

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17230

研究課題名（和文）正常筋および骨への晩期的影響をもたらすBNCTとX線との基礎的比較解析

研究課題名（英文）Comparative analysis between BNCT and X-ray for radiation-induced late effect in normal muscle and bone

研究代表者

岩崎 遼太（Iwasaki, Ryota）

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：20782139

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）：正常筋では筋線維化（RIF）モデルの作出実験を実施。75Gy/3FrのX線を2系統のマウス右後肢に照射し、マッソントリクローム染色によりC3H/Heは12週後、C57BL/6は8週後に下腿筋のRIFを確認した。ウェスタンブロット法によるフィブロネクチンおよびTGF- β の発現解析では、C57BL/6においてより早期から発現が増加した。

正常脛骨において、ホウ素薬剤BPAは成長板、海綿骨、骨髄および骨膜・骨内膜に局在し、BPA投与120分後までその濃度を維持した。また、X線照射およびBNCT施行12週後の骨強度低下を生物学的エンドポイントとした際の、X線等価線量への換算係数CBE値を2.34と求めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したRIFモデルマウスは、RIF発症機序の解明に寄与するとともに、今後の中性子線照射やBNCTを行う上での基礎データを提供するものである。骨においてはBNCTでも骨強度の低下が起こりうるという知見が得られたが、求めたCBE値を処方線量に組み込み、さらなる照射実験により正常骨に与える晩期的影響を評価することで、将来的に適正な線量を助成したBNCTの実施が可能となるであろう。

研究成果の概要（英文）：In normal muscle, experiments were conducted to make a model of radiation-induced fibrosis (RIF). 75 Gy/3 Fr X-rays were irradiated to the right hindlimbs of two strains of mice, and RIF was confirmed after 12 weeks for C3H/He and 8 weeks for C57BL/6 by Masson trichrome staining. Western blot analysis of fibronectin and TGF- β expression showed increased expression earlier in C57BL/6 than in C3H/He. In normal tibia, the boron compound BPA localized to the growth plate, trabecular bone, bone marrow, and periosteum/endosteum and maintained its concentration until 120 minutes after BPA administration. The CBE value of 2.34 was calculated as the conversion coefficient to X-ray equivalent dose when the biological endpoint was the decrease in bone strength after 12 weeks of X-irradiation and BNCT.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 CBE factor 骨強度 線維化 晩発性障害 BPA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

通常のがん X 線治療においては、多くの場合正常筋や正常骨が照射野に含まれ、X 線が照射されたこれらの組織では、筋線維化 (radiation-induced fibrosis: RIF) に伴う拘縮や、骨壊死・骨強度の低下による骨折が晩期障害として生じうる。一方、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は以下の理由により X 線照射と比較して正常組織への晩期障害を軽減できると予想される: BNCT は、腫瘍細胞へ集積しやすい特性を有するホウ素 ^{10}B 薬剤を投与した後に熱中性子を照射し、 ^{10}B と熱中性子との核反応によって生じる α 粒子と ^7Li 原子核とによって腫瘍細胞を破壊する放射線治療法である。発生したこれら粒子の飛程は $10\ \mu\text{m}$ 以下であり、その効果がホウ素薬剤を取り込んだ細胞にほぼ限定されるため、正常組織へのダメージを軽減することが可能となる。しかしながら、それぞれの正常組織にもホウ素薬剤の一定の集積があることから、皮膚、粘膜、脳組織などでは X 線治療と同様の皮膚炎、粘膜炎、脳壊死といった有害事象が生じることが報告されている。したがって、正常筋や正常骨においても X 線と同様もしくは BNCT 特有の晩期障害が生じる可能性が考えられ、これらの組織に対して照射可能な BNCT 線量は明らかになっていない。ここで、処方する BNCT 線量のうちのホウ素線量を X 線等価線量に換算するためには Compound Biological Effectiveness (CBE) factor と呼ばれる換算係数を物理線量に乗じる必要があるが、この値はホウ素薬剤の種類と照射される組織、更には観察する有害事象の組み合わせによって異なる。CBE factor は実験的に求める他に手立てはなく、正常筋や正常骨に対する晩期有害事象を指標とした CBE factor は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、適正線量を勘案した BNCT の適応拡大を将来的に実現させるため、マウスの正常筋と正常骨におけるホウ素薬剤 L-p-boronophenylalanine (BPA) の取り込みや分布、マウス下肢骨に対して BNCT がもたらす影響を X 線照射と比較解析し、晩期有害事象の発生を指標として CBE 値を求めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常筋

予備実験における検証において、実験レベルで照射される BNCT 線量および観察期間では RIF 発症に必要な線量を確保できなかったため、本研究期間ではまず X 線照射による RIF マウスモデルを作成することとした。マウスは雄性 8 週齢の C3H/He と C57BL/6 の 2 系統を用い、右後肢に $25\ \text{Gy}/\text{回}$ を週に 1 回の頻度で計 3 回、総線量 $75\ \text{Gy}$ を照射した。3 回目の照射から 4 日後、2、4、8 および 12 週間後の腓腹筋を採材し、病理学的検査およびウェスタンブロット法 (WB) に供した。病理組織学的検査では HE 染色とマッソントリクローム染色を行い、それぞれ炎症・血管数と線維化を評価した。また WB ではフィブロネクチンおよび TGF- β の発現を解析した。

(2) 正常骨

雌性 8-10 週齢の C3H/He マウスを用い、以下の 4 実験を実施した: ① 即発ガンマ線分析 (PGA) および誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) による BPA (125, 250, 500 mg/kg) 投与 30-120 分後の正常骨中ホウ素濃度測定、② オートラジオグラフィ (ARG) およびレーザーアブレーション ICP 質量分析 (LA-ICP-MS) による BPA (125, 250, 500 mg/kg) 投与後の脛骨内 ^{10}B 分布の可視化、③ X 線照射 ($4\ \text{Gy}$ ずつ $20\ \text{Gy}$ まで段階化)、中性子線照射 (照射時間: 60 分、90 分、120 分) および BNCT 施行 (125, 250, 500 mg/kg BPA 投与後に中性子線を 60 分間照射) から 12 週後

における3点曲げ試験による骨強度測定、④ マイクロCTによる照射12週後の骨形態解析。なお放射線照射は2日間に分け、1日目に予備実験で求めた骨強度に影響を及ぼさない最大線量である24 GyのX線を照射し、2日目に上述の照射を行った。

4. 研究成果

(1) 正常筋

病理組織学的検査: X線照射後の腓腹筋において、C57BL/6では照射2週間後のHE標本にてマクロファージやリンパ球、形質細胞を中心とした炎症細胞の顕著な浸潤がみられた(図1)。一方、C3H/HeではC57BL/6ほど顕著な変化は観察されなかった。筋線維数あたりの毛細血管数はC3H/HeとC57BL/6の2系統ともコントロールと比較して照射終了直後の4日目から減少し始め、時間の経過とともにさらに減少した。この傾向はC3H/HeよりC57BL/6において顕著であ

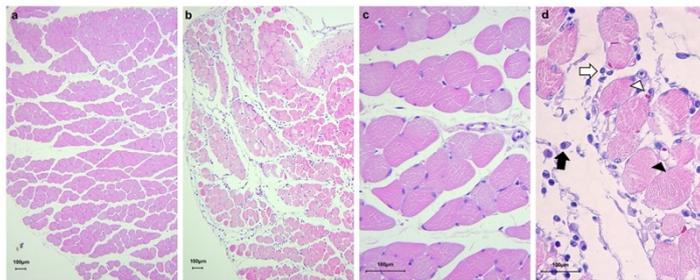


図1. 照射2週間後のマウス2系統におけるHE標本

マクロファージ(白矢頭)、リンパ球(白矢印)、形質細胞(黒矢印)がC57BL/6において観察される。a,c: C3H/He (40×), b,d: C57BL/6 (40×, 400×)。

り、照射4週間後と8週間後で2系統間に有意差を認めた。マッソントリクローム染色によるRIFの評価において、筋面積あたりの線維化面積は、C3H/Heでは放射線照射12週間後から有意に増加し、24週間後ではその変化が顕著であった(図2)。一方、C57BL/6では照射2週間後から線維化面積が徐々に増加し始め、8週間後から有意に増加しその後も経過とともに増加傾向がみられた。この反応は、C57BL/6においてより顕著な変化を示す傾向であった。

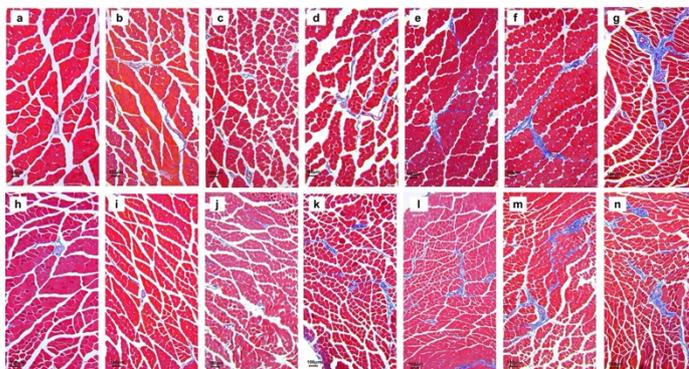


図2. 照射後のマウス2系統における筋線維化の経時的変化

線維化領域が青く示されている。a, h: 非照射; b, i: 4日後; c, j: 2週間後; d, k: 4週間後; e, l: 8週間後; f, m: 12週間後; g, n: 24週間後。a-g: C3H/He (100×), h-n: C57BL/6 (100×)

WB: フィブロネクチンは、C3H/Heでは照射2週間後でわずかに増加した後8週間後で再び顕著に増加したのに対し、C57BL/6は照射直後から増加し始め2週間後で顕著に増加し、8週間後で再び増加傾向が見られた。TGF-βは、C3H/Heにおいて照射直後から緩やかに増加傾向がみられ8-12週間後でピークに達した(図3)。C57BL/6は照射直後から顕著な増加が見られ、2週間後でピークに達しその後減少傾向となった。

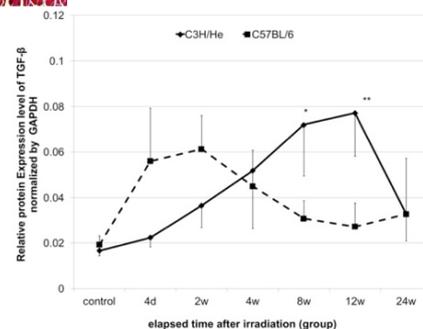


図3. 照射後のマウス2系統におけるTGF-β発現量の経時的変化

グラフはC3H/He(実線)とC57BL/6(点線)を示す。

$p^* < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

(2) 正常骨

ホウ素濃度測定：すべての BPA 濃度におけるいずれの採材時間においても、PGA と ICP-AES 間で有意な相違はなく近似した値を示した（図 4）。血液および骨のホウ素濃度は用量依存性に増加した。また、投与 120 分後までの間に血中ホウ素濃度は急激に低下した一方で、骨中ホウ素濃度はいずれの BPA 用量においても投与 120 分後まで同等の数値を維持した。

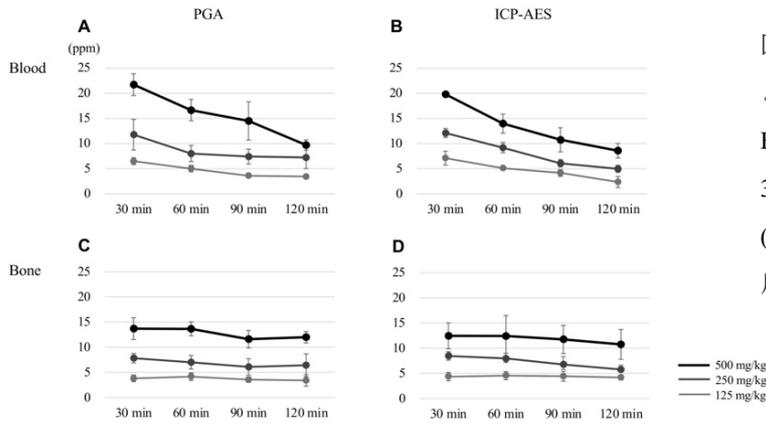


図 4. PGA と ICP-AES による血液および骨ホウ素濃度
BPA 125, 250, 500 mg/kg を投与した 30, 60, 90, 120 分後における、PGA (A, C) もしくは ICP-AES (B, D) を用いた血液および骨のホウ素濃度。

脛骨 ¹⁰B 分布の可視化：LA-ICP-MS（図 5）および ARG（図 6）は、投与された BPA が用量依存性に脛骨内で不均一に集積することを可視化した。どちらの解析法においても ¹⁰B の局在は同様の傾向を示した。¹⁰B は骨幹端部の骨端軟骨および海綿骨に高く集積し、次いで骨幹部の骨髓腔内にも高く集積した。

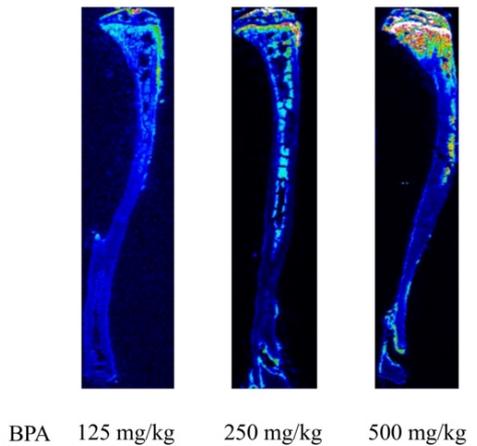


図 5. LA-ICP-MS を用いた脛骨における ¹⁰B 分布
BPA 投与 60 分後の脛骨における ¹⁰B の局在を、半定量的イメージングにより色分けしている。

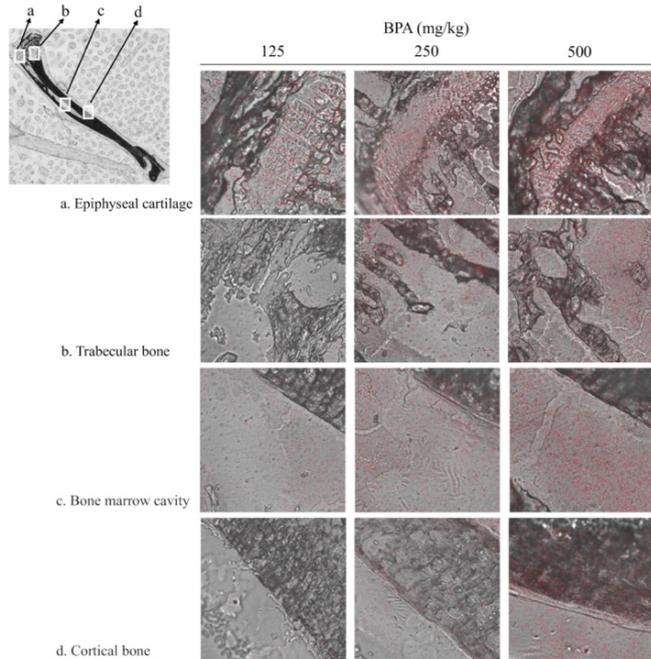


図 6. ARG を用いた脛骨における ¹⁰B 分布
BPA 投与 60 分後の骨端軟骨、海綿骨、骨髓腔および皮質骨において、¹⁰B の局在を表す CR-39 上の etched pits が赤点で示されている。

骨強度測定： 3 点曲げ試験による骨幹部の骨力学パラメータを測定し、このうち最大荷重 (N) を骨強度として解析した。対照群と比較し、X 線群では 8 Gy 以上、中性子線群では 90 分間 (すなわち 1.6 Gy) 以上の照射、そして BNCT 群では BPA 125 mg/kg (すなわち 2.4 Gy) 以上の投与において、いずれも線量依存性に最大約 70% まで骨強度が低下した (図 7)。

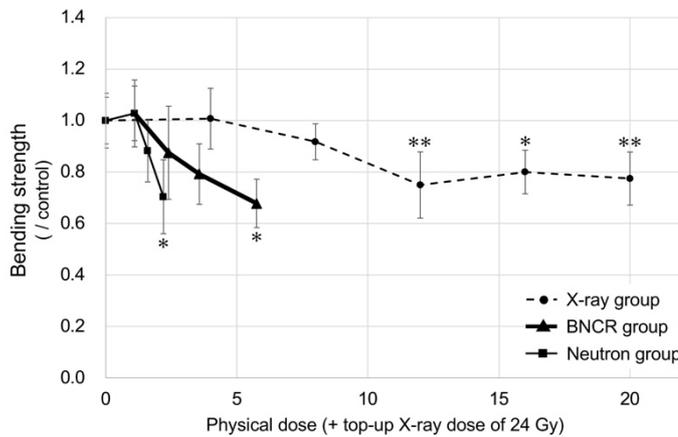


図 7. 照射後の脛骨骨強度の変化
骨強度は対照群に対する相対値として表している。統計解析は対照群と各照射群との間で Dunnett's multiple comparison method を用いている。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

CBE factor の算出： 骨強度解析の物理線量-骨強度グラフにおいて、X 線照射に対する中性子線照射、および X 線照射に対する BNCT 照射の生物学的エンドポイントにおける反応比がそれぞれ RBE 値と CBE 値を表している。したがって、X 線群、中性子線群および BNCT 群の直線の傾きから、RBE 値と CBE 値をそれぞれ 8.38, 2.34 と算出した。

骨形態解析： マイクロ CT 撮影によって骨幹端部および骨幹部における骨構造の変化を解析した (図 8)。皮質骨量および皮質骨幅は、骨幹端部および骨幹部のいずれにおいても補充線量 (=X 線 24 Gy) の影響により非照射群と比較して有意に増加したが、各群におけるさらなる照射により減少に転じた。骨幹端部における海綿骨量は補充線量の影響により非照射群と比較して有意に減少した。骨幹部における骨外膜長は対照群と比較して X 線群では変化がなかったが、中性子線群および BNCT 群では有意に短縮した。一方、骨内膜長は非照射群と比較して対照群で有意に短縮し、各群におけるさらなる照射により線量依存性の増加に転じた。骨幹端部および骨幹部における骨密度は線量、放射線の種類いずれにおいても有意な変化は観察されなかった。

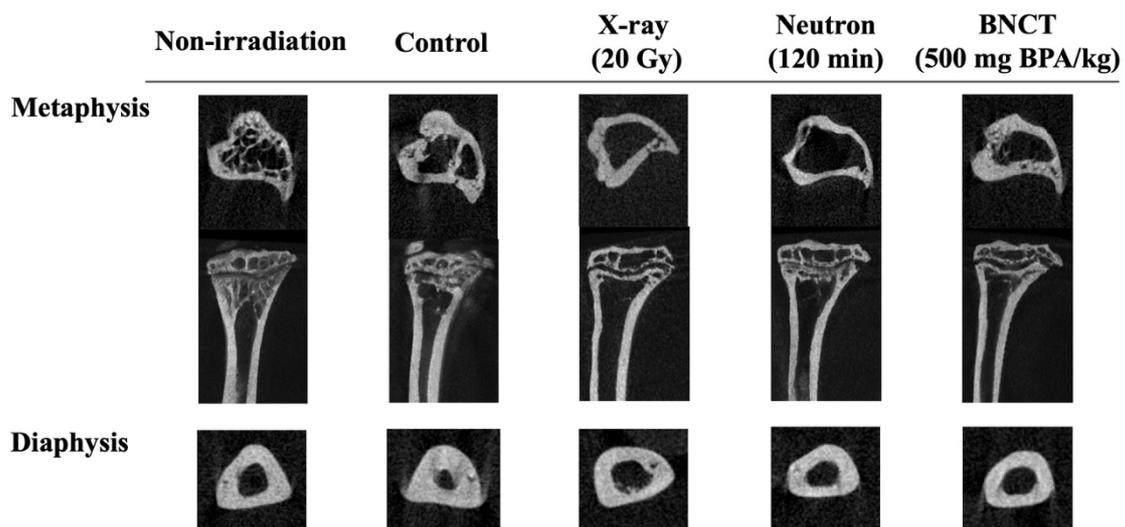


図 8. 照射後の脛骨骨幹端部および骨幹部におけるマイクロ CT の再構成画像
補充線量の影響により増加した皮質骨幅は、X 線群、中性子線群および BNCT 群ともにさらなる照射によって低下に転じている。また、各照射群において骨幹端部における海綿骨の顕著な減少が確認される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakoshi Yu, Yoshikawa Ryutaro, Mori Takashi, Iwasaki Ryota	4. 巻 40
2. 論文標題 Feasibility study for inducing the skeletal muscle fibrosis via irradiation using two mouse strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 466 ~ 475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11604-021-01219-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩崎遼太, 吉川竜太郎, 森 崇, 鈴木 実, 小野公二
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）がマウス正常骨の骨強度に及ぼす影響
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第33回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村越 湧, 森 崇, 岩崎遼太
2. 発表標題 マウスを用いた骨格筋放射線誘発線維症モデルの作成
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第33回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅野 凌, 岩崎遼太, 吉川竜太郎, 森 崇, 鈴木 実
2. 発表標題 マイクロCTを用いたマウス正常脛骨におけるBNCTの影響解析
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第34回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsukawa T, Takeno S, Iwasaki R, Suzuki M, Yokoyama K
2. 発表標題 Comparison of CR-39 autoradiography and laser ablation ICP-MS imaging to assess 10B distribution of tibia bone in 10BPA-treated mice
3. 学会等名 19th International Congress on Neutron Capture Therapy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎遼太
2. 発表標題 正常骨に対するBNCTの生物学的影響
3. 学会等名 骨軟部腫瘍BNCTセミナー「骨軟部腫瘍に対する革新的がん治療BNCTの可能性を探る」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎遼太, 吉川竜太郎, 森 崇, 松川岳久, 武野 慧, 鈴木 実, 小野公二
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)がマウス正常骨に与える生物学的影響
3. 学会等名 第59回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------