



展 TENBO 望

放射線防護剤開発を加速する 新規スクリーニング法の確立



関根(鈴木) 絵美子

Sekine (Suzuki) Emiko
(独)放射線医学総合研究所

1 はじめに

放射線治療は欧米では既になが治療の第一選択肢となっており、近年、日本でもがんの放射線治療が増える傾向にある。がん周囲の正常組織の炎症や線維化など放射線による副作用を効果的、効率的に予防できれば、更に放射線治療の普及が進むと期待されており、正常組織を放射線から防護することは放射線治療の更なる高度化にとって極めて重要であると考えられる。加えて、福島第一原子力発電所の事故以来、放射線防護への関心がこれまで以上に高まっている。そのため、正常組織を放射線から防護できる効果的な放射線防護剤や緩和剤の開発は急務であり、社会的なインパクトも大きい研究課題となっている。放射線による組織障害の防護を目的とする化合物の研究はこれまでも多数行われてきた。しかし、それらの化合物は、生体への副作用が強く、実際に臨床現場で応用されているものはほとんどないのが現状である。

我々は、新規の放射線防護剤を開発することを目的として研究する中で、天然抗酸化物質を化学修飾することにより活性酸素種・フリーラジカル消去活性を増強した化合物を設計・合成してきた。これらの新規化合物について、抗酸

化能やラジカル消去能のような化学的性質は既に検討済みであり、次のステップとして、生物学的にその機能を評価することが必要となってくる。しかし、放射線防護剤の従来の評価法は、“被検試薬が大量に必要である”、“試験期間が比較的長くかかる”、“手技が煩雑である”、“コストがかかる”、“主観が入りやすい”といった問題点のうち1つ以上を有していた。そのため、動物実験や臨床応用へと進める前に、新しく設計・合成した多種類かつ微量の候補化合物に対して、防護効果をスクリーニング的に評価する系が必要とされてきたが、これに見合う方法が見当たらず、開発の大きな阻害要因となっていた。

そこで我々は、これらの問題点をすべて解決できる新しいスクリーニング法を確立した¹⁻³⁾。このスクリーニング法に関して2012年に日本で特許出願を、2013年に国際特許を出願している(特願2012-72619“スクリーニング方法、スクリーニングキット、および解析プログラム”, PCT出願PCT/JP2013/002032)。このスクリーニング法は、放射線でラット胸腺細胞にアポトーシスが誘導されて細胞サイズが縮小する現象^{4,5)}を利用して、対象化合物の放射線防護効果を判定する方法である。本法は、従来法

と比べて、短時間で結果を得られるため、新薬の効果検討に要する期間を大幅に短縮することができる。

本稿ではこの新しいスクリーニング法を、代表的な抗酸化物質についての放射線防護効果の評価を通して紹介する。

2 本スクリーニング法のプロトコール

ラットから外科的に胸腺を切り出す。その胸腺から胸腺細胞を10%ウシ胎児血清(FBS)添加RPMI1640培地中に絞り出し、必要数を希釈し実験に用いる。この胸腺細胞に調べたい化合物を添加後、放射線を照射する。本実施例では、放射線はX線照射装置PANTACを用い、2 Gy照射する。照射後直ちに5% CO₂存在下で37℃で4時間培養したのち、細胞サイズの測定を行う。

胸腺細胞に放射線を照射し数時間培養すると、胸腺細胞の縮小、核の濃縮が観察される。細胞サイズの測定と比較は、測定する装置に合わせて、細胞の面積、細胞の体積、又は細胞の長さにより行うことができる。本実施例では、フローサイトメトリーの一種であるFACSCalibur (BD)を用いて測定し、細胞の面積変化により評価を行った。

3 放射線照射による胸腺細胞のサイズ縮小例

図1は、胸腺細胞のサイズ縮小を示すために、核を蛍光染色した像を示した。図に見られるように、生細胞の核内には真核細胞内に存在するDNAとタンパク質の複合体であるクロマチン構造を観察できる。放射線によって細胞死した死細胞では、核の濃縮が観察される。このように、ラット胸腺細胞では、細胞が断片化してできるアポトーシス小体を形成することなく、1つの細胞のまま凝縮するため、死細胞の割合を正確に検出することができる。

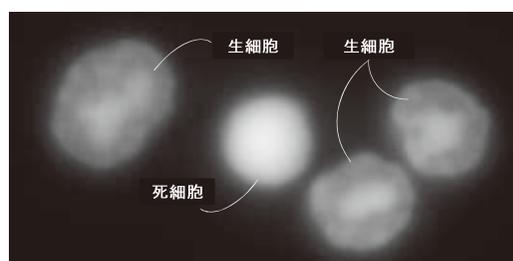


図1 胸腺細胞の縮小

ここでは、胸腺細胞のサイズ縮小を示すために染色により核の様子を示したが、実際のスクリーニングでは染色する必要はなく、細胞の大きさを検出するだけでよいので、この点が簡便化の1つといえる。胸腺細胞は感受性の高い正常細胞であり、このような細胞死の反応が数時間で起こる。そのため、短時間での測定・評価が可能となった。また、培養細胞株等と違い継代中の性質変化がなく、細胞周期依存性の問題がないため、精度が良く再現性の高いスタンダードな方法として使うことができる。

4 条件検討

本スクリーニング法では、ラットの胸腺細胞を使用する。ラットはマウス等と比較して体が大きく、1匹から2,000~20,000試料を試験できる大量の胸腺細胞が得られるという利点がある。

最初に、ラット、マウス間の、またそれぞれの雌雄間の胸腺細胞の放射線に対する感受性の差を検討した(データ表示なし)。検討は、X線2と10 Gyを使用し、6時間まで1時間ごとに経時変化を追った。結果、同じ系統(種別)では雌雄間における放射線に対する感受性の差はないことが分かった。一方、特に10 Gyにおいて、マウスの胸腺細胞よりもラットの胸腺細胞の方が死細胞の割合が顕著に多く、放射線に対する感受性が高いということが分かった。これらの結果から、スクリーニングを行う際には、毎回同じ系統の動物種を使用して評価する

ことが重要であるということが分かった。

5 放射線防護効果の検討例

本実施例では、カテキン誘導体に対して放射線防護効果の有無について検討した。コントロール、X線2 Gy照射、カテキン誘導体1 mM投与、カテキン誘導体1 mM事前投与とX線2 Gy照射の4群間において比較検討した。図2は、横軸が細胞サイズ、縦軸が細胞数を示している。本実施例において生細胞ピーク位置をL(L1~L4)、死細胞ピーク位置をA(A1~A4)と表示している。照射、薬剤添加に起因する変化のみを確認するため、非照射かつ薬剤添加無

のサンプルをコントロールとして比較した。図2(A)はコントロールの胸腺細胞であり、細胞の大きさのピーク(P1)は400付近となった。図2(B)はX線2 Gyを照射した胸腺細胞であり、細胞の大きさのピーク(P2)は200付近となった。これらの結果により、胸腺細胞に2 Gyの放射線を照射すると、胸腺細胞が凝縮し、胸腺細胞の細胞サイズがおよそ半分になることが分かった。図2(C)はカテキン誘導体1 mM投与でありコントロールと違いはなかったことから、カテキン誘導体1 mMは毒性を示さないことが分かる。図2(D)はカテキン誘導体1 mMを投与した後にX線2 Gyを照射した胸腺細胞である。図2(B)に示した場合と異なり、

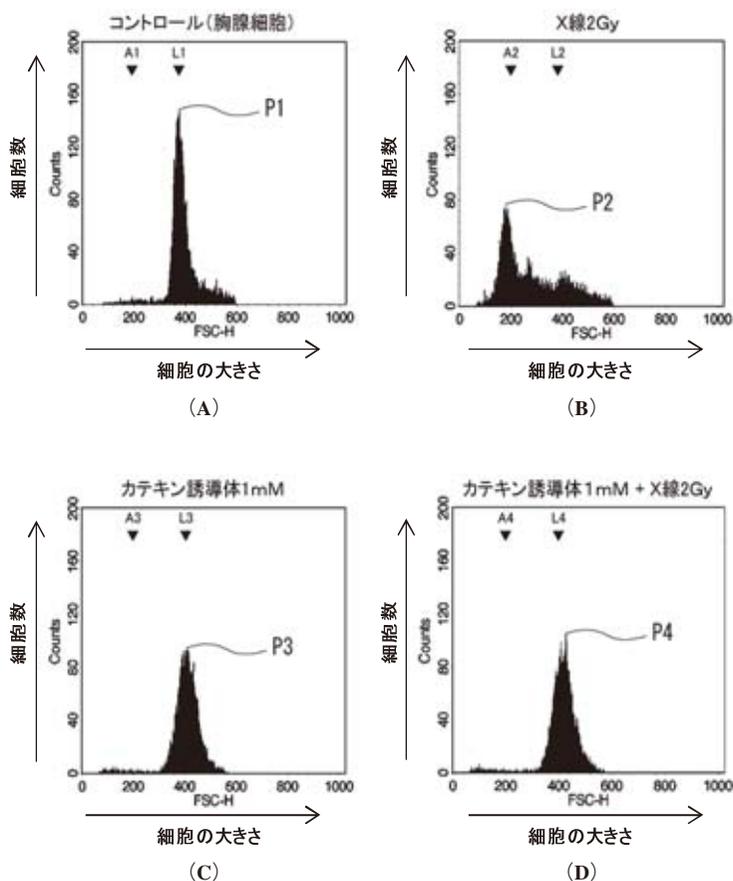


図2 カテキン誘導体の放射線防護効果の検討

カテキン誘導体を事前投与した場合には、2 Gyを照射しても、ピークが生細胞ピーク位置のままであり、カテキン誘導体の放射線防護効果を示している。

6 放射線防護剤のスクリーニング例

幾つかの代表的な抗酸化物質を用いてスクリーニングを行った例を示す。ここでは、緑茶の成分である(+)−カテキン、ウコンの黄色色素であるクルクミン、ブドウの果皮に含まれるレスベラトロール、脂溶性ビタミンであるビタミンE、水溶性ビタミンであるビタミンC、コーヒーに含まれるカフェイン酸、玉ねぎ等に含まれるケルセチンについて試験を行った。これらの化学物質の最終濃度が1, 10, 100, 1000 μM になるように培地に添加し、その後胸腺細胞にX線を照射して、細胞サイズの変化を観察した。測定データを解析ソフトModFitにて数値化し解析したものを表1に示す。

(+)−カテキンは、1 mMの濃度では毒性は見られず、かつ放射線防護効果を示した。クルクミンは、100 μM から毒性を示し、10 μM で弱い放射線防護効果を示した。ビタミンCは、100 μM から顕著な毒性が観察された。レスベラトロールは100 μM で、カフェイン酸は100 μM , 1 mMで、ケルセチンは1 mMで放射線防護効果を示した。今回の検討では、放射線防護効果の見込めそうな既存の抗酸化化合物を用いたが、その中でも、カフェイン酸が特に有効性が高いことが示唆された。

7 今後の展望

本稿では放射線防護効果の判定例を示したが、本法は胸腺細胞に細胞死を誘導するような細胞障害性因子であれば判定が可能である。例えば、本法を用いることで、放射線防護剤以外にも放射線増感剤、薬剤の毒性、薬剤の使用条件（薬剤濃度、投与形態）等もスクリーニング

表1 代表的な抗酸化物質を用いた検討

	死細胞の割合 (%)	
	照射なし	X-rays 2 Gy
no treat (コントロール)	20.25	41.51
DMSO 0.01%	21.50	40.96
DMSO 0.1%	20.59	40.98
DMSO 1%	20.78	44.94
(+)−カテキン 1 μM	21.23	41.05
(+)−カテキン 10 μM	21.01	40.65
(+)−カテキン 100 μM	21.63	39.76
(+)−カテキン 1 mM	20.23	28.62
クルクミン 1 μM	20.03	42.31
クルクミン 10 μM	19.71	30.81
クルクミン 100 μM	91.04	76.11
クルクミン 1 mM	85.79	94.90
レスベラトロール 1 μM	20.64	43.91
レスベラトロール 10 μM	20.81	39.99
レスベラトロール 100 μM	20.34	23.87
レスベラトロール 1 mM	42.67	43.93
ビタミンC 1 μM	24.11	44.01
ビタミンC 10 μM	25.56	42.57
ビタミンC 100 μM	73.62	74.86
ビタミンC 1 mM	57.54	64.70
ビタミンE 1 μM	22.57	43.91
ビタミンE 10 μM	22.20	44.47
ビタミンE 100 μM	21.87	45.72
ビタミンE 1 mM	22.89	50.62
カフェイン酸 1 μM	21.44	44.89
カフェイン酸 10 μM	22.99	44.42
カフェイン酸 100 μM	27.34	29.56
カフェイン酸 1 mM	16.27	17.59
ケルセチン 1 μM	20.42	43.27
ケルセチン 10 μM	22.44	41.21
ケルセチン 100 μM	32.87	34.90
ケルセチン 1 mM	22.51	20.50

できる。本スクリーニング法は、全工程における実験操作が容易であり、明瞭で再現性が高く精度の良い客観的な結果を短期間で安価に得ることができ、非常に効率的な検査方法である。本法では、ラットの胸腺細胞を用いているが、

同じリンパ系細胞として、患者のリンパ球を用いて、放射線治療後の正常組織の障害を検討している報告もある^{6,7)}。今後、薬剤の臨床使用へ向けた検討を進める際に、その前判定法としての位置付けとなることを望んでいる。

近年では、より多くの放射線を患部に照射することで、がん組織に対する治療効果を向上させ、総合的にがん治療を高度化することが重要となってきている。そのためには同時に、がん組織の周りにある正常組織が放射線によって障害を起こすのを防止することが必要で、我々は天然抗酸化物質を化学修飾することにより、放射線防護剤の候補化合物を開発してきた。これらの化合物に対し、本スクリーニング法を用いて放射線防護効果の評価を行うとともに、各化合物の化学構造に基づく機能解析及び分類、構造活性相関を検討し、有効性が高く臨床応用可能な新しい放射線防護剤を計画的に開発する。本法を初期的なスクリーニングとして用い、その結果を基に従来の方法を併せて検討することで、新薬開発の加速が期待される。

【謝辞】

本稿は(独)放射線医学総合研究所 重粒子医学科学センター国際重粒子医学科学研究プログラムの村上健プログラムリーダー、先端粒子線生物

研究プログラムの今井高志プログラムリーダー、松本謙一郎チームリーダー、下川卓志チームリーダー、中西郁夫主任研究員、上野恵美准研究員、日本薬科大学物理系薬学分野の安西和紀教授らとの共同研究による成果です。本研究で用いたカテキン誘導体は、昭和大学薬学部の福原潔教授、芝浦工業大学大学院理工学研究科の今井耕平研究員らと共同で設計・合成しました。共同研究者の方々に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 日本経済新聞, 放射線治療, より安全に 放医研, 細胞防護へ新技術, 2012年6月20日付
- 2) 日経産業新聞, 放射線防護剤の評価 時間・費用 半分以下に 放医研, 検証の新手法, 2012年6月7日付
- 3) マイナビニュース, 放医研, 放射線防護効果を迅速・簡便にスクリーニングできる手法を確立, 2012年6月6日付
- 4) Ohyama, H., Yamada, T., *et al*, *Radiat Res.*, **85**, 333-339 (1981)
- 5) Ohyama, H., Yamada, T., *et al*, *Radiat Res.*, **101**, 123-130 (1985)
- 6) Goutham, H.V., Bola Sadashiva, S.R., *et al*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, **84**, 607-612 (2012)
- 7) Goutham, H.V., Bola Sadashiva, S.R., *et al*, *Anal Biochem.*, **414**, 287-293 (2011)