

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08126

研究課題名(和文)放射線誘発消化管障害におけるToll様受容体9シグナルの動態解析と病態への関与

研究課題名(英文)The significance of Toll-like receptor 9 in radiation-induced gastrointestinal damage

研究代表者

谷川 徹也(Tanigawa, Tetsuya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・客員准教授

研究者番号：70423879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘発食道炎におけるToll like receptor 9 (TLR9)およびインターフェロン(IFN)- α の役割を疾患モデルマウスを用いて検討した。胸部への放射線照射により食道組織におけるIFN- α の遺伝子発現は亢進しTLR-9の遺伝子発現は低下した。IFN- α 中和抗体は食道上皮の放射線障害を軽減し、IFN- α 受容体アゴニストは放射線障害を増悪させた。形質細胞様樹状細胞(pDC)機能抑制薬であるBortezomibおよび抗CD317抗体はIFN- α 発現抑制とともに放射線食道炎を抑制した。以上から、放射線誘発食道炎においてpDCが産生するIFN- α は炎症誘発・進展促進因子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線食道炎は頭頸部癌や肺癌の治療における重大な有害事象です。放射線食道炎の発症により、治療中に食事や水分の摂取ができなくなる、食道の痛みを感じる、といった症状を引き起こし、治療中の生活の質を大幅に低下させ、ひいては放射線治療を断念せざるを得なくなり、長期予後も増悪させる重大な有害事象です。本研究により形質細胞様樹状細胞が産生するIFN- α が放射線食道炎の発症を誘発し炎症を進展させる重大な役割を有することが明らかとなり、IFN- α や形質細胞様樹状細胞が本疾患の治療や予防のターゲットとなりうることを示しました。

研究成果の概要(英文)：Radiation-induced organ damage is a major dose-limiting side effect of the radiation therapy. This study aimed to elucidate the role of Toll-like receptor 9 (TLR9) and interferon- α (IFN- α) in radiation-induced esophagitis. C57BL/6 mice were exposed to single thoracic irradiation. Esophageal mucosal damage and inflammatory reactions were assessed for 5 days after irradiation. Irradiation decreased the level of gene expression for TLR9 and increased the level of gene expression for IFN- α in the esophageal tissue. Neutralizing antibody against IFN- α ameliorated radiation-induced esophagitis, while IFN- α receptor agonist had an inverse effect. Depletion of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) by anti-CD317 antibody or pharmacological inactivation with bortezomib suppressed radiation-induced esophagitis, accompanied by decrease in IFN- α expression level. These findings suggest that IFN- α and pDCs exert proinflammatory properties in the pathophysiology of radiation-induced esophagitis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：interferon-alpha 放射線食道炎 I型インターフェロン 形質細胞様樹状細胞 アポトーシス Toll-like receptor 9 PARP

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は頭頸部癌、食道癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌を始めとした種々の癌に対する治療手段として施行されるが、照射部位に含まれる健全な臓器や組織もまた放射線により障害を受ける。放射線消化管障害では粘膜の炎症により上皮細胞が障害され粘膜バリアの破綻を来すことでさらなる粘膜炎症が惹起される。放射線食道炎では嚥下痛や胸焼け症状による食物摂取困難をきたし、放射線腸炎では下痢、腹痛、下血といった消化管症状が発現し、闘病患者の生活の質(QOL)を大きく損ない、治療効果や生命予後に大きな負の影響を及ぼす。

放射線食道炎の分子病理学的特徴は上皮細胞の DNA ダメージに因る上皮細胞死である。放射線照射によるダメージを受けた細胞は DNA や RNA の断片、chromatin-binding nuclear protein high-mobility group box 1 (HMGB1)、ミトコンドリア DNA、熱ショックタンパク、その他の種々の分子を危険シグナル(danger-associated molecular patterns: DAMPs)として放出し細胞死に至る。DAMPs は Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLR) を介して一連の炎症反応を誘導する。

インターフェロン(IFN)- α は I 型 IFN の一つであり、ウイルス等の病原体を排除する防御機構を担う一方で、自己免疫性疾患等において自然炎症を惹起するといった炎症誘発的な側面も有している。最近の研究では、DAMPs により誘導された IFN- α が種々の炎症性疾患において炎症を誘導することが明らかとなっている。しかしながら放射線消化管障害における IFN- α の意義については明らかにされていない。

樹状細胞 (dendritic cell: DC)は抗原提示細胞であり、免疫反応の誘導および調節において重要な役割を有する免疫細胞である。DC は古典的 DC と形質細胞様 DC (plasmacytoid dendritic cell: pDC)の二種類に分別される。pDC は I 型 IFN を産生することで自然免疫および獲得免疫を発動しウイルスをはじめとした微生物に対する防御に関わっている免疫細胞である。pDC は危険シグナルである一本鎖 RNA を認識する TLR7 および非メチル化オリゴヌクレオチドを認識する TLR9 を発現している。pDC は細胞から放出されたこれらの危険シグナル分子に反応して IFN- α を産生し、炎症反応を亢進させることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究に於いて我々は放射線食道炎における TLR9 の発現動態、および IFN- α の意義を検討した。また、炎症の場において IFN- α を産生する pDC の本疾患における意義について検討した。

3. 研究の方法

(1)放射線食道炎疾患動物モデルの作成

放射線照射装置を用いて 6~8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスの胸部に限局的に放射線照射を行い放射線食道炎疾患モデルマウスを作成した。体重を経時的に測定し、放射線照射から 5 日後に解剖を施行し食道をサンプリングした。放射線食道炎の発症や程度については食道扁平上皮層の断面積、上皮組織の TLR9、IFN- α 、インターロイキン 1- β (IL-1 β)、keratinocyte chemoattractant (KC)の遺伝子発現を検討した。食道上皮細胞のアポトーシスについては SDS-PAGE および Western blotting 法による cleaved poly-ADP ribose polymerase (PARP)の発現誘導の評価および caspase-3 活性アッセイキットにより評価した。食道組織における放射線照射による IFN- α タンパク濃度の評価は Cayman の EIA アッセイキットを用いて検討した。

(2)放射炎食道炎における IFN- α の意義の検討

放射線食道炎における IFN- α の意義を検討するために IFN- α の中和抗体 (200 μ g/kg)あるいは IFN- α 受容体アゴニスト (RO8191; 1 mg/kg body weight)を放射線照射 1 時間前および照射後 1 日 1 回投与し、上記(1)に記載した食道上皮の放射線障害の指標について薬剤非投与コントロール群と比較した。

(3)放射線食道炎における pDC の関与の検討

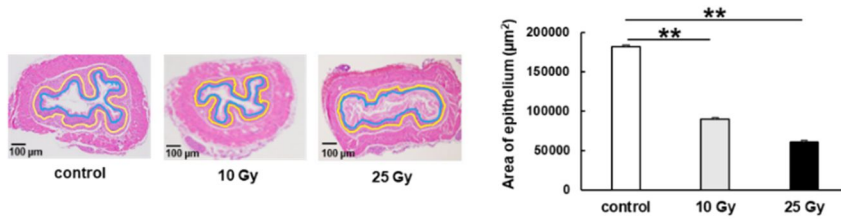
pDC の関与を検討するため、同細胞に対する不活化抗体である抗 CD317 抗体および活性阻害薬であるボルテゾミブを腹腔内投与した。

4. 研究成果

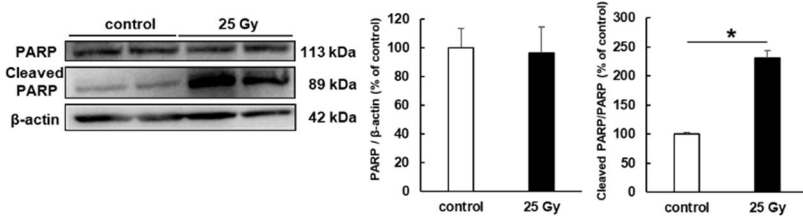
(1)放射線食道炎疾患動物モデルの作成

放射線照射群では非照射コントロール群に比し体重の減少、食道扁平上皮層断面積の減少、食道組織中のアポトーシスの指標である cleaved PARP の発現誘導や caspase-3 活性の亢進誘導を認めた。

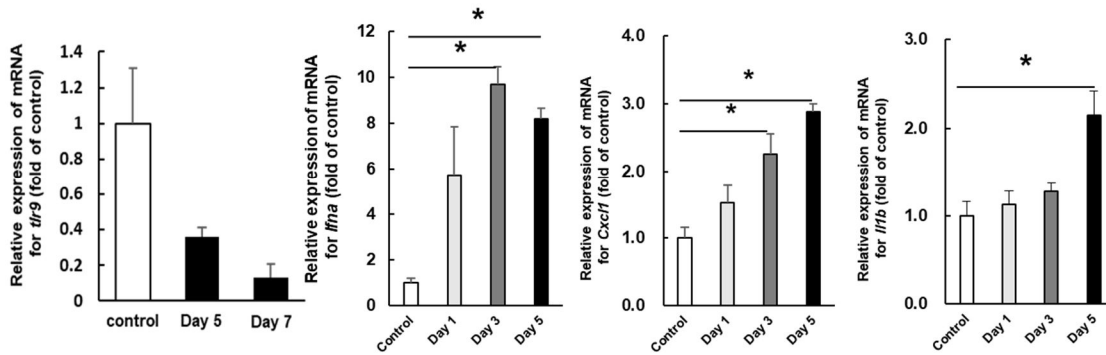
放射線照射は食道組織における IFN- α 、IL-1 β 、KC の遺伝子発現を亢進させた。食道組織における TLR9 遺伝子発現は放射線照射により低下した。



胸部への選択的放射線照射による食道上皮の菲薄化. Blue line: 食道上皮内腔側 Yellow line: 食道上皮基底層側



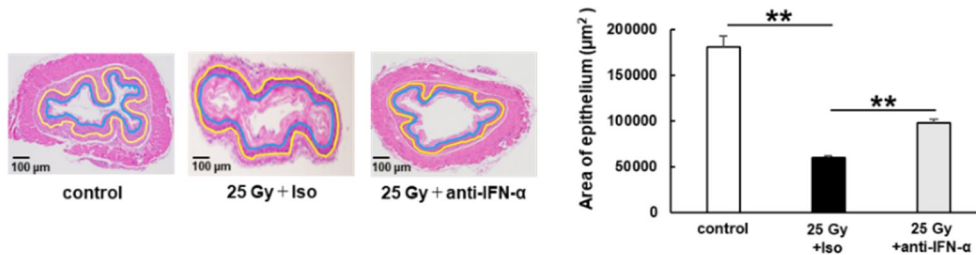
胸部への選択的放射線照射による食道組織における cleaved poly-ADP ribose polymerase (PARP)の発現誘導



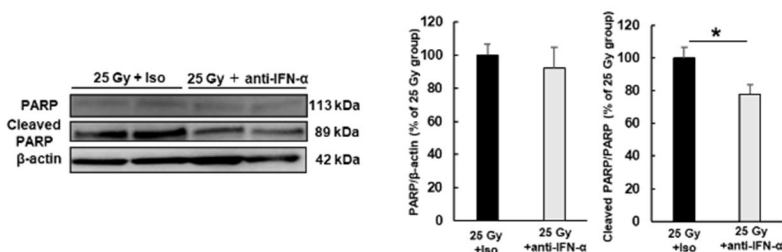
胸部への選択的放射線照射による食道組織における TLR9, IFN- α , KC, IL-1 β の遺伝子発現誘導

(2)放射炎食道炎における IFN- α の意義の検討

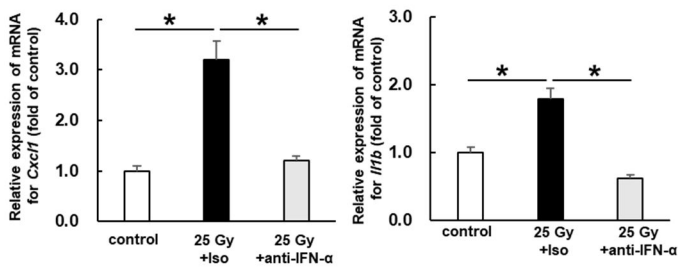
体重の減少、食道扁平上皮層断面積の減少、食道組織中のアポトーシスの指標である cleaved PARP の発現誘導といった食道上皮の放射線障害の程度は IFN- α 中和抗体の投与により緩和された。



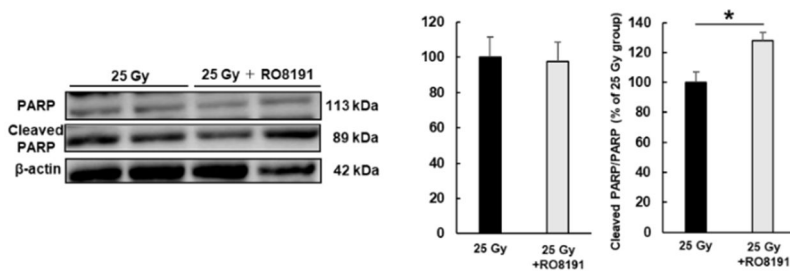
放射線照射による食道上皮の菲薄化に対する IFN- α 中和抗体の効果. Iso: 非特異的コントロール抗体. Blue line: 食道上皮内腔側 Yellow line: 食道上皮基底層側



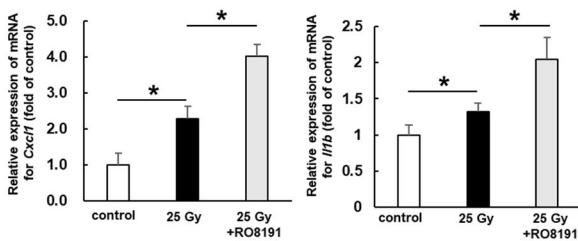
放射線照射による cleaved poly-ADP ribose polymerase の発現誘導に対する IFN- α 中和抗体の効果. Iso: 非特異的コントロール抗体



放射線照射による KC、IL-1β の遺伝子発現誘導に対する IFN-α 中和抗体の効果, Iso: 非特異的コントロール抗体
逆に IFN-α 受容体アゴニストの投与により放射線障害は増悪した。



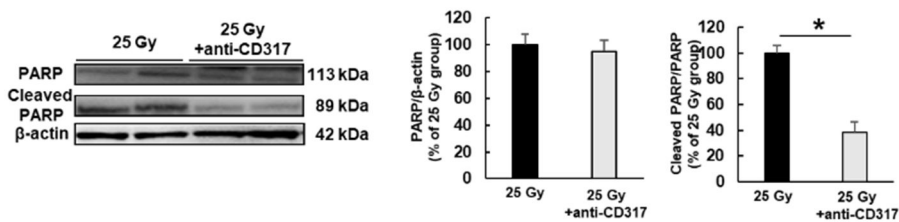
放射線照射による cleaved poly-ADP ribose polymerase の発現誘導に対する IFN-α 受容体アゴニスト (RO8191) の効果



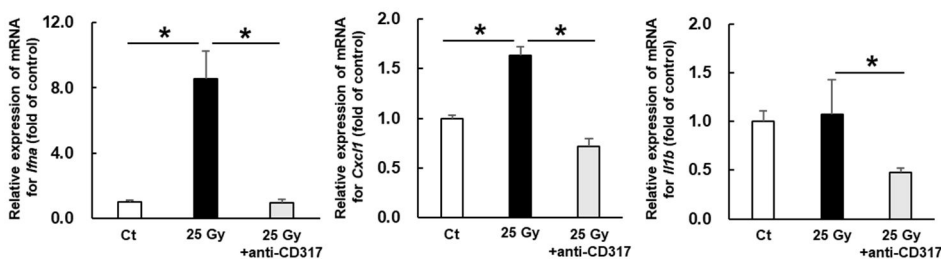
放射線照射による KC、IL-1β の遺伝子発現誘導に対する IFN-α 受容体アゴニスト (RO8191) の効果

(3) 放射線食道炎における pDC の関与の検討

抗 CD317 抗体は IFN-α の遺伝子発現を抑制するとともに放射線食道炎を抑制した。

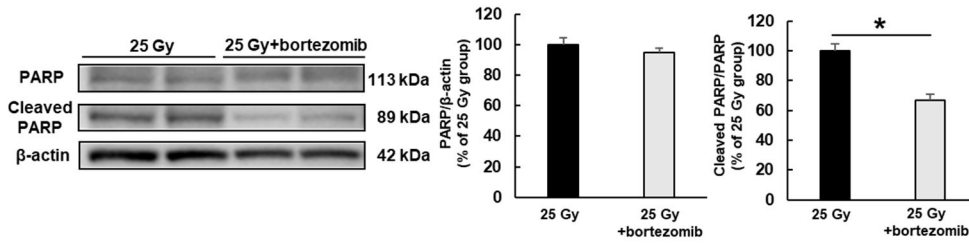


放射線照射による cleaved poly-ADP ribose polymerase の発現誘導に対する抗 CD317 抗体の効果

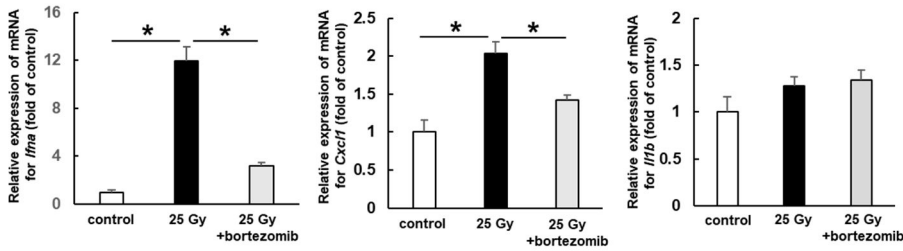


放射線照射による KC、IL-1β の遺伝子発現誘導に対する抗 CD317 抗体の効果

抗 CD317 抗体と同様に、ボルデゾミブは IFN- α の遺伝子発現を抑制するとともに放射線食道炎を抑制した。



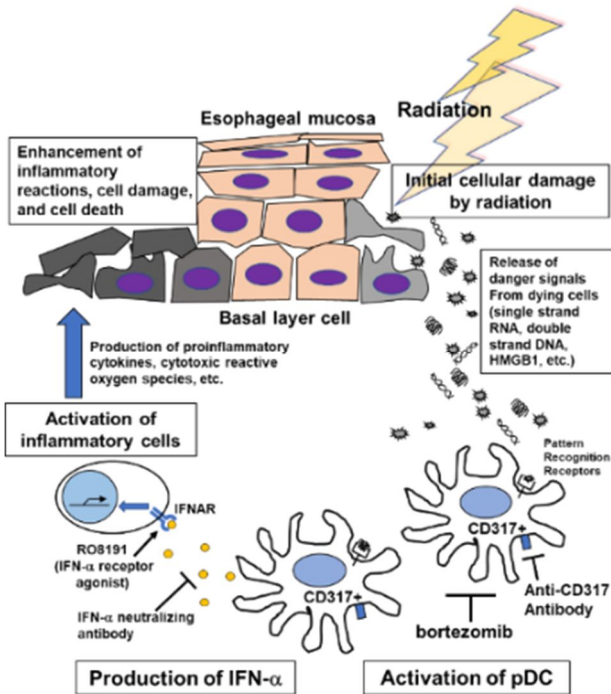
放射線照射による cleaved poly-ADP ribose polymerase の発現誘導に対するボルデゾミブの効果



放射線照射による KC、IL-1 β の遺伝子発現誘導に対するボルデゾミブの効果

(5) 結論

以上の結果から、IFN- α は放射線性食道炎において炎症を促進させる役割を有すると考えられた。放射線性食道炎における IFN- α の産生には活性型 pDC が関与している可能性が示唆された。



本研究の要旨のシエマ

放射線照射により食道上皮が障害を受け、細胞障害とともに危険シグナルが放出される。放出された危険シグナルは pDC に認識され pDC は IFN- α を産生する。産生された IFN- α は炎症細胞を活性化させさらなる炎症反応を惹起し、放射線食道炎の進展・増悪を誘発する。

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 1件）

1. 著者名 Kitamura Hiroyuki, Tanigawa Tetsuya, Kuzumoto Takuya, Nadatani Yuji, Otani Koji, Fukunaga Shusei, Hosomi Shuhei, Tanaka Fumio, Kamata Noriko, Nagami Yasuaki, Taira Koichi, Uematsu Satoshi, Watanabe Toshio, Fujiwara Yasuhiro	4. 巻 289
2. 論文標題 Interferon- exerts proinflammatory properties in experimental radiation-induced esophagitis: Possible involvement of plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120215 ~ 120215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2021.120215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroyuki Kitamura, Tetsuya Tanigawa, Takuya Kuzumoto, Yuji Nadatani, Koji Otani, Shuhei Hosomi, Fumio Tanaka, Yasuaki Nagami, Noriko Kamata, Koichi Taira, Toshio Watanabe, Masatsugu Shiba, Yasuhiro Fujiwara
2. 発表標題 Role of Interferon- and Plasmacytic Dendritic Cells in the Pathophysiology of Radiation-induced Esophagitis
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2020 (USA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村 寛之、谷川 徹也、大谷 恒史、灘谷 祐二、平良 高一、渡辺 俊雄、藤原 靖弘 ほか
2. 発表標題 放射線性食道炎におけるinterferon- の役割
3. 学会等名 第74回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村 寛之、谷川 徹也、大谷 恒史、灘谷 祐二、平良 高一、渡辺 俊雄、藤原 靖弘 ほか
2. 発表標題 放射線性食道炎におけるinterferon- および形質細胞様樹状細胞の役割
3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村 寛之、谷川 徹也、大谷 恒史、灘谷 祐二、平良 高一、渡辺 俊雄、藤原 靖弘 ほか
2. 発表標題 放射線性食道炎におけるinterferon- の役割
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020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	藤原 靖弘 (Fujiwara Yasuhiro) (40285292)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	
研究分担者	渡邊 俊雄 (Watanabe Toshio) (50336773)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	
研究分担者	平良 高一 (Taira Koichi) (00783713)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	大谷 恒史 (Otani Koji) (30597555)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	
研究分担者	灘谷 祐二 (Nadatani Yuji) (00634007)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	

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