

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592782

研究課題名(和文)唾液腺細胞の放射線障害に対するアミノチオール系防護剤の効果

研究課題名(英文)Effect of amino thiol-based protective agent for radiation damage of salivary gland cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：口腔乾燥症として知られる唾液腺機能低下は頭部がんの放射線治療により起こる。アミフォスチンは放射線療法による唾液腺のような正常組織を防護することが知られている。我々はマウス胎仔の顎下腺原基に対する放射線の影響およびアミフォスチンの効果を調べた。妊娠マウスにアミフォスチンを腹腔内投与し、30分後に放射線を照射した。その結果、アミフォスチンは放射線の影響を軽減するが、細胞活性に対する抑制作用を有していた。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland hypofunction, known as xerostomia, occurs as a result of radiation therapy for head cancer, and can cause a variety of critical oral health issues. Amifostine has been shown to protect normal tissues as salivary gland from damage caused by radiation. Pregnant mice that were injected intraperitoneally with amifostine were irradiated 30 minutes later. We investigated the effect of amifostine on X-ray irradiated mice fetal submandibular gland. As a results, amifostine to reduce the effects of radiation, which had an inhibitory effect on cell activity.

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：放射線 amifostine 顎下腺 器官培養

1. 研究開始当初の背景

(1) amifostineは米国においてFDAから認可されている唯一の放射線防護剤であり、頭頸部領域の放射線治療における健全な唾液腺の防護剤としての amifostine の臨床応用が多数なされている。一方、放射線治療時の amifostine 投与による唾液流出率が改善されず、吐き気、嘔吐に代表される副作用、低血圧、低カルシウム状態が生じるなど、相反する報告がなされている。

(2) 動物実験では amifostine 投与により晩発的影響が軽減された報告があるが、多くは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による。
 (3) amifostine は口腔領域の放射線治療の際の唾液腺防護剤として有効とされながらも唾液腺原基および成長後の腺房細胞以外の唾液分泌に関与する実験的データは少ない。

2. 研究の目的

(1) 器官培養した唾液腺原基に対する放射線の影響、amifostine の効果

胎生期の唾液腺は上皮を間葉が取り囲む基本的な構造を成している。また、胎生期の器官形成は放射線の影響が照射早期に出現やすい。胎生期の分枝形態形成の過程において上皮間葉相互作用により細胞-細胞間接着から細胞-マトリックス接着へ変換シクレフトが形成される。原基の成長、分枝形態形成、上皮細胞内、マトリックス内の分枝形態、器官形成に関与する物質の局在、その量を比較、検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：実験は日本歯科大学生命歯学部「動物の愛護と管理に関する規定」に従い実施した。妊娠 C57BL マウスを使用した。膣栓が確認された日を妊娠 0.5 日齢(ED=0.5)として ED=15.5 の顎下腺原基を実験に供した。

(2) Amifostine 投与：X線照射 30 分前に 100mg/kg の amifostine (WR-2721, Ethyol®, MedImmune Oncology Inc, U.S.A) を妊娠マウスの腹腔内に投与した。
 (3) X線照射：投与 30 分後に妊娠マウスを仰臥位に固定し、1 Gy あるいは 3Gy の X線 (200 kV, 15 mA, 0.88 Gy/min) を全身に照射し胎仔から顎下腺原基を摘出した。

(4) 実験群

Amifostine 非投与、投与、無照射、1Gy, 3Gy から 6 群の実験群とした。
 無照射-amifostine 非投与群 (0Gy(-))
 無照射-amifostine 投与群 (0Gy(+))
 1Gy 照射-amifostine 非投与群 (1Gy(-))
 1Gy 照射-amifostine 投与群 (1Gy(+))
 3Gy 照射-amifostine 非投与群 (3Gy(-))
 3Gy 照射-amifostine 投与群 (3Gy (+))

(5) 器官培養：摘出した顎下腺原基を 6 穴マルチウェルプレートの成長培養液上でポア

サイズ 0.4µm の culture cell insert 上で培養し、48 時間後を観察した。(成長培養液：1mM MEM, ペニシリン G(50Units/ml), ストレプトマイシン(50µg/ml), アンホテリシン B (Fungizone; 0.25µg/ml) 添加の DMEM/F12(Invitrogen Corp., USA))

(6) 原基の面積比：培養直後、6 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後の顕微鏡像を撮影し画像処理ソフト (Image J,Java) で面積を算出した。1 群 5 匹とした。

(7) 原基に対する上皮系組織の体積の割合：器官培養 48 時間後を比較した。4µm 厚の連続切片を 20 枚作製し、約 80µm 厚分を 3D 構築ソフト(TRI/3D-SRF; ラトックエンジニアリング (株)) で再構築した。

(8) HE 染色：器官培養 48 時間後、4% formaldehyde 水溶液で固定後、4µm 厚の胎仔顎下腺切片を HE 染色した。

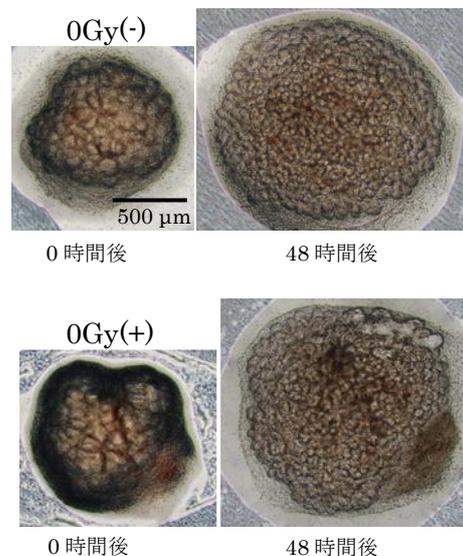
(9) AQP5 染色：器官培養 48 時間後の 4µm 厚の薄切切片に anti-aquaporin 5 (1:200(PBS(-)), ab 104751) を室温、1 時間で反応、PBS(-) で 3 回洗浄、発色試薬 (シンプルステインマウス MAX-PO(R)) を室温、30 分反応、PBS(-) で 3 回洗浄、DAB 溶液 (ニチレイ) で発色した。

(10) 核内増殖抗原 (PCNA) 染色：器官培養 48 時間後の 4µm 厚の薄切切片に anti-PCNA(1:100(PBS(-)), sc-7907) を反応させ、発色試薬 (シンプルステインマウス MAX-PO(R)) を室温、30 分反応、PBS(-) で 3 回洗浄、DAB 溶液 (ニチレイ) で発色した。

(11) RT-PCR による AQP5 の半定量：アガロースゲル電気泳動で器官培養 48 時間後の各群の AQP5 の PCR 産物を分離、ゲル撮影 (Ez-Capture MG, CS Analyzer, ATTO) し、各 GAPDH とのシグナル強度を比較した。

4. 研究成果

(1) 原基の面積比



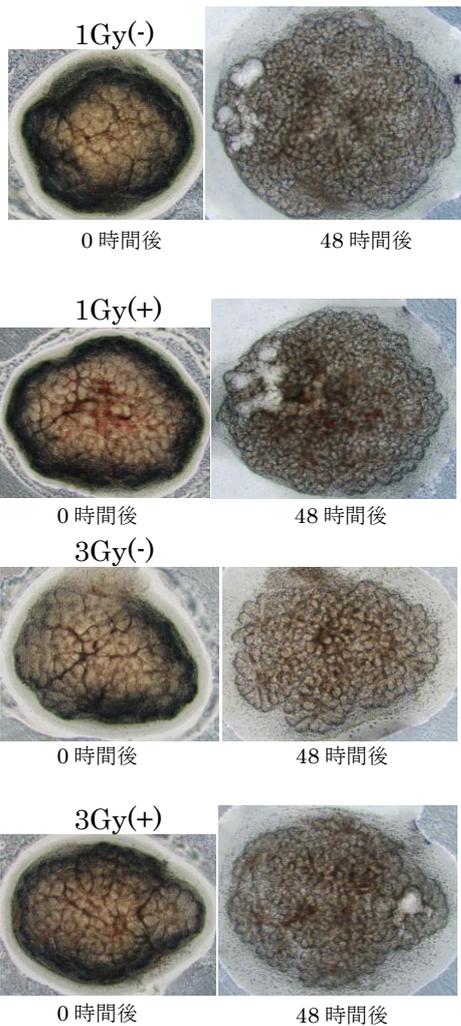


図 1 ED15.5 の培養 0 時間後、48 時間後の器官培養像

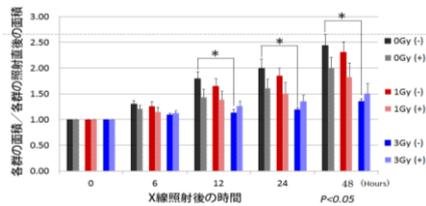


図 2 各群の照射直後の面積に対する照射時間後の面積比

各実験群の培養 0 時間後、48 時間後の実体顕微鏡像を図 1 に示した。0Gy, 1Gy, 3Gy とともに X 線照射後の培養経過時間とともに増加した。0Gy と 1Gy は各時間で有意差はなく、amifostine 投与群の方が非投与群よりも小さい傾向にあった。一方、3Gy は 0Gy と比較し培養 12 時間後、24 時間後、48 時間後で有意に小さかった。また、amifostine 投与群の方が非投与群よりも大きかった。(図 2)

(2) 上皮系組織の体積比

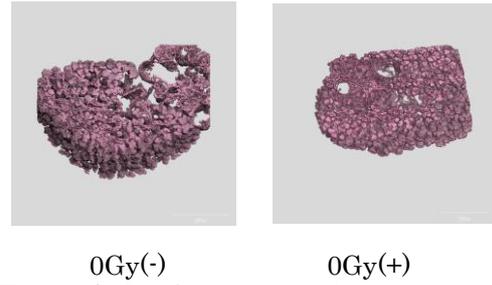


図 3 上皮系組織の 3D 再構築の一例

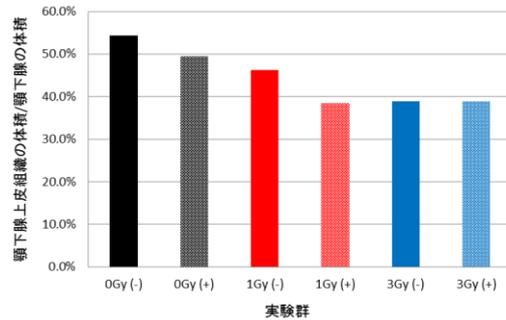
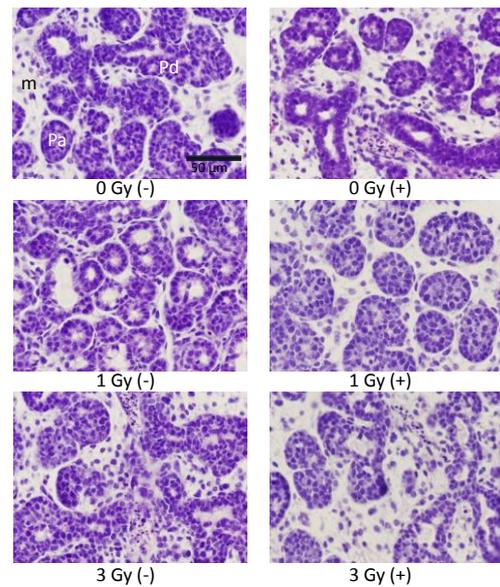


図 4 器官培養 48 時間後の顎下腺全体の体積に対する上皮組織の体積の割合

上皮組織の 3D 再構築像の一例とし 0Gy(-), 0Gy(+)を示した。(図 3) 0Gy と比較し、照射群は低値を取り、1Gy の方が 3Gy よりも低かった。0Gy, 1Gy では amifostine 投与の方が非投与より低値を示した。3Gy では投与群、非投与群は同程度の値を示した。(図 4)

(3) HE 染色像



Pa:pro-acinar (前腺房) m:mesenchyme (間葉)
Pd:presumptive duct (導管前駆体)

図 5 ED15.5 の培養 0 時間後、48 時間後の HE 染色像

0 Gy(-)と比較し0 Gy(+)は Pa, Pd ともに同様の像を呈した。1Gy(-)は Pa, Pd ともに内腔が存在したが, 1Gy(+)ではほとんどみられなかった。3Gy(-)は一部で Pa の細胞の配列の乱れが観察された。3Gy(+)では 3Gy(-)ほどの組織の変化はみられなかった。(図 5)

(4) AQP5 染色

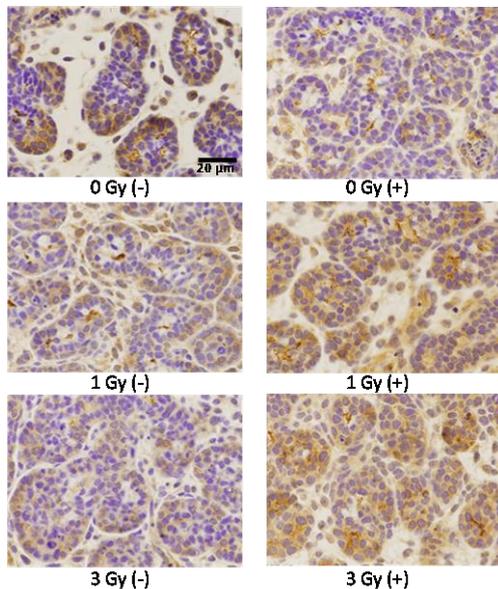


図 6 ED15.5 の培養 0 時間後, 48 時間後の AQP5 染色像

0Gy(-)と同様に 0Gy(+), 1Gy(-), 1Gy(+), 3Gy(+) は前腺房の管腔側で強発現を呈した。3Gy(-)は陽性像がほとんど観察されなかった。(図 6)

(5) PCNA 染色

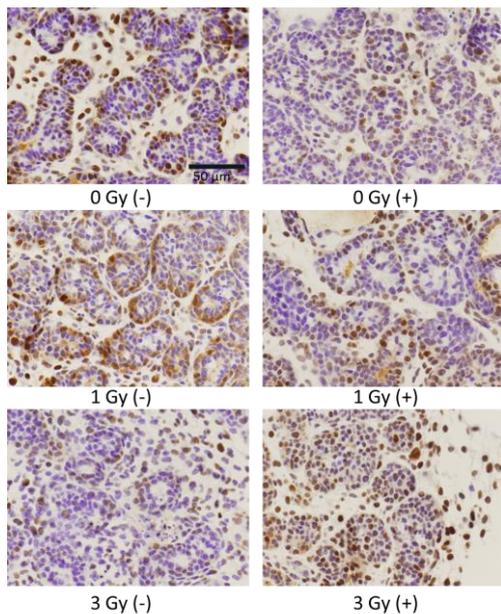


図 7 ED15.5 の培養 0 時間後, 48 時間後の PCNA 染色像

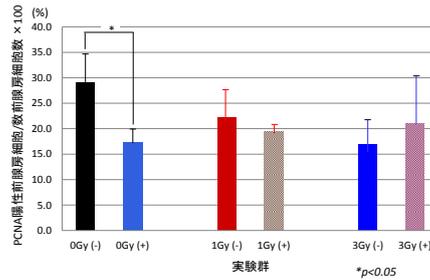


図 8 ED15.5 の培養 0 時間後, 48 時間後の PCNA 陽性の割合

1Gy(-), 3Gy(-)は 0Gy(-)と比べ線量の増加に応じて低い割合を示した。0Gy(+)は 0Gy(-)と比較して有意に低値を示し, 逆に 3Gy(+)は 3Gy(-)よりも高い値をとる傾向にあった。

(6) AQP5 の RT-PCR 解析

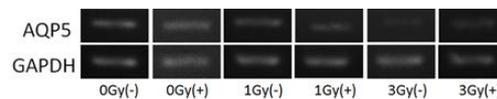


図 9 各群の PCR 産物

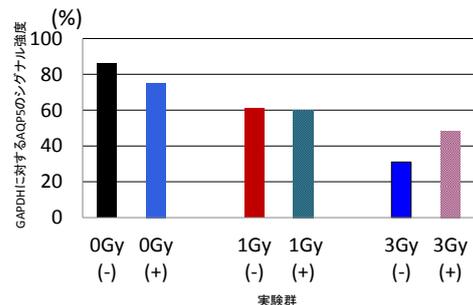


図 10 各群の GAPDH のシグナル強度に対する AQP5 のシグナル強度

AQP5 のシグナル強度は amifostine 投与群, 非投与群ともに, 0Gy 群と比較し照射群は線量の増加に伴って低値を示した。0Gy(-)と比較して 0Gy(+)で低値をとり, 逆に 3Gy(+)の方が 3Gy(-)より高い値を示した。

本研究は放射線防護剤 amifostine のマウス胎子の顎下腺に対する効果を, 成獣マウスでの amifostine の適正量とされる 100 mg/kg を腹腔内投与 30 分後, X 線照射し, 48 時間までの器官培養で検討した。その結果, amifostine 投与群は非投与群と比較し, 無照射群で胎子の唾液腺の形態, 増殖を抑制し, 3 Gy 照射群では X 線の影響を軽減した。照射後早期 (48 時間後) においても胎子顎下腺に対する amino thiol 系防護剤は有効であるが, 適量を精査する必要がある。

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 Nasu M, Nakahara T, Tominaga N, Tamaki Y, Ide Y, Tachibana T, Ishikawa H, Isolation and characterization of vascular endothelial cells derived from fetal tooth buds of miniature swine, In Vitro Cell Dev Biol Ani, 査読有 49:189-195, 2013. doi: 10.1007/s11626-013-9584-6

[学会発表] (計 2 件)

- ① 那須 優則, 中原 貴, 井出 吉昭, X 線照射されたマウスの胎仔期の顎下腺に対するアミノチオール系防護剤の効果, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山, 2013 年, 9 月 20-22 日.
- ② 那須 優則, 中原 貴, 井出 吉昭, 富永徳子, 田巻友一, 石川 博, ヒト歯肉由来血管内皮細胞の分離と同定, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岐阜, 2011 年, 10 月 1-2 日.

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

中原 貴 (NAKAHARA, Taka)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号: 1 0 3 6 6 7 6 8

(3)連携研究者

井出吉昭 (IDE, Yoshiaki)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 7 0 4 0 9 2 2 5