

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10927

研究課題名(和文)放射線照射が脊椎転移の局所進展様式に与える影響 - 特に硬膜バリア機構に着目して -

研究課題名(英文)The impact of irradiation on spinal dural mater

研究代表者

村上 英樹 (Murakami, Hideki)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70334779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射後の脊椎腫瘍では、本来は腫瘍に対するバリア組織である硬膜への腫瘍浸潤や、術後の硬膜内再発を認めることがある。その原因として、放射線照射による硬膜バリア機構の破綻が推察され、マウスを用い本仮説を検証した。

放射線照射されたマウスでは、腫瘍の硬膜内浸潤は有意に増加し、電子顕微鏡を用いた観察で硬膜微細構造の破綻が確認された。本研究により、新たな放射線障害として硬膜バリア機構の破綻が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後の更なるがん治療の進歩に伴い、脊椎腫瘍に対する放射線照射後に長期生存する例が増加していくと考えられる。本研究で初めて示された放射線障害である硬膜バリア機構の破綻によって悪性腫瘍の硬膜内浸潤が発生すると、腫瘍の局所制御のみならず、生命予後・機能予後も極めて不良となる。そのため、本研究で得られた知見は脊椎腫瘍の治療戦略において考慮すべき重要な要素となる。

研究成果の概要(英文)：Surprisingly, after radiation exposure, some spinal tumors invade into the dura mater resulting in poor surgical and oncological outcomes. We hypothesized that radiation exposure may result in the disruption of the protections offered by the spinal dura mater. The purpose of this study was to investigate post-irradiation changes in the spinal dura mater in mice. Intra-dural tumor invasion and disruptions of the dural microstructure were observed in the meninges of mice post-irradiation, indicating radiation-induced disruption of the dural barrier function. Disruption of dural barrier function should be acknowledged as one of the radiation-induced injuries.

研究分野：整形外科

キーワード：放射線障害 脊椎腫瘍 硬膜 硬膜内浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療後の脊椎腫瘍の再増悪により改めて手術が必要となることは少なくないが、放射線照射後の脊椎手術では予後を極めて不良にする腫瘍の硬膜内への浸潤や、硬膜内再発が報告されている。その原因として、放射線照射により、腫瘍に対する重要なバリア組織である硬膜の脆弱化が推察される。

2. 研究の目的

放射線照射後の硬膜バリア機構の変化を、

- (1) 腫瘍脊髄圧迫モデルマウスを用いて病理学的に評価すること
- (2) 電子顕微鏡を用いて観察すること

3. 研究の方法

(1) 10週齢の ddY 雌性マウスを用い、胸腰椎移行部へ 20Gy の単回照射を行う群 (照射群) と非照射群に分けた。さらに照射群を照射後 6 週の群 (照射後早期群) と照射後 12 週の群 (照射後晚期群) に分けた。各群に対し、腹腔内麻酔下に、腹臥位で後方から胸腰椎移行部の椎弓を展開し、エアドリルで椎弓の背側骨皮質を掘削して (図 1 A)、マウス乳癌細胞株 (MMT)、またはマウス骨肉腫株 (LM8) の腫瘍塊 (1x1mm) を移植した (図 1 B)。生着した腫瘍が椎弓腹側皮質を穿破し、脊髄を圧迫して両後肢麻痺となった時点で屠殺した (図 1 C)。

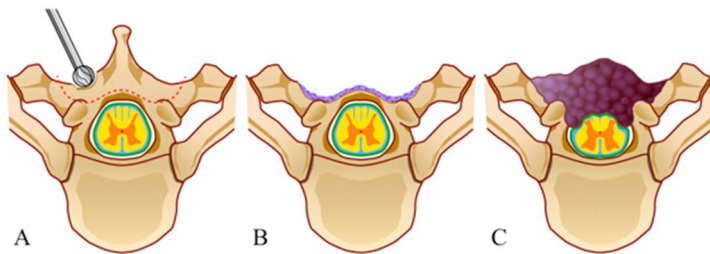


図 1 . 腫瘍脊髄圧迫モデルマウスの手術手順

各群 10 例ずつ標本作製し、HE 染色を行って病理学的評価を行った。硬膜への腫瘍の浸潤度を、硬膜内浸潤なし (grade 0) (図 2 A, D)、硬膜内浸潤を認めるが硬膜の連続性が保たれている (grade 1) (図 2 B, E)、硬膜内浸潤を認め硬膜の連続性が破綻している (grade 2) (図 2 C, F)、の 3 段階に分けて評価した。各群間の比較には Steel-Dwass test を用い、p 値が 0.05 未満を統計学的に有意と判定した。

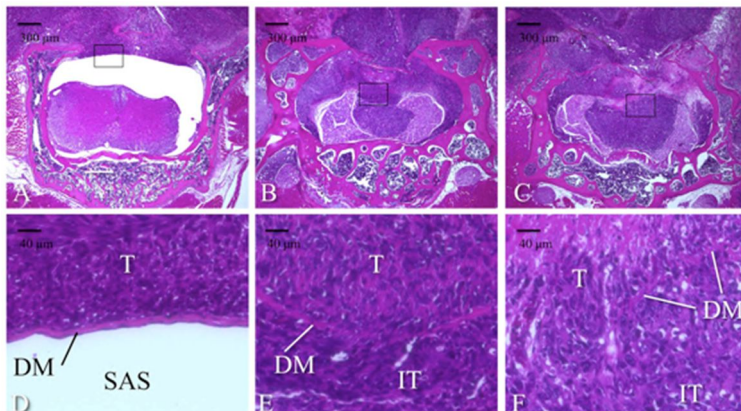


図 2 . 硬膜内浸潤の grade 分類 (T : 腫瘍 ; DM : 硬膜 ; SAS : くも膜下腔 ; IT : 硬膜内に浸潤した腫瘍)

(2) 照射後 12 週での硬膜表面を透過電子顕微鏡および走査電子顕微鏡で観察し、非照射群と比較した。

4 . 研究成果

(1) 各群 (非照射群、照射後早期群、照射後晚期群) における硬膜への腫瘍浸潤度の分布は、MMTでそれぞれ grade 0=(10,8,5)、grade 1=(0,2,3)、grade 2=(0,0,2)、LM8でgrade 0=(8,7,3)、grade 1=(2,1,3)、grade 2=(0,2,4)となり、非照射群と晚期群において有意差を認めた (表 1)。

表 1 . 各腫瘍における硬膜内浸潤度の分布

	硬膜内浸潤度			p 値	
	grade 0	grade 1	grade 2	vs 照射後早期群	vs 照射後晚期群
MMT 移植群					
非照射群 (n = 10)	10	0	0	0.351	0.039
照射後早期群 (n = 10)	8	2	0		0.300
照射後晚期群 (n = 10)	5	3	2		
LM8 移植群					
非照射群 (n = 10)	8	2	0	0.794	0.044
照射後早期群 (n = 10)	7	1	2		0.280
照射後晚期群 (n = 10)	3	3	4		

(2) 透過電子顕微鏡を用いた観察では、照射群において、低倍率で硬膜層構造の不整を認め(図 3 上段)、高倍率では硬膜を構成するコラーゲン線維の配列異常が確認された (図 3 下段)。

走査電子顕微鏡での観察では、照射群において低倍率で硬膜表面に欠損孔が確認され(図 4 上段)、高倍率ではコラーゲン線維の変性を認めた (図 4 下段)。

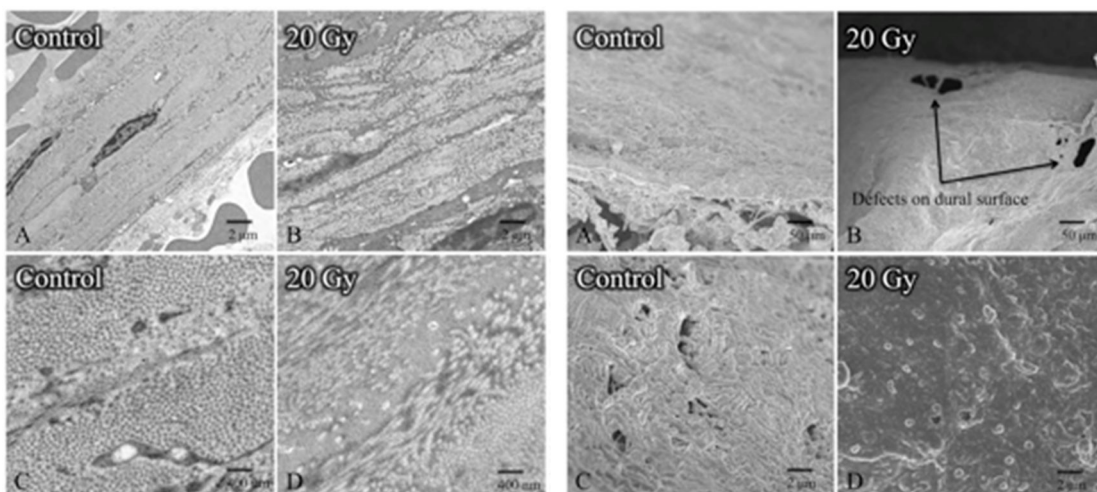


図 3 . 透過電子顕微鏡を用いた硬膜の観察

図 4 . 走査電子顕微鏡を用いた硬膜の観察

(3) 硬膜は腫瘍の局所進展を防ぐ、髄膜最外層のバリアとしての働きを有する[1]. マウス腫瘍脊髄圧迫モデルを用いた、腫瘍に対する硬膜のバリア機能を評価した実験では、照射群において有意な硬膜内浸潤の増加が確認され、放射線照射が硬膜バリア機構を破綻させるという仮説を支持する結果が得られた。先行研究では、放射線照射による硬膜外の線維化が報告されており、照射後12週頃に線維化がピークに達すると報告されている[2]. 硬膜内浸潤はその数も

gradeも照射後早期群よりも晩期群で大きいことから、この硬膜バリア機構の破綻は、硬膜外線維化と同様に照射後晩期にかけて引き起こされる放射線障害と推察される。

(4) 電子顕微鏡を用いた硬膜微細構造の観察では、硬膜を構成するコラーゲン線維の変性と配列異常、硬膜表面の欠損孔が確認された。放射線により引き起こされるこれらコラーゲン線維の変化の機序は不明とされるが、照射によりコラーゲン分子の分節化と非酵素的架橋が起こり、強度が低下することが知られている[3,4]。つまり、放射線照射された硬膜は強度が低下し表面には欠損孔を有するため、物理的バリアが破綻していると言える。さらに、先行研究では髄膜の化学的バリアであるくも膜閉鎖細胞の菲薄化が確認されている[2]。したがって、放射線照射により髄膜は物理的バリアも化学的バリアも破綻し、腫瘍の硬膜内浸潤や術後の硬膜内再発、術後髄液漏の要因になっていると考えられた。

(5) 本研究の結果を踏まえると、脊椎腫瘍に対する放射線照射後の局所再発、脊髄の圧迫は極力避けなければならないと言える。照射後の脊椎腫瘍はバリア機能の破綻した硬膜内へ浸潤する可能性があり、その場合は手術を行っても局所根治は困難で、それに続く髄内播種により極めて不良な転帰をたどることになる。したがって、脊椎腫瘍に対する無計画な放射線照射は避けるべきであり、照射後の局所再発、脊髄の圧迫を回避するために、放射線単独でコントロール可能な症例と、外科的介入が必要な症例とを見極める必要がある。そのためには大規模データに基づき、脊椎腫瘍に対する詳細な治療アルゴリズムの確立が必要である。

(6) 照射群において、腫瘍の硬膜内浸潤は有意に増加し、放射線照射により硬膜のバリア機構が破綻するという仮説を支持する現象が確認された。電子顕微鏡を用いた観察で、硬膜の物理的バリアの破綻が確認され、腫瘍が硬膜内へ浸潤する要因と考えられた。

悪性腫瘍の硬膜内浸潤は局所制御のみならず、生命予後、機能予後をも著しく不良とするため、本研究で得られた知見は脊椎腫瘍の治療において考慮すべき重要な要素と考えられた。

<引用文献>

1. Murakami H, Kawahara N, Tsuchiya H, Demura S, Yamaguchi T, Tomita K. Invasive features of spinal osteosarcoma obtained from whole-mount sections of total en bloc spondylectomy. *J Orthop Sci.* 2007;12:311-315.
2. Yokogawa N, Murakami H, Demura S, Kato S, Yoshioka K, Yamamoto M, Iseki S, Tsuchiya H. Effects of Radiation on Spinal Dura Mater and Surrounding Tissue in Mice. *PLoS One.* 2015;10:e0133806.
3. Barth HD, Zimmermann EA, Schaible E, Tang SY, Alliston T, Ritchie RO. Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone. *Biomaterials.* 2011;32:8892-8904.
4. Pendleton MM, Emerzian SR, Liu J, Tang SY, O'Connell GD, Alwood JS, Keaveny TM. Effects of ex vivo ionizing radiation on collagen structure and whole-bone mechanical properties of mouse vertebrae. *Bone.* 2019;128:115043.

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 清水貴樹, 村上英樹, 出村諭, 加藤仁志, 新村和也, 横川文彬, 奥規博, 北川亮, 半田真人, 土屋弘行
2. 発表標題 放射線照射による髄膜バリア機構への影響
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水貴樹, 村上英樹, 出村諭, 加藤仁志, 新村和也, 横川文彬, 奥規博, 北川亮, 半田真人, 土屋弘行
2. 発表標題 放射線照射による髄膜バリア機構への影響
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaki Shimizu, Satoru Demura, Satoshi Kato, Kazuya Shinmura, Noriaki Yokogawa, Norihiro Oku, Ryo Kitagawa, Makoto Handa, Ryohei Annen, Hideki Murakami, Hiroyuki Tsuchiya
2. 発表標題 The impact of irradiation on spinal dura mater in mice
3. 学会等名 American Academy of Orthopedic Surgeons 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaki Shimizu, Satoru Demura, Satoshi Kato, Kazuya Shinmura, Noriaki Yokogawa, Norihiro Oku, Ryo Kitagawa, Makoto Handa, Ryohei Annen, Hideki Murakami, Hiroyuki Tsuchiya
2. 発表標題 Radiation disrupts protective function of the spinal meninges in a mouse model of tumor-induced spinal cord compression
3. 学会等名 EUROSPINE 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水貴樹
2. 発表標題 放射線照射による硬膜バリア機構への影響 - 腫瘍脊髄圧迫モデルマウスの作成と病理学的検討 -
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018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