

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591611

研究課題名（和文） 線維化関連分子を標的とした放射線誘発肺傷害の予防と治療

研究課題名（英文） Inhibition and amelioration of radiation induced lung fibroproliferation by TGF- β inhibition

研究代表者

西岡 明人（NISHIOKA AKIHITO）

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：70237668

研究成果の概要（和文）：放射線により誘発される肺の傷害に対する TGF- β を標的とする予防あるいは治療の長期的な有効性と安全性を明らかにするためにマウス実験モデルを用いて検討を行った。生体内でその生理作用を抑制することが可能な TGF- β に対する抗体を用いて、放射線照射前あるいは照射後に TGF- β の作用を抑制することにより、放射線照射によって生じる、あるいは既に生じた肺傷害を予防、あるいは改善することが可能か否かを、組織化学的な解析を主体に検討した結果、それらが十分に可能であることが示唆された。しかしながら、その効果が一過性のものか否かの問題や、発癌性を含めた重大な副作用の評価には、更なる検討と長期の観察が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether the inhibition of TGF- β actions could inhibit or ameliorate fibroproliferative change in rat irradiated lung. We used the anti-body for TGF- β that can adsorb TGF- β itself and that may inhibit the functions of the TGF- β . Our data indicate that TGF- β does play a critical role in radiation-induced pulmonary damage. Our results suggest that TGF- β inhibition by the antibody could be effective for the inhibition or amelioration of radiation-induced fibrosis in the lung. Possible side-effects of TGF- β inhibition over the long-term such as carcinogenesis should be carefully examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療、肺傷害、線維化関連分子、TGF- β

1. 研究開始当初の背景

胸部への放射線照射による肺障害について

ては、古くから肺癌、乳癌、食道癌やリンパ腫等において、照射線量や照射範囲、照射方

法との関連を中心に、多くの要因との関連の検討がなされてきた。

我々の施設においても、乳房温存療法にて治療された乳癌患者の肺障害を中心に、いくつかの検討を行い、化学療法との併用時期等との観点から肺障害軽減の可能性について模索してきた。

しかしながら、我々の検討も含めて放射線による肺傷害の詳細なメカニズムの解明や根本的な予防方法あるいは治療方法の確立については未だになされていない。

近年、肺をはじめとする各臓器の線維化のメカニズムが解明されはじめたことにより、線維化に対する概念が大きく変化しつつある。すなわち、

- (1) 線維化は決して不可逆性の変化ではなく、可逆的なものである。
- (2) 線維化の関連分子を標的として制御することにより、その予防と治療の可能性が示唆される。
- (3) TGF- β (transforming growth factor- β) が線維化の形成と持続の過程において中心的な役割を果たす”マスタースイッチ”である。

ことが判明してきた。

従って、放射線による肺傷害の予防や治療に関しても、TGF- β を中心とする経路が最も重要であり、TGF- β を特異的な標的とした制御が有効である可能性が示唆されてきはじめた。

一方、実際の臨床の場においては肺癌、乳癌の増加は著しいものがあり、それらの癌治療における放射線の役割は更に大きくなりつつある。しかしながら、それらの癌に対する胸部への放射線照射においては、正常肺組織の一部を照射野に含めることは避け難く、それによる肺障害の発生は時に重篤な症状として現われる。従ってその発生メカニズムの解明と予防および治療法の開発は、より有効かつ安全な胸部への放射線治療を可能にする上で重要であると思われる。

2. 研究の目的

上記背景のもとに我々は、TGF- β と結合してその作用を抑制することができる可溶性 TGF- β 受容体の遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (AdT β -ExR) を、肺に照射を行ったラットの照射前あるいは照射後に投与し、その肺障害に対する予防と治療効果を組織学的に解析することにより、以下の結果を得た。すなわち、

- (1) AdT β -ExR を照射前に投与すると、照射後 2 ヶ月の肺組織における TGF- β の発現、マクロファージの浸潤、筋線維芽細胞の増生および線維増殖性変化をいずれも抑制する。

- (2) 照射 2 ヶ月後という線維化が形成されつつある時期に AdT β -ExR を投与すると、やはり照射 4 ヶ月後の肺組織における TGF- β の発現、マクロファージの浸潤、筋線維芽細胞の増生を減少させ、線維化を改善する。

というものである。

これらのことから、線維化関連分子としての TGF- β を標的とし、その作用を抑制することにより、2 ヶ月間という短期間の観察期間と組織学的な検索のみではあるものの、放射線照射による肺傷害を予防あるいは治療することが実験的に可能であることを示した。

そこで今回は、その効果が一過性のものか永続的なものかといった問題も含めて、放射線により誘発される肺の傷害に対する TGF- β を標的とする予防あるいは治療の長期にわたる効果を、組織学的な解析に加えて生理学的な面からも検討すること、また生体内で TGF- β の種々の作用を長期間に渡って抑制することやアデノウイルスベクターを投与することによる、肺をはじめとする諸臓器への影響の有無、発癌性の有無などの長期的な副作用についても検討することにより、それらの結果から、放射線により誘発される肺の傷害に対する TGF- β を標的とする予防あるいは治療の、長期にわたる有効性と安全性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

線維化関連分子としての TGF- β を標的とすることにより、マウス照射肺の傷害発生を予防することが可能か否かを検討する。また同様の方法にてマウス照射肺にすでに生じた障害を改善することが可能か否かを検討する。加えて、臓器障害や発癌等の重大な副作用に関する検討を行う。

- (1) 放射線照射前に TGF- β の作用を抑制することにより、放射線照射によって生じるはずの肺傷害をどの程度予防することが可能かの解析と臓器障害や発癌等の副作用の評価
 - ① 全マウスを 3 群にわけ、1 群はコントロール群、1 群は放射線照射単独群、1 群を放射線照射 + TGF- β 抑制群とする。
 - ② コントロール群と放射線照射単独群は無治療、無操作にて飼育し、TGF- β 抑制群には放射線照射の 3 日前から 2 週間にわたり、体内の TGF- β を中和するための処置を行う。
 - ③ 放射線照射単独群と放射線照射 + TGF- β 抑制群のマウスの両側の全肺に一回で 30Gy の X 線を照射する。
 - ④ 各群の全マウスを定期的に観察し、呼吸状態等を評価する。

- ⑤ 各群のマウスを定期的に屠殺し、発癌の有無をはじめとする各臓器の異常の有無を確認すると共に、肺を摘出して液体窒素中に凍結保存する。定期的な屠殺以前に死亡するマウスがある場合は、死亡後直ちに同様の処置と検索を行い、死亡率を計算する。
 - ⑥ 凍結保存した肺組織から薄切切片を作成する。各標本を HE 染色、塗銀染色、各種モノクローナル抗体を使用した免疫組織染色にて検索し、TGF- β の発現、マクロファージの浸潤、筋線維芽細胞の増生および線維化の有無と程度を解析する。
 - ⑦ 上記の結果を解析し、放射線による肺の傷害に対する TGF- β 抑制の長期的な予防効果と安全性を検討する。
- (2) 放射線照射後に TGF- β の作用を抑制することにより、放射線照射によって既に形成された肺の線維化の改善がどの程度可能かの解析と臓器障害や発癌等の副作用の評価
 - ① 全マウスを 3 群にわけ、1 群はコントロール群、1 群は放射線照射単独群、1 群を放射線照射 + TGF- β 抑制群とする。
 - ② コントロール群は無治療、無操作にて飼育し、放射線照射単独群と放射線照射 + TGF- β 抑制群は各マウスの両側の全肺に一回で 30Gy の X 線を照射する。
 - ③ 各群のマウスを定期的に観察し、呼吸状態等を評価する。
 - ④ 放射線照射 + TGF- β 抑制群に放射線照射の 2 ヶ月後 (線維化が形成されつつある時点) から 2 週間にわたり、体内の TGF- β を中和するための処置を行う。
 - ⑤ 引き続き各群のマウスの定期的な観察を続ける。特に放射線照射 + TGF- β 抑制群のマウスの呼吸状態の変化を注意深く観察する。
 - ⑥ 各群のマウスを定期的に屠殺し、発癌の有無をはじめとする各臓器の異常の有無を確認すると共に、肺を摘出して液体窒素中に凍結保存する。定期的な屠殺以前に死亡するマウスがある場合は、死亡後直ちに同様の処置と検索を行い、死亡率を計算する。
 - ⑦ 凍結保存した肺組織から薄切切片を作成する。各標本を HE 染色、塗銀染色、各種モノクローナル抗体を使用した免疫組織染色にて検索し、TGF- β の発現、マクロファージの浸潤、筋線維芽細胞の増生および線維化の有無と程度を解析する。
 - ⑧ 上記の結果を解析し、放射線による肺の傷害に対する TGF- β 抑制の長期的な改善効果と安全性を検討する。

4. 研究成果

放射線により誘発される肺の傷害に対する TGF- β を標的とする予防あるいは治療の長期にわたる有効性と安全性を明らかにするために本研究を立案した。まずマウス実験モデルを用いて、放射線照射前に TGF- β の作用を抑制することにより、放射線照射によって生じるはずの肺傷害を形態的、機能的に予防することが可能か否か、次に、放射線照射後に TGF- β の作用を抑制することにより、放射線照射によって既に形成された肺の線維化を形態的にも機能的にも改善させることが可能か否かを検討した。当初は TGF- β の作用を抑制するために以前の我々の実験でも用いたアデノウイルスベクター (AdT β -ExR) の使用を計画したが、調達面の問題およびアデノウイルスを用いることによる遺伝子操作を原因とする種々の危険性を考慮し、同様の効果を期待できる TGF- β に対する抗体を用いて検討した。まず TGF- β を標的として、放射線により誘発される肺の傷害を予防可能か否かの検討の結果、6 ヶ月目までの観察からは、TGF- β に対する抗体を用いてその作用を抑制することで、組織化学的には照射肺組織における TGF- β の発現、マクロファージの浸潤、筋線維芽細胞の増生および線維増殖性変化がやはり抑制された。生理学的な評価では、マウスの呼吸状態に改善がみられた。これらのことから、放射線照射により生じる肺傷害の形態的、機能的な予防が可能であることが示唆された。また観察期間内において各マウスに著変はなく、現時点で安全性についても明らかな問題は生じていない。次に TGF- β を標的として、放射線により既に誘発された肺の傷害を改善可能か否かの検討においては、照射肺組織における TGF- β 発現、マクロファージ浸潤および筋線維芽細胞増生の減少、線維化の改善といった組織化学的な検討に関しては、6 ヶ月目までの観察の結果からは、やはり TGF- β に対する抗体を用いてその作用を抑制することにより、放射線照射により生じた肺傷害を形態的、機能的に改善し得る可能性が、予防の場合と同様に示唆されたが、予防の場合と比較してその差異が明確ではなく、現時点では断定するまでには至っていない。線維化関連分子のなかでもマスタースイッチとなる TGF- β を標的としてその作用を抑制することは、近年解明されつつある線維化のメカニズムからも理にかなったものと思われるが、その効果が一過性のものか永続的なものかといった問題の解明や、各臓器に対する障害の有無や発癌性の有無といった重大な副作用の評価には、現時点でのデータではまだまだ不十分で、その有効性と安全性を判断するには、更なる検討と長期の観察が必要と

考えられた。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西岡 明人 (NISHIOKA AKIHITO)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：70237668