1.0、2.0 Gy に調整し、照射 24 時間後にコロニーアッセイを実施した。しかし、各照射量における CFU-GM コロニー数の減少は、WT、TRPM2KO マウスの間において有意な差が認められなかった（図 2）。

##### DXR による骨髄毒性と TRPM2 の関連

###### 1)DXR による過酸化水素による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇への影響

TRPM2/HEK 細胞に DXR (1.0、2.0 μM) を 1 時間処置したところ、細胞内の有意な ROS 増加を認めた。次に、TRPM2HEK 細胞に DXR (2 μM) もしくは vehicle で 1 時間前処置した後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM にて刺激した。DXR を前処置した場合、vehicle に比較して有意に大きい $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた（図 3A,B n=4, \*p<0.05 vs vehicle）。TRPM2 の発現が認められている U937 細胞を用いて DXR (1 μM) もしくは vehicle で 1 時間前処置した後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM にて刺激した場合においても、DXR 前処置によって vehicle に比較して有意に大きい $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされた。これらの結果から、DXR は細胞内 ROS 産生を誘導し、過酸化水素による TRPM2 の活性化を増強する可能性が示唆された。

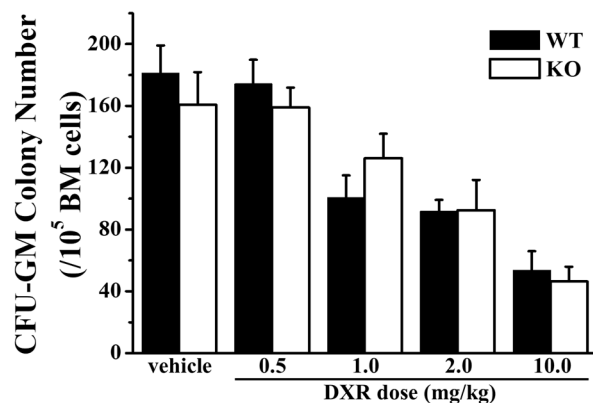


図4 DXR 投与 24 時間後の CFU-GM コロニー数

###### 2)DXR による骨髄毒性と TRPM2 の関連

マウスに DXR (0.5、1.0、2.0、10.0 mg/kg) を腹腔投与し、24 時間後にコロニーアッセイを実施した。CFU-GM コロニー数は、DXR 投与 24 時間後において、WT、TRPM2KO マウス共に有意に低下した。しかし、DXR の各投与量における CFU-GM コロニー数の減少は、WT、TRPM2KO マウスの間において有意な差が認められなかった（図 4）。

#### まとめ

本研究の結果から、放射線、DXR によるマウスの骨髄抑制の発現において、TRPM2 が寄与する可能性が低いと結論づけた。TRPM2 は活性化することで、細胞死を誘導することが知られて

いるが、放射線、DXR によって引き起こされる骨髄毒性には TRPM2 を介さない機構による寄与が大きいと考えられた。放射線、DXR による骨髄抑制と TRPM2 の関連性を示すことはできなかったが、DXR が過酸化水素による TRPM2 の活性化を増強する可能性が見出された。DXR による薬効や有害事象の発現機構の解明において、TRPM2 チャンネルを標的分子として検証する上で有用な情報であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----