

令和元年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20032

研究課題名(和文)放射線脳障害に対する抗HMGB1抗体を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of treatment for radiation-induced brain injury using HMGB1 antibody

研究代表者

高垣 匡寿(Takagaki, Masatoshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70724433

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、近年注目されているHMGB1の核外放出が脳に対する放射線照射の影響でも認められるかどうかを明らかにし、放射線脳障害の治療の対象となりうるかを検証するものである。本研究により、放射線照射後の脳内では、ミクログリアにおいてHMGB1の核外放出が生じていることを示すことができた。また、その現象は放射線照射後の時間により異なる部位で生じることも明らかとなった。この結果は抗HMGB1抗体を用いた放射線障害に対する治療の可能性を見出したものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性脳腫瘍患者の生命予後は延長している。転移性脳腫瘍に対する治療法として放射線の全脳照射が一般的に行われているが、その副作用として遅発性の放射線脳障害が代表的であり、治療後の生活に影響を与えるため大きな問題となっている。本研究ではマウスを用いた実験を行い、放射線照射後の脳内でHMGB1の核外放出が認められることを明らかにした。その結果から、抗HMGB1抗体を用いた放射線障害に対する新たな治療の可能性を見出すことができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is whether the extracellular release of HMGB1 is occur due to radiation-induced brain injury. In this study, extracellular release of HMGB1 was occur in the microglia of the brain after irradiation. Additionally, the phenomenon occurs at different sites by the time after irradiation. This result has the possibility of treatment for radiation-induced brain injury using HMGB1 antibodies.

研究分野：脳神経外科

キーワード：放射線脳障害 HMGB1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

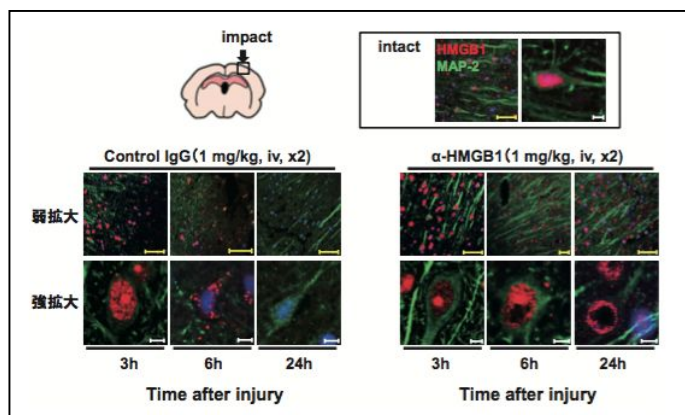
分子標的薬治療の登場によりがんの集学的治療は近年大きく進歩したと言える。その一方で、本邦では毎年約3～9万人程度の患者で転移性脳腫瘍が生じているとされ、癌患者の生命予後、機能予後を悪化させる病変として問題となっている。転移性脳腫瘍の予後は現疾患の状態に大きく影響されるが、転移個数が1個で原発巣がコントロールされている場合にかぎると、腫瘍摘出術+全脳照射(WBRT)を行った場合の生存期間中央値(Median survival time: MST)は10～16ヶ月と比較的予後が良いと報告されている。我が国では、転移性脳腫瘍に対する標準治療は、外科的摘出術もしくは定位放射線治療とWBRTの組み合わせが一般的であるが、転移性脳腫瘍患者の生命予後が延長している現在、WBRTが脳に対して及ぼす遅発性有害事象が問題として注目されている。

放射線照射後の脳組織ではTNF- α 及びIL-1 β の炎症性サイトカインが分泌され、その炎症反応が神経障害を悪化させていることが動物実験モデルにおいて報告されている[1]。その為、放射線照射後の脳内における炎症性サイトカインを抑制することにより遅発性放射線障害の発生が予防できる可能性がある。

近年、核内に存在する非ヒストン蛋白であるHigh mobility group box 1(HMGB1)が急性肺炎、肝炎、リウマチ性関節炎等の様々な炎症性病態に関与することが報告され、脳梗塞や頭部外傷においてもその関与が注目されている。さらに、抗HMGB1抗体を用いることで脳梗塞領域の縮小や外傷後の浮腫の消失が報告されており、その作用機序としては血管透過性亢進の抑制、TNF- α 等の炎症性サイトカインの発現抑制などが考えられている(下図)[2]。

放射線照射時におけるHMGB1の動態については不明な点が多いものの、Dongらは肺の放射線障害モデルにおいて抗HMGB1抗体を用い放射線肺障害を抑制したと報告しており、その治療薬としての可能性を指摘している[3]。

本研究では、放射線照射後のラット脳におけるHMGB1の動態を観察し、抗HMGB1抗体を用いることで放射線脳障害が抑制できることを病理組織やMRIでの画像検査等を用いて証明し、放射線脳障害の予防に向けた新たな治療の可能性を示すことを目的とする。



参考文献

- [1] Dong X et al. Int J Radiat Biol 2015;91(3):224-39
- [2] Okuma Y et al. Ann Neurol 2012;72(3):373-84
- [3] Wang L et al. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(5):4815-4822

2. 研究の目的

転移性脳腫瘍に対する標準治療は、外科的摘出術もしくは定位放射線治療と WBRT の組み合わせが一般的であるが、転移性脳腫瘍患者の生命予後が延長している現在、WBRT が脳に対して及ぼす遅発性有害事象が問題として注目されている。本研究の目的は動物実験モデルを用いて、全脳照射 (whole brain radiation ; WBRT) 後の放射線脳障害における短期あるいは長期における HMGB 1 (high mobility group box protein 1) の関与を病理学的に、また神経放射線学的に明らかにし、更に、抗 HMGB1 抗体による放射線脳障害の予防効果を証明することで、脳腫瘍患者に用いられる放射線治療の合併症予防を目的とした新たな治療法を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) HMGB1 の核外放出の確認 (中大脳動脈閉塞モデルを用いた検証)

本研究は HMGB1 の核外放出を確認するため、マウスの中大脳動脈閉塞モデルを用いることとした。マウスは C57BL/6J, 雄, 8 週齢 (日本クレアから入手) を使用した。セボフルラン吸入 麻酔下に腹臥位とし、直腸温 37 度前後に保った。右側頭部頭皮を切開し、一部側頭筋を除去した後、Doppler 血流計で側頭骨に接するように固定した。次に、体位を仰臥位にして頸部を正中切開した。顕微鏡下に総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を露出して、総頸動脈近位部を結紮した。その後、総頸動脈上壁を切開してシリコン糸を内頸動脈に向けて挿入し、中大脳動脈を閉塞させた。血管の閉塞は Doppler の血流が 10~30%程度まで低下することで確認した。1 時間の閉塞を行った後、シリコン糸は抜去した。脳梗塞モデルマウスは中大脳動脈閉塞後 4 時間後に 4%PFA で灌流固定し脳を摘出し凍結切片を作成した。凍結切片に対して HMGB1 は Goat anti rabbit IgG を用いて赤色に蛍光染色を行い、GFAP は Donkey anti mouse IgG を用いて緑色に蛍光染色を行った。細胞核は DAPI を用いて蛍光染色を行った。

(2) 放射線照射後の脳組織における HMGB1 の核外放出の検証

マウスは C57BL/6J, 雄, 8 週齢 (日本クレアから入手) を使用した。鎮静下に頭部への放射線照射を行った。放射線照射料は 10Gy, 15Gy, 30Gy, 40Gy とした。照射後はそれぞれ 6 時間、24 時間、48 時間の経過観察の後、4% PFA で灌流固定し脳を摘出し凍結切片を作成した。(1) と同様の手法で染色を行った。また、Iba-1 を用いた蛍光染色も追加し、microglia との関係性も検証した。

(3) 脳片側照射での非照射側との比較。

マウスは C57BL/6J, 雄, 8 週齢 (日本クレアから入手) を使用した。鉛を用いた特殊装置を作成し、マウスの頭部片側だけに放射線照射を行うべく実験を行った。照射線量は 15Gy, 30Gy, 45Gy とした。照射後は (2) と同様の手順で HMGB1 抗体の核外放出を観察した。

4. 研究成果

(1) HMGB1 の核外放出の確認 (中大脳動脈閉塞モデルを用いた検証)

マウスの脳梗塞モデルにおいて、Penumbra 領域、Core 領域において HMGB1 の核外放出を確認することができた (図 1)。

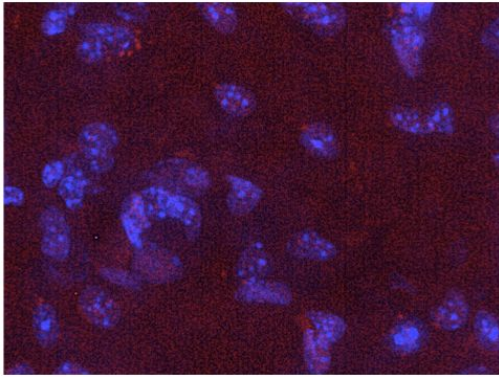


図 1

(2) 放射線照射後の脳組織における HMGB1 の核外放出の検証

放射線量 30Gy までの照射では、6 時間後、24 時間後、48 時間後で HMGB1 の核外放出は認められなかった。40Gy の照射では、6 時間後では変化を認めなかったものの、24 時間後では線条体、歯状回のみクログリアにおいて HMGB1 の核外放出が認められた (図 2)。また、48 時間後では線条体、歯状回に加えて皮質下においても同様の所見が確認できた (図 3)。

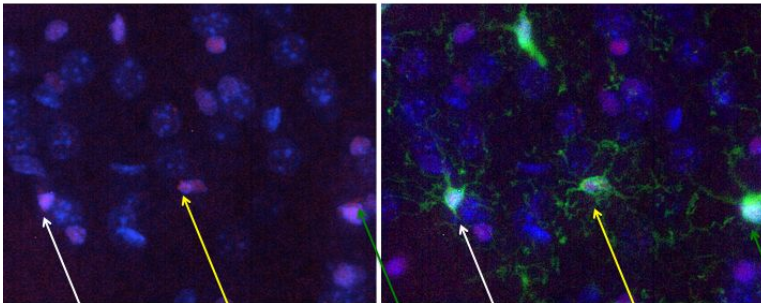


図 2

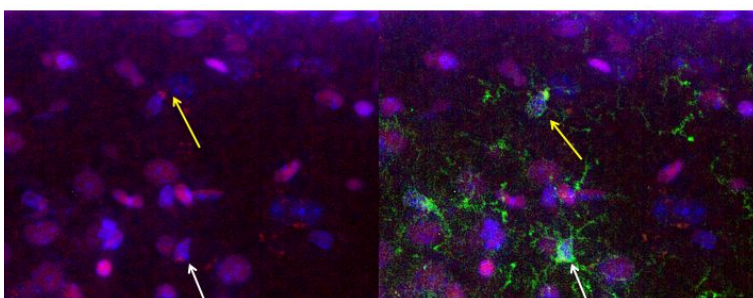


図 3

(3) 脳片側照射での非照射側との比較

特殊装置を作成し、放射線照射を行った。同様の染色を行いその変化を観察したが、HMGB1 の核外放出を確認することはできなかった。原因として、装置やマウスの体動などで効果的に放射線照射ができていなかったことが考察された。

以上の結果から、放射線照射により脳内のミクログリアにおいて HMGB1 の核外放出が生じていることを示すことができた。また、その現象は放射線照射後の時間により異なる部位で生じることにも明らかとなった。部分照射における健常部位との比較においては、マウスを用いた実験では技術的に難しい面が多く、手技の改良、もしくは動物種の変更などを行い検証する必要があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(研究代表者には下線)

Kadono Y, Nakamura H, Saito S, Nishida T, Takagaki M, Shigematsu T, Asai K, Murakami T, Todo K, Fujinaka T, Sakaguchi M, Toda K, Sawa Y, Kishima H. Endovascular treatment for large vessel occlusion stroke in patients with ventricular assist devices. *J Neurointerv Surg*. 2019 May 2. doi: 10.1136/neurintsurg-2018-014645. 査読あり

Takagaki M, Kinoshita M, Kawaguchi A, Murasawa A, Nakao K, Nakamura H, Kishima H. Relationship between normalized distributional pattern and functional outcome in patients with acute cardiogenic cerebral embolism. *PLoS One*. 2019 Jan 15;14(1):e0210709. doi: 10.1371/journal.pone.0210709. 査読あり

Takagaki M, Togami Y, Murasawa A, Nakao K. Multiple Fusiform aneurysms of the Distal Middle Cerebral Artery Showing Different Radiological Courses: a Case Report *Interdisciplinary Neurosurgery*. 10 (2017) 8-10. doi.org/10.1016/j.inat.2017.04.007 査読あり

Achiha T, Takagaki M, Oe H, Sakai M, Matsui H, Nakanishi K, Ozaki T, Fujimoto Y, Yoshimine T, Nakanishi K, Kinoshita M. Voxel-Based Lesion Mapping of Cryptogenic Stroke in Patients with Advanced Cancer: A Detailed Magnetic Resonance Imaging Analysis of Distribution Pattern. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017 Mar 28. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.02.038. 査読あり

Takagaki M, Kinoshita M, Nishino K, Nakano M, Adachi H, Ueno M, Kitamura M, Fujimoto Y, Tashiro K, Tomita Y, Imamura F, Yoshimine T. Downregulation of EGFR in metastatic brain lesion of EGFR-mutated non-small cell lung cancer using a tyrosine kinase inhibitor: A case report *Oncol Lett*. 2017 Apr;13(4):2085-2088. doi: 10.3892/ol.2017.5677. Epub 2017 Feb 6. 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

高垣匡寿、中村元、西田武生、角野喜則、井筒伸之、木下学、貴島晴彦 標準脳座標変換法を用いた脳動静脈奇形(AVM)の脳内分布と発症形式との関係 第 44 回日本脳卒中学術集会 2019 年 3 月 22 日 横浜

高垣匡寿、中村元、吉矢和久、射場治郎、木下喬弘、西田武生、角野喜則、井筒伸之、川端修平、藤中俊之、嶋津岳士、貴島晴彦 頭頸部外傷に伴う脳血管損傷と脳血管内治療医の役割 第 42 回日本脳神経外傷学会 2019 年 3 月 6 日 淡路島

高垣匡寿、中村元、西田武生、角野喜則、井筒伸之、貴島晴彦、北野貴也、村瀬翔、藤堂謙一 高度救命救急センター併設施設における再開通治療の現状と課題 第 34 回日本脳神経

血管内治療学会総会 2018年11月22日 仙台

__高垣匡寿、中村元、西田武生、角野喜則、井筒伸之、木下学、貴島晴彦 標準脳座標変換法を用いた脳動静脈奇形(AVM)の脳内分布と発症形式との関係 第77回脳神経外科学会学術集会 2018年10月12日

__高垣匡寿、木田光則、村澤明、中尾和民、貴島晴彦 MRIを用いた急性期主幹動脈閉塞に対する血栓診断 第43回日本脳卒中学会総会 2018年3月15日

__高垣匡寿、木田光則、村澤明、中尾和民、貴島晴彦 急性期内頸動脈閉塞に対する直接血栓吸引の効果と治療成績における検討 第33回日本脳神経血管内治療学会総会 2017年11月23日

__高垣匡寿、木田光則、村澤明、中尾和民、貴島晴彦 急性期頭蓋内主幹動脈閉塞に対するMRI FSBB法を用いた血栓診断 第76回日本脳神経外科学術総会 2017年10月13日

__高垣匡寿、戸上由貴、村澤明、中尾和民、木下学 標準脳座標変換法を用いた心原性脳塞栓症の脳内分布と予後における検討 第4回日本心血管脳卒中学術集会 2017年6月2日

__Masatoshi Takagaki, Yuki Togami, Akira Murasawa, Kazutami Nakao, Manabu Kinoshita Voxel-based Lesion Mapping of Cardiogenic Cerebral Embolism ISMRM 25th Annual Meeting in Hawaii, April 26, 2017

__高垣匡寿、戸上由貴、村澤明、中尾和民、木下学 標準脳座標変換法を用いた心原性脳塞栓症の脳内分布解析とその臨床的特徴 第42回脳卒中学会学術総会 2017年3月18日

__高垣匡寿、戸上由貴、村澤明、中尾和民 超急性期脳梗塞に対するMRI-FSBB法を用いた画像診断 第32回日本脳神経血管内治療学会総会 2016年11月25日

__高垣匡寿、戸上由貴、村澤明、中尾和民 急性期内頸動脈閉塞に対する経皮的血栓回収術の成績と手技に関する検討 第75回脳神経外科学会総会 2016年9月29日

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。