

放射線療法後の皮膚障害ケアに関する基礎的検討

独立行政法人放射線医学総合研究所重粒子医科学センター 先端粒子線生物研究プログラム

中山 文明

The influence of radiation therapy on skin barrier functions remains unknown. In this study, skin barrier-associated proteins were examined after irradiation. As a result, skin moisture and the expression of skin barrier-associated protein loricrin were decreased after irradiation at a relatively low dose, whereas filaggrin proteins increased in skin after irradiation. These findings suggest that decreased loricrin proteins play an important role in the pathogenesis of radiation skin injuries.

1. 緒言

重粒子線治療などの新しい放射線療法や、IVRを使った血管内治療など、医療現場における放射線の利用がますます盛んになっている。今日では病巣へ放射線を集中させる技術が発達し、正常組織への影響は少なくなっており、皮膚潰瘍などの重篤な皮膚障害も極めて稀である。しかしながら、脱毛や乾性落屑などの比較的軽度な放射線皮膚障害は依然として発生し、美容的な問題として患者に大きな負担となっている。また、放射線皮膚障害の病態は十分に解明されておらず、有効な治療法も確立していない。一方、これらの研究に必要な放射線皮膚障害の評価方法も存在しなかった。そこで、我々は、放射線脱毛における毛包障害を検討し、化学療法による毛包障害と同様の組織学的なパラメーターを使って評価できることを明らかにし、放射線毛包障害の評価方法を確立した¹⁾。

皮膚バリア機能に関係する構造として、cornified cell envelopeは角質細胞の細胞膜を裏打ちし、loricrinやinvolucrinなどで構成されている。filaggrinもその構成蛋白質の一つだが、表皮の顆粒層でprofilaggrinとして生合成された後、脱リン酸化や限定加水分解によりfilaggrinとなり、さらに分解されて天然保湿因子となる。最近、filaggrin異常と尋常性魚鱗癬²⁾やアトピー性皮膚炎³⁾の病因との関連性が明らかになった。一方、放射線皮膚障害においても皮膚の乾燥傾向が顕著だが、放射線と皮膚バリア機能の関係は未だ不明である。

本研究では、放射線毛包障害の評価に基づき、マウスモデルの照射線量を検討する。そのモデルを用いて皮膚バリア機能に対する放射線による影響を組織・分子レベルで解析す

る。そして、放射線療法後の皮膚障害に有効な治療法や新たなスキンケア製品の開発に有用な動物モデル指標を見出す。

2. 実験

2.1 各毛周期における放射線脱毛の線量の検討

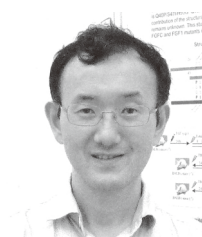
7週齢のオスBALB/cマウスを日本クレアより購入しSPFで飼育した。7週齢マウスの毛はすべて休止期(Telogen)であるが、抜毛によりすべて成長期(Anagen)に同調・誘導できる。そこで背部より抜毛後6日目、毛包がAnagenVIの毛包周期になった時に、セシウム線源(Gammacell 40, Atomic Energy of Canada, Ottawa, Canada)を使ってガンマ線を全身照射した。照射方法は、マウスを無麻酔でプレキシガラスの円形容器に入れ、0.57Gy/分の線量率で4~12Gyを1回照射した。抜毛後14日まで背部皮膚を観察し、発毛を認める線量を決定した。

2.2 放射線毛包変性の組織学的検討

マウスは皮膚を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作成し、HE染色を行った。そして、以前報告した¹⁾放射線毛包障害の評価方法に基づき、これらの組織標本から各放射線障害パラメーターを測定した。すなわち、表1は、化学療法による変性毛包の分類⁴⁾を参考に、AnagenVIの毛包に12Gyを照射し、3.5日までの経時的な毛包変性に対して、その特徴を明らかにしたものである¹⁾。特に、(1)毛包のdermal papillaとbulbの直径比、(2)bulbの直径、(3)毛包の長さの比較が変性毛包の評価に有用であった。すなわち、初期変性成長期(early dystrophic anagen)では、bulb径がわずかに縮小する程度で、他に変化は認められなかった。中期変性退行期(mid dystrophic catagen)では、bulb径がさらに縮小する一方、DP/bulb比と毛包の長さが増大した。晩期変性退行期(late dystrophic catagen)では、DP/bulb比がさらに増加するが、毛包の長さは急速に短縮した。

2.3 皮膚水分率の測定

マウス背部より抜毛6日後、毛周期が成長期となった背



Basic Study of Skin Injury Care after Radiotherapy

Fumiaki Nakayama

Advanced Radiation Biology Research Program, Research Center for Charged Particle Therapy, National Institute of Radiological Sciences

部皮膚に対して、6 Gyのガンマ線全身照射を行い、肌湿度計 (SR-101、ロゼスター) で4点3回ずつ24時間おきに4日間測定し、皮膚水分率の平均値を算出した。なお、実験中のマウスの飼育環境は室温22.9～23.0℃、湿度50～51%と一定であった。

2.4 皮膚バリア機能関連蛋白の免疫組織化学染色

マウス背部より抜毛6日後、6 Gyのガンマ線全身照射を行い、照射後3日の皮膚を採取した。採取した皮膚は10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作成し、HE染色を行った。さらに、パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、2%過酸化水素/メタノール溶液に室温で30分反応させて内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックさせた後、0.01 Mクエン酸に浸して120℃ 15分のオートクレーブで抗原賦活処理を行った。組織中のマウスIgGをVECTOR M.O.M. immunodetection kitを用いてブロックした後、抗loricrin抗体 (PRB-145P、Covance) を反応させ、抗ウサギIgG-biotin抗体を2次抗体として反応させた後、VECTASTAIN Elite ABCキット (Vector Laboratories) を使ってDABで発色させた。一方、抗filaggrin抗体 (PRB-417P、Covance) による免疫組織化学染色では、コンパウンドで包埋した皮膚凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで固定し、上記と同様に染色した。

2.5 Western Blotting

マウス背部より抜毛6日後、12Gyのガンマ線全身照射を行い、照射24、48、84時間後に皮膚を採取し液体窒素にて凍結した。約5 mm³の凍結皮膚組織片をBioMasher III (Nippi, Tokyo, Japan) で電動攪拌機 (Nippi) を用いてホモジナイズし、100 µlのlysisバッファーに溶解させた。そのlysateをBio-Rad Protein Assay (BioRad) で蛋白定量し、30 µgの皮膚lysateをミニプロテインTGXゲル (any KD、BioRad) で1次元蛋白質電気泳動を行った。PVDF膜に転写後、5%スキムミルクでブロッキングし、抗filaggrin抗体、抗loricrin抗体及び抗β-actin抗体 (4967、Cell Signaling) を反応させ、2次抗体として抗ウサギIgG-HRP (NA934、GE Healthcare) を反応させた。最後にECL select Western Blotting Detection System (GE Healthcare) で発光させ、LAS-4000 mini (Fujifilm) で検出した。

3. 結果

3.1 成長期における6 Gy照射後の発毛障害

抜毛により誘導された成長期の毛包は、抜毛後6日目にはAnagenVIとなっている。この成長期毛包に4、6、8 Gyのガンマ線照射を行い8日後の発毛を観察した (図1)。その結果、非照射マウスでは著明な発毛が観察され、4 Gy照射マウスでも非照射群と比べて短いながらも発毛が

表1 放射線毛包障害のパラメーターと毛包変性の分類

Time after radiation exposure	0 h	8 h	16 h	24 h	48 h	84 h
Bulb diameter		↓	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓
Follicle length		→	→	↑	↑	↓ ↓
DP / bulb diameter ratio		→	→	→	↑	↑ ↑
Shape of DP	narrow	narrow	narrow	thinner	thin or round	round or ball-shaped border between dermis and subcutis
Position of DP	subcutis	subcutis	subcutis	subcutis	subcutis	
TUNEL ⁺ cells in the bulb	—	15-25%	10-20%	10-20%		
Act-Caspa3 ⁺ cells in the bulb	—	+	±	±		
Apoptotic fragments in the bulb	—	++	+	+	—	—
Remnant of hair shaft in the proximal hair canal		+	+	+	+	+
Follicular distortion	—	+	+	+	+	+
Widened distal hair canal	—	—	±	+	+	++
Club hair	—	—	—	—	+	+
Epithelial Constriction between germ capsule and DP	—	—	—	—	+	+
Epithelial strand longer than DP diameter	—	—	—	—	—	+
Trailing CTS	—	—	—	—	—	+
Subcutaneous fat tissues		→	→	→	↓	↓ ↓
Speculated stage	Anagen VI	Early dystrophic catagen			Mid dystrophic catagen	Late dystrophic catagen

認められた。一方、6 Gyと8 Gyの照射では発毛が認められず、その背部皮膚に多数のしわを認め、点状の紫斑が散発していた。

3.2 成長期毛包に対する放射線照射後の障害パラメーターの変化

今回、抜毛後6日目のAnagenVIの毛包に対して4～12 Gyのガンマ線照射し、照射後8日(抜毛後14日)まで観察し、その背部皮膚組織標本を、表1の毛包変性のパラメーターに基づき解析した。その結果、

- (1) DP/bulb比は1日目には非照射では減少するのに対して、4～12 Gyのすべて照射群では線量依存性に増加した。3日目には10～12 Gyではさらに増加したのに対して、4～8 Gyでは減少に転じ、4 Gyと6 Gyは8日目には0 Gyと同じ値になった。
 - (2) bulb径は1日目には0 Gyでは不変だったのに対して、4～12 Gyのすべての照射群ではほぼ同程度に低下した。3日目には10～12 Gyではさらに減少したが、4～8 Gyでは3日目には横ばいとなった。そして、4 Gyと6 Gyでは8日目には増加に転じ、4 Gyの群は0 Gyと同じ値になった。8 Gy照射群は、8日目でも横ばいであった。
 - (3) 毛包の長さは、3日目には10 Gyと12 Gy群は減少した。4 Gyと6 Gy群は増加してゆき、8日目には0 Gyの長さと同じになった。
- 3つのパラメーターは、4～8 Gy照射群は0 Gy群と10～12 Gy照射群の中間の値を取る傾向にあった。4 Gy照射群では8日目までに3つのパラメーターすべてが0 Gy群と同じになり、4 Gy群で発毛を認めていることは、パ

ラメーターの数値と矛盾しなかった。3日目の変性毛包の状態は、表1の3つのパラメーターに基づいて判定すると、10～12 Gyは晩期変性退行期、6～8 Gyは中期変性退行期、4 Gyは初期変性退行期と同程度の数値だった(図2)。

3.3 照射後の皮膚水分量低下

6 Gy照射後の皮膚にしわが発生していることから、皮膚水分量の低下が疑われた。そこで、抜毛後6日目のAnagenVIの毛包に対して、6 Gyのガンマ線を照射し、照射後4日目まで、24時間ごとに皮膚水分率を測定した。その結果、皮膚水分率はガンマ線6 Gy照射後3日までは不変であったが、4日目に有意に低下した(図3)。

3.4 照射後のバリア機能関連蛋白質の皮膚における発現変化

6 Gy照射3日後の皮膚に対するHE染色では、表皮構造に大きな変化を認めなかった。しかしながら、loricrinは非照射皮膚では表皮顆粒層付近に局限して強発現していたが、照射によりその発現が著明に減少し、ほぼ消褪していた。一方、皮膚バリア機能関連蛋白質であるfilaggrinは、非照射皮膚では表皮顆粒層付近に局限して発現していたものが、照射によりその発現が基底層と有棘層、および角層の一部に及び、filaggrinの発現部位が著しく拡大していた(図4)。

3.5 照射後のバリア機能関連蛋白質発現の経時的変化

マウスに12 Gy照射し、経時的にサンプリングを行いwestern blottingで検討した。その結果、profilaggrin及びその中間体は48時間まで減少していったが、84時間で増

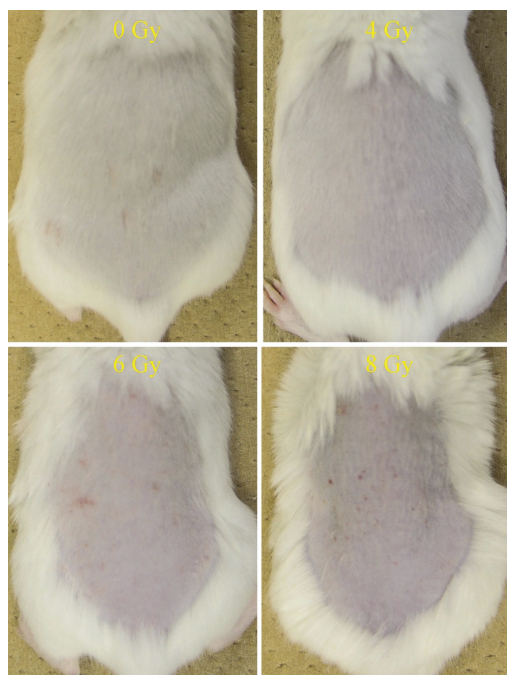


図1 成長期毛包の放射線障害

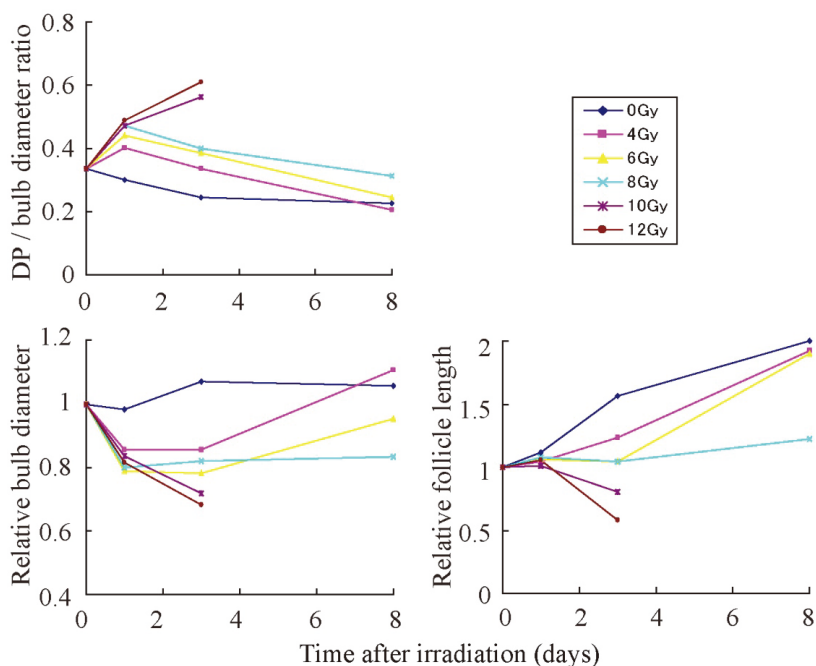


図2 成長期毛包の放射線障害指標の推移

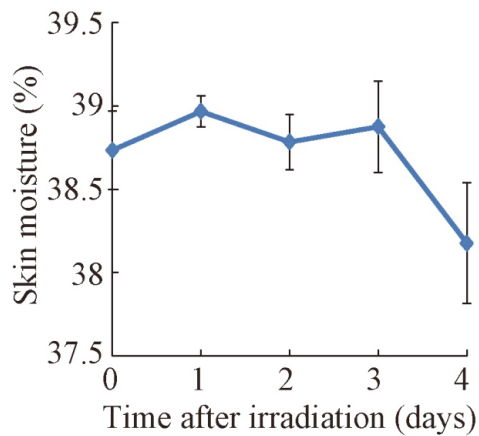


図3 照射後皮膚水分量の減少

加に転じていた。一方、filaggrinの発現量は48時間で軽度増加し、84時間でむしろ著明に増加していた。保湿成分になるfilaggrin分解産物も照射後徐々に増加していった。loricrinの発現はwestern blottingでも非照射では強発現しているのが示されたが、照射後24時間でも明らかな減少を認め、その後も経時的に減少を続け、今回検討した84時間では著減していた(図5)。

4. 考 察

本研究のマウスモデルでは、毛包成長期に対して4 Gyのガンマ線照射では照射8日後で発毛が認められるが、6 Gy以上の線量では発毛を認めなかった。我々が提案した変性毛包の組織学的パラメーターに基づいて照射3日目の毛包を評価すると、4 Gyは初期変性退行期、6～8 Gyは

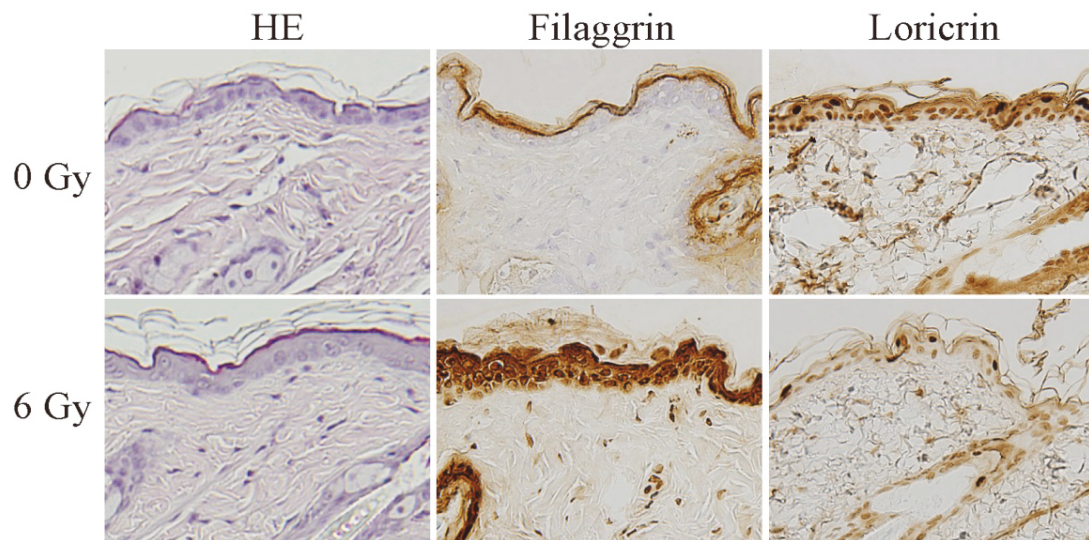


図4 照射後のバリア機能関連蛋白質の皮膚免疫組織化学染色

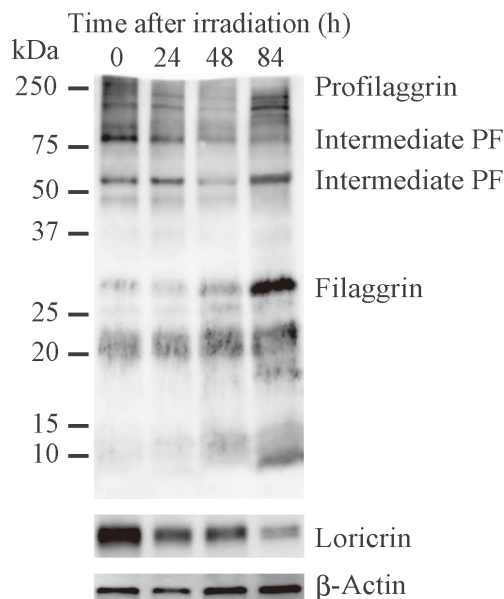


図5 照射後の皮膚バリア機能関連蛋白発現のwestern blot解析

中期変性退行期と分類され、6～8 Gy照射群の方が4 Gy群より後期の変性毛包であったが、10～12 Gy照射群の晩期変性退行期よりは早期の変性であった。この中期変性退行期を誘発する6 Gy以上の照射条件では、皮膚にしわも生じ皮膚の水分量の減少が示唆された。実際に皮膚水分率は、6 Gy照射後4日目より有意な減少が認められた。

皮膚バリア機能に関係するloricrinは、cornified cell envelope (CE) 構成蛋白質の一つで、表皮ではそれに由来する部分がCE成分の70%を占めるなど、主要成分となっている。しかしながら、loricrin欠損マウスでは、出生時には赤い半透明の光沢のある皮膚となるものの、他のCE成分が短期間にloricrinの機能を補うことにより、皮膚バリア機能低下の所見に乏しい⁵⁾。今回、放射線照射により、マウス表皮におけるloricrin蛋白の著明な減少が明らかになった。一方、filaggrinが増加している所見は、照射後4日目に認められた皮膚水分率の軽度低下が、loricrinの減少に由来することを示唆した。loricrin欠損マウスのwestern blottingでは、大きなfilaggrinの変化は認められていないと報告されているが、新たなprofilaggrinのバンドが検出されていることから⁵⁾、filaggrinもloricrin減少に補完的に作用している可能性がある。

ヒトの放射線皮膚障害では3～10 Gyで紅斑が生じ、8～12 Gyで乾性落屑と呼ばれる皮膚症状が生じる⁶⁾。一方、ヒトの脱毛は3 Gy以上で生じることから、今回マウスモデルで示した6 Gy照射による毛包障害と皮膚症状は、ヒトの紅斑と乾性落屑に相当する軽度の障害と考えられた。ヒトの紅斑は乾性落屑より軽い病態であり、今回のマウス皮膚モデルでは、明らかな発赤は認められなかったものの、皮膚水分率の低下とloricrin減少という皮膚バリア機能の低下が認められた。よって、皮膚バリア機能関連蛋白は、軽度の放射線皮膚障害でも変動し、その発症に関与している可能性が考えられた。

5. 総 括

軽度の放射線皮膚障害でも、皮膚バリア機能関連蛋白であるloricrinの著明な発現低下が認められ、皮膚水分量の低下に関与していることが示唆された。そして、皮膚バリア機能の変化は、放射線皮膚障害の潜在的な病因であることが示唆され、放射線皮膚障害に有効な治療法や新たなスキンケア製品の開発のための有用な指標となることが示された。

(引用文献)

- 1) Nakayama F, Hagiwara A, Kimura M, Akashi M, Imamura T: Evaluation of radiation-induced hair follicle apoptosis in mice and the preventive effects of fibroblast growth factor-1, *Exp Dermatol*, 18, 889-892, 2009.
- 2) Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WH: Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris, *Nat Genet*, 38, 337-342, 2006.
- 3) Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, *Nat Genet*, 38, 441-446, 2006.
- 4) Hendrix S, Handjiski B, Peters EM, Paus R: A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice, *J Invest Dermatol*, 125, 42-51, 2005.
- 5) Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC, Roop DR: Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein, *The Journal of cell biology*, 151, 389-400, 2000.
- 6) IAEA. Diagnosis and treatment of radiation injuries. In: Safety Reports Series No. 2. Vienna: The Agency; 1998. p. 10.