

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08140

研究課題名(和文)放射線療法における高気圧酸素併用の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of combination use of hyperbaric oxygen in radiotherapy.

研究代表者

片桐 千秋 (Katagiri, Chiaki)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：00443664

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)：悪性神経膠腫の標準治療は手術による腫瘍の摘出と術後の化学療法を併用した放射線照射治療であるが、放射線照射は副作用として患者の認知機能を低下させる側面をもつ。本研究は放射線による神経損傷、それに伴う認知機能の低下に対して高気圧酸素療法の併用が神経保護効果を示し、認知機能低下を予防するメカニズムについてモデル動物を用いて解析した。放射線照射により大脳白質領域の神経細胞の軸索縮小と成熟スパインの減少が観察された。これに対して高気圧酸素療法併用群では大脳白質における軸索の長さおよび成熟スパインの数がコントロールである非照射群と同等に維持され、高気圧酸素併用による神経保護作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高気圧酸素療法は減圧症の治療、末梢循環不全により低酸素環境となった末梢組織の改善や突発性難聴、そして抗がん剤と併用される脳腫瘍の放射線治療に有効であるとし保険適応治療となっている。高気圧酸素療法の研究は臨床試験研究にとどまっておらず本研究による神経細胞の動態および認知機能への影響を明らかにしたことは学術的に新しい発見であっただけでなく、認知機能低下の予防方法として放射線治療の一助となる。

研究成果の概要(英文)：The standard treatment for malignant gliomas is radiation therapy combined with surgical tumor removal and postoperative chemotherapy, but radiation can have the side effect of reducing the patient's cognitive function. In this study, the combination of hyperbaric oxygen therapy demonstrated a neuroprotective effect against radiation-induced neuronal damage and the associated decline in cognitive function using model animals. Radiation was observed to reduce the axonal size and mature spines of neurons in the cerebral white matter region. In contrast, in the hyperbaric oxygen therapy combination group, the axonal length and number of mature spines in the cerebral white matter were maintained at the same level as in the non-irradiated control group, demonstrating the neuroprotective effect of the combination of hyperbaric oxygen therapy.

研究分野：神経科学

キーワード：高気圧酸素療法 放射線治療 認知機能 神経保護作用

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍摘出後の放射線療法は平日の5日間1.8-2.0Gy/dayを照射し、6週間かけて合計最大60Gy照射する長期的な治療計画である。琉球大学医学部附属病院脳神経外科では治療開始前より治療中に認知機能が落ちていく症例が散見された。そこで科学的に検討するため、機能的磁気共鳴画像(fMRI)を用いて装置内で課題を行う海馬機能評価画像解析を行った。その結果、放射線4Gy-12Gy相当を海馬領域に被曝した患者の海馬機能評価が放射線照射前と比較して著しく低下しているという結果を得た。一方で、臨床試験において高気圧酸素療法(HBO)を併用した放射線療法が効果的であることを示しており、我々は放射線療法におけるHBOの影響のメカニズムを研究し、近年は腫瘍組織のみならず正常組織への影響を検討し始めていた。本研究はHBOによる放射線照射からの保護効果の神経機能的および認知機能的なメカニズムを明らかにするため、動物モデルを用いて研究することを試みることにした。

2. 研究の目的

放射線照射による脳神経の損傷、それに続く認知機能低下に対して高気圧酸素療法併用法が神経に対して保護作用を示し認知機能低下を予防するメカニズムをモデル動物を用いて神経科学的に検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス照射モデルの作製

8~10週齢のマウスを非照射群、放射線単独照射群、高気圧酸素併用照射群(HBO併用群)に分ける。HBO併用群はスモールケージに移し自由行動下にて高気圧酸素チャンバー内で2.5気圧、100%酸素下40分間飼育する。放射線照射は吸気麻酔にて麻酔し、鉛シートで体表面を覆い頭部のみを露出させX線照射装置RX-650(Faxitron)を用いて2Gyを全脳に照射する。連続して5日間照射し合計10Gy照射とした。

(2) 認知機能評価

行動解析による認知機能評価はオープンフィールドテスト、高架式十字迷路、新規物体認識試験、恐怖条件付記憶試験にて解析する。

(3) 免疫組織染色

マウス脳は4%パラホルムアルデヒドにて還流固定しパラフィンブロックにした。組織切片は脱パラフィン後、一次抗体に浸し4℃で一晩おいた。免疫化学染色はニチレイ社のヒストファインを用いて行った。蛍光染色はAlexa546抗体、DAPIを用いて染色した。

(4) ゴルジ染色

還流固定後の脳組織は嗅球と小脳を切断しFD RapidGolgi kit (FD NeuroTechnologies)を用いて染色後、100µmにスライスし観察した。

(5) 神経細胞特異的YFP発現マウスの3Dイメージング

神経細胞特異的YFP発現マウス(Tg(Thy1-YFP)HJrs:YFP)を用いてマウス照射モデルを作成する。還流固定後全脳を取り出し、改良クラリティー溶液(Advanced CLARITY)により透明化後、ライトシート顕微鏡(LightsheetZ.1, ZEISS)を用いて海馬CA1-CA3-DGにおける神経細胞の3D画像を撮影する。

4. 研究成果

(1) 組織学的解析

古くはヒトを含めた哺乳類において神経細胞は幼若期に分化が終焉し成体では新たな神経細胞は作られないと信じられていた。しかしながら近年、海馬では終生にわたり神経幹細胞から神経細胞が新たに新生されていることが明らかとなり、海馬の神経新生が記憶や学習に重要なことが分かってきた。海馬歯状回における神経新生を中間神経前駆細胞マーカーのDoublecortin(DCX)で染色、陽性細胞を数値化した。(図1、2)また細胞分裂期特異的に細胞に取り込まれる試薬、BrdUを投与したマウスの海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞数を数えた。(図2)

放射線照射群 (RT) は非照射群 (Control) に対して DCX および BrdU 陽性細胞が 2 割程度に減少した。これは合計 10Gy の放射線照射により神経新生が著しく抑制されたことを示唆した。神経新生の減少は HBO 併用群 (RT+HBO) においても放射線単独照射群と同様に減少した。

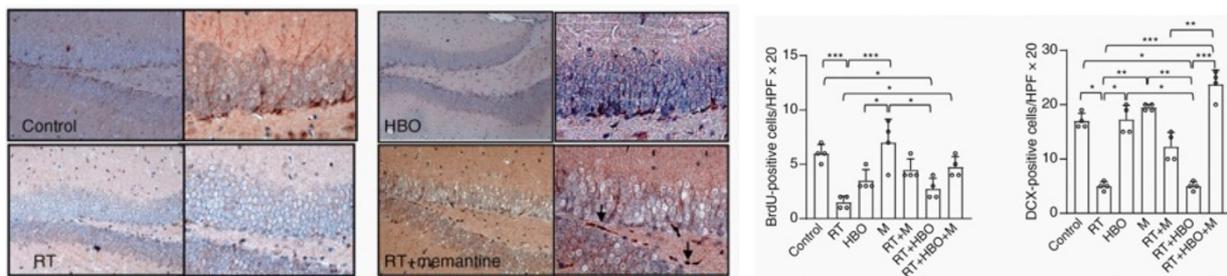


図 1 中間神経前駆細胞マーカー Doublecortin 染色画像と DCX および BrdU 陽性細胞数

近年急速に普及が進んだ組織透明化技術と神経細胞特異的 YFP 発現遺伝子組換えマウスを用いて海馬における神経細胞を 3D イメージング画像解析による可視化を行なった。図 2 に示したように CLARTY 法を用いて全脳を透明化し腹側下部から海馬領域を水平断で撮像し 3D 化した。YFP 陽性の細胞体および軸索は放射線照射により著しく減少したが、HBO 併用により減少は抑制された。

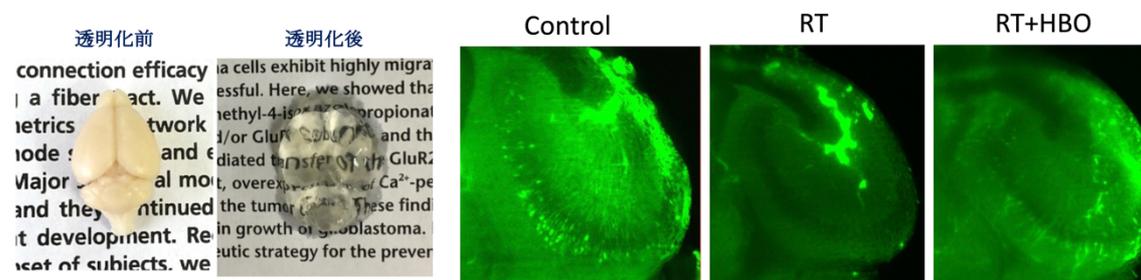


図 2 神経特異的 YFP 発現マウスを用いた全脳透明化による 3D イメージング

海馬の成熟神経細胞への影響を検討するため、海馬歯状回におけるスパイン形態をゴルジ染色にて観察した。

スパインの形態は樹状突起部から突出して形成される。形成初期は細い棒状のフィロポディアを形成し、その後、頭部と呼ばれる部位を形成する。細いままの頭部を持つ Thin 型、頭部と樹状突起の間にネックが無い Stubby 型、完全な頭部とネックを持つ Mushroom 型に分類される。放射線照射単独群では Mushroom 型スパインが消失し Thin 型が増加した。一方、高気圧酸素療法併用群では Mushroom 型スパインの減少が見られたものの放射線単独群と比較して優位に減少量が低下していた。(図 3)

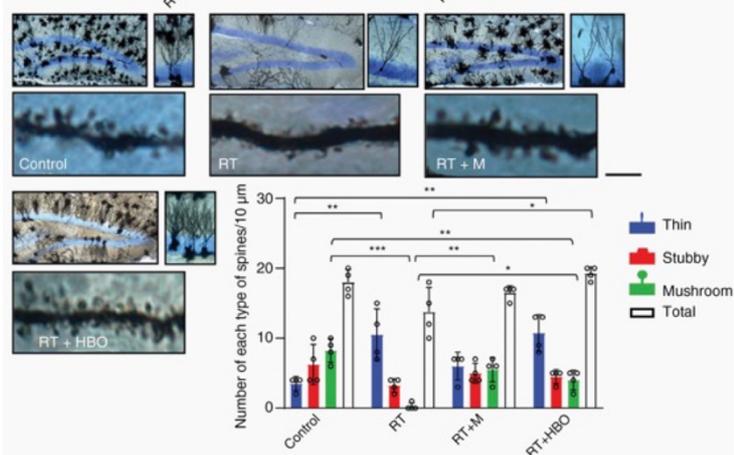


図 3 海馬歯状回でのゴルジ染色とスパイン形態

次に大脳白質領域における神経細胞への影響を観察した。

大脳白質神経細胞の軸索はニューロフィラメント抗体を用いて染色し軸索長を計測 (図 4 左)、軸索を取り巻くミエリン髓鞘タンパク質を MBP 抗体と蛍光標識 2 次抗体を用いて染色し蛍光画像の面積を算出し比較した (図 4 中)。軸索長およびミエリン髓鞘は放射線照射単独群で非照射群と比較して優位に減少した。HBO 併用群における軸索長およびミエリン髓鞘は非照射群と変わらず、高気圧酸素療法併用は放射線による軸索損傷を抑制することが示された。白質神経細胞の樹状突起におけるスパイン形態を観察した (図 4 右)。放射線照射により成熟 Mushroom 型スパインは消失したが、HBO 併用群において成熟 Mushroom 型スパインの数は非照射群と変化がなくスパインの保護効果が顕著にみられた。

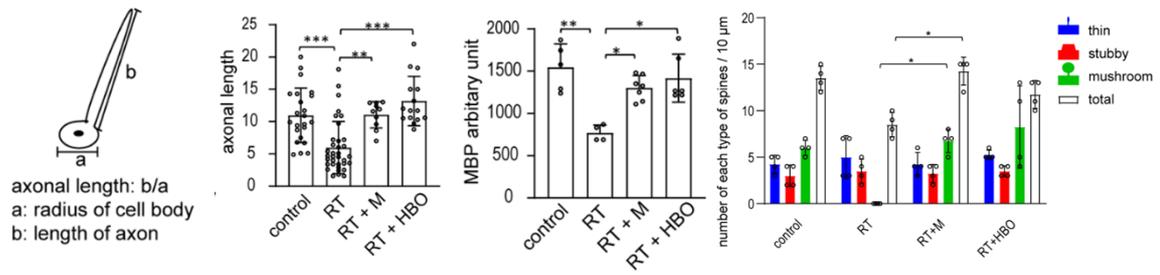


図4 大脳白質神経細胞における軸索および樹状突起スパイン形態

(2) 行動解析

全脳への放射線照射による情動および認知・記憶への影響を検討するため高架式十字迷路、恐怖条件付け記憶試験、新規物体認識試験を解析した。放射線照射単独群は高架式十字迷路のオープンアーム（明るく高い場所でありマウスが不安を感じる）に滞在する時間がどの群と比較しても著しく増加した。また恐怖条件付け記憶試験において放射線単独照射群は HBO 併用群と比較してすくみ時間が減少していた。これらの結果から放射線照射により恐怖に対する感情応答が低下したため不安が減り、強い恐怖感情に関連づけられた空間記憶が低下したと思われる。一方、HBO 併用群では不安感情の低下は抑制され、恐怖記憶においては非照射群よりもすくみ時間が優位に長かった。しかしながら、新規物体認識テストでは放射線単独照射群および HBO 併用群ともに新規物体と既知の物体を見分けることが出来なかった。これらの結果は高気圧酸素療法の併用が海馬への放射線障害を抑制することはできないが白質神経細胞の障害を抑制するため、海馬依存的な新規物体の認知では効果がないことが示された。

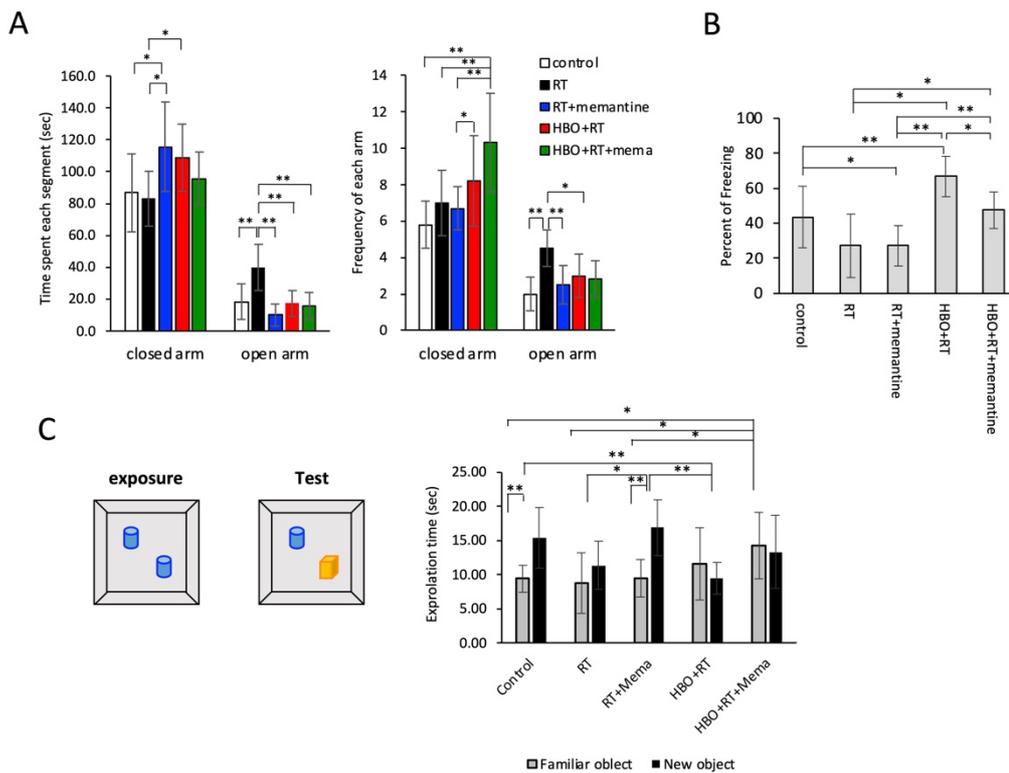


図5 情動及び認知・記憶行動の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hokama Yohei, Nishimura Masahiko, Usugi Ryoichi, Fujiwara Kyoko, Katagiri Chiaki, Takagi Hiroshi, Ishiuchi Shogo	4. 巻 25
2. 論文標題 Recovery from the damage of cranial radiation modulated by memantine, an NMDA receptor antagonist, combined with hyperbaric oxygen therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 108 ~ 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noac162	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 Miyagi Yasuyo, Fujiwara Kyoko, Hikishima Keigo, Utsumi Daisuke, Katagiri Chiaki, Nishimura Masahiko, Takagi Hiroshi, Ishiuchi Shogo	4. 巻 59
2. 論文標題 Altered Calcium Permeability of AMPA Receptor Drives NMDA Receptor Inhibition in the Hippocampus of Murine Obesity Models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4902 ~ 4925
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-022-02834-2	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片桐千秋、高木博、石内勝吾
2. 発表標題 Neuroprotective effect of hyperbaric oxygenation treatment before radiotherapy.
3. 学会等名 第45回日本神経科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片桐千秋
2. 発表標題 Neuroprotective effect of hyperbaric oxygenation treatment in radiation injury
3. 学会等名 第11回国際放射線神経生物学会大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片桐千秋
2. 発表標題 放射線照射による神経障害における高気圧酸素療法併用の神経保護作用
3. 学会等名 第24回日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片桐千秋、石内勝吾
2. 発表標題 NMDA受容体阻害剤と高気圧酸素療法を併用した放射線照射からの神経保護効果
3. 学会等名 第95回日本生化学会
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
研究分担者	石内 勝吾 (Ishiuchi Shogo) (10312878)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究分担者	菅原 健一 (Sugawara Kenichi) (50375573)	琉球大学・病院・講師 (18001)	

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