

放射光由来微小X線微小平板ビーム治療(MRT)の基礎研究：ラット組織における組織影響と発現遺伝子解析

Basic Study of Microplanar Beam Radiation Therapy: Analysis of Effects on Histological Changes and Gene Expressions in Rats

東北大学加齢医学研究所大学院博士課程1回生 栗原 愛

<背景と目的>

放射光由来の微小平板X線ビーム治療(Microplanar beam radiation therapy, MRT)は、スリット状コリメーターを通して、すだれ状のX線ビームを腫瘍組織に照射する放射線治療法である。MRTは従来の放射線療法とは全く異なり、がん細胞だけが死滅するが、周囲の正常組織は損傷を受けないと報告されている。

我々は2007年から続く一連の照射実験で、正常組織におけるMRTの影響を検証してきた。2007年度採択された申請では、Microbeam radiation照射を行った正常ラット脳と、従来の放射線療法で用いられるbroadbeam照射ラット脳とを比較した際、浮腫やグリア細胞の反応は、microbeam radiation照射の方が軽微であることを明らかにした。2008年度には、照射前における、抗炎症性ステロイド剤であるサクシゾンの経口投与によって、照射後の死亡率の軽減がみられた。これら一連の実験は全て、いかに脳組織に対する悪影響少ないmicrobeamの至適照射条件を得るかを目指して行ってきたものである。

これまでの研究では、組織レベルの形態変化観察によりその背景を探る方法を取っていたが、本研究では次の段階として、遺伝子レベルの放射線に対する応答について検討することを目的とする。

<方法>

- 1) BL28B2の第2光学ハッチに、線量計測用イオンチェンバー、マイクロスリットとこれの位置合わせ機構、コリメータをこの順で設置し、その下流に実験動物、画像検出器を配置した。
- 2) ハッチ据付のX線シャッターで照射時間を制御して様々な条件設定を行った、すだれ状microbeamを、正常ラット脳に対して照射した。

- 3) 照射1日後、1週間後、1ヵ月後にそれぞれ屠殺し、必要に応じた方法（ホルマリン固定若しくは凍結保存）で組織を保存した。
- 4) 保存した組織について、各種染色法によって免疫化学的手法に解析し、そのダメージを調べた。
- 5) 照射1週間後の組織切片において、ビームによる照射組織とビーム間の非照射部と、全く非照射である対側脳をそれぞれレーザーマイクロダイセクション（LCM）によって切り出した後RNAを抽出し、Differential Display (Gene Fish) 法によって発現遺伝子を比較する。RNAを抽出し、Differential Display (Gene Fish) 法によって発現遺伝子を比較した。

<結果>

1) 動物の生存と組織学的概観

ピーク線量を 1100 Gy に設定し、スリット照射を行ったラットは、1ヶ月经過した時点においても、全ての個体において外見上の変化は認められず、生存し続けた。一方、280 Gy のブロード照射を行ったラットは、照射後 2 週間以内に全て死亡した。ブロード照射ラット脳では、明らかな浮腫が観察されたが、スリット照射ではこれが認められなかった。また、抗 Vimentin 抗体を用いて免疫染色を行った所、スリット、ブロード両者において、照射部位におけるアストロサイトの活性化が観察され、時間を追うごとにその活性は減少した。ただし、抗 Vimentin 抗体、抗 GFAP 抗体、KB 染色の結果から、スリット照射部において細胞の照射部位への移動は確認されていない。

2) マイクロアレイ解析(概観)

照射後 1 週間が経過しているためか、ブロード照射部位の解析を行ったものでは、血管拡張作用が報告されている遺伝子発現の増加が著しかった。また、サイトカインなど炎症反応を引き起こす遺伝子や増殖停止因子の発現も増加が確認された。反対に、ナトリウム、カリウムなどの電位依存性チャネルタンパクやカルシウムチャネル、神経伝達物質レセプターなどの遺伝子発現の著しい減少が確認された。

3) マイクロアレイ解析 (スリット照射部位)

インターフェロン関連タンパク質、ブロード照射部ほどではないがサイトカイ

ンの遺伝子発現が上昇していた。反対にミオシンや脂肪酸不飽和化酵素、血管平滑筋細胞浸潤タンパク質の遺伝子発現量の減少が確認された。

4) マイクロアレイ解析 (ブロード照射対側)

コントロールに比べて発現量が上昇している遺伝子の数は少なく、炎症性サイトカインが上昇してはいたが、ブロード照射部位に比べて上昇量は小さくなっている。遺伝子発現が減少しているものは少なく、膜結合タンパク質の一部やミオシンの発現量が少量減少している程度であった。

5) マイクロアレイ解析 (スリット照射対側)

コントロールに比べて発現量が上昇している遺伝子の数は非常に少なく、機能の解明されているものはなかった。発現量が減少しているものも少なかったが、ミオシンや増殖停止因子がわずかに減少していた。

6) chrd11 の減少

スリット照射部位でコントロールに比べ発現量が上昇し、ブロード照射部位でコントロールに比べ発現量が減少している遺伝子が chrd11 である。この遺伝子は BMP4 のアンタゴニストであり、神経幹細胞においてグリア細胞運命決定の阻害を行っていると示されている。スリット照射を行ったラットは生存し続けたが、ブロード照射を行ったラットが 2 週間以内に死亡した原因がこの遺伝子によるものである可能性がある。

7) pnlip の減少

また、ブロード照射部位および対側、スリット照射部位および対側において発現量の著しい減少が確認された遺伝子が pnlip である。ブロード照射部位、スリット照射部位、ブロード照射対側、スリット照射対側の順に遺伝子発現の減少量が大きくなっていった。この遺伝子は、中枢神経系に物理的な外傷を与えると、3 日後に上昇がピークになり、その後減少し、外傷前と同程度の発現量に戻ることが示されている。今回の放射線による障害では pnlip が著しく減少していることから、中枢神経系において放射線の影響が顕著に現れる遺伝子であり、アストロサイトの増殖を押さえてしまう要因となっているかもしれない。

<考察>

一部の細胞集団に放射線を照射すると、放射線に直接曝されていない近傍の細胞にも照射の影響が引き起こされることが知られおり、この現象はバイスタンダー効果と呼ばれている。共同研究者の菓子野助教によって、microbeamでもバイスタンダー効果があることを培養細胞にて明らかにした。

主に液性因子によって司られると考えられてきたバイスタンダー効果であるが、細胞内レベルで、さまざまmRNAを介した情報伝達系が活性化されていることが初めて示された。特にpnlipの著しい減少が、スリット照射部位のみならず、対側にまで及んでいたことは、peakとpeakの間でのバイスタンダー効果のみならず、スリット照射エリア外へ及ぶmicrobeamの影響を示すものである。興味あることに、臨床で用いられるコバルトを線源としたガンマナイフ治療ユニットを用いた動物実験でも、60Gyの照射が反対側の線条体に照射側と共通の遺伝子の減少を示したとの実験結果が2009年に報告され、microbeam照射と共通の現象と考えられる。

<参考文献>

- 1: Jia J, Yan M, Lu Z, Sun M, He J, Xia C. Regulated expression of pancreatic triglyceride lipase after rat traumatic brain injury. *Mol Cell Biochem.* 2010, 335:127-36.
- 2: Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ, Hevner RF, Miura N, Sugimura H, Sato K. A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 2003, 23:11732-40.
- 3: Wei HH, Lu XC, Shear DA, Waghray A, Yao C, Tortella FC, Dave JR. NNZ-2566 treatment inhibits neuroinflammation and pro-inflammatory cytokine expression induced by experimental penetrating ballistic-like brain injury in rats. *J Neuroinflammation.* 2009, 6:19.
- 4: Lei P, Li Y, Chen X, Yang S, Zhang J. Microarray based analysis of microRNA expression in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *Brain Res.* 2009, 1284:191-201.
- 5: Hirano M, Shibato J, Rakwal R, Kouyama N, Katayama Y, Hayashi M, Masuo Y. Transcriptomic analysis of rat brain tissue following gamma

knife surgery: early and distinct bilateral effects in the un-irradiated striatum. *Mol Cells*. 2009, 27:263-8.