

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15430

研究課題名(和文)放射線障害の克服による肝細胞癌に対する放射線治療の適応拡大

研究課題名(英文)Examination of the mechanisms of which radiation induces liver disorder for expanding radiation therapy

研究代表者

巽 智秀(Tatsumi, Tomohide)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20397699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：SBRTの登場により放射線耐用量の低い肝臓においても悪性腫瘍に対する治療適応の拡大が期待されているが、放射線性肝障害の機序は明らかになっていない。そこで、今回我々は放射線照射が肝再生に与える影響について検討した。放射線照射を受けたマウスの肝臓では、p53の下流で細胞周期を負に制御するp21が上昇していた。放射線照射を行った肝臓に対し、部分肝切除にて肝再生を誘導したところ、p21の誘導に伴い、肝再生が遅延していた。そこで、肝細胞特異的にp53を欠損させたマウスに対し放射線照射後に部分肝切除を行い同様の検討を行ったところ、放射線照射に伴い上昇するp21の誘導が抑制され肝再生の遅延が改善した。

研究成果の概要(英文)：Radiation therapy for liver cancer was restricted because of the limited tolerance dose of liver for irradiation. However, the mechanism of radiation induced liver disease and the effect of the regenerative capacity of irradiated liver is unclear. So we investigated the regenerative capacity of irradiated liver. p21, which is induced by the activation of p53 and negatively regulate cell cycle, significantly increased in the irradiated liver compared with non-irradiated liver. In the irradiated liver, p21 mRNA expression level significantly increased and liver regeneration was significantly suppressed after partial hepatectomy compared with non-irradiated liver after partial hepatectomy. In the irradiated p53-knockout liver after partial hepatectomy, p21 induction was suppressed compared with the irradiated p53-wild type liver after partial hepatectomy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：放射線肝障害

1. 研究開始当初の背景

近年、SBRT(stereotactic body radiotherapy)の登場により悪性腫瘍に対する放射線治療の治療適応範囲の拡大が期待されている。現在、原発性肝癌に対しては、2004年に5cm以内の孤立性肝腫瘍に対し保険収載され、2014年からは孤立性肝細胞癌に対する他施設共同前向き試験が行われており、肝切除術やラジオ波焼灼術の適応外とされていた症例に対し、治療適応の選択肢が増えることが期待されている。

一方で、放射線照射による放射線性肝障害は、時として致死的となるものの有効な治療法や予防法がなく、放射線照射の線量自体を下げるのが最大の治療とされている。

2. 研究の目的

正常肝細胞では放射線照射による放射線性障害(RILD:Radiation Induced Liver Damage)が問題となっているが、これまで肝臓における放射線照射の研究において、放射線障害の動物モデルが存在せず、また、その放射線量も他臓器への影響もあるため十分ではなく、病態や機序についての検討はされていなかった。

今回、我々は、SBRTで使用されている高容量の放射線照射を可能とするマウスモデルを作成し、その肝臓への影響について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL6Jマウスに対し、胸部および下腹部を鉛板で遮蔽し、上腹部に局限して対外照射を行った。さらに放射線照射後に70%部分肝切除を行い肝再生への影響を検討した。

また、放射線照射によりp53が活性化されることが知られており、肝細胞特異的p53欠損マウス(p53 Alb-Cre p53 fl/fl)に対し放射線照射後に部分肝切除術を施行し、肝再生への影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 肝限局照射マウスモデル

8-9週齢のC57BL6J雄マウスに対し、胸部と下腹部を遮蔽し10Gyの肝限局照射を施行した。施行後1,2,12,24時間後にSacrificeを行い、DNA double-strand breakを検出するヒストンH2Ax免疫染色を施行した。照射1時間後、2時間後の肝臓の全葉において均一に陽性細胞を認めた。その後、12時間後、24時間後には陽性細胞は消失した。

また、10Gyの全身照射を行ったマウスと肝限

局照射を施行したマウスを14日間観察したところ、全身照射マウスでは85%が死亡したが、肝限局照射マウスでは死亡例を認めなかった。

(2) C57BL6Jマウスにおける肝限局照射の影響

8-9週齢のC57BL6J雄マウスに対し、胸部と下腹部を遮蔽し10Gyの肝限局照射を施行し、放射線照射終了1,2,3,8日後にSacrificeを行った。AST,ALT,T-Bilに明らかな変化を認めなかった。リアルタイムPCR法でp53、p21、Puma、CyclinD1、CyclinE、CTGFの発現の評価を行った。p53は放射線照射終了1日後後に上昇し、以後は照射前と差を認めなかった。p21は、放射線照射1日後から上昇し2日後を最大として以後8日後においても照射前よりも上昇を認めた。PumaやCyclinD1、CyclinE、CTGFは明らかな変化を認めなかった。

(3) 肝細胞特異的p53欠損マウスにおける肝限局照射

8-10週齢の肝細胞特異的p53欠損雄マウスおよび同腹の野生型雄マウスに対し、10Gyの肝限局照射を施行し、放射線照射終了1,2,3,8日後にSacrificeを行った。AST,ALT,T-Bilに明らかな変化を認めなかった。リアルタイムPCR法でp53、p21、Puma、CyclinD1、CyclinEの評価を行った。野生型マウスでは照射数量1日後よりp21の上昇を認めていたが、肝細胞特異的p53欠損マウスでは、p21の上昇は認めなかった。また、PumaやCyclinD1、CyclinEはp53欠損マウスで明らかな変化を認めなかった。

肝細胞特異的p53の欠損により、放射線により誘導されるp21の上昇は認めなかったことから、肝臓においては放射線照射により誘導されるp21はp53に依存的であると考えられた。

(4) C57BL6Jマウスにおける放射線照射後の肝再生

8-9週齢のC57BL6J雄マウスに対し、胸部と下腹部を遮蔽し10Gyの肝限局照射を施行し24時間後に70%部分肝切除を行い肝再生への影響を検討した。コントロール群、放射線照射単独群、肝部分切除単独群、放射線照射後肝部分切除群の4群の比較を行った。

まず、肝再生能を評価するため、肝重量体重比について検討した。放射線照射単独群とコントロール群に肝重量体重比の差を認めな

かった。放射線照射後肝部分切除群は肝部分切除単独群に比し、肝重量体重比は術後3日目において有意に低下していた。(肝部分切除単独群2.93%v放射線照射後肝部分切除群2.61%, $n>7$, $p<0.01$)また、肝増殖マーカーであるPCNA、Ki67陽性細胞数の評価を行った。コントロール群、放射線照射単独群では陽性細胞は認めなかった。肝部分切除単独群では術後2日目において全肝細胞中67%でPCNA陽性細胞を認めたが、放射線照射後肝部分切除群ではPCNA陽性細胞は全肝細胞中22%で陽性細胞を認め、放射線照射後肝部分切除術群で有意に低下していた。また、Ki67免疫染色では、肝部分切除単独群では術後2日目において全肝細胞中48%で陽性細胞を認めており、放射線照射後肝部分切除群では陽性細胞は全肝細胞中6%で陽性細胞を認めており、放射線照射後肝部分切除術群で有意に低下していた。また、リアルタイムPCR法にてp53、p21、Puma、CyclinD1の発現の評価を行った。P53、Pumaは4群間で明らかな変化を認めなかった。p21、CyclinD1は放射線照射後肝部分切除群で有意に上昇しており、p21はウエスタンブロットでも上昇を認めた。放射線照射によりp53を介してp21が上昇し、細胞周期が停止することで、肝再生の遅延が惹起される可能性が示唆された。

(5) 肝細胞特異的 p53 欠損マウスにおける肝再生

8-11週の肝細胞特異的p53欠損雄マウスおよび同腹の野生型雄マウスに対し70%肝部分切除術を施行した。肝重量体重比で肝再生の評価を行ったが、両群間に有意差を認めなかった。肝増殖マーカーとして、Ki7、PCNA免疫染色を施行したが、両群間に有意差を認めなかった。以上からp53の欠損は、肝再生能に影響しないと考えられた。

(6) 肝細胞特異的 p53 欠損マウスにおける放射線照射後の肝再生

8-11週の肝細胞特異的p53欠損雄マウスおよび同腹の野生型雄マウスに対し、胸部と下腹部を遮蔽し10Gyの肝限局照射を施行し24時間後に70%部分肝切除を行い肝再生への影響を検討した。放射線照射後肝部分切除を施行した肝細胞特異的p53欠損マウスは術後7日目において肝重量体重比は3.37%であり、放射線照射後肝部分切除を施行した野生型マウスでは術後7日目の肝重量体重比2.91%に対し、優位に上昇していた。また、放射線照射後肝部分切除を施行した肝細胞特異的

p53欠損マウスは術後7日目の肝重量体重比は肝部分切除のみを施行した野生型マウスの肝重量体重比3.35%と有意差を認めなかった。肝増殖マーカーであるPCNA、Ki67陽性細胞数の評価を行った。放射線照射後肝部分切除を施行した野生型マウスでは、術後2日目のKi67陽性細胞は全肝細胞中16.8%であったが、肝細胞特異的p53欠損マウスでは67.9%であり、これは肝部分切除のみを施行した野生型マウスにおける全肝細胞中のKi67陽性細胞率65.7%と有意差を認めなかった。また、PCNA陽性細胞数においても、放射線照射後肝部分切除を施行した野生型マウスでは、術後2日目のPCNA陽性細胞は全肝細胞中25.1%であったが、肝細胞特異的p53欠損マウスでは89.8%であり、これは肝部分切除のみを施行した野生型マウスにおける全肝細胞中のPCNA陽性細胞率87.2%と有意差を認めなかった。

また、リアルタイムPCR法にてp53、p21、Puma、CyclinD1の発現の評価を行った。Pumaは野生型マウス、肝細胞特異的p53欠損マウスで有意差を認めなかった。一方で肝細胞特異的p53欠損マウスではp21の上昇は認めず、また、CyclinD1の上昇も認めなかった。以上から、放射線照射による肝再生の遅延はp53を介したp21が関与している可能性が高いと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

占部真貴子、正田隼人、齋藤義修、小玉尚宏、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎
放射線肝限局照射モデルマウスを用いた肝再生能の検討(一般口演)第54回肝臓学会総会 2018.6 大阪

占部真貴子、正田隼人、齋藤義修、小玉尚宏、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎
放射線照射が肝再生へ与える影響についての検討(シンポジウム口演)
第25回肝細胞研究会 2016.6 東京シンポジウム

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 智秀 (TATSUMI, Tomohide)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20397699

(2) 研究分担者

阪森 亮太郎 (SAKAMORI, Ryotaro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10644685

(3) 研究分担者

疋田 隼人 (HIKITA, Hayato)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20623044

(4) 研究協力者

齋藤 義修 (SAITO, Yoshinobu)
大阪大学・大学院医学系研究科・博士課程
大学院生
研究者番号：

(5) 研究協力者

占部 真貴子 (URABE, Makiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・博士課程
大学院生
研究者番号：