

エダラボンのヒト臍帯静脈内皮細胞に対する放射線防護作用

Radioprotective effects of edaravone on human umbilical vein endothelial cells

生命歯学部 那 須 優 則
安 藤 百 花
小 林 朋 子
三 橋 扶 佐 子
下 浦 優 希
鈴 木 さ つ き
片 柳 亮 太
戸 円 智 幸
堀 江 哲 郎

Masanori NASU¹, Momoka ANDO², Tomoko KOBAYASHI³, Fusako MITSUHASHI², Yuki SHIMOURA², Satsuki SUZUKI², Ryota KATAYANAGI², Toshiyuki, TOEN¹, Tetsuro HORIE²

¹Department of Natural Science, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, 1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0071, Japan

²Research Center for Odontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, 1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0071, Japan

³Department of Developmental and Regenerative Dentistry, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, 1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0071, Japan

Abstract: Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one [MW:174.20]) is a free radical scavenger clinically used as a brain protective agent in cerebral infarction. In the acute phase of cerebral infarction, it shows cerebroprotective effects by suppressing the action of reactive oxygen species around the infarction site, including the penumbra region, and preventing oxidative damage to endothelial cells and nerve cells in the brain. As a result, it inhibits the onset and exacerbation of ischemic cerebrovascular disorders such as cerebral edema, cerebral infarction, and neurological syndromes. In this study, we focused on the free radical scavenging ability of edaravone to reduce the effects of radiation and its damage. We examined the effect of edaravone on proliferation of human umbilical vein endothelial cells X-ray irradiated. Consequently, we found that the addition of edaravone ameliorated the cellular growth of HUVECs irradiated 5 Gy of X-rays.

Key words: edaravone, radioprotection, blood vessel endothelium, HUVECs

(2023年 3月 9日 受理)

はじめに

放射線が生体高分子に吸収されるとフリーラジカルが産生されるが、現在までに、放射線防護剤として開発されたラジカル捕捉剤は、それ自体の副作用が強く、臨床で日常的に使用されているものはほとんどない (Okumura, Nasu et al. 2009)。日本で医療用医薬品として認可されている唯一の

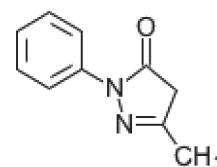


Fig. 1 Structure of edaravone. Cited from KEGG Compound Database (<https://www.genome.jp/kegg/compound/>)

ラジカススカベンジャーは脳保護剤またはALS治療薬であるエダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one [MW:174.20], MCI-186, Fig. 1) である。エダラボンは脳梗塞急性期に、ペナンブラ領域を含む梗塞部位周囲の活性酸素の働きを抑え、脳内の血管内皮細胞・神経細胞の酸化障害を防ぐ。その結果、脳浮腫、脳梗塞、神経症候などの虚血性脳血管障害の発現及び増悪を抑制することにより脳保護作用を示す。発症後24時間以内に投与し、その後1日朝夕2回の点滴静注を行う。フリーラジカルとは、不対電子を1つ以上もつ分子・原子のことであり、遊離基ともいわれる。すべての物質は分子から成り立ち、その分子は原子核と電子からなる原子の組み合わせによって構成されている。分子中の電子は対になる分子があることで安定して存在できる。一方、不対電子とは、対になる分子がない状態のことを指し、不安定である。活性酸素もフリーラジカルの一つである。フリーラジカススカベンジャーはフリーラジカルと反応し、不対電子を安定的な化合物に変化させることで消去する。

腫瘍とは自律的で制御できない増殖能を持つ細胞集団であり、良性と悪性の2つがある。がん治療には大きく分けて3つの治療法がある (Baskar, Lee et al. 2012)。手術療法、化学療法、そして放射線療法である。放射線療法は、手術療法のように臓器を取り除くことなく治療できる (Itoh and Ono 2021)。腫瘍に局所的に照射し、細胞のDNAに損傷を与え、がん細胞を殺傷する。放射線は、がん細胞のような細胞分裂の活発な細胞ほど影響を受けやすいため、正常な細胞には、あまり影響を与えずにがん細胞を殺傷することができる (Baskar, Lee et al. 2012)。しかし、局所照射した腫瘍部位周辺の正常細胞への放射線の影響も確認されている。正常細胞には自己修復の機能が備わっているが、被曝によってその機能が損傷すると二次がんを発症する可能性がある。そのために、放射線治療時における放射線防護戦略の確立が重要となる。

我々はエダラボンのフリーラジカル除去能に着目し、放射線療法の際に正常細胞への放射線障害の影響を軽減できないかと考えた。笹野らは、エダラボンがヒト血球系細胞であるMOLT-4において、X線照射が誘導するアポトーシスを抑制することで放射線防護作用を示すことを報告している (Sasano, Enomoto et al. 2007)。

血管は血液を身体の各所に送るための通路であり、全身へ酸素や栄養分、水分、体温、老廃物を

運ぶ。放射線照射された血管内皮細胞の機能の改善は全身の血管機能を維持し、さらに臓器・組織に対する放射線障害の軽減をもたらすと考えられる。本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) (Baudin, Bruneel et al. 2007) を用いて、エダラボンの放射線防護作用について解析した。

材料と方法

HUVECsの培養

HUVECs (5×10^5 cells/mL, Passage 2) はLonzaより購入し、37℃、5% CO₂で培養した。播種密度は2500 cells/cm²とし、培地量は1 mL / 5 cm²とした。培養液としてEBM™-2培地 (Lonza) を使用した。使用前に30分以上、37℃、5% CO₂インキュベーター内で平衡化させた。凍結されたHUVECsの融解は製造者のマニュアルに従い行った。簡潔に示すとHUVECsを37℃のウォーターバス中で融解し、細胞懸濁中の氷片が米粒大になったらピペッティングし、培地入りの15mLチューブに全量入れた。1 mLずつ60 mm ディッシュに分注し、インキュベーターで培養した。培養開始から16~24時間で培地交換を行い、48時間毎に培地交換を行った。

細胞の回収

培養中の細胞から培地を除き、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。トリプシン/EDTA (Lonza) を1 mL加え37℃、5% CO₂で5分間処理した。細胞が丸くなったのを確認したら、ディッシュを叩き細胞を浮遊させた。トリプシン中和溶液 (Lonza) を1 mL加えてトリプシンを中和した後に、EBM™-2培地を10 mL加えた。ピペッティングし、遠心分離を行った。ペレットに必要な量の培養培地を添加した。

24ウェルプレートへの播種

培養中のディッシュの培地を除去し、4 mL HEPES Bufferで洗浄後、トリプシン/EDTAを2 mL添加し、37℃のインキュベーターで1分間反応した。顕微鏡で、細胞が丸くなり剥がれたのを確認し、全量を新しい15 mLチューブに回収した。ディッシュにトリプシン中和溶液を5 mL入れ、全体の細胞が剥がれるようにピペッティングし、全量を前述の15 mLチューブに回収した。24ウェルプレートに 5×10^3 cells/wellで播種した。培地量は1 mL/wellとした。

セルカウント

血球計算盤を用いてセルカウントを行った。細胞懸濁液を1200 rpm、5分、4℃で遠心分離し、上清除去した。細胞数が 5×10^3 cells/mLになるように調整した。

エダラボン溶液の調製

ジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒として、エダラボン溶液を調製した。エダラボン (FUJIFILM Wako Chemicals) を15mLチューブに50mg量り、5.74mL DMSO (FUJIFILM Wako Chemicals) をチューブに添加後、ボルテックスでよく攪拌し、溶解した。これを原液とし(50mM)、0.45 μ mのフィルターユニット (Merck) でフィルトレーションした。その後、培地で段階希釈を行い、20, 10, 1.0, 0.1, 0.01mMの溶液を作製した。DMSOの細胞増殖への影響をみるため、40, 20, 2.0, 0.2, 0.02%のDMSO溶液を作製した。

X線照射とエダラボン添加

HUVECsを播種した1日後に、エダラボン溶液を含む培地に交換し、各々のX線をX線照射装置(日立メディコ, 150 kV, 20 mA, 1.80 Gy/分)で照射した。10分間インキュベートしたのちに、通常の培地に交換した。

撮影・観察方法

0～5日目まで、同時刻に位相差顕微鏡で倍率 $\times 40$ で撮影した。細胞を観察、撮影する位相差顕微鏡はDiaphot300 (Nikon)を用いた。ランダムに1mm \times 1mmの領域を選び、経時的にセルカウントを行った。4辺の境界線上にある細胞は、2辺のみを選択しカウントした。0日目の細胞数を1として、細胞数の比率による細胞増殖率を算出した。

活性酸素種の定量

HUVECs (Passage 3) を10ウェルスライドチャンバー (GreinerBio-one) に 1×10^4 cells/200 μ lの濃度で播種した。翌日、播種した細胞が接着していることを確認し実験を行った。まず、CellRoxTMOrange (ThermoFisherSCIENTIFIC) を最終濃度が5 μ Mになるように培地で希釈した。そして細胞の培地をCellRoxTMOrangeを添加した培地に置換し、37℃、5%CO₂で30分間培養した。HEPES (Lonza) で一度洗浄し、0.1mMエダラボン/培地に置換した直後にX線照射装置を用

いて2 Gy照射し37℃、5%CO₂で10分間インキュベートした。HEPESで一度洗浄後、培地に置換し、共焦点レーザー顕微鏡LSM700 (CarlZeiss) で撮影した。撮影した画像はImageJを用いて輝度を測定した。

統計解析

一元配置分散分析、二元配置分散分析、もしくはクラスカル-ウォリス検定を行い、その後の検定として、チューキーの方法、またはスティーラドゥワス検定を用いた。n=2～3で解析を行い、p<0.05を統計的有意差ありとして判定した。統計解析ソフトはSPSS Statistics version25 (IBM) またはKyPlot 6.0 (KyensLab) を用いた。

結果と考察

HUVECsの増殖に対するX線の影響

HUVECsを24ウェルプレートに1ウェルあたり 5×10^3 cellsで播種し、その1日後に、それぞれ0、1、2、5 GyのX線を照射し、5日間決められた区画の細胞数をカウントすることにより、増殖を調べた。0日の細胞数を1として、細胞増殖率を計算し、プロットした (Fig. 2)。その結果、1 Gy照射群で、すでに増殖の抑制がみられ、2 Gy、5 Gyと線量依存的に細胞増殖が強く抑制されることが観察された。

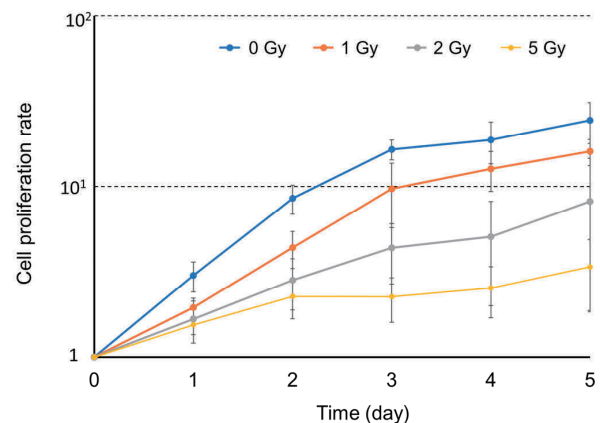


Fig. 2 Effects of X-ray on cell proliferation of HUVECs Growth curves of HUVECs after X-ray irradiation.

エダラボンの至適濃度の決定

エダラボンは細胞増殖の抑制活性を持つことが報告されている (Sasano, Enomoto et al. 2010, Nakajima, Watanabe et al. 2015)。そこで我々はエダラボンのHUVECsに対する至適濃度を調べるために、様々な濃度のエダラボンで処理をした細胞の増殖を調べた。その為に、HUVECsを24ウェルプレートに

1 ウェルあたり 5×10^3 cells 播種し、播種 1 日後、DMSO に溶解したエダラボンを添加した培地 (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 20mM) で 10 分間処理し、その後 5 日間の増殖を調べた。コントロールとして対応する溶媒濃度で処理をした細胞についても観察を行った (Fig. 3)。

エダラボン添加では、0.1, 0.01mM ではほとんど細胞毒性は観察されなかったが、10~20mM では細胞増殖率が抑制された (Fig. 3 A)。その反面、DMSO のみを添加した実験では、最大濃度のエダラボンを溶解するために使用した 40% の DMSO で処理をしたときのみ、増殖抑制が起こった (Fig. 3 B)。これらの結果から、X 線照射障害を軽減するエダラボンの効果を調べるためには、0.1mM が適当であると判断した。

エダラボンの放射線防護作用の解析

HUVECs を 24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^3 cells を播種し、その 1 日後に 0.1mM のエダラボンの添加培地に交換し、X 線 (0, 1, 2, 5 Gy) を照射した。10 分後に培地を通常培地に交換して、5 日間増殖を調べた (Fig. 4)。

その結果、0, 1, 2 Gy はエダラボン無添加 (溶媒のみ添加) より、エダラボン添加の細胞増殖率

が低い傾向であった。この結果は、これらの線量では、エダラボンの毒性がより強く影響していることを示唆している。5 Gy 照射では、エダラボン添加の細胞増殖率が無添加より高い傾向を示した。統計解析を行った結果、エダラボン添加は 0 Gy と 5 Gy で増殖に有意差が認められなかったが、エダラボン無添加では有意に増殖に差があった (*: $p < 0.05$)。このことから X 線照射の影響をエダラボン添加により有意に軽減したと考えられる。

次に X 線照射により生じる活性酸素について、活性酸素と反応すると蛍光を発する CellRoxTMOrange を用いて調べた (Fig. 5)。2 Gy 照射のエダラボン無添加は強く活性酸素が検出されるが、エダラボン添加では、2 Gy 照射でも活性酸素は検出されなかった (Fig. 5 A)。得られた画像を定量化し、プロットした。その結果、エダラボン添加は有意 ($p < 0.05$) に細胞内の活性酸素種の産出を抑制することが明らかとなった (Fig. 5 B)。

結 論

我々は本研究において、X 線照射した HUVECs に対するエダラボンの効果について検討した。エダラボンは脳梗塞時の脳保護および ALS 治療薬であり、すでに承認済み薬品のため、安全性が高く (Kaur, Langetal.2022)、放射線治療時における放射線障害軽減効果が認められれば非常に有望な薬剤となる。これまでにも、HUVECs とは異なるヒト培養細胞を用いて、エダラボンを放射線防御剤として用いる試みは積極的に行われている (Sasano, Enomotoetal.2007, Sasano, Enomotoetal.2010, Nakajima, Watanabeetal.2015)。どの報告でもある程度、エダラボンの細胞毒性について報告されているため、今回の結果も踏まえて、投与方法、用量についての慎重な検討が必要だと考えられる。エダラボンは DMSO の他にエタノールや酢酸にも溶解易いとされているため、今後は溶媒の検討も行う必要がある。加えて、エダラボンの濃度についても、より薬効の高い濃度を同定するための培養細胞レベルでの条件検討が必要だと考えられる。また、エダラボンは脂肪親和性が強くこれまで投与ルートも点滴に限られてきたが、最近、懸濁状態を変え、経口投与が可能となった製剤が承認された (田辺三菱製薬)。本研究のような試みが継続されていけば、より放射線防護効果の高い投与方法が開発されることが大きく期待される。

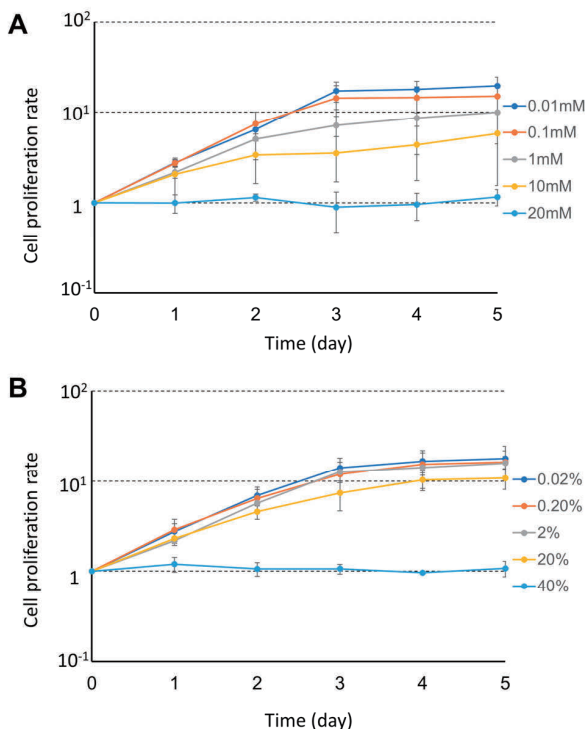


Fig. 3 Effects of edaravone on HUVECs proliferation. Growth curves of HUVECs treated with edaravone / DMSO (A) or DMSO (B).

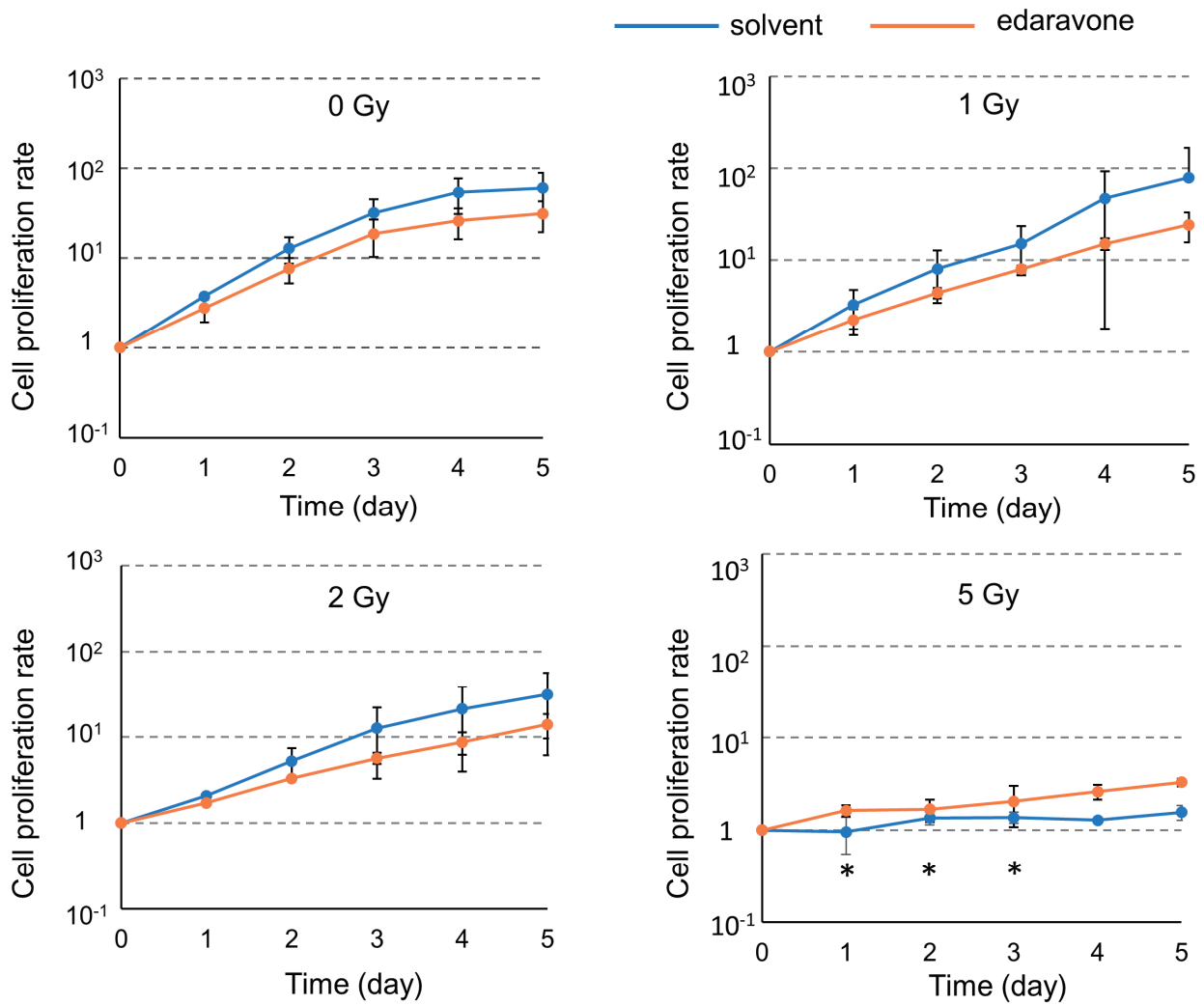


Fig. 4 Effects of edaravone on proliferation of X-ray-irradiated HUVECs. Growth curves of HUVECs treated with or without 0.1 mM edaravone. Doses of X-ray are indicated in each plot. (*: $p < 0.05$)

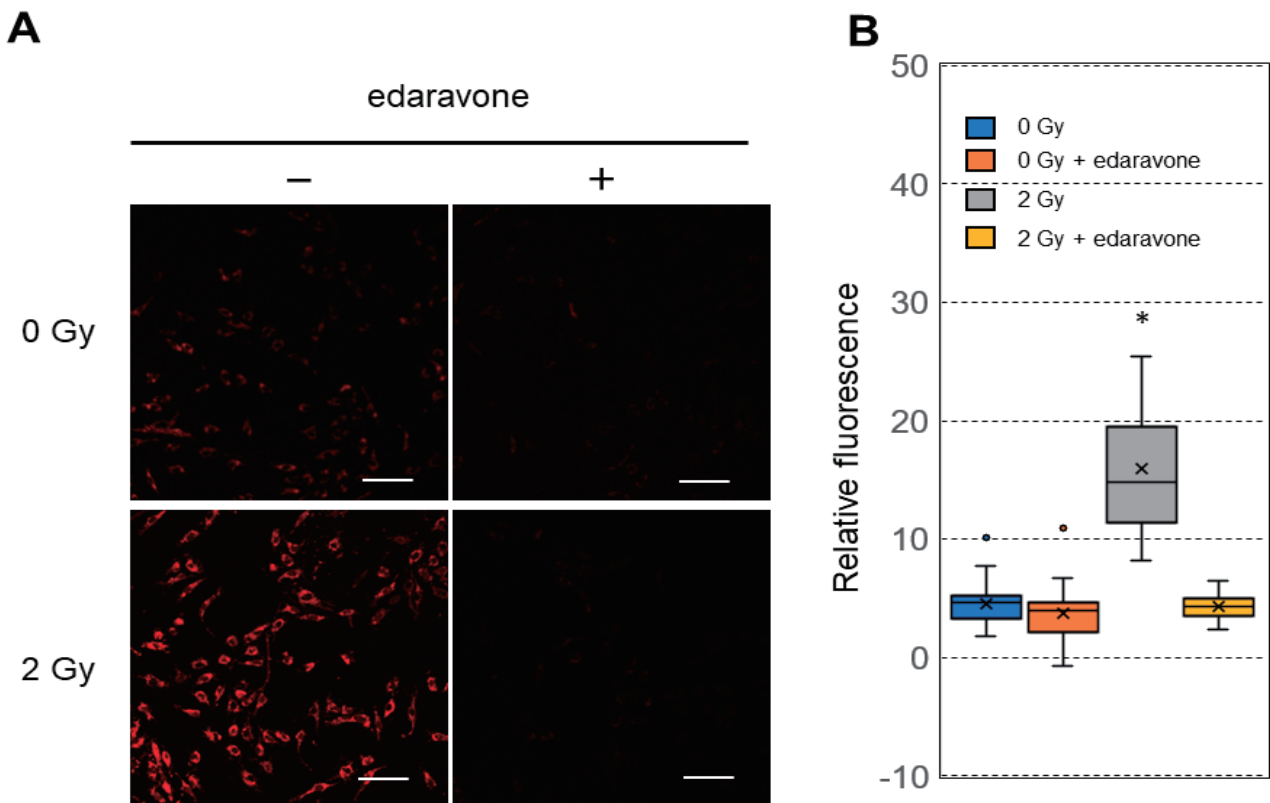


Fig. 5 Measurements of ROS using CellRox™ Orange. (A) Cells irradiated or not are stained with CellRox™ Orange and observed using the fluorescent microscope (scale bar: 100 μm). (B) Measured values using ImageJ are plotted. (*: $p < 0.05$)

謝 辞

本研究はJSPS 科研費（18K09824）の助成を受けたものである。

引用文献

Baskar, R., K. A. Lee, R. Yeo and K. W. Yeoh (2012). "Cancer and radiation therapy: current advances and future directions." *Int J Med Sci* **9** (3) : 193-199.

Baudin, B., A. Bruneel, N. Bosselut and M. Vaubourdolle (2007). "A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells." *Nat Protoc* **2** (3) : 481-485.

Itoh, Y. and T. Ono (2021). "Proposal for personalized treatment of early glottic cancer with radiation therapy." *Nagoya J Med Sci* **83** (4) : 663-668.

Kaur, R., D. K. Lang, H. Singh, A. Arora, N. Garg and B. Saini (2022). "Repurposing of Various Current Medicines as Radioprotective Agents." *Anticancer Agents Med Chem*.

Nakajima, N., S. Watanabe, T. Kiyoi, A. Tanaka, K.

Suemaru and H. Araki (2015). "Evaluation of edaravone against radiation-induced oral mucositis in mice." *J Pharmacol Sci* **127** (3) : 339-343.

Okumura, H., M. Nasu and T. Yosue (2009). "Effects of amifostine administration prior to irradiation to the submandibular gland in mice: autoradiographic study using ³H-leucine." *Okajimas Folia Anat Jpn* **85** (4) : 151-160.

Sasano, N., A. Enomoto, Y. Hosoi, Y. Katsumura, Y. Matsumoto, A. Morita, K. Shiraishi, K. Miyagawa, H. Igaki and K. Nakagawa (2010). "Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations." *Cancer Lett* **293** (1) : 52-57.

Sasano, N., A. Enomoto, Y. Hosoi, Y. Katsumura, Y. Matsumoto, K. Shiraishi, K. Miyagawa, H. Igaki and K. Nakagawa (2007). "Free radical scavenger edaravone suppresses x-ray-induced apoptosis through p53 inhibition in MOLT-4 cells." *J Radiat Res* **48** (6) : 495-503.

田辺三菱製薬「ニュースリリース：ALS治療薬エダラボン 経口懸濁剤「ラジカット®」内用

懸濁液2.1%」について 日本における製造販売承認取得のお知らせ <https://www.mt-pharma.co.jp/news/2022/MTPC221223.html> (最終アクセス日:2023年3月6日)