

【原著】

X線照射がラット肺胞線維芽細胞のエラスチンへ及ぼす影響

北山義尚^{*1} 白戸佑貴^{*2} 椎谷賢^{*1} 嵯峨涼^{*3} 寺島真悟^{*3} 細川洋一郎^{*3}
敦賀英知^{*3}

(2019年6月13日受付, 2019年8月30日受理)

要旨: 弾性線維は全身に広く分布する細胞外基質の1つである。これまで肺胞の弾性線維がX線照射によって分解することは報告されていない。そこで、肺胞の線維芽細胞を用いた細胞培養系により、弾性線維にX線を10Gy, 20Gy, 30Gy照射した。その結果、X線照射後12時間では弾性線維の分解は観察されなかったが、24時間後では有意な分解傾向が観察された。本研究により肺胞の弾性線維がX線により分解することが示唆された。

キーワード: 放射線肺炎, 肺胞, 弾性線維

I. はじめに

近年、日本での人口動態統計によるがん死亡データでは、男女計のがん部位別において、肺がんによる死亡者が最も多い¹⁾。肺がん患者への放射線治療の役割は、根治目的胸部放射線治療、術前術後照射、再発転移に対する緩和照射など多岐にわたる。肺がんに対する放射線治療では、直線加速器による6~10MVのX線を用い、CTシミュレーションによる3次元的治療計画にて不均質補正を用いて行い、必要に応じて適切な呼吸性移動対策を行う^{2) 3)}。放射線治療に用いられるX線は、腫瘍だけではなく正常組織においても損傷を引き起こす。正常肺組織の放射線障害には、早期障害である放射線肺炎と、晩期障害である放射線誘発性肺線維症がある。放射線肺炎では多くの病変が限局性だが、患部の範囲が広いときは重篤な症状となり死亡することもある。放射線肺炎の定義はいまだ完全には定義づけされていないが、損傷を受けた肺組織と、感染症を伴う炎症の組み合わせと考えられている⁴⁾。放射線肺炎の原因として、肺組織の肺胞の損傷が挙げられている^{4) 5) 6)}。

肺の末梢にある肺胞は伸縮性と弾性を有し、呼吸運動により肺は膨張する。呼吸は肋間筋や横隔膜が動くことで肺が受動的に膨らむことで空気を取り入れ、肺自身の弾性によって縮むことで空気を吐き出す。このように肺は呼吸により大きく構造が変化するため、呼吸作用には伸縮性と弾性を生み出す弾性線維が必要となる⁷⁾。肺胞の弾性線維の形成は、初めに糖タンパク質であるフィブリリン分子が肺胞線維芽細胞から分泌され、分子間でトランスグルタミナーゼにより架橋結合を起こし微細線維を形成する。その後、

リジロキシターゼが作用することにより、肺胞線維芽細胞から分泌されるトロポエラスチンが互いに架橋結合を起こしながら微細線維の束に沈着することで弾性線維が形成される^{8) 9) 10)}。肺胞弾性線維の破壊により、肺炎および肺気腫様症状が生じることが報告されている^{11) 12)}。放射線治療の際の肺照射体積によって、放射線治療の副作用である放射線肺炎の発生が起こりうる線量に変化する。線量の変化については、照射体積が全肺の1/3(%)であると45Gyであるのに対し、2/3(%)であると30Gyで放射線肺炎が生じ得ると日本腫瘍学会ガイドラインで報告されている¹³⁾。しかし、肺胞の弾性線維がX線照射によって分解されるか否かを解析した報告はない。そこで、X線照射後のラット肺胞線維芽細胞が形成した弾性線維のX線照射による変化を、細胞培養系を用いてトロポエラスチンの蛍光免疫染色により解析する。

II. 方法

1. 培養細胞およびX線照射

培養細胞はラット肺胞線維芽細胞 (RFL-6; Health Protection Agency, Salisbury, UK) を培養細胞として用いた。培養培地は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA) とし、仔牛血清 (Gibco, Massachusetts, USA) を10%となるように添加し、また抗生物質 (Penicillin: 100unit/ml, Streptomycin: 100µg/ml) (Roche, Basel, Switzerland) を1%となるように添加した。細胞をインキュベータ (MCO-5AC-PJ, SANYO, Osaka, Japan) にてCO₂を5%とし、37°C環境

*1 弘前大学大学院保健学研究科博士前期課程
Master's Course in Hirosaki University Graduate School of Health Science
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan
*2 弘前大学大学院保健学研究科博士後期課程
Doctor's Course in Hirosaki University Graduate School of Health Science
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111

66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan
*3 弘前大学大学院保健学研究科
Hirosaki University Graduate School of Health Science
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

Correspondence Author tsuru@hirosaki-u.ac.jp

下でコンフルエントになるのを観察後、4週間培養した。4週間培養した時点で、X線発生装置(MBR-1520-R-3, HITACHI, Tokyo, Japan)を用いて10Gy, 20Gyまたは30GyのX線照射を行った。X線の照射条件は管電圧150kVp, 管電流20mA, 線量率0.99~1.01Gy/min, フィルタを0.5mmAl+0.3mmCuと設定した。

2. 蛍光免疫染色

X線照射後12時間および24時間の細胞を5分間、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(Wako, Osaka, Japan)を用いて固定を行った。1次抗体(PR393; anti-human tropoelastin antibody, rabbit polyclonal)(Elastin Product Companies, Missouri, USA)を2000倍希釈で添加し、室温にて12時間インキュベートした。その後、2次抗体(Alexa Fluor® 488-labeled anti-rabbit IgG antibody, goat polyclonal)(Life technology, California, USA)を添加し、アルミホイルにて遮光を行い、室温にて2時間インキュベートした。その後、DAPI染色を行い、蛍光顕微鏡(IX71N-22PH, Olympus, Osaka, Japan)にて観察を行った。

3. 細胞数の計数

X線照射24時間後のラット肺胞線維芽細胞を0.25%トリプシン処理し、60φ培養皿(MS-11600, Sumitomo Bakelite Co, Tokyo, Japan)にDMEMを1ml添加した後、細胞を回収し、遠心分離器(IEC61010-2-020, KUBOTA, Osaka, Japan)を用い、10round/minとして、3分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清をアスピレートし、DMEMを添加した。その後、生細胞数の計数を行った。

4. 面積解析

蛍光免疫染色にて得られた染色像を、Image Jにて面積解析を行った。面積解析で得られた値をTurkey-Kramer法, Scheffe's F test法, Bonferroni/Dunn法を用いて検定を行い、その分散に関して一元配置分散分析法を用いて分析し、グラフを作成した。

III. 結果

1. ラット肺胞線維芽細胞が形成したエラスチンの免疫染色像およびDAPI染色像とX線照射による変化

最初に、ラット肺胞線維芽細胞を培養しコンフルエント後、4週間培養し、エラスチンの免疫染色により弾性線維が形成され連続したエラスチンの染色像を観察した。ラット肺胞線維芽細胞を4週間培養した後、X線を10Gy, 20Gy, 30Gyと照射を行った。照射後12時間では、すべての線量で連続したエラスチン陽性像が観察された(図1)。エラスチン陽性部位の面積解析を行った結果、非照射群と照射群にて有意な差は認められなかった(図2)。照射後24時間

では、すべての線量で、エラスチン陽性部位の減少が観察された(図3)。また、エラスチン陽性部位の面積解析を行った結果、線量依存的に陽性部位の面積は減少し、非照射群と照射群にて有意な差が検出された(図4)。さらに、DAPI染色では、X線照射後12時間および24時間後においても、核の変化や細胞の膨潤などの変化は観察されなかった(図1, 図3)。

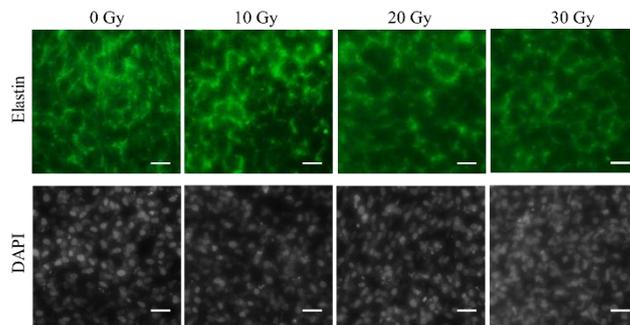


図1 X線照射後12時間後のエラスチンの免疫染色像およびDAPI染色像

非照射および10Gy, 20Gy, 30Gy照射群でのエラスチンの免疫染色像を上段に示す。非照射および10Gy, 20Gy, 30Gy照射群での核の染色像をDAPI染色にて下段に示す。スケールバーは50µmである。

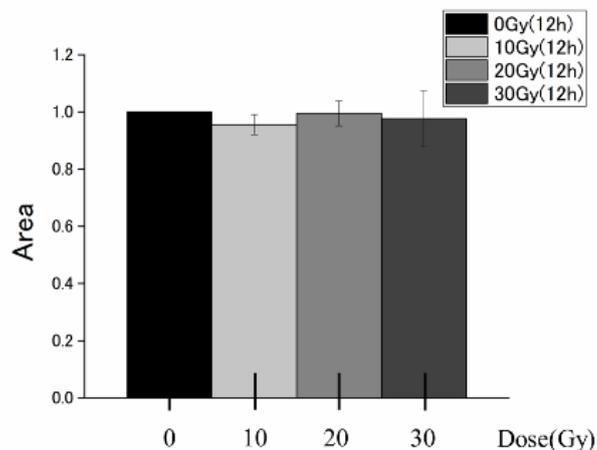


図2 X線照射後12時間後のエラスチンの免疫染色像の面積解析

非照射および10Gy, 20Gy, 30Gy照射群でのエラスチンの免疫染色像の面積解析を行い、X線照射によるエラスチンの免疫染色像の面積の変化を示す。非照射群をコントロールとする。コントロール群はn=8, その他の群もn=8である。データはコントロール群を1と規格化した後、平均値±標準偏差で示している。コントロール群と照射群とで有意な差は認められない。

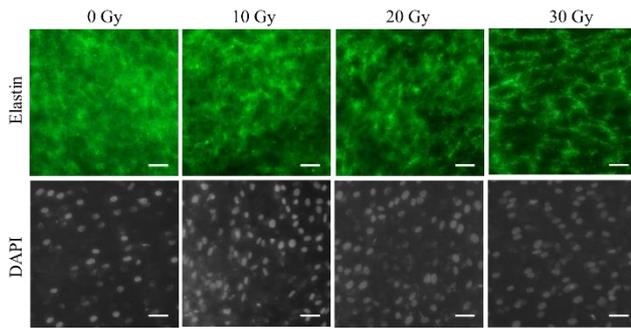


図3 X線照射後24時間後のエラスチンの免疫染色像および核染色像

非照射および10Gy, 20Gy, 30Gy照射群でのエラスチンの免疫染色像を上段に示す。非照射および10Gy, 20Gy, 30Gy照射群での核の染色をDAPI染色にて下段に示す。スケールバーは50 μ mである。

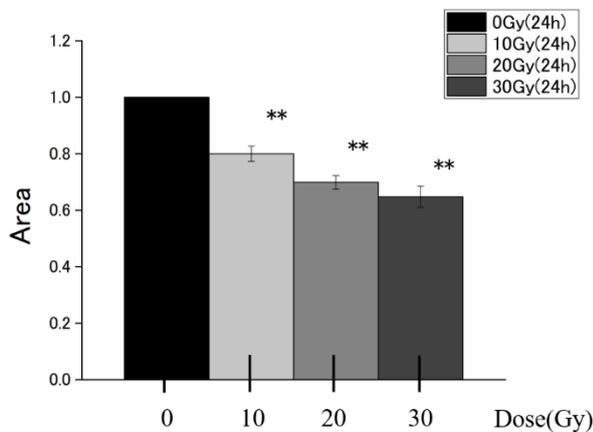


図4 X線照射後24時間後のエラスチンの免疫染色像の面積解析

非照射および10Gy, 20Gy, 30Gy照射群でのエラスチンの免疫染色像から、面積解析を行い、X線照射によるエラスチンの免疫染色像の面積の変化を示す。非照射群をコントロールとした。コントロール群はn=8, その他の群もn=8である。データはコントロール群を1と規格化した後、平均値±標準偏差で示している。**は非照射群(0Gy)と照射群(10Gy, 20Gy, 30Gy)に対してP値を0.01と定め、有意差がみられたことを示す。

2. X線照射後の細胞数の変化

ラット肺胞線維芽細胞を培養しコンフルエント後、4週間培養した後、X線を10Gy, 20Gy, 30Gyと照射を行った。24時間後の生細胞数を計数した(図5)。全ての照射群において対照群(0Gy)に対して細胞数に有意な差は見られなかった。

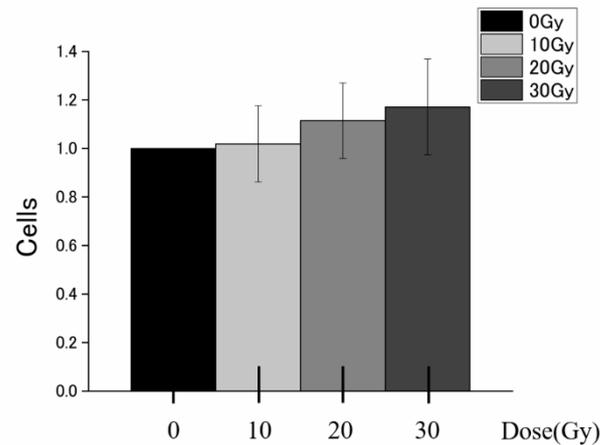


図5 X線照射後24時間後のRLFの細胞数

非照射および10Gy, 20Gy, 30Gy照射群でのラット肺胞線維芽細胞の細胞数を示す。非照射群をコントロールとする。コントロール群はn=8, その他の群もn=8である。データはコントロール群を1と規格化した後、平均値±標準偏差で示す。コントロール群と照射群とで有意な差は認められない。

IV. 考察

本研究では、ラット肺胞線維芽細胞の形成した弾性線維を対象として、X線照射が弾性線維の分解に与える影響に関して解析することを目的とした。コンフルエント後のラット肺胞線維芽細胞をさらに4週間培養すると連続した弾性線維が形成される。その弾性線維にX線を10Gy, 20Gy, 30Gyと照射を行い、その12時間および24時間後と時間経過による線維の分解について、エラスチンの免疫染色像から面積解析を行った。弾性線維の形成過程で、細胞が分泌するトロポエラスチンは微細線維上で互いに架橋結合することによりエラスチンとなり弾性線維が成長する。免疫染色に使用した1次抗体である抗トロポエラスチン抗体は、弾性線維のエラスチンに反応することが知られている¹⁴⁾。その結果、エラスチンの24時間後の免疫染色像から、エラスチンの減少が確認された(図3)。また、面積解析を行った結果、非照射群と照射群にて、有意な差を検出した(図4)。この結果から、X線照射後24時間では、X線照射により有意に弾性線維の分解がなされることが明らかとなった。

これまで、弾性線維のターンオーバーは非常に遅いと考えられてきた¹⁵⁾。弾性線維の分解機構として、X線照射によって培養シャーレ中に生じたReactive oxygen species (ROS)やMatrix metalloproteinase (MMP)の関与が考えられる。酸化ストレスにより生成された酸化剤が、新たに合成されたトロポエラスチンを修飾し、トロポエラスチンのフィブリリン2分子やMAGP-1分子への凝集を阻害したという報告がある¹⁶⁾。そのため、X線照射により生じた

ROS がトロポエラスチンの微細線維への凝集を阻害したと考えられる。また、MMP に関して、MMP-1, 2, 7, 9, 12 がコラーゲンとエラスチンを含む様々な細胞外マトリックスを分解するプロテアーゼであるという仮説がある¹⁷⁾。これまでの報告では、エラスチンを基質とする MMP は MMP-3, 9, 10, 12 である¹⁸⁾。更に、トロポエラスチンが沈着する足場である微細線維を構成するさまざまな分子も MMP の基質となっている^{16, 17, 19)}。このことから、エラスチンの沈着の足場である微細線維が分解されることによりエラスチンの沈着が抑制されたということも一因として考えられる。さらに、本実験と同一細胞のラット肺胞線維芽細胞を用いた実験において、MMP-9 の発現が観察され ProMMP-9 の活性化がザイモグラフィにて観察されたという報告がある²⁰⁾。また、ヒト血管平滑筋細胞が発現した ProMMP-2, ProMMP-9 が、マクロファージ由来の泡沫細胞から生じた ROS により活性化されたという報告もある²¹⁾。この二つの報告から、X 線照射により生じる ROS が、ラット肺胞線維芽細胞の産出した MMP-9 に作用することにより、MMP-9 が活性化し弾性線維の分解に至ったとも考えられる。

エラスチンの 12 時間後の免疫染色像から、エラスチンの減少が確認されなかった (図 1)。また、面積解析を行った結果、非照射群と照射群にて、有意な差は検出されなかった (図 2)。以上の結果から、X 線照射後 12 時間の時点ではエラスチンの分解が観察されないことが明らかとなった。このことから X 線照射から、12 時間以降にエラスチンの分解がなされると考えられる。ここで、ヒト皮膚線維芽細胞において、X 線照射によって生じる ROS は、X 線照射後 6 時間にて有意な増加がみられないという報告がある²²⁾。このことにより、X 線照射によりエラスチンの分解に関して ROS の関与は少ないと考えられる。MMP に関しては、活性化までの時間が必要であり、さらに、一度架橋結合したエラスチンは可溶化されにくいことから²²⁾、12 時間以内には分解が確認されなかった可能性がある。

X 線照射 12 時間および 24 時間後の DAPI 染色像の結果から、X 線照射後による核の変化はみられなかった。二本鎖切断修復能が正常なヒト線維芽細胞では、X 線 10Gy を照射後 24 時間では生存率に有意差がなかったという報告がある²³⁾。そのため、核の膨潤等が観察されなかったと考えられる。また、X 線照射後 24 時間において、ラット肺胞線維芽細胞の照射群と非照射群とで有意な細胞数の差が認められなかったことは、ヒトおよびラット線維芽細胞は X 線に対して、この条件下では高い感受性を示さなかったと考えられる (図 5)。

V. おわりに

本研究では、ラット肺胞線維芽細胞が形成した弾性線維を蛍光免疫染色にて観察し、X 線照射により弾性線維の陽性像の減少が確認された。このことから、X 線照射により肺胞の弾性線維が分解されることが示唆された。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

引用文献

- 1) 厚生労働省：人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報部編）. 2017.
- 2) 有路貴樹, 大西洋, 奥村雅彦：呼吸性移動を伴う放射線治療に関するガイドライン. 公益社団法人日本医学物理学会 2012.
- 3) Chun SG, Hu C, Choy H et al : Impact of intensity-modulated radiation therapy technique for locally advanced non-small-cell lung cancer : A secondary analysis of the NRG oncology RTOG 0617 randomized clinical trial. *J Clin Oncol*, 35 : 56-62, 2017.
- 4) Li M, WenFeng Y, QiWen L et al : Subjective global assessment (SGA) score could be a predictive factor for radiation pneumonitis in lung cancer patients with normal pulmonary function treated by intensity-modulated radiation therapy and concurrent chemotherapy. *Clin Lung Cancer*, 19 : 211-217, 2018.
- 5) Tsoutsou PG, Koukourakis MI : Radiation pneumonitis and fibrosis : mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 68 : 1281-1293, 2006.
- 6) Thomas JG, Gary WH. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 345 : 517-525, 2001.
- 7) Sonia IM, Macro S, Johannes CS. Developmental alveolarization of the mouse lung. *Dev Dyn*, 237 : 2108-2116, 2008.
- 8) Judith TC, Catherine MB, Elaine CD et al. Fibrillins, fibulins, and matrix-associated glycoprotein modulate the kinetics and morphology of in vitro self-assembly of a recombinant elastin-like polypeptide. *Bio Chem*, 47 : 12601-12613, 2008.
- 9) Jessica EW, Robert PM. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res*, 81 : 229-240, 2007.
- 10) Tsuruga E, Yajima T. Elastic system fibers-molecular properties of tropoelastin and microfibrils. *J Dent Res*, 43 : 119-122, 2007.
- 11) Kida K, Thurlbeck WM. The effects of beta-aminopropionitrile on the growing rat lung. *Am J Pathol*, 101 : 693-710, 1980.
- 12) Adrian S, Anthony GD, Russell HK et al. Elastin protein levels are a vital modifier affecting normal lung development and susceptibility to emphysema. *Am J Phys Lung Cell Mol Phys*, 292 : 778-787, 2007.
- 13) Lawrence BM, Ellen DY, Andrew J et al. The use of normal tissue complication probability (NTCP) models in the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 76 : 10-19, 2010.
- 14) Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y et al. Tropoelastin expression by periodontal fibroblasts. *J Dent Res*, 81 : 198-202, 2002.
- 15) Matthew PC, Vera LC, Martins EA et al. Metalloproteinases and wound healing. *Adv Wound Care*, 4 : 225-234, 2015.
- 16) Kamal A, Thomas JB, Ming M et al. Oxidative and nitrosative

- modifications of tropoelastin prevent elastic fiber assembly in vitro. *J Biol Chem*, 285 : 37396–37404, 2010.
- 17) Hauntamaki RD, Dale K, Kobayashi RM et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke–induced emphysema in mice. *Science*, 277 : 2002–2004, 1997.
 - 18) Vera LM, Matthew C, Edel A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351 : 255–268, 2013.
 - 19) Shiroto Y, Terashima S, Tsuruga E et al. The effect of ultraviolet B on fibrillin–1 and fibrillin–2 in human non–pigmented ciliary epithelial cells in vitro. *Acta Histochem Cytochem*, 50 : 105–109, 2017.
 - 20) Vaideesh P, Nasim N, Aniq C et al. Pentagalloyl glucose increases elastin deposition, decreases reactive oxygen species and matrix metalloproteinase activity in pulmonary fibroblasts under inflammatory conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 30 : 24–29, 2018.
 - 21) Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S et al. Reactive oxygen species produced by macrophage–derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*, 98 : 2572–2579, 1996.
 - 22) Hongying YN, Kathryn AD. Medium–mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X–ray–irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene*, 24 : 2096–2103, 2005.
 - 23) Edward GC, Mark AG. Elastin–associated microfibrillar proteins. *Int Rev Connect Tissue Res*, 10 : 97–209, 1983.
 - 24) Meng H, Terao T, Kimura H. Apoptosis induced by X–rays and chemical agents in murine fibroblastic cell lines with a defect in repair of DNA double–strand breaks. *Int J Radiat Biol*, 73 : 503–510. 1998.

【Original article】

The effect of X-ray irradiation on elastic fibers formed by rat lung fibroblasts in vitro

YOSHITAKA KITAYAMA^{*1} YUKI SHIROTO^{*2} SUGURU SHIYA^{*1}
RYO SAGA^{*3} SHINGO TERASHIMA^{*3} YOICHIRO HOSOKAWA^{*3}
EICHI TSURUGA^{*3}

(Received June 13, 2019 ; Accepted August 30, 2019)

Abstract : Elastic fibers are one of the extracellular matrices, which distribute throughout human organizations. It had not been reported that the elastic fibers in the lung alveoli are degraded by X-ray irradiation. Therefore, in this study, we performed to examine whether the elastic fibers are degraded by X-ray irradiation or not. We cultured lung fibroblasts for 4 weeks and examine the degradation of elastin after X-ray irradiation using immunofluorescence. Elastic fibers were irradiated with X-rays at 10, 20, and 30 Gy. As a result, the elastic fibers were not degraded by 12 hours after X-ray irradiation. However, at 24 hours after X-ray irradiation, we observed the tendency that elastic fibers were degraded by X-ray irradiation. These results suggest that the elastic fibers in lung alveoli were degraded by X-rays.

Keywords : radiation pneumonia, alveoli, elastic fiber