

氏 名 ・ (本籍)	福田 耕二 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	医博甲第 937 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	医学系研究科医学専攻
学 位 論 文 題 名	A diarylpentanoid curcumin analog exhibits improved radioprotective potential in the intestinal mucosa (ディアリルペンタノイド型クルクミンアナログが示す腸粘膜に対する放射線防護作用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 橋本 学 (副査) 教授 寺田 幸弘 教授 飯島 克則

学 位 論 文 内 容 要

A diarylpentanoid curcumin analog exhibits improved radioprotective potential in the intestinal mucosa
ディアリルペンタノイド型クルクミンアナログが示す腸粘膜に対する放射線防護作用

申請者氏名 福田 耕二

研 究 目 的

近年の癌治療において、約 50 %の患者が放射線治療を受けるようになった。正常細胞への急性もしくは晩発性放射線障害はある程度避けられない。放射線療法の効果を最大にするためには、フリーラジカルによって生じる腸粘膜の損傷を含む様々な放射線障害を最小化することが重要である。また、原子力発電所の事故や核によるテロリズムの脅威に対して、放射線障害に対する対応策の開発が求められている。

クルクミンは伝統的な薬剤として知られており、それ自身が抗腫瘍活性を持ち、放射線感受性を増す物質である。一方、正常細胞に対しては、クルクミンは γ 線照射を防護する効果が示されている。しかし、*in vivo*ではクルクミンの生体内有用性は低い。そこでクルクミンの活性増強を目指して新規アナログを合成した。これらのディアリルペンタノイド型クルクミンアナログには抗腫瘍効果の増強が確認されている。今回、これらのアナログ(G0-Y031)の腸粘膜に対する放射線防御作用について研究した。

研 究 方 法

放射線防御に関する研究は、C57BL/6J(B6)および Jc1:ICR(ICR)マウスをクレア日本より購入して行われた。クルクミンと G0-Y031 は高脂肪食(HFD32;クレア日本)と混合し、それぞれ 0.1%、0.5% (重量/重量) の濃度で調整した。第 1 日目から第 7 日目まで餌として 1 日あたり 5 グラムを前投与し、第 8 日目に腹部に 11 グレイの放射線照射を行い、屠殺前日の第 10 日目まで投与を継続した。また放射線照射をしないマウスには高脂肪食のみを同様に与えた。

放射線障害の程度は陰窩および絨毛の数で測定した。10 %中性ホルマリンで膨らませた腸管を十二指腸の長軸に直交する面で切断し、陰窩および絨毛数をそれぞれ 10 および 15 の標本から計測した。放射線照射障害に関与する p53、Bax、Bcl-2、活性型 Caspase-3 について免疫組織化学的手法により解析した。小腸を方形に開いて短辺でロール状に巻き、全長を観察した。フリーラジカルによるタンパク質酸化の指標として Protein Carbonyls 免疫染色キット(コスモバイオ)を用いた。増殖動態の指標として Ki-67 を、腸幹細胞のマーカーとして OLFM4 を解析した。

統計学的検定は StatMate III を用いて Student's t-test および Cochran-Cox test により行った。

研 究 成 績

B6 マウスにおいて、放射線による陰窩の減少は 0.5% クルクミンでは防護されなかった。一方、非照射群が 9.87 ± 1.15 個/周径(mm)であるのに対し、0.5% G0-Y031 投与群は 11.0 ± 2.00 個/mm (照射単独群; 6.86 ± 0.99 個/mm) と有意に陰窩の減少を防護した ($p=0.0079$)。放射線障害により感受性の高い ICR でも、0.5% G0-Y031 投与群で 2.54 ± 0.40 個/mm (照射単独群; 0.74 ± 0.18 個/mm) と有意に陰窩の減少を防護した ($p=0.00043$)。絨毛数は非照射群が 3.40 ± 0.56 個/mm に対し、0.5% G0-Y031 投与群は 2.70 ± 0.35 個/mm (照射単独群; 2.40 ± 0.20 個/mm) であった ($p=0.06$)。

アポトーシスマーカーについては、正常の(非照射群の)小腸粘膜の陰窩から絨毛先端にかけて p53 の発現はほとんど認められない。照射単独群では、特に陰窩における多くの細胞で p53 の発現が誘導された。しかし、0.5% G0-Y031 投与群では p53 の発現誘導が抑制された ($3.2 \pm 4.9\%$, $p=0.09$)。活性型 Caspase3 は正常小腸粘膜の絨毛の先端にのみ認められるが($4.2 \pm 3.8\%$)、放射線照射を受けると絨毛上皮全体の $81.7 \pm 11.3\%$ に活性型 Caspase3 の発現誘導が認められた。一方、G0-Y031 投与群では活性型 Caspase3 の発現誘導の抑制が観察された($10.5 \pm 8.4\%$, $p<0.001$)。電離放射線により活性酸素種ならびに活性カルボニル種(RCS)が産生される。クルクミンはそれらを抑制し、酸化ストレスへの抵抗性を発揮する。酸化ストレスのマーカーであるカルボニル化蛋白質(PC)は正常な(非照射群の)絨毛細胞では陽性率は $20.7 \pm 12.5\%$ であるが、照射群では $76.1 \pm 13.7\%$ と増加する。G0-Y031 投与群では $14.6 \pm 6.9\%$ と有意に抑制された ($p<0.001$)。腸幹細胞は分裂していないが、その子孫は細胞分裂が盛んである。これらの細胞は陰窩の下部に存在する。腸幹細胞は陰窩の底部から 4-6 細胞の位置にある。細胞分裂の指標である Ki-67 陽性細胞は非照射群で 10.6 ± 0.26 個/周径($100 \mu\text{m}$)あるのに対して、照射単独群では 2.23 ± 1.49 個/ $100 \mu\text{m}$ に減ず流。しかし、0.5% G0-Y031 投与群では 4.77 ± 1.83 個/ $100 \mu\text{m}$ と保護された ($p=0.025$)。これらは全て OLFM4 という放射線抵抗性の幹細胞のマーカーを有していた。

結 論

小腸上皮細胞において、放射線照射によって生ずる RCS、さらに誘導されるアポトーシス関連蛋白質 p53 や活性型 Caspase3 を G0-Y031 は抑制することで放射線防御に寄与するものと考えられる。G0-Y031 は優れた放射線保護化合物になる可能性がある。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 橋本 学

申請者： 福田 耕二

論文題名： **A diarylpentanoid curcumin analog exhibits improved radioprotective potential in the intestinal mucosa**

（ダイアリルペンタノイド型クルクミンアナログが示す腸粘膜に対する放射線防護作用）

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、クルクミンアナログが正常小腸上皮の急性放射線障害を抑制することをB6マウスと ICRマウス（放射線高感受性）を用いた動物実験で検討したものである。マウスの餌として高脂肪食のみの群と高脂肪食とクルクミンないしクルクミンアナログを混ぜた群にわけ、それぞれ実験開始から11日間投与した。実験8日目に全身にX線を11Gy照射し、11日目に小腸の絨毛や陰窩の組織学的変化を比較検討した。さらにB6マウスでp53, Caspase-3などのアポトーシス関連蛋白の発現、放射線による蛋白質酸化をみるカルボニル蛋白質の状態、細胞増殖能や幹細胞マーカーなど照射後の細胞機能の状態などを免疫組織学的に比較検討した。それぞれコントロール群は高脂肪食で非照射群とした。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1）斬新さ

クルクミンの活性増強型であるクルクミンアナログが照射後の正常小腸上皮細胞の減少の抑制、放射線誘発アポトーシスの抑制、細胞たんぱく質の酸化の抑制、細胞機能残存により腸の急性放射線障害に対する防護作用を有することを動物実験ではじめあて明らかとした。

2）重要性

短時間に多量の放射線を浴びたとき急性放射線障害を引き起こす。消化管症状を発症すると救命することは不可能といわれている。本研究はこのような急性放射線障害からの救命や防護にクルクミンアナログが寄与する可能性を示したもので重要な研究である。また、臨床面でも骨髄移植前の全身照射で消化器症状などの副作用軽減や腹部病変へ一度に多量の放射線を照射する定位照射の安全性確保・適応拡大に役立つ可能性がある有用な研究である。

3）研究方法の正確性

正常小腸上皮の放射線による組織学的。免疫組織化学的な影響評価は、すでに報告者らのグループが開発し報告した手法である。クルクミンアナログの放射線防護作用は陰窩・絨毛数の変化やアポトーシス、たんぱく質酸化、細胞機能の照射前後での変化を統計学的検討で評価しており、客観的な評価法で正確性があると考えられる。

4）表現の明瞭さ

クルクミンアナログが正常小腸上皮の急性放射線障害に対する防護作用を持つことを明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。