



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	固形腫瘍の再酸素化における一酸化窒素の役割とその生成機構 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	永根, 大幹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11282号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56312
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masaki_Nagane_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：永根 大幹

学位論文題名

固形腫瘍の再酸素化における一酸化窒素の役割とその生成機構

放射線は直接作用および間接作用によるフリーラジカル産生により、DNA やタンパク質などの生体高分子を傷害する。損傷分子はグルタチオンなどの還元酵素により速やかに修復されるが、酸素分子存在下では酸素分子と反応し、過酸化ラジカルが生成される。この過酸化ラジカルを生じた生体高分子は酵素的な修復が困難であるため、放射線による損傷が致命的な損傷として固定される。よって、放射線の細胞死誘導作用を目的とする放射線治療では、この酸素分子による損傷の固定は重要な因子である。しかし、固形腫瘍内では腫瘍細胞の急激な細胞分裂と不十分な血管新生により、酸素の需要と供給の不均衡を引き起こし、腫瘍内に低酸素領域を形成している。低酸素領域では酸素による増感作用が得られないため、治療処置後のがん細胞の生残率が上昇し、再発や転移の原因となる。よって、効果的な放射線治療を実現するためには低酸素領域を標的とした治療が必要となる。

この低酸素領域の放射線に対する応答として再酸素化現象が知られている。これは放射線誘導細胞死によって腫瘍塊全体の酸素要求量が減少することや、細胞死により生じた間隙への血管新生によって酸素供給が増加することにより、低酸素領域が減少することが原因であると考えられている。加えて近年、腫瘍内で閉塞している血管が放射線照射により一時的に再灌流することが再酸素化に関与していることが報告されている。この再酸素化により腫瘍内の放射線抵抗性領域が減少するため、現在の放射線治療プロトコルでは単回大線量照射ではなく、小線量に分割して照射する分割照射を基本としている。しかしながら、放射線照射後に起こる再酸素化とそれに関連した血流調節機構の詳細について完全には解明されていない。そこで本研究では、放射線照射後の急性期の再酸素化機構の解明および放射線感受性への影響を検討した。

第一章では生理的な血管拡張因子として知られる一酸化窒素（NO）に着目し、放射線が誘導する再酸素化への NO の関与を検討した。まず電子スピン共鳴法（ESR）を用いた酸素分圧測定により、マウス頭頸部扁平上皮がん株化細胞 SCCVII 移植腫瘍の組織酸素分圧は、X 線照射後 12 時間から 24 時間をピークとする急性期の再酸素化が観察され、さらに 48 時間以降に持続的に続く慢性期の再酸素化が観察された。腫瘍内における組織灌流量は X 線照射 24～48 時間で一過性に上昇した。この再酸素化に及ぼす NO の効果を検討するため、広域一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害剤 L-NAME を X 線照射の前後に投与したところ、急性期の再酸素化および組織灌流量の上昇が抑制されたのに対し、慢性期の再酸素化は抑制されなかった。加えて、

L-NAME を X 線照射前後に投与したマウスでは、頻回照射による抗腫瘍作用の抑制が観察された。以上から、放射線照射によって起こる再酸素化は二相性の様相を示しており、急性期の再酸素化は NO 依存的であること、また急性期の再酸素化が分割照射時の放射線感受性上昇の原因になっていることが明らかとなった。放射線照射後に生じる NO 産生の責任酵素を解明するため、mRNA、タンパク質発現量ならびに NOS 活性を測定したところ、放射線照射後には内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が活性化していることが明らかとなった。また、SCCVII 移植腫瘍内において eNOS は血管内皮細胞に局在していた。

第一章の結果から、放射線照射により腫瘍内血管の eNOS が活性化し、腫瘍内血流量が増加することが明らかとなった。加えて、組織灌流量の上昇に伴い、腫瘍内の低酸素領域が減少し、腫瘍の放射線感受性を増感していることが示唆された。血管内皮細胞において eNOS は、血管平滑筋の収縮を制御することで循環機能の調節を担っている。eNOS の制御機構はリン酸化酵素による翻訳後修飾に依存している。しかし、放射線がどのような経路によって eNOS を活性化しているのかについて、その制御機構は未だ不明である。eNOS の活性化に関与する Ser1179 残基は多種多様なリン酸化酵素の基質となることが知られている。一方、放射線は DNA 二本鎖切断の生成により、Ataxia telangiectasia mutated (ATM) キナーゼの活性化を起点とした広範なリン酸化シグナルカスケードを誘起する。この ATM の活性化は、DNA 損傷修復や細胞周期の停止など、様々な適応応答に関与していることが報告されている。以上の知見から、放射線によって ATM やその下流のリン酸化酵素の活性化が起これ、eNOS-Ser1179 のリン酸化に繋がっているのではないかという仮説が考えられた。また近年、核内に存在する Heat shock protein 90 (HSP90) が DNA 損傷応答において重要な役割を担っていることが明らかとなっている。そこで第二章では、放射線が引き起こす eNOS 活性化のメカニズムを明らかにする目的で、X線による eNOS-Ser1179 残基のリン酸化に対する HSP90/ATM 経路の関与を検討した。ウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) に X 線照射すると照射 3 時間～24 時間後において eNOS-Ser1179 残基のリン酸化が亢進した。加えて、NOS 活性試験により照射 12 時間～24 時間後において NOS 活性が上昇することが明らかとなった。DNA 損傷センサータンパク質である ATM 阻害剤 Ku-60019 は、放射線照射後の eNOS-Ser1179 リン酸化および活性化を阻害した。加えて、HSP90 阻害剤 geldanamycin は ATM のリン酸化を抑制し、eNOS-Ser1179 リン酸化および活性化を抑制した。以上から、放射線照射後に生じる eNOS リン酸化に対する DNA 損傷応答の関与が示唆された。

本研究では放射線照後の再酸素化機構に対する NO の関与、および NO 産生の責任酵素である eNOS の活性化機構を解明した。放射線照射は HSP90/ATM 経路を活性化し DNA 損傷応答を誘導することで腫瘍内血管の eNOS を活性化する。また、eNOS 活性化による NO 産生の増強により、腫瘍内の組織灌流量が増加し、低酸素領域を再酸素化することが明らかとなった。また、この再酸素化は分割照射における腫瘍の放射線感受性を増感することが示された。