

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16641

研究課題名(和文)放射線脳壊死特異的生理活性脂質・バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Bioactive lipids involved in radiation brain necrosis

研究代表者

近藤 夏子(Kondo, Natsuko)

京都大学・複合原子力科学研究所・助教

研究者番号：00582131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍・頭頸部がんの放射線治療後に発症する放射線脳壊死は慢性期の副作用である。がんの再発による再照射で起こりやすく、有効な治療法が無い。生理活性脂質は様々な炎症に関わることで知られる。放射線脳壊死の病態進行に関わるメカニズムを明らかにし、新しい治療法を探す目的として、関連する生理活性脂質について調べた。マウス放射線脳壊死モデルを用いて経時的に調べた結果、リゾリン脂質は1か月後に急上昇し高値のまま慢性期まで推移した。リゾリン脂質のうちリゾホスファチジルコリン・リゾホスファチジン酸は慢性的にミクログリアを活性化していた。これらリゾリン脂質が放射線脳壊死の病態進行に関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性脳腫瘍や頭頸部がん患者は手術・放射線・化学療法などの標準治療の後、再発することが多い。免疫チェックポイント阻害薬の治療効果が有効でないことも多く、放射線の再照射を行うことが多い。しかし、放射線脳壊死がしばしば問題となる。有効な治療法のない放射線脳壊死に対して、本研究は炎症に関わると注目されている脂質メディエーターの観点から治療・診断法を開発することを目指した。研究結果から、リゾリン脂質ホスファチジルコリン・リゾホスファチジン酸が脳の免疫細胞であるミクログリアを慢性的に活性化し、放射線脳壊死の病態と関与することが明らかとなった。リゾリン脂質のシグナル伝達を制御する新しい治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Radiation brain necrosis is a late adverse event which occurs after radiation therapy in brain or head and neck tumor patients. Re-irradiation because of relapse often develops radiation brain necrosis and effective therapy has not been established. Bioactive lipids are known to relate to various inflammation. Therefore, we investigated the bioactive lipids with aim to elucidate the mechanism of pathophysiology in radiation brain necrosis and create a new therapy for brain radiation necrosis. Using mouse radiation brain necrosis model, we found lysophospholipids increased radically one month after irradiation and kept at high levels chronically. Among them, we found lysophosphatidylcholine and lysophosphatidic acid continuously activated microglia through P2X4 receptors. These lysophospholipids are supposed to be involved in the pathogenesis of radiation brain necrosis.

研究分野：悪性脳腫瘍、放射線、ホウ素中性子捕捉療法

キーワード：放射線脳壊死 脂質メディエーター リゾリン脂質 ミクログリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脳神経組織に対する放射線治療後の晩期障害である放射線脳壊死は患者の生命・Quality of Life にかかわる社会的に極めて重要かつ根本的な治療法を開発すべき急務の課題である。放射線脳壊死は、照射後半年以上あるいは何年か経過してから発症する。病態として 1)脱髄や軸索変性による白質障害による神経機能低下、2)血管損傷による慢性炎症がある。ステロイドに反応する場合もあるが効果は一時的である。最近では VEGF の阻害薬ベバシズマブの有効性が示されたが、腎障害や中断による再燃など課題がある。放射線脳壊死の病態のメカニズムは明らかでない。脳神経組織は脂肪組織の次に脂質の含有率が高く、恒常性維持のために生理活性脂質が果たす役割は極めて大きい。脂質メディエーターは 1)受容体、キナーゼ・ホスフォターゼ、イオン交換器などのタンパクと直接作用する 2) 脂質ミクロドメインまたはラフトを形成し関連タンパクと作用する 3) 神経幹細胞のエネルギー・酸化還元バランスを調整する脂質セカンドメッセンジャーを誘発する[Biberich E, Neurochem Res. 2012]。放射線脳壊死の病態に係るかは不明である。

2. 研究の目的

放射線脳壊死の病態進行に関与する各時期の脂質メディエーターを同定する。さらに発症を早期に検出可能なバイオマーカー候補を探索し、その制御機構をもとにした診断・予防・治療応用技術のシーズの創出を目指す。

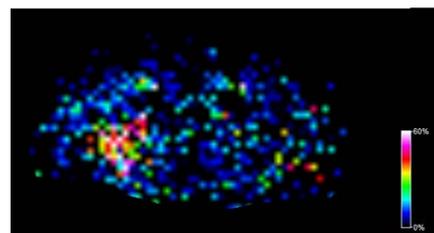
3. 研究の方法

申請者らはこれまでにマウスの右脳の 5mm x10mm, 4mm depth) の体積に陽子線を 60Gy 照射して慢性期に放射線脳壊死を発症する放射線脳壊死マウスモデルを開発した。このモデルではヒト放射線脳壊死の病理でみられる、海馬の萎縮、血管拡張、微小血管の増生、微小出血、浮腫などの病理像が照射後慢性期の 6 か月～8 か月後に認めることを明らかにした[Kondo, et al. Applied Radiation Isotope 2015]。本研究ではこの放射線脳壊死マウスを用いる。照射後慢性期まで経時的に脳を摘出し、LC-MS/MS を用いて網羅的に病態に関与する脂質メディエーターを探索し同定する。さらに定量解析を行う。LC-MS/MS で同定した脂質メディエーターの時空間的分布を調べるために、質量分析イメージングを用いて脂質メディエーターを可視化する。脂質メディエーターのシグナル伝達に介入し、病理・行動解析を行い放射線脳壊死の発生・進行の予防・抑制が起こるか調べる。

4. 研究成果

研究開発代表者の近藤らは、研究協力者の青木淳賢教授らとともにマウスモデルで放射線脳壊死が形成されるまでにリン脂質とリゾリン脂質を LC-MS/MS で定量的に調べたところ、照射された脳で顕著な変化が起こることを発見した。照射後、リン脂質 (ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジレイノシトール、ホスファチジルグリセロール) は全て、非照射群と比べて 10 日目ですでに上昇、1 か月で劇的に 2 倍～10 倍上昇し、2、4、8 か月で減少した。このリン脂質の上昇は免疫細胞の侵入を伴うと考える。一方、リゾリン脂質 (リゾホスファチジルコリン: LPC、リゾホスファチジン酸: LPA、リゾホスファチジルセリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジレイノシトール、リゾホスファチジルグリセロール) は照射後 1 か月で 2 倍程度上昇し、2、4、8 か月とその上昇したレベルが維持された。また研究協力者の瀬藤光利教授らとともにイメージング質量分析を用いて、LPA を可視化したところ、やはり照射後 1 か月の照射側の脳で顕著に上昇していることが確認できた (Fig. 1)。放射線が誘発する慢性炎症にリゾリン脂質が関すると考え、世界に先駆けて報告することになる (現在論文執筆中)。LPC、LPA はミクログリアを活性化することが知られている。ミクログリアの免疫組織染色を行ったところ、照射側に優位にミクログリアが集積し、慢性期まで集積は継続した (Fig. 2) LPC、LPA は P2X4 (ヒトでは P2X7) 受容体を介してミクログリアを活性化することが報告されている。P2X4 受容体の発現を免疫組織染色のミクログリアでみたところ、活性化ミクログリアと、共発現していた (Fig. 3)。これらの結果から放射線脳壊死の病態には LPC、LPA の慢性的な上昇と P2X4 受容体を介したミクログリアの慢性的な活性化が関与していることを世界で初めて明らかにした (現在論文執筆中)。

放射線 (陽子線)
脳表から深さ4mmまで照射
(脳冠状断面)



LPA(18:1) m/z 1023.28

Fig.1 LPA の照射側脳での上昇 (1 か月)

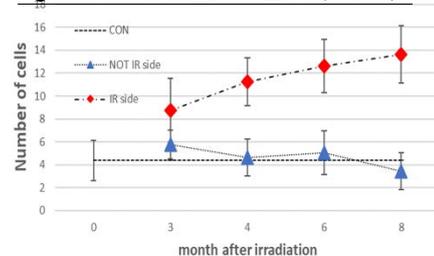


Fig.2 大脳皮質照射側と非照射側のミクログリアの (Iba-1) の数の推移 (横軸: 照射後月)

加えて、研究開発代表者の近藤らは、P2X4 受容体の作動薬イベルメクチンを照射後 2 日後から脳壊死形成時期の慢性期まで投与したところ、照射側に集積するミクログリアの数と P2X4 受容体を発現しているミクログリアの数は、5 か月後、9 か月後ともに優位に低下していた。照射後 9 か月の時点では生存マウス (両群 n=6) の脳壊死発症はイベルメクチン投与群では 0 匹、非投与群では 2 匹、生存期間を優位に延長することはなかった (n=15)。また行動解析の結果、認知機能を維持することもなかった。これは慢性期までイベルメクチンの投与を続けたことで M2 ミクログリアの組織修復機能を抑えてしまったからではないかと推測している。炎症誘発時の M1 ミクログリアの活性が M2 ミクログリアにシフトする際にイベルメクチン投与を速やかに止める必要があるかもしれない (現在論文執筆中)。これらの研究は、放射線が脳神経組織に与えた損傷によりリン脂質やリゾリン脂質が上昇し、特にリゾリン脂質 LPA・LPC によってミクログリアが集積することを示したのみならず、その受容体 P2X4 を活性化し、放射線脳壊死の病態とリゾリン脂質 LPA を介するミクログリアの存在を強く支持するものである。

以上の結果から、放射線照射後の慢性炎症にはリゾリン脂質 LPA・LPC が P2X4 受容体を介してミクログリアを活性化していること・イベルメクチンによってその活性化は抑えられることが明らかとなった。しかし、イベルメクチンによる放射線脳壊死の発生制御には最適化が必要であると考えられる。また LPC, LPA 以外のリゾリン脂質 (リゾホスファチジルセリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルグリセオール) がどのようなシグナル伝達を行い、放射線脳壊死の病態に関与するかはまだ調べていないので、今後の課題である。

バイオマーカーについては脳脊髄液・血液の回収を行い脳神経組織の変化と相応する脂質メタボロームを検出する技術が必要とする。しかし脳神経組織中の定量解析で LPA・LPC は超微量で分解されやすいため、バイオマーカーとして脳脊髄液、とくに血液から検出することは難しいと考える。そのため、LPC から LPC に変換する酵素オートキシシンを検出、定量することが現実的である。青木淳賢教授に相談の上進めていく予定である。

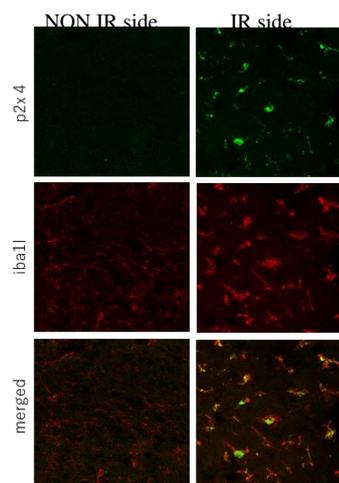


Fig.3 照射後 6 か月マウス脳の照射側 (右) と非照射側 (左) の P2X4 受容体 (緑) とミクログリア (Iba1 : 赤) の共染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 近藤夏子、櫻井良恵、梶原堯之、高田卓志、保田隆子、久米 恭、尾田正二、鈴木 実
2. 発表標題 放射線脳壊死では脂質メディエーター・リゾホスファチジルコリンが上昇し、その受容体P2x4を介してミクログリアを活性化する
3. 学会等名 平成30年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤夏子、櫻井良恵、梶原堯之、高田卓志、保田隆子、久米 恭、尾田正二、鈴木 実
2. 発表標題 Increased lysophosphatidylcholine activates microglia through P2X4 receptor in radiation brain necrosis
3. 学会等名 第9回国際神経放射線生物学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 堯之、近藤 夏子、櫻井 良恵、高田 卓志、鈴木 実、久米 恭、三谷 啓志、尾田 正二、保田 隆子
2. 発表標題 イベルメクチンは放射線誘発性脳内慢性炎症を抑制する
3. 学会等名 第61回放射線影響学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤夏子、本田守、中山憲司、櫻井良恵、高田卓志、小川修、鈴木実
2. 発表標題 イメージング質量分析を用いた放射線脳壊死の脂質ターゲット探索
3. 学会等名 2017年日本放射線腫瘍学会生物部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Natsuko Kondo, Mamoru Honda, Kenji Nakayama, Yoshinori Sakurai, Takushi Takata, Kyo Kume, Shin-ichi Miyatake, Osamu Ogawa, Minoru Suzuki
2. 発表標題 Lipid alteration following proton beam irradiation in mouse brain of radiation necrosis model
3. 学会等名 World Federation of Neuro-Oncology Society Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤夏子、中山憲司、櫻井良憲、高田卓志、久米恭、宮武伸一、小川修、鈴木実
2. 発表標題 放射線脳壊死(RN)マウスモデルを用いた照射後脳組織リン脂質変化の解明
3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤夏子、中山憲司、櫻井良憲、高田卓志、宮武伸一、小川修、鈴木実
2. 発表標題 イメージング質量分析を用いた放射線脳壊死の脂質ターゲット探索
3. 学会等名 第14回 日本中性子捕捉療法学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Natsuko Kondo, Kenji Nakayama, Yoshinori Sakurai, Takushi Takata, Kyo Kume, Shin-ichi Miyatake, Osamu Ogawa, Minoru Suzuki
2. 発表標題 Elucidation of phospholipid alteration in brain after irradiation using brain radiation necrosis mouse model
3. 学会等名 22rd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名	N. Kondo, T. Yasuda, Y. Sakurai, K. Nakayama, T. Takata, S-I. Miyatake, Kyo Kume, S. Oda, O. Ogawa, M. Suzuki
2. 発表標題	Increased lysophosphatidylcholine is associated with recruitment of reactive microglia and astrocytes in radiation brain necrosis mouse model
3. 学会等名	AACR Immunobiology of Primary and Metastatic CNS Cancer: Multidisciplinary Science to Advance Cancer Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	近藤 夏子, 櫻井 良憲, 高田 卓志, 可野 邦行, 梶原 堯之, 久米 恭, 前田 宗利, 尾田 正二, 青木 淳賢, 宮武 伸一, 鈴木 実
2. 発表標題	放射線脳壊死では脂質メディエーター・リゾホスファチジルコリンが上昇し、その受容体P2x4を介してミクログリアを活性化する
3. 学会等名	第78回日本脳神経外科学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	近藤夏子、櫻井良憲、梶原堯之、高田卓志、高井伸彦、久米 恭、宮武伸一、尾田正二、鈴木 実
2. 発表標題	放射線脳壊死におけるP2X4受容体を介するミクログリアの活性化の制御
3. 学会等名	第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	近藤夏子、鈴木周五、高井伸彦、櫻井良憲、高田卓志、久米 恭、前田宗利、魏 民、鰐淵英機、鈴木 実
2. 発表標題	放射線脳壊死におけるミクログリアP2X4受容体の制御
3. 学会等名	2019年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 近藤夏子、可野邦行、櫻井良憲、高田卓志、久米恭、前田宗利、青木淳賢、鈴木実
2. 発表標題 放射線脳壊死の病態に関する脂質メディエーター
3. 学会等名 第4回京都質量分析研究会シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究協力者	青木 淳賢 (Aoki Junken)	東京大学・薬学部・教授	
研究協力者	瀬藤 光利 (Setou Mitsutoshi)	浜松医科大学・医学部・教授	
研究協力者	高井 伸彦 (Takai Nobuhiko)	長崎国際大学・薬学部・准教授	