放射線防護薬としての D 体アミノ酸の可能性

放射線ストレスと粘膜上皮傷害 唾液腺研究応用への可能性

吉川 正信

要約：頭頸部には、聴覚、嗅覚、味覚などの感覚器や口腔粘膜が含まれており、放射線照射による感覚器障害、粘膜炎、潰瘍、唾液腺障害などが頭頸部がん患者に苦痛を与えている。中でも唾液腺障害は、照射期間中から発症し、照射終了後も回復しないケースが多く、患者の QOL 低下の一因に挙げられている。半世紀以上前にチオール基を有する含硫アミノ酸のシステインが高い放射線防護作用を示すことが発見されて以来、アミノ酸を放射線防護薬とする研究は長い歴史を持つ。しかし、アミフォスチンを代表とする放射線防護薬は、毒性、腫瘍に対する防護効果などの問題があり臨床で使われることが難しい。これまでに放射線防護薬として研究されてきたアミノ酸はすべて L-アミノ酸であった。D-メチオニンは硫黄を含む求核剤であり、明白な副作用を伴うことなく、白金含有抗がん薬治療を受けている患者に対して、抗腫瘍効果を損なわず粘膜炎、聴器毒性、腎毒性などに対して予防または軽減効果を示すことが報告されている。我々のグループは D-メチオニンが低 LET 放射線である X 線照射のみならず重粒子線である炭素イオン線照射後の舌粘膜上皮細胞の菲薄化および唾液腺機能障害に対して防護効果を示すことを明らかにした。D-メチオニンによる放射線照射マウスの唾液量および生存率に対する改善効果は臨床的有用性を示唆するものであった。

1. はじめに

日本の頭頸部がんの罹患率および死亡率は近年増加しており、特に口腔・咽頭のがんの罹患率は男女ともに増加している。頭頸部がんは、耳、鼻、舌、喉頭、咽

頭、唾液腺など重要で複雑な機能を担っている器官での発生が特徴である。治療法は、機能温存が可能なこと、また頭頸部がんの多くが扁平上皮がんという放射線に対して感受性が高い組織型であることから、放射線治療が治療の第一選択肢となる場合が多い。頭頸部がんに対する放射線治療の適応は、他部位のがんに比べて多く、近年さらに増加傾向にある。

しかし照射野には、聴覚、嗅覚、味覚などの感覚器や口腔粘膜が含まれており、X 線などの低 LET (Linear Energy Transfer) ^{*1)} 放射線照射による感覚器障害、粘膜炎、潰瘍、唾液腺障害などが患者に苦痛を与えているのも事実である。

頭頸部がんに対する放射線治療の主な有害作用に口腔粘膜炎と唾液腺機能障害がある。積算線量が約 15 Gy で口腔粘膜の基底細胞に壊死が生じはじめ、約 30 Gy を超えると照射開始後 1~2 週間で粘膜の腫脹、発赤、潰瘍などとなって現れる (1)。口腔粘膜細胞に対する細胞傷害は痛み、味覚の喪失、感染症を発症するリスクが増加する。唾液腺機能障害は、照射期間中から発症し、照射終了後も回復しないケースが多い。唾液腺機能障害は、口腔粘膜炎の憎悪、口腔乾燥症による不快な口渇、ならびに発声および嚥下の困難を生じる。この過程を通して、食欲不振、体重減少、虚弱、および易感染性など QOL が低下する。現在、唾液腺障害による口腔乾燥症状の改善を目的として副交感神経作用薬のピロカルピンが臨床使用されているが副作用の点で問題がある。

医療で使用される放射線は、透過した原子の軌道電子を失わせるかあるいは追加して正 (陽) または負

キーワード：D-メチオニン、頭頸部がん、放射線、粘膜障害、唾液腺機能障害
東海大学 医学部 基盤診療学系臨床薬理学 (〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143)

E-mail: yoshikaw@is.icc.u-tokai.ac.jp 原稿受領日：2013 年 3 月 11 日、依頼原稿

Title: D-Methionine as a protector for irradiation-induced oral mucositis and xerostomia. Author: Masanobu Yoshikawa

*1) LET (Linear Energy Transfer: 線エネルギー付与): 放射線が飛跡 1 μm あたりに平均して失うエネルギーを keV 単位で表したものである。放射線が局所に与えるエネルギー量の違いを表し、線質の違いを知る指標とされる。X 線、 γ 線、 β 線 (電子線) は低 LET 放射線であり、中性子線、 α 線、重粒子線などは高 LET 放射線である。

(陰)の電荷を帯びた状態(イオン化)にする,いわゆる電離作用を有する電離放射線である.一般には電離放射線を放射線と呼ぶ.放射線照射は次に示すようなメカニズムで生体成分に障害を引き起こすと考えられている

- ① DNAなどの生体分子を電離し,分子の化学結合を切断し障害する(直接作用).
- ② 水を電離し反応性の高いラジカルを発生する.このラジカルによって生体成分に障害する(間接作用).
- ③ 被ばくした細胞から周辺の被ばくしなかった細胞へ遠隔的に被ばくの情報が伝えられる,いわゆるバイスタンダー効果(bystander effect)のような細胞間情報伝達の変化をおこす.
- ④ 放射線被ばくによって生じた初期の損傷を乗り越え生き残った細胞集団に“遺伝的不安定性”が誘導され,長期間に渡って様々な遺伝的变化が非照射時の数~数10倍の高い頻度で生じ続ける状態が続く(遅延型影響).

重粒子線はその優れた腫瘍への線量分布から,重粒子線治療による正常組織障害は通常の低LET放射線治療と比べてはるかに少ないが,X線,炭素イオン線ともに細胞致死に対する間接作用の寄与率は70%~80%との報告がある(2).

2. 放射線防護薬としてのアミノ酸

放射線治療において,腫瘍が根治するために必要な放射線線量が正常組織に影響を与えない線量(耐容線量)を上回ったときに放射線による障害が発生する.そのために,正常組織への放射線の影響をいかに減らすかが大きな課題となっている.この障害を軽減するには正常組織の放射線感受性を低下させ,腫瘍組織の放射線感受性を高めればより効果的な治療が期待できる.正常組織の放射線障害を防ぐための放射線防護薬研究は長い歴史を持つ.半世紀以上前にチオール基を有する含硫アミノ酸のシステインが高い放射線防護作用を示すことが発見されたが,吐き気や嘔吐などの有害作用が明らかとなった.システアミンを基本骨格として一連の化合物のスクリーニング研究がアメリカで大規模に行われ,アミフォスチン(WR-2721: amino-propylaminoethylphosphorothioate)が開発された.しかし,アミフォスチンは低血圧を引き起こすため投与量が制限されることとなり,広く放射線防護薬として臨床で使われるには至っていない(図1).

システインやシステアミンのチオール基は,放射線の間接作用によって生ずるラジカルの消去,ラジカルへの水素付加,酸素効果の低減などにより防護作用を

図1 放射線防護薬としてのアミノ酸

示すと考えられている.このような物質はラジカルスカベンジャーと呼ばれる.放射線防護薬は血流の少ない腫瘍への取り込みが少なく,正常組織により多く取り込まれると想定されて,選択的に正常組織の障害を軽減することが期待されている.しかし,システインやシステアミンは腫瘍にもかなり取り込まれ,正常組織に対して毒性があるため,防護作用を示す有効濃度にまで投与することが難しいといった問題がある.チオール基を持つグルタチオンは細胞の解毒機構に関与している物質であり,グルタチオン自身の毒性は少ない.しかし,抗がん薬にはグルタチオン抱合を受け細胞毒性を失うものが多いことが知られており,細胞内グルタチオン濃度が高値に維持されることが腫瘍細胞の抗がん薬耐性機構の一つとして重要な役割を果たしていることが報告されている.従って,グルタチオンを放射線防護薬として投与した場合,正常組織の放射線障害を防護する可能性はあるが,腫瘍に抗がん薬耐性を付与する可能性がある.アミフォスチンは正常組織内へは速やかに取り込まれるが,腫瘍内への取り込みが遅いという特徴がある.従って,アミフォスチン投与後数分以内に放射線照射すると,正常組織が選択的に防護されると考えられている.

アミフォスチンを代表とする放射線防護薬は,毒性,腫瘍に対する防護効果などの問題があり臨床で使われることが難しい.口腔粘膜炎ならびに唾液腺機能障害を防護する有用な薬が現在無いため,これらの障害が頭頸部がんに対する放射線治療の用量を制限する主な有害作用となっている.

3. D-メチオニン

これまでに放射線防護薬として研究されてきたアミノ酸はすべてL-アミノ酸であった.アミノ酸を化学的に合成するとL-アミノ酸とD-アミノ酸とが1:1の

比でラセミ混合物として得られる。一方、生物では細菌の細胞壁など一部の例外を除き、L-アミノ酸のみを利用していると考えられてきた。しかし、近年の分析技術の進歩によりヒトを含む高等動物においてもD-アミノ酸が存在すること、それらが重要な生理機能を有することが明らかとなってきた。たとえば、D-セリンはN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体グリシン結合部位の内在性リガンド(コアゴニスト)として記憶や学習など脳の高次機能制御などに、D-アスパラギン酸は脳ホルモンの分泌制御やテストステロンの合成促進などに働いていることが知られてきた。

L-メチオニンは含硫アミノ酸の一つで、生体内ではメチル基供与体として重要な役割を担う必須アミノ酸である。脂質代謝に関与し肝機能の維持に重要であるため、L-メチオニンはアセトアミノフェン中毒による肝障害の解毒薬として用いられている。法規上L-メチオニンは非医薬品に分類され、経口摂取する場合は高い安全性が示されている。L-メチオニンは重要な生体内抗酸化物質である還元型グルタチオン(GSH)の合成基質として働きGSHの生合成を亢進する(図2)。また、その構造中のメチルチオ基が弱いながらラジカールスカベンジャーとして活性酸素種を中和すると考えられている(図3)。腫瘍におけるアミノ酸膜輸送の亢進、タンパク質合成の亢進、メチル化反応の亢進および腫瘍のL-メチオニン依存性などにより、腫瘍ではL-メチオニンの取り込みが亢進している。この腫瘍へのL-メチオニン取り込みの亢進を利用して、 ^{11}C -L-メチオニンをポジトロン標識薬剤とするPET(Positron Emission Tomography)による腫瘍の診断が行われている。ヒトのPET全身像では ^{11}C -L-メチオニンが腫瘍へ集積するのが観察される他に、口腔粘膜、唾液腺などの口腔領域において生理的集積が認められるのが特徴である(3)。以前にL-メチオニンを放射線防護薬として用いる試みがなされてきたが、防護効果が認められなかった。

D-メチオニンはL-メチオニンの光学異性体である。D-メチオニンはD-アミノ酸化酵素(DAO: D-amino acid oxidase)により α -keto- γ -methiobutyric acidに、さらにL-phenylalanine dehydrogenaseによってL-メチオニンに代謝される(4,5)。腸管からの吸収はL-メチオニンとD-メチオニンとの間に差は認められないことが明らかにされている(6)。

我々はアカゲザルを用いたPET像の解析により、静脈注射後2分以内に ^{11}C -L-メチオニンと ^{11}C -D-メチオニンが口腔粘膜、唾液腺に分布・集積することを明らかにした。しかし、 ^{11}C -D-メチオニンは口腔粘膜、唾

図2 メチオニンからグルタチオンへの合成経路

図3 メチオニンの構造式

液腺において滞留時間、生物学的半減期のいずれとも ^{11}C -L-メチオニンに比べて長かった。

4. 放射線防護薬としてのD-メチオニンの可能性

生体における酸化ストレスをD-メチオニンが軽減するとの報告が複数のグループよりなされている(7-18)。我々は、頭頸部がんに対する放射線治療による有害作用である口腔粘膜炎症ならびに唾液腺機能障害へのD-メチオニンの防護効果について検討した。

X線(150 kV, 20 mA)、炭素イオン線(HIMAC: 290 MeV/u, 6 cm-SOBP, LET 50 keV/ μm)のC3H系雌性マウス(8週齢)頭頸部への局所照射を各々5日間行った。最終照射後2~6日目に、ピロカルピン(0.2 mg/kg)を筋注後に唾液量を測定し、組織(舌・口唇・唾液腺)を摘出した。また、舌粘膜上皮細胞厚を計測して口腔粘膜上皮に対する放射線防護効果を評価した。また照射30日後の生存マウスについても同様の評価を実施した。最終照射より6日後に舌の潰瘍が1%トルイジンブルー染色で明確に観察され、舌を摘出し、粘膜上皮厚を計測した。マウス頭頸部への照射(X線5~6 Gy/fraction; 炭素イオン線3~3.5 Gy/fraction)により、舌粘膜上皮細胞の菲薄化が観察された。低線量照射(X線3.5 Gy/fraction; 炭素イオン線2.5 Gy/fraction)では、舌粘膜上皮細胞は、むしろ肥

厚傾向が観察された。D-メチオニン（150 mg/kg）あるいはL-メチオニンは照射7分前に経口した。X線、炭素イオン線照射ともにD-メチオニン投与により非薄化が抑制されておりD-メチオニンの放射線防護効果が確認された。一方L-メチオニン投与群では放射線防護効果が認められなかった。舌粘膜上皮障害を指標としたD-メチオニンの放射線防護効果として、障害が比較的軽度である場合（照射後の舌粘膜上皮厚が非照射時の20%程度まで減少）、照射6日後の舌粘膜上皮細胞厚の比より求めた防護率は炭素イオン線、X線ともに約1.6であった。低線量照射（X線3.5 Gy/fraction；炭素イオン線2.5 Gy/fraction）での軽度な粘膜障害（舌上皮細胞の肥厚）に対するD-メチオニンの防護率は約2.0であった。すなわちD-メチオニンの防護効果は軽度な障害においてより有効であると考えられた。D-メチオニンの至摘投与タイミングについては照射前30分、7分および照射直後のD-メチオニン投与では、生食群と比べて有意な防護効果が認められたが、照射30分後の投与では防護効果は得られなかった。最も防護効果が大きかったのは、照射7分前投与であった。急性唾液腺障害に対するD-メチオニンの防護効果について検討した結果、最終照射後2日目に観察される唾液分泌量減少はD-メチオニンの併用によって緩和されることが明らかとなった。頭頸部領域への放射線照射後の口腔内正常組織障害の過程として、分割照射中に発症する唾液分泌の減少、引き続いて起こる舌を含む口腔粘膜細胞の非薄化・脱落に起因する潰瘍による摂食障害の後の死亡が予測される。そこでD-メチオニン併用炭素イオン線分割照射マウスの生存率を検討した。照射後30日での評価では、D-メチオニン併用群において有意な生存率の改善が認められた。さらに生存マウスについて唾液量、舌粘膜上皮細胞厚を測定した結果、放射線照射後数日の急性期および30日後の唾液量評価においてD-メチオニン投与群において有意な防護効果が認められた。放射線照射30日後の舌粘膜上皮細胞に対する障害は生食投与群、D-メチオニン投与群ともに回復しており、舌粘膜上皮細胞厚はともに非照射群と変わらなかった。

D-メチオニンの防護効果はX線照射および炭素イオン線照射のいずれに対しても同程度であった。先に述べたようにX線と炭素イオン線はともに細胞致死に対する間接作用の寄与率は70%～80%との報告がある(2)。従って、D-メチオニンの放射線防護効果がラジカル消去／損傷修復でないかと推測した。しかし、in vitro および in vivo 電子スピン共鳴法（electron spin resonance：ESR法）により解析した結果、D-メチオ

ニンは各種ラジカル消去能、還元力が弱いことが示された。ミトコンドリア膜保護作用によりD-メチオニンが酸化ストレスを軽減するとの報告がある(19)が、D-メチオニンの放射線防護効果の作用機序は未だ明らかになっていない。

5. まとめ

D-メチオニンはX線および炭素イオン線照射時における舌粘膜上皮細胞の肥厚・非薄化、唾液腺障害の軽減ならびに生存率を改善することを明らかにした。D-メチオニンの抗酸化能（OHラジカル、過酸化水素の消去）、還元力が弱いことを確認した。またD-メチオニンは安定ニトロキシドラジカルであるテンボールとの併用で相乗的な放射線防護効果を示すことが報告(9)されており、D-メチオニンの作用機序解明を急ぎたい。D-メチオニンによるX線ならびに炭素イオン線分割照射実験で得られた唾液量および生存率に対する改善効果は臨床的有用性を示唆するものである。今後はD-メチオニンの放射線防護効果の作用機序を明らかにするとともに、低LET放射線または重粒子線に対して有効な防護効果を示す新たな防護剤の開発も進めたいと考えている。

謝辞：本研究は米国 NIH Bruce J Baum 博士、Ana P Cotrim 博士、James Mitchell 博士、東海大学医学部臨床薬理学村山千恵子博士、放射線医学総合研究所古澤佳也博士、平山亮一博士、鶴澤玲子博士、松本謙一郎博士、富山大学医学部放射線基礎医学講座近藤隆博士、古澤之裕博士、浜松ホトニクス（株）塚田秀雄博士との共同研究により行ったものである。ここに深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Vissink A, et al. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:199-212.
- 2) Ito A, et al. Radiat Res. 2006;165:703-712.
- 3) 吉川京燦. 医用原子力だより. 2005;2:4-6.
- 4) Hasegawa H, et al. J Nutri. 2005;135:2001-2005.
- 5) Findrik Z, et al. Biotechnol Bioengineer. 2007;98:956-967.
- 6) Jacobs FA, et al. J Biol Chem. 1958;232:445-451.
- 7) Rewerska A, et al. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol. 2012;269:1-8.
- 8) Gopal KV, et al. Neurotoxicol Teratol. 2012;34:495-504.
- 9) Cotrim AP, et al. Int J Rad Oncol Biol Physic. 2012;83:1284-1290.
- 10) Clifford RE, et al. Otolaryngol. 2011;145:999-1006.
- 11) Campbell K, et al. Hearing Res. 2011;282:138-144.
- 12) Alagic Z, et al. Acta Oto Laryngol. 2011;131:802-808.
- 13) Campbell K, et al. Hearing Res. 2007;226:92-103.
- 14) Cheng PW, et al. Toxicol Appl Pharmacol. 2006;215:228-236.
- 15) Takumida M, et al. Acta Otolaryngol. 2003;123:8-13.
- 16) Ekborn A, et al. Hearing Res. 2002;165:53-61.
- 17) Takumida M, et al. ORL. 2002;64:143-147.
- 18) Kover KD, et al. Otolaryngol. 2002;126:683-689.
- 19) Vuyyuri SB, et al. Clin Cancer Res. 2008;14:2161-2170.