

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592765

研究課題名(和文)放射線照射メダカによる骨代謝障害予防法の開発

研究課題名(英文)Radioprotective assay on bone metabolism with Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)

研究代表者

澤尻 昌彦 (Sawajiri, Masahiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：20325195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨浸潤性腫瘍に対する放射線治療において照射後の骨の機能と形態の保存を目的としてメダカ(*Oryzias*)咽頭歯骨部を用いて放射線照射後の骨代謝、破骨細胞誘導の信号伝達物質を生化学的に計測してきた。骨浸潤性腫瘍においてはペリオスチンなどが高頻度に発現して骨代謝、石灰化、骨芽細胞の成熟に大きな影響を与えることが示されている。ペリオスチンの骨代謝に与える影響は明らかではないが、ガンマ線照射に比べて炭素線照射によってペリオスチンは増強され骨吸収が阻害されるだけでなく、骨芽細胞が産生される石灰化促進因子が増強される。このために骨の吸収阻害や放射線照射後の病的骨折防止に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： We investigated bone metabolism signaling protein biochemically such as osteoclast-induced cytokine using the pharyngeal bones of medaka (*Oryzias*) after irradiation. Periostin, which frequently expressed osteoblast, was found in bone invasive tumors and also could significantly affect on bone metabolism. Moreover, periostin was expressed on the calcification and the maturation of osteoblast. However, the effects of periostin on bone metabolism are still not clear about carbon ion irradiation enhanced the expression of periostin on osteoblast cells. The result of this study showed that carbon ion irradiation can increase periostin on osteoblast cell. Furthermore, the irradiated osteoblast cell also express high representation of calcification factor and bone maturation factor. Carbon ion radiotherapy might promote the prevention of bone absorption and the pathological fracture after exposure irradiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：メダカ(*Oryzias*) 放射線照射 破骨細胞誘導 シグナル伝達物質 骨浸潤性腫瘍 がん放射線治療

1. 研究開始当初の背景

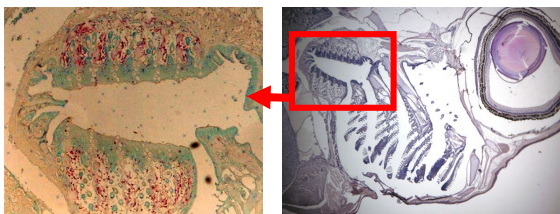
がん放射線療法は、手術療法、化学療法とならぶ悪性腫瘍に対する三大治療法の一つである。しかしながら、従来わが国では外科的切除が第一選択と考えられる傾向があったが、治療後の生活の質(QOL)の高い治療法を希望するようになってきている。放射線療法はこのような時代の要求に合致するがん治療法である。ここで問題になるのは放射線による骨組織の反応である。重粒子線がん治療において骨組織の反応が従来のガンマ線照射と異なることが指摘されてきたが、ガンマ線と炭素粒子線のように LET の違う放射線によって骨組織における骨代謝因子や骨芽細胞の成熟と分化における反応が異なることが示され、その解明が求められている。

放射線治療における腫瘍周囲正常骨の放射線性障害の予防と腫瘍の骨浸潤における放射線照射の影響を調べるために、炭素線とガンマ線を骨に照射し、骨代謝因子におよぼす影響を調査してきた。従前の研究では正常骨に対するガンマ線照射では骨の吸収が見られたが、炭素線照射に於いては骨の石灰化亢進が認められた。

我々はこれまでラット脛骨、マウス骨芽細胞様細胞などに炭素粒子線、ガンマ線を照射してその結果を報告してきた。近年、骨微小環境とサイトカイン・ネットワークや分化の調節にかかわる転写因子の解明が基礎分野で進んでいる。放射線照射後の少々細胞と骨芽細胞とりまく微細構造やサイトカイン・ネットワークや分化の調節にかかわる転写因子の関連については報告も少なく、解明が求められているためメダカに於ける放射線照射後の反応を観察することにした。

2. 研究の目的

最近、国内外において、メダカ(Oryzias)など小型魚類を利用した遺伝学・生物学的研究や環境影響研究が盛んになってきている。放射線生物学の研究は一般にヒトへの影響を目的に検討していることが多いために、小型ほ乳動物が多用されているが、環境の影響を直接受ける変温脊椎動物であるメダカは、近年さまざまな分野でも実験用動物として大きな意義を持っている。



鰓の後方、neural arch の咽頭歯周囲に TRAP 染色により破骨細胞が赤く染色されている

がんの骨への浸潤増殖が破骨細胞性骨吸収に引き続いて起こることから、破骨細胞性骨吸収を標的とした治療法として放射線による骨転移巣でのがんの増殖や骨破壊制御の可能性が示されている。咽頭歯骨部ではほ乳類に見られるような骨代謝が盛んに行われているため放射線照射後の骨のリモデリングや分化の調節に関わる骨代謝因子の関連を解明しようとした。

ペリオスチンは、骨芽細胞に特異的に発現する細胞間接着因子である。近年の研究により、細胞の接着や移動、増殖に関与するという報告がなされている。腫瘍とペリオスチンの関係は多くのがんでペリオスチンの発現とがんの骨浸潤、骨転移などの悪性化や進行度に密接な関係があることが報告されている。メダカ生体組織に対して放射線を照射しペリオスチンの変化を解析することで、腫瘍の骨転移あるいは骨浸潤の予防策について検討した。

放射線照射後のメダカでペリオスチンの発現と局在を視覚化し、生体での骨・歯のリモデリングを詳細に明らかにしサイトカイン・ネットワークや分化の調節に関わる転写因子の関連を解明することでがん放射線治療における骨代謝障害の軽減に大きく貢献できると考えた。

3. 研究の方法

(1)ペリオスチンは、骨芽細胞に特異的に発現し骨の代謝に関与するとされているため、放射線の骨代謝に与える影響を調査するためにメダカにガンマ線、炭素粒子線の照射を行い、照射後の全身をパラフィン包埋して薄切切片を作成し免疫染色を施すことで発現と局在を視覚化して解析した。さらに咽頭歯骨部を摘出して RNA およびタンパク質を抽出して RT-PCR と western blotting によってペリオスチンの遺伝子発現とタンパク質を計測した。

(2)放射線照射後の骨の反応は前述のように従来のガンマ線照射と炭素線照射では異なり、炭素線照射によって骨の石灰化が亢進する現象が見られたために照射後の骨石灰化因子、骨代謝因子の変化を経時的に計測した。ガンマ線、炭素線をメダカに照射し薄切切片上で OSX, osteocalcin などの骨代謝因子の計測を行った。また同様に抽出した咽頭歯骨より発現遺伝子とタンパク質を経時的に計測し、照射した放射線の線質、LET の差による骨代謝因子の発現状況の違いを比較した。

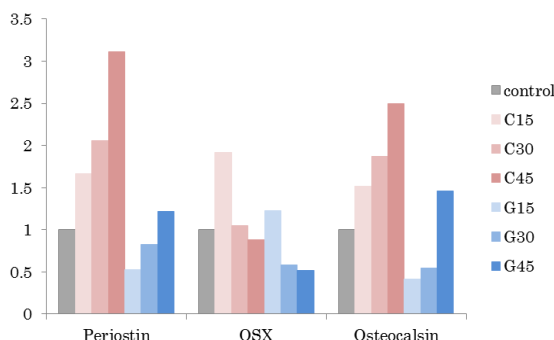
4. 研究成果

(1) 重粒子線がん治療において臨床的にも組織学的にも骨組織の反応が従来のガンマ線照射と異なることが指摘されてきたが、ガンマ線と炭素粒子線のように LET の違う放射線

によって骨組織におけるペリオスチンの発現が異なることが示された。骨代謝に於いて骨芽細胞の産生するペリオスチンは放射線照射によって増強されしかも高 LET 放射線である炭素線照射によってより強く発現していた。

臨床に於ける重粒子線がん放射線治療において腫瘍周囲の正常骨の骨吸収が少ないこと、過去の動物実験において、炭素線照射した骨では骨梁の肥厚が見られ、軟骨内骨化における軟骨の残存と低石灰化などペリオスチンの過剰発現との関連など引き続き検討すべき課題が多く提起された。

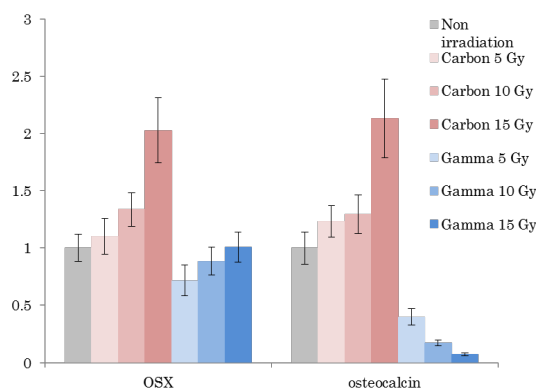
(2) 骨軟骨部における重粒子線治療後に見られる骨梁の肥厚や石灰化の低い繊維化した骨増生、さらに骨形成細胞、骨吸収細胞との相互作用など多様な役割を演じていると考えられる各種骨代謝因子の計測を行った。照射後の咽頭歯骨部における骨代謝、骨石灰化因子である OSX, Osteocalcin などを計測した。グラフのようにガンマ線照射では石灰化因子の減少が見られ、炭素線照射では逆に増加傾向が認められ異なった結果が得られた。これらは過去の炭素線放射線治療に見られる周囲正常骨の石灰化や動物実験に於ける骨梁の肥厚や石灰化に対応する。



ペリオスチンは炭素線照射咽頭歯骨内で増強されている。骨成熟、石灰化因子についても炭素線照射で増加傾向が見られる。

(3) メダカを用いて行った研究と平行して行っているマウスに於ける乳がん細胞移植実験でも癌の増殖や骨破壊の制御を行っているとされてきたペリオスチンの発現がガンマ線、炭素線照射後の変化において差違が認められた。すなわち次項のグラフのように骨芽細胞に対する炭素線の照射実験において骨芽細胞の産生する骨代謝因子の発現がメダカ咽頭歯骨と同様に炭素線で増強された。過去の臨床経過とマウス、ラットによる動物実験結果との同相性が見られた。

メダカを用いたペリオスチンおよび骨代謝関連タンパクの解析は骨軟骨部に対する重粒子線がん放射線治療の向上と副作用の低減に有用であろう。



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 1 件)

1. Fujita K., Nomura Y., Sawajiri M., Pravat K M, El-Shemy H., Nguyen T., Hosokawa M., Miyashita K., Maeda T., Saneoka H., Fujita S., Fujita T., The extracts of Japanese willow tree species are effective for apoptotic desperation or differentiation of acute myeloid leukemia cells, Pharmacognosy Magazine 10(38)査読有 2014,125-131,

〔学会発表〕(計 6 件)

澤尻昌彦、野村雄二、寺東宏明、丸山耕一、谷本啓二、重粒子線の骨代謝におよぼす影響、平成 25 年度がん治療装置共同利用研究成果発表会、千葉、2014.4.21

澤尻昌彦、スリマウング・プリヤポーン、野村雄二、寺東宏明、丸山耕一、谷本啓二、乳がん細胞の破骨細胞誘導における放射線の影響、日本放射線影響学会第 56 回大会、青森、2013.10.19

澤尻昌彦、野村雄二、丸山耕一、谷本啓二、重粒子線の骨代謝におよぼす影響、平成 24 年度がん治療装置共同利用研究成果発表会、千葉、2013.4.22

澤尻昌彦、野村雄二、丸山耕一、谷本啓二、重粒子線の骨代謝におよぼす影響、日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、2012.9.6

澤尻昌彦、野村雄二、丸山耕一、谷本啓二、重粒子線の骨代謝におよぼす影響、平成 23 年度がん治療装置共同利用研究成果発表会、千葉、2012.4.24

澤尻昌彦、野村雄二、丸山耕一、谷本啓二、重粒子線の骨代謝におよぼす影響、日本放射線影響学会第 54 回大会、神戸、2011.11.19

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤尻 昌彦 (SAWAJIRI MASAHIKO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：20325195

(2)研究分担者

野村 雄二 (NOMURA YUJI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：80218370

谷本 啓二 (TANIMOTO KEIJI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：10116626

滝波 修一 (TAKINAMI SHUICHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：60154952
(平成23年のみ分担者)