

機関番号：32667

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19592184

研究課題名 (和文) アミノチオール系防護剤による唾液腺の放射線障害の軽減

研究課題名 (英文) Reduction of radiation damages on salivary glands by the aminothiols.

研究代表者

那須 優則 (NASU MASANORI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：50130688

研究成果の概要 (和文)：口腔乾燥症は頭頸部腫瘍の放射線療法中,療法後の最も共通の合併症の一つであり,照射野に含まれる唾液腺の回復不可能な障害が原因である。この障害を防止するために USA では放射線防護薬である amifostine が臨床応用されている。我々は照射前のマウス唾液腺腺房細胞の分泌能で amifostine の効果を追求した。そして amifostine 非投与と比較して amifostine 投与はマウス唾液腺の腺房細胞の障害を軽減することを確認した。

研究成果の概要 (英文)：Xerostomia is one of the most common complications during and after radiation therapy for head and neck cancer, because irreparable damage is caused to the salivary glands, which are included in the radiation fields. In order to prevent of the damage, the radioprotect drug, amifostine, is clinically used in USA.

.we have examined the effect of amifostine from the secretory ability of mice salivary gland acinar cells before radiation. We confirmed that the damage of the acinar cells of mice salivary glands were inhibited by amifostine during radiation compared to nonamifostine treated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：amifostine, 放射線防護, 唾液腺, 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部の悪性腫瘍の治療は機能や形態の保持の側面から放射線療法が選択されることが多い。照射野に唾液腺が含まれる場合,口腔内乾燥,摂食障害や咀嚼,嚥下障害などの口腔機能不全,感染の増大,う蝕の多発などが生じることがあることから,唾液腺の放射線障害の軽減は重要である。アミフォスチ

ンは SH 基をリン酸型のプロドラッグとして摂取し,生体内でアルカリホスファターゼによって活性型の SH 基を持った型(WR-1065)に変わり防護効果が現れるため毒性が低い。静脈内に投与された場合,唾液腺,骨髄,皮膚などに高濃度に分布し,頭頸部の悪性腫瘍の治療に特に有用とされる。このことから米国では頭頸部領域の放射線治療に健常な唾

液腺の防護剤としてのアミフォスチンの臨床応用が多数報告されている(Ozsahin M., et al., Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 132: 141-145, 2006, et al.)が, 日本ではアミフォスチンを積極的にには使用していない。吐き気や嘔吐に代表される副作用や, 低血圧, 低カルシウム状態を生じるなどの報告(Ryan S.V., et al., J Clin Pharmacol, 36: 365-373, 1996., Rades D, et al., Radiother Oncol, 70: 261-264, 2004.)があるなど, 投与量や投与時期などが確立されていないためと考えられる。また動物実験でも放射線照射された唾液腺から分泌した唾液の量や成分の測定, 形態変化のみの所見からの報告が多く, 腺房細胞内のタンパク合成能により検討した報告は見あたらない。

(2) 放射線障害された組織再生のためには血管の誘導が不可欠である。唾液腺, 歯髄などの口腔領域の血管, 特に血管内皮細胞に対する放射線の影響および amifostine の作用についての報告は少ない。

## 2. 研究の目的

(1) 唾液腺の腺房細胞を実験対象臓器とし, 照射前に投与した放射線防護剤の効果を実験的に *in vivo* で追求する。

(2) *in vitro* で血管内皮細胞に対する放射線の影響を把握することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス顎下腺への放射線照射における amifostine 前投与の効果:  $^3\text{H}$ -leucine を用いたオートラジオグラフィによる検討

### ①実験動物と飼育条件

生後 8 週齢, 体重約 20g の BALB/c 雄性マウスを, A 群: amifostine 非投与・非照射, B 群: amifostine 投与・非照射, C 群: amifostine 非投与・5 Gy 照射, D 群: amifostine 投与・5 Gy 照射の 4 群に分類した。日本歯科大学生命歯学部の実験動物に関する指針に基づいて本研究を行った。

② X 線照射装置および照射条件, 照射方法  
C 群, D 群の各マウスの顎下腺相当部に厚さ 5mm の鉛板を用いて照射野を限定し 5Gy (150kV, 20mA, 2.0Gy/min) を一回照射した。A 群, B 群は麻酔のみを施した。

### ③ Amifostine 投与

amifostine (WR-2721, Ethyol, MedImmune Oncology Inc, U.S.A) の投与量を 100mg/kg とし, B 群, D 群の各マウスに X 線照射 30 分前に腹腔内投与した。A 群, C 群には amifostine と同等量の生理食塩水のみを腹腔内投与した。

### ④ 観察時期

Amifostine 投与・X 線照射の 30 日後を観察した。

### ⑤ 観察方法

a) 組織学的標本

HE 染色および AZAN-Mallory 染色

b) 光顕オートラジオグラフィ (LMARG)

各群マウス腹腔内に,  $^3\text{H}$ -leucine [ $[4, 5\text{-}^3\text{H}]-$ , 2.22-33TBq/mol, ] を 370kBq/g 投与し, 30 分後および 120 分後に全身麻酔下で顎下腺を摘出した。腺体中央部を約 1mm<sup>3</sup> に細切し, 2.5% グルタルアルデヒドで 2 時間, 1.0% オスミウム酸で 1 時間固定, Epon-Araldite 混合樹脂で包埋, 厚さ約 1.0 $\mu\text{m}$  の切片を作成し, LMARG 用乳剤を銀粒子が単層になるように塗布し, 10 日間露出後, 現像, 定着した。切片を共焦点レーザー顕微鏡で 15 箇所撮影し, 腺房細胞 1mm<sup>2</sup> あたりの還元銀粒子数に換算し比較した。マウスに投与後の生体でアミノ酸の量がピークとなる  $^3\text{H}$ -leucine 投与 30 分後, および量の減少が始まる 120 分後を観察した。

⑦ 電顕オートラジオグラフィ (EMARG) の作製

LMARG と同一の包埋試料より厚さ約 90 $\mu\text{m}$  の超薄切片を作製し, EMARG 用乳剤 (Ilford L-4, Ilford, U.K.) を塗布し 50 日間露出後, フェニドン現像し観察した。1 群あたり 20 箇所を無作為に抽出し, 腺房細胞内の銀粒子数, 分泌顆粒内の蛋白合成に深く関与している粗面小胞体, ゴルジ装置, 分泌顆粒に局在する還元銀粒子数から細胞小器官に局在する割合を求めた。

(2) 血管内皮細胞に及ぼす放射線の影響  
マウス顎下腺, ヒト歯肉, あるいはブタ胎仔の歯髄から血管内皮細胞様細胞を得ている。代表的にブタ胎仔の歯髄から得た敷石状細胞について報告する。

### ① 血管内皮細胞の分離

無菌的に細切したから消化酵素 (0.1% trypsin + 0.02% EDTA/PBS(-)) で細胞を解離させ初代静置培養を行った。Confluent sheet 中に認められる血管内皮細胞を colonial cloning して内皮細胞様細胞を樹立した。

### ② 観察方法

a) 敷石状細胞が血管内皮細胞であることの確認

a-1) 免疫染色: VE cadherin, von willbrand factor (vWF), Flk-1 (VEGFR-2)

a-2) RT-PCR: vWF, VE cadherin, CD31

a-3) TEM 観察

b) HGF 含有寒天培養による tube formation の観察

HGF 入りの寒天培地をゲル化しその上に敷石状細胞を載せた。倒立顕微鏡用インキューベ

ジョンシステムで培養し、CCDカメラで撮影した像を、連続画像作成ソフトを用いて動画として観察した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス顎下腺への放射線照射における amifostine 前投与の効果： $^3\text{H}$ -leucine を用いたオートラジオグラフィによる検討

##### ①光学顕微鏡による組織学的検索

HE 染色像では C 群は A 群と比較し、腺房細胞に著明な萎縮性変化や、不規則な形態を呈した (図 1)。D 群は C 群と同様に腺房の萎縮性変化を認めたが、その変化は、C 群よりも弱く、A 群、B 群に近い像であった。AZAN-Mallory 染色像では C 群は膠原線維が他の群よりやや増加した (図 2)。

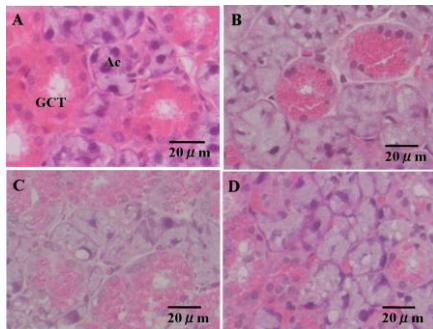


図 1 各群の HE 染色像

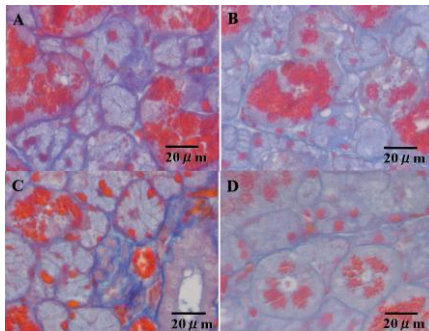


図 2 各群の AZAN-Mallory 染色像

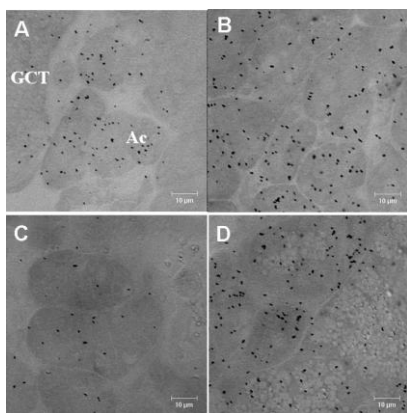


図 3 各群の RI 投与 30 分後の LMARG 像

Ac:腺房細胞 GCT:顆粒細胞膨大部

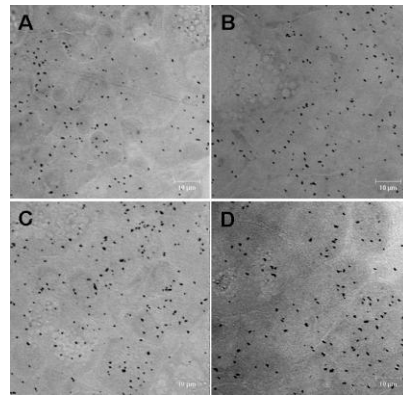


図 4 各群の RI 投与 120 分後の像

##### ②LMARG による腺房細胞内の還元銀粒子数の経時的変化

各群の RI 投与 30 分後および 120 分後の LMARG 像を図 3, 4 に示した。RI 投与 30 分後における腺房細胞内の還元銀粒子は、A 群と B 群では値の差はなく、C 群は D 群と比較し有意に低値を示した。A 群と比較し C 群で有意に低値を示した。RI 投与 120 分後では各群ともに同程度の還元銀粒子数であった (図 5)。

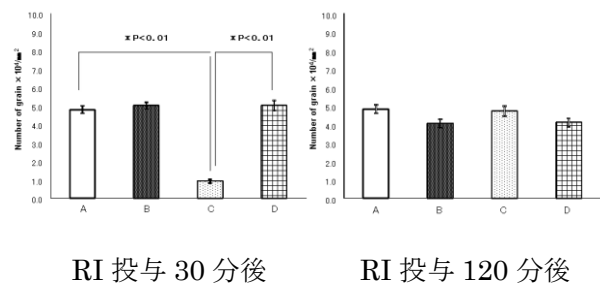


図 5 各群の腺房細胞の単位面積当たりの銀粒子数

##### ③電子顕微鏡による組織学的検索および EMARG による腺房細胞内小器官に局在する還元銀粒子数の割合の経時的変化

A 群、B 群と比較し C 群は腺房細胞全体のコントラストが強く、粗面小胞体、ゴルジ装置は、解離した像や強い形態変化が認められた。分泌顆粒は A 群と比較し、歪で融合した像も観察された。細胞核は異染色質と正染色質の区別がつかない像も観察された。D 群は粗面小胞体やゴルジ装置の膨化が一部に観察されたが、多くの部分は A 群と同様の像を呈した (図 6, 図 7)。

ゴルジ装置に局在する還元銀粒子数の割合は、120 分後で A 群と比較し C 群で有意に高値を示した。分泌顆粒に局在する還元銀粒子数の割合は、120 分後で A 群と比較し C 群で有意に低値を示した (表 1)。

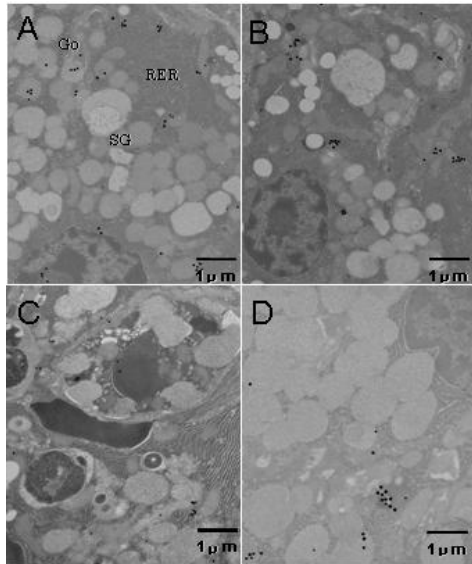


図 6 各群の RI 投与 30 分後の EMARG 像

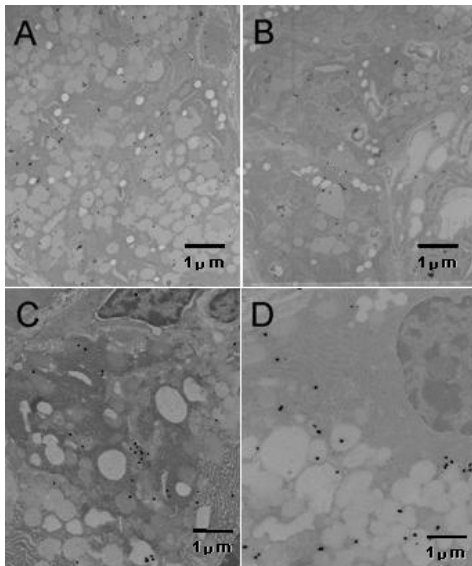


図 7 各群の RI 投与 120 分後の EMARG 像

表1 RI 投与120分後の各細胞小器官に局在する各群の銀粒子数(%)

	A	B	C	D
粗面小胞体	15±2	22±2	17±7	18±2
ゴルジ装置	31±2	27±2	50±4*	39±2
分泌顆粒	47±2	44±4	22±2*	34±2
その他	7±1	7±1	11±2	9±1

\*P<0.01

## (2) 血管内皮細胞に及ぼす放射線の影響

### ①免疫染色

VE cadherin は主に細胞の周囲部に存在した。vWF は顆粒状を呈し細胞質にみられた。また、Flk-1 は細胞の辺縁部および細胞質に観察された (図 8)。

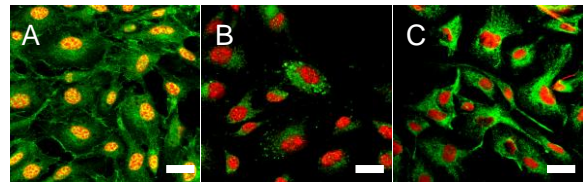


図 8 免疫蛍光染色像

(A) VE cadherin (B) vWF (C) Flk-1

### ②PCR

vWF, VE cadherin, CD31, beta actin ともに predict size が一致したバンドが検出された (図 9)。

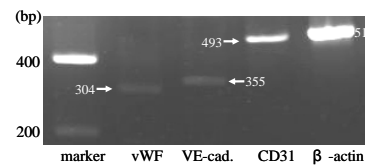


図 9 RT-PCR 解析

### ③tube formation

単細胞 (約 20 分後) が整列 (約 40 分後) し、枝とネットワーク (約 120 分後) を形成したのち凝集 (約 420 分後) した (図 10)。

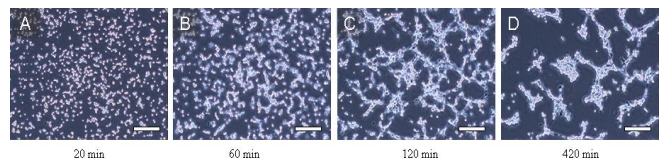


図 10 経時的 tube formation の変化

### ④TEM

数個～10 数個の細胞が内腔を取り囲み、細胞接着装置が細胞間に存在した (矢印)。ミトコンドリア、ゴルジ装置の発達、内皮細胞の特徴的な Weibel Palade body が観察された (図 11)。

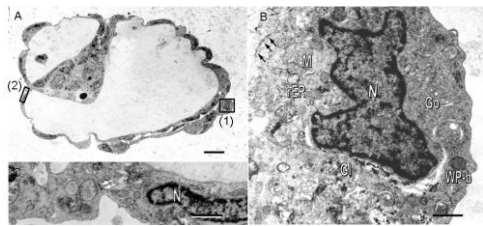


図11 tube formation の垂直方向の薄切像

スケールバー A:10 $\mu$ m, B,C:1 $\mu$ m

B:A-(1)の拡大写真A-1, C:A-(2)の拡大写真

N:nucleus, M: mitochondria, rER: rough-surfaced endoplasmic reticulum, Go: Golgi apparatus, Gl: Glycogen particle, WPb: Weibel Palade body

## 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 15 件)

- ①Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Kumazawa Y, Nasu M, Hirata T: Magnetic separation and characterization of keratinocyte stem cells from human gingiva, J Periodont Res, 45: 703-708, 2010.
- ②Okumura H, Nasu M, Yosue T: Effects of amifostine administration prior to irradiation to the submandibular gland in mice: autoradiographic study using  $^3\text{H}$ -leucine, Okajimas Folia Anat. Jpn, 85: 151-160, 2008. (corresponding author)
- ③Yachi Y, Nasu M, Yosue T: Effect of preliminary amifostine administration in irradiation of parotid glands, OSI, 5: 104-111, 2008.

[学会発表] (計 43 件)

- ①那須優則, 中原 貴, 井出吉昭, 富永徳子, 石川 博: ミニブタ胎児の歯胚由来血管内皮細胞株の血管形成に関する研究, 第 52 回 歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 船堀, 2010 年, 9 月 21-22 日. (JAOB, 52: suppl., 187.)
- ②Nasu M, Nakahara T, Ide Y, Tominaga N, Tachibana T, Hashimoto H, and Ishikawa H, Characterization of endothelial cells from tooth buds of miniature swine, IADR General Session, Barcelona, Spain, 2010, July.

③那須優則, 中原 貴, 井出吉昭, 富永徳子, 立花利公, 橋本尚志, 石川 博: ミニブタ胎児の歯胚由来血管内皮細胞の血管形成に関する実験, 第 27 回日本ヒト細胞学会学術集会プログラム・抄録集, 東京, 2009 年, 8 月 23 日. Human Cell 22:A13

④那須優則, 中原 貴, 井出吉昭, 立花利公, 橋本尚詞, 岩永健裕, 土屋秀治, 石川 博: ミニブタ胎児の歯胚由来血管内皮細胞の生物学的特徴, 第 6 回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 東京, 2008 年, 9 月 13 日. (JARD, 6:70)

⑤那須優則, 三橋扶佐子, 代居 敬: 耳下腺への放射線照射における amifostine 前投与の効果に関する実験的研究, 第 49 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 札幌, 2007 年, 8 月. (JAOB, 49:191.)

⑥奥村隼人, 那須優則, 代居 敬: 放射線照射された顎下腺に対する放射線防護剤アミフォスチンの効果, 第 48 回日本歯科放射線学会総会・学術大会, 大宮, 2007 年, 5 月.

⑦那須優則, 代居 敬: 耳下腺への放射線照射における amifostine 前投与の効果に関する実験的研究, 第 61 回日本口腔学会総会, 神戸, 2007 年, 4 月. (シンポジウム)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 優則 (NASU MASANORI)  
(日本歯科大学・生命歯学部・准教授)  
研究者番号: 5 0 1 3 0 6 8 8

(2) 研究分担者

三橋扶佐子 (MITSUHASHI FUSAKO)  
(日本歯科大学・生命歯学部・助教)  
研究者番号: 6 0 1 8 7 8 9 6