

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462932

研究課題名(和文)放射線による唾液腺障害に対するD体メチオニンの防護機構の解明

研究課題名(英文)D-methionine as a protector for irradiation-induced xerostomia

研究代表者

吉川 正信 (YOSHIKAWA, Masanobu)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90276791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット唾液腺中に複数のD-アミノ酸(D-Ser、D-Ala、D-Asp)が存在すること、および光学異性化酵素であるセリンラセマーゼと、D-アミノ酸分解酵素であるD-アミノ酸酸化酵素(DAO: D-Amino acid Oxidase)のmRNAがそれぞれ大脳皮質と小脳と同程度に発現していることを明らかにした。さらに、DAO欠損マウスは野生型に比べてピロカルピン刺激時の唾液分泌レベルが2～3倍高いこと、経口投与されたD-Serが野生型マウスの唾液分泌量を亢進することを明らかにした。唾液腺にはD-Serがコアゴニストとして結合するNMDA型グルタミン酸受容体サブユニットの発現がみとめられた。

研究成果の概要(英文)：Squamous cell cancers in head and neck are known to be sensitive to irradiation. Patients may have oral-sequelae to radiation include mucositis and salivary glands dysfunction. Some groups have shown protective effects of D-methionine, the dextro-isomer of the common amino acid L-methionine, against oxidative stress. To evaluate if D-methionine can prevent oral mucositis and salivary glands dysfunction resulting from x-ray irradiation or carbon ion beam during treatment for the head and neck cancers. D-methionine can prevent irradiation-induced oral mucositis or salivary glands dysfunction in mice and may be useful clinically to prevent such oral mucositis or xerostomia in head and neck cancer patients.

研究分野：薬理学

キーワード：Dアミノ酸 放射線 唾液腺機能障害 防護薬 唾液分泌

1. 研究開始当初の背景

1) **L 体アミノ酸は放射線防護薬として十分な効果が得られない**

含硫アミノ酸を使った放射線防護剤研究は長い歴史を持つ。半世紀以上前にチオールを有する含硫アミノ酸のシステアミンやアミノホスチンが開発された。しかし、いずれも強い有害作用があり、広く放射線防護剤として臨床で使われるには至っていない。L 体メチオニン¹は含硫アミノ酸の一つで、生体内ではメチル基供与体として重要な役割を担う必須アミノ酸である。L 体メチオニンはフリーラジカールスカベンジャーとして活性酸素種を中和するとともに、生体内抗酸化物質である還元型グルタチオン(GSH)の合成基質として GSH の生合成を亢進する。1970 年代 L 体メチオニンを放射線防護薬とする試みが行われたが、効果が得られなかった。

2) **D 体メチオニンは放射線照射による唾液腺機能障害・口腔粘膜障害を防護する**

アミノ酸には光学異性体の D 体と L 体がある。ほ乳類の D 体アミノ酸は L 体アミノ酸に比べて存在量が極めて少ない。D 体アミノ酸は L 体アミノ酸とは異なる代謝過程を有し、増強した生物学的利用能を持つことが知られている。申請者は米国 National Institute of Health (NIH)/National Institute of Dental and Craniofacial Research(NIDCR)において C3H/Ne マウスに D 体あるいは L 体メチオニンを経口投与後、X 線 8Gy を 5 日間分割照射した結果、L 体メチオニン投与群では舌の潰瘍を抑制しなかったが、D 体メチオニン投与群においてのみ有意に舌の潰瘍を抑制することを明らかにした (Cotrim, Yoshikawa, et al, Int.J. Rad. Oncol. Biol. Physics, 2012)。

3) **L 体メチオニンは唾液腺および口腔粘膜に生理的集積する**

¹⁴C 標識 L 体メチオニンをを用いたヒトの PET/CT 像において L 体メチオニンは口腔粘膜および唾液腺に生理的に集積することが知られている。

4) **D 体メチオニンの代謝**

(D 体メチオニン L 体メチオニン)

D 体メチオニンは D アミノ酸酸化酵素(DAO)により ケト酸を経由して L 体メチオニンに代謝される。また、腫瘍細胞では DAO 活性が極めて低いことが報告されている。従って、大量に D 体メチオニンを投与した場合でも腫瘍の増殖を促進しないと考えられる。

以上の先行研究から、申請者は D 体アミノ酸の特異的な代謝系が D 体メチオニンに特異的な防護効果を与えているのではないかとの仮説に至った。すなわち、L 体メチオニンに比べて D 体メチオニンは生物学的半減期、滞留時間が長いことなどがその効果を増強していると考えた。しかし、現時点では、唾液腺での D 体メチオニンの動態、ならびに放

射線照射による唾液腺機能障害の発現機構との関連については不明である。

2. 研究の目的

放射線は頭頸部癌治療に広く用いられるが口腔乾燥症と口腔粘膜障害が高頻度に発生するため患者 QOL を低下させる。アミノホスチンなどの L 体含硫アミノ酸は防護薬として古くから開発されてきたが、有害作用が強いため臨床ではほとんど使用されない。申請者はこれまでに D 体メチオニンが放射線照射による口腔粘膜障害に防護効果を持ち L 体含硫アミノ酸にみられる有害作用が無いことを明らかにした。D 体アミノ酸は L 体アミノ酸とは異なる代謝過程を持つことが知られている。本研究計画では放射線による D アミノ酸代謝関連遺伝子変異動物を用いて D 体メチオニンの放射線防護効果の機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) DAAO 欠損マウスの放射線照射による唾液腺機能障害と生理的、生化学的解析

DAAO 欠損マウスに D 体メチオニンを経口投与後に、頭頸部に動物研究用 X 線照射装置(MRB-1520R3, 日立製作所, 150kV, 20mA)頭頸部および腫瘍移植部位に分割照射(6 Gy/day, Total 30Gy)あるいは単回照射(15 Gy)する。初回 X 線照射から 21 日後に Pirocarpine(50mg/kg)刺激による唾液を回収し唾液腺機能の評価解析を行う。唾液腺を摘出し、顕微鏡下で組織学的に解析する。D 体メチオニンは通常生体内(唾液腺)では存在しないことを予備実験で確認している。D 体メチオニンの検出は申請者が考案した HPLC 法で行う。すなわち、唾液腺を摘出しアミノ酸をトリクロロ酢酸で抽出し、OPA 試薬などにより蛍光誘導体化反応を行う。Nova-Pak C18 (3.9 mm i.d. X 300 mm : Waters 社)により D 体、L 体アミノ酸を分離し、検出には 530 nm の蛍光発光(励起波長 470 nm)を用いる。また、D 体メチオニン投与後の唾液腺における活性酸素種(ヒドロキシラジカル、一重項酸素、過酸化水素)に対する抗酸化能を L-バンド ESR 分光装置(JES FA200, 日本光電)により不均衡化反応速度定数を解析し、抗酸化能を評価する。

2) DAAO ノックダウンマウスの放射線照射による唾液腺機能障害と生理的、生化学的解析

耳下腺に DAAO siRNA とナノバブルリポソームを逆行性に注入し、ソノポレーション(Sonitron 2000V; 1MHz, 0.5-4.0W cm⁻²; Exposure time 2 min, Duty cycle 50%)により siRNA を細胞内に導入し、DAAO ノックダウンマウスを作出する。条件は、予備実験により決定済みである。本モデルマウスに放射線照射した後に 2)と同様に D-,L-メチオニン代謝関連、酸化ストレスの関連分子群への影響、唾液腺機能解析を行う。

4. 研究成果

1) ラット 3 大唾液腺におけるアミノ酸プロファイル

ラットの大唾液腺には複数の D-アミノ酸 (D-Ala、D-Asp、D-Ser) が存在することを明らかにした。

2) D-アミノ酸関連遺伝子発現

光学異性化酵素 (Serine racemase; Srr) や代謝 (DAO) に関与する酵素の遺伝子発現がそれぞれ大脳皮質と小脳と同程度に認められること、および NMDA 受容体サブユニット (NR1, NR2D) が大脳と同程度に発現していることを明らかにした。

3) 放射線照射による唾液腺障害モデル野生型マウスを用いた実験

C3H/HeN 系雌性マウスに x 線あるいは重粒子線を照射した唾液腺障害モデルを用いて、D-メチオニンが唾液分泌障害を防護することを明らかにした。

4) DAO 欠損マウス

DAO 欠損マウスは野生型に比べて副交感神経刺激時の唾液分泌レベルが 2 ~ 3 倍高いこと、経口投与された D-Ser が野生型マウスの唾液分泌量を亢進した。

5) 正常ラット顎下腺に灌流実験

唾液腺には D-Ser がコアゴニストとして結合する NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットの発現も確認されており、D-Ser を L-グルタミン酸とともに正常ラット顎下腺に灌流すると唾液分泌促進効果が観察された。

6) D-メチオニンの抗酸化能、還元能

ヒドロキシラジカルに対する D-メチオニン (9.24×10^{-9} L/mol/sec) および L-メチオニン (1.34×10^{-10} L/mol/sec) の抗酸化能 (OH cancelation) は DMSO に比べてやや大きい程度であり、還元能 (decay constant) は小さかった。D-Met と L-Met との間に差がないことから、放射線による障害からの防護効果は抗酸化能、還元能以外の機序であると考得られた。

<引用文献>

Cotrim P. A*, Yoshikawa M*, Sunshine N. A, Zheng C, Sowers L. A, Thetford D. A, Cook J. A, Mitchell B. J, Baum J. B. Pharmacological protection from radiation- and chemoradiation-induced oral mucositis. International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics 2012, 83 (4), 1284-1290, *These authors contributed equally to this work.

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9件)

1. Irie M, Yoshikawa M, Ono R, Iwafune H,

Furuse T, Yamada I, Wakana S, Yamashita Y, Abe T, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Cognitive function related to the Sirh11/Zcchc16 gene acquired from an LTR retrotransposon in eutherians. PLoS Genet. 2015, 11(9): e1005521. 査読有

2. Ajimi J, Yoshikawa M, Takahashi S, Miura M, Tsukamoto H, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of three peptidase inhibitors on antinociceptive potential and toxicity with intracerebroventricular administration of dynorphin A (1-17) or (1-13) in rat. J. Anesthesia 2014, 29(1), 65-77. 査読有

3. Shinomiya T, Kawaguchi M, Okubo M, Kosuge Y, Yoshikawa M. mRNA Expression and localization of LPS-induced beta-defensin isoforms in rat salivary glands. Bul. Tokyo Den. Coll. 2014, 55(3), 139-147. 査読有

4. Murata T, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Potentiation of [Met5]enkephalin-induced antinociception by mixture of three peptidase inhibitors in rat. J. Anesthesia 2014, 28(5), 708-715. 査読有

5. Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M, Jin X.L., Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of d-serine on formalin-induced pain. J. Anesthesia 2014, 28(2), 228-234. 査読有

6. Takeyama K, Sakamoto R, Yoshikawa M, Suzuki T. A case of Wenckebach-type atrioventricular block caused by administration of indigo carmine. Tokai J Exp Clin Med 2014, 39 (1), 10-13. 査読有

7. Miura, M, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Ajimi J, Ito K, Ito M, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Increase in antinociceptive effect of [Leu5]enkephalin after intrathecal administration of mixture of three peptidase inhibitors. Tokai J Exp Clin Med 2013, 38 (2), 62-70. 査読有

8. Okubo M, Yoshikawa M, Shinomiya T, Kawaguchi M. Methamphetamine-withdrawal stress activates PACAP-DBI pathway in rat salivary gland, resulting in inhibition of salivary secretion. Tokai J Exp Clin Med 2013, 38 (2), 55-61. 査読有

9. 吉川正信. 放射線防護薬としての D 体アミノ酸の可能性. Folia Pharmacologica Japonica. 2013, 141 (6), 310-313. 査読無

[学会発表](計5件)

1. Masanobu Yoshikawa, Chieko Murayama, Ana P. Cotrim, Ryuichi Hirayama, Hideo Tsukada, Yoshiya Furusawa, Bruce J.

- Baum. D-METHIONINE AS A PROTECTOR FOR IRRADIATION-INDUCED ORAL MUCOSITIS OR SALIVARY GLANDS HYPOFUNCTION. The 2nd International Conference of D-amino Acid Research. 2014年9月3日 栃木県宇都宮市栃木県文化センター
2. Masanobu Yoshikawa, Migiwa Okubo, Yurika Miyoshi, Kenji Hamase, Ryuichi Konno, Mitsuru Kawaguchi. D-AMINO ACID AS A PROMOTER FOR SALIVATION. The 2nd International Conference of D-amino Acid Research. 2014年9月2日 栃木県宇都宮市栃木県文化センター
 3. 吉川正信、大久保みぎわ、三次百合香、濱瀬健司、村山千恵子、金野柳一、小林広幸、川口充. D-アミノ酸と唾液腺. 第87回日本薬理学会年会. 2014年3月19日 宮城県仙台市東北大学
 4. 四宮敬史、吉川正信、川口充、重村重年、大久保みぎわ. 放射線粘膜炎に対するDMX シートの効果. 第55回歯科基礎医学会. 2013年9月13日 岡山県岡山市岡山コンベンションセンター
 5. 吉川正信、大久保みぎわ、三次百合香、濱瀬健司、金野柳一、川口充. D-アミノ酸と唾液分泌. D-アミノ酸研究会第9回学術講演会. 2013年9月5日 大阪府吹田市関西大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 正信 (YOSHIKAWA, Masanobu)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：90276791