

急性放射線腸管障害の分子機構とその制御

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・医用理工学分野

森田 明典*、西山 祐一、坂井 卓磨、東 優一

(2023年3月15日掲載決定)

Molecular mechanisms of acute radiation intestinal injury and its control

Department of Biomedical Science and Technology, Graduate School of Biomedical Sciences,
Tokushima University

Akinori Morita*, Yuichi Nishiyama, Takuma Sakai, Yuichi Higashi

(Accepted for publication 15 March 2023)

腸管は代表的な放射線高感受性組織であり、放射線治療においては腹部・骨盤領域の腫瘍への処方線量を制限するリスク臓器である。高線量の放射線により腸組織が損傷を受けると腸上皮幹細胞の喪失を誘発するが、この過程は p53 によって制御される陰窩細胞死過程と炎症性の免疫応答による増悪過程の 2 段階のプロセスからなることが明らかにされつつある。本総説では、それぞれの過程の分子機構について概説し、急性放射線腸管障害を効果的に制御する方法について考察する。

キーワード：放射線防護剤、p53、p53 調節剤、炎症応答、炎症制御

The intestinal tract is a typical radiosensitive tissue and a risk organ in radiotherapy that limits the prescribed dose to tumors in the abdominal and pelvic regions. High-dose radiation damage to intestinal tissue induces loss of intestinal stem cells, and it is becoming clear that this process consists of two steps: a crypt cell death process regulated by p53 and an exacerbation process by inflammatory immune responses. In this review, we will outline the molecular mechanisms of each process and discuss how to effectively control acute radiation intestinal injury.

Key words: radioprotector, p53, p53 modulator, inflammatory response, inflammation control

* 〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

TEL: +81-88-633-9052, E-mail: morita@tokushima-u.ac.jp

1. はじめに

生体が放射線による被ばくを全身に受けると主に放射線に対する感受性が高い骨髄組織や腸組織が損傷を受け、10 Gy 以下の線量の全身被ばくでは骨髄死、10 Gy を超える線量では腸死に至る(1)。放射線防護剤 (radiation protector または radioprotector) とは、放射線による細胞や組織の障害を予防するため被ばく前投与して放射線抵抗性を付与する薬剤である。また、放射線障害後の組織回復を促進する薬剤は放射線緩和剤 (radiation mitigator) とよばれ区別されるが、広義では放射線防護剤として扱われることもある。放射線防護剤としては、放射線による間接作用を減弱するラジカル消去剤のほか、生体防御機構の活性化剤の開発が進みつつある。また、放射線緩和剤では造血促進剤が主流である。

放射線治療においては、腫瘍組織は防護せず正常組織を防護する選択性が放射線防護剤の課題である。臨床応用されている放射線防護剤は米国食品医薬品局 FDA に承認された抗酸化剤アミフォスチン (別名 WR-2721、商品名 Ethyol) のみであり、頭頸部がんの放射線治療において唾液腺を選択的に保護する口内乾燥症の予防薬としての使用が認められている(2, 3)。アミフォスチンは、ラジカル消去に必要なチオール基がリン酸基で覆われたプロドラッグであり、体内で脱リン酸化された後に放射線防護効果を発揮する。頭頸部がんでの取込みやホスファターゼによる脱リン酸化が唾液腺に比べて遅い傾向があることから、アミフォスチン投与 10~30 分内のタイミングで照射することで唾液腺を選択的に防護することが可能となる。すなわち、腫瘍において薬剤の取込みおよび脱リン酸化に遅延が生じる場合に限り、放射線治療に適した選択性が発揮されることになる。

また、米国では急性放射線症候群 (Acute Radiation Syndrome; ARS) に対する研究が精力的に進められ、緊急被ばく医療対策として、2015 年以降、G-CSF (filgrastim) および持続型 G-CSF 製剤である pegfilgrastim、GM-CSF (sargramostim) と、トロンボポエチン受容体アゴニストである Romiplostim (Nplate) の 4 つの造血促進剤が FDA に承認された(4)。これらの薬剤は、がん医療においては化学療法剤による骨髄抑制の治療薬として有効な造血因子が含まれるが、放射線だけで固形腫瘍を治療している時に、治療を中断しなければならないほど造血組織に広範に放射線が当たることはまれであり、放射線治療においては造血組織よりも腫瘍近傍のリスク臓器を護ることを考慮すべきである。

2. リスク臓器としての腸管および p53 の制御による放射線腸管障害の防護

腸管は代表的な放射線高感受性組織であり、放射線治療においては腹部・骨盤領域の腫瘍への処方線量を制限するリスク臓器である。高線量の放射線により腸組織が損傷を受けると腸上皮幹細胞の喪失を誘発する。高線量の放射線被ばくは放射線誘発胃腸管症候群 (Radiation-Induced Gastrointestinal Syndrome: RIGS) を引き起こし、下痢、脱水症、敗血症、腸の出血などの症状を伴い被ばく後 10 日から 15 日で死亡する(1)。また、放射線治療においては分割照射によって正常

組織障害は低減されるものの腸管が照射野に近接する場合には、腸管出血や潰瘍形成、狭窄、穿孔、腸閉塞等の急性・晩期障害が発生することが知られている(5,6)。参考文献5では、骨盤内放射線治療を受けた患者コホートにおいて、9割が治療中に急性RIGSを経験し、7割の患者が急性RIGS症状の不完全な消失または急性RIGSに由来する症状の進行のいずれかを経ること、また、6ヶ月後までに放射線直腸障害の診断を受けた患者が3割に達したことを報告している。

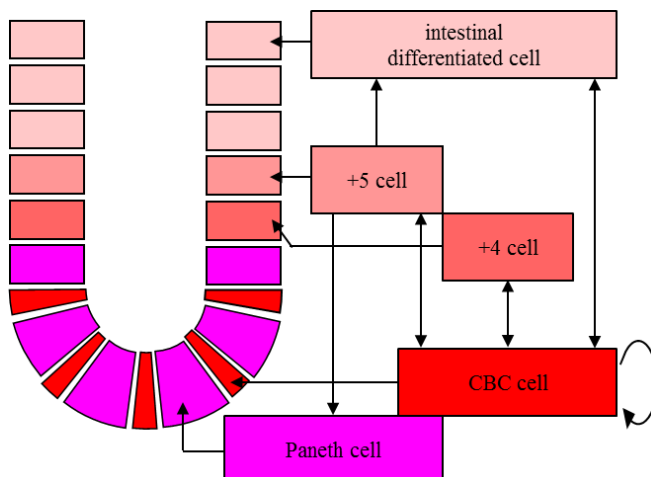


図1 腸陰窩の構造

CBC 幹細胞が活発に分裂を繰り返し、上部の分化細胞を押し上げ、絨毛の先端から脱落することで腸上皮組織の細胞は新しいものへと置き換わる。矢印の向きは分化の方向性および可逆性を示す。

図1に腸陰窩の構造を示す。腸組織の表面は陰窩および絨毛から構成されており、腸上皮幹細胞には活発に分裂を繰り返している陰窩底部円柱細胞 (Crypt base columnar; CBC) 細胞と分裂をほとんど行っていない+4細胞の2種類の存在が知られている(7,8)。CBC細胞は分化した分泌細胞であるパネート (Paneth) 細胞の間に存在することで、陰窩底部を構成しており、パネート細胞より分泌されるニッチ (微小環境) 因子により未分化の状態を維持している(9,10)。CBC細胞が活発に分裂しているのに対してパネート細胞は分裂していないため、パネート細胞から離れニッチ因子を受け取ることができなくなったCBC細胞が分化することで腸上皮組織が構成されている。CBC細胞が活発に分裂を繰り返し、上部に存在する分化細胞を押し上げ、分化とともに陰窩上部、絨毛へと移動、絨毛の先端から脱落することで腸上皮組織の細胞は数日で新しいものへと置き換わる。また、分泌前駆細胞には+4細胞や+5細胞といったものがあり、これらの子孫は通常分泌細胞のみであるが、放射線などの障害によりCBC細胞が損傷を受けると脱分化することでCBC細胞として機能する予備細胞である(11-14)。腸陰窩の細胞はそれぞれの細胞に特異的に多く発現する遺伝子の存在が知られており、CBC細胞では *Asc12*, *Lgr5*, *Olfm4*, *Ephb3*, +4細胞では *Bmi1*, *Hopx*, *Lrig1*, *Tert*, *Mex3a*, +5細胞では *Dlil1*, さらに分化した細胞では *Alpi*, *Krt19* がマーカー遺伝子として報告さ

れている(15-26)。放射線などによる損傷が与えられたマウスの腸上皮から採取されたサンプルのマーカ遺伝子の発現量を調べることで、損傷が大きい細胞や防護剤投与により損傷から保護される細胞を推定することが可能となる。

がん抑制遺伝子産物である p53 は、骨髄や腸管の放射線細胞死の進行に関わるが、その関わり方は両組織で全く異なっている。骨髄では放射線誘発アポトーシスを誘導し細胞死を促進するように働く一方、腸上皮では非アポトーシス性の分裂死 (mitotic death) に対する抵抗性因子として機能する。腸上皮特異的に *Trp53* をノックアウトしたマウスは後半身照射試験でより放射線感受性となるのに対し、*Trp53* を 2 コピー余計にもつ Super p53 マウスは抵抗性を示す(27)。

したがって、リスク臓器を防護するためには p53 の役割に応じ、p53 の制御方法を変える必要がある。我々は、骨髄障害に対しては p53 の細胞死促進活性を抑制する p53 阻害剤 (p53 inhibitor) としてオルトバナジン酸ナトリウムを(28, 29)、さらに腸管障害に対しては p53 の抗細胞死活性を高める p53 調節剤 (p53 modulator) として 5-クロロ-8-キノリノール (5CHQ) をそれぞれ効果的な p53 制御剤として発見した(30) (図 2)。p53 阻害性のオルトバナジン酸ナトリウムは腹部単回照射後の RIGS に対して一切の防護効果を示さない一方(31)、5CHQ 系化合物は RIGS に有効性を示す数少ない防護剤の一つであり、腸管保護剤の開発を推進する貴重なリード化合物である。

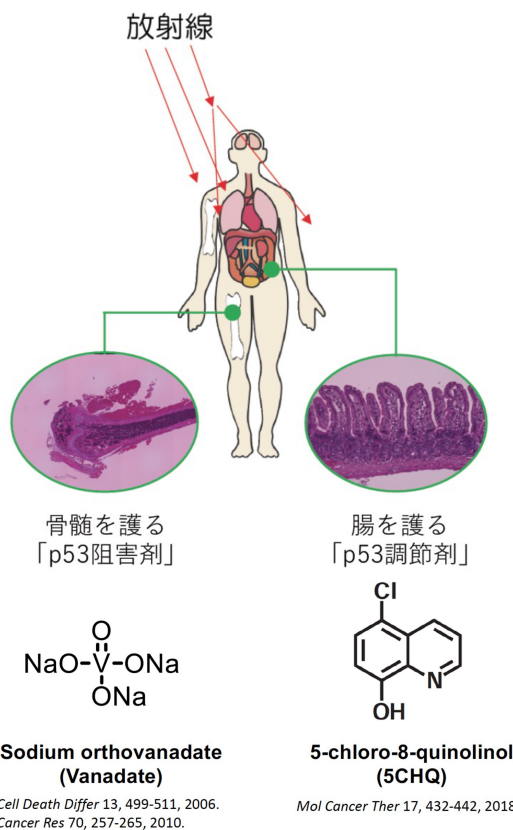


図2 放射線感受性組織を護る2種のp53制御剤

p53 制御剤には「p53 阻害剤」と「p53 調節剤」の2つのタイプがあり、全身被ばくによる骨髄抑制には「p53 阻害剤」、局所被ばくによる腸障害には「p53 調節剤」が有効である。

5CHQ は、p53 依存的にマウスの腸上皮で p21 をコードする *Cdkn1a* の発現を亢進させ Puma をコードする *Bbc3* の発現を抑制する。また、CBC 幹細胞のマーカー遺伝子である *Lgr5* の発現量は後半身照射後の RIGS によって低下するが 5CHQ はこれを抑制する (30)。*Cdkn1a* は p53 依存的に細胞周期を停止することで放射線による損傷を受けた腸上皮で非アポトーシス性の分裂死を抑制し (27)、*Bbc3* はマウス腸上皮幹細胞で放射線誘発アポトーシスの誘導因子として作用する (32)。C57BL/6 を背景とする *Cdkn1a* ノックアウトマウス (*Cdkn1a*^{-/-})、*Bbc3* ノックアウトマウス (*Bbc3*^{-/-})、両遺伝子のダブルノックアウトマウス (*Cdkn1a*^{-/-}/*Bbc3*^{-/-})、および *Trp53* ノックアウトマウス (*Trp53*^{-/-}) を用い、15 Gy 全身照射後の生存日数を野生型マウスと比較した先行研究では、最も生存日数が短縮されたのは約 3 日短縮した *Trp53* ノックアウトマウスであった。また、*Bbc3* ノックアウトマウスでは生存日数が約 3 日延長されたことから *Bbc3* は放射線による腸組織の細胞死を促進すること、ならびに *Cdkn1a* ノックアウトマウスおよびダブルノックアウトマウスではどちらも約 1 日短縮されたことから *Cdkn1a* は腸組織の保護に寄与するだけでなく、その欠損は *Bbc3* 遺伝子欠損による生存延長効果が無効化してしまうことが明らかにされている (33)。この報告は、p53 調節による放射線防護では、p21 の機能を損なうことなく PUMA を抑制することが重要であることを示している。

細胞の放射線抵抗性を高める p53 調節剤は、5CHQ 以外にもいくつか報告されている。セリン・スレオニンキナーゼである GSK-3 の阻害剤 CHIR99021 は GSK-3 のリン酸化標的分子の一つであるアセチルトランスフェラーゼ Tip60 のリン酸化を阻害することで、p53 分子内のリジン 120 アセチル化および PUMA 誘導を特異的に阻害する一方、p21 誘導は抑制しないため腹部照射による腸死を効果的に抑制する (34)。金含有抗リウマチ薬であるオーラノフィン (Auranofin) は、p53 の安定化制御に関与するデユビキチナーゼ HAUSP7 を阻害することによりプロテアソーム分解を阻害して p53 を安定化する (35)。この活性により、5CHQ と同様に薬剤単独で p53 の蓄積および p21 を誘導するが PUMA は誘導せず、PUMA 誘導に必要な p53 の DNA 結合ドメインにおけるリジン 120 アセチル化も誘導しない。これらの p53-p21 経路の活性化作用による可逆的細胞周期停止により腹部照射による腸死を抑制して生存率を向上させた (36)。また、マウス腹部腫瘍モデルやヒト悪性結腸オルガノイドにおいて薬剤単独による抗腫瘍効果、および放射線併用時におけるさらなる抗腫瘍効果が得られた。Pantらは、Mdm2 P2 プロモーターに存在する p53 応答エレメントを変異させることにより、p53-Mdm2 のネガティブフィードバックループを破壊したノックインマウスを作製した (37)。このマウスは、平常時は正常な p53 レベルおよび活性を持ち、DNA 損傷刺激後に野生型マウスよりも p53 活性が亢進する特徴を有し、後半身照射による腸死に抵抗性を示す。また、このマウスにおいて、*Lgr5* 陽性幹細胞においてのみ p53 をノックアウトした場合や *Cdkn1a* (*p21*) をノックアウトした場合は腸死抵抗性が失われることも確認した (38)。DNA 損傷時における p53 のプロテアソーム分解経路阻害による p53-p21 経路活性化の有効性を遺伝子改変マウスにおいて実証した本研究では、Mdm2 阻害剤であ

る RG7112 を用いて野生型マウスの p53 活性を薬理的に一過性増強することで腸死を抑制できることも報告している (38)。

p53 制御剤による放射線防護の課題として、がん性変異細胞に対する排除機能を抑制することによる発がん促進の懸念を指摘されることが多いが、p53 の DNA 損傷応答として代表的な「アポトーシス」「細胞周期の停止」「老化」の 3 つの機能を抑制しても、p53 による発がん抑制には影響せず、p53 による「発がん抑制」の機能はこれら 3 機能とは独立した遅発性応答であることが種々のモデルマウスより明らかにされており (39-41)、一時的な p53 制御の有用性の証拠は十分揃っている。これらの結果より、薬理的手段による野生型 p53 活性の一時的増強が、臨床で放射線治療を受ける患者の腸管障害の問題を軽減する予防的措置として有効な戦略となることが強く期待される。

3. 免疫機構の制御による放射線腸管障害の防護

種々の炎症関連遺伝子の遺伝子改変マウスの結果から、RIGSにおける自然免疫応答の重要性が近年明らかにされつつある。炎症応答を惹起する分子構造パターンは、外来性の病原体に特徴的な分子群である病原体関連分子パターン (Pathogen-Associated Molecular Patterns; PAMPs) と、損傷細胞から漏出する自己由来の免疫原性分子群であるダメージ関連分子パターン (Damage-Associated Molecular Patterns; DAMPs) の 2 つに大別される (42)。RIGS においては、後者の DAMPs として自己核酸の漏出が特に重要である。

DAMPs をリガンドとして活性化するパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptors; PRRs) については、細胞内外の DAMPs の分布および PRRs の細胞内配置による DAMPs 認識経路に留意する必要がある。細胞内 PRRs の活性化では、マクロファージなどの免疫担当細胞の炎症誘導性細胞死であるパイロトーシス (Pyroptosis) が誘導される (43)。また、細胞外漏出後に分解・除去しきれなかった DAMPs は周辺細胞のエンドサイトーシスによって取り込まれ、エンドソーム内 Toll 様受容体 (Toll-Like Receptors; TLRs) である TLR3、TLR7、TLR9 を活性化する。なお、それぞれのアゴニストは、TLR3 は二本鎖 RNA (dsRNA)、TLR7 は一本鎖 RNA、TLR9 は CpG-DNA である (44)。

武村らは TLR3 が RIGS の発症に重要であることを報告している (45)。*Tlr2*、*Tlr3*、*Tlr4*、*Tlr5*、*Tlr7*、*Tlr9* の単独欠損マウスの 10 Gy 全身照射試験において抵抗性を示したのは *Tlr3* ノックアウトマウスのみであり、陰窩細胞死が有意に減少することにより RIGS に対する抵抗性を示した。また RIGS が、RNA の細胞外漏出を引き起こす p53 依存的な陰窩細胞死、および漏出した dsRNA が TLR3 を活性化し TLR ファミリー分子中 TLR3 だけが利用できる TRIF-RIP1 経路を介して p53 非依存的な腸上皮細胞死を誘導する 2 段階の障害プロセスからなることを明らかにした。また TLR3-dsRNA 結合の阻害剤は、陰窩細胞死を減少させることにより RIGS を改善した。なお、TRIF-RIP1 経路はネクロトーシスを誘導する経路として知られているが、実際に RIP1 の特異的阻害剤であるネクロスタチン-1 を用いた研究では、事前投与ではなく事後投与 (全身照射 24-72 時間後) においてのみ

マウス生存率を向上させる緩和効果が確認されており(46)、腸管障害の2段階モデルを支持する結果と考えられる。

パイロトーシス研究は、Friedlander らによってマウス初代マクロファージを炭疽菌致死毒素で処理したときに細胞死と細胞内容物の急速な放出が起こることが発見されたことにより始まった(47)。その後、赤痢菌に感染したマクロファージの細胞死に関する研究によって、1992年に Zychlinsky らによって初めて発見された(48)。この細胞死は、カスパーゼ依存性、DNA 損傷、核凝縮などアポトーシスと類似した特徴があるため当初はアポトーシスとみなされていた。しかし、2001年に D' Souza らによって、カスパーゼ-1 依存的な炎症性プログラム細胞死を表す用語としてギリシャ語の pyro (火・熱) と ptosis (落下) に由来するパイロトーシスとして新たに定義された(49)。

パイロトーシスでは、インフラマソーム形成が重要な役割を果たす(50) (図3)。インフラマソームは、アダプター分子である ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing Caspase recruitment domain) が Pyrin ドメインを介して細胞内 PRRs と、また同時に ASC が自身の Caspase recruitment ドメインを介してカスパーゼ-1 と結合することで構成される炎症性カスパーゼ活性化のためのプラットフォームである。IL-1 β や IL-18 などの炎症性サイトカインが分泌シグナル配列を持たないため細胞外放出されるメカニズムが長らく不明であったが、カスパーゼ-1 によって切断・活性化される細胞膜小孔形成因子ガスダーミン D (Gasdermin D; GSDMD) が発見され(51)、現在ではこの細胞死が主要な放出機構と考えられるようになった。また、GSDMD の発見後、GSDMD 分子群による小孔形成を介した細胞死をパイロトーシスとするという新定義が提唱されている(52)。

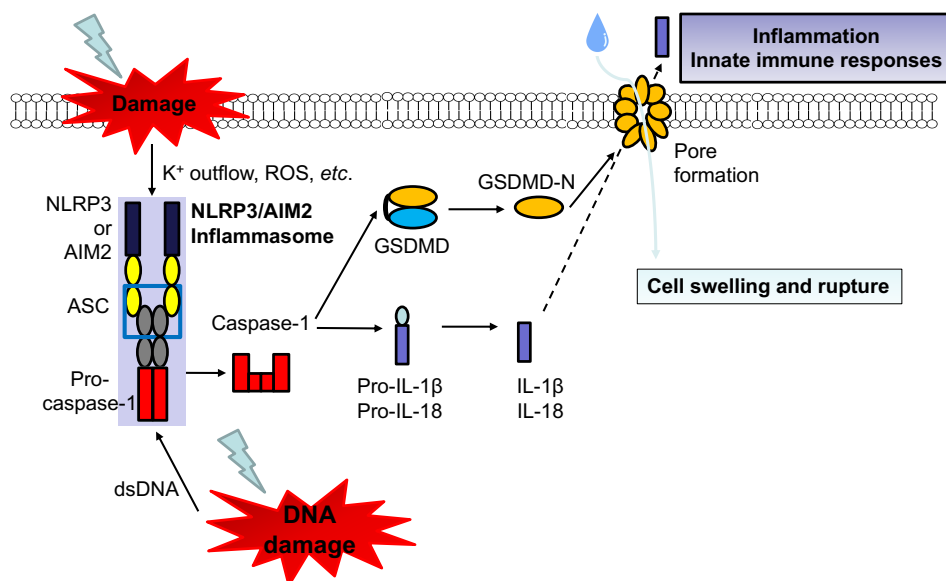


図3 パイロトーシスにおけるインフラマソームの役割

RIGS においては、二本鎖 DNA (dsDNA) の PRR である Absent in melanoma 2 (AIM2) をセンサーとする AIM2 インフラマソームが腸上皮の細胞死や組織損傷を制御することが知られている (53)。この報告では、同プラットフォーム内の分子であるカスパーゼ-1、AIM2、アダプター分子である ASC のいずれをノックアウトしても放射線による腸死が抑制され、RIGS と炎症性細胞死の深い関わりを指摘している。さらに、腸上皮特異的にカスパーゼ-1 をノックアウトした場合でも腸死抵抗性が維持されることから、RIGS においてインフラマソームを介した細胞死が腸上皮細胞で生じていることも明らかにしている。

また、細胞膜の損傷に伴うカリウムイオン流入や活性酸素種 (ROS) だけでなく種々の PAMPs や DAMPs によって活性化するため、活性化に必要な分子パターンが明確ではない NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) をノックアウトしたマウスも 9.5 Gy 全身照射試験において抵抗性を示すことが報告されている (54)。

パイロトーシスの機構は TLRs を介したシグナル経路が詳細に調べられているが、その過程は古典的経路においては 2 段階のプロセスで起こることが知られている (43, 50)。第 1 段階の過程では、TLRs とリガンドとの結合による「プライミング」を必要とし、NF- κ B が活性化され、インフラマソーム複合体を形成するいくつかのタンパク質や IL-1 β や IL-18 などの炎症性サイトカインの前駆体発現が誘導される。次の第 2 段階の過程においてカスパーゼ-1 が活性化し、プロ IL-1 β やプロ IL-18、GSDMD が切断されることにより、細胞の溶解を伴うパイロトーシスに至る。また、細胞内 PAMPs によってインフラマソームの形成を経ずに直接カスパーゼ-4/5 が活性化してパイロトーシスに至る経路は非古典的経路とよばれる。RIGS における第 1 段階から第 2 段階への移行の分子機構や対象となる標的細胞の詳細は現在のところ判然としないが、AIM2 や NLRP3 のような細胞内 PRRs をノックアウトすると放射線抵抗性となることから、RIGS における第 2 段階は増悪因子と見なせる。

一方、第 1 段階のプライミングシグナルは、この経路を増強する各種アゴニストが放射線抵抗性をもたらすことから RIGS においては腸上皮細胞の抵抗性に寄与するシグナルと考えられる。現在までに TLR2/6 (55-59)、TLR4 (60-64)、TLR5 (65-67) および TLR9 (68) のアゴニストが RIGS に対する防護効果や緩和効果を示すことが報告されている。

また、RIGS による障害の程度が著しい場合、細胞内 PRRs である AIM2 や NLRP3 が第 1 段階のプライミングプロセスを経ずに活性化し、炎症反応を増大させるシグナルが作動することも考えられる。このような状況下ではインフラマソームの要であるカスパーゼ-1 を創薬標的分子とした抗 RIGS 戦略が有効と考えられる。炎症性疾患の治療のための見込みのある治療法として、いくつかの炎症性カスパーゼ阻害剤が設計されてきた。効果の不十分性、標的特異性の低さ、または重篤な副作用などの障壁により、臨床試験が行われたものはごくわずかであり、臨床研究の結果承認された合成カスパーゼ阻害剤は未だない (69)。合成カスパーゼ阻害剤は、ペプチドベース阻害剤、ペプチド模倣

阻害剤、非ペプチド性阻害剤に分類される。カスパーゼ-1を標的とする阻害剤として、ペプチドベース阻害剤では Ac-YVAD-CMK (70) や Z-YVAD-FMK (71)、ペプチド模倣阻害剤では VX-765 (Belnacasan) (72)、VRT-043198 (73)、VX-740 (Pralnacasan) (74) が盛んに研究されてきた。RIGS に対しては、実際に VX-765 が腹部照射による腸死抑制効果を示すことが報告されている (75, 76)。また、間接的ではあるが NLRP3 を制御する Micheliolide (77)、Rosiglitazone (78)、Resveratrol (79)、あるいは AIM2 を制御する 5-androstenediol (80) に RIGS に対する有効性があることが報告されている。

4. まとめ

放射線急性腸管障害の分子機構は、p53 を介した過程から始まり、次に免疫系の増悪過程である炎症応答に至る 2 段階のプロセスを経ることを概説した。即ち、第 1 段階の過程の制御法としてアポトーシスを増強しない p53 機能の亢進が有効であり、このような働きを促進する p53 調節剤としていくつかの化合物を紹介した。また、第 2 段階の過程の制御方法として、パイロトーシスのプライミングシグナルを増強する TLR シグナル伝達経路のアゴニスト、ならびにインフラマソーム活性を抑制する阻害剤を紹介した。p53 調節剤による放射線腸管障害の抑制はマウスモデルにおいて正常組織の選択的防護が期待される成果が得られつつある。第 2 段階の過程の制御によって正常組織選択性が実現されるかどうかについては今後のさらなる研究の展開を待ちたい。両過程の病理機構の研究がさらに進むことでより効果的な放射線腸管障害の制御方法が開発されることを期待したい。

謝辞

貴重な執筆の機会をいただきました近藤隆先生 (名古屋大学) に厚く御礼申し上げます。

本報で紹介した研究の一部は、JSPS 科研費 24689050、16K10396、19K17143、19H03604、21K07644 による助成、および放射線災害・医科学研究拠点 共同利用・共同研究による助成により実施されました。この場をお借りして御礼申し上げます。

参考文献

1. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., 2012.
2. Weiss JF. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. Environ Health Perspect 1997; 105: 1473-8.
3. Capizzi RL, Oster W. Chemoprotective and radioprotective effects of amifostine: an update of clinical trials. Int J Hematol 2000; 72: 425-35.

4. Singh VK, Seed TM. Repurposing pharmaceuticals previously approved by regulatory agencies to medically counter injuries arising either early or late following radiation exposure. *Front Pharmacol* 2021; 12: 62484.
5. Henson CC, Davidson SE, Ang Y, Babbs C, Crampton J, Kelly M, Lal S, Limdi JK, Whatley G, Swindell R, Makin W, McLaughlin J. Structured gastroenterological intervention and improved outcome for patients with chronic gastrointestinal symptoms following pelvic radiotherapy. *Support Care Cancer* 2013; 21:2255-65.
6. Shadad AK, Sullivan FJ, Martin JD, Egan LJ. Gastrointestinal radiation injury: Prevention and treatment. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 199-208.
7. Beumer J, Clevers H. Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development* 2016; 143: 3639-49.
8. Henning SJ, von Furstenberg RJ. GI stem cells - new insights into roles in physiology and pathophysiology. *J Physiol* 2016; 594: 4769-79.
9. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459: 262-5.
10. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011; 469: 415-8.
11. Hua G, Thin TH, Feldman R, Haimovitz-Friedman A, Clevers H, Fuks Z, Kolesnick R. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology* 2012; 143: 1266-76.
12. Yu J. Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy. *Transl Cancer Res* 2013; 2: 384-96.
13. Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, Su N, Luo Y, Heilshorn SC, Amieva MR, Sangiorgi E, Capecchi MR, Kuo CJ. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 466-71.
14. Buczacki SJ, Zecchini HI, Nicholson AM, Russell R, Vermeulen L, Kemp R, Winton DJ. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 2013; 495: 65-9.
15. Powell AE, Wang Y, Li Y, Poulin EJ, Means AL, Washington MK, Higginbotham JN, Juchheim A, Prasad N, Levy SE, Guo Y, Shyr Y, Aronow BJ, Haigis KM, Franklin JL, Coffey RJ. The pan-

- ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* 2012; 149: 146-58.
16. van Es JH, Sato T, van de Wetering M, Lyubimova A, Yee Nee AN, Gregorieff A, Sasaki N, Zeinstra L, van den Born M, Korving J, Martens ACM, Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1099-104.
 17. Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, Wang Q, Lu MM, Epstein JA. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* 2011; 334: 1420-4.
 18. Tetteh PW, Basak O, Farin HF, Wiebrands K, Kretschmar K, Begthel H, van den Born M, Korving J, de Sauvage F, van Es JH, van Oudenaarden A, Clevers H. Replacement of lost Lgr5-positive stem cells through plasticity of their enterocyte-lineage daughters. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 203-13.
 19. Batlle E, Henderson JT, Begthel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111: 251-63.
 20. Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 2008; 40: 915-20.
 21. Barriga FM, Montagni E, Mana M, Mendez-Lago M, Hernando-Momblona X, Sevillano M, Guillaumet-Adkins A, Rodriguez-Esteban G, Buczacki SJA, Gut M, Heyn H, Winton DJ, Yilmaz OH, Attolini CS, Gut I, Batlle E. Mex3a marks a slowly dividing subpopulation of Lgr5+ intestinal stem cells. *Cell Stem Cell* 2017; 20: 801-816. e7.
 22. van der Flier LG, Haegerbarth A, Stange DE, van de Wetering M, Clevers H. OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2009; 137: 15-7.
 23. van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, Kujala P, Haegerbarth A, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Guryev V, Oving I, van Es JH, Barker N, Peters PJ, van de Wetering M, Clevers H. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 2009; 136: 903-12.
 24. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegerbarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007; 449: 1003-7.

25. Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, Farilla L, Kranendonk ME, Henderson DE, Baffour-Awuah NY, Ambruzs DM, Fogli LK, Algra S, Breault DT. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 179-84.
26. Asfaha S, Hayakawa Y, Muley A, Stokes S, Graham TA, Ericksen RE, Westphalen CB, von Burstin J, Mastracci TL, Worthley DL, Guha C, Quante M, Rustgi AK, Wang TC. Krt19(+)/Lgr5(-) cells are radioresistant cancer-initiating stem cells in the colon and intestine. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 627-38.
27. Kirsch DG, Santiago PM, di Tomaso E, Sullivan JM, Hou WS, Dayton T, Jeffords LB, Sodha P, Mercer KL, Cohen R, Takeuchi O, Korsmeyer SJ, Bronson RT, Kim CF, Haigis KM, Jain RK, Jacks T. p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. *Science* 2010; 327: 593-6.
28. Morita A, Zhu J, Suzuki N, Enomoto A, Matsumoto Y, Tomita M, Suzuki T, Ohtomo K, Hosoi Y. Sodium orthovanadate suppresses DNA damage-induced caspase activation and apoptosis by inactivating p53. *Cell Death Differ* 2006; 13: 499-511.
29. Morita A, Yamamoto S, Wang B, Tanaka K, Suzuki N, Aoki S, Ito A, Nanao T, Ohya S, Yoshino M, Zhu J, Enomoto A, Matsumoto Y, Funatsu O, Hosoi Y, Ikekita M. Sodium orthovanadate inhibits p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* 2010; 70: 257-65.
30. Morita A, Takahashi I, Sasatani M, Aoki S, Wang B, Ariyasu S, Tanaka K, Yamaguchi T, Sawa A, Nishi Y, Teraoka T, Ujita S, Kawate Y, Yanagawa C, Tanimoto K, Enomoto A, Neno M, Kamiya K, Nagata Y, Hosoi Y, Inaba T. A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist. *Mol Cancer Ther* 2018; 17: 432-42.
31. Nishiyama Y, Morita A, Wang B, Sakai T, Ramadhani D, Satoh H, Tanaka K, Sasatani M, Ochi S, Tominaga M, Ikushima H, Ueno J, Neno M, Aoki S. Evaluation of sodium orthovanadate as a radioprotective agent under total-body irradiation and partial-body irradiation conditions in mice. *Int J Radiat Biol* 2021; 97: 1241-51.
32. Qiu W, Carson-Walter EB, Liu H, Epperly M, Greenberger JS, Zambetti GP, Zhang L, Yu J. PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 576-83.
33. Leibowitz BJ, Qiu W, Liu H, Cheng T, Zhang L, Yu J. Uncoupling p53 functions in radiation-induced intestinal damage via PUMA and p21. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 616-25.

34. Wang X, Wei L, Cramer JM, Leibowitz BJ, Judge C, Epperly M, Greenberger J, Wang F, Li L, Stelzner MG, Dunn JCY, Martin MG, Lagasse E, Zhang L, Yu J. Pharmacologically blocking p53-dependent apoptosis protects intestinal stem cells and mice from radiation. *Sci Rep* 2015; 5: 8566.
35. Cummins JM, Vogelstein B. HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* 2004; 3: 689-92.
36. Nag D, Bhanja P, Riha R, Sanchez-Guerrero G, Kimler BF, Tsue TT, Lominska C, Saha S. Auranofin protects intestine against radiation injury by modulating p53/p21 pathway and radiosensitizes human colon tumor. *Clin Cancer Res* 2019; 25: 4791-807.
37. Pant V, Xiong S, Jackson JG, Post SM, Abbas HA, Quintás-Cardama A, Hamir AN, Lozano G. The p53-Mdm2 feedback loop protects against DNA damage by inhibiting p53 activity but is dispensable for p53 stability, development, and longevity. *Genes Dev* 2013; 27: 1857-67.
38. Pant V, Xiong S, Wasylshen AR, Larsson CA, Aryal NK, Chau G, Tailor RC, Lozano G. Transient enhancement of p53 activity protects from radiation-induced gastrointestinal toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 17429-37.
39. Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 2006; 443: 214-7.
40. Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* 2012; 149: 1269-83.
41. Valente LJ, Gray DH, Michalak EM, Pinon-Hofbauer J, Egle A, Scott CL, Janic A, Strasser A. p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep* 2013; 3: 1339-45.
42. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 2: 168.
43. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6: 128.
44. Kaczanowska S, Joseph AM, Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013; 93: 847-63.
45. Takemura N, Kawasaki T, Kunisawa J, Sato S, Lamichhane A, Kobiyama K, Aoshi T, Ito J, Mizuguchi K, Karuppuchamy T, Matsunaga K, Miyatake S, Mori N, Tsujimura T, Satoh T, Kumagai Y, Kawai T, Standley DM, Ishii KJ, Kiyono H, Akira S, Uematsu S. Blockade of TLR3

- protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nat Commun* 2014; 5: 3492.
46. Huang Z, Epperly M, Watkins SC, Greenberger JS, Kagan VE, Bayır H. Necrostatin-1 rescues mice from lethal irradiation. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1862: 850-6.
47. Friedlander AM. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J Biol Chem* 1986; 261: 7123-6.
48. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992; 358: 167-9.
49. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 2001; 9: 113-4.
50. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev* 2015; 265: 6-21.
51. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526: 660-5.
52. Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42: 245-54.
53. Hu B, Jin C, Li HB, Tong J, Ouyang X, Cetinbas NM, Zhu S, Strowig T, Lam FC, Zhao C, Henao-Mejia J, Yilmaz O, Fitzgerald KA, Eisenbarth SC, Elinav E, Flavell RA. The DNA-sensing AIM2 inflammasome controls radiation-induced cell death and tissue injury. *Science* 2016; 354: 765-8.
54. Liu YG, Chen JK, Zhang ZT, Ma XJ, Chen YC, Du XM, Liu H, Zong Y, Lu GC. NLRP3 inflammasome activation mediates radiation-induced pyroptosis in bone marrow-derived macrophages. *Cell Death Dis* 2017; 8: e2579.
55. Shakhov AN, Singh VK, Bone F, Cheney A, Kononov Y, Krasnov P, Bratanova-Toshkova TK, Shakhova VV, Young J, Weil MM, Panoskaltis-Mortari A, Orschell CM, Baker PS, Gudkov A, Feinstein E. Prevention and mitigation of acute radiation syndrome in mice by synthetic lipopeptide agonists of Toll-like receptor 2 (TLR2). *PLoS One* 2012; 7: e33044.
56. Ciorba MA, Riehl TE, Rao MS, Moon C, Ee X, Nava GM, Walker MR, Marinshaw JM, Stappenbeck TS, Stenson WF. *Lactobacillus* probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. *Gut* 2012; 61: 829-38.

57. Singh VK, Ducey EJ, Fatanmi OO, Singh PK, Brown DS, Purmal A, Shakhova VV, Gudkov AV, Feinstein E, Shakhov A. CBLB613: a TLR 2/6 agonist, natural lipopeptide of *Mycoplasma arginini*, as a novel radiation countermeasure. *Radiat Res* 2012; 177: 628-42.
58. Liu W, Chen Q, Wu S, Xia X, Wu A, Cui F, Gu YP, Zhang X, Cao J. Radioprotector WR-2721 and mitigating peptidoglycan synergistically promote mouse survival through the amelioration of intestinal and bone marrow damage. *J Radiat Res* 2015; 56: 278-86.
59. Kurkjian CJ, Guo H, Montgomery ND, Cheng N, Yuan H, Merrill JR, Sempowski GD, Brickey WJ, Ting JP. The Toll-like receptor 2/6 agonist, FSL-1 lipopeptide, therapeutically mitigates acute radiation syndrome. *Sci Rep* 2017; 7: 17355.
60. Neta R, Oppenheim JJ, Schreiber RD, Chizzonite R, Ledney GD, MacVittie TJ. Role of cytokines (interleukin 1, tumor necrosis factor, and transforming growth factor beta) in natural and lipopolysaccharide-enhanced radioresistance. *J Exp Med* 1991; 173: 1177-82.
61. Riehl T, Cohn S, Tessner T, Schloemann S, Stenson WF. Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. *Gastroenterology* 2000; 118: 1106-16.
62. Riehl TE, Foster L, Stenson WF. Hyaluronic acid is radioprotective in the intestine through a TLR4 and COX-2-mediated mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G309-16.
63. Liu C, Zhang C, Mitchel RE, Cui J, Lin J, Yang Y, Liu X, Cai J. A critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) and its' in vivo ligands in basal radio-resistance. *Cell Death Dis* 2013; 4: e649.
64. Guo J, Chen Y, Lei X, Xu Y, Liu Z, Cai J, Gao F, Yang Y. Monophosphoryl lipid a attenuates radiation injury through TLR4 activation. *Oncotarget* 2017; 8: 86031-42.
65. Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, Kurnasov OV, Fort FL, Osterman AL, Didonato JA, Feinstein E, Gudkov AV. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 2008; 320: 226-30.
66. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, Gewirtz AT. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* 2008; 180: 8280-5.
67. Brackett CM, Greene KF, Aldrich AR, Trageser NH, Pal S, Molodtsov I, Kandari BM, Burdelya LG, Abrams SI, Gudkov AV. Signaling through TLR5 mitigates lethal radiation damage by neutrophil-dependent release of MMP-9. *Cell Death Discov* 2021; 7: 266.
68. Saha S, Bhanja P, Liu L, Alfieri AA, Yu D, Kandimalla ER, Agrawal S, Guha C. TLR9 agonist protects mice from radiation-induced gastrointestinal syndrome. *PLoS One* 2012; 7: e29357.

69. Dhani S, Zhao Y, Zhivotovsky B. A long way to go: caspase inhibitors in clinical use. *Cell Death Dis* 2021; 12: 949.
70. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994; 371: 346-7.
71. Eldadah BA, Yakovlev AG, Faden AI. The role of CED-3-related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1997; 17: 6105-13.
72. Stack JH, Beaumont K, Larsen PD, Straley KS, Henkel GW, Randle JC, Hoffman HM. IL-converting enzyme/caspase-1 inhibitor VX-765 blocks the hypersensitive response to an inflammatory stimulus in monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients. *J Immunol* 2005; 175: 2630-4.
73. Wannamaker W, Davies R, Namchuk M, Pollard J, Ford P, Ku G, Decker C, Charifson P, Weber P, Germann UA, Kuida K, Randle JC. (S)-1-((S)-2-[[1-(4-amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino]-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide (VX-765), an orally available selective interleukin (IL)-converting enzyme/caspase-1 inhibitor, exhibits potent anti-inflammatory activities by inhibiting the release of IL-1beta and IL-18. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 509-16.
74. Leung-Toung R, Li W, Tam TF, Karimian K. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review. *Curr Med Chem* 2002; 9: 979-1002.
75. Wu D, Han R, Deng S, Liu T, Zhang T, Xie H, Xu Y. Protective effects of flagellin A N/C against radiation-induced NLR pyrin domain containing 3 inflammasome-dependent pyroptosis in intestinal cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018; 101: 107-17.
76. Zhang F, Liu T, Huang HC, Zhao YY, He M, Yuan W, Li L, Li J, Wu DM, Xu Y. Activation of pyroptosis and ferroptosis is involved in radiation-induced intestinal injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2022; 631: 102-9.
77. Wu DM, Li J, Shen R, Li J, Yu Y, Li L, Deng SH, Liu T, Zhang T, Xu Y, Wang DG. Autophagy induced by micheliolide alleviates acute irradiation-induced intestinal injury via inhibition of the NLRP3 inflammasome. *Front Pharmacol* 2022; 12: 773150.
78. Hu L, Chen H, Zhang X, Feng Z, Zhang H, Meng Q. Rosiglitazone ameliorates radiation-induced intestinal inflammation in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome and TNF- α production. *J Radiat Res* 2020; 61: 842-50.
79. Sun H, Cai H, Fu Y, Wang Q, Ji K, Du L, Xu C, Tian L, He N, Wang J, Zhang M, Liu Y, Wang Y, Li J, Liu Q. The Protection effect of resveratrol against radiation-induced inflammatory bowel

- disease via NLRP-3 inflammasome repression in mice. *Dose Response* 2020; 18: 1559325820931292.
80. Wu T, Liu W, Fan T, Zhong H, Zhou H, Guo W, Zhu X. 5-Androstenediol prevents radiation injury in mice by promoting NF- κ B signaling and inhibiting AIM2 inflammasome activation. *Biomed Pharmacother* 2020; 121: 109597.