

氏 名	吉 積 佳 世
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 696 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	放射線照射が創傷治癒能に与える経時的变化の解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 山 本 直 人 (委 員) 教 授 高 橋 將 文 教 授 森 壘

論文内容の要旨

1 研究目的

放射線治療は健常組織に急性および晩発性の確定的放射線障害をもたらすが、その病態メカニズムや病理機序の経時的变化については明らかではない。我々は、放射線照射により組織内の幹細胞が不可逆的に欠損し、その結果、虚血、線維化、萎縮などの組織機能障害が経時的に進行するという仮説を立てた。この仮説を検証するため、放射線障害マウスモデルを考案し、照射 1 か月後の急性期から 12 か月後の慢性期まで、脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells ; ASCs) を含む細胞成分、および創傷治癒能や皮膚酸素飽和度などの組織機能の経時的变化を長期的に調査した。

2 研究方法

8 週齢マウスの背部皮膚に、毎週 10Gy×4 回、総量 40Gy の放射線照射を行った。放射線照射群は 5 群 (N=4-6) にわけ、それぞれ照射 1 か月後、3 か月後、6 か月後、9 か月後、12 か月後に皮膚酸素飽和度、創傷治癒能を調査した。創傷治癒実験は、照射部皮膚を 6 mm バイオプシーパンチにて全層でくり抜き、創収縮を予防するために創周囲皮膚をシリコンリングで固定した。創傷部の経過を毎週 2 回、創治癒が完了するまで一眼レフカメラで撮影し、画像解析にて創面積を算出することにより創傷治癒能を評価した。この際くりぬいた皮膚組織、および創傷治癒後の組織は Zinc 固定し、HE 染色にて表皮、真皮、皮下脂肪の厚みと瘢痕組織の面積を調査した。また、免疫組織化学染色にて皮下脂肪層の CD34+/Isolectin-幹細胞数を計測した。年齢による影響を考慮するため、放射線非照射コントロールはそれぞれの週齢に対応した 5 群 (N=5) にわけた。

3 研究成果

創傷治癒能は、照射 1 か月後で 27.6 ± 2.6 日と遅延していたのに対し、非照射群では 17.8 ± 1.5 日だった。また、創傷治癒の過程で急性放射線障害の影響が示唆された。照射 3 ヶ月後、非照射群と比較して統計的に有意差がないレベルまで改善した。照射 6 ヶ月以降は再度悪化し、9 ヶ月目 (28.0 ± 2.0 日、対照 : 17.2 ± 3.2 日) および 12 ヶ月目 (26.3 ± 3.0 日、対照 : 17.6 ± 2.87 日) では創傷治癒期間が有意に遅延した。また、放射線照射群における潰瘍出現率は、1 ヶ月で 3.03% (1/33)、3 ヶ月で 3.85% (1/26)、6 ヶ月で 0% (0/19)、9 ヶ月で 21.43% (3/14)、12 ヶ月で 33.33%

(2/6) であった。

皮膚酸素飽和度はすべての放射線照射群において非照射コントロール群に比べ低下したが、その差は 6、9、12 カ月でのみ統計的に有意であった（対コントロール：1 カ月 $p=0.236$ ；3 カ月 $p=0.258$ ；6 カ月 $p=0.039$ ；9 カ月 $p=0.023$ ；12 カ月 $p=0.0009$ ）。放射線照射群では、皮膚酸素飽和度の値は 1 カ月で低下し、3 カ月で一部回復した。その後、経時的に低下し、12 ヶ月で最も低下した。

組織学的検査では、放射線照射による CD34+/Isolectin-脂肪幹細胞の欠乏、皮下脂肪組織の萎縮、および治癒後瘢痕組織の過形成がみられた。皮下組織中の ASCs の総数は、すべての照射群で非照射群と比較して有意に減少していた（対コントロール：1 ヶ月 $p=0.013$ ；3 ヶ月 $p=0.031$ ；6 ヶ月 $p=0.0006$ ；9 ヶ月 $p=0.0007$ ；12 ヶ月 $p<0.0001$ ）。照射群では、ASCs の総数は経時的に減少し、特に 6 ヶ月以降で減少した。皮下脂肪層は、非照射コントロール群と比較して、1 ヶ月群を除くすべての照射群で有意に萎縮していた（対コントロール：1 ヶ月 $p=0.427$ ；3 ヶ月 $p=0.004$ ；6 ヶ月 $p=0.016$ ；9 ヶ月 $p=0.036$ ；12 ヶ月 $p=0.048$ ）。とくに照射群では、9、12 ヶ月で皮下脂肪層の著大な萎縮が観察された。瘢痕組織の過形成は、すべての放射線照射群で非照射コントロールと比較してみられた（対コントロール：1 ヶ月 $p=0.017$ ；3 ヶ月 $p=0.214$ ；6 ヶ月 $p=0.013$ ；9 ヶ月 $p=0.121$ ；12 ヶ月 $p=0.024$ ）。放射線照射群では、瘢痕組織は 1 カ月で増加し、3 カ月で減少した。その後、経時的に増加し、12 ヶ月で最大値となった。

非照射群では、特に 47 週齢以上で、加齢による真皮や皮下脂肪の萎縮、過剰な線維化が観察されたが、創傷治癒能や組織幹細胞数には影響がなかった。

4 考察

放射線障害は、症状出現時期により急性障害と晩発性障害に分類され、その病態も異なる。これまで放射線性皮膚障害を模した様々な動物モデルが開発され、治療法が研究されているが、これらの多くは実際には放射線照射後 1~2 カ月までの急性放射線皮膚炎を呈している。しかし、臨床的に困難な問題は、照射後数年経過しても発症し得る慢性障害であり、その病態は急性放射線皮膚炎とは異なり、複雑で未解明な部分が多い。今回、分割照射プロトコルのマウスを用い、照射後 1 ヶ月の急性期から照射後 12 ヶ月の慢性期まで、照射の皮膚機能への影響を経時的に評価した。慢性放射線障害と組織内の残存幹細胞数との相関や、創傷治癒不全の新たな治療戦略として幹細胞投与が報告されていることから、本研究では放射線障害の病態を幹細胞学的に調査することを目的とする。

急性放射線皮膚炎は、皮膚紅斑、乾燥および湿潤性落屑、浮腫、皮膚壊死、潰瘍、出血を呈する。一般的には、放射線治療中または治療後数週間以内に出現し、90 日以内に発症する。病態生理学的には、放射線治療は機能細胞の大量喪失、上皮の再生障害、炎症反応の誘発をもたらし、これらはすべて創傷治癒障害を引き起こす。本研究においては、創傷治癒能は 1 カ月で最低となった。3 ヶ月後、急性障害は治まり、晩発性障害は進行していないため、創傷治癒能は全実験期間を通じて最も良好であった。組織酸素飽和度も同様の経時変化を示し、1 ヶ月で低下し、3 ヶ月で一時的に回復した。創傷実験において、照射 1 ヶ月後の創部所見や広範囲の瘢痕形成は、正常な創傷治癒過程を妨げる顕著な急性障害を示すものであった。一方、照射 1 ヶ月の ASCs 数は非照射コントロールと比較して減少していたものの、皮下脂肪の萎縮はまだ見られなかった。1 ヶ

月後の ASCs 数は、創傷治癒が一時的に改善した 3 ヶ月後とほぼ同レベルであった。従って、1 ヶ月の創傷治癒障害の直接の原因は急性炎症反応によるものと考えられ、9 ヶ月、12 ヶ月とは異なる病態であることが推測された。

晩発性放射線障害は、放射線治療後数ヶ月から数年経ってから発症する。毛細血管拡張、線維化、萎縮、石灰化、難治性潰瘍、骨髓炎、さらに二次皮膚癌を含む不可逆的かつ進行性の合併症である。晩発性障害の病態はまだよく分かっていないが、最近の学説では放射線照射直後に開始されるサイトカインカスケードの重要性が強調されている。放射線は様々な細胞シグナル伝達経路を活性化し、炎症性サイトカインおよび線維性サイトカインの発現と活性化、血管傷害、凝固カスケードの活性化などを引き起こす。TGF- β 、PDGF、TNF などの様々なサイトカインが、放射線治療後に制御されなくなることが分かっている。ASCs は、組織リモデリングや新生血管の誘導に係る因子を分泌し、組織傷害の治癒に極めて重要である。最近、長期にわたる放射線障害の病態は、幹細胞の欠乏に起因することが報告されている。本研究では、組織酸素飽和度と創傷治癒能は 6 カ月後に低下し、その傾向は 12 カ月まで経時的に漸進的に悪化した。組織学的評価では、ASCs の欠乏、皮下脂肪の萎縮、治癒後の過剰な線維化が 9 ヶ月および 12 ヶ月で有意に悪化し、創傷治癒の遅延と相関していた。これらの結果は、放射線照射が線量や頻度によって ASC や創傷治癒に影響を与え、残存幹細胞の数が創傷治癒能の低下の程度と相関することを示した我々の先行研究と一致している。ASC の欠乏は時間とともに不可逆的に進行し、それに伴い照射によって活性化された細胞間シグナルの調節機構が働かなくなり、炎症性サイトカイン、線維性サイトカイン、および血管傷害・凝固カスケードの活性化が継続し、線維化、萎縮、血液灌流不全、創傷治癒不全が時間とともに悪化したと推測される。

加齢皮膚では、ケラチノサイトの増殖低下、真皮萎縮、マクロファージの機能低下などの特徴があり、創傷治癒遅延に関与している。本研究では、創傷治癒実験開始時に 15 週齢から 59 週齢まで週齢差のあるマウスを使用した。創傷治癒能や組織幹細胞数には影響がなかった。

5 結論

動物実験では放射線治療が組織機能に影響を与えることが示された。創傷治癒は 1 ヶ月で低下し、3 ヶ月で改善し、6 ヶ月以降経時的に徐々に低下した。1 ヶ月では、急性炎症と組織低酸素が見られたが、ASC 欠乏と皮下脂肪の萎縮はまだ深刻ではなかった。一方、6 カ月後、ASC の数は経時的に減少し、その後、線維化、萎縮、虚血が不可逆的に進行した。これらの結果は、慢性放射線障害が時間の経過とともに進行し、ASCs を補充することが慢性放射線障害の回復や進行予防の根本的治療となる可能性があるという重要な臨床的示唆を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

本研究は、放射線照射による皮膚創傷治癒障害の動物実験モデルを作成し、放射線照射後 1 から 12 ヶ月まで時間経過により群を分け、整理機能的評価として酸素飽和度測定、組織学的評価として表皮・真皮・脂肪層の厚さ、血管内皮細胞数、幹細胞数の計測、創傷治癒能の評価として、皮膚潰瘍の上皮化速度の計測、生じた瘢痕組織量の計測を行い、急性から晩期にわたる皮膚創傷治癒障害の病態を比較検討した。

創傷治癒能、組織酸素飽和度は急性の影響が鎮静化して晩期の影響がまだ始まってない3か月でもっとも良好でありは6か月後に低下し、その傾向は9か月をピークに悪化しており、またこの現象はASCsの減少と創傷治癒能の低下には相関性があると考えられることを示した。これらは、これまでの研究でその可能性が示唆されていたが、本研究で経時的に連続するモデルを比較検討することで、放射線照射後の時間変化をより明確に示すことができた。

結論として、limitationはあるものの、ASCsを補充することが慢性放射線障害の回復や進行予防の可能性があるという臨床的な示唆を与えるものである。

最終試験の結果の要旨

審査では、研究目的の記述法、実験モデル作成法の根拠、放射線障害の定義、統計解析の手法、データの記述方法などでいくつかの指摘が挙げられたが、適切に回答、修正され、Limitationにおいても今後の研究課題が示された。臨床応用の際に寄与する研究内容と結果と思われた。最終版では全員一致で合格の判定に至った。