

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791389

研究課題名(和文)放射線照射マウス/ラットにおける酸化ストレス値上昇機序と発現遺伝子の解明

研究課題名(英文)Analyses of mechanism of the elevation of serum reactive oxidative metabolite level and expressions of related genes in an irradiated rat model

研究代表者

野宮 琢磨(Nomiya, Takuma)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・医長

研究者番号：60436201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：近年は少量の血液より体内の酸化ストレスやフリーラジカルの発生を間接的に捕らえることが可能になった。放射線の効果はフリーラジカルの発生と密接に関係していることが従来から知られ、今回はその放射線をラットに照射して酸化ストレスを計測した。

皮膚反応と血中酸化代謝物(酸化ストレス値)のレベルは反応の強さと有意に相関した。また、遺伝子群の解析ではXirp1, Nos2, Ncf1, Ncf2など明らかに増幅された遺伝子が確認された。これらの働きや相互作用、臨床的意義が今後の探求の課題である。

研究成果の概要(英文)：Recently, oxidative metabolites have been able to be measured by simple small device. Radiation used in radiotherapy causes free radicals and oxidative metabolites, and irradiation causes dermatitis and sometimes causes skin ulcer in the irradiated site. We analyzed the relationships among the value of oxidative metabolites and skin reactions and gene expressions. As a result, a significant correlation was seen between the value of oxidative metabolites and irradiation dose. And some genes (e.g. NOS2, NCF1, NCF2, etc.) were overexpressed after the irradiation. It was suggested that measuring the level of serum oxidative metabolites seems to be useful for estimating degree of skin reaction, and a part of reactions to the irradiation was revealed in the gene expression level.

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

放射線が物質に照射されると、放射線が直接物質を電離する直接作用と、水や酸素を電離することによりフリーラジカルや活性酸素を生じ、これらが周囲の物質に影響を与える間接作用の2つの反応が起こる。人体への影響もこの間接作用が多くを占めていると言われており、フリーラジカルは周囲との反応が非常に早い（マイクロ秒～ミリ秒単位）ため直接補足することは非常に困難である。しかし近年はフリーラジカルや活性酸素の反応物で寿命の長い物質を計測することで発生フリーラジカルの量を近似的に定量することが可能となった。

2. 研究の目的

人の組織は80%が水分で構成されており、主な放射線障害は水分子に由来するOH, H₂O₂, H₂Oなどのフリーラジカルによって引き起こされ、酸素存在下では、HO₂, O₂といったラジカルを生成する(Cohen GM, 1987; Teebor GW, 1988)。発生したフリーラジカルによりDNA, RNA, 蛋白質、細胞膜に障害が生じ、損傷や細胞死がもたらされる。

この反応は癌細胞だけではなく正常細胞にも起こり、放射線治療を行う上では有害な事象の一つとなっている。特に頭頸部領域のがんに対する放射線治療では、照射野が広範になり皮膚炎や粘膜炎がほぼ必発である。これらの障害が患者の苦痛の一因となり評価と対策が大きな課題となっている(Chang VT, 2003; Palazzi M, 2007)。

フリーラジカル測定値はパラメトリックな連続変数であり、これまでの皮膚などの主観的グレード分類より客観的評価分類を定義しやすいと考えられる。この関連性を検討し、客観的評価方法を確立する事と、その延長としてフリーラジカル除去剤の開発・有効性の検証・臨床への応用が当研究の最終到達点である。

3. 研究の方法

(1) フリーラジカル計測法

1-1. 測定法の概要:

生体における酸化還元作用を計測する方法は電子スピン共鳴(ESR)などが代表的方法として挙げられる。しかしながら、これらは煩雑で大掛かりな装置を必要とし、施設の整った環境でしか計測できなかった。これに対する簡便な方法としてフェントン反応を利

用した活性酸素代謝物(ROMs: reactive oxygen metabolites)測定法が開発された。

フリーラジカルは様々な種類があるが、生体での直接測定は非常に困難である。そのため測定は体内のフリーラジカルを直接分析するものではなく、活性酸素やフリーラジカルにより損傷(酸化反応)を受けた脂質・蛋白質・核酸を計測する事により予想されるフリーラジカル量を定量する。活性酸素やフリーラジカルに酸化反応を受けた脂質・蛋白質・核酸のマーカーとなるものとして、ヒドロペルオキシドを定量する(Ritov VB, 1996; Devamanoharan PS, 1996)。

(2) 動物実験における検討

皮膚に放射線皮膚障害を発生させる程度の高線量を照射することにより放射線皮膚障害モデルのマウス(またはラット)を作成する。このときの照射線量、皮膚障害のグレード、フリーラジカル測定値を計測し、これらの間に相関があるかどうかを解析する。皮膚反応のグレードは過去の放射線照射による皮膚障害を検討した実験報告に基づいて行う。照射線量は低線量、中間線量、高線量の3群程度に分けて照射を行い、一群当たりのマウス(またはラット)の数は4~8匹として比較解析を行う。

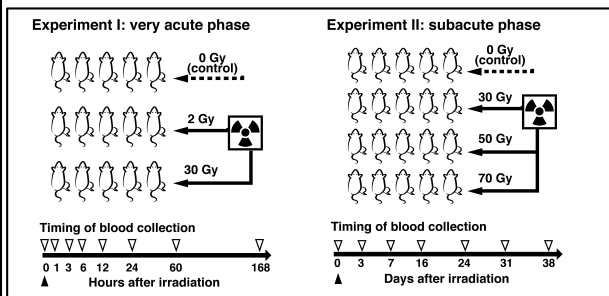


図1. ラットに対する照射線量と計測日程

(3)

リアルタイム RT-PCR 法による照射後の遺伝子発現量の変化の検出

照射後のラット右大腿皮膚を採取し、液体窒素により凍結保存する。この検体を粉碎し、Total RNA を組織より抽出する。このRNA を鋳型として逆転写酵素により cDNA を得る。これを PCR 法による遺伝子増幅によって遺伝子変化量を検出する。96well プレートを用いて行い、解析対象の遺伝子群は Oxidative Stress and Antioxidant Defence (Filgen PARN-065)とした。解析対象は非照射のラッ

トの右大腿皮膚を Control として、70Gy を照射したラットの0日後、3日後、16日後の皮膚を Test 検体として発現遺伝子増幅を数値化した。

4. 研究成果

各群ラットに対する放射線照射後の皮膚障害の変化と時間の変化を図2に示す。皮膚障害の各群の[照射前/Day3/Day7/Day16/Day24/Day31/Day38]の平均グレードは、30Gy 群で [0/0/0/0.8/1.0/1.4/1.4/1.5/1.2/1]、50Gy 群で [0/0/0/1.1/1.6/3.2/3.0/2.5/ 2.5/2.0]、70Gy 群で [0/0/0/2.9/3.4/3.8/3.5/3.3/3.0/2.0]であった。障害グレードは放射線照射量に応じて70Gy 群、50Gy 群、30Gy 群の順により重度の皮膚障害が発生する傾向が見られ、群間に有意差が見られた ($p < 0.001$)。どの群でも放射線照射後16日目から障害が出現し始め、24-31日目にかけて皮膚障害のピークが見られた。

次に各群のラットに対する放射線照射後の酸化反応物の測定値と時間の変化を図2に示す。各時点[照射前/Day3/Day7/Day16/Day24/Day31/Day38]での平均測定値は0Gy 群で [299.2/412/368.4/373.4/ 347.6/364.8/340]、30Gy 群で [271/443/ 365.6/433.6/374.2/ 391.6/377.6]、50Gy 群で [371.4/498.6/ 452/530/497.7/ 468.7/ 395.5]、70Gy 群は [313.4/498.6/426/548.4/484.2/455/387]であった。

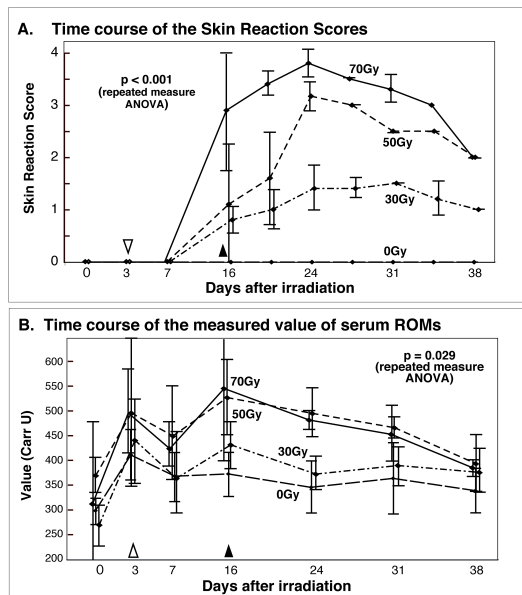


図2.皮膚反応と酸化ストレス値の関係

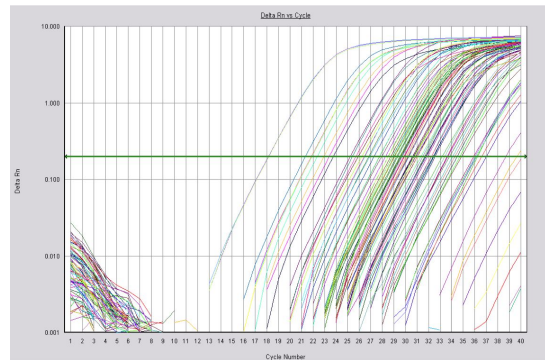


図3.リアルタイム RT-PCR の結果

図のようにリアルタイム RT-PCR では遺伝子発現に明瞭な差が見られた。

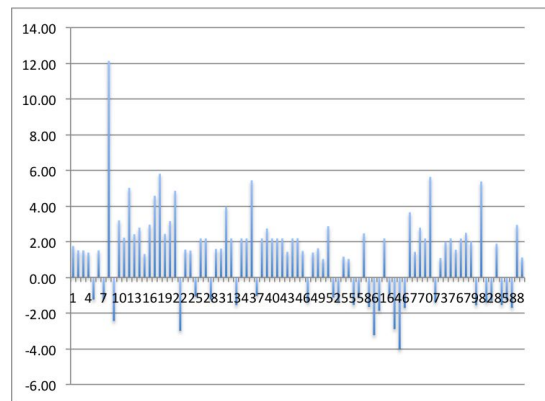


図4. Control 群と照射群の遺伝子発現量

最初に行った Control 群と 70Gy 照射後 0 日のラット皮膚の比較では遺伝子発現は図4のようになった(横軸:遺伝子割当て番号、縦軸:変化倍率)。この時点では Xirp1 (Xin actin-binding repeat containing 1) という遺伝子発現が約 12 倍に増加していた。

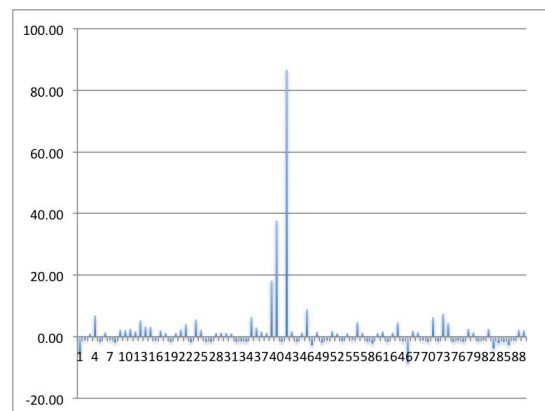


図5. 遺伝子発現量の比較(16日後)

これに対して 70Gy 照射後 16 日目の遺伝子変化量は図5のようになった。この結果では

最も発現増加していた遺伝子はNos2 (Nitric oxide synthase 2, inducible)が約 86 倍、Ncf2 (Neutrophil cytosolic factor 2), Ncf1 が各々約 38 倍、約 18 倍に増幅しており、3 倍以上に増幅した遺伝子がこれらを含め 11 種類観察された。NO 自身はフリーラジカルの一種であるが、スーパーオキシドを消去する際に産生される事がある。この反応は組織中に生じたラジカルに対する防護反応である可能性が高い。

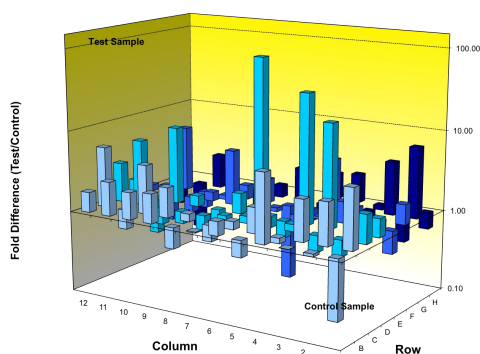


図 6 . 各遺伝子群の増幅率 (3D グラフ)

今回の実験では放射線被曝に対する皮膚反応として活性酸素種 (Reactive Oxygen Species)が増加することが示された。これまで d-ROMs テストはヒトの喫煙や糖尿病などで上昇することが報告されていたがヒトの放射線被曝後の変化の報告はまだ無いが今回の実験結果を学術雑誌に掲載する事ができた (Nomiya T et al, Free Radic Res 2014)。遺伝子発現に関しては現在解析中であるが、照射群と非照射群で明らかに発現に変化が生じていた。また、照射直後と 16 日後でも明らかな発現遺伝子の違いが観察された。各遺伝子の複雑な相互作用と放射線障害発現のメカニズムの解析が今後の研究の中心になると考えられる。ヒトを含む哺乳動物の放射線に対する反応は定量可能になると考えられる。また、酸化ストレス値により組織の損傷を指標化できれば線量の調節やラジカルの中和剤投与など治療適応の選択指標へも応用できる可能性があると考えられる。

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)

Nomiya T, Kaneko T, Goto J, Harada M,

Akamatsu H, Hagiwara Y, Ota I, Nemoto K. Relationship between Serum Reactive Oxidative Metabolite Level and Skin Reaction in an Irradiated Rat Model. Free Radic Res. 2014 May;48(5):572-9. (Impact factor=3.279; 2012)

[学会発表](計 1 件)

Nomiya T, Kaneko T, Goto J, Harada M, Akamatsu H, Ota I, Hagiwara Y, Kamada T, Nemoto K. Relationship between the quantity of serum reactive oxygen metabolites and skin toxicity grade in the irradiated rat model. The 17thECCO-38thESMO-32thESTRO. Sep. 27-Oct. 1, 2013, Amsterdam

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野宮 琢磨 (NOMIYA TAKUMA)

放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・医長

研究者番号: 60436201

研究協力者

根本 建二 (NEMOTO KENJI)

山形大学・医学部医学系研究科・教授

金子 崇 (KANEKO TAKASHI)

山形大学・医学部医学科

後藤 準 (GOTO JUN)

山形大学・医学部医学科