

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：80126

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461899

研究課題名(和文) 便中の α-デフェンシン測定を用いた放射線性腸炎の定量評価と臨床応用

研究課題名(英文) To investigate the clinical application of alpha-defensin in stool in the objective evaluation of radiation enteritis

研究代表者

小野寺 俊輔 (Onodera, Shunsuke)

独立行政法人国立病院機構北海道がんセンター(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：30374458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はPaneth細胞によって産生・放出される α-defensinを便中から測定することにより放射線腸炎の評価が可能であるかを検討し、臨床上利用可能な放射線腸炎の客観的指標を見いだすため、本研究を行った。マウスにおける基礎実験では、α-defensinの放射線照射後における有意な減少を観察した。また、腸内細菌叢における検討では照射後3日目で α-defensinとFirmicutesの間に有意な負の相関が認められた。この結果から照射後の α-defensinによる低下が腸内細菌叢の変化に関与していることが示唆された。臨床では、臨床研究における症例集積が十分に進まず、臨床上の検討には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the clinical application of α-defensin in stool in the objective evaluation of radiation enteritis. As the first step, we experimented on mice and found that the amount of α-defensin significantly decreased in stool of mice irradiated to the abdomen. In addition, a significant negative correlation was observed between the amount of α-defensin and Firmicutes at three days after irradiation. These results suggested that decrease of α-defensin correlated with an altered intestinal flora of the mice irradiated to the abdomen. We could not investigate the clinical application due to insufficient number of patients in this period.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線腸炎 α-defensin 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

腹部への放射線治療において臨床問題となる副作用として放射線腸炎が知られている。この副作用を防ぐため、陽子線治療が有用と考えられる。しかし、この副作用である放射線腸炎の程度や状態を客観的に測定する簡便な指標は放射線線量の比較や自覚症状以外にはあまり認められていない。

一方で慢性炎症性腸疾患に関する研究から腸内における抗菌ペプチドの働きが重要であることがわかってきた。この抗菌ペプチドの中でも小腸の Paneth 細胞が産生・分泌する α -defensin は腸内細菌叢の常在菌には抗菌作用を示さず、病原菌に対して強く殺菌効果を示す選択的殺菌活性を示すことが分担研究者の中村らの研究で明らかとなった。また、さらに中村らの研究によりマウスの糞便中の α -ディフェンシンを測定する方法を確立されていた。

Paneth 細胞が α -defensin を特異的に分泌することで腸内細菌叢の安定が保たれ、腸内環境が整えられるシステムの重要性が明らかになり、実際に疾病との関係が明らかになってきている。さらに、Paneth 細胞は隣接する Lgr5 陽性の幹細胞との連携から腸管上皮細胞の再生に重要な役割を果たしていることも近年明らかとなった。すなわち、Paneth 細胞が分泌する α -defensin は、腸管のホメオスタシス、自然免疫及び再生・分化において重要な役割を果たしている。しかし、これまで放射線性腸炎との関係は全く知られていなかった。

2. 研究の目的

我々は、 α -defensin の糞便からの定量測定法を用いて、マウスにおける X 線照射後の腸管毒性を経時的に測定し、放射線腸炎の定量評価法として確立する。これは現時点で唯一、糞便中の defensin を測定できる綾部研究室の協力を得てはじめて可能になる方法である。さらに北海道大学病院の陽子線治療装置を用いることで、実際に陽子線照射と X 線照射の線量比較を行い、実際にこの測定方法でその線量の違いによる腸管への影響を比較可能となるのかどうかも合わせて検討する。

臨床面への応用の検討として、腹部への照射を行う臨床症例において、その糞便や血液を臨床症状の情報と合せて収集し、抗菌ペプチドやリゾチーム活性をはじめとする免疫関連因子の解析および腸内細菌メタゲノム解析等による腸内細菌組成の検討と臨床症状との比較を行い、最終的には、ヒトにおいても defensin を用いて、臨床における放射性腸炎の定量的評価方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

研究方法として以下の 4 点にわけて進めることとした。

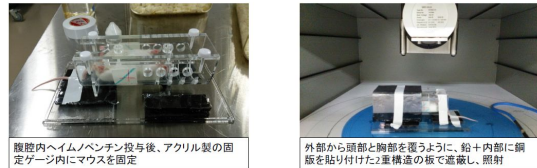
- 1) マウスモデルにおける、腸管への X 線照射後の α -defensin 量の経時的变化と腸管病理像の変化を解析する
- 2) マウスモデルにおける X 線照射および陽子線照射による照射方法の違いによる腸管の Dose Volume Histogram と α -defensin の分泌量及び腸内細菌叢を比較して、バイオマーカーとしての有用性を検討する
- 3) 臨床において、全骨盤照射症例における血漿シトルリン、血清リゾチーム活性の測定、糞便中の腸内細菌叢の経時的变化の観察と実際の臨床症状を経過観察する
- 4) 臨床において、陽子線による腰仙椎部照

射症例と同様の X 線照射症例を比較し、血中シトルリン、血清リゾチーム活性、糞便中の defensin の測定する

4. 研究成果

本研究による成果は上記研究方法に分けて示す。

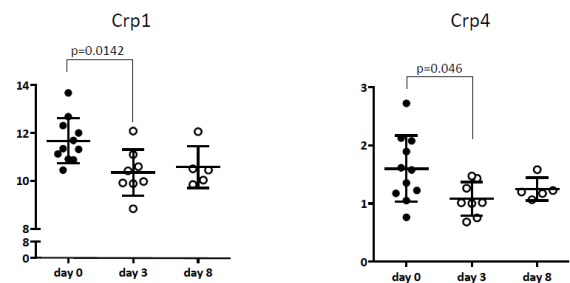
- 1) マウスへの腹部照射 (Fig.1) により、照射前と比較し、有意な α -ディフェンシンの減少を認めた (Fig.2)。また併せて病理所見においても照射後 3 日目と 8 日目で、小腸の陰窩底部の Paneth 細胞の空胞化や消失を認めた



(Fig.3)

Fig.1: 腹腔内ヘイムノベンチン投与後、アクリル製固定ゲージ内にマウス固定し、外部から頭部と胸部を遮蔽の上、体表で 8Gy を照射。

糞便中 α -ディフェンシン (Crp1, Crp4) の測定結果



* 自然免疫研究室 中村准教授の開発した Sandwich ELISA法による測定 (Nakamura K. et al. Anal Biochem. 2013 15;443(2):124-31)

Fig.2: 便中 α -ディフェンシンは照射後 3 日目で照射前と比較して有意な低下を認めた。



Fig.3: 照射後 3 日目で小腸の陰窩 (Crpt) 底部において Paneth 細胞の形態異常を認め、8 日目では Paneth 細胞が見られず絨毛の減少を認めた。

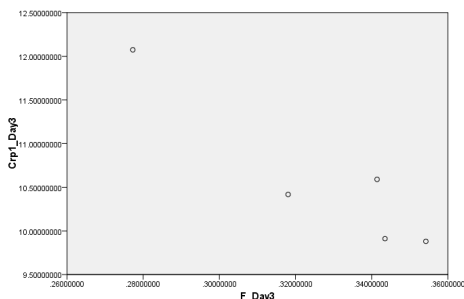


Fig.4: 照射後 3 日目のマウスにおける -defensin である Crp4 の値が低いほど、同日の Firmicutes は高値を示した。

腸内細菌叢の検討においては、照射後 3 日目において便中 Firmicutes の増加と -defensin の減少という負の相関を認めた (Spearman 's correlation test, $r = -0.9$, $p = 0.037$) (Fig.4)。併せて行った血中シトルリンには明らかな変化を認めなかった。

- 2) 北大陽子線治療施設では実験動物が入り可能な領域がなく、実施できなかった。
- 3) 骨盤内照射症例に対する経時的血中シトルリンの測定を行ったが明らかな変化をとられることができなかった。ただ、関連する研究として、照射線量と腹部症状出現の関連については、30Gy の線量投与が下痢などの消化管症状を引き起こすことがわかった (Table 1)。

		治療中の副作用 (下痢)
相関係数		0.47
Rectum V30(%)	有意確率 (両側)	0.050
	N	18

• Spearman 's correlation test ($p < 0.05$)

Table 1: 骨盤部への放射線照射による下痢と直腸への線量 30Gy で相関が認められた

- 4) 本研究中に十分な症例集積ができず、解析には至らなかった。

これらの結果から、放射線腸炎の評価として便中 -ディフェンシンの測定が有用である可能性が示されたが、臨床応用については今後さらに研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 婦人科腫瘍における IMRT の利用経験; 小野寺俊輔; 第 129 回日本医学放射線学会

北日本地方会 2013 年 10 月 4 日 ~ 10 月 5 日

2) Initial dosimetric study of whole pelvic irradiation using spot scanning proton therapy ; Takaaki Yoshimura, Shunsuke Onodera, Chie Toramatsu, Rumiko Kinoshita, Shinnichi Shimizu, Kikuo Umegaki, Hiroki Shirato; 第 107 回日本医学物理学学会学術大会 2014 年 4 月 10 日 ~ 4 月 13 日

3) A retrospective planning study of spot scanning proton therapy for gynecologic cancer ; Takaaki Yoshimura, Shunsuke Onodera, Chie Toramatsu, Rumiko Kinoshita, Shinnichi Shimizu, Kikuo Umegaki, Hiroki Shirato ; 53rd International Meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group 2014 年 6 月 8 日 ~ 6 月 14 日

4) 放射線腸炎の指標としての便中 -ディフェンシンの可能性 ~ マウスでの研究結果から ~ ; 小野寺俊輔、中村公則、西山典明、綾部時芳、白土博樹; 第 133 回日本医学放射線学会 北日本地方会 2015 年 10 月 23 日 ~ 10 月 24 日

5) NTCP Modeling Analysis of Acute Hematologic Toxicity in Whole Pelvic Radiation Therapy for Gynecologic Malignancies - A Dosimetric Comparison of IMRT and Spot-Scanning Proton Therapy ; T.Yoshimura, R.Kinoshita, S.Onodera, C.Toramatsu, R.Suzuki, Y.M.Ito, S.Takao, T.Matsuura, Y.Matsuzaki, S.Shimizu, K.Umegaki, H.Shirato ; 57th Annual Meeting of ASTRO 2015 年 10 月 18 日 ~ 10 月 21 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

小野寺 俊輔 (Shunsuke Onodera)
北海道がんセンター 放射線治療科 医長
研究者番号：30374458

(2)研究分担者

中村 公則 (Kiminori Nakamura)
北海道大学大学院 先端生命科学研究院
自然免疫研究室 准教授
研究者番号：80381276

(3)連携研究者

()

研究者番号：