

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08128

研究課題名(和文)フローサイトメトリーを用いたI-131 MIBG治療後骨髄抑制予測法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a method for predicting bone marrow suppression after I-131 MIBG treatment using flow cytometry

研究代表者

若林 大志 (WAKABAYASHI, HIROSHI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60622818

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)：本研究では、DNA損傷指標の  $\gamma$ -H2AXを用いて、放射線治療後のリンパ球障害の程度をフローサイトメトリー(FCM)で測定する簡易な骨髄抑制予測法の確立を目指す。外照射、内照射後のリンパ球障害を  $\gamma$ -H2AXを用いてFCMで評価し、被ばく量とリンパ球障害の程度、経時的なリンパ球障害の変化を検討した。外照射によるリンパ球のDNA損傷は、吸収線量に正の相関を持つことが証明された。外照射による損傷からの回復が3日以内であることが確認されたが、低線量内部照射によるリンパ球損傷は24時間以内に回復することが確認された。FCMは、放射線によるDNA損傷を定量的に評価する有効な方法であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、DNA損傷指標の  $\gamma$ -H2AXを用いて、放射線治療後のリンパ球障害の程度をフローサイトメトリーで測定する簡易な骨髄抑制予測法の確立を目指した。フローサイトメトリーで評価できる放射線外照射後のリンパ球障害の程度は線量と相関関係があり、障害の回復過程も確認できた。I-131によるリンパ球障害はフローサイトメトリーでの検出が可能であった。日本の放射線同位元素(RI)治療で用いられる核種は主にI-131であり、本研究の結果は我が国におけるRI治療後の被ばく管理に応用できる。フローサイトメトリーによる評価はRI治療後の被ばく管理に応用でき、広く役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to establish a simple method for predicting myelosuppression using  $\gamma$ -H2AX, a DNA damage indicator, to measure the degree of lymphocyte damage after radiotherapy by flow cytometry. Lymphocyte damage after external and internal irradiation was evaluated by flow cytometry using  $\gamma$ -H2AX to examine exposure dose, the degree of lymphocyte damage, and changes in lymphocyte damage over time. DNA damage of lymphocytes due to external irradiation was positively correlated with absorbed dose. Recovery from damage caused by external irradiation was observed within 3 days, while lymphocyte damage caused by low-dose internal irradiation was observed to recover within 24 hours. Flow cytometry was an effective method to assess radiation-induced DNA damage quantitatively.

研究分野：核医学

キーワード：放射線 核医学 被ばく DNA フローサイトメトリー リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射性同位元素(以下 RI)治療は全身病変への照射が可能であり、広範囲に転移した悪性腫瘍などでも病巣へ選択的に放射線核種を取り込ませ、放出する放射線により抗腫瘍効果をもたらすピンポイント治療である。しかしながら、全身への照射により、骨髄抑制が副作用となる。

造血幹細胞は放射線感受性が非常に高く、全身に放射線を浴びた場合には造血器官からの血球は白血球、血小板の順に減少する。そのなかでもリンパ球は放射線の影響を最も鋭敏に受けるため、治療後早期にリンパ球障害の程度を確認することが重要とされている。その確認方法として、DNA2重鎖切断の指標となる分子マーカーである phosphorylated histone variant H2AX (γ-H2AX)の発現を顕微鏡下で目視計測する方法がある。γ-H2AXはヌクレオゾームを構成するコアヒストンの一つであるH2Aの亜種であり、DNA二重鎖切断が発生すると周辺のH2AXは直ちにリン酸化され、γ-H2AXとなる。しかしながら、煩雑性ゆえに普及しておらず、臨床では2、3週おきに採血にて血球数を計測することで、骨髄抑制の程度を確認するしかない現状がある。患者は、定期的な受診が必要とされ、治療後に生じた骨髄抑制の程度がわからないため副作用に対する不安が強い。この経験から、治療後早期の骨髄抑制の程度を簡易に測定する方法の確立が求められている。

本研究では、個々の粒子を光学的に分析するフローサイトメトリーを用いてリンパ球内のDNA損傷を測定する方法に注目した。RI治療による被ばく評価にフローサイトメトリーを用いた研究は、γ線放出核種のAc-225、β線放出核種のLu-177のみであり、いずれも国外で実施された(PLoS One. 2014. 7;9:e88239)。これらの研究ではγ-H2AXの発現量を確認し、被ばく評価に有用であるという結果が報告された。しかし、飛程距離やエネルギーが異なるI-131に関する研究は報告されていない。本研究では、DNA損傷指標のγ-H2AXを用いて、放射線治療後のリンパ球障害の程度をフローサイトメトリーで測定する簡易な骨髄抑制予測法の確立を目指す。日本のRI治療で用いられる核種は主にI-131であり、本研究の結果は我が国におけるRI治療後の被ばく管理に応用でき、広く役立つと考える。

### 2. 研究の目的

本研究では、DNA損傷指標のγ-H2AXを用いて、放射線治療後のリンパ球障害の程度をフローサイトメトリーで測定する簡易な骨髄抑制予測法の確立を目指す。外照射、内照射後のリンパ球障害をγ-H2AXを用いてフローサイトメトリーで評価し、被ばく量とリンパ球障害の程度、経時的なリンパ球障害の変化を検討した。

### 3. 研究の方法

外照射を用いたリンパ球障害の確認

外照射 *In vitro* 実験 (BALB/cCrSlc; 8-12週齢; 雄; n=6/グループ): 麻酔下のマウスから採血を行い、末梢静脈血をヘパリン含有溶液に採取した。採取した血液にX線発生装置(MBR-1520R-3)を用い、採取した8実験群(6匹/群)の末梢静脈血試料に、以下の照射量を照射した: 0.10, 0.25, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 Gy/min (管電圧150 kV、管電流20 mA、フィルター0.5 mm Al および0.2 mm Cu、焦点-ターゲット間距離320 mm)。照射から除外した血液試料をコントロールとした。

外照射 *In vivo* 実験 (BALB/cCrSlc; 8-12週齢; 雄; n=6/グループ): 8つの実験グループのマウスに、それぞれ0.10, 0.25, 0.5, 0.75, 1.00, 1.25, 1.5, 2.00 Gy/分の線量で全身照射した。照射中、マウスはX線照射専用の小型ケージに收容された。非照射のマウスを対照とした。血液サンプルは、放射性物質照射後0日目、3日目、7日目、14日目に採取した。

内照射を用いたリンパ球障害の確認

内部照射 *In vivo* 実験 (BALB/cCrSlc ; 8-12 週齢 ; 雄) : I-131 ヨウ化ナトリウム溶液 (74MBq) を腹腔内注射したマウス 10 匹、生理食塩水を注射したマウス 4 匹を対照群として設定した。血液サンプルは、グループごとに 1 時間および 24 時間の時点で採取した。

サンプル調製: 採取した末梢血サンプルを、RBC Lysis Buffer を用いて溶解した。各サンプルは、以下の T 細胞および B 細胞の免疫蛍光染色のために、 $1 \times 10^6$  細胞 / 50  $\mu$ l の密度で、各 50  $\mu$ l の分量に分割した。

免疫蛍光染色: モノクローナル抗体 (mAb) (BioLegend および BD Bioscience) を用い細胞表面抗原の染色を行った [ 抗マウス CD8a 抗体 (クローン 53-6.7、PE/Cyanine7 コンジュゲート)、抗マウス CD4 抗体 (クローン GK1.5、FITC コンジュゲート)、抗マウス CD45R/B220 抗体 (クローン RA3-6B2、FITC コンジュゲート) ]。固定・透過液を用いて膜を透過させ、抗 H2AX (pS139) 抗体 (クローン N1-431、PE コンジュゲート) を用いて細胞質内染色を実施した。

マルチカラーフローサイトメトリーによる解析: 染色した細胞をフローサイトメーター (RF-500、シスメックス株式会社) を用いた。

吸収線量測定: 内部照射実験では、オートウェルガンマシステム (AccuFLEX ARC-800, Hitachi Aloka Medical, Ltd., Mitaka, Tokyo) を用いて、注入後 1、3、24 時間に放射能測定を実施した。血液への線量は、医学的な内部被ばく線量の計算式を用いて算出した。

データ解析と統計: フローサイトメトリーデータは、FlowJo ソフトウェア (Version 10.8.1, Becton Dickinson & Company (BD), Franklin Lakes, New Jersey, USA) を用いて分析した。

-H2AX 発現レベルを推定するために平均蛍光強度 (MFI) 値を用い、照射後の MFI 値 (MFI') とコントロールの MFI 値 (MFI) の比を算出した。結果は、平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) / 標準誤差で表示した。グループ間の差の有意性は、一元配置分散分析および t-test を用いて評価した。P 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした。統計解析は、JMP Pro ソフトウェア (バージョン 16.0.0、SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

#### 4. 研究成果

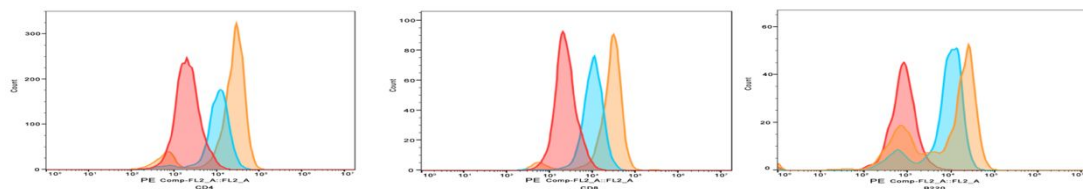
##### フローサイトメトリー解析

MFI 値は、FlowJo のヒストグラムを用いて解析した。CD4+、CD8+、B220+リンパ球は線量の増加 (0Gy、1Gy、2Gy 照射後) に伴い、MFI 値が右にシフトすることが確認された (図 1)。

図 1 フローサイトメトリー解析 (赤 0Gy, 青 1Gy, 黄 2Gy)

-H2AX 発現量と線量との直線的な正の相関関係

*in vivo* および *in vitro* の外照射実験から、MFI' / MFI の比は照射量と正の相関があることを確



認した。線形回帰分析の結果を表 1 に示す。

表 1 -H2AX 発現量と線量の相関関係

細胞	一次回帰式	R <sup>2</sup>	Prob > F
<i>In vitro</i> 実験			
CD4 (+)	MFI' / MFI = 1.13 + 4.33 * Radiation (Gy)	0.52	<0.0001
CD8 (+)	MFI' / MFI = 1.00 + 4.03 * Radiation (Gy)	0.49	<0.0001

B220 (+)	$MFI' / MFI = 0.84 + 6.36 * Radiation (Gy)$	0.76	<0.0001
<i>In vivo</i> 実験			
CD4 (+)	$MFI' / MFI = 0.72 + 3.85 * Radiation (Gy)$	0.84	<0.0001
CD8 (+)	$MFI' / MFI = 0.67 + 3.92 * Radiation (Gy)$	0.84	<0.0001
B220 (+)	$MFI' / MFI = 0.77 + 6.06 * Radiation (Gy)$	0.67	<0.0001

時間的交互作用

外照射実験では、3日目と7日目のMFI'とMFIの比に放射線量によらず有意差は認められなかったが、0.10Gy以上の放射線量を受け入れた実験群では、0日目と3日目の差が有意であることが証明された。

表2 *In vivo* 外照射後の経過

細胞	外照射(Gy)	Level	-Level	P値
CD4 (+)	0.10	0 d	3 d	0.93
		3 d	7 d	0.96
		0 d	7 d	0.89
	0.25	0 d	3 d	<0.001
		7 d	3 d	0.13
		0 d	7 d	0.01
	0.50	0 d	3 d	<0.001
		7 d	3 d	0.24
		0 d	7 d	0.01
	0.75	0 d	3 d	<0.0001
		7 d	3 d	0.78
		0 d	7 d	<0.0001
	1.00	0 d	3 d	<0.0001
		3 d	7 d	0.85
		0 d	7 d	<0.0001
	1.25	0 d	3 d	<0.0001
		3 d	7 d	0.81
		0 d	7 d	<0.0001
1.50	0 d	3 d	<0.0001	
	7 d	3 d	0.37	
	0 d	7 d	<0.0001	
CD8 (+)	0.10	0 d	3 d	0.71
		3 d	7 d	0.99
		0 d	7 d	0.71
	0.25	0 d	3 d	<0.01
		7 d	3 d	0.25
		0 d	7 d	0.03
0.50	0 d	3 d	<0.01	
	7 d	3 d	0.30	
	0 d	7 d	0.03	

		0 d	3 d	<0.0001
	0.75	7 d	3 d	0.42
		0 d	7 d	<0.001
	1.00	0 d	3 d	<0.001
		3 d	7 d	0.82
		0 d	7 d	<0.001
	1.25	0 d	3 d	<0.0001
		3 d	7 d	0.72
		0 d	7 d	<0.0001
	1.50	0 d	3 d	<0.0001
		7 d	3 d	0.89
		0 d	7 d	<0.0001
	0.10	0 d	3 d	0.18
		3 d	7 d	0.27
		0 d	7 d	0.02 *
	0.25	0 d	3 d	<0.0001
		3 d	7 d	0.06
		0 d	7 d	<0.0001
	0.50	0 d	3 d	<0.01
		3 d	7 d	0.89
		0 d	7 d	<0.01
B220 (+)	0.75	0 d	3 d	<0.0001
		7 d	3 d	0.71
		0 d	7 d	<0.001
	1.00	0 d	3 d	<0.001
		3 d	7 d	0.97
		0 d	7 d	<0.001
	1.25	0 d	3 d	< 0.001
		3 d	7 d	0.47
		0 d	7 d	<0.001
	1.50	0 d	3 d	<0.0001
		7 d	3 d	0.61
		0 d	7 d	<0.001

内部照射 ( $D_{\text{blood}} = 0.16\text{Gy}$ ) 実験では、24 時間以内に DNA 損傷が回復することが示された。実験群と対照群の MFI' / MFI 比は 24 時間後に有意差はなかった。

外照射によるリンパ球の DNA 損傷は、吸収線量に正の相関を持つことが証明された。外照射による損傷からの回復が 3 日以内であることが確認されたが、低線量内部照射によるリンパ球損傷は 24 時間以内に回復することが確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Wakabayashi Hiroshi, Kayano Daiki, Inaki Anri, Araki Raita, Kuroda Rie, Ikawa Yasuhiro, Fujiki Toshihiro, Akatani Norihito, Yamase Takafumi, Watanabe Satoru, Hiromasa Tomo, Kunita Yuji, Mori Hiroshi, Saito Shintaro, Nishimura Ryosei, Wada Taizo, Kinuya Seigo	4. 巻 34
2. 論文標題 High-dose 131I-mIBG as consolidation therapy in pediatric patients with relapsed neuroblastoma and ganglioneuroblastoma: the Japanese experience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 840 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-020-01514-2	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 -

1. 著者名 Kayano Daiki, Wakabayashi Hiroshi, Nakajima Kenichi, Kuroda Rie, Watanabe Satoru, Inaki Anri, Toratani Ayane, Akatani Norihito, Yamase Takafumi, Kunita Yuji, Hiromasa Tomo, Takata Aki, Mori Hiroshi, Saito Shintaro, Araki Raita, Taki Junichi, Kinuya Seigo	4. 巻 34
2. 論文標題 High-dose 131I-metaiodobenzylguanidine therapy in patients with high-risk neuroblastoma in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 397 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-020-01460-z	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 -

1. 著者名 Taniguchi Yuka, Wakabayashi Hiroshi, Inaki Anri, Kayano Daiki, Yamada Masako, Kinuya Seigo	4. 巻 34
2. 論文標題 Radiation exposure in nurses during care of 131I-MIBG therapy for pediatric patients with high-risk neuroblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 441 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-020-01466-7	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 -

1. 著者名 Xue Zhang, Hiroshi Wakabayashi, Daiki Kayano, Anri Inaki, Seigo Kinuya	4. 巻 61
2. 論文標題 I-131 metaiodobenzylguanidine therapy is a significant treatment option for pheochromocytoma and paraganglioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nuklearmedizin	6. 最初と最後の頁 231-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1759-2050	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 -

1. 著者名 Xue Zhang, Hiroshi Wakabayashi, Tomo Hiromasa, Daiki Kayano, Seigo Kinuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent Advances in Radiopharmaceutical Theranostics of Pheochromocytoma and Paraganglioma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Semin Nucl Med .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.semnuclmed.2022.12.005	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Chen Z, Wakabayashi H, Kuroda R, Kitamura Y, Kozaka T, Saito S, Inaki A, Kayano D, Kinuya S.
2. 発表標題 The Process of Radiation Exposure Lymphocyte Damage Assessed by H2AX Expression Level using Flow Cytometry.
3. 学会等名 35th Annual congress of the European association of nuclear medicine 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張 雪, 小西貴広, 若林大志, 米山寛人, 稲木杏吏, 廣正 智, 渡辺 悟, 森 博史, 赤谷憲一, 山瀬喬史, 國田優志, 齊藤晋太郎, 萱野大樹, 絹谷清剛
2. 発表標題 177Lu-DOTATATEシンチグラフィによる標的臓器体積測定: CTとの比較.
3. 学会等名 第50回断層映像研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張 雪, 小西貴広, 若林大志, 米山寛人, 稲木杏吏, 廣正 智, 渡辺 悟, 森 博史, 赤谷憲一, 山瀬喬史, 國田優志, 齊藤晋太郎, 萱野大樹, 絹谷清剛.
2. 発表標題 Personalized dosimetry of kidney in patients undergoing therapy with 177Lu-DOTATATE.
3. 学会等名 第3回標的アイソトープ治療線量評価研究会
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
---------	---------