

エダラボンによる放射線感受性の修飾

笹野仲史

研究の背景

高齢化社会を迎えて、癌による死亡者は増加してきている。癌の治療法には、手術、放射線治療、化学療法があるが、近年は放射線治療や化学療法の占める割合が増えてきており、幅広く利用されるようになってきている。癌の放射線治療においては、正常組織への副作用が問題になる場合があり、正常組織の副作用を減らしつつ、腫瘍組織の治療効率を上げることができるように様々な工夫がなされている。その一つとして、照射装置を改善することにより達成される物理的方法がある。その中に定位照射があるが、これは標的を正確に固定して、三次元の多方向から照射することにより、病変部へ線量を集中させる方法である。また、最近では、IMRT(intensity modulated radiation therapy; 強度変調放射線治療)により、病変部へ放射線を集中して照射し、周囲の正常組織への照射線量を極力減らす治療が行われるようになってきている(1)。また、陽子線のようにブラッグピークのある放射線や(2)、重粒子線などの高LET(linear energy transfer)放射線を用いることにより(3)、治療効率を上げることも行われてきている。ただし、病変への根治線量が接する正常組織の耐容線量を超える場合などは、正常組織への副作用なしに腫瘍を根治できない。このような場合、正常組織の放射線感受性を低下させるか、腫瘍組織の放射線感受性を増加させることができれば、正常組織の副作用なしに腫瘍を根治できると考えられる。その一つの手段として、放射線防護剤、放射線増感剤などが考えられている。

現在の放射線防護剤、放射線増感剤の現状を述べる。アミフォスチンが米国食品医薬品

局(U. S. FDA; U. S. Food and Drug Administration)で放射線防護剤として唯一認可された薬剤であり、耳下腺が照射された時に起こる口腔内乾燥症の予防目的でのみ保険使用が許可されている(4)。ただし、嘔気などの副作用があり、臨床的に広く使用されていないのが現状である。一方、放射線増感剤としては、シスプラチンや 5-FU などの抗癌剤を放射線と同時期に投与することにより、相乗効果があるとされており、広く用いられている(5)。

また、*in vitro* のレベルでは wortmannin が DNA 修復系を阻害することにより放射線増感作用を示す薬剤として知られているが(6)、副作用のため臨床使用には至っていない。このように、放射線防護剤や放射線増感剤の開発は目覚ましく進んでいるとは言えない現状である。

新しい放射線防護剤や放射線増感剤を開発するに当たって、放射線により細胞死がどのような分子機序で起こるのか理解する必要があるので、現状で一般的に知られていることを述べる。X 線照射による細胞死は、直接効果、間接効果の二つの効果からなる(7)。直接効果では、X 線は細胞内の DNA などの巨大分子を電離、励起し、その分子を切断して、細胞傷害を引き起こす。間接効果では、X 線はまず細胞内の水分子を励起させ、ROS (reactive oxygen species) を産生し、その ROS が細胞内機能分子を損傷し、細胞を傷害する。ROS は水があればどこでも産生されるが、放射線による細胞死においては、細胞内で産生された ROS が重要である。通常、臨床的で放射線治療として使われる線量域においては、60-70% の細胞傷害が間接効果によると言われている(8)。X 線により引き起こされる DNA 損傷は、

1 本鎖切断、2 本鎖切断、塩基損傷、塩基遊離、架橋形成などに分けられる。これらは細胞死や突然変異の原因となる。2 本鎖切断は 1 本鎖切断よりも生じにくく、10 倍以上のエネルギーを必要とするが、細胞にとって致命的な障害となる。X 線により致命的な傷害を受けた細胞は、増殖死または間期死により細胞死を起こす(9)。増殖死は、活発に細胞分裂している細胞が放射線照射を受けた後に数回の分裂を経てから死に至るものであり、骨髄や腸の幹細胞、腫瘍細胞、培養細胞など盛んに分裂している細胞で見られる。間期死は、間期にある細胞が放射線照射を受けた後、分裂することなく死に至るものである。もはや細胞分裂を行わない神経細胞、筋細胞などの分化した細胞で間期死は見られ、細胞分裂している細胞でも分裂死が起こる線量よりもさらに大きな線量が与えられると間期死が起こる。これらを低感受性間期死という。一方、リンパ球や卵母細胞などでは低線量の照射で間期死が見られ、これを高感受性間期死として区別している。T 細胞の大部分は、X 線照射によりアポトーシスと呼ばれる高感受性間期死を起こす(10, 11)。アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、生体の恒常性を保つために非常に重要であると考えられている。ROS は放射線によるアポトーシスの誘導に重要であるとされており(12)、中でもヒドロキシルラジカルが最も重要であるとされている。

アポトーシスは様々な細胞内伝達物質を介して起こることが知られている。特に、MOLT-4 細胞(ヒト T 細胞白血病細胞株)においては、p53 と JNK(c-Jun N-terminal kinase) の経路が放射線によるアポトーシスに関わっていることが示されている(13-16)。中でも

p53 は非常によく研究されている転写因子であり、その細胞内での動態により、細胞傷害後の細胞の運命が変わってくる。すなわち、DNA 傷害が起こった後、p53 はリン酸化されるなどして安定化し、蓄積し、多くの標的分子を活性化することにより、アポトーシスの促進や細胞周期の制御にかかわっている。p53 により活性化される標的分子に PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis)(17)、p21^{WAF1}(18)などがある。PUMA はアポトーシスを制御する BH3-only protein に属し、p53 を介したアポトーシスにおいて、重要な役割を果たす(17, 19-21)。p21^{WAF1} は、サイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase; CDK)阻害剤で、放射線照射後の細胞周期制御、特に G₁ 停止に重要な役割を果たす(22, 23)。細胞は放射線照射されると、分裂頻度の低下や細胞周期の延長が見られ、分裂が遅延する。細胞には細胞周期の進行状況や DNA 損傷の有無をチェックするための機構が備わっており、これを細胞周期チェックポイントという。チェックポイントは、細胞周期の様々な段階に備わっており、G₁ 期チェックポイント、S 期チェックポイント、G₂ 期チェックポイントなどがある。これらのチェックポイントで異常が発見されると、DNA 修復を行うため、細胞分裂の進行が一時的に停止し、細胞分裂遅延が起こる。照射された腫瘍細胞で p21^{WAF1} が欠如していると、おそらく傷害負荷状態で細胞周期を止めることができないために、p53 を介したアポトーシスが起こることが報告されている(21, 24-27)。さらにこれらの下流の経路にはカスパーゼがある。カスパーゼはシステインプロテアーゼであり、細胞のアポトーシスの時に活性化される(28)。カスパーゼは前駆体として産生され、分割されることにより

活性化されることが知られている。中でもカスパーゼ 3、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7 はアポトーシスの実行分子（エフェクターカスパーゼ）と言われている(29)。エフェクターカスパーゼによって基質が切断されることは細胞の重要な構成要素を切断するのに必要であり、その結果としてアポトーシスに特徴的な形態学および化学的变化、すなわち、細胞骨格の再編成、核の凝集、DNA の断片化などが引き起こされる。また、Bcl-2 は、ストレスなどによるアポトーシスの際に、ミトコンドリアの膜透過性に影響を与え、ミトコンドリアからのチトクローム c などのたんぱく質の放出を抑えることにより、アポトーシスを抑制することが知られている(30)。ここまでの細胞内伝達経路を纏めると、図 1 のようになる。この経路のどこかを遮断することが出来れば、細胞のアポトーシスを抑制することができ、細胞の生存率を改善できる。

エダラボン (MCI-186; 化学名; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one; 商品名; ラジカット; 分子量 174.20) は、臨床的に脳梗塞の治療薬として広く用いられている薬剤である。*in vivo*(31-44), *in vitro*(45, 46), 臨床(47-50)のいずれにおいても、脳梗塞の治療に有効であると報告されている。エダラボンは電子供与型のフリーラジカルスカベンジャーであり(51-53)、放射線防護に有効である可能性があると考えられる。実際に、安西らが、マウスの腹腔内にエダラボンを投与することにより、マウスの LD_{50/30}(lethal dose; 照射 30 日以内に 50%の個体が死ぬ線量)が増加し、エダラボンに放射線防護効果があることを報告した(54)。その報告では、実験に使われた X 線線量は 10 Gy 以下であることから、エダラボン

の放射線防護効果は恐らく主に骨髄細胞の死を抑えることによって達成されていると考えられている。放射線による骨髄細胞の死は、主にアポトーシスによって起こるため(55)、エダラボンは骨髄細胞のアポトーシスを抑制していると予想される。しかし、エダラボンの放射線防護効果の詳細な分子機構などは解明されていない。詳細な分子機構を解明して、エダラボンがいずれ臨床的に放射線防護剤として使用される手助けになるような研究を行いたいと考えた。特にエダラボンは実際に臨床使用されている薬剤であることから、放射線防護剤としての臨床使用の実現可能性も高いと考えた。

今回の実験では、エダラボン投与が放射線による細胞のアポトーシスに与える影響を、*in vitro* で解析した。今回は、主に MOLT-4 細胞を用いて実験を行った。MOLT-4 細胞を選んだのは、X 線に非常に感受性が高く、照射後に DNA の断片化と核の濃縮で特徴づけられるアポトーシスを高率に起こすので(56-59)、今回の実験に使う細胞として適切であると考えたためである。今回の実験で、エダラボンが MOLT-4 細胞のアポトーシス経路(図 29)において、どの部分に作用してアポトーシスに影響を与えているのかについても実験し、解析した。

材料と方法

細胞培養

ヒト T 細胞白血病細胞株 MOLT-4、および siRNA(short-interfering RNA)により short hairpin type の p53 を過剰発現させた MOLT-4 細胞(p53 ノックダウン MOLT-4)、および p53-Luc1 プラスミドを過剰発現させた MOLT-4 細胞(MOLT/p53-Luc-1)、およびヒト前 B 細胞白血病細胞株 Nalm-6 は、5%FBS (fetal bovine serum; Hyclone 社)と抗生物質 (ペニシリン/ストレプトマイシン) を含む RPMI-1640 を培地として、37°C で 5%CO₂ と 95%空気の混合気体の中で培養した。

ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 は、5% FBS (Hyclone 社) と抗生物質 (ペニシリン/ストレプトマイシン) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma 社) を培地として、37°C で 5%CO₂ と 95%空気の混合気体の中で培養した。

p53 ノックダウンの MOLT-4 細胞を産生するために、エレクトロポレーション (Gene Pulsar II, Bio-Rad; 0.25 kV, 950 マイクロファラド) により、MOLT-4 細胞に ApaLI-linearized ベクター (Gene Suppressor System, p53 siRNA プラスミドとネガティブコントロールの p53 shRNA プラスミド, IMGENEX) を導入し、0.8 mg/ml の G418 を含む 0.16%寒天培地で 3 週間かけて目的の細胞を選択した。MOLT/p53-Luc1 細胞を産生するために、エレクトロポレーション (Gene Pulsar II, Bio-Rad; 0.25kV, 950 マイクロファラド) により、MOLT-4 細胞に p53-Luc1 プラスミドとネオマイシン耐性遺伝子ベクター

(pcDNA3.1, Invitrogen)を共に導入し、0.4 mg/ml の G418 を含む 0.16%寒天培地で 3 週間かけて目的の細胞を選択した。

化学薬品

エダラボンは田辺三菱製薬株式会社（東京）から原末を提供された。52.5 mg のエダラボン原末を 192.5 μ l の 2 M の NaOH で溶解した後、1.05 ml の蒸留水を加え、約 52.5 μ l の 2 M の HCl で pH を約 8.8 に調製した後、生理食塩水で 30 mg/ml の濃度になるように調製したものをを用いた。

ロスコビチン(Roscovitine)は薬剤性の CDK 阻害剤である(60)。ロスコビチンは Calbiochem 社（サンディエゴ）から購入した。DMSO(dimethylsulfoxide)を溶媒として、10 μ M の濃度で、照射前に投与した。

X線照射

X線照射は島津社の Pantak HF 350 で、200 kVp、200 mA で 0.5 mm の Cu と 1 mm の Al のフィルター使って、135-140 cGy/min の線量率で行った。

色素排除試験

100 μ l の細胞培養液(約 5×10^5 細胞/ml)と 25 μ l の 1%エリスロシン B を含む

PBS(phosphate-buffered saline)を混合して、2分後に生細胞（染色+）と、死細胞（染色-）

を顕微鏡下で計数した。生存率は以下の式で求めた。

$$\text{生存率(\%)} = (\text{生細胞数}) / (\text{総細胞数}) \times 100$$

Annexin V-PI 染色

アポトーシスを Annexin V-FITC(fluorescein isothiocyanate)と PI(propidium iodine)の二重染色にて測定した。測定は、MBL 社の MEBCYTO アポトーシスキットを用いて行われた。第 1 象限(低 FITC/高 PI)は二次ネクローシス、第 2 象限(高 FITC/高 PI)は一次ネクローシス、第 3 象限(低 FITC/低 PI)は生存、第 4 象限(高 FITC/低 PI)は早期アポトーシスの細胞として、EPICS フローサイトメーター(XL System II; Beckman Coulter)で計数された。5000 個以上の細胞が計数された。

細胞内 ROS の測定

細胞内 ROS の測定は Molecular Probe 社の CM-H₂-DCFDA (chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) を用いて行われた(61)。
CM-H₂-DCFDA は、細胞内で産生された ROS を調べるために開発された化合物である。
この化合物は非蛍光物質であるが、細胞内に入り、細胞内エステラーゼにより脱アセチル

化され、さらに ROS 存在下で酸化されると蛍光物質に変化する。この蛍光をフローサイトメトリーにて検出することにより、細胞内 ROS を間接的に定量することができる。MOLT-4 細胞は約 5 μ g/ml の CM-H₂-DCFDA プローブとともに暗所で約 1 時間培養され、EPICS フローサイトメーター(XL System II; Beckman Coulter)で励起波長 492-495 nm、消退波長 517-527 nm で測定された。

ウエスタンブロット

細胞を SDS(sodium dodecyl sulfate) サンプルバッファ(1% SDS, 3% β -mercaptoethanol, 5% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8)で溶解した。タンパク質は 10% または 15% の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分離し、polyvinylidene difluoride 転写膜(Immobilon, Millipore 社)に転写した。この転写膜を 5% スキムミルクを含む TBS (Tris-buffered saline, 29 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.6)に 0.05% の Tween-20 を混ぜたもの(TBS-T)で 30 分ブロッキングした後、4°C で 5% スキムミルクを含む TBS-T に一次抗体を加えたもので一晩インキュベートした。一次抗体は、抗 p53 抗体 (clone DO-1, Santa Cruz Biotechnology)、抗 p53 リン酸化抗体 Serine15 (Calbiochem)、Serine6, 9, 20, 392 (Cell Signaling)、抗分割カスパーゼ 3 抗体 (Cell Signaling)、抗カスパーゼ 7 抗体 (MBL)、抗 p21^{WAF1} 抗体 (Calbiochem)、抗 Bcl-2 抗体 (Pharmingen)、抗 β アクチン抗体(Sigma, AC-15)、抗 PUMA 抗体 (Calbiochem)を用いた。

TBS-T で抗体を 3 回洗った後、5%スキムミルク入り TBS-T に horseradish peroxidase (DAKO)を接合した二次抗体を加えたもので、室温で 2 時間インキュベートした。転写膜は、その後、TBS-T で 3 回、TBS で 1 回洗った後、ECL-plus キット(GE Healthcare)で蛍光標識した。シグナルは X 線フィルム(Hyperfilm MP; GE Healthcare)に焼きつけて画像化した。本来であればβアクチンをコントロールたんぱく質としてすべての実験について用いるべきであったが、一部のサンプルについては用いていないため、細胞量が合うように、すべてのサンプル作成を慎重に行った。少なくとも 3 回ずつ実験を行い、いずれも同様の傾向であることを確認し、代表的な結果を示した。p53 の蓄積と Serine15 のリン酸化については、画像解析ソフト ImageJ を用いて 3 回の実験のタンパク量を解析して、グラフ化した。

DNA 断片化の解析

約 1×10^6 個の細胞を解析に用いた。DNA は Apoptosis Ladder Detection Kit (WAKO) を用いて使用説明書を参考にして抽出した。DNA ペレットは洗浄後に 1.5%アガロースゲル上で 100 ボルトで 30 分電気泳動した。ゲルは $1 \mu\text{g/ml}$ のエチジウムブロマイドにより染色され、UV トランスイルミネーターにより観察され、写真化された。3 回実験を行い、代表的な結果を示した。

ルシフェラーゼアッセイ

Promega 社の Dual Luciferase assay system を用いて、業者の説明書を参考にしてルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイについて説明する。MOLT-4 細胞の p53 の p21 に対するプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合させることにより、p53 の転写活性に比例してルシフェラーゼが産生される。このルシフェラーゼはルシフェリンという非蛍光物質を蛍光物質に変化させることができる。よって、その蛍光量を調べることにより、p53 の p21 に対する転写活性を調べることができる。ATTO 社の luminescencer-PSN AB-2200 を用いて、10 秒間蛍光量を測定した。未処置の細胞との蛍光量の比を測定し、グラフ化した。

統計処理

すべての実験は最低でも 3 回ずつ行った。実験の結果は平均±標準偏差で表示した。すべての実験データは Excel2000 などを使い、標準的な統計処理方法で処理された。統計的有意差は T 検定により検定した。すべての実験において、p 値が 0.05 以下の場合を統計的有意差があるとした。

結果

エダラボンは高濃度(2.7 - 3 mg/ml)では放射線防護効果があり、低濃度(0.15 - 1.5 mg/ml)では放射線増感効果がある。

まずは、エダラボンの細胞毒性を色素排除試験で調べた。MOLT-4 細胞に 0.15, 0.75, 1.5, 3, 6 mg/ml の濃度のエダラボンを投与して 20 時間後に MOLT-4 細胞の生存率を調べた。3 mg/ml までの濃度のエダラボンを投与した時には、細胞の生存率は 60%以上であり、エダラボンの毒性は実験する上で許容範囲内であると考えた。しかし、濃度を 6 mg/ml まで上げると、細胞の生存率は 30%以下に低下し、毒性が強すぎると判断された(図 2)。よって、以下の実験はすべて 3 mg/ml 以下の濃度のエダラボンを用いて行った。

エダラボンを放射線照射 5 分前に MOLT-4 細胞に投与し、その後 2 Gy の X 線を照射し、20 時間後に細胞の生存率を調べた。エダラボンの濃度をいろいろに変えて、濃度によりエダラボンの効果がどのように変わるかを調べた。エダラボンを投与せずに MOLT-4 細胞を照射したときには、MOLT-4 細胞の生存率は $36.2 \pm 6.3\%$ であった。エダラボンを 0.15, 0.75, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 2.7, 3 mg/ml の濃度で投与し、照射したときには、MOLT-4 細胞の生存率はそれぞれ $9.7 \pm 2.1\%$, $5.7 \pm 3.5\%$, $7.2 \pm 6.3\%$, $27.5 \pm 8.5\%$, $44.0 \pm 8.9\%$, $59.3 \pm 11.0\%$, $59.8 \pm 4.0\%$, $49.2 \pm 10.6\%$ であった(図 3)。エダラボンの濃度が 2.7, 3 mg/ml の時は、エダラボンを投与しない時に比べて細胞の生存率が有意に改善し($p < 0.05$)、エダラボンの放射線防護効果が認められた。逆に、エダラボンの濃度が 0.15, 0.75, 1.5 mg/ml の時は、細胞の生存率が有意に低

下し($p < 0.05$)、エダラボンの放射線増感効果が認められた。それ以外の濃度では、照射単独と比べて有意差は見られなかった。以後の実験では、前半部分では 3 mg/ml のエダラボンを用いて、放射線防護効果を研究した。後半部分では 0.75 mg/ml のエダラボンを用いて、放射線増感効果を研究した。その中間の濃度については今回は検討を行わなかった。

まず、放射線防護効果について詳しく調べるために、エダラボン濃度を 3 mg/ml として実験を続けた。X 線線量を 2 Gy から 5 Gy に上げて、3 mg/ml のエダラボンを 5 分前に投与して、20 時間後に MOLT-4 細胞の生存率を調べたところ、やはり有意な放射線防護効果を認めた($p < 0.05$)(図 4)。しかも、5 Gy の時の方が 2 Gy の時に比べて防護効果が際立っていたので、以後の放射線防護効果の実験は主に 5 Gy で行った。放射線防護効果の時間経過を調べるために、3 mg/ml エダラボンを 5 Gy の X 線照射 5 分前に投与し、4, 8, 12, 16, 20 時間後に色素排除試験にて細胞の生存率を調べ、エダラボンを投与せずに 5 Gy の X 線を照射した場合の時間経過と生存率を比較した。図 5 のように、エダラボンを投与して照射した方が 8 時間後から 20 時間後に細胞の生存率が有意に改善した。

エダラボンの放射線防護効果は MOLT-4 細胞のアポトーシスを抑制することにより起こっている。

このエダラボンの放射線防護効果がアポトーシスを抑えることによるものかどうかを調べるために、Annexin V-PI 染色を行った。Annexin V(-)PI(-)の細胞 (アポトーシスを起こ

さず生存していると考えられる細胞)は、5 Gy の X 線照射単独の 16 時間後では $10.6 \pm 0.8\%$ であったが、照射 5 分前に 3 mg/ml のエダラボンを投与することにより、 $74.2 \pm 2.1\%$ と、著明に増加した($p < 0.05$)(図 6-8)。

高濃度エダラボンは放射線による細胞内 ROS の増加を抑制する。

ROS は放射線誘発アポトーシスに重要とされているため、CM-H₂-DCFDA のキットを用いて、細胞内で産生される ROS を間接的に測定した(61)。MOLT-4 細胞を 20 Gy の X 線照射することにより、細胞内 ROS は約 11 倍に増加したが、3 mg/ml のエダラボンを照射 5 分前に投与することにより、当検査上はこの ROS がほぼ完全に抑えられることが分かった($p < 0.05$)。また、照射 5 分後に投与した場合にも、細胞内 ROS はかなり抑えられるが、照射前に投与した時ほどは抑えられないことが分かった(図 9)。

高濃度エダラボンは p53 の蓄積とリン酸化を抑制する。

アポトーシスの抑制がどのような細胞内の変化によって起こっているのかを調べるために、ウェスタンブロット法でエダラボンのアポトーシス関連分子に与える影響を調べた。5 Gy の X 線を照射し、3 mg/ml のエダラボンを照射前に投与した場合としない場合で、p53 の蓄積と p53 の Serine15 残基のリン酸化がどう変化するかを調べた。p53 の蓄積もリン酸化も、照射単独では照射 1-4 時間後にかけて増えていたが、エダラボン投与により増え方が

抑制されることが分かった(図 10)。この時のタンパク発現量を画像解析ソフト ImageJ を用いて定量した。p53 の蓄積は照射 2, 4, 8 時間後で、p53 の Serine15 残基のリン酸化は照射 4, 8 時間後で、照射単独に比べて照射前にエダラボンを加えた方が有意にタンパク量が抑制されることが分かった(図 11)。また、p53 の標的遺伝子である p21^{WAF1}(図 12)および PUMA(図 13)の発現も、X 線照射単独ではともに増加していたが、エダラボン投与により抑制されることが分かった。また、アポトーシスの実行分子であるカスパーゼ 3、カスパーゼ 7(29)の活性化は、照射単独では X 線照射 8-16 時間後に増加していたが、エダラボン投与により抑制されていた(図 14, 15)。また、抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 の総量は、照射単独でもエダラボン投与後の照射でも変化は見られなかった。ただし、Bcl-2 の分割は照射単独により起こっていたのが、エダラボン投与により抑制されていることが分かった(図 16)。

高濃度エダラボンは DNA 断片化を抑制する。

DNA の断片化は、アポトーシスの指標でもある(62)。DNA 断片化がエダラボンによりどのように変化するかを電気泳動法により調べた。5 Gy の X 線照射 8 時間後から DNA の断片化に対応すると考えられるスメアが明らかであったが、照射 5 分前に 3 mg/ml のエダラボンを投与することにより、そのスメアがほぼ完全に抑制されることが分かった(図 17)。

これまでの結果から、3 mg/ml のエダラボンを X 線照射 5 分前に投与することにより、

ROS の除去、p53 経路の抑制を介して、MOLT-4 細胞のアポトーシスが抑制されることが *in vitro* で示された。

低濃度エダラボンは放射線増感効果を示す。

これ以降は、低濃度のエダラボンの放射線増感効果について、その分子機構などを解析した。0.15, 0.75, 1.5 mg/ml のエダラボンでは放射線増感効果が見られたが、中でも 0.75mg/ml の時が最も増感効果が際立っていたので、以後の実験は 0.75 mg/ml で行うこととした。この放射線増感効果は X 線の照射線量を 1 Gy、5 Gy としても同様に認められた($p < 0.05$)(図 18)。また、照射後の時間経過を調べるために、線量を 2 Gy として照射 4, 8, 12, 16, 20 時間後に色素排除試験にて MOLT-4 細胞の生存率を調べた。照射 8-20 時間後において、エダラボン投与により有意な放射線増感効果が認められた($p < 0.05$)(図 19)。また、この放射線増感効果はヒト前 B 細胞白血病細胞株 Nalm-6 ($p < 0.05$)(図 20)、ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 ($p < 0.05$)(図 21)でも認められた。ただし、その増感効果は MOLT-4 細胞ほど際立ってはいなかった。

エダラボン以外のフリーラジカルスカベンジャーでも同様の放射線増感効果が認められるかどうか確認するために、DMSO を用いて同様の実験を行った。すなわち、2 mg/ml および 10 mg/ml DMSO を照射 5 分前に MOLT-4 細胞に投与し、2 Gy の X 線を照射し、20 時間後に色素排除試験を行った。10 mg/ml DMSO を投与して照射した時には、細胞の生存

率は照射単独の時に比べて有意に改善し($p < 0.05$)、DMSO の放射線防護効果によるものと考えられた。一方で、2 mg/ml DMSO を投与して照射した時には、細胞の生存率は照射単独の時と比べて有意差は見られなかった(図 22)。

エダラボンの放射線増感効果はアポトーシスの亢進により起こる。

低濃度エダラボンによる放射線増感効果がアポトーシスによって起こるかどうかを確認するために、Annexin V-PI 染色を行った。MOLT-4 細胞を 2 Gy の X 線照射単独または 0.75 mg/ml のエダラボン単独またはその両方で処理して、8 時間後に Annexin V-PI 染色を行った。Annexin V(+), PI(-)の早期アポトーシスの細胞はそれぞれ $12.43 \pm 1.96\%$ 、 $2.04 \pm 0.21\%$ 、 $39.57 \pm 4.48\%$ であった。エダラボンと X 線照射の組み合わせにより、相乗効果的に MOLT-4 細胞のアポトーシスが増えていることが分かった($p < 0.05$)(図 23, 24)。この結果から、エダラボンによる放射線増感効果は、アポトーシスの亢進によって起きていることが分かった。次に、アポトーシスの実行因子であり、アポトーシスの指標ともなるカスパーゼの一つであるカスパーゼ 7(29)がエダラボン投与と照射によりどのような影響を受けるかを、ウエスタンブロット法で調べた。2 Gy X 線照射単独では、照射 8 時間後までカスパーゼ 7 の活性化ははっきりしなかったが、照射 5 分前に 0.75 mg/ml のエダラボンを投与した場合には、カスパーゼ 7 は切断され、活性化が見られた(図 25)。このことから、エダラボンによる放射線増感効果はアポトーシスによって起こっていることが分かった。

低濃度エダラボンにより ROS は抑制される。

エダラボンが細胞内 ROS に与える影響を調べるために、再び CM-H₂-DCFDA キットを用いた。20 Gy X 線照射により約 11 倍に増えた細胞内 ROS は、照射前に低濃度エダラボンを投与することにより、有意に抑制されていることが分かった ($p < 0.05$)(図 26)。ただし、エダラボン濃度が 3 mg/ml の時ほどは抑制されていなかった。よって、エダラボンにより放射線誘発性アポトーシスが増感している時、ROS は抑制されていることが分かった。

低濃度エダラボンの放射線増感効果には p53 が強く関与している。

MOLT-4 細胞のアポトーシス経路において重要とされる p53 の変化について、ウエスタンブロット法で調べた。2 Gy X 線照射 5 分前に 0.75 mg/ml のエダラボンと投与した場合としない場合で、1-4 時間後に p53 の蓄積、Serine6, 9, 15, 20, 392 残基のリン酸化について、ウエスタンブロット法で調べた。p53 の Serine15, 20 残基のリン酸化は、エダラボン投与により増加していることが分かった。一方、p53 の蓄積、Serine6, 9, 392 のリン酸化については、エダラボン投与により増加していないことが分かった(図 27)。これらから、エダラボンの放射線増感効果について、p53 が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

エダラボンの放射線増感効果における p53 の関与をよりはっきりさせるために、p53 の siRNA を過剰発現したベクターを使って作られた p53 ノックダウン MOLT-4 細胞を用いて、

エダラボンの放射線増感効果を研究した。2つの p53 ノックダウンクローンのうち(63)、よりしっかり p53 がノックダウンされているクローンを用いて、エダラボンを投与した場合と、投与しない場合で、細胞の生存率の推移を調べた。このクローンについて、X 線照射前に 0.75 mg/ml のエダラボンを投与した場合としない場合と何も処理しない場合で、p53 の蓄積が抑えられていることを確認した(図 28)。このクローンを 2 Gy の X 線照射単独で治療した場合と、0.75 mg/ml のエダラボンを 5 分前に投与し、2 Gy の X 線を照射した場合の 20 時間後の p53 ノックダウン MOLT-4 細胞の生存率はそれぞれ、 $88.63 \pm 2.02\%$ 、 $86.13 \pm 4.75\%$ であり、統計的有意差は見られなかった(図 29)。すなわち、p53 のノックダウンによりエダラボンによる放射線増感効果が打ち消されていた。よって、エダラボンの放射線増感効果には p53 が深く関与していることが分かった。

エダラボンの放射線増感効果において、p21^{WAF1} は抑制され、PUMA は亢進した。

次に、p53 の転写活性と、p53 標的分子の変化について調べた。まずは、p53 の標的分子の一つであり、CDK 阻害作用のある p21^{WAF1}(18)について、エダラボンの放射線増感効果の時にどのような変化が見られるか調べた。MOLT-4 細胞において、2 Gy X 線照射単独により 8 時間後にはっきりと出現する p21^{WAF1} の増加が、0.75 mg/ml のエダラボンを 5 分前に投与することにより、大部分が抑制されることが分かった(図 30)。

次に、p53 の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより調べた。2 Gy または 5 Gy の X 線

照射により増加していた p53 の転写活性が、照射 5 分前にエダラボンを投与することにより、大部分が抑制されることが分かった(図 31)。Yu らは、p21^{WAF1} が発現していない細胞では p53 を介したアポトーシスが強く誘発されることを報告している(21)。これは、CDK 阻害作用により細胞周期を止める役割のある p21^{WAF1} が存在しないことにより、傷害を受けた細胞が細胞周期を止めることができず、細胞修復が不完全になり、アポトーシスが誘発されるためとされている。エダラボンの放射線増感効果に p21^{WAF1} の発現の低下が影響しているかどうかを調べるために、薬剤性の CDK 阻害剤であるロスコビチンの影響を調べた(60)。MOLT-4 細胞にエダラボンとロスコビチンを同時に投与して、2 Gy の X 線照射をし、20 時間後に色素排除試験にて細胞の生存率を調べたところ、 $31.6 \pm 4.5\%$ であった。すなわち、エダラボンのみを投与して照射した場合より、有意に生存率が改善した($p < 0.05$)。また、照射単独と比べて有意差が見られなかった(図 32)。この時、溶媒の DMSO の濃度は 1 mg/ml 以下であり、MOLT-4 細胞の生存率に影響しないと考えられた。p21^{WAF1} が抑制されている状態でも、ロスコビチンが存在すれば CDK 活性が抑制され、アポトーシスが抑制されることが示唆された。この結果から、エダラボンの放射線増感効果において、p21^{WAF1} の抑制がアポトーシス増感に寄与している可能性が示唆された。

次に別の p53 標的分子である PUMA(17)について調べた。MOLT-4 細胞に 2 Gy の X 線照射した後の PUMA の発現は、時間とともに増えていったが、照射 5 分前に 0.75 mg/ml のエダラボンを投与することにより、その増え方はより際立った(図 30)。また、siRNA で p53

をノックダウンした MOLT-4 細胞は、野生型の MOLT-4 細胞に比べて、X 線照射後の PUMA の発現はエダラボンを投与した時もしない時も目立たなくなっていた(図 28)。PUMA はアポトーシス促進型の BH3-only protein と言われており、PUMA の発現の亢進がエダラボンによるアポトーシスの増感に関与している可能性が示唆された。

考察

以上の結果から、高濃度(3 mg/ml)のエダラボンには放射線防護効果、低濃度(0.75 mg/ml)のエダラボンには放射線増感効果があることが分かった。エダラボンはフリーラジカルスカベンジャーであることから、放射線防護効果は予想されていたが、放射線増感効果については予想外であった。

放射線防護効果は MOLT-4 細胞において、照射前に 3 mg/ml のエダラボンを投与することにより起こった(図 3-5)。Annexin V-PI 染色の結果から、この防護効果はアポトーシスの抑制により起こっていることが分かった(図 6-8)。照射前のエダラボン投与により、細胞内 ROS が抑制されていた(図 9)。エダラボンは血球細胞内に移行することが知られており(64)、エダラボンは細胞内に入って、細胞内で発生した ROS を抑制したと考えられた。照射後にエダラボンを投与した場合でも細胞内 ROS は減る傾向にあり、これは長寿命フリーラジカルや、照射後の細胞内酸化ストレスなどを抑制していることによる所見と考えられた(図 9)。照射前にエダラボンを投与した時、p53 の蓄積、Serine15 残基のリン酸化の抑制(図 10, 11)および p53 標的分子の発現の抑制が起こっており(図 12, 13)、アポトーシスの抑制に深く関与していると思われた。もし、p53 を siRNA でノックダウンした細胞を作製したとすると、その細胞自体が放射線抵抗性になってしまうため、放射線防護効果を調べる実験には不適當であると考えられた。このため、今回は p53 ノックダウンで p53 の放射線防護効果への関与を調べることはしなかった。またその下流のカスパーゼ 3、カスパーゼ 7 の抑制も起こ

っていた(図 14, 15)。さらに、DNA の断片化の抑制(図 17)により、アポトーシスの抑制が再確認された。

色素排除試験の結果をみると、照射 16 時間後以降はエダラボンを投与した場合にも MOLT-4 細胞の生存率は低下してきているが(図 5)、これについては ROS を介さない経路、すなわち直接効果などの経路を介して細胞死が起こっていると推測することができる。

今回の実験結果は、安西らの *in vivo* での報告でマウスの LD_{50/30} がエダラボンの腹腔内投与により増加するという実験結果に一致していた(54)。ROS はエダラボンの照射前投与により抑制されており、ROS が放射線誘発性アポトーシスに重要であるという他の研究者らの報告からも(65, 66)、ROS の抑制が MOLT-4 細胞の放射線誘発性アポトーシスの抑制に繋がった可能性が考えられた。照射 5 分後のエダラボン投与でも ROS は抑制される傾向にあったが、照射前投与の時ほど抑制はされなかった。照射後投与では効果が弱いことは、ROS の中でも放射線誘発性アポトーシスに重要とされるヒドロキシルラジカルの半減期が非常に短いことから説明できるかもしれない。また、安西らの報告で、マウスの腹腔内投与の時に照射後では放射線防護効果がなかったという実験結果とも合致する(54)。

p53 は重要な転写因子であり、放射線によるアポトーシスにおいて非常に重要であるとされている。DNA 傷害が起こると、p53 の安定性はリン酸化されることにより増し、その結果として起こる p53 の蓄積(15)によりその標的因子の転写が起こるが(67)、その標的因子には細胞周期制御にかかわる p21^{WAF1}(18)やアポトーシスにかかわる PUMA(17)がある。

カスパーゼはアスパラギン酸特異的なシステインプロテアーゼであり、アポトーシスの時に活性化されることが知られている。カスパーゼは ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) を不活性化し、CAD (caspase-activated DNase) を活性化することにより、DNA を切断し、アポトーシスを起こす。また、カスパーゼは活性化されることにより、その酵素活性により多くの基質を分割して、細胞をアポトーシスへと導く。今回の実験では、そのカスパーゼが抑制されていることからアポトーシスが抑制されていることが分かる(図 14, 15)。

その基質の一つが Bcl-2 である(68, 69)。Bcl-2 は様々なストレスによる細胞のアポトーシスを抑制する膜タンパク質である(70)。榎本らは、マウスの Bcl-2 を強制発現させた MOLT-4 細胞は放射線抵抗性であり、放射線誘発性アポトーシスが抑制されることを報告した(13)。今回の実験では、Bcl-2 の発現量はエダラボン投与によって変化が見られないことが分かった(図 16)。この結果は、これまでの *in vivo*(39, 71)や *in vitro*(72)での脳梗塞モデルなどによるエダラボン投与の実験結果の報告と異なる。これらは、実験に使われた細胞も異なり、細胞刺激も異なるために結果が異なったのかもしれない。また、*in vitro* と *in vivo* の条件の違いによるのかもしれない。

また、Bcl-2 はカスパーゼ 3 により、アスパラギン 34 で切断され、Bcl-2 の分解産物はアポトーシス促進に働くことが報告されている(73)。今回の実験では、カスパーゼ 3 の活性化が抑制されたことにより、Bcl-2 の切断も抑制されたと考えられる。

図 17 では、DNA の断片化が抑制されていることが確認された。DNA 断片化では、通常電気泳動法はラダー状になることが知られているが、MOLT-4 の DNA 断片化の場合は、スミア状になるとの報告もあり(74)、今回の所見は X 線照射により DNA が断片化され、スミア状となったものが、エダラボン投与により断片化が抑制され、スミアが消失したと考えることができる。

エダラボンは抗酸化剤としても知られている(35, 43, 75, 76)。エダラボンと似た作用を持つ薬剤として、アミフォスチン、アルファリポ酸、グルタチオン、ビタミン C、トロロックスなどの様々な抗酸化剤が知られており、これらは *in vivo* で ROS を抑制することが示されている(77)。例えば、アミフォスチンは放射線治療や化学療法による正常組織の細胞防護作用があって、臨床的にも使われている薬剤であり、その放射線防護作用はフリーラジカル除去作用(78)や抗突然変異作用(79)によるとされている。また、トロロックスは脂質抗酸化作用があるビタミン E のアナログであり(80)、放射線による MOLT-4 細胞のアポトーシスをカスパーゼ 3 の経路を抑えることにより抑制したと報告されている(81)。これらの作用はエダラボンと類似点が多く、今後も研究の余地があると思われる。

以上、ここまでを纏めると、3 mg/ml のエダラボンは放射線による MOLT-4 細胞のアポトーシスを ROS の抑制、p53 の抑制を介して、抑えることが *in vitro* で示された。これを図 33 に図示した。ただし、MOLT-4 細胞は白血病の細胞であり、実際の臨床では防護されてしまっただけでは困る細胞である。臨床では正常組織を防護したいところであるが、*in vivo* では違った

効果が見られる可能性もあるので、さらに研究が必要と思われる。

様々な抗酸化剤やフリーラジカルスカベンジャーが知られているが、低濃度になると放射線増感効果を示す薬剤は知られていない。今回の実験でも、高濃度で放射線防護効果を示す DMSO を低濃度にして実験したが、放射線増感効果は認められなかった(図 22)。

p53 野生型である MOLT-4、Nalm-6、HepG2 細胞において、放射線照射前にエダラボンを低濃度(0.15–1.5 mg/ml)で投与すると、エダラボンを投与せずに照射した場合に比べて細胞の生存率が有意に低下し、エダラボンによる放射線増感効果が観察された(図 3, 18-21)。この放射線増感効果は、エダラボンの細胞毒性を考慮しても、エダラボンと放射線の効果の単純な足し算よりは高い効果があると思われた。この放射線増感効果はアポトーシスを亢進させることにより起こっていた(図 23-25)。この時の ROS は抑制されていたが、防護効果を示すエダラボンの濃度の時ほどは抑制されていなかった(図 26)。p53 がこの放射線増感効果に深く関与していた(図 29)。照射前に低濃度のエダラボンを投与することにより p53 のリン酸化状態が変化し(図 27)、p53 標的分子の発現も変化していた(図 30, 31)。即ち、PUMA の発現は亢進し、p21^{WAF1} の発現は抑制されていた。p21^{WAF1} の抑制は転写レベルでも確認された(図 31)。CDK 阻害剤であるロスコビチンを投与することにより、エダラボンによる放射線増感効果は打ち消された(図 32)。

今回の実験では、0.75 mg/ml のエダラボンを照射前に投与することにより、p53 の Serine15, 20 残基のリン酸化が亢進したが(図 27)、エダラボンが p53 に直接どのような影響を与えて

いるのかは、今回の実験では不明であった。例えば、タンパクリン酸化酵素である ATM (ataxia telangiectasia mutated)は、Serine1981 残基のリン酸化により活性化され、p53 の Serine15 残基を直接リン酸化することが報告されている(82)。さらに、ATM により活性化された Chk2 が p53 の Serine20 残基をリン酸化して、p53 を安定化させることも報告されている(83)。エダラボンがこれらのプロテインキナーゼなどを介して p53 のリン酸化を制御しているのか、p53 に直接影響を及ぼしてリン酸化を制御しているのかは、今回の実験からは不明であり、さらなる検討課題である。p53 のリン酸化部位によるアポトーシスに与える影響については、Unger らが(84)ヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 において、Serine6, 9, 15, 20, 33, 37 残基のうち、Serine15, 20 残基がアポトーシスに深くかかわっていることを報告しており、今回の実験結果と同様である。Chehab らは DNA 傷害の際に、Serine20 残基のリン酸化が p53 の安定化に重要であると報告している(85)。また、Serine15 残基のリン酸化はアポトーシスには重要であるものの(84)、p53 の安定化に必要不可欠であるというわけではないようだ(86, 87)。ただし、p53 のリン酸化部位の違いによるアポトーシスに与える影響の違いや転写活性に与える影響の違いについてはまだ定説はなく、現在も議論的である。

p21^{WAF1} が抗アポトーシス分子として働いているという証拠は多い。Yu らは、p21^{WAF1} が破壊されたヒト大腸癌細胞 HCT-116 で p53 を介したアポトーシスが強く誘導されることを報告している(21)。Wendt らは、ヒト乳癌細胞 MCF-7 細胞において、DNA 損傷による p21^{WAF1} の発現を抑制すると、放射線誘発性アポトーシスを亢進させるが、p21^{WAF1} を過剰発現させ

ると、逆に放射線誘発性アポトーシスが抑制されることを報告した(26)。また、野生型の HCT-116 において、p21^{WAF1} を抑制することにより、*in vitro* およびヌードマウスへの異種移植片の両方で放射線感受性が高くなることが報告されている(88, 89)。さらには、Sohn らは、p21^{WAF1} が欠損している HCT-116 細胞において、X 線によるカスパーゼ 3 の活性化がロスコピチンにより効果的に抑制され、CDK 活性の抑制が放射線によるアポトーシスの抑制に繋がることを示した(90)。

一方で、PUMA は p53 誘発性アポトーシスを起こさせるという報告も多い。Villunger らは、PUMA を破壊したマウスの線維芽細胞やリンパ球において、DNA 損傷によるアポトーシスが抑制されることを報告した(19)。Yu らは、p21 と PUMA 遺伝子の両方を破壊した HCT-116 細胞は p53 の外因性過剰発現によるアポトーシスに抵抗性になることを示した(21)。

以上のことから、エダラボンによる放射線増感効果は、少なくとも部分的には PUMA の発現の亢進と、p21^{WAF1} の抑制によって起こっていることが示唆された。

同じ p53 の標的分子であるのに、p21^{WAF1} の発現は抑制され、PUMA の発現は亢進するのは矛盾しているように思われる。標的遺伝子のプロモーター内の p53 の結合部位のヌクレオチドの配列とプロモーターへの p53 の結合力はストレス応答の重要な決定因子である(89)。p53 とその転写コアクティベーターの相互作用はそのプロモーターとの結合力に影響すると報告されている(91)。エダラボンは標的遺伝子のプロモーターと p53 の結合力に影響を与え、p21^{WAF1}、PUMA の発現の程度に影響を与えているのかもしれない。

また、低濃度のエダラボンは放射線による細胞内 ROS の増加を抑制するのに、放射線増感効果を示すということも矛盾しているように見える。高濃度(3 mg/ml)のエダラボンは放射線による細胞内 ROS の増加をほぼ完全に抑制したが、低濃度(0.75 mg/ml)では部分的にしかな抑制できなかった。この ROS の抑制が不完全であったため、p53 の蓄積や Serine15 のリン酸化を抑制させるには不十分であったため、潜在的な放射線増感効果が現われてきたのかもしれない。

以上、放射線増感効果について纏めると、0.75 mg/ml のエダラボンは p53 経路を介して、放射線増感効果を示すことが分かった。p21^{WAF1} の抑制、PUMA の亢進が起こっており、これらも増感効果に寄与している可能性があると思われた。図 34 に放射線増感効果について纏めた。

結語

エダラボンは、高濃度においては、MOLT-4 細胞において放射線防護効果を示し、低濃度においては、放射線増感効果を示した。

臨床的なエダラボンの血中濃度は、今回の実験の血中濃度よりも遥かに低いとされており(92)、実際の臨床で使用した場合にどのような効果があるのかは分からない。理想的には、悪性腫瘍組織に増感効果が働き、正常組織に防護効果が働くとよいが、投与方法の工夫などにより達成できる可能性もあると考えられる。エダラボンはそのような魅力的な潜在能力を秘めた化合物であることは間違いないだろう。

謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻放射線分子医学教室にて行った。御指導、御高閲を賜りました放射線分子医学教室の宮川清教授、細井義夫前准教授、松本義久前助教、榎本敦助教、東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻放射線医学講座放射線治療学の中川恵一准教授、井垣浩前講師、白石憲史郎助教に深甚なる敬意を表します。また、多数の助言を頂きました東京大学大学院工学系研究科原子力国際専攻の勝村庸介教授、富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学講座の近藤隆教授に深謝いたします。

参考文献

1. Goffman, T. E. and Glatstein, E. (2002) Intensity-modulated radiation therapy.
Radiat. Res. **158**: 115-117.
2. Loffler, J. S., Smith, A. R. and Suit, H. D. (1997) The potential role of proton beams
in radiation oncology. *Semin. Oncol.* **24**: 686-695.
3. Tsujii, H. (1997) Clinical evaluation and perspective of charged particle therapy.
Nippon Rinsho **55**: 1588-1595.
4. Kouvaris, J. R., Kouloulis, V. E. and Vlahos, L. J. (2007) Amifostine: the first selective-target
and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist* **12**: 738-747.
5. Rotman, M., Aziz, H. and Wasserman, T. (1997) Chemotherapy and Irradiation.
Principle and Practice of Radiation Oncology, Third Edition. 705-722,
Lippincot-Raven Publishers.
6. Hosoi, Y., Miyachi, H., Matsumoto, Y., Ikehata, H., Komura, J., Ishii, K., Zhao, H. J., Yoshida,
M., Takai, Y., Yamada, S., Suzuki, N. and Ono, T. (1998) A phosphatidylinositol 3-kinase
inhibitor wortmannin induces radioresistant DNA synthesis and sensitizes cells to bleomycin
and ionizing radiation. *Int. J. Cancer* **78**: 642-647.
7. Bernhard, W. A. and Close, D. M. Charged Particle and Photon Interaction with Matter. (2004)
Eds. Mozunder, A. and Hatano, Y., pp. 431-470, *Marcel Dekker Inc*.

8. von Sonntag, C. *The Chemical Basis of Radiation Biology*. (1987) *Taylor and Francis, New York*.
9. Radford, I. R. and Murphy, T. K. (1994) Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines: III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 229–239.
10. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239–257.
11. Yamada, T. and Ohyama, H. (1988) Radiation-induced interphase death of rat thymocyte is internally programmed (apoptosis). *Int. J. Radiat. Biol.* **53**: 65–75.
12. Hosokawa, Y., Tanaka, L., Kaneko, M., Sakakura, Y., Tsuruga, E., Irie, K. and Yajima, T. (2002) Apoptosis induced by generated OH radicals inside cells after irradiation. *Arch. Histol. Cytol.* **65**: 301–305.
13. Enomoto, A., Suzuki, N., Hirano, K., Matsumoto, Y., Morita, A., Sakai, K. and Koyama, H. (2000) Involvement of SAPK/JNK pathway in X-ray-induced rapid cell death of human T-cell leukemia cell line MOLT-4. *Cancer Lett.* **155**: 137–144.
14. Enomoto, A., Suzuki, N., Kang, Y., Hirano, K., Matsumoto, Y., Zhu, J., Morita, A., Hosoi, Y., Sakai, K. and Koyama, H. (2003) Decreased *c-Myc* expression and its involvement in X-ray-induced apoptotic cell death of human T-cell leukemia cell line MOLT-4. *Int. J. Radiat.*

- Biol.* **79**: 589–600.
15. Nakano, H., Yonekawa, H. and Shinohara, K. (2003) Delayed expression of apoptosis in X-irradiated human leukemic MOLT-4 cells transfected with mutant p53. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **44**: 179–183.
 16. Shinohara, K. and Nakano, H. (1993) Interphase death and reproductive death in X-irradiated MOLT-4 cells. *Radiat. Res.* **135**: 197–205.
 17. Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K. H., Han, J., Ihle, J. N., McKinnon, P. J., Cleveland, J. L. and Zambetti, G. P. (2003) Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**: 321-328.
 18. Crosby, M. E., Oancea, M. and Almasan, A. (2004) p53 binding to target sites is dynamically regulated before and after ionizing radiation-mediated DNA damage. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **23**: 67–79.
 19. Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M. and Strasser, A. (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**: 1036-1038.
 20. Nakano, K. and Vousden, K. H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* **7**: 683–694.
 21. Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Zhang, L. (2003) PUMA mediates the

- apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 1931-1936.
22. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816.
23. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Kasso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**: 701-704.
24. Lu, Y., Yamagishi, N., Yagi, T. and Takebe, H. (1998) Mutated p21(WAF1/CIP1/SDI1) lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* **16**: 705-712.
25. Tian, H., Wittmack, E. K. and Jorgensen, T. J. (2000) p21WAF1/CIP1 antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res.* **60**: 679-684.
26. Wendt, J., Radetzki, S., von Haefen, C., Hemmati, P. G., Güner, D., Schulze-Osthoff, K., Dörken, B. and Daniel, P. T. (2006) Induction of p21^{CIP/WAF-1} and G₂ arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* **25**: 969-971.
27. Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. and Jänicke, R. U. (2006) p21 blocks

- irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res.* **66**: 11254-11262.
28. Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**: 443-446.
29. Kumar, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **14**: 32-43.
30. Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**: 99-163.
31. Watanabe, T., Yuki, S., Egawa, M. and Nishi, H. (1994) Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: Possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**: 1597-1603.
32. Yamamoto, T., Yuki, S., Watanabe, T., Mitsuka, M., Saito, K. and Kogure, K. (1997) Delayed neuronal death prevented by inhibition of hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res.* **762**: 240-242.
33. Mizuno, A., Uemura, K. and Nakashima, M. (1998) Inhibitory effect of MCI-186, a free radical scavenger, on cerebral ischemia following rat middle cerebral artery occlusion. *Gen. Pharmacol.* **30**: 575-578.
34. Abe, K., Yuki, S. and Kogure, K. (1988) Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* **19**: 280-285.

35. Nishi, H., Watanabe, T., Sakurai, H., Yuki, S. and Ishibashi, A. (1989) Effect of MCI-186 on brain edema in rats. *Stroke* **20**: 1236–1240.
36. Watanabe, T. and Egawa, M. (1994) Effects of an antistroke agent MCI-186 on cerebral arachidonate cascade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 1624–1629.
37. Kawai, H., Nakai, H., Suga, M., Yuki, S., Watanabe, T. and Saito, K. -I. (1997) Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 921–927.
38. Watanabe, K., Watanabe, K., Kuwahara, T. and Yamamoto, Y. (1997) Free radical-induced oxidation products of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186). *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **46**: 797–801.
39. Amemiya, S., Kamiya, Y., Nito, C., Inaba, Y., Kato, K., Ueda, M., Shimazaki, K. and Katayama, Y. (2005) Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following focal ischemia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **516**: 125–130.
40. Shichinohe, Y., Kuroda, S., Yasuda, H., Ishikawa, T., Iwai, M., Horiuchi, M. and Iwasaki, Y. (2004) Neuroprotective effects of the free radical scavenger Edaravone (MCI-186) in mice permanent focal brain ischemia. *Brain Res.* **1029**: 200–206.
41. Nito, C., Kamiya, T., Amemiya, S., Kato, K. and Katayama, Y. (2003) The neuroprotective effect of a free radical scavenger and mild hypothermia following transient focal ischemia in rats. *Acta.*

- Neurochir. Suppl.* **86**: 199–203.
42. Ikeda, T., Xia, X. Y., Kaneko, M., Sameshima, H. and Ikenoue, T. (2002) Effect of the free radical scavenger, 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186), on hypoxia-ischemia-induced brain injury in neonatal rats. *Neurosci. Lett.* **329**: 33–36.
43. Noor, J. I., Ikeda, T., Ueda, Y. and Ikenoue, T. (2005) A free radical scavenger, edaravone, inhibits lipid peroxidation and the production of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain damage of neonatal rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **193**: 1703–1708.
44. Nakashima, N., Niwa, M., Iwai, T. and Uematsu, T. (1999) Involvement of free radicals in cerebral vascular reperfusion injury evaluated in a transient focal cerebral ischemia model of rat. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 722–729.
45. Watanabe, T., Morita, I., Nishi, H. and Murota, S. (1988) Preventive effect of MCI-186 on 15-HPETE induced vascular endothelial cell injury *in vitro*. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **33**: 81–87.
46. Yamaguchi, T., Ida, T., Kobayashi, T., Hiraga, M., Oishi, K., Uchida, M. K. and Echizen, H. (2004) Alterations of antiproliferative effects of serum obtained from patients with acute cerebral infarction treated with a radical scavenger, edaravone, with or without amlodipine using an *in vitro* cultured basilar artery smooth muscle cells. *Yakugaku Zasshi* **124**: 25–29.
47. Edaravone Acute Infarction Study Group. (2003) Effect of a novel free radical scavenger,

- edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc. Dis.* **15**: 222–229.
48. Toyoda, K., Fujii, K., Kamouchi, M., Nakane, H., Arihiro, S., Okada, Y., Ibayashi, S. and Iida, M. (2004) Free radical scavenger, edaravone, in stroke with internal carotid artery occlusion. *J. Neurol. Sci.* **221**: 11–17.
49. Watanabe, T., Tanaka, M., Watanabe, K., Takamatsu, Y. and Tobe, A. (2004) Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant. *Yakugaku Zasshi* **124**: 99–111.
50. Mishina, M., Komaba, Y., Kobayashi, S., Tanaka, N., Kominami, S., Fukuchi, Y., Mizunari, T., Hamamoto, M., Teramoto, A. and Katayama, Y. (2005) Efficacy of edaravone, a free radical scavenger, for the treatment of acute lacunar infarction. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **45**: 344–348. discussion 348.
51. Watanabe, K., Watanabe, K. and Hayase, T. (1997) Radical scavenging mechanism of MCI-186. *Jpn. Pharmacol. Ther.* **25**: S1699–S1707.
52. Watanabe, K., Watanabe, K., Kuwahara, T. and Yamamoto, Y. (1997) Free radical-induced oxidation products of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186). *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.* **46**: 797–801.
53. Abe, S., Kirima, K., Tsuchiya, K., Okamoto, M., Hasegawa, T., Houchi, H., Yoshizumi, M. and

- Tamaki, T. (2004) The reaction rate of edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186)) with hydroxyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **52**: 186–191.
54. Anzai, K., Furuse, M., Yoshida, A., Matsuyama, A., Moritake, T., Tsuboi, K. and Ikota, N. (2003) *In vivo* radioprotection of mice by 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (Edaravone; Radicut), a clinical drug. *J. Radiat. Res.* **45**: 319–323.
55. Peng, R., Wang, D., Wang, B., Xia, G., Li, Y., Xiong, C., Gao, Y., Yang, H. and Cui, Y. (1999) Apoptosis of hemopoietic cells in irradiated mouse bone marrow. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **18**: 305–308.
56. Nakano, H., Kohara, M. and Shinohara, K. (2001) Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res.* **306**: 101–106.
57. Morita, A., Suzuki, N., Matsumoto, Y., Hirano, K., Enomoto, A., Zhu, J. and Sakai, K. (2000) p41 as a possible marker for cell death is generated by caspase cleavage of p42/SET β in irradiated MOLT-4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**: 627–632.
58. Bakkenist, C. J. and Kastan, M. B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 499-506.
59. Lavin, M. F., Birrell, G., Chen, P., Kozlov, S., Scott, S. and Gueven N. (2005) ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat. Res.* **569**(1-2): 123-132.

60. Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S. P., Tang, L., Jiang, T., Liang, D. C., Galons, H., Dierick, J. F., Pinna, L. A., Meggio, F., Totzke, F., Schächtele, C., Lerman, A. S., Carnero, A., Wan, Y., Gray, N. and Meijer, L. (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* **280**: 31208–31219.
61. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I. and Brownlee, M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**: 787–790.
62. Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**: 12–18.
63. Morita, A., Zhu, J., Suzuki, N., Enomoto, A., Matsumoto, Y., Tomita, M., Suzuki, T., Ohtomo, K. and Hosoi, Y. (2006) Sodium orthovanadate suppresses DNA damage-induced caspase activation and apoptosis by inactivating p53. *Cell Death Differ.* **341**: 499–511.
64. Yamamoto, M. and Takamatsu, Y. (1997) Pharmacokinetic studies of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186). –Protein binding and distribution to red blood cell- *Jpn. Pharmacol. Ther.* **25**: 245-253.
65. Cui, Z. G., Kondo, T., Feril, Jr. L. B., Waki, K., Inanami, O. and Kuwabara, M. (2004) Effects of antioxidants on X-ray- or hyperthermia- induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* **9**: 757–763.

66. Salganik, R. I. (2001) The benefits and hazards of antioxidants: Controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J. Am. Coll. Nutr.* **20**: 464S–472S.
67. Wahl, G. M. and Carr, A. M. (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nature Cell Biol.* **3**: E277–E286.
68. Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K. and Flavell, R. A. (1999) Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ.* **6**: 402–411.
69. Nicholson, D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **6**: 1028–1042.
70. Gross, A., McDonnell, J. M. and Korsmeyer, S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes. Dev.* **13**: 1899–1911.
71. Rajesh, K. G., Sasaguri, S., Suzuki, R. and Maeda, H. (2003) Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**: H2171–H2178.
72. Song, Y., Li, M., Li, J. C. and Wei, E. Q. (2006) Edaravone protects PC12 cells from ischemic like injury via attenuating the damage to mitochondria. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **7**: 749–756.
73. Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J. M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*

- 278:** 1966–1968.
74. Akagi, Y., Ito, K. and Sawada, S. (1993) Radiation induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: a study of dose effect relationships and their modification. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**: 47–56.
75. Zhang, N., Komine-Kobayashi, M., Tanaka, R., Liu, M., Mizuno, Y. and Urabe, T. (2005) Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke* **36**: 2220–2225.
76. Yagi, Y., Horinaka, S. and Matsuoka, H. (2005) Edaravone prevented deteriorated cardiac function after myocardial ischemia-reperfusion via inhibiting lipid peroxidation in rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **46**: 46–51.
77. Mantovani, G., Maccio, A., Madeddu, C., Mura, L., Gramignano, G., Russo, M. R., Murgia, V., Camboni, P., Ferreli, L., Mocci, M. and Massa, E. (2003) The impact of different antioxidant agents alone or in combination on reactive oxygen species, antioxidant enzymes and cytokines in a series of advanced cancer patients at different sites: correlation with disease progression. *Free Radic. Res.* **37**: 213–223.
78. Marzatico, F., Porta, C., Moroni, M., Bertorelli, L., Borasio, E., Finotti, N., Pansarasa, O. and Castagna, L. (2000) *In vitro* antioxidant properties of amifostine (WR-2721, Ethyol). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **45**: 172–176.
79. Grdina, D. J., Kataoka, Y., Basic, I. and Perrin, J. (1992) The radioprotector WR-2721 reduces

- neutron-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in mouse splenocytes when administered prior to or following irradiation. *Carcinogenesis* **13**: 811–814.
80. McClain, D. E., Kalinich, J. F. and Ramakrishnan, N. (1995) Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes. *FASEB J.* **9**: 1345–1354.
81. Inanami, O., Takahashi, K. and Kuwabara, M. (1999) Attenuation of caspase-3-dependent apoptosis by Trolox post-treatment of X-irradiated MOLT-4 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**: 155–163.
82. Siliciano, J. D., Canman, C. E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M. B. (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* **11**: 3471-3481.
83. Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J. and Mak, T. W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**: 1824-1827.
84. Unger, T., Sionov, R. V., Moallem, E., Yee, C. L., Howley, P. M., Oren, M. and Haupt, Y. (1999) Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. *Oncogene* **18**: 3205-3212.
85. Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S. and Halazonetis, T. D. (1999) Phosphorylation of

- Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 13777-13782.
86. Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. and Vousden, K. H. (1999) Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **19**: 1751-1758.
87. Blattner C., Tobiasch, E., Litfen, M., Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P. (1999) DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene* **18**: 1723-1732.
88. Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1999) Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* **104**: 263–269.
89. Tian, H., Wittmack, E. K. and Jorgensen, T. J. (2000) p21^{WAF1/CIP1} antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res.* **60**: 679-684.
90. Sohn, D., Essmann, F., Schluze-Osthoff, K. and Jänicke, R. U. (2006) p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res.* **66**: 11254-11262.
91. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. (2003) Apoptosis - the p53 network. *J. Cell Sci.* **116**: 4077-4085.

92. Shibata, H., Arai, S., Izawa, M., Murasaki, M., Takamatsu, Y., Izawa, O., Takahashi, C. and Tanaka, M. (1998) Phase I clinical study of MCI-186 (Edaravone; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) in healthy volunteers: safety and pharmacokinetics of single and multiple administration. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **29**: 863-876.