

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16346

研究課題名(和文) 皮膚線維化とリンパ管機能不全を標的とした放射線障害指向型リハビリテーションの開発

研究課題名(英文) Development of radiation disorder oriented rehabilitation targeting radiation-induced skin fibrosis and lymphatic dysfunction

研究代表者

成田 大一 (NARITA, HIROKAZU)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：90455733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線照射により惹起される皮膚損傷や関節可動域制限、リンパ管の異形成に対するリハビリテーション(超音波療法)の効果について、ラット後肢の放射線皮膚障害モデルを用いて検証した。その結果、放射線照射後14日目頃より皮膚の損傷や関節可動域制限が重度化したが、超音波療法によりこれらは有意に改善した。また、リンパ管新生も超音波療法により増加する傾向がみられた。以上のことから、急性期の放射線皮膚障害に対する補助療法としての超音波療法の可能性が考えられた。今後は、超音波療法のエビデンスを構築するために、より長期的な形態変化と分子発現について調査していくことが課題となる。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to evaluate rehabilitation (therapeutic ultrasound (TUS)) in improvement of radiation-induced skin damages, restriction of joint mobility and reduction of lymphatic vessels, using our original rat model with x-ray irradiated hind limb. Eighteen adult male rats were divided into control (Con-G), 30 Gy x-ray irradiation (30 Gy-G), and 30 Gy x-ray irradiation with TUS treatment group (US-G). In our results, radiation-induced disorders were significantly severe from 14 days after x-ray irradiation, and TUS significantly improved the skin damages 28 days after x-ray irradiation and reduced the early restriction of range of motion. The number of lymphatic vessels tended to increase in the US-G, compared with the 30 Gy-G. The present findings indicate the possibility of TUS as an adjuvant treatment for radiation-induced skin disorder, though further examinations for the morphological and molecular changes of the x-ray irradiated skin mediated by TUS are required.

研究分野：解剖学

キーワード：放射線障害 リハビリテーション 皮膚 超音波療法 リンパ管

### 1. 研究開始当初の背景

近年、工業や医療現場での放射線を用いた検査や治療に起因する放射線皮膚障害の事例が多数報告されている。特に医療現場では、がん治療を目的として放射線が使用されることが多く、その副作用として皮膚の炎症や線維化、リンパ浮腫などが多数報告されており、放射線治療を受ける患者の生活の質(QOL)を引き下げる要因となっている<sup>1)</sup>。

放射線による皮膚の線維化を誘導するタンパクとして、トランスフォーミング増殖因子(TGF- $\beta$ )が着目されている<sup>1)</sup>。このTGF- $\beta$ は、放射線照射により産生が活性化されることで、コラーゲンの産生を加速させる。これにより皮膚の線維化が惹起されるが、線維化はさらにリンパの輸送能力の低下を引き起こす。またTGF- $\beta$ は、リンパ管内皮細胞の線維芽細胞への分化を誘導し、リンパ管の線維化を引き起こす。このようなリンパ管の異形成と機能不全によりリンパ浮腫が発症する。一方、放射線治療に伴うリンパ浮腫に対しては、リンパドレナージの効果が報告されている<sup>2)</sup>。しかし、リンパドレナージはリンパ浮腫に対する理学療法であり、リンパ浮腫発症の背景にある皮膚の線維化やリンパ管の異形成と機能低下に対する効果の報告は乏しい。

近年臨床の現場では、急性期の皮膚損傷に対する種々の早期リハビリテーション介入が創傷治癒を早めるとともにTGF- $\beta$ の産生や皮膚線維化を抑制することが報告されている。

本研究では、放射線障害による皮膚の炎症や線維化ならびにリンパ管の異形成と機能不全の改善を目的とした新しいリハビリテーション(Radiation Disorder Oriented Rehabilitation: RDOR)の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

上記の背景を基に本研究では、放射線皮膚障害に対するRDORの効果について1)運動機能、2)皮膚の外観ならびに組織学的所見、3)線維化を促進するタンパク(TGF- $\beta$ )の発現量、4)リンパ管の分布に焦点をあてて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、弘前大学動物実験委員会の承認(承認番号:G13001)を受けた後、同委員会が定める規定に基づき実施した。

#### (1) 実験動物ならびに実験方法

実験動物には9週齢のWistar系雄性ラット18匹を用い、放射線非照射群(Con群, n=6)、30Gy放射線照射群(30Gy群, n=6)、30Gy放射線照射後、RDORとして超音波療法を実施した群(US群, n=6)の3群に無作為に割り付けた。放射線照射は、X線照射装置MBR-1520R(150 kV and 20 mA, Hitachi Medical

Corporation, Tokyo, Japan)を使用し、ラットの右後肢にのみ実施した。またUS群では、超音波治療器UST-77Q(ITO Physiotherapy and Rehabilitation, Tokyo Japan)を使用して、放射線照射翌日から、放射線照射部位の皮膚に1週間に5日、1日10分超音波療法(3 MHz, 0.5 W/cm<sup>2</sup>)を実施した。実験期間は4週間とし、評価項目として1週間に1度ラット足関節最大背屈角度<sup>3)</sup>ならびにRadiation-induced skin reaction score<sup>4,5)</sup>を測定するとともに、実験最終日に深麻酔下で放射線照射部位の皮膚を採取し、光学顕微鏡ならびにWestern Blotting法により解析した。

各評価項目の詳細を以下に示す。

#### 足関節最大背屈角度測定

深麻酔下にあるラットの股ならびに膝関節を90度屈曲位にし、blindされた検者がラットの足関節を他動的に背屈させ、抵抗を感じた角度を保持し、測定した。基本軸は膝関節裂隙中央と腓骨外果を結ぶ線、移動軸を足根骨の足底面とし、角度は角度計を用いて5°刻みで測定した。

#### Radiation-induced skin reaction score

blindされた検者が、ラットの放射線照射部位を観察し、Table 1に基づき皮膚の外観を評価した。

Table 1. Radiation-induced skin reaction score

| Score | Observation  |
|-------|--|
| 0     | Normal   |
| 0.5   | Very slight reddening  |
| 1     | Definite abnormality with reddening                                    |
| 1.5   | Moist breakdown in one very small area with scaly or crusty appearance |
| 2     | Breakdown of large areas of skin, possibly moist in places             |
| 2.5   | Breakdown of large areas of skin with definite moist exudate           |
| 3     | Breakdown of most of skin with moist exudate                           |
| 3.5   | Complete moist breakdown of irradiated area; necrosis                  |

#### 光学顕微鏡による解析

採取した皮膚からパラフィン標本ならびに凍結標本を作製後、パラフィン切片に対してはHematoxylin-eosin(HE)染色を実施し、病理診断学の経験のある医師が病理組織学的に評価した。また凍結切片に対しては、リンパ管内皮細胞のマーカーであるLYVE-1に対する免疫染色を実施し、LYVE-1陽性細胞面積を測定した。

#### Western Blotting法による解析

採取した皮膚をホモジナイズし、SDS-PAGE電気泳動法に供し、ブロッティング

を実施した。1次抗体として、TGF- $\beta$ の活動性を示す TGF- $\beta$  induced protein 抗体を使用し、その発現量を半定量的に解析した。

## (2) 統計解析

各群ならびに各測定時における足関節最大背屈角度と Radiation-induced skin reaction score の比較には Steel-Dwass 法ならびに Tukey-Kramer 法を用いた。また、放射線照射 28 日後における TGF- $\beta$  induced protein の発現量の 3 群間の比較には Tukey-Kramer 法を、30Gy 群と US 群の LYVE-1 陽性細胞面積の比較には Student の t 検定を用いた。全ての統計解析において有意水準は 5%未満とした。

## 4. 研究成果

### (1) 本研究の主な成果

超音波照射により放射線による皮膚の炎症症状が軽減され、足関節の関節可動域も改善した。

30Gy 群ならびに US 群では放射線照射後 3 日後よりわずかに発赤が出現し、14 日頃になると脱毛や浸出液がみられた。しかし、照射 28 日後、US 群では、30Gy 群に比べ皮膚の症状が有意に改善していた (Fig 1)。また、放射線照射 28 日後の皮膚の病理組織像では、US 群に比べ 30Gy 群で多くの好中球が表皮や真皮に浸潤し、重度の炎症所見を示した (Fig 2)。これらのことから、US 群では、30Gy 群に比べ炎症症状が軽減され、創傷治癒における炎症期から癒痕形成へより早期に移行したことが考えられた。

足関節背屈可動域では、Con 群と US 群の間に有意差は認められなかったが、30Gy 群では他の 2 群に比べ照射後 2 週間より有意に可動域が低下した (Fig 3)。先行研究では、放射線障害に起因する関節可動域制限の評価を照射後 2 か月以上経過後からのみ評価していたが、本研究から照射 2 週間後という早期から関節可動域に影響が出ることも明らかになった。また超音波照射は早期から関節の可動性維持に貢献することが示唆された。

一方、放射線照射 28 日後における TGF- $\beta$  induced protein の発現量には 3 群間で有意差は認められず (Fig 4)、皮膚線維化の組織像や病期による分子の発現量、ならびにその機構をより詳細に調査する必要があると考えられた。

超音波照射により放射線障害部位の皮下にリンパ管新生が誘導される可能性が示唆された。

放射線照射 28 日後における皮下のリンパ管の分布量は、有意差は認められなかったものの、30Gy 群に比べ US 群で多い傾向が認められた (Fig 5)。このことから超音波照射により放射線障害部位にリンパ管新生が誘導された可能性がある。しかし本研究では、

リンパ管新生を誘導因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C やそのレセプターである VEGFR3 までは調査していないため今後はこれらの分子発現も調査し、超音波のリンパ管新生に対する効果をさらに検証する必要がある。

(2) 得られた成果の国内外における位置付けならびに今後の展望

本研究は、放射線皮膚障害に対する超音波療法の効果について、動物モデルを用いて運動機能ならびに組織学的に示した初めて報告である。しかし、上述のように限られた評価項目の限られた期間でしかその効果を示していない。今後は、超音波療法のエビデンスを構築するために、より長期的な形態変化と分子発現について調査していくとともに 3 次元人工ヒトモデルを用いて検証していくことが課題となる。

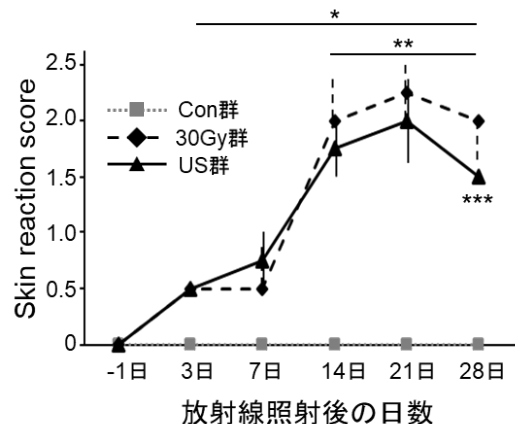


Fig 1. Radiation-induced skin reaction score の比較

30Gy 群と US 群において放射線照射前日に比べ、それ以降では有意に皮膚障害が増悪し (\*:  $p < 0.05$ )、さらに 14 日目以降では 3、7 日目よりも有意に症状が重度化している (\*\*:  $p < 0.05$ )。28 日目には、US 群で 30Gy 群に比べ有意に改善している (\*\*\*:  $p < 0.05$ )。

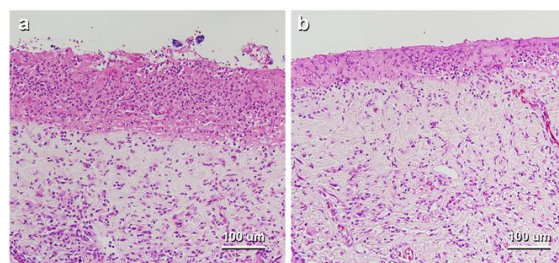


Fig 2. 放射線照射 28 日後の皮膚の 30Gy 群 (a) と US 群 (b) の HE 染色像

US 群に比べ 30Gy 群で表皮ならびに真皮に多くの好中球が浸潤し、重度の炎症症状を呈する。

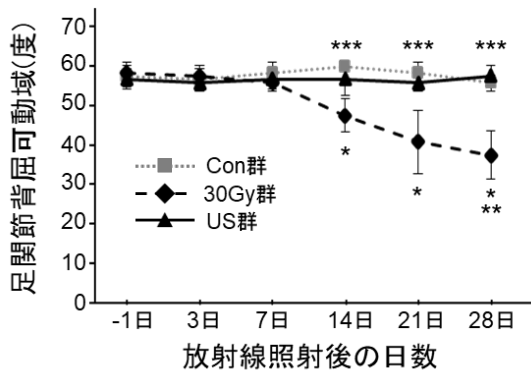


Fig 3. 足関節最大背屈可動域の比較

30Gy 群は他の 2 群に比べ 14 日目以降で有意に可動域が低下しており(\*\*\*:  $p < 0.01$ ), また群内比較においても照射前日, 3, 7 日目と比べて 14 日目以降で有意に可動域が低値を示す(\*, \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*は 14 日目と 28 日目の比較)。Con 群と US 群の間には全ての評価日で有意差は認められない。

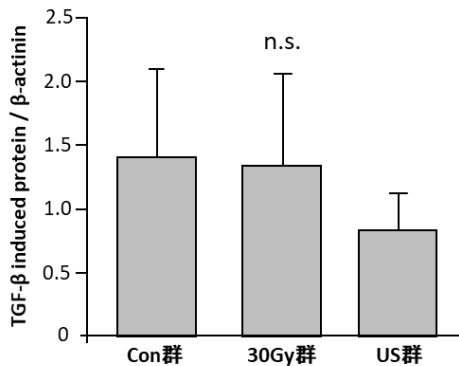


Fig 4. 放射線照射 28 日後の皮膚の TGF-β induced protein の発現量の比較

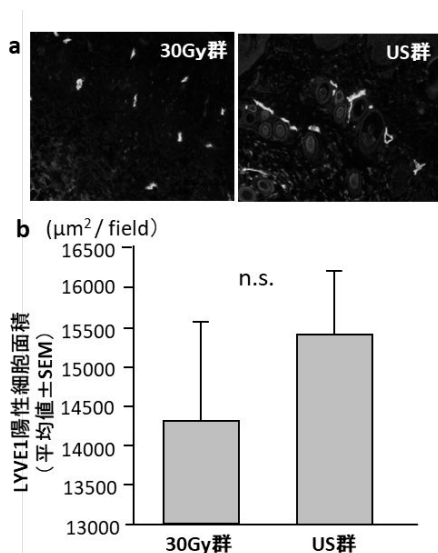


Fig 5. 放射線照射 28 日後の皮膚の LYVE-1 免疫染色像 (a) と LYVE-1 陽性細胞面積 (b) 有意差は認められないものの US 群で 30Gy 群に比べ LYVE-1 陽性細胞面積が増加する傾向が認められた。

## 参考文献

- 1) Avraham T, et al. Radiation therapy causes loss of dermal lymphatic vessels and interferes with lymphatic function by TGF-beta1-mediated tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:589-605, 2010.
- 2) Williams AF, et al. A randomized controlled crossover study of manual lymphatic drainage therapy in women with breast cancer-related lymphedema. *Eur J Cancer Care* 11:254-61, 2002.
- 3) Okita M, et al. Effects of short duration stretching on disuse muscle atrophy in immobilized rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc* 4:1-5, 2001.
- 4) Iwakawa M, et al. Different radiation susceptibility among five strains of mice detected by a skin reaction. *J Radiat Res* 44:7-13, 2003.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Narita H, Koeda S, Takahashi K, Shimoda H. Effects of therapeutic ultrasound on radiation-induced skin damage and restriction of joint mobility in rats. *Biomed Res J*, 1:1-5, 2018. (査読有) [[http://www.scitcentral.com/article.php?journal=43&article=140&article\\_title=Effects of Therapeutic Ultrasound on Radiation-Induced Skin Damage and Restriction of joint Mobility in Rats#tabs2](http://www.scitcentral.com/article.php?journal=43&article=140&article_title=Effects%20of%20Therapeutic%20Ultrasound%20on%20Radiation-Induced%20Skin%20Damage%20and%20Restriction%20of%20joint%20Mobility%20in%20Rats#tabs2)]

[学会発表](計 1 件)

- (1) 小枝周平, 成田大二, 佐藤ちひろ, 澄川幸志: 放射線熱傷に対する超音波療法の効果に関する試験的検討. 第 50 回日本作業療法学会, 2016 年 9 月 9 日 ~ 11 日, 札幌市教育文化会館(札幌市).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田大一 (Narita, Hirokazu)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90455733