

東海大学大学院令和 5 年度博士論文

放射線全身照射（TBI）が骨格筋に与える影響：筋肥大能力の低下率と筋内幹細胞/前駆細胞増殖・分化能の定量的解析

福澤 毅

この学位申請論文は、Journal of clinical medicine. 2022, 11, 3735 に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・ Journal of clinical medicine. 2022, 11, 3735 に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

I 総括

【背景・緒言】

放射線治療は手術、薬物療法（化学療法）と並ぶがん治療の 3 大治療の一つであり、局所治療による根治治療から緩和治療まで広く用いられ、生体の形態や機能を温存できるのが特徴である。リニアック（直線加速装置）により高エネルギー X 線を発生させ、患部へ照射、DNA 損傷を起こすことで細胞死を引き起こす。放射線治療はがん細胞と正常組織の感受性・反応性の差を利用して行う治療であり、DNA 損傷は正常組織にも発生し有害事象として現れる。一般的に正常組織の耐容線量内で治療を行うため、有害事象は重篤になることは少ない。しかし、この有害事象は治療部位、方法により異なるため、有害事象を熟知し、最小限に押さえる放射線治療を行っていくことが重要である。

放射線（高エネルギー X 線）全身照射（Total Body Irradiation:TBI）は、白血病、悪性リンパ腫やその他多

くの血液悪性疾患の基本治療である骨髄移植(Bone Marrow Transplantation :BMT)の前処置として用いられる処方であり、放射線によるDNA損傷で骨髄造血幹細胞の細胞死を引き起こすことによる抗腫瘍効果を目的として行われる。また、骨髄環境に対する強力な免疫抑制、造血機能抑制で、移植細胞の生着を促進する効果も担っている。しかし、放射線TBIは脳、肺、卵巣、腎臓、水晶体、精巣など、その他の重要臓器へも影響を及ぼし、肺炎、内分泌障害、白内障、不妊、腎機能障害などの晩期有害事象を起こすことも知られている。肺や水晶体などは鉛ブロックを用いて遮蔽することが工夫されている。しかし、骨格筋は運動系として骨周囲に接着・密着しているために、遮蔽することは不可能である。他方、骨格筋は生体の中でも、生後の卓越した肥大・再生能力を有する臓器として知られている。しかし、骨格筋の持つこれらの可塑性に対するTBIの影響に関しては、現状、ほとんど報告されていない。関連事項として例えば、小児期にTBIを受けた患児は低身長などの成長障害が起こることが知られており、筋・骨格系への障害と成長ホルモン分泌障害が原因と考えられているが、いずれも定量的な解析は行われていない。

そこで、本研究では骨格筋の肥大能力をほぼ100%引き出すことが可能な「代償性筋肥大モデル」を用いて、TBIマウスと正常マウス(対照群)とを比較するこ

とで「骨格筋の肥大能力の定量化」を行った。同様に、骨格筋の肥大・再生能を担う筋内の幹細胞/前駆細胞群、即ち、サテライト細胞や骨格筋間質由来幹細胞群、及びその他の間質由来細胞群を分離・抽出し、その増殖・分化能を培養系にて定量化した。

【方法】

正常 BL-6 マウスに 3 段階強度の単回照射 TBI(9.0Gy 群, 5.0Gy 群, 2.5Gy 群)を行い、GFP-Tg マウスより採取した骨髓造血幹細胞を尾静脈より注入、移植した (1×10^6 cell/mouse)。移植 5 週間後、末梢血におけるその生着率(キメリズム)を FACS にて測定、各生体が実際に受けた TBI の影響として評価・定量化した。その後各群に、骨格筋の肥大能力をほぼ 100% 引き出す「代償性筋肥大モデル」を各々右後肢足底筋に施術し(各個体反対側左足底筋がコントロール)、5 週後、正常マウス(対照群)と比較、筋肥大能に対する TBI の影響を評価・定量化した。さらに、骨格筋の肥大、再生能を担う筋内の幹細胞/前駆細胞群、即ち、サテライト細胞や骨格筋間質由来幹細胞群 Sk-DN 細胞(CD34-/45-/29+)、Sk-34 細胞(CD34+/45-)、及びその他の間質由来細胞群を各群骨格筋より酵素処理(コラゲナーゼ Type-I)により分離・抽出し、FACS にて分画、各分画細胞群を同一条件で培養し、その増殖・分化能を、サイトスピン法を用いて定量化した。

【結果及び考察】

骨髄移植(BMT)5週間後の末血における平均 GFP 生着率（キメリズム）は 9.0Gy 群 $96\% \pm 0.8\%$ 、5.0Gy 群 $83\% \pm 3.9\%$ 、2.5Gy 群 $8.4\% \pm 3.4\%$ を示し、特に 2.5Gy 群は非常に低く、TBI/BMT が無効と判断された。逆に骨格筋肥大能力は 9.0Gy 群で $5.3 \pm 5.1\%$ （95% 減）、5.0Gy 群でも $51.5\% \pm 2.6\%$ （48% 減）、さらに 2.5Gy 群でさえ $74.1\% \pm 8.3\%$ （36% 減）と有意に低下していた。これらは、骨格筋が骨髄より TBI による影響を受けやすい器官であることを示していた。

さらに培養系による細胞増殖・分化能を評価する際、酵素処理により抽出される総細胞数は、3 照射群で一律有意に低下（1/3 以下）していた。これは骨格筋内の単核細胞群が全体として影響を受けた（総細胞数低下）ことを示している。加えて、抽出された細胞群(Bulk 細胞群)を Sk-DN と Sk-34、その他の細胞群(other cells)に分画してカウントすると、やはり一律に照射の影響を受け、細胞数の減少が観察された。また、全細胞数に対する減少率は照射強度と関係なく、3 群でほぼ一定であった。しかし、低線量ほど other type cells の増加を認め、2.5Gy では有意に増加していた。

筋細胞への分化する能力として Pax7（サテライト細胞マーカー）、MyoD（筋芽細胞マーカー）を発現する細胞数を確認した結果、対照群と比較し TBI 3 群では有

意に低下しており、「筋芽細胞への分化能低下」を示していた。その一方で PCNA（細胞増殖マーカー）陽性細胞は対照群と TBI 3 群の間で有意な変化は認めず、筋芽細胞、サテライト細胞以外の細胞が PCNA 陽性（増殖期細胞）の増加に貢献していると推測された。この点を明らかにするために筋芽細胞系、線維芽細胞系、末梢神経系、血管系細胞への分化マーカー mRNA 発現量を RT-PCR 解析で確認したところ、筋芽細胞系マーカーは線量依存性に低下し、逆に線維芽細胞系マーカーは線量依存性に増加していた。このことから線維芽細胞の集団が PCNA 陽性細胞数の増加を引き起こし、「線量依存性に骨格筋組織の繊維化」を促進する可能性を示唆していた。

さらに、上記同様の解析を Sk-DN、Sk-34 細胞分画内で検討した。全 Sk-DN 筋細中の Pax7 及び MyoD 陽性率は、TBI 3 群の全てで照射強度依存性に有意に低下していた。しかし、Sk-34 細胞群では Pax7、MyoD 陽性細胞の低下は認められず TBI の影響が低いと考えられた。この結果に対して、本来 Sk-DN、Sk-34 細胞群は骨格筋間質存在している。しかし、今回骨格筋内に存在する全ての単核細胞を抽出したため Sk-DN 細胞群にはサテライト細胞が多く含まれており、Pax7、MyoD 陽性細胞数に影響を与えている。サテライト細胞は筋線維の細胞膜と基底膜の間に存在していることから、SK-DN、

Sk-34 細胞群では存在場所が異なる。この点を考慮して、サテライト細胞が照射の影響を受け Sk-DN 細胞群における Pax7, MyoD 陽性細胞数減少を助長したとも考えられる。このことは、同じ間質に存在する Sk-34 細胞群が照射の影響を受けなかったことから裏付けられる。即ち、細胞の局在部位の違いが放射線抵抗性に関連している可能性が示唆された。従って、照射後に残された筋肥大能に（特に、5.0Gy、9.0Gy 群）Sk-DN, Sk-34 細胞群が主に関与している可能性が高いと考えられる。

加えて、これまでの本グループの研究成果から、日常生活や通常の運動、さらには筋力トレーニングにおいても、骨格筋の持つ最大能力の 30% 以下程度しか使用していないことがわかっている。今回、5.0GyTBI では筋肥大能減少は 50% 近くでとどまっており、日常生活に必要な筋肥大能力としては十分に「許容範囲内」であると考えられた。

【結論】

5.0GyTBI の筋肥大能減少は日常生活では許容範囲と考えられ、通常の運動、筋力トレーニングには支障がないと言える。近年、副作用を軽減するために、実験的評価あるいは臨床において「分割照射」が行われている。本研究では分割照射法を用いるまでには至っていないが、本研究結果に基づき 2.5-3.0Gy×3 回の分割照

射が骨格筋へ与える影響を探究すべきであると考えている。

II 研究の背景

放射線治療は手術、薬物療法（化学療法）と並ぶがん治療の3大治療の一つであり、局所治療による根治治療から緩和治療まで広く用いられ、生体の形態や機能を温存できるのが特徴である。リニアック（直線加速装置）により高エネルギーX線を発生させ、患部へ照射、DNA損傷を起こすことで細胞死を引き起こす。放射線治療はがん細胞と正常組織の感受性・反応性の差を利用して行う治療であり、DNA損傷は正常組織にも発生し有害事象として現れる。一般的に正常組織の耐容線量内で治療を行うため、有害事象は重篤になることは少ない。しかし、この有害事象は治療部位、方法により異なるため、有害事象を熟知し、最小限に押さえる放射線治療を行っていくことが重要である。

全身照射（Total Body Irradiation: TBI）は白血病、悪性リンパ腫や多くの血液悪性疾患の骨髄移植（Bone Marrow Transplantation: BMT）の前処置として不可欠かつ確立された治療法である。TBIは放射線（高エネルギーX線）によるDNA損傷により増殖性の幹細胞/前駆細胞の細胞死を引き起こすことで、骨髄細胞の増殖停止能を発揮しドナー由来の細胞の生着を促進する。即ち、放射線TBI主たる目的は骨髄照射による免疫抑制であるが、その他の重要臓器；脳、肺、卵巣、腎臓、水晶体、精巣などへも影響を及ぼし、肺炎、内分泌障害、白内障、不妊、腎機能障害などの晩期有害事象を起こすこ

とでも知られている。肺や水晶体などは鉛ブロックを用いて遮蔽が工夫されている。しかし、上記以外の臓器を遮蔽することは基本困難である。さらに別の観点から見ると、骨格筋は筋骨格系・運動系として骨周囲に存在・接着しているため、遮蔽することはまず不可能である。筋骨格系の特徴として、生後においても卓越した肥大・再生能力を有する臓器であることが知られている。即ち、トレーニング等により定期的な過負荷を加えることで大きく肥大（陽性適応）し、逆にギブス固定やベッドレスト等で著しく萎縮する（陰性適応）。この能力はサテライト細胞や骨格筋由来幹細胞、末梢神経系（シュワン細胞、神経周囲細胞）、血管系細胞群（血管平滑筋、血管内皮細胞、周皮細胞）等、多くの幹細胞/前駆細胞のサポートが必要であることが示されている。そのため骨格筋の幹細胞/前駆細胞が TBI の影響を受けるのは明らかである。しかし、これら骨格筋可塑性へ TBI が与える影響に関してはほとんど報告されていない。

本研究の概要と実験の流れを(Figure1)に示した。TBI 単回照射；9.0Gy、5.0Gy、2.5Gy を行い、骨髄移植を施行、その抹血における生着率から各個体が実際に受けた線量指標を決定した。加えて、骨格筋の肥大能力をほぼ 100%引き出すことが可能な「代償性筋肥大モデル」を用いて、TBI マウスと正常マウス（対照群）を比較することで「骨格筋肥大能力の定量化（減少率決定）」

を行った。さらに骨格筋内の幹細胞/前駆細胞の増殖能と分化能を、サテライト細胞や間質由来幹細胞群より分離した Sk-34 細胞 (CD34+/45-)、Sk-DN 細胞 (CD34-/45-/29+) との比較定量化を行った。

V. 考察

本研究では 3 段階の TBI 強度による骨髄と骨格筋への影響を、組織・細胞レベルで比較検討し、定量化した。最初に致死線量と考えられている 9.0Gy に注目すると、抹血単核細胞が平均 96% ドナー GFP 陽性細胞に置き換わっていた (キメリズム) ことから、骨髄内の幹細胞/前駆細胞の増殖能力はほぼ消失し BMT が達成されたと考えられる。また、骨格筋肥大能力も 97-98% 消失し、体重増加抑制 (Figure 3) と正常 TA 筋重量 (Table 1) の増加抑制も認められたことから、「成長抑制」が確実に起こると判断され、9.0Gy の生体への影響の強さが再確認された。

次ぎに 2.5Gy に注目すると、抹血のキメリズム (8% 前後) から骨髄への影響はほとんど無いと考えられる。しかし、筋肥大能力は有意に低下 (>25% ; Figure3) していたことから、骨髄と骨格筋に対する TBI の影響は異なり、骨格筋の方がより感受性が高いと考えられる。

同様に 5.0Gy に注目すると、抹血のキメリズムが約 83% で BMT がほぼ成立する値であることから、骨髄への影響はかなり高く、9.0Gy と 2.5Gy の中間値という

よりむしろ 9.0Gy に近いと判断できる。したがって、骨髄に関しては 2.5～5.0Gy の中間に BMT 成立の閾値があると考えられる。一方、5.0Gy 時の筋肥大率の低下は約 50% であり、他の 2 点との関係から TBI 線量との逆相関関係がより強いと考えられる。

さらに骨格筋肥大能力の低下に伴い、骨格筋から抽出される総単離細胞数（マウス 1 匹あたり）も有意に低下していた (Figure 4A)。しかし、全細胞数と 3 つの細胞グループ (Sk-DN、Sk-34、Other cells) には TBI 線量依存性は見られず、照射群一律に有意な低下が認められた (Figure 4A-D)。しかし、Sk-DN、Sk-34 細胞の分布比率そのもの (総細胞数に対する割合) は、TBI の影響を受けないことから、低線量であっても総細胞数は低下し、その低下に伴って Sk-DN、Sk-34 細胞数も低下すると判断される。したがって、一見、各群の「総細胞数の低下」自体は筋肥大率に直接関係しないとも考えられる。しかし、Bulk 細胞及び Sk-DN 細胞群に含まれる骨格筋芽細胞 (Pax7, MyoD 陽性細胞、Figure 5C,D と 7A,B) に注目すると、肥大率同様の TBI 線量依存性の低下が認められることから、骨格筋芽細胞が筋肥大を支えていると考えられる。興味深いことは、骨格筋芽細胞分布が Sk-DN に集中していること、即ち Sk-34 細胞群の骨格筋芽細胞分布比率は、Sk-DN 細胞群に比べて圧倒的に低い、TBI の影響はほとんど受けていないことである。一見、Figure 7 から「Sk-34 細胞群に残留して

いる筋芽細胞数は少ない」という印象を受けるが、実際には Sk-34 細胞群は間質由来幹細胞群の主たる細胞群で Sk-DN 細胞群の 5-10 倍数存在している (Figure 4) ことから、照射後の筋肥大能への貢献度には期待が持てる。

さらに特筆すべきは、上記骨格筋芽細胞系細胞群の減少に対して Other cell type ではむしろ増加傾向が示された点である。特に 2.5Gy 群では有意な増加が認められた (v.s. CON 群; Figure 4G)。同様の増加傾向が PCNA 陽性細胞でも認められたこと (Figure 5)、及び mRNA 解析で Bulk 細胞系における線維芽細胞系マーカーの発現増加が認められた点 (Figure 6) を総合すると、骨格筋内の線維芽細胞増加と繊維化が進行したもとと考えられる。

この点に関して臨床では、放射線治療における晩期障害の主因である繊維化が、肺、腎、皮膚等で報告されている。さらに、放射線照射後の組織の繊維化は各種の動物モデルにおいても有害事象として確認されている。本研究の結果はこれらの報告と一致し、組織の繊維化は TBI の典型的 side-effect であることを提示している。

上述のごとく「照射により骨格筋肥大能は低下し、肥大能を支える筋芽細胞系細胞数も低下する」ことが明らかとなった。しかし本研究でもう一つ考慮すべき点は、「サテライト細胞と Sk-DN, Sk-34 細胞群の関係」

であろう。本研究では、放射線照射の影響を骨格筋内全ての単核球細胞を対照・分析するために、コラゲナーゼ処理（細胞抽出）を行うまえに筋を細断した。そのため Bulk 細胞群には既知の学術的に確立された筋芽前駆細胞であるサテライト細胞と、その他の筋間質由来幹細胞/前駆細胞群等全て細胞が含まれている。そして、この間質由来幹細胞群もまた筋芽細胞になり得る細胞を含んでいるため、どの分画の筋芽細胞群が主に TBI の影響を受けたのかは非常に興味深い。この点に関して、Bulk 細胞群と Sk-DN 細胞の筋芽細胞比率は有意に低下するが Sk-34 細胞群はほとんど TBI の影響を受けていない (Figure 5, 7)。さらに、サテライト細胞は筋細胞の基底膜と細胞膜の間に存在しているが、Sk-34 細胞は確実に筋間質に存在している。この 2 点から、両細胞局在として「筋間質のコラーゲンネットワーク内は、筋細胞基底膜内より放射線照射の影響を受けにくい」ことが示唆される。

加えて、われわれの先行研究においてサテライト細胞は CD34(-)を示すこと、Sk-DN 細胞群に僅かに Pax7 陽性細胞（サテライト細胞マーカー）が含まれるのみということを明らかにしている。即ち Sk-34 細胞と Sk-DN 細胞は、元々サテライト細胞がほとんど含まれない方法で単離された細胞群から分画された細胞群である。したがって、Sk-DN 細胞群もそのほとんどが本来間質スペースに存在していることを考慮する必要がある。

したがって、本研究でもサテライト細胞は、Sk-DN 細胞群に含まれることになる。

例えば、2.5Gy 群における「筋肥大能の低下、筋芽細胞数の低下」が、主にサテライト細胞に対する照射の影響（機能低下、数の低下）と考えることも出来る。加えて、放射線照射によるサテライト細胞の枯渇が先行研究で既に報告されている。上記の裏返しとして、2.5Gy, 5.0Gy 群に保持されている「筋肥大能」は Sk-DN,Sk-34 細胞群内に残留した筋芽細胞が補償しているとも考えられる。

いずれにせよ、本研究で TBI が筋肥大能を低減させることは明らかとなった。臨床において TBI に伴う骨格筋への副作用は患者の生涯にわたる QOL にかかわる重要な点である。そこでこの肥大能低下が実生活レベルでどのように QOL とかかわるかをこれまでの動物実験の結果から推測してみた。例えば、随意的に最大度努力の筋力トレーニング（ラットスクワット・トレーニングモデル）を行わせ、主働筋の単位時間あたりのアミノ酸取り込み量を [^{14}C]leucin を使用し、骨格筋の蛋白合成量（能力）として評価すると、安静時を基準として 2-4 日後に 3.3-3.5 倍の取り込み増加を認めた。同様に、このモデルに対して、蛋白同化ステロイド（Anabolic Androgenic Steroid: AAS）を投与すると、[^{14}C]leucin の取り込みは安静時の 5 倍へと跳ね上がり蛋白合成能の促進が観察された。さらに、同様の方法

で今回の「代償性筋肥大モデル」の $[^{14}\text{C}]$ leucin 取り込みを測定すると、3-5 日後に 10 倍近くの蛋白合成促進が認められた。しかし、この 10 倍促進は、AAS 投与でさらに促進されることはなかった。即ち、本研究で用いた代償性筋肥大モデルは、骨格筋が有する生理学的最大値蛋白合成能を引き出すモデルであると考えることが出来る。したがって、この値を 100% として、スクワットモデルの値を評価すると、生理学的条件下で最大限に努力した筋力トレーニングで最大値の約 30% となる。つまり、我々の日常生活や通常の運動、トレーニングでは筋最大肥大能力の 30% 以下程度しか使用していないと仮説を立てることができる。即ち、TBI5.0Gy 群では約 50% の筋肥大能が保持されていることから、日常生活に必要な筋肥大能力は保持されていると判断できる。さらに、筋肥大能は筋再生能と密接にリンクしていることから 5.0Gy 群の 50% 減は許容範囲であると考えられる。

同様の TBI 副作用は他の臓器や組織にも起きており、これらを軽減するために分割照射が臨床や動物実験で応用・検証されている。本研究では分割照射法を検討するには至っていないが、この本研究結果に基づき 2.5-3.0Gy x 3 回などの分割照射での TBI が骨格筋へ与える影響を探究すべきであると考えている。

実際、臨床においてはトモセラピーや強度変調回転

放射線治療 (Volumetric Modulated Arc Therapy: VMAT) を用いることで、標的を骨髄に絞った全骨髄照射 (Total marrow Irradiation: TMI) が行われる等、有害事象の軽減が試みられている。

最後に本研究においては、「筋肥大の抑制」は認められたが、「TBI に依存した筋萎縮」そのものは認められなかった。したがって、E3 ユビキチンリガーゼである MuRF1 や MAFbx/atrogen-1 等、骨格筋萎縮のパラメーターの解析は行っていない。しかし、ユビキチンリガーゼと放射線の関係も重要な課題と考えられるため、今後骨格筋への直接照射における長期的な影響として、その関連を解析する予定である。

VI. 結語

TBI に対する感受性は骨髄よりも骨格筋の方が大きい。9Gy の様な致死的強度では両者に差が出ないが、比較的低線量 (5Gy, 2.5Gy) になると骨格筋の方で影響 (肥大能低下、含有幹細胞数の低下) が大きくなる。しかし、これらの影響は日常生活上の QOL を大きく左右するほどではない。したがって、今後、低線量による分画照射の検討が重要となる。