

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10900

研究課題名(和文)放射線照射による認知機能低下における高気圧酸素併用療法の神経保護作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of neuroprotective effect of radiation therapy combined with hyperbaric oxygen therapy.

研究代表者

片桐 千秋 (Katagiri, Chiaki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00443664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫の標準治療は手術による腫瘍の摘出と術後の化学療法を併用した放射線照射療法であるが、放射線照射は副作用として患者の認知機能を低下させる側面を持つ。本研究は放射線による神経損傷、それに伴う認知機能低下に対して高気圧酸素療法併用法が神経細胞に対しての保護作用を示し認知機能低下を予防するメカニズムを検討した。HBO併用放射線療法は白質の神経細胞、オオリゴデンドロサイトへの放射線による神経障害を軽減することにより認知機能の低下を防いでいることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫の術後療法のひとつ放射線照射療法は、照射部位にもよるが副作用として認知機能低下をもたらす。本研究では放射線による神経損傷、それに伴う認知機能低下に対して高気圧酸素療法併用法が神経細胞に対しての保護作用を示し認知機能低下を予防することを示した。今後、患者のQOLを重視する治療戦略として認知機能保護を考慮した放射線療法を行うためにも本研究で得られた知見は有用である。

研究成果の概要(英文)：The standard treatment for malignant glioma is irradiation therapy, which is a combination of surgical removal of the tumor and postoperative chemotherapy, but irradiation has the side effect of reducing the patient's cognitive function as a side effect. In this study, we investigated the mechanism by which radiation therapy combined with hyperbaric oxygen therapy shows a neuroprotective effect on cognitive decline caused by irradiation. Radiation therapy combined with HBO was found to prevent cognitive decline by reducing neuropathy caused by radiation to white matter neurons and oligodendrocytes.

研究分野：神経科学

キーワード：高気圧酸素 HBO 放射線照射

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の治療における放射線照射療法は副作用として認知機能の低下が避けられない。

海馬歯状回には神経幹細胞が並び日々神経新生を行っている。放射線照射による認知機能低下の原因として海馬新生ニューロン細胞の減少が挙げられる。海馬の神経新生は認知や記憶に必要であることが近年急速に明らかになっている。したがって認知機能の低下防止には放射線照射療法による海馬への影響を軽減させることが重要である。

琉球大学医学部附属病院では脳腫瘍への放射線治療に高気圧酸素療法 (HBO) を組み合わせた臨床試験を行い、2000年から2006年までのグレード4患者の術後生存日数を平均17ヶ月に延ばすことに成功している。(Ogawa et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012, 1;82(2):732-8) この臨床試験を経て我々はHBOによる治療効果の分子メカニズムの研究を行っている。

### 2. 研究の目的

放射線照射による脳神経の損傷、それに続く認知機能低下に対して高気圧酸素療法併用法が神経に対して保護作用を示し認知機能低下を予防するメカニズムをモデル動物および臨床データを用いて神経科学的に検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス照射モデルの作製

8~10週齢のマウスを非照射群、放射線単独照射群、高気圧酸素併用照射群 (HBO 併用群) に分ける。高気圧酸素併用照射群はスモールケージに移し自由行動下にて高気圧酸素チャンバー内で2.5気圧、100%酸素下40分間飼育する。放射線照射は吸気麻酔にて麻酔し、鉛シートで体表面を覆い頭部のみを露出させX線照射装置RX-650(Faxitron)を用いて2Gyを全脳に照射する。連続して5日間照射し合計10Gy照射とした。

#### (2) 認知機能評価

行動解析による認知機能評価はオープンフィールドテスト、高架式十字迷路、新規物体認識試験、フィアコンディショニングテストにて解析する。

#### (3) 免疫組織染色

BrdUを投与後、還流固定したマウス脳の冠状断スライスに抗BrdU、リン酸化ヒストン、ミエリン、ニューロフィラメントの抗体で免疫染色し海馬における神経新生、白質ニューロンおよびオリゴデンドロサイトの走行を解析する。

#### (4) カルシウムイメージング解析

マウス海馬の急性単離スライス標本を作成し、Ca感受性蛍光色素であるFluo3AMを導入し、蛍光強度の変化を指標にグルタミン酸受容体のアゴニスト (AMPA, NMDA) を投与した場合の細胞内Ca動態の変化を測定する。

#### (5) 神経細胞特異的 YFP 発現マウスの 3D イメージング

神経細胞特異的 YFP 発現マウス (Tg(Thy1-YFP)HJrs:YFP) を用いてマウス照射モデルを作成する。還流固定後全脳を取り出し、改良クラリティー溶液 (Advanced CLARITY) により透明化後、ライトシート顕微鏡 (Lightsheet Z.1, ZEISS) を用いて海馬 CA1-CA3-DG における神経細胞の 3D 画像を撮影する。

#### (6) 拡散テンソル画像による神経の異方性評価

放射線加療患者の fMRI 画像から拡散テンソル画像 (diffusion tensor imaging: DTI) 解析により神経線維の走行性を定量的 FA 値で評価する。分析対象は20歳~60歳とし、精神疾患の既往歴があるものを除外する。琉球大学脳神経外科では膠芽腫の的シュル患者に対し HBO 併用の放射線治療を標準としているが耳疾患、閉所恐怖症により濃い浮き圧酸素加療しない症例を放射線単独群とする。

### 4. 研究成果

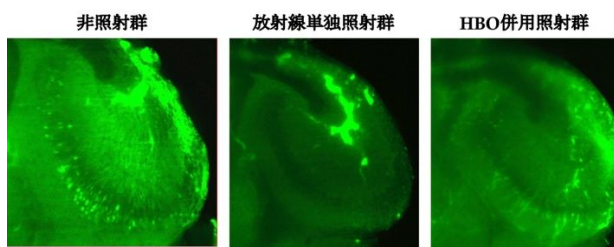
#### (1) 行動解析による認知機能評価

総運動量および情動性の評価としてオープンフィールドテスト、不安行動の評価として高架式十字迷路、認知機能の評価として新規物体認識試験、フィアコンディショニングテストを行った。放射線単独照射群は非照射群と比較し高架式十字迷路における不安行動が抑制され、高所で壁のないアームへの滞在時間が有意に増加したが、HBO 併用群では非照射群と比較して変化がなかった。また、海馬依存的な記憶を評価するフィアコンディショニングテストでは放射線単独群と比較して HBO 併用群の方が有意に記憶を保持している結果となった。ゆえに放射線照射による認知機能の低下および情動の変化に対して高気圧酸素療法を併用することで放射線障害を低減させる効果があることが示された。

### (2) 海馬神経新生および神経細胞への影響の評価

海馬神経新生評価は DNA 合成の指標である BrdU とリン酸化ヒストン抗体の免疫染色法により行った。BrdU 陽性細胞は非照射群と比較して放射線単独群、HBO 併用群ともに減少した。しかしリン酸化ヒストン陽性細胞は放射線単独群では減少したが HBO 放射線併用群は非照射群と同程度を維持した。白質における神経細胞の影響をニューロフィラメントタンパク質抗体、オリゴデンドロサイトへの影響をミエリン抗体を用いて検討した。放射線照射によりニューロフィラメント陽性細胞及びオリゴデンドロサイト陽性細胞が減少したが HBO 併用群では非照射群と同程度に維持された。放射線照射の神経細胞への影響を検討するため神経特異的 YFP 発現マウスの全脳を透明化しライトシート顕微鏡を用いて撮像した。放射線単独照射群の海馬では YFP 陽性の神経細胞が非照射群と比較して著しく減少していた。一方で HBO 併用群では YFP 陽性神経細胞は非照射群と比較して減少していたが放射線単独照射群と比較すると減少は軽度であった。これらの結果から高気圧酸素療法の併用では放射線障害による海馬の神経新生の減少には保護効果はないが、すでに分化した成熟神経細胞の減少を抑制することが示された。

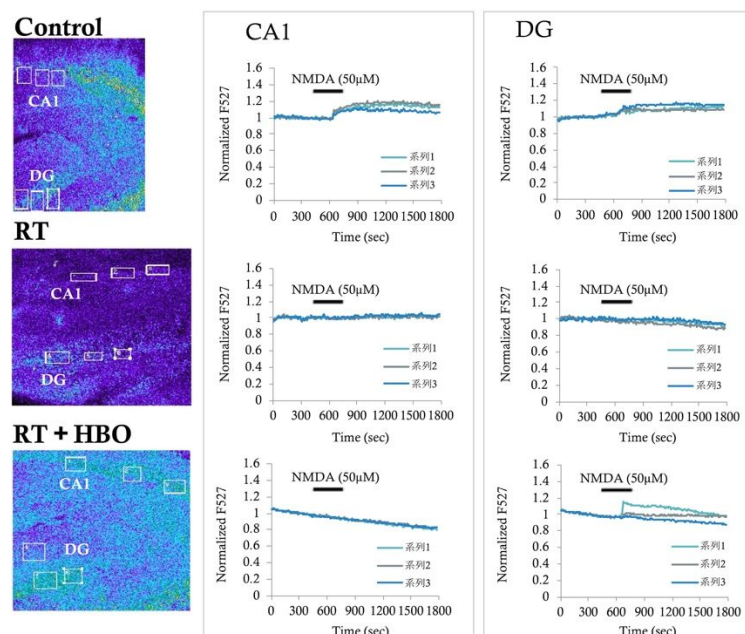
神経細胞特異的YFP発現マウスの海馬領域



### (3) カルシウムイメージング解析による神経機能評価

海馬スライス標本を用いて CA1 および DG 領域の NMDA 作動性の神経活動をカルシウムイメージング解析により観察した。CA1 領域では放射線単独照射および HBO 併用群どちらも NMDA 投与後もカルシウムの神経細胞内への流入が観察されず神経機能が低下していた。DG 領域において放射線単独照射群は NMDA 投与後もカルシウムの流入が観測されなかったが、HBO 併用群では NMDA 投与後の神経細胞へのカルシウム流入が観察され神経機能が保持されていることが明らかとなった。

海馬スライス標本におけるカルシウムイメージング解析



#### (4) 臨床症例の拡散テンソル画像解析

マウスを用いた実験により白質神経細胞における放射線障害からの保護効果が顕著だったことから、臨床症例における白質繊維路を抽出する拡散テンソル画像解析を行った。高気圧酸素併用療法が標準となっているため放射線単独照射症例は 3 例のみとなった。各症例の放射線治療前と放射線治療後を比較したが放射線単独照射群 3 例における治療前後の FA 値(拡散異方係数)に変化は見られなかった。一方、高気圧酸素療法併用群は 9 症例で治療前後の解析を行った結果、下前頭後頭束 (IFOF) が優位に上昇した。神経細胞の走行性が密に揃っているほど FA 値が高いため高気圧酸素療法により下前頭後頭束の神経繊維束がより密になったことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Chiaki Katagiri, Hiroshi Takagi, Shogo Ishiuchi
2. 発表標題 Neuroprotective effect of hyperbaric oxygenation treatment before radiotherapy
3. 学会等名 the 10th Annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐 千秋、高木 博、石内 勝吾
2. 発表標題 悪性神経膠腫の放射線療法における高気圧酸素療法併用の有効性
3. 学会等名 ブレインサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiaki Katagiri, Hiroshi Takagi, Shogo Ishiuchi
2. 発表標題 Effect of hyperbaric oxygenation treatment before radiotherapy for memory and recognition.
3. 学会等名 the 9th Annual meeting of International Society of Radiation Neurobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片桐千秋
2. 発表標題 Neuroprotective effect of hyperbaric oxidation therapy
3. 学会等名 第58回日本神経化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chiaki Katagiri
2. 発表標題 放射線照射による神経障害における高気圧酸素療法併用の神経保護作用
3. 学会等名 第24回日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石内 勝吾  (Ishiuchi Shogo)  (10312878)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (18001)	
研究分担者	菅原 健一  (Sugawara Kenichi)  (50375573)	琉球大学・病院・講師   (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------