

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08044

研究課題名（和文）脳放射線有害事象軽減のためオリゴデンドロサイトを標的としたアプローチ

研究課題名（英文）Oligodendrocyte-targeted approaches to reduce brain adverse effects of radiation therapy

研究代表者

吉田 由香里（Yoshida, Yukari）

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：90431717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳放射線壊死に関する研究は古くからあるものの、未だに病態の全貌は解明されておらず、診断や治療に関しても確立したものが無い。本研究は、白質病変の主体と考えられているオリゴデンドロサイト(OL)に着目し、放射線による脱ミエリン化および再ミエリン化の分子機構を解明することを目的とした。X線照射により脱髄モデルマウスを作成し、サンプリングした脳の凍結切片を作製し、OL、アストロサイト、ミクログリア等の各特異的マーカーを用いて解析を行った。その結果、正常マウスに比べて、照射マウスの脳では白質部位においてOLの発現低下、活性化アストロサイトおよび活性化ミクログリアの増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は他に例を見ない超高齢化社会を迎えており、がん疾患において、今後ますます手術非適応が増え、放射線治療の適応が増えて行くと思われる。IMRTや定位放射線治療、粒子線治療などの高線量放射線治療により、悪性腫瘍の生命予後は確実に改善しているが、高線量放射線治療の宿命として脳放射線壊死は避けて通れない大きな問題となっており、早急な治療戦略の改善が求められている。放射線生物学分野において脳の放射線影響についての知見は非常に少ない。本研究は、脳腫瘍に対する放射線治療戦略を考える上でも、健康長寿社会実現のためにも、その成果の意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Although studies on radiation necrosis of the brain have been conducted for many years, the pathogenesis of the disease has not yet been fully elucidated, and there is no established diagnosis or treatment. In this study, we focused on oligodendrocytes (OLs), which are thought to be the main cells involved in white matter lesions, and aimed to elucidate the molecular mechanism of radiation-induced demyelination and remyelination. Demyelinated mouse models were created by X-irradiation, and frozen sections of the sampled brains were prepared and analyzed using each specific marker such as OLs, astrocytes, and microglia. The results showed that the expression of OL was decreased in the white matter areas of the brains of irradiated mice compared to that of normal mice, and the expression of activated astrocytes and activated microglia was increased in the brains of irradiated mice compared to that of normal mice.

研究分野：放射線生物学

キーワード：脳 オリゴデンドロサイト 放射線

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は脳腫瘍の治療において歴史的に広く用いられてきており、現時点でもその中心的役割を果たしている。放射線治療において、粒子線治療や IMRT (Intensity Modulated Radiation Therapy) などの高精度放射線治療など治療技術の進歩に伴い、周囲の正常組織に対する被ばくを極力抑えながら病変そのものを十分に治療することが可能となったことから、がん治療における局所制御率および生存率は着実に向上してきている。一方で、これらの治療法は、標的周囲の正常組織に高線量が照射される危険性も高く、晩期放射線障害は避けて通れない大きな問題となっている。特に、放射線による脳障害が注目されるようになってきた。

脳の晩期放射線障害の中でも予後を左右する重篤な副作用は脳放射線壊死であり、これらに関する研究は古くからあるものの、未だに病態の全貌は解明されておらず、診断や治療に関しても確立したものがない。悪性脳腫瘍治療にとって放射線治療の役割は大きく、その有害事象を克服する方策を立案することは急務と考える。脳放射線壊死は放射線治療後に照射線量依存性に生じる脱髄や血管障害を基盤として生じる脳白質壊死と認識されており、本病態は頭蓋内腫瘍だけでなく頭頸部領域のがん治療の際にも生じることが知られている。近年、脳放射線壊死の病態について新たな分子機構が解明された。その結果、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブ (アバスタチン) が脳放射線壊死の新規治療薬として期待され、実際にその治療効果が報告されている (Furuse et al., 2016)。しかしながら、本治療薬は放射線壊死の周辺に生じた浮腫を主に治療するものであることから、分子機構の上流を解明することにより、予防薬を開発することが期待される。そこで、申請者は、オリゴデンドロサイト (OL) の脱髄過程に着目した。

中枢神経系の髄鞘は、OL からなり、神経細胞の軸索を覆い、神経信号の高速伝達に重要な役割を果たしている。脱髄疾患では、ミエリンが消失し (脱ミエリン化)、修復機構である再ミエリン化が障害されていることが多発性硬化症などの脱髄疾患において明らかとなっている (Frohman et al., 2006)。白質は髄鞘化された神経細胞の軸索繊維が集まることにより形成されているため、大半を OL が占めている。また、成体脳には全グリア細胞数の 5~8% 程度の OL 前駆細胞 (OPC) が存在し、外傷や疾患後には再生の過程で、未成熟な OPC がミエリンを産生できる成熟した OL へと分化し、軸索のミエリン化 (再ミエリン化) を行うことが知られている (Chang et al., 2002)。

放射線照射による脱髄の発生メカニズムとして OL に着目し、放射線による脱ミエリン化および再ミエリン化の分子機構を解明し、標的分子を明らかにすることで、放射線防護剤および治療薬の開発に有効となる成果が期待でき、更には、多発性硬化症など放射線有害事象以外の脱髄疾患においても有益な情報を与えると確信し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

放射線照射による脱髄のメカニズムを明らかにするために、マウスモデルおよび OPC 細胞を用いて、OL および OPC の放射線生物学的効果、放射線照射による脱ミエリン化の分子メカニズム、放射線照射後の再ミエリン化の可能性の有無について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデルマウスの作製

MultiRad225 (Faxitron Biotics, Tucson, AZ, USA; 200 kVp, 14.6 mA, 0.5 mm Al + 0.5 mm Cu filter) を用いて、C57/BL6 マウス (8 週、オス) の脳の一部に対して上方から X 線を 60 Gy 照射した。当初の計画では、線量集中度が高く高線量照射が可能である炭素イオン線を用いて作製する予定であったが、実験スケジュール等の兼ね合いから常時利用できる X 線を用いることとした。また、これとは別に、対照実験として、髄鞘を選択的に破壊する薬剤であるクプリゾンを含む食餌を与えることで、マウス脳内に人為的に脱髄を誘発した脱髄モデルマウスを作製した。

(2) 解析

各細胞における形態学的な変化を解析するため、経時的にサンプリングした脳から凍結切片を作製し、OL、アストロサイト、ミクログリア等の各特異的のマーカを用いた抗体染色およびヘマトキシリンエオジン染色を行った。

脱髄モデルの機能的評価を行うため、TimeOFCR1 (O'Hara & Co., Ltd.) を用いてオープンフィールド行動試験を実施した。

4. 研究成果

(1) モデルマウスの作製

本研究の対照実験として作製したクプリゾン投与マウスについて、クプリゾン投与後 4 週目に、オープンフィールド行動試験を実施した結果、コントロール (正常) マウスは、部屋の辺縁や中心部で一定の歩行をするのに対し、クプリゾン投与マウスはそれと比較して、壁周辺の探索行動の

有意な増加と中心部に滞在する時間の減少が認められた。また、投与してから 12 週経過後に一時的なてんかん様の症状が認められた。20 週経過後に脳組織をサンプリングし、HE 染色にて病理的变化を調べた。その結果、大脳皮質および海馬において、細胞の欠損が認められた。

X 線を照射した照射マウスにおいてもクプリゾン投与マウスと同様、一過性のてんかん様症状は認められたが、オープンフィールドテストで解析可能ないくつかの行動解析において、立ち上がり行動を除き、いずれも正常マウスと比べて有意な違いは認められなかった (図 1)。照射後 24 週が経過した時点で、脳組織をサンプリングし、HE 染色にて観察した結果、大脳皮質の一部に淡明化が認められた。この淡明化が脱髄を示しているかどうかは明らかではないが、少なくとも髄鞘に何らかの異常があることは示された。そこで、以後の実験では、照射マウスを用いて評価を行うこととした。

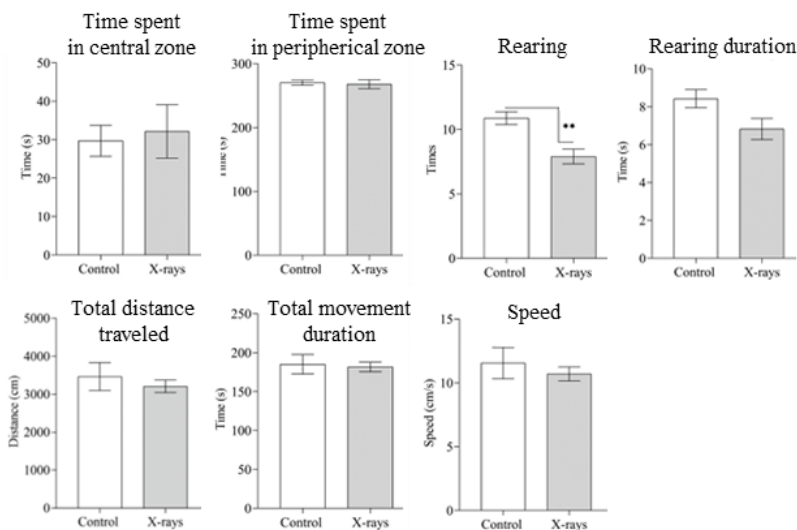


図 1 X 線照射後のマウスのオープンフィールド解析の結果

(2) OL の放射線照射後の OL および周辺細胞の形態学的解析

OL の早期の放射線生物学的効果を確認するため、X 線 60 Gy を照射したマウスの脳を照射 1 週間後にサンプリングし免疫染色を行った。オリゴデンドロサイト特異的のマーカ (abcam, ab53041) を用いて OL の発現を評価した結果、白質において、正常マウスに比べて明らかな発現の減少が認められた (図 2)。次に GFAP 抗体 (Millipore, MAB3402)、Iba-1 抗体 (Wako, 019-19741)、CD68 (AbD Serotec, MCA1957) 抗体を用いてアストロサイトおよびミクログリアについて確認した。その結果、正常マウスに比べて照射マウスにおいて、反応性アストロサイトの増加および活性化ミクログリアの増加が認められた。照射後の脳における活性化ミクログリアの増加については、以前の我々の研究から照射後 0.5 日でも認められることがわかっている (Yoshida et al., 2018)。

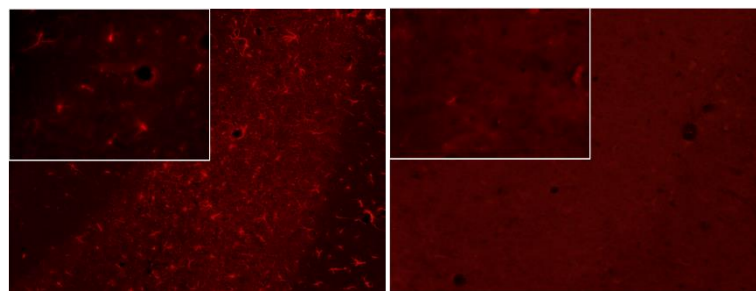


図 2 X 線照射後 1 週間における正常マウス(左)と照射マウス(右)の OL 発現

これまでの、脱髄の過程で活性化されるアストロサイトが間接的に OL の分化を抑制し、再ミエリニ化を阻害することが知られている (Kotter et al., 2006; Syed et al., 2008; Plemel et al., 2013)。また、ミクログリアが髄鞘再生に関与することが示唆されている。

脳放射線壊死は、その発生機序として、放射線照射により神経細胞やグリア細胞が一時的に障害されるという説と放射線照射により一時的に血管が障害されるのに伴って二次的に生じるという説がある。現在では、後者の説が支持されているが、これまでの我々の研究から、放射線照射により、少なくとも神経細胞やグリア細胞も、直接、障害を受けていることを明らかにしてきた。また、前者の説では、脳構成細胞の中でも OL の直接障害による脱髄が白質病変の主体と考えられている。本研究において OPC の発現について確認できておらず、照射が OPC に与える影響については未だ評価できていないが、少なくとも、本研究で認められた OL の減少から OL 自身が放射線高感受性である可能性が示唆された。また、過去の知見を踏まえて考察すると、照射により活性化されたミクログリアとアストロサイトが間接的に OL の分化を抑制している可能性が示唆された。

なお、放射線照射後の再ミエリニ化の可能性の有無についての検討や正常ヒト神経幹細胞を用いた評価を行うことを当初予定していたが、コロナ禍による人員不足や研究時間の減少、実験条件の確率に想定以上に時間を要したこと、また他の業務との兼ね合い等により研究が大幅に遅延した。予定していた研究を期間内に完遂することができなかったが、今後も継続して放射線照射による脱髄のメカニズムを明らかにしていきたい。

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 保田 浩志, 吉田 由香里, 王 冰, 永田 健斗, 長谷川 有史, 高橋 昭久	4. 巻 56
2. 論文標題 確定的影響の生物学的効果比 (RBE) に関する最近の知見	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 164-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 保田浩志, 吉田由香里, 王冰, 永田健斗, 長谷川有史, 高橋昭久
2. 発表標題 確定的影響の生物学的効果比 (RBE) に関する最近の知見
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukari Yoshida, David Fernandez-Quezada, Sonia Luquin de Anda, Akihisa Takahashi, Araceli Espinosa-Jeffrey
2. 発表標題 Combined effects of radiation and simulated microgravity on decreased locomotor activity in the normal mouse brain
3. 学会等名 43rd COSPAR (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------