

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861032

研究課題名(和文) TrkB受容体を標的とする放射線障害治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach targeting TrkB receptor against radiation injure

研究代表者

富山 健一 (Tomiya, Ken-ichi)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・博士研究員

研究者番号：20584064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体が放射線で被ばくした場合、その線量に応じて造血系細胞そして腸管系(特に小腸)に重篤な障害をきたし最悪死に至るが、その根本的な治療法は確立されていない。近年、間葉系幹細胞(MSC)は、再生医療の細胞ソースとして様々な疾患応用に向けて研究が進められ、放射線障害モデルにおいても治療効果が報告されている。本研究では、MSCの分泌因子の一つBDNFが放射線を照射したラット小腸上皮細胞(IEC-6)の細胞死を抑制することを明らかにした。また、BDNFをノックダウンしたMSCにおいては、その治療効果が減弱することから、MSCの放射線防護効果の一つにBDNFが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Here, we demonstrate that brain-derived neurotrophic factor (BDNF), an endogenous ligand for tyrosine kinase B (TrkB) receptor, protect IEC-6 cells against gamma ()-irradiation damage. IEC-6 was exposed with 4Gy of -irradiation and then challenged BDNF treatment. After 24 hours, -irradiation-induced cell death of IEC-6 and expression of cleaved caspase-3 were decreased. Further examination shows that BDNF suppresses apoptosis of IEC-6 induced by irradiation damage through an increase of Bcl-2/Bax ratio. BDNF significantly enhanced the phosphorylation of Akt and ERK1/2 proteins by subsequent to irradiation and ameliorated the expression of Bcl-2 protein. These data also indicates that PI3K/AKT and/or ERK1/2 pathway activated by BDNF plays important role for IEC-6 survival after -irradiation. Therefore, BDNF may be therapeutically useful to attenuate the intestinal injury caused by radiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：radiation injure BDNF IEC-6 MSC

1. 研究開始当初の背景

生体が放射線で被ばくした場合、その線量に応じて造血系細胞そして腸管系(特に小腸)に重篤な障害をきたし最悪死に至る。現在医療技術の進歩とともに、造血系細胞の障害においては骨髄移植および補助的に造血刺激因子等の併用が非常に効果的であることがわかってきた。また、血管再生治療の実用化も進められている。しかしながら、腸管障害においては根本的な治療法は確立されていない。近年、間葉系幹細胞(MSC)は、再生医療の細胞ソースとして様々な疾患応用に向けて研究が進められている。放射線障害モデルにおいてMSCは、障害に対する治療効果が報告されており、多くの疾患モデルでは、MSC移植による組織再生促進効果はMSCに由来するパラクリン因子によるものであると報告されている。最近申請者は、MSCの分泌因子の中の一つ **Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)**が放射線を照射した**ラット小腸上皮細胞(IEC-6)**の細胞死を抑制することを明らかにした。BDNFは、神経細胞の保護・成長・神経回路の形成・シナプスの可塑性を調節する液性タンパク質であり、チロシンキナーゼ活性を有する**特異的受容体 TrkB**と結合する。また、TrkB受容体アゴニスト **7,8-Dihydroxyflavone** および **LM22A4**についてもBDNFと同様に神経細胞の細胞死を抑制することも知られている。したがって、TrkB受容体を標的とする薬物は、放射線からの防護効果が期待できるシードとしての可能性がある。

2. 研究の目的

被ばくによって障害された細胞におけるBDNFの細胞保護効果についてはこれまでに報告がなく、本研究ではBDNFおよびTrkB受容体アゴニストを用いて *in vitro* または *in vivo* の系によるBDNFの細胞保護機序解析ならびに他のTrkB受容体アゴニストの放射線による細胞死の抑制効果を明らかにすることで、TrkB受容体作用薬が高線量被ばく障害治療への応用に発展することを目的とする。また、再生医療の観点から間葉系幹細胞(MSC)移植による放射線障害治療モデルが検討されており、MSCが分泌するBDNFによる治療効果についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ヒトリコンビナントBDNFならびにMSCの共培養系による放射線照射後のIEC-6の細胞の生存率は、トリパンブルー染色で測定した。細胞周期への影響は、PI染色によるフローサイトメーター解析を行った。またアポトーシスの指標として、Annexin-V/PI染色法によるフローサイトメーター解析および caspase-3 活性化についてウエスタンブロット法を用いて解析した。

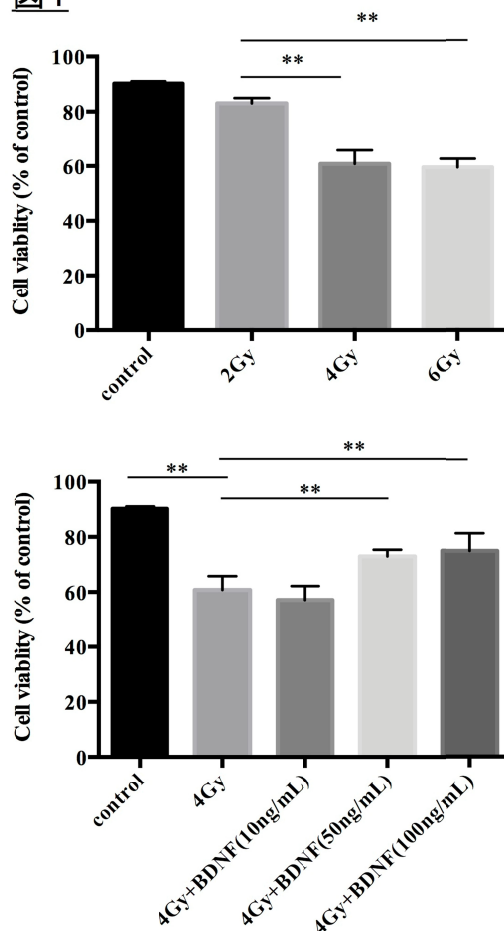
薬理的評価として、TrkB受容体 inhibitorの影響も解析する。BDNFによる放射線防護効果の発現機序については p38、JNK、ERK および AKT カスケードについてウエスタンブロットングによる解析を行った。アポトーシス抑制機序として Bcl-2 および Bax 発現の比をウエスタンブロットングで解析した。

(2) *in vivo* 実験として、BDNF および BDNF を over-expression または ノックダウンした MSC の投与による被ばくマウスの臓器損傷に対する治療効果を調べた。マウスの放射線による腸管障害モデルの作成を行った。マウスの下腹部に X 線を 15Gy 照射して、3.5 日目に解剖し、消化器系組織のうち主に小腸の病理所見をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色で行い、柔毛の長さ、クリプトの数を測定した。クリプトにおけるアポトーシスの検出は、TUNEL 染色で行った。またクリプト内の腸管幹細胞の増殖は EdU 陽性細胞を評価した。

4. 研究成果

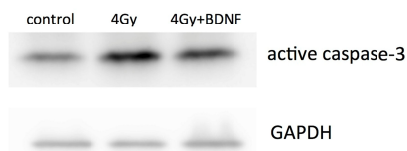
(1)放射線照射を行った IEC-6 は、ヒトリコンビナントBDNF処置によって放射線による細胞死が有意に抑制された(図1)。また、アポ

図1



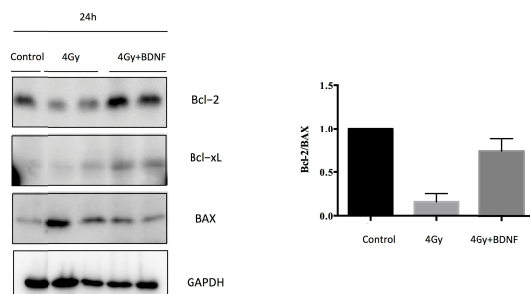
トーシスにみられる active caspase-3 の発現量も BDNF の処置によって減少した(図2)。

図2



IEC-6 の細胞内では BDNF の処置によって細胞の生存に関与すると考えられている AKT や ERK のリン酸化が認められ、Bcl-2 の発現の増加、Bax の減少も明らかになった(図3)。一方で、p38 や JNK といったストレスによって起こるカスケードの抑制効果は認められなかった。したがって、BDNF は AKT および ERK の活性化によってアポトーシスを抑制していると考えられた。TrkB 受容体のアゴニストである 7,8-Dihydroxyflavone および LM22A4 についても BDNF と同様に放射線からの細胞死を抑制した。また、MSC と IEC-6 の共培養は、IEC-6 における放射線からの細胞死を抑制し、MSC における BDNF のノックダウンによって IEC-6 の細胞死抑制効率に減少傾向が認められた。この結果から、放射線によって障害された細胞の細胞死抑制機序として、MSC が分泌する BDNF は重要な働きを担っていることが明らかになった。

図3



(2)マウスの放射線腸管障害は、マウス上半身を鉛で保護し、下腹部に X 線を 15Gy 照射するモデルを確立した。本モデルでは、小腸の柔毛の長さの減少、クリプト構造の崩壊、TUNEL 陽性細胞の増加、腸管幹細胞の減少が認められている。本障害モデルマウスにおいて MSC の投与は、柔毛の長さの回復、TUNEL 陽性細胞の減少、クリプト構造の維持および EdU 陽性細胞の増加が認められた。BDNF をノックダウンした MSC の投与では、放射線による腸管障害の回復に減少が認められた。

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)

Obara C, Tomiyama K, Takizawa K, Islam R,

Yasuda Y, Gotoh T, Tajima K. Characteristics of three-dimensional prospectively isolated mouse bone marrow mesenchymal stem/stromal cell aggregates on nanoculture plates. *Cell Tissue Res.* 2016 Apr 21. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計1件)

Tomiyama K, Hazawa M, Saotome-Nakamura A, Obara C, Rafiqul Islam, Takizawa K, Gotoh T, Yasuda T, Tajima K. Cell protection signaling pathway of brain-derived neurotrophic factor against γ -irradiation induced cell death in rat intestinal epithelial cells (IEC-6), 15th International Congress of Radiation Research. May 25-29, 2015. Kyoto, Japan.

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

富山 健一 (Tomiyama, Keni-ichi)
国立研究開発法人放射線医学総合研究所
緊急被ばく医療研究センター・博士研究員
研究者番号： 20584064

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

小原 千寿香 (Obara, Chizuka)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所
緊急被ばく医療研究センター・研究員

研究者番号：90415977