

論文の内容の要旨

論文題目 エダラボンによる放射線感受性の修飾

指導教員 中川恵一 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

笹野仲史

研究の背景

癌の放射線治療においては、正常組織への副作用が問題になる場合があり、正常組織の副作用を減らしつつ、腫瘍組織の治療効率を上げることができるよう様々な工夫がなされている。その一つ的手段として、放射線防護剤により正常組織の放射線感受性を低下させるか、放射線増感剤により腫瘍組織の放射線感受性を増加させることが考えられている。

エダラボンは、臨床的に脳梗塞の治療薬として広く用いられている薬剤であるが、フリーラジカルスカベンジャーとしても知られており、放射線防護に有効である可能性がある。

実際に、マウスの $LD_{50/30}$ が減少し、エダラボンに放射線防護効果があることを示した報告があるが、詳細な分子機構などは解明されていない。今回の実験では、エダラボン投与

が放射線感受性に与える影響を *in vitro* で研究し、エダラボンが放射線防護剤などとして臨床使用できるための手助けになればよいと考えた。

材料と方法

細胞はヒト T 細胞白血病細胞株 MOLT-4、ヒト前 B 細胞白血病細胞株 Nalm-6、ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 を用いた。MOLT-4、Nalm-6 は 5%FBS (fetal bovine serum) と抗生物質を含む RPMI-1640 を培地として、37°C で 5%CO₂ と 95%空気の混合気体の中で培養した。HepG2 は 5% FBS と抗生物質を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium を培地として、37°C で 5%CO₂ と 95%空気の混合気体の中で培養した。

エダラボンは田辺三菱製薬株式会社（東京）から原末を提供され、pH 約 8.8、30 mg/ml の濃度になるように調製したものをを用いた。細胞死の判定に色素排除試験を用いた。アポトーシスの判定に Annexin V-PI 染色を用いた。細胞内 ROS の測定を CM-H₂-DCFDA (chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) のキットを用いて行った。アポトーシス関連分子、(p53、カスパーゼ 3、カスパーゼ 7、p21^{WAF1}、PUMA、Bcl-2) の発現量やリン酸化状態について、ウエスタンブロット法で調べた。アポトーシスに伴う DNA 断片化の解析を、電気泳動法を用いて行った。アポトーシスへの p53 の関与を調べるために、short hairpin type の p53 を過剰発現させた MOLT-4 細胞(p53 ノックダウン MOLT-4)を用いた。P53 結合ドメインをルシフェラーゼに結合させたプロモーター解析用ベクターを用

いて、p53 の転写活性を調べた。

結果

まずは、エダラボンの細胞毒性を色素排除試験で調べたところ、3 mg/ml 以下までの濃度のエダラボンを投与した時には、細胞の生存率は 60%以上であり、エダラボンの毒性は実験する上で許容範囲内の毒性であると考えた。しかし、濃度を 6 mg/ml まで上げると、細胞の生存率は 30%以下に低下し、毒性が強すぎると判断された。よって、以下の実験はすべて 3 mg/ml 以下の濃度のエダラボンを用いて行った。

エダラボンを放射線照射 5 分前に MOLT-4 に投与し、その後 2 Gy の X 線を照射し、20 時間後に細胞の生存率を調べたところ、エダラボンの濃度が 2.7, 3 mg/ml の時は、エダラボンを投与しない時に比べて細胞の生存率が有意に改善し($p < 0.05$)、エダラボンの放射線防護効果による結果と考えられた。逆に、エダラボンの濃度が 0.15, 0.75, 1.5 mg/ml の時は、細胞の生存率が有意に低下し($p < 0.05$)、エダラボンの放射線増感効果によると考えられた。この放射線増感効果は、エダラボンの細胞毒性を考えても、エダラボンと放射線の効果の単純な足し算よりは高い効果があると思われた。

まずは、放射線防護効果について詳しく調べるために、エダラボン濃度を 3 mg/ml として実験を続けた。X 線線量を 2 Gy から 5 Gy に上げても、同様の放射線防護効果が見られた ($p < 0.05$)。また、照射の 20 時間後だけでなく、8-20 時間後の間でいずれも放射線防護効果が

認められた($p < 0.05$)。

Annexin V-PI 染色を行ったところ、Annexin V(-)PI(-)の細胞（アポトーシスを起こさず生存していると考えられる細胞）は、照射単独に比べ、照射前にエダラボンを投与することにより著明に改善した($p < 0.05$)。この結果から、エダラボンは X 線によるアポトーシスを抑制していることが分かった。

CM-H₂-DCFDA により、X 線治療におけるエダラボンによる ROS の変化を調べたところ、照射前にエダラボンを投与することにより、ROS が有意に抑えられることが分かった ($p < 0.05$)。

X 線照射により、p53 の蓄積、リン酸化、その標的分子である p21^{WAF1}、PUMA のいずれも照射単独では増加がみられたが、エダラボン投与により増え方が抑制されていた。また、カスパーゼ 3、カスパーゼ 7 も照射単独では増加していたが、エダラボン投与により抑制されていた。また、抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 の総量は、照射単独でもエダラボン投与後の照射でも変化は見られなかった。

アポトーシスの指標でもある DNA の断片化は、X 線照射 8 時間後から明らかであったが、照射前にエダラボンを投与することにより、ほぼ完全に抑制されることが分かった。

以上より、3 mg/ml のエダラボンを X 線照射 5 分前に投与することにより、ROS の除去、p53 経路の抑制を介して、MOLT-4 細胞のアポトーシスが抑制されることが *in vitro* で示された。

これ以降は、低濃度のエダラボンの放射線増感効果について、その分子機構などを解析した。そのため、以後の実験はエダラボン濃度を 0.75 mg/ml とした。エダラボン投与時の放射線増感効果は X 線の照射線量を 1 Gy、5 Gy としても同様に認められた($p < 0.05$)。また、照射 20 時間後だけでなく、照射 8・20 時間後において有意な増感効果が認められた($p < 0.05$)。また、この放射線増感効果は Nalm-6 細胞、HepG2 細胞でも認められたが($p < 0.05$)、その増感効果は MOLT-4 細胞ほどではなかった。

別のフリーラジカルスカベンジャーである DMSO(dimethylsulfoxide)で同様の実験を行ったところ、10 mg/ml の DMSO を投与して照射した時には、その放射線防護効果により細胞の生存率は照射単独の時に比べて有意に改善したが、2 mg/ml の DMSO を投与して照射した時には、細胞の生存率は照射単独の時と比べて有意差は見られなかった。よって、すべてのフリーラジカルスカベンジャーが低濃度にすれば放射線増感効果が見られるわけではないことが分かった。

Annexin V・PI 染色を行ったところ、エダラボンはアポトーシスを増感することにより、放射線増感効果を齎すことが分かった。また、カスパーゼ 7 が照射のエダラボン投与により、照射単独時よりも活性化が亢進することが分かった。CM-H₂-DCFDA キットにより細胞内 ROS を調べたところ、細胞内 ROS は照射前の 0.75 mg/ml のエダラボン投与により照射単独に比べて抑制されることが分かった。ただし、3 mg/ml のエダラボンの時ほどは抑制されなかった。

このとき、p53 の Serine15, 20 残基のリン酸化は照射前のエダラボン投与により増加しているが、p53 の蓄積、Serine6, 9, 392 残基のリン酸化については、エダラボン投与により増加していないことが分かった。そこで、siRNA で p53 をノックダウンした MOLT-4 細胞を用いて、X 線照射単独で治療した場合と、0.75 mg/ml のエダラボンを照射前に投与し、X 線照射した場合の生存率を調べたところ、統計的有意差は見られなかった。よって、エダラボンの放射線増感効果には p53 が深く関与していることが分かった。

p53 の標的分子の一つであり、CDK 阻害作用のある p21^{WAF1} は、照射単独により増加するが、0.75 mg/ml のエダラボンを投与することにより、抑制されることが分かった。次に、p53 の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより調べた。X 線照射により増加していた p53 の転写活性が、照射 5 分前にエダラボンを投与することにより、大部分が抑制されることが分かった。そこで、MOLT-4 細胞にエダラボンと CDK 阻害剤であるロスコビチンを同時に投与して照射したところ、エダラボンのみを投与して照射した場合より、有意に生存率が改善した(p < 0.05)。また、照射単独と比べて有意差が見られなかった。この結果から、p21^{WAF1} の抑制がアポトーシス増感に寄与している可能性が示唆された。

次に別の p53 標的分子である PUMA について調べた。MOLT-4 細胞に X 線照射した後の PUMA の発現は、時間とともに増えていったが、照射前に 0.75 mg/ml のエダラボンを投与することにより、その増え方はより際立った。

考察

以上の結果から、高濃度(2.7–3 mg/ml)のエダラボンには放射線防護効果、低濃度(0.15–0.75 mg/ml)のエダラボンには放射線増感効果があることが分かった。放射線防護効果は MOLT-4 細胞において、ROS の抑制、p53 経路の抑制を介して、アポトーシスを抑制することにより起こっていた。低濃度エダラボンの放射線増感効果については、p53 が深く関与しており、エダラボンが直接的または間接的に p53 のリン酸化状態を変化させ、p53 標的分子の転写活性を変化させることによりアポトーシスの増感が起こっている可能性が考えられた。p53 標的分子の一つである PUMA は亢進するとアポトーシス促進に働くことが知られている。別の p53 標的分子である p21^{WAF1} は細胞周期制御に関わるが、これが抑制されることにより、細胞周期制御ができなくなり、放射線照射後のアポトーシスが促進することが知られている。今回の実験でも、エダラボンの放射線増感効果に PUMA の亢進、p21^{WAF1} の抑制が関与している可能性が示唆された。

結語

エダラボンは、高濃度においては、MOLT-4 細胞において放射線防護効果を示し、低濃度においては、放射線増感効果を示した。

臨床的なエダラボンの血中濃度は、今回の実験の血中濃度よりも遥かに低いとされており、実際の臨床で使用した場合にどのような効果があるのかは分からない。理想的には、

悪性腫瘍組織に増感効果が働き、正常組織に防護効果が働くとよいが、投与方法の工夫などにより達成できる可能性もあると考えられる。エダラボンはそのような魅力的な潜在能力を秘めた化合物であることは間違いないだろう。