

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461933

研究課題名(和文) 粒子線治療における中枢神経の新規RBE指標の開発

研究課題名(英文) Research of relative biological effectiveness of the central nervous

研究代表者

高井 伸彦 (Takai, Nobuhiko)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：70373389

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)：炭素線を脳局所に照射した際における認知機能低下と脳内毛細血管密度を指標とした解析を実施した。晩発性に神経細胞壊死を生じさせる線量(単回30Gy)をマウス全脳に照射したところ、照射16週間後に記憶に重要な役割を持つ海馬内の選択的な細胞壊死が生じていた。毛細血管密度を指標とした新しい画像分析手法を用いたところ、照射12週間後まで線量及び時間依存的な毛細血管密度の低下が生じており、その変化は認知機能障害が認めれる照射1週間後から検出が可能であることを、世界で初めて見出した。また毛細血管密度の低下は、晩発性に生じる選択的な海馬内神経細胞壊死の領域と関連性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study investigated effects on the cognitive function and microvessel density (MVD) in the hippocampus after local brain irradiation with carbon ions using mice. The irradiation dose was set at level known to produce vascular change followed by necrosis, which appeared the late period after irradiation with 30 Gy. At 16 weeks after irradiation, the irradiated mice showed marked neuronal degeneration at the hippocampus within CA1 to CA3 layers at 16 weeks after irradiation. MVD of the vulnerable hippocampal-region decreased rapidly from 1 week after irradiation. The cerebral MVD also declined from 1 to 12 weeks and radiation vasculopathy was dose and time dependent. We found that the hippocampus within CA1 to CA3 layers sensitive to irradiation than DG astrocytes, the decrease of MVD and activation of astrocytes in the hippocampus have been implicated in neuronal cell death.

研究分野：放射線生物学

キーワード：radiotherapy Cerebral dysfunction hippocampus

### 1. 研究開始当初の背景

2015年度で終了する「第3次対がん10か年戦略」において、粒子線治療の臨床的有用性の確立は重要課題の一つであったが、重粒子線治療によっても悪性脳腫瘍の克服はなされていない。

近年では、国内外において放射線療法と化学療法併用による集学的治療が試みられ、いくつかの抗がん剤併用による放射線治療によって、生存期間の延長などが認められつつあるが(Shibui S, 2013)、腫瘍辺縁部からの再発や高線量域における脳浮腫や脳壊死のリスクを解決していない。また粒子線治療を含む放射線治療後や、種々の抗がん剤による化学療法単独においても、晩発性の認知機能障害などの副作用の併発が報告されており、その障害をいかにして低く抑えるかが課題とされている。

国外においては、化学療法や放射線療法による認知機能の低下は、治療中・治療後に生じる重要な問題と認識されており、治療後のQOLを向上させるための様々の試みが実施されているが、国内国外を問わず依然として認知機能の障害に結びつく科学的根拠は少ない。中枢神経の許容線量の推定が非常に困難である要因として、脳機能に関わる中枢神経の生物学的効果比(RBE)の科学的根拠が極めて少ないことが考えられる。治療線量や分割照射計画を推定し患者に適した治療を行なう上で、中枢神経のRBEの算出は不可欠であることを考えると、早急に解決しなければならない課題となっている。

### 2. 研究の目的

脳腫瘍治療モデル動物の認知機能と病理的・生理的变化との関連性を調べ、中枢神経の許容治療線量の推定及び早期診断が可能かについて検討を行う。

(1) 脳局所への粒子線照射方法をすでに確立しており(Takahashi S, Sun XZ, Kubota Y, Takai N, 2002)、この脳腫瘍治療モデルを用いて、脳機能障害を誘発する要因を行動薬理学的解析や薬物動態学的、病理組織学的、神経生理学的観点から詳細に検討する。

(2) 晩発期に生じる病理組織変化につながる早期の要因を、脳内毛細血管分布密度及び局所血流量・糖代謝、神経伝達動態などを指標に経日的計測を行い、関連性を示す要因を特定する。

### 3. 研究の方法

脳腫瘍治療モデルに炭素線を3-30 Gy単回照射し、その後生じる記憶・認知機能障害をChoice reaction time taskを用いて解析する。また併せて病理組織学的変化および脳内毛細血管密度を、新規に創出した画像解析手法によって解析し、定量性ならびに再現性の確認を行なう。さらに線量依存性および経

日的変化を測定する。

脳内毛細血管の蛍光標識を行うために、20%ゼラチン水溶液を加温しながら攪拌し、1mol/L NaOHを滴下し、pHを約11に調整した。Fluorescein-4-isothiocyanate(FITC)をDimethyl Sulfoxide(DMSO)にFITC10mgに対してDMSO1mLとなるように溶解した(蛍光色素DMSO溶液)。ゼラチン水溶液を攪拌しながら、蛍光色素DMSO溶液を加え遮光し、一晚37のインキュベーター内でゆっくり攪拌して結合反応を行わせた。反応させた混合液を透析チューブに移し、暗所37にて透析を行った(蛍光色素ゼラチン溶液)。蛍光色素FITC標識ゼラチンは、炭素線照射後の解析に適した分子量を基礎実験によって特定した。炭素線を照射したモデル動物(8週齢のC57BL系雄性)の胸腔を切開し、大動脈からPBSで40%に希釈した蛍光色素ゼラチン溶液を還流し、還流後、標本を氷温の水につけてゼラチンを固定することで血管を標識した。固定化した標本の脳を摘出し、これを試料とした。摘出した脳は、冷暗所で固定液に入れ保存した。この試料から切片を作成し、共焦点レーザー走査顕微鏡(confocal laser scanning microscope; CLSM)を用いて脳毛細血管を観察した。画像解析法においては、解析ソフトWinROOFを用い判別分析法による自動2値化を行い、照射領域と反対側の面積率の比を算出して定量評価した。

### 4. 研究成果

新規に創出した脳内毛細血管密度の画像解析手法の定量性の検証実験を行った結果、下記の図に示すように、炭素線単回30Gy照射領域(図1.画像右側)の毛細血管密度が1週間後、4週間後、12週間後と経日的に減少することが確認できた。また合わせてMRIを用いた病理変化の解析を実施中であるが、単回30Gy照射によっても4週間後までは変化は認められなかった。

新規に創出した脳内毛細血管密度の画像解析の結果、10-60Gy単回照射1週間後において、線量依存的に毛細血管密度が低下することが認められた。さらに脳内の毛細血管密度の低下は、照射領域において均一に低下するのではなく、背側海馬のCA2-3領域において顕著に低下しており、近傍の歯状回DGにおいては比較的障害の程度が軽微であった。このことから脳内毛細血管密度において、脆弱性を示す脳部位の存在が明らかとなった。(図2)

このことは41th Annual Meeting European Radiation Research Society, Rhodos, Greeceにおいて、これまで報告されていない炭素線による脳局所照射の影響を、早期に診断できる技術として、また炭素線を含む粒子線照射によって、脳内に脆弱部位が存在し、それにはアストロサイトの活性化が伴っていることを国際発表し、学会賞を受賞するに至った。

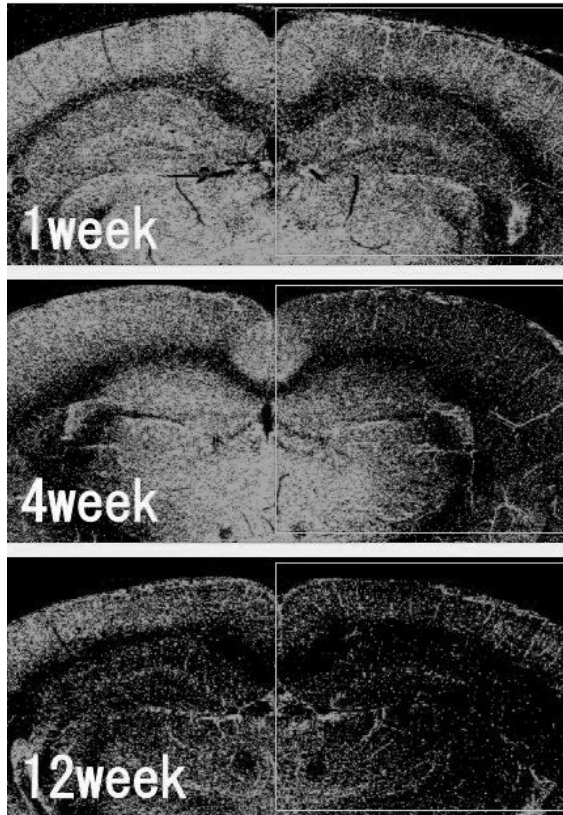


図1．炭素線照射後に生じる脳内毛細血管密度の減少（図右側のみ炭素線 30Gy 照射）

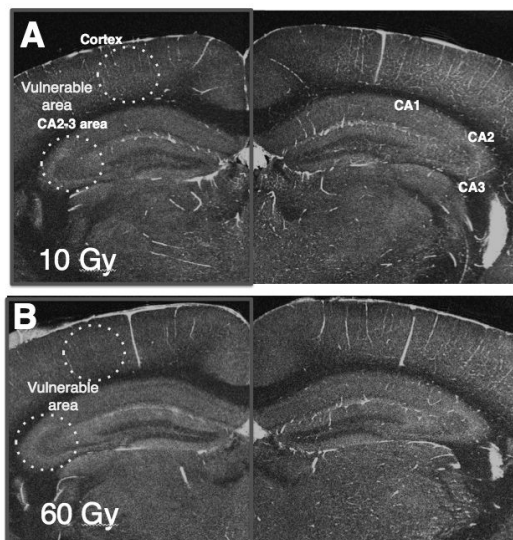


図2．炭素線照射後に生じる脳内脆弱部位の脳内毛細血管密度の変化（点線内で示される領域が晩発性脳壊死を生じる部位）

## 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1件)

Localized radiation necrosis model in mouse brain using proton ion beams. Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Takai N, Nakagawa Y, Tanaka H, Watanabe T, Kume K, Toho T, Miyatake S, Suzuki M, Masunaga S, Ono K. Appl Radiat Isot 2015 Dec;106:242-6

〔学会発表〕(計9件)

招待講演 6th International Society of Radiation Neurobiology (ISRN) 「Nobuhiko Takai : Early effects on the cognitive function and microvessel density after local brain irradiation with carbon ions using mice.( Nagasaki ) 2015年2月12-13日

招待講演 平成27年度京都大学原子炉実験所専門研究会「BNCTの新展開 - 特殊な療法から一般的な療法への移行を目指して - 」招待講演：高井伸彦「放射線による脳壊死と脳機能との関連性」2015年11月（京都大学原子炉実験所）

招待講演 がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン/博士課程教育リーディングプログラム共催 講演会 平成26年度「第4回 重粒子線医工連携セミナー」講演：高井伸彦 放射線治療後の脳機能障害を画像診断で予測可能か？ 群馬大学重粒子線医学センター・2014年7月28日（群馬）

招待講演 異分野横断セミナー「画像診断技術を利用した重粒子線治療の高度化」講演：高井伸彦 福井大学附属国際原子力工学研究所 2014年2月17日(福井)

招待講演 3th International Society of Radiation Neurobiology (ISRN) 【Early and late impairments of spatial cognition after local brain irradiation with carbon ions 炭素線脳局所照射による高次脳機能に与える影響】講演：高井伸彦 2013・1月25-26日（沖縄）

Early effects on the cognitive function and microvessel density after local brain irradiation with carbon ions using mice. Masahide Takeshita, Nobuhiko Takai, Saya Noda, Akiko Uzawa,

Ryoichi Hirayama, Matsumoto Yoshitaka, Saori Nakamura, Yoshihito Ohba. The 6th International Society of Radiation Neurobiology Conference. Nagasaki, 12-13 Feb, 2016

The Activation of N-methyl-D-aspartate receptor and correlation with radiation-induced gut Injuries. Nobuhiko Takai, Akiko Uzawa, Risa Takami, Rina Aoki, Saori Nakamura, Ohba Yoshihito 3th International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, Budva, Montenegro, 8-12 June, 2015

The effects on the cognitive function and astrocytic activation in the hippocampus after local brain irradiation with carbon ions using mice. Takai Nobuhiko, Uzawa Akiko, Hirayama Ryoichi, Yoshitaka Matsumoto, Ohba Yoshihito, Nakamura Saori, Furusawa Yoshiya. 41th Annual Meeting European Radiation Research Society, Rhodos, Greece, 14-19 September, 2014

REGIONAL BLOOD FLOW IS AN ESSENTIAL FACTOR FOR FUNCTIONAL DIAGNOSIS OF GUT INJURY TO CARBON-ION IRRADIATION. Nobuhiko Takai, Akiko Uzawa, Yoshihito Ohba, Saori Nakamura, Yoshitaka Matsumoto, Ryoichi Hirayama, Yoshiya Furusawa. 16<sup>th</sup> International Symposium on Microdosimetry. 20-25 October 2013 Treviso, Italy

〔その他〕

ホームページ等

長崎国際大学（学術研究トピックス）

<http://www1.niu.ac.jp/topics/study/2014/602.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

高井伸彦（TAKAI, Nobuhiko）

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：70373389