

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 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791164

研究課題名（和文）

単球及びマクロファージによる放射線皮膚障害治療の可能性

研究課題名（英文）

Possibility to the treatment for radiation-induced skin damages using monocytes and acrophages.

研究代表者

高橋 賢次（TAKAHASHI KENJI）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00400143

研究成果の概要（和文）：

本研究は、放射線治療の dose limit となる治療過程で併発する皮膚障害を軽減する方法を探索することを目的としたが、モデルの作製が困難であったため、皮膚障害のひとつである疼痛に着目して実験を進めることとした。より簡便な疼痛モデルとして培養細胞を用い、放射線と同様に障害を与える抗がん剤による疼痛関連分子への影響を評価した。

研究成果の概要（英文）：

In this research, to study a skin pain, one of radiation-induced skin damages, effects of DNA damaging agent, paclitaxel on transient potential ankyrin 1 (TRPA1), one of polymodal receptors using cell line RIN-14B expressing TRPA1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

本研究は、放射線治療の実施する上で dose limit となる放射線障害のうち皮膚障害に着目し、これを防護・緩和する目的で炎症に関わる血球のうち単球およびマクロファージの作用を検討することで開始した。しかしながら、当初の計画における実験モデルの作製に難航したため、皮膚障害のひとつである疼痛のメカニズムを検証することを実施した。放射線による皮膚障害においても疼痛が発症し、著しく QOL を下げる一因となってい

る。

一方、抗がん剤治療においても神経因性疼痛が副作用として発症するため使用濃度や頻度が限られることがあり、放射線同様に DNA に損傷を与える抗がん剤でもある白金製剤、ビンカルカロイドあるいはタキサン系薬物では末梢神経障害が顕著である。

痛覚神経にはその受容体として様々なものが機能しているが、中でも侵害受容器として熱や酸そしてトウガラシの辛味成分であるカプサイシンを受容する transient

potential vanilloid 1 (TRPV1)に代表される TRP チャネルファミリーが注目されている。従って、これらの疼痛メカニズムにおいて TRP チャネルとの相互作用については可能性が考えられるものの、研究が始まったばかりであり、これらの研究成果は放射線誘発の疼痛にも有益な情報になると考えられる。

そこで、本研究でもまず DNA 損傷を引き起こす抗がん剤のひとつであるパクリタキセルの TRP チャネルへの作用を明らかにする目的で TRP チャネルのうち主に冷温に感受性が高いとされる TRP ankyrin 1 (TRPA1) を発現している培養細胞株 RIN-14B を用いて疼痛発症メカニズムを明らかにすることを試みた

2. 研究の目的

侵害刺激を認識するイオンチャネルや受容体はこれまでも多数明らかにされ、トウガラシに含まれる辛味成分であるカプサイシンの受容体である TRPV1 チャネルが痛みの刺激となる熱や酸をも認識するポリモーダル受容体として知られるようになった。また炎症組織で放出されるサイトカインや脂質、プロトンなどの様々な因子がチャネルや受容体を介して侵害刺激を発生させることも明らかとなり、痛みを認識する分子実体の解明は大きく進展している。

タキサン系抗がん剤であるパクリタキセルは、副作用として末梢神経障害を起こすことが知られ、冷温刺激や機械刺激に過敏になる疼痛障害を発症する。一方、ほ乳類では冷温を感知するチャネルとして TRP チャネルのひとつである TRPA1 が関与することが明らかとなっている。そこで、パクリタキセルによる神経因性疼痛の発症メカニズムを明らかにする目的で、TRP チャネルがそれに関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。具体的には、TRPA1 を発現する培養細胞株 RIN-14B を用いて、パクリタキセルにばく露することで TRPA1 の応答性にどのように影響を及ぼすかを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

3-1. 試薬

パクリタキセルは和光純薬工業（大阪）から購入した。Fura-2 AM はインビトロジェン（東京）より入手した。抗 TRPA1 ウサギ抗体はアブカム（東京）から、抗 Actin ヤギ抗体は Santa Cruz (LA, USA) からそれぞれ購入した。アリルイソチオシアネート (AITC) はナカライテスク（京都）から入手した。

その他の一般試薬類は、和光純薬工業より購入した。

3-2. 細胞

細胞株 RIN-14B は DS ファーマバイオメデ

ィカル（大阪）から購入した。10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地（和光純薬）にて培養した。

3-3. パクリタキセルばく露

パクリタキセルをジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、DMSO が終濃度で 0.1% になるように培地に添加しばく露溶液とした。

パクリタキセルは 0.01 あるいは 0.1 μM の濃度で処理し、対照は DMSO のみを添加した。パクリタキセル処理 6, 12 あるいは 24 時間後に回収し、トリパンブルー色素排除法にて生存率を算定したのち、各実験に供与した。

3-3. 細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 測定

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定には、蛍光指示薬 fura-2 を用いたイメージング法を実施した。

細胞はあらかじめカバーガラス上に播種し、Normal 液 (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH7.4) で 10 μM fura-2 AM を 37°C で 40 分間インキュベーションし細胞に導入した。

検出は、還流装置を組み込んだ蛍光顕微鏡下で実施し、Aquacosmos（浜松ホトニクス、浜松）でデータ取得と解析を行った。

TRPA1 の感受性を試験するため、1~10 μM の AITC で刺激したのち、陽性対照として 0.1 mM AITC で刺激し、TRPA1 の活性化による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加反応を測定した。

3-4. TRPA1 発現量の検出

イムノブロット法を用いて、TRPA1 の発現量を評価した。

各細胞サンプルを回収し、細胞溶解液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, pH7.5) で細胞抽出液を調製した。各抽出液のタンパク質量は Bio-Rad Protein Assay (バイオラッド、東京) を用いて吸光度計で測定した。

泳動用の試料は Laemmli 法に従い、62.5 mM Tris-HCl, 5% 2-メルカプトエタノール, 2% ドデシル硫酸ナトリウム, 10% グリセロールで pH7.5 に調製しブロモフェノールブルーで着色した。

TRPA1 の検出には、抗 TRPA1 抗体を 5% スキムミルク含有 TBST バッファー (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH7.5) で 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度に調製して使用した。抗 actin 抗体は同様に 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で使用した。それぞれの HRP 結合二次抗体と反応させたのち、化学発光法 (ピアース、東京) で検出した。

3-5. 統計処理

一元配置分析による多重比較検定 (Games-Howell 法) を実施した。P>0.05 以下を有意な差であると判定した。

4. 研究成果

4-1. パクリタキセルの細胞死への影響

パクリタキセルは使用した濃度範囲では、ばく露 24 時間後までは、形態の変化は見られたが細胞死は観察されなかった (図 1)。このことは、使用した濃度範囲では細胞毒性はないものの、細胞に対して何らかの変化をもたらせていると考えられる。

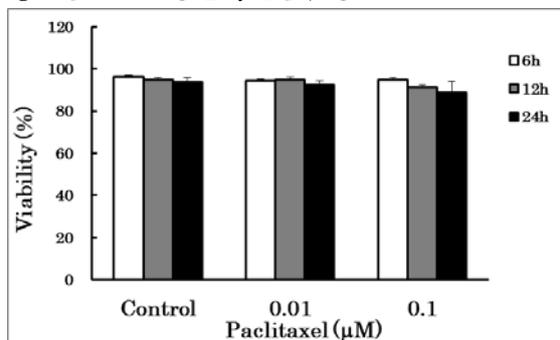


図 1 パクリタキセル処理による生存率への影響 (**; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$)

4-2. TRPA1 の感受性への影響

パクリタキセルのばく露は時間と濃度によって TRPA1 の感受性に作用し、1 および 10 μM AITC 刺激では明確な差が認められなかったが、3 μM で刺激すると 0.01 μM のばく露 12 時間後において対照に対して感受性が増加した。しかしながら、24 時間後では濃度依存的に TRPA1 の感受性が低下した (図 2)。

これまで、パクリタキセルの神経因性疼痛が TRPA1 に関与しているという報告もあるが、一方では関与しないという報告もあり、議論の余地が残されていた。本結果は、濃度とばく露時間によって TRPA1 の感受性が異なることを示唆するものであり、パクリタキセルが TRPA1 の感受性に関与することを裏付けるものの、作用については投与量、血中濃度や投与後時間を慎重に考慮する必要があることが新たに示された。

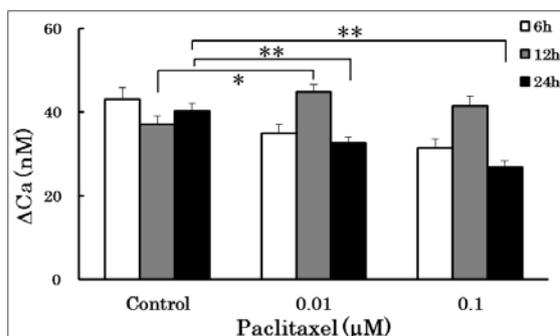


図 2 パクリタキセル処理による TRPA1 作動薬 AITC (3 μM) 刺激後の細胞内カルシウム濃度上昇への影響 (**; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$)

4-3. TRPA1 の発現変動

ばく露 12 時間後において、0.01 μM パクリタキセルは対照に比して、発現量が増加した。しかしながら、24 時間後では濃度依存的に発現量が低下した (図 3)。これらの結果は、TRPA1 の感受性と相関するものであり、パクリタキセルが TRPA1 の発現量を調節して感受性の変化に作用している可能性を示した。それ故、この調節機構をさらに明らかにすることで神経因性疼痛の防護や緩和を可能にできることが示唆された。

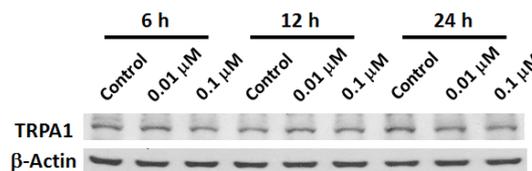


図 3 パクリタキセル処理による TRPA1 発現量への影響

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 4 件)

- ① Ohkita M, Saito S, Imagawa T, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. Molecular cloning and functional characterization of *Xenopus tropicalis* frog transient receptor potential vanilloid 1 reveal tis functional evolution for heat, acid, and capsaicin sensitivities in terrestrial vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 287(4), 2012, 2388-2397.
- ② Monzen S, Takahashi K, Yoshino H, Kasai-Eguchi K, Kashiwakura I. Terminal maturation of megakaryocytes and platelet production by hematopoietic stem cells irradiated with heavy-ion beams. *Radiation Research*, 査読有, 176(1), 2011, 8-16.
- ③ Hazawa M, Takahashi K, Sugata S, Kashiwakura I. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate induces nonapoptotic cell death in leukemia cells independent of the 67 kDa laminin receptor. *Journal of Natural Products*, 査読有, 74(4), 2011, 695-700.
- ④ Kato K, Takahashi K, Monzen S, Yamamoto H, Maruyama A, Itoh K, Kashiwakura I. Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in

human hematopoietic stem cells.
Radiation Research, 査読有, 174(2),
2010, 177-184.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 高橋賢次, 太田利男, 酸性条件下における 2-aminoethoxydiphenyl borate による PC12 細胞の細胞死誘発作用, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 2011 年 11 月, 福岡市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 賢次 (TAKAHASHI KENJI)

鳥取大学・農学部。准教授

研究者番号 : 00400143