



# 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/56312">https://hdl.handle.net/2115/56312</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Masaki_Nagane_review.pdf, 審査の要旨                                                                                           |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：永根大幹

|      |    |     |    |    |
|------|----|-----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授  | 稲波 | 修  |
|      | 副査 | 教授  | 木村 | 和弘 |
|      | 副査 | 准教授 | 高木 | 哲  |
|      | 副査 | 准教授 | 山盛 | 徹  |

## 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

固形がんの低酸素組織は放射線抵抗性であり、放射線療法において克服すべき重要な研究課題である。一般的な医療での放射線治療では1日に2 Gy 照射し、総線量 60～70 Gy となる様に照射する分割照射が用いられている。この方法では最初の照射によって好氣的腫瘍組織に優先的に致死を起し、生き残った低酸素組織の酸素濃度が時間と共に上昇し、次の放射線照射ではその治療効率が向上すると考えられており、照射の繰り返しにより治療効率の向上が期待されている。この照射後の低酸素組織における酸素濃度上昇を再酸素化と呼んでいる。この再酸素化の原因としては、照射により放射線感受性細胞が死ぬことで腫瘍塊全体の酸素要求量が減少することや、その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で、低酸素組織が時間とともに減少して行くことに起因すると考えられている。しかし、放射線照射後に起こる再酸素化と放射線感受性との関連について十分に解明されていないのが現状である。そこで、永根大幹氏はこの放射線照射後の再酸素化機構の解明および放射線感受性への影響について明らかにする事を目的に本学位論文の研究を行った。

最初に、永根大幹氏は生理的な血管拡張因子として知られる一酸化窒素（NO）がこの再酸素化に関与するという仮説に基づき、放射線が誘導する再酸素化へのNOの関与を検討した。マウス頭頸部扁平上皮がん株化細胞 SCCVII の同種移植腫瘍モデルを用い、腫瘍組織の酸素分圧を測定したところ、X線照射後12時間から24時間をピークとする急性期再酸素化と48時間以降の慢性期再酸素化が存在することを明らかにした。腫瘍内の組織還流量はX線照射後24時間から48時間で一過性の上昇することも示された。次にこの再酸素化と還流量増加にNOが関与するか検討するため、広域一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害剤 L-NAME を投与したところ、照射による急性期再酸素化および組織灌流量の上昇が抑制されたが、慢性期再酸素化は抑制されなかった。更に、急性期再酸素化には血管内皮型 NOS（eNOS）の活性化が必要である事を NOS 活性の測定と複数の NOS 阻害剤を用いた実験ならびに免疫組織

化学による観察により明らかにされた。また、腫瘍移植モデルでの2回分割照射の実験において、1回目のX線照射後にL-NAME投与で再酸素化を阻害した群では照射後非投与で再酸素化を起こした群と比較して、2回目の照射後の腫瘍成長抑制が有意に低下することが示された。以上の結果は放射線照射によって起こる24時間から48時間後の急性期再酸素化にはeNOSによるNOが関与している事を示しており、この再酸素化が分割照射時の放射線感受性上昇の原因の1つであると結論づけられた。

次に放射線がeNOS活性化を引き起こす細胞内シグナル経路を明らかにする目的で、ウシ大動脈内皮細胞(BAEC)を用いた実験を行った。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事が知られ、DNA損傷修復や細胞周期の停止などの様々な放射線応答に関与していることが既に報告されている。次の実験ではこの放射線によるATM活性化がeNOS活性化に関与しているのではないかという仮説に基づいて行われた。その結果、BAECは照射後3時間から24時間においてeNOS-Ser1179残基のリン酸化の亢進とNOS活性上昇が起きること、また、これらeNOSリン酸化とNOS活性化はATM阻害剤Ku-60019により有意に阻害される事が明らかとなった。加えて、分子シャペロンHSP90阻害剤geldanamycinは照射によるATMリン酸化、eNOS-Ser1179リン酸化およびNOS活性化を有意に抑制することも明らかとなった。以上の結果は放射線照射後に生じるeNOSリン酸化とNOS活性化にはHSP90/ATM経路が強く関与する事を示唆するものである。

本研究は固形がんにおける放射線による再酸素化にeNOS由来のNOが関与し、再酸素化と分割照射の腫瘍感受性との関連性を明瞭に示した研究である。更に照射による内皮細胞のeNOS活性化にHSP90/ATM経路が関与する事を明らかにした初めての研究である。本学位論文の研究成果は、新たな再酸素化を考慮した放射線治療プロトコル確立やNO合成系の修飾による放射線増感法の開発等において重要な知見であると認められる。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者永根大幹氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。