



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11282
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57635
Type	doctoral thesis
File Information	Masaki_Nagane.pdf



学位論文

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

2014

永根 大幹

<目次>

目次	1
略語一覧	3
緒言	4
第一章：移植固形腫瘍における放射線照射後の再酸素化機構に関する検討	
1. 序論	9
2. 材料および方法	12
3. 結果	
3-1. 腫瘍内組織酸素分圧および低酸素領域に及ぼす 放射線誘導性 NO の効果	22
3-2. 放射線による組織灌流量の上昇に対する NO の関与	23
3-3. 放射線感受性に及ぼす NO の効果	23
3-4. 腫瘍内 NO 合成酵素に及ぼす放射線照射の効果	24
4. 考察	30
5. 小括	32
第二章：放射線による内皮型一酸化窒素合成酵素活性化機構	
1. 序論	34
2. 材料および方法	36
3. 結果	
3-1. NOS 活性に及ぼす放射線の効果	39
3-2. eNOS リン酸化状態に及ぼす放射線の効果	39
3-3. 放射線による eNOS 活性化に対する ATM の関与	40
3-4. 放射線による ATM リン酸化および eNOS 活性化に対する	

HSP90 の関与	40
4. 考察	46
5. 小括	50
総括	52
謝辞	55
引用文献	56
英語抄録	60

<略語一覧>

- 3-NT: 3-nitrotyrosine
- ATM: ataxia telangiectasia mutated
- B2M: β 2-microglobulin
- BAEC: bovine aortic endothelial cells
- BH₄: tetrahydrobiopterin
- BSA: bovine serum albumin
- CaM: calmodulin
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- EF5: 2-(2-Nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)acetamide
- eNOS: endothelial nitric oxide synthase
- ESR: electron spin resonance
- FBS: fetal bovine serum
- H33342: Hoechst33342
- HRP: horse radish peroxidase
- HSP90: heat shock protein 90
- iNOS: inducible nitric oxide synthase
- LiNc-BuO: lithium-5,9,14,18,23,27,32,36-octa-n-butoxy-2,3- naphthalocyanine
- L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester
- NO: nitric oxide
- NOS: nitric oxide synthase
- nNOS: neural nitric oxide synthase
- PBS: phosphate bufferd saline
- PET: positron emission tomography

<緒言>

医学の発展による平均寿命の延長に伴い、がんの罹患数は増加傾向を示している。がん治療において外科療法、化学療法、放射線療法、あるいはこれらの治療法を複数組み合わせた治療が選択されており、近年では、外科的切除に比べ生体への負担が少ない放射線療法の適用症例数が増加している。放射線療法の理想的な到達点は、腫瘍組織だけを限局的に傷害することで、正常臓器の機能を保つことである。しかし、工学的技術の発達に伴い、粒子線療法など線量分布の優れた治療法が開発されているものの、腫瘍の場所や形態によっては、腫瘍部のみを照射することは困難な場合があり、周辺組織の被ばくにより生じる副作用が問題となる。従って、正常組織の保護と抗がん作用を両立するためには、がん細胞の放射線感受性を増感し、照射線量を低減する技術の開発が必要である。

がんの放射線感受性に関する臨床研究として Brizel らは、放射線治療前に腫瘍内酸素分圧を測定し、治療後の生存率におよぼす腫瘍の酸素化状態の影響の報告している。その結果、固形腫瘍内の低酸素領域が多いほど、放射線治療後の生存率が低下することが示された¹。加えて、Harada らは、低酸素領域中の腫瘍細胞が放射線治療後の転移・再発に関与していることを移植腫瘍モデルにより示した¹²。よって、腫瘍内の低酸素領域は放射線治療の大きな障害となっている。

腫瘍細胞の急激な細胞分裂と不十分な血管新生は、酸素の需要と供給の不均衡を引き起こし、腫瘍内に不均一な酸素環境を形成する¹³。血管から約 70 μm 以内の領域では通常の組織酸素分圧である 20 mmHg~30 mmHg を維持することが出来る。しかし、血管から離れ、酸素分子の物理的拡散限界を超えた領域では、10 mmHg 以下の慢性低酸素領域が形成される（図 1A）。さらに、血管近傍であっても、血管構造の未熟性に起因する末梢血管のうっ滞・閉塞により生じる一時的な低酸素状態である急性低酸素領域が存在する。このようなメカニズムにより、直径 200 μm 以上の腫瘍塊では急性・慢性低

酸素領域が形成されると考えられている¹¹。

低酸素領域における放射線抵抗性は、放射線による酸化損傷における酸素分子の重要な働きに起因する。放射線が生体に吸収されると、水の電離・励起によって不対電子を有するフリーラジカルが生成される。反応性が極めて高いフリーラジカルは、DNA など生体高分子の化学結合を切断し損傷分子を生成する。また、DNA が直接的に放射線の電離・励起作用を受けて DNA ラジカルを生成する場合もある。この様に不対電子を付加された生体高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¹¹。この過酸化ラジカルを生じた生体高分子は、還元酵素による修復では損傷前の化学形に戻ることが出来ないため、放射線による損傷が致死的な損傷として固定される。よって、放射線の細胞殺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。

1970 年代に van Putten²⁸ および Kallman¹⁷ は、放射線照射後に腫瘍内の低酸素細胞が減少すること、また、複数回の照射により、腫瘍内の低酸素細胞が照射回数に伴って漸減することを発見した。この再酸素化現象を利用することで酸素分子の強力な増感効果が得られるため、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（小線量頻回照射）を基本としている（図 1B）。この低酸素領域の再酸素化メカニズムに関して van Putten は、放射線誘導細胞死により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が関与しており、その過程には数日間を要することを報告している²⁸。加えて近年、照射 24 時間以内に生じる急性期の再酸素化が報告された。この機構に関し Hall らは、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急性期の再酸素化に寄与していると述べている¹¹。しかし、現在までこの急性期における再酸素化機構に関し、統一見解は得られていない。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。

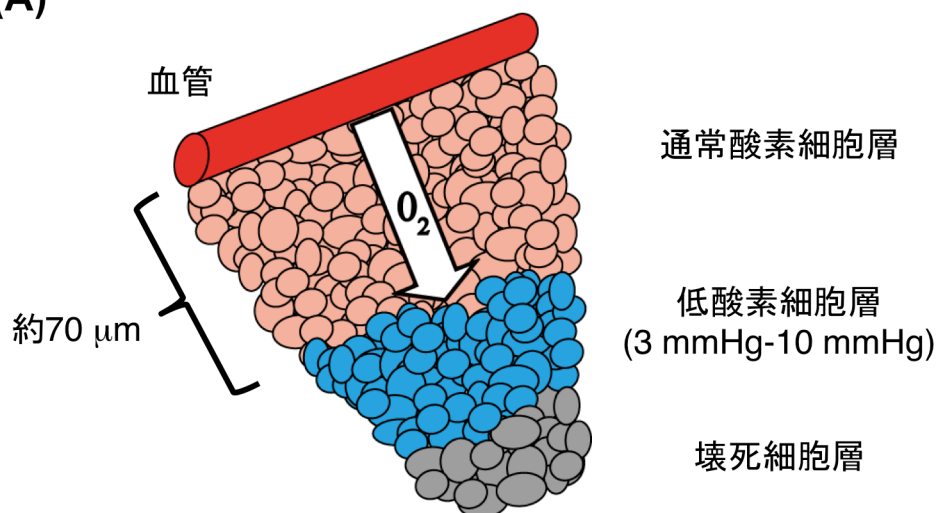
第一章では生理的な血管拡張因子として知られる一酸化窒素（NO）に着目し、放射線が誘導する再酸素化への NO の関与を検討した。まず電子スピン共鳴法(ESR)を用いた *in vivo* での酸素分圧測定（*in vivo* ESR）により、X 線照射後のマウス扁平上皮がん株化細胞 SCCVII 移植腫瘍の組織酸素分圧を経時的に検討した。SCCVII 移植腫瘍では、照射後 12 時間から 24 時間をピークとする急性期の再酸素化が観察され、さらに 48 時間以降に持続的に続く慢性期の再酸素化が観察された。組織学的検討によって、この急性の再酸素化を裏付ける腫瘍内低酸素領域の減少も確認された。また、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。また、X 線照射により内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の活性化が観察され、急性期の再酸素化は eNOS からの NO 産生に依存していることが示唆された。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 依存的事であること、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。

第一章より、固形腫瘍内の血管内皮細胞に存在する eNOS が放射線照射後の腫瘍内血流を制御していることが示唆された。血管内皮細胞に多く発現する 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¹⁰。発現量により機能調節がなされる誘導型（iNOS）と異なり、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。特に、protein kinase A、Akt、AMP-activated protein kinase ならびに calmodulin-dependent protein kinase などのリン酸化酵素は eNOS-Ser1179 残基をリン酸

化し、そのリン酸化により活性中心への電子伝達を増強し、L-arginine の酸化反応を亢進させ NO 産生を増強することが報告されている²⁵。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²⁷。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り、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。DNA 損傷修復において HSP90 は ATM の損傷部位への集積と安定化に関与しており、適切な DNA 二本鎖切断修復に必須であることが報告されている^{6,22}。よって、HSP90 は DNA 損傷応答の調節を介した eNOS 活性化経路に関与することが考えられる。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。ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) において X 線は NOS 活性を上昇させ、eNOS-Ser1179 残基のリン酸化レベルを上昇させた。また、DNA 損傷応答の制御因子である ATM および HSP90 の阻害により、放射線照射後の eNOS-Ser1179 リン酸化は抑制された。本研究から、X 線照射後の eNOS リン酸化は HSP90/ATM 経路を中心とした DNA 損傷応答に起因することが明らかとなった。

なお、本博士論文の第一章の結果についてはすでに誌上発表されており²¹、第二章の結果についても現在、国際誌に投稿準備中である。

(A)



(B)

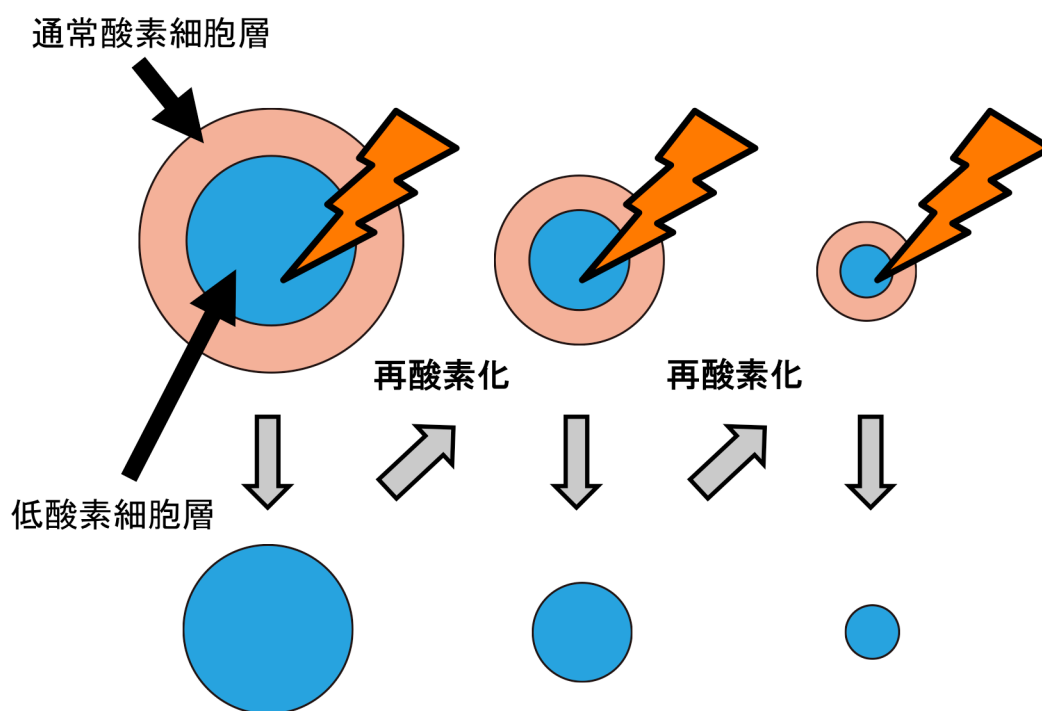


図1.固形腫瘍内の低酸素領域と再酸素化の模式図

(A) 固形腫瘍内における不均一な酸素環境。固形腫瘍内には血管からの酸素分子の拡散限界により10 mmHg～30 mmHg通常酸素細胞層、3 mmHg～10 mmHgの低酸素細胞層、ならびに壊死細胞層が形成される。(B) 頻回照射による低酸素領域の再酸素化。放射線治療により、放射線感受性の高い通常酸素細胞層が除去され、低酸素細胞層の再酸素化が生じる。青; 低酸素領域、桃色; 通常酸素領域

＜第一章＞

移植固形腫瘍における放射線照射後の再酸素化機構に関する検討

1. 序論

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。フリーラジカルにより傷害を受けた生体高分子は、グルタチオンなどの還元酵素により化学的修復されるが、2 個の不对電子をもち、強力な酸化剤である酸素分子の存在下では、酸素分子との反応によって損傷部位における不可逆的な修飾が起き細胞の致死を引き起こす（酸素効果）。しかし、放射線治療の対象となる固形腫瘍内では、急激な細胞分裂と栄養供給の不均衡により酸素分圧が 10 mmHg 以下の低酸素領域が形成されている（図 1A）。酸素効果が減弱する低酸素領域では、放射線感受性が低下し、がん細胞の生残の確率が上昇し、治療処置後の再発や転移の原因となることが報告されている¹²。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。現在、低酸素領域を克服するため、いくつかの戦略が検討されている。第一には tirapazamine などの低酸素選択的制がん剤である。tirapazamine は腫瘍内の低酸素領域でのみ還元され、アルキル化剤となることで殺細胞作用を示す²。第二には、ニトロイミダゾールの様な酸素分子と類似の作用を持つ低分子化合物により、化学的に酸素効果を得ることである。本教室においても、ニトロイミダゾール系低酸素増感剤である doranidazole が放射線による抗腫瘍作用を増感することを報告している³⁰。しかし、これら低酸素標的薬剤は中枢毒性を中心とした副作用の問題もあり、臨床での日常的な使用には至っていない。

緒言でも述べたように、放射線照射後の固形腫瘍内では低酸素細胞の再酸素化が生じ、再酸素化により得られる酸素効果は、X 線などの線エネルギー付与の低い放射線においてその抗腫瘍作用を 2～3 倍増強することが知られている¹¹。また、炭素線など線エネ

ルギー付与が高い放射線においても酸素効果は抗腫瘍作用を増強することが知られている¹⁵。よって、固形腫瘍における低酸素領域の再酸素化機構は放射線治療における増感標的として重要である（図 1B）。現在、この再酸素化機構は、放射線照射により感受性の高い通常酸素細胞が細胞死することで、腫瘍の酸素消費量が低下し、結果として残存するがん細胞への酸素供給が増加することが原因であると考えられている。また、細胞死により生じた間隙に血管が新生することによって血液供給が再開し、低酸素細胞まで酸素分子が拡散可能となることが考えられている²⁸。加えて Hall らは、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疎通することが原因であると述べている¹¹。また、Fokas らは、放射線による腫瘍内血管の機能変化により組織血流量が増加し、低酸素環境が改善することを報告している⁸。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、生理的な血管拡張因子であり、組織血流の調節因子として知られている一酸化窒素（NO）の再酸素化への関与を検討した。ほ乳類における NO 合成酵素（NOS）には、神経型（nNOS）、誘導型（iNOS）、ならびに内皮型（eNOS）の三種類のアイソフォームが存在する。また近年、放射線照射はこれらの NOS を活性化することが報告されている^{21,26}。Sonveaux らは放射線照射によって腫瘍内血管に存在する eNOS が活性化し、血管構造・機能が成熟することを報告している²⁶。また、Li らは照射後の腫瘍内で iNOS 発現量が増加し、タンパク質のニトロ化修飾が生じることを報告している¹⁸。これら内因性の NO 産生に加えて、Jordan らは NO ドナーである isosorbide dinitrate の投与により、腫瘍血管からの酸素分子の拡散性が上昇し、組織酸素分圧が上昇することが報告されている¹⁶。以上から、放射線照射後の NOS 活性の上昇により NO が生成され、血管拡張により組織灌流量が上昇し、固形腫瘍の再酸素化に関与することが考えられる。

本研究では、放射線による腫瘍内 NO 産生の再酸素化への関与を明らかにすることを

第一の目的とした。次に放射線による NO 産生を亢進させる詳しいメカニズムを明らかにするとともに、この放射線誘発 NO が腫瘍の放射線感受性に与える効果について検討することを目的とした。そのために、SCCVII 移植腫瘍を用いて、放射線照射後の腫瘍内酸素環境の変化を *in vivo* 電子スピン共鳴 (ESR) 法による経時的酸素分圧測定、組織灌流量試験ならびに免疫組織化学により評価した。また、放射線照射後の腫瘍における NOS 発現および活性について調べることで、責任酵素となる NOS のアイソフォームを調べた。さらに、NO 合成酵素阻害剤を投与することで、固形腫瘍の再酸素化および腫瘍の放射線感受性に及ぼす NO の効果を検討した。

2. 材料および方法

2-1 試薬

Minimum Essential Medium Alpha (α MEM) 培地は Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA) から購入した。 $[^{14}\text{C}]$ -L-arginine は Perkin Elmer Life Science (Boston, MA, USA) より、NOS Activity Assay Kit は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。広域 NOS 阻害剤 N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) は DOJINDO (熊本)、特異的 iNOS 阻害剤 1400W は和光純薬 (大阪) より購入した。Hypoxypore-1 Kit は Hypoxypore, Inc. (Burlington, MA, USA) より、2-(2-Nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)acetamide (EF5) およびその特異抗体は Camelon J. Koch 博士 (ペンシルベニア大学) より供与された。抗 3-nitrotyrosine 抗体 (ab61392)、抗 eNOS 抗体 (ab66127)、抗 CD31 抗体 (ab28364)、抗 iNOS 抗体 (ab3523) は Abcam (Cambridge, MA, USA) より購入した。抗 COX-2 抗体 (sc-1746)、抗 Actin 抗体 (sc-1615)、および HRP 標識二次抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。また、AlexaFluor[®] 488 または 555 標識二次抗体は Life Technologies Corporation から購入した。特に記載の無い一般試薬については和光純薬 (大阪) から購入した。

2-2. 細胞株および移植腫瘍モデル

マウス扁平上皮癌 SCCVII 細胞は 10 % fetal bovine serum (FBS) を含む α MEM 培地中で加湿、37℃ならびに 5% CO_2 条件下で培養した。移植腫瘍モデルの作成は Yasui らの方法に従った³¹。6~7 週齢の C3H/HeJ マウス (雌、体重 16~20 g、Japan SLC、浜松) を用いた。マウスは SPF であり照明時間は 1 日 12 時間、室温 $22 \pm 4^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 5\%$ とした。マウス一匹につき 5×10^6 個の SCCVII 細胞を 20 μl の FBS を含まない α MEM 培地に懸濁し、ハロセン麻酔下でマウス左後肢の掌側足底部にマイクロシリンジにて接種

した。腫瘍体積の計測は麻酔下でノギスにて腫瘍の長径、短径を計測したのち、以下の計算式から腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times \pi / 6$$

すべての動物実験は北海道大学（許可番号：12-0005）および本研究科（許可番号：獣1134）の動物実験委員会の承認を受け、本研究科動物実験委員会の定めるエンドポイントに達した時点で安楽殺した。

2-3. X 線照射および薬剤投与

X 線発生装置は PANTAK HF-320 型（島津製作所、京都）を使用し 200 kVp、20 mA、0.5 mm Al+0.5 mm Cu フィルターを用いて線量率 0.8 Gy/min になる条件で照射した。移植腫瘍体積が 400 mm³ - 500 mm³ に達した時点にて X 線照射を行った。腫瘍塊が形成された左後肢足底部を除く全身を 6 mm 厚鉛板により遮蔽し、10 または 13 Gy の線量で X 線を照射した。X 線照射時、マウスはハロタン吸入麻酔下で照射台に保定され、携帯カイロにて体温低下を防止した。NOS 阻害剤 L-NAME は PBS に溶解し、30 mg/kg の用量で腹腔投与した。覚醒後、ケージにマウスを戻し L-NAME を二次蒸留水に 500 mg/l の濃度で溶解し、特別な記載が無い限り採材まで飲水投与した。

2-4. *in vivo* 電子スピン共鳴法による組織酸素分圧測定

組織酸素分圧測定は Pandian らの報告による *in vivo* ESR 法を用いた²³。この方法は、腫瘍内に安定ラジカルを投与し、この安定ラジカルとバイラジカルである組織中の酸素分子とのスピン-スピン相互作用による緩和時間の変化を ESR スペクトルの変化として評価する手法である。安定ラジカルより得られる ESR スペクトルのピーク間の線幅が酸素分圧に依存することを利用し、腫瘍内に取り込ませた安定ラジカルプローブの線幅を測定することで、腫瘍内組織酸素分圧を非侵襲的に測定することが可能である。酸素

感受性安定ラジカルである lithium 5,9,14,18,23,27,32,36-octa-n-butoxy-2,3-naphthalocyanine (LiNc-BuO; 図 2A)は以下のとおり合成した。アルゴンガス置換下のナスフラスコ内で、3.5 g のリチウム顆粒に pentanol 7.5 ml を添加し、攪拌しながら 60℃ のオイルバス中において溶解した。7.5 ml の Li-pentanol と 50 mg の octa-n-butoxynaphthalocyanine をアルゴンガス置換ナスフラスコ内で 140℃、2.5 時間混合した。三角フラスコにおいて上記の反応液と 150 ml の tert-butyl-methyl-ether を混合し、綿とシリカを用いて濾過した。濾液を 40℃のエバポレーターで溶媒を除き、15 ml の hexane に溶解し、氷冷エバポレーターで濃縮した。濃縮液に 10 ml の methanol を加え、ブフナーの中心に重層し、乾燥させた。得られた LiNc-BuO に 10 mg/ml の濃度で 5% dextran 添加 PBS を加え、超音波処理により溶解した。マイクロシリンジを用いて一匹あたり 20 μ l の LiNc-BuO 懸濁液を移植腫瘍内に注入した。すべての移植腫瘍における酸素分圧測定は注入 24 時間以降に開始した。ESR スペクトルの収集はサーフェイスコイルを備えた L-band ESR spectrometer (JES-TE200; JEOL、東京)を使用し、以下の条件で行った。

Scan time 480 sec、Field scanning 1.0 mT、Field modulation 0.032 mT、Time constant 10 sec、Microwave Frequency 1.096 GHz、Microwave power 6 mW

酸素分圧に対する検量線作成のため、0 mmHg はアルゴンガス内、38、76、108 mmHg は酸素・窒素混合ガス内、ならびに 149 mmHg は大気圧条件にて ESR スペクトルを取得し、その線幅から検量線を作成した（図 2B）。

2-5. 免疫組織化学

X 線照射後の腫瘍内低酸素領域の変化を評価するため、二種類の低酸素集積性ニトロイミダゾール化合物を X 線照射前後にタイミングをずらして投与し、それぞれの特異抗体を用いて免疫組織化学を行った（図 3）。X 線照射 1 時間前に PBS に溶解した

pimonidazole (Hypoxyprobe-1 Kit; Hypoxyprobe, Inc.) を 10 mg/kg の用量で静脈内投与し、照射前の低酸素領域を標識した。X 線照射後に任意の時間で、2%エタノールを含む 5%ブドウ糖液に溶解した EF5 を 30 mg/ml の用量で腹腔投与した。1 時間後に CO₂ 吸入により安楽殺し、腫瘍塊を切り出し、10%中性緩衝ホルマリンで一晩、4℃で浸漬固定した。固定後、70%-90%のアルコール系列で脱水し、キシレンにて 3 回、各 2 時間透徹し、68℃インキュベーター内でパラフィンを経過し、包埋をおこなった。パラフィンブロックは滑走型マイクロトームを用いて 3 μm の厚さに薄切された。パラフィン切片は 68℃、1 時間インキュベートし、脱パラフィン、再水和した。抗原の賦活化は 0.01 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)を用い、圧力鍋で 121℃、2.5 分加熱することで行った。PBS で 3 回洗浄後、5%ヤギ血清を含む PBS で室温、60 分反応させ非特異的反応を除いた。ブロッキング液を除去後、5%ヤギ血清を含む PBS に希釈した抗 EF5 抗体 (1:10) または抗 CD31 抗体 (1:100) にて 4℃、一晩処理した。PBS にて 3 回、2 分洗浄後、5%ヤギ血清を含む PBS に希釈した Alexa Fluor[®]555 標識抗マウス IgG または抗ウサギ IgG 抗体にて室温、1 時間処理した。PBS で 3 回洗浄後、5%ヤギ血清を含む PBS で室温、60 分反応させた。続いて抗 pimonidazole 抗体 (1:100) または抗 eNOS 抗体 (1:100) にて 4℃、一晩処理した。PBS にて 3 回、2 分洗浄後、5%ヤギ血清を含む PBS に希釈した Alexa Fluor[®]488 標識抗マウス IgG または抗ウサギ IgG 抗体にて室温、1 時間処理した。PBS にて 3 回、2 分洗浄後、300 nM の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む PBS により 20 分染色した。染色切片は ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Life Technologies Corporation) により封入した後、DP71 デジタルカメラを備えた BX41 正立蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) で画像を取得した。染色切片の定量化は、ImageJ (National Institutes of Health, MD, USA) を使用し、各群から 200 倍の倍率で無作為に 10 視野選び、陽性領域のピクセル数を計測した。

2-6. 組織灌流量試験

放射線照射後の組織灌流量を評価するため、DNA 親和性蛍光色素を灌流し組織上でその拡散性を評価した。X 線照射後、1.5%のハロセン麻酔下のマウスに PBS に溶解した Hoechst33342 (H33342) を 30 mg/kg の用量で静脈投与した。4 分後に CO₂ 吸入により安楽殺し、腫瘍塊を切り出し、凍結標本用包埋剤 (ティッシュ・テック O.C.T.コンパウンド; サクラファインテックジャパン、東京) に包埋し、ドライアイス冷却エタノールで凍結した。切片はクライオトームを用いて 10 μ m の厚さに調整された。室温で 10 分間乾燥させた後、アセトン固定を 4℃、5 分間おこなった。PBS にて 3 回、2 分洗浄後、ProLong® Gold Antifade Reagent により封入した。灌流面積の定量化は、免疫組織化学的解析と同様に DP71 デジタルカメラを備えた BX41 正立蛍光顕微鏡で得られたデジタル画像から ImageJ を使用し、各群から 100 倍の倍率で無作為に 10 視野選び、陽性領域のピクセル数を計測した。

2-7. 定量 PCR

X 線照射後の腫瘍組織を採材し、液体窒素にて凍結した。凍結組織は液体窒素下で乳鉢を用いて破碎し、約 20 mg の組織から SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) により製造元のプロトコルに従い RNA を抽出した。抽出した総 RNA の濃度は分光光度計 (DU 800 Spectrophotometer; Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を用いて測定した。逆転写反応は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡, 大阪)を用いて 2 μ g の総 RNA から cDNA の合成を行った。反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini TP10 (タカラバイオ, 滋賀)を用い、37℃で 15 分間、50℃で 5 分間、98℃で 5 分間の条件で行った。リアルタイム PCR では、cDNA 10 ng、Forward/Reverse プライマー 各 5 pmol ならびに FastStart Essential DNA Green Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を含む全量 10 μ l の反応液を調製し、PCR 反応を行った。PCR 条件は 95℃で

10 分アニーリングを行い、増幅反応は 95℃で 20 秒、60℃で 20 秒、72℃で 20 秒を 1 サイクルとし、計 40 サイクル行った。PCR 反応は LightCycler Nano System (Roche Applied Science)で行い、付属のソフトウェアで解析を行った。蛍光強度は毎回の伸長反応の終点で測定した。内部標準遺伝子としてβ2-microglobulin(B2M)遺伝子を使用し、各遺伝子の発現レベルを補正した。PCR 反応に用いたプライマー配列を以下に示す。

nNOS

5'-CAAGAACTGGGAGACAGATG-3'

5'-CTGACTTCCGTATGTGATGG-3'

iNOS

5'-GACCTGAAAGAGGAAAAGGA-3'

5'-TGTATTGTTGGGCTGAGAAC-3'

eNOS

5'-AAAGCTGCAGGTATTTGATG-3'

5'-TGCCTCTATTTGTTGCGTAT-3'

β2-microglobulin (B2M)

5'-AGGAGTGGATCTCTGGAAAG-3'

5'-GCTTGATCACATGTCTCGAT-3'.

2-8. ウェスタンブロッティング

X 線照射後の腫瘍組織を採材し、液体窒素にて凍結した。組織重量 1 mg に対し 2 μl

の Homogenize Buffer A (10 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 1 mM EDTA, 1% Triton-X100) を添加し、氷上でモーターに取り付けたホモジェナイザーペッスル (1005-39; AS ONE、大阪) で 3 秒間、20 回破碎した。続いて、30 秒間、3 回の超音波処理を行い、20,000 ×g で 20 分遠心した。上清を回収し、再び 20,000 ×g で遠心した。得られた上清をタンパク質試料とし、Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) のプロトコルに従ってタンパク質濃度の定量を行い、各試料の濃度を揃えた。Laemmli's sample Buffer (0.1875 M Tris-HCl [pH 6.8]、15% β-mercaptoethanol、6% SDS、30% glycerol、0.006% bromophenol blue) を試料の 1/2 容量加え、沸騰水で 3 分間加熱処理し泳動試料とした。試料は SDS-PAGE 電気泳動装置でタンパク質を分離し、転写装置を用いてニトロセルロース膜に 100 V、1 時間転写した。転写したニトロセルロース膜は、5%低脂肪スキムミルクを含む Tris-Tween-20 (TBST; 10 mM Tris-HCl [pH7.4]、0.1 M NaCl、0.1% Tween-20) にて 1 時間ブロッキングした。その後、iNOS および eNOS を検出する場合には 5% Bovine Serum Albumin (BSA) を含む TBST で 750 倍希釈した一次抗体を、CD31 および COX-2 を検出する場合には 5%低脂肪スキムミルクを含む TBST 溶液にて 1,000 倍希釈した一次抗体にメンブレンを浸し、4℃で一晩処理した。TBST にて 3 回、10 分洗浄後、TBST により 3000 倍希釈した Horse radish peroxidase (HRP) 標識二次抗体にメンブレンを浸し室温、1 時間処理した。その後、化学発光基質 (Western Lightning® Plus-ECL; Perkin Elmer Life Science) を添加し、画像解析装置 (LAS 4000 mini; 富士フイルム、東京) にてバンドの検出を行った。

2-9. NOS 活性試験

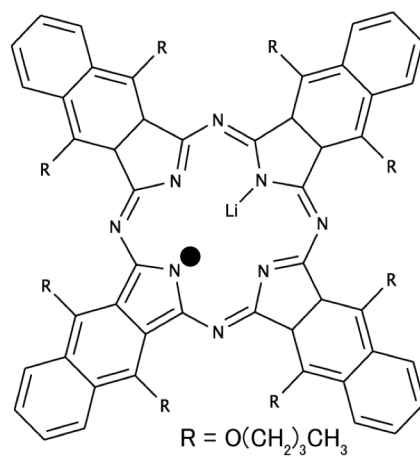
[¹⁴C]-L-arginine (比活性 10.138 Bq/pmol) および NOS Activity Assay Kit を使用し、製造元のプロトコルに従って組織中の NOS 活性を測定した。X 線照射後、任意の時間で腫瘍組織を採材し、液体窒素にて凍結した。組織試料 1 mg あたり 3 μl の Homogenize

Buffer B (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 μ M PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml pepstatin) を添加し、氷上でモーターに取り付けたホモジェナイザーペッスルで 3 秒間、20 回破碎した。10,000 $\times$ g、10 分間遠心後、上清を回収し再び 10,000 $\times$ g、10 分間遠心した。得られた上清を Reaction Buffer (25 mM Tris-HCl [pH7.4], 3 μ M tetrahydrobiopterin (BH_4), 1 μ M FAD, 1.25 mM NADPH, 0.5 μ Ci [^{14}C]-L-arginine, 0.75 mM $CaCl_2$, 0.1 μ M calmodulin)と混合した。その後、0.1% DMSO、20 mM 広域 NOS 阻害剤 L-NAME、および 10 μ M 特異的 iNOS 阻害剤 1400W を添加後に 37 $^{\circ}C$ 、60 分間反応させた。得られた反応液に 8 倍量の氷冷 Stop Buffer (50 mM HEPES-NaOH [pH5.5], 5 mM EDTA) を添加し反応を停止させた。陽イオン交換樹脂中を通過させ [^{14}C]-L-arginine を除いた後、反応液中の [^{14}C]-L-citrulline を液体シンチレーションカウンタで計数した。すべての試料に対し Bio-Rad Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度の定量を行い、NOS 活性 (pmol/ μ g/min) を算出した。

2-10. 統計処理

群間比較の統計的有意性は、F 検定による分散比の検定ならびに *t*-検定により行った。危険率が $p<0.05$ の際に有意差有りとした。

(A)



(B)

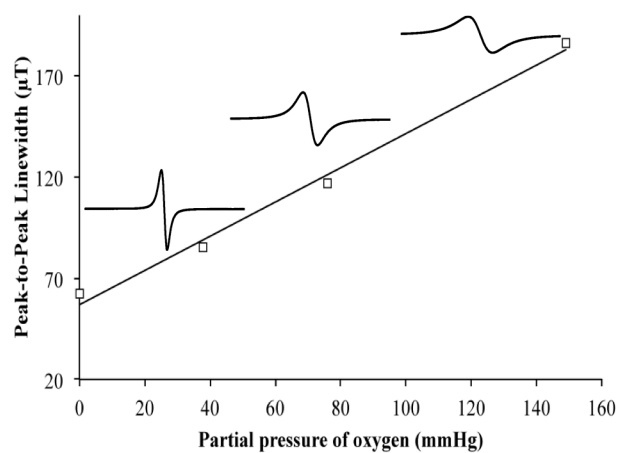
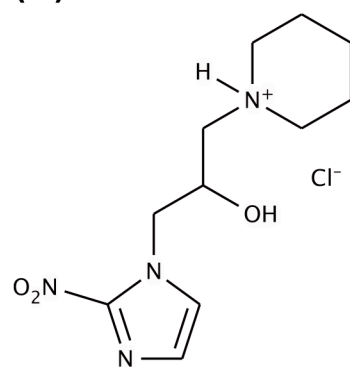


図2. 酸素感受性ESRプローブLiNc-BuOとその検量線

(A) LiNc-BuOの化学構造。(B) LiNc-BuOの酸素分圧に対する検量線。グラフ内のスペクトルは、36 mmHg、76 mmHgならびに108 mmHgにおけるLiNc-BuOのESRスペクトルであり、ピーク間の線幅を酸素分圧に対しプロットした。

(A)



(B)

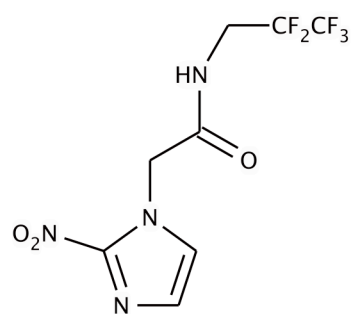


図3. 低酸素集積性ニトロイミダゾール化合物

(A) pimonidazoleの構造式

(B) EF5の構造式

3. 結果

3-1. 腫瘍内組織酸素分圧および低酸素領域に及ぼす放射線誘導性 NO の効果

放射線照射後の SCCVII 移植腫瘍内の組織酸素分圧を測定するため、L-band ESR を用いた酸素分圧測定法を行った。照射前の組織酸素分圧は 4.3 mmHg であったのに対し、13 Gy の X 線照射 24 時間後では 17.4 mmHg と有意な組織酸素分圧の上昇が観察された（図 4A）。また、照射 48 時間後では 7.7 mmHg と下がるものの、それ以降も照射前より高い酸素分圧が維持された。続けて、腫瘍組織内における低酸素領域の変化を免疫組織化学により評価した。移植腫瘍モデルに低酸素プローブである pimonidazole を投与し、照射前の低酸素領域を標識した。また、X 線照射後の任意の時間において pimonidazole とは異なる低酸素プローブである EF5 を投与し、各時点での低酸素領域を標識した。その後、両低酸素プローブの組織内局在を二重免疫組織化学染色により検討した（図 4B）。まず二種類の低酸素プローブを 1 時間差で投与した移植腫瘍では両プローブの陽性領域が一致したため、プローブの性質として同程度の酸素分圧にある低酸素細胞に集積することが確認できた。X 線照射 24 時間後に EF5 を投与した群では pimonidazole 陽性領域に比較して、EF5 陽性領域は著しく減少した。また、照射 48 時間後に EF5 を投与した群では 24 時間後ほどではないものの pimonidazole 陽性領域に比べ EF5 陽性領域の減少が観察された。以上の組織画像から二種類の低酸素プローブ陽性領域を定量し、pimonidazole 陽性領域に対する EF5 陽性領域の比を算出した。X 線照射 24 時間後および 48 時間後において、EF5 陽性領域はそれぞれ 13.1% および 58.2% まで減少した（図 4D）。以上から、組織酸素分圧の変動と同様に、放射線照射後に低酸素領域が減少することが示唆された。

放射線誘導性再酸素化に及ぼす一酸化窒素の効果を、広域 NOS 阻害剤 L-NAME を前投与することで評価した。L-NAME 投与群において放射線照射 24 時間をピークとする早期の組織酸素分圧の上昇のみが抑制された（図 4A）。加えて、pimonidazole と EF5

を用いた組織学的実験では、L-NAME 投与により X 線照射 24 時間後に生じた低酸素領域の減少のみが阻害された（図 4C、4D）。以上から、放射線照射は腫瘍内の組織酸素分圧を上昇させ、同時に低酸素領域を減少させること、また NO がその再酸素化に関与することが示唆された。

3-2. 放射線による組織灌流量の上昇に対する NO の関与

次に放射線照射後の腫瘍内での NO 産生を評価するため、腫瘍内タンパク質のニトロ化レベルを 3-Nitrotyrosine (3-NT) に対するウェスタンブロットにより評価した。図 5A の矢印で示した様に放射線照射によって三種類の腫瘍内タンパク質のニトロ化チロシンレベルは上昇し、L-NAME 投与によりそれらのタンパク質のニトロ化レベルの上昇は抑制された。NO は血管拡張性物質として知られており、NO ドナーの投与は正常組織だけではなく腫瘍組織中でもその血流量を増加させることが知られている¹⁶。従って、放射線照射後の腫瘍内組織灌流量の変化、および NO の効果を組織灌流量試験により検討した。静脈投与された H33342 は血管からの拡散性に依存して組織中へ浸透し、DNA と結合する。L-NAME 非投与群では放射線照射後、腫瘍内の灌流面積の上昇が観察された（図 5B）。灌流領域を定量したところ、H33342 陽性領域は照射前では 8.5%であったが、照射 24 時間後では 30.9%、48 時間後では 31.3%まで上昇した（図 5C）。また、L-NAME 投与群では 24 時間後に生じた組織灌流量の上昇の阻害が観察されたが、48 時間後に生じる組織灌流量の阻害は観察されなかった。以上から、放射線照射は NO 産生を亢進させ、組織灌流量を増加させることが示唆された。

3-3. 放射線感受性に及ぼす NO の効果

放射線照射により NO 依存的に組織灌流量が上昇し、腫瘍内の低酸素領域が減少した。序論で述べたように、腫瘍内における低酸素領域は放射線抵抗性であることが知られて

いる。そこで分割照射の抗腫瘍効果に及ぼす NO の効果について評価した。分割照射プロトコルは 10 Gy の 2 回照射（照射間隔 18 時間）とし、1 回目の照射後に L-NAME を腹腔投与し、2 回目の照射直前まで飲水投与した（図 6A）。X 線非照射群は L-NAME 投与・非投与に関わらず急激な腫瘍体積の増大が観察された。放射線治療群では分割照射による腫瘍体積増加の抑制作用観察されたが、L-NAME 投与群では抗腫瘍作用の有意な抑制が観察された（図 6B）。以上より、1 回目の X 線照射により生じる NO 産生の亢進は、二回目の照射による放射線感受性を増感していることが示唆された。

3-4. 腫瘍内 NO 合成酵素に及ぼす放射線照射の効果

ここまでの結果から、放射線による NO 産生は固形腫瘍の再酸素化に関与することで、その後の放射線感受性を制御していることが示唆された。次に、放射線照射後に生じる NO 産生の責任酵素を解析した。SCCVII 移植腫瘍内における各種 NOS アイソフォームの mRNA を RT-定量 PCR で評価した（図 7A）。定量 PCR により、移植腫瘍内における nNOS mRNA の発現量は他のアイソフォームと比較し極めて低値であった。また、iNOS および eNOS においては一定の mRNA の発現が観察されたが、X 線照射による有意な増加は観察されなかった。

SCCVII 移植腫瘍内において mRNA の発現が確認された iNOS および eNOS について、それらのタンパク質発現量をウェスタンブロットにより評価したところ、放射線照射による両アイソフォーム発現量の増加は観察されなかった（図 7B）。組織灌流には血管新生や炎症が関与していることも考えられたため、血管内皮細胞マーカー（CD31）および炎症マーカー（COX-2）の発現量についても評価したが、放射線照射によるそれぞれの発現量の増加は観察されなかった（図 7B）。以上から、放射線照射後の NO 産生はその産生酵素である NOS の発現レベルに依存しないことが示唆された。そこで、移植腫瘍からのタンパク質抽出液における NOS 活性を評価した。DMSO 処理群から分

るように、放射線照射後の NOS 活性は有意な増加を示した（図 7C）。続いて、移植腫瘍抽出液の NOS 活性を広域 NOS 阻害剤 L-NAME および特異的 iNOS 阻害剤 1400W 存在下で測定した。照射および非照射群において、L-NAME 存在下において NOS 活性は有意に抑制された。しかし、1400W 存在下では NOS 活性の抑制は観察されなかった（図 7C）。この結果から、X 線照射による全体としての NOS 活性の上昇を担っているのは、iNOS ではなく eNOS であることが示唆された。加えて、免疫組織化学により、SCCVII 移植腫瘍において eNOS は血管内皮細胞マーカーである CD31 と共局在することが観察された（図 7D）。以上から、放射線照射によって血管内皮細胞に存在する eNOS が活性化し、腫瘍内の NO 産生が亢進することが示唆された。

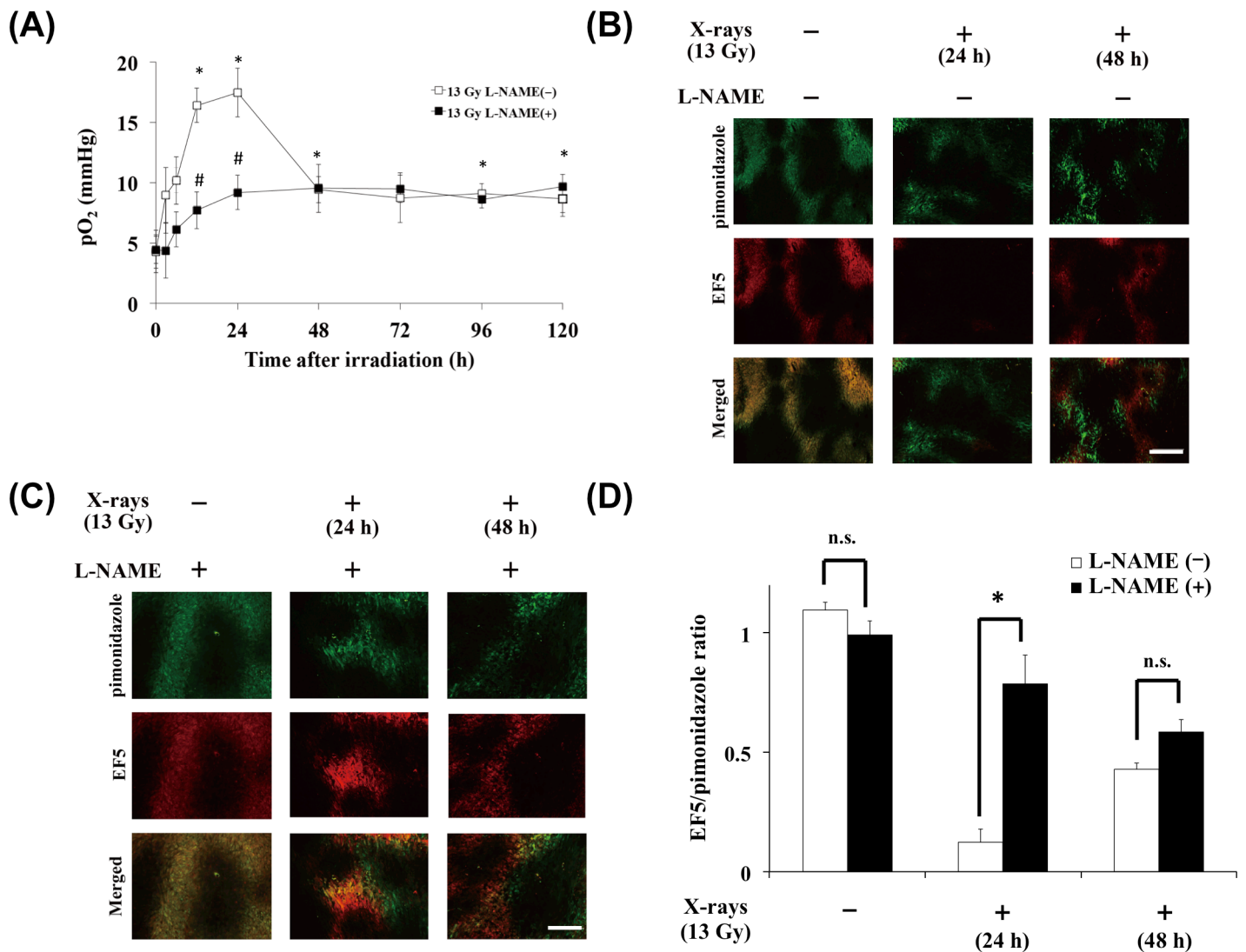


図4. 腫瘍内組織酸素分圧および低酸素領域に及ぼす放射線誘導性NOの効果

(A) L-NAME投与/非投与群における放射線照射後の組織酸素分圧の変動。SCCVII移植腫瘍に13 GyのX線を照射し、*in vivo* ESRを用いて組織酸素分圧を測定した。グラフのポイントおよびバーは平均±S.E.を表している。統計的有意差は、X線照射前の酸素分圧に対して* $p < 0.05$ 、L-NAME非投与群に対して# $p < 0.05$ で示した。(B) L-NAME非投与群における放射線照射後の腫瘍内低酸素領域の変化。Pimonidazoleを照射1時間前に投与し、照射24時間後または48時間後にEF5を投与した。組織切片作成後、特異抗体を用いた免疫組織化学により画像化した。緑色はpimonidazole陽性領域、赤色はEF5陽性領域を示している。白線は100 μ mを示す。(C) L-NAME投与群における放射線照射後の腫瘍内低酸素領域の変化。X線照射後にL-NAMEを30 mg/kgで腹腔投与し、採材まで500 mg/mlのL-NAMEを飲水投与した。緑色はpimonidazole陽性領域、赤色はEF5陽性領域を示している。白線は100 μ mを示す。(D) EF5/pimonidazole比の定量値。低酸素プローブ陽性領域のピクセル数を計数し、照射前の低酸素領域(pimonidazole)に対する照射後の低酸素領域(EF5)の比を算出した。グラフのカラムおよびバーは平均±S.E.を表している。統計的有意差は、L-NAME非投与群に対して* $p < 0.05$ で示した。また、n.s.は有意差なしを示す。

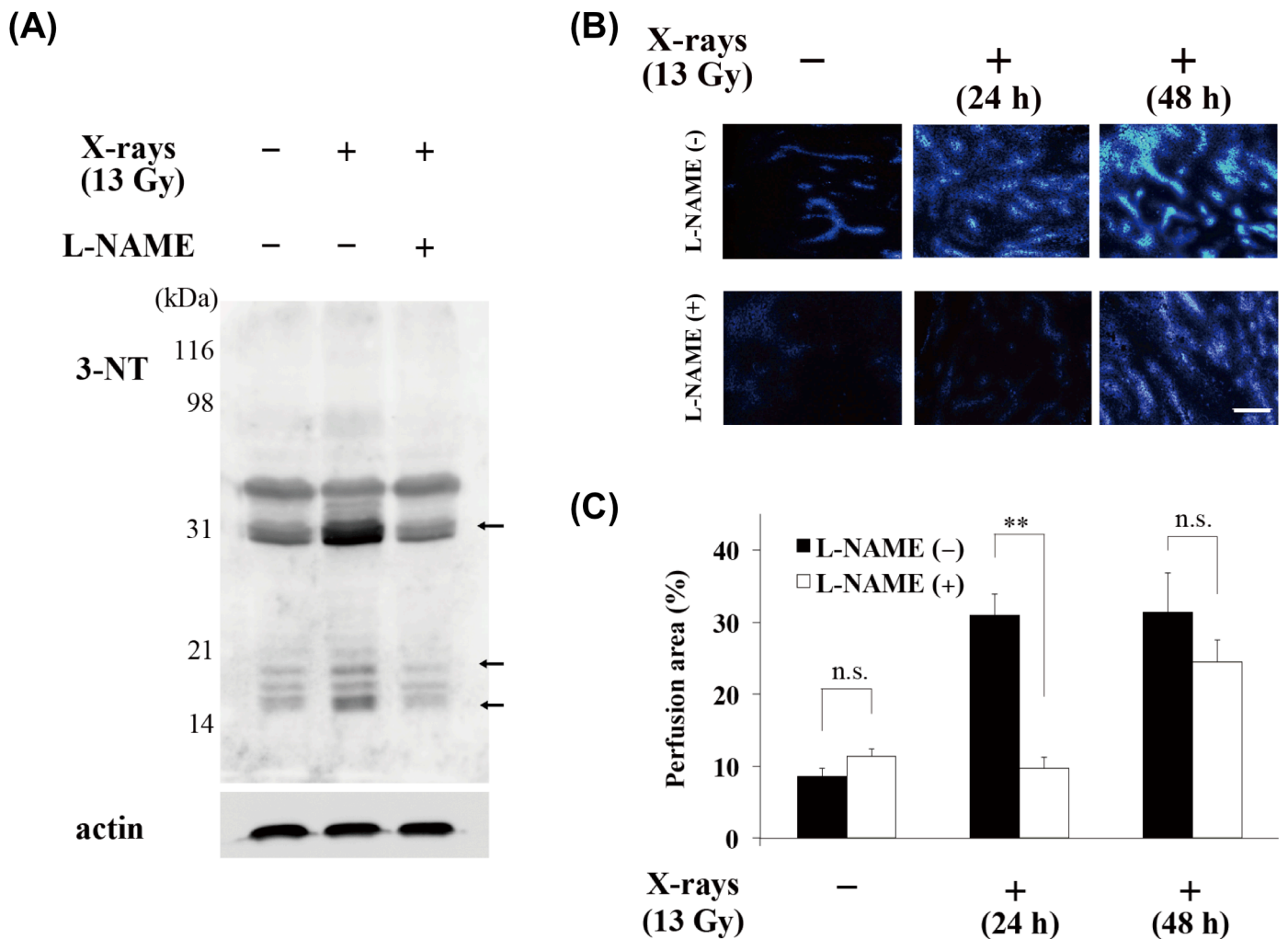


図5. 放射線によって起こるNO産生と組織灌流量に及ぼす放射線誘導性NOの効果

(A) X線照射後の腫瘍内ニトロ化タンパク質の評価。X線照射後のSCCVII移植腫瘍からタンパク質を抽出しウェスタンブロットによりニトロ化チロシン量(3-NT)を評価した。L-NAME投与群では、X線照射後にL-NAMEを30 mg/kgで腹腔投与し、採材まで500 mg/mlのL-NAMEを飲水投与した。矢印は照射によりニトロ化が上昇したバンドを示す。(B) H33342組織灌流量試験による腫瘍内組織灌流量の評価。13 GyのX線照射後、L-NAME投与群および非投与群において、照射24時間後または48時間後にH33342を静脈投与した。投与4分後に採材し、凍結切片を作成した。青色はH33342灌流領域を、白線は200 μ mを示す。(C) H33342灌流領域の定量値。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.E.を表している。統計的有意差は、L-NAME非投与群に対して** $p < 0.01$ で示した。また、n.s.は有意差なしを示す。

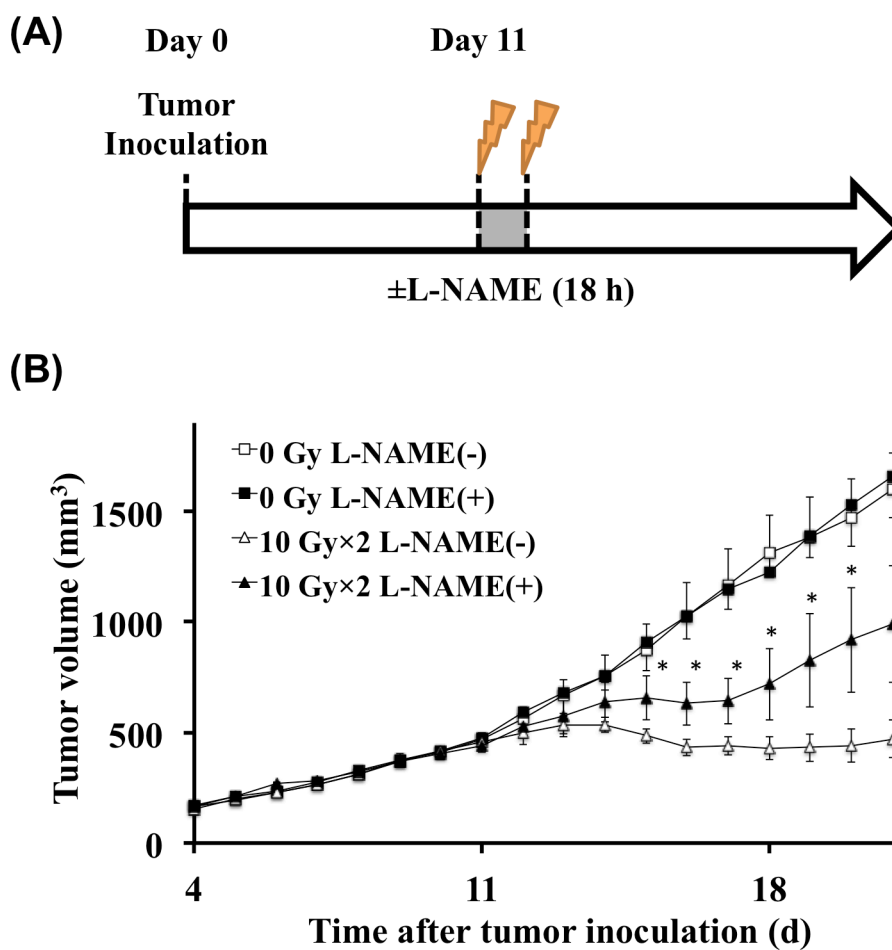


図6. 放射線感受性に及ぼす放射線誘導性NOの効果

(A)放射線治療プロトコルの概要。腫瘍体積が400～500 mm³にて10 GyのX線を照射した。第一照射直後にL-NAMEを腹腔投与し、第二照射直前まで飲水投与した。(B)腫瘍成長抑制試験。グラフのポイントおよびバーは平均±S.E.を表している。統計的有意差は、L-NAME非投与群に対して*p<0.05で示した。

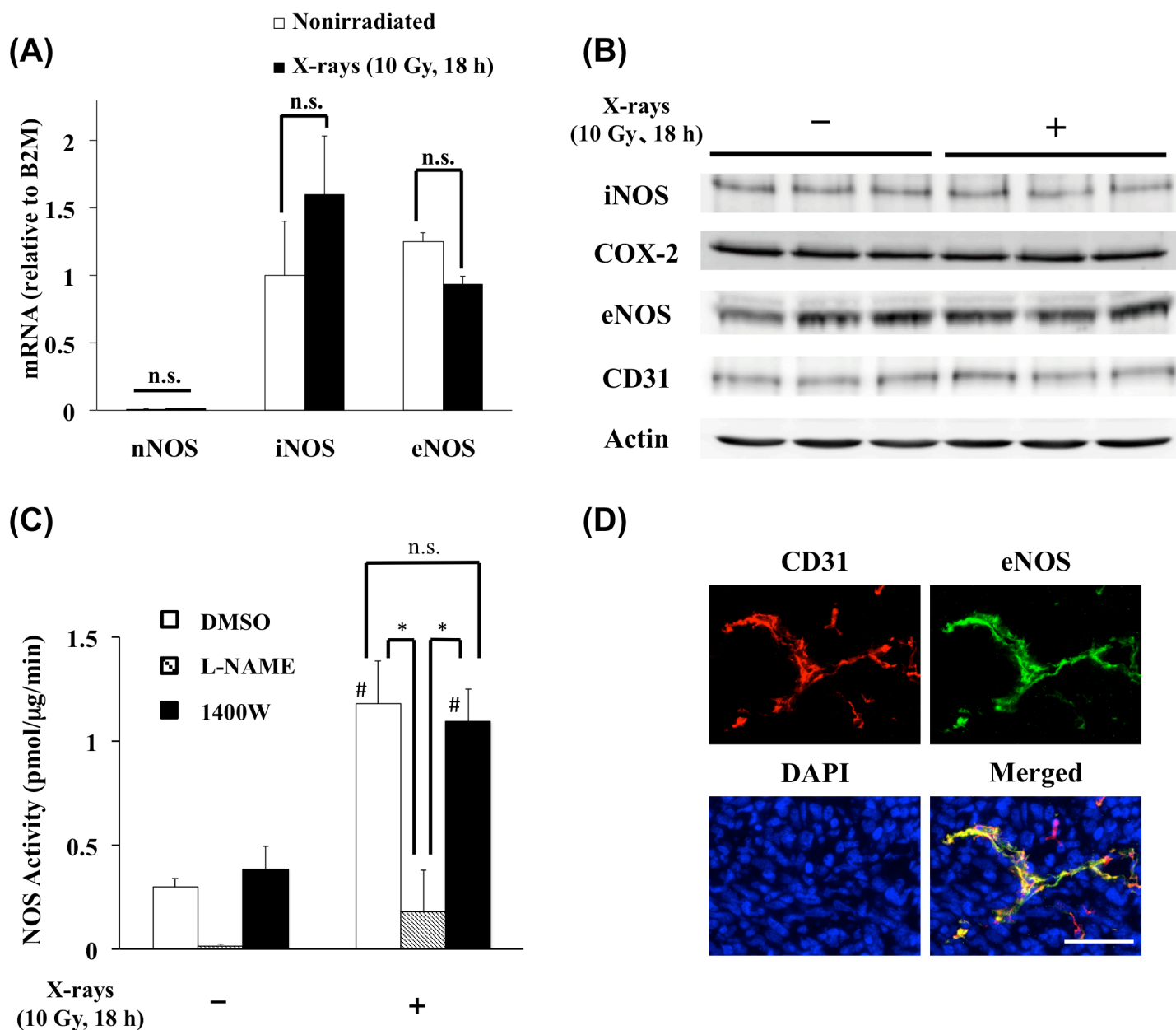


図7. 腫瘍内NOSに及ぼす放射線の効果

(A) 放射線照射後の各NOSアイソフォームのmRNA発現量の評価。10 GyのX線照射18時間後に腫瘍組織を採材しRT-定量PCRにてmRNA発現量を測定した。グラフのカラムおよびバーは平均±S.E.を表している。n.s.は有意差が無いことを示す。(B) 放射線照射後のiNOS、eNOS、COX-2ならびにCD31発現量。3例のマウス移植腫瘍モデルにおいて、照射18時間後にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットをおこなった。(C) 放射線照射後のNOS活性。照射18時間後のタンパク質抽出物においてNOS活性試験をおこなった。また、なお、すべてのサンプルは広域NOS阻害剤および特異的iNOS阻害剤存在下でNOS活性を測定した。グラフのカラムおよびバーは平均±S.E.を表している。統計的有意差は、L-NAME処理条件に対して $*p<0.05$ で示した。また、X線非照射群に対しては $\#p<0.05$ で示した。n.s.は有意差が無いことを示す。(D) eNOSに対する免疫組織化学。赤色はCD31陽性領域、緑色はeNOS陽性領域を示す。白線は50 μmを示す。

4. 考察

固形腫瘍内の放射線応答として、固形腫瘍内の低酸素領域が放射線照射後に減少することが報告されている²⁸。Hall らはこの再酸素化機構に関して、放射線感受性の高い通常酸素領域において細胞死が生じ、酸素消費量が減少することで、残存する低酸素領域へと酸素が供給されるためであると述べている¹¹。加えて、腫瘍内に存在する閉塞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を誘発することが報告されている^{4,11}。しかし、放射線照射後の再酸素化機構に関して、その詳細は明らかではない。

本章ではまず放射線によって起こる再酸素化の経時的变化を、*in vivo* ESR による酸素分圧測定および二種類の低酸素マーカーを用いた二重蛍光染色によって評価し、H33342 を用いた組織灌流量との比較を行った。連続的な組織酸素分圧測定により、放射線は 12 時間後から 24 時間後に急激に酸素分圧を上昇させ、48 時間後以降では照射前より高い酸素分圧で安定した（図 4A）。また、腫瘍内の組織灌流量も 24 時間後、48 時間後で増加が観察された（図 5B、5C）。組織酸素分圧と組織灌流量の変化に伴い、照射 24 時間後および 48 時間後において腫瘍内の低酸素領域は減少していた（図 4D）。組織の酸素環境には、組織灌流以外にも、腫瘍体積や血管新生が関与していることが報告されているが¹⁹、SCCVII 移植腫瘍において照射 24 時間から 48 時間後では、腫瘍体積の減少および血管新生の亢進は観察されなかった（データ未掲載）。また、Crokart らは放射線照射により生じる炎症反応が急性期の再酸素化に関与することを報告しているが⁴、SCCVII 移植腫瘍においてはマクロファージの浸潤は観察されず（データ未掲載）、かつ炎症マーカーの上昇および iNOS の誘導は観察されなかった（図 7B）。以上から、放射線照射後に生じる組織灌流量の上昇が、低酸素領域の再酸素化に関与していることが示唆された。

NO は内因性の血流調節因子として知られており、組織灌流量を増加させることが報告されている²⁵。そこで、放射線誘発再酸素化に対する NO の関与を検討した。放射線

照射後の SCCVII 移植腫瘍内では、タンパク質のニトロ化レベルの上昇が観察され（図 5A）、その上昇は L-NAME 投与により抑制されたため NO 産生が増強していることが示唆された。また、L-NAME 投与は放射線照射 24 時間後に生じた組織酸素分圧の上昇、低酸素領域の減少、および組織灌流量の増加を抑制した。L-NAME が 48 時間における酸素環境の変化に関与しないことから、NO は照射 12 時間後から 24 時間後に生じる再酸素化のみを制御していることが示唆された（図 4、図 5）。興味深いことに、L-NAME を投与し NO 依存性の再酸素化を阻害した群では、分割照射による抗腫瘍効果の有意な抑制が観察された（図 6B）。以上から、放射線誘導性 NO は照射後 12~24 時間程度における血流状態を改善し、低酸素領域を再酸素化することで、固形腫瘍の放射線感受性を制御することが示唆された。また、NO 非依存性である照射 48 時間以降の再酸素化においては、Hall ら¹¹が述べたような放射線誘発性細胞死により生じる再酸素化であると考えられる。

続いて、NO 産生の責任酵素の解明を検討した。ほ乳類細胞には、iNOS、nNOS ならびに eNOS の三種類のアイソフォームが存在している。iNOS は発現量によりその活性制御がなされているが、nNOS および eNOS は発現量だけではなく、リン酸化シグナルにより制御されている¹⁰。SCCVII 移植腫瘍内の mRNA 発現解析により、腫瘍内では nNOS の発現が極めて低いことが明らかとなった（図 7A）。また、放射線照射後の iNOS および eNOS の mRNA およびタンパク質発現量の増加は観察されなかった（図 7A、7B）。しかし、腫瘍組織抽出液中の NOS 活性は照射により上昇しており、その NOS 活性は広域 NOS 阻害剤 L-NAME で阻害されたが、特異的 iNOS 阻害剤 1400W では阻害されなかった（図 7C）。加えて、SCCVII 移植腫瘍において eNOS は血管内皮細胞と共局在していた（図 7D）。以上から、放射線照射は iNOS ではなく、腫瘍内血管に存在する eNOS を活性化し、NO 産生を亢進していることが示唆された。

5. 小括

本章では固形腫瘍の酸素環境に及ぼす放射線誘導性 NO の効果および NO 産生の責任酵素を解明した。マウス扁平上皮がん SCCVII 細胞を C3H/HeJ マウスに移植し固形腫瘍を形成し、放射線照射後の酸素環境の変動を、ESR を用いた組織酸素分圧測定、二種類の低酸素集積性化合物を用いた免疫組織化学ならびに組織灌流量試験によって解析した。X 線照射は腫瘍内の組織酸素分圧を上昇させ、低酸素領域を減少させた。加えて、組織中の灌流量の低下が観察された。一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤 L-NAME の投与によって酸素環境の変化が抑制されたことから、放射線による NO 産生は固形腫瘍の酸素環境を制御していることが解明された。また、分割放射線照射プロトコル中に L-NAME を投与すると、抗腫瘍効果の有意な抑制が観察された。加えて、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 eNOS の活性化が関与していることが明らかとなった。これらの結果から、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 (図 8)。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。



図8. 一酸化窒素(NO)が関与する放射線による再酸素化機構

＜第二章＞

放射線による内皮型一酸化窒素合成酵素活性化機構

1. 序論

第一章では、放射線照射後に腫瘍内の血管内皮細胞における eNOS が活性化し、eNOS 由来の NO 産生が組織灌流量を上昇させ、急性期の再酸素化を生じることを解明した (図 8)。また、この再酸素化が頻回照射時の放射線治療効果増強の一因となっていることが明らかとなった。eNOS は過酸化水素、ずり応力、および紫外線など様々な外的因子により活性化されることが報告されている。また、それらの因子による eNOS 活性化は、刺激に曝露された直後から起こることが知られている²⁵。しかし、ウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) を用いた報告²⁶によると、放射線の場合は照射後 12~24 時間において、持続的に eNOS の活性化に関与する Ser1179 残基のリン酸化が上昇し、そのリン酸化に Akt が関与することが示唆されている。以上の eNOS 活性化までの所要時間および効果時間の差違より、他の外的な刺激因子と異なる放射線特有の活性化経路が存在すると考えられるがその詳細については明らかとなっていない。

一般的な NOS 活性化機構に関して、eNOS はリン酸化修飾により活性化することが知られており、Ser1179 残基におけるリン酸化がその酵素活性に密接に関わっている⁵。一方、放射線は DNA 損傷を引き起こすため、細胞内では DNA 損傷に応答する広範なリン酸化シグナルカスケードが誘導される。特に Ataxia telangiectasia mutated (ATM) キナーゼはその中心的役割を示し、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²⁷。以上の知見から、すでに報告されている Akt に加えて、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り、eNOS 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。

加えて、Dote らは、核内に存在する HSP90 が DNA 損傷修復において ATM の損傷部

位への集積と安定化に関与しており、適切な DNA 二本鎖切断修復に必須であることを報告している⁶。細胞内分子シャペロンである HSP90 は細胞質に多く存在するタンパク質である。HSP90 と相互作用するタンパク質にはリン酸化酵素などの様な、細胞増殖・生存に必須なシグナル伝達分子が多く含まれ、クライアントタンパク質が正しくシグナルに応答して機能する為の補助因子として ATP 依存的に働いている²⁹。よって、HSP90 は DNA 損傷応答を制御する ATM の集積・活性化の修飾により、放射線照射後の eNOS 活性化に関与していることが考えられた。

本章では、BAEC を用いて *in vitro* における放射線照射後の NOS 活性を評価した。加えて、放射線照射後の eNOS のリン酸化状態をウェスタンブロットにて検討するとともに、これに対する ATM および HSP90 の関与を検討した。

2. 材料および方法

2-1. 試薬

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) は Life Technologies Corporation から購入した。ATM 阻害剤 Ku-60019 は Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) より、HSP90 阻害剤 geldanamycin は Focus Biomolecules (Fort Washington, PA, USA) より購入した。

抗 eNOS 抗体 (ab66127)、抗 eNOS-pSer1179 抗体 (ab87750)、抗 CD31 抗体 (ab28364)、抗 iNOS 抗体 (ab3523) は Abcam (Cambridge, MA, USA) より購入した。抗 ATM-pSer1981 抗体 (200-301-500) は Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA) より購入した。抗 eNOS-pThr497 抗体 (sc-19827)、抗 COX-2 抗体 (sc-1746)、抗 Actin 抗体 (sc-1615)、および HRP 標識二次抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。また、AlexaFluor[®]488 または 555 標識二次抗体は Life Technologies Corporation から購入した。特に記載の無い一般試薬については和光純薬 (大阪) から購入した。

2-2. 細胞培養

ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC; Cell Systems, Kirkland, WA, USA) は 10 % FBS を含む DMEM 培地中で加湿、37℃ならびに 5% CO₂ 条件下で培養した。すべての実験は 5～9 継代の細胞を使用した。

2-3. NOS 活性試験

[¹⁴C]-L-arginine (比活性 10.138 Bq/pmol) および NOS Activity Assay Kit を使用し、製造元のプロトコルに従って培養細胞中の NOS 活性を測定した。X 線照射後の培養細胞をスクレイパーにより回収し、秤量後に液体窒素にて凍結した。組織試料 1 mg あたり 1 μl の Homogenization Buffer C (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% Triton-X100, 1 μM PMSF, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml pepstatin) を添加

し、氷上で 10 秒間、3 回の超音波処理を行い、 $20,000\times g$ で 20 分遠心した。得られた上清を Reaction Buffer (25 mM Tris-HCl [pH7.4], 3 μ M BH₄, 1 μ M FAD, 1.25 mM NADPH, 0.5 μ Ci [¹⁴C]-L-arginine, 0.75 mM CaCl₂, 0.1 μ M CaM)と混合し、37℃、60 分間反応させた。得られた反応液に 8 倍量の氷冷 Stop Buffer (50 mM HEPES [pH5.5], 5 mM EDTA) を添加し反応を停止させた。陽イオン交換樹脂中を通過させ [¹⁴C]-L-arginine を除いた後、反応液中の [¹⁴C]-L-citrulline を液体シンチレーションカウンタで計数した。すべての試料に対し Bio-Rad Protein Assay Kit のプロトコルに従ってタンパク質濃度の定量を行い、NOS 活性 (pmol/ μ g/min) を算出した。また、試料中の NOS 活性を阻害するため、0.1% DMSO、20 mM 広域 NOS 阻害剤 L-NAME、および 10 μ M 特異的 iNOS 阻害剤 1400W 存在下で NOS 活性の測定を行った。

2-4. ウェスタンブロッティング

X 線照射後の細胞をスクレイパーにて採取し、 $20,000\times g$ 、4℃、2 分間遠心し回収した。凍結融解の後、50 μ l の氷冷 Lysis 緩衝液 (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 300 mM NaCl, 10% glycerol, 3 mM EDTA, 1mM MgCl₂, 25 mM NaF, 1% Triton X-100, 50 mM β -glycerophosphate, 1 μ M PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml pepstatin, 1 μ M DTT) を加え、10 秒間、3 回の超音波処理を行い、 $20,000\times g$ で 20 分遠心した。得られた上清をタンパク質試料とし、Bio-Rad Protein Assay Kit のプロトコルに従ってタンパク質濃度の定量を行い、各試料の濃度を統一した。Laemmli's sample Buffer (0.1875 M Tris-HCl [pH 6.8], 15% β -mercaptoethanol、6% SDS、30% glycerol、0.006% bromophenol blue) を試料に加え、沸騰水で 3 分間加熱処理し泳動試料とした。試料は SDS-PAGE 電気泳動装置でタンパク質を分離し、転写装置を用いてニトロセルロース膜に 100 V、1 時間転写した。eNOS-pSer1179、eNOS-pThr497 ならび eNOS を検出する場合には、ニトロセルロース膜を 5% BSA を含む TBST にて 1 時間ブロッキングした。その後、5% BSA

を含む TBST で 1500 倍希釈した一次抗体を添加した。また、Actin を検出する場合は、5% 低脂肪スキムミルクを含む TBST にて 1 時間ブロッキングした後、5% 低脂肪スキムミルクを含む TBST 溶液にて 1,000 倍希釈した一次抗体にメンブレンを浸し、4℃で一晩処理した。TBST にて 3 回、10 分洗浄後、5% 低脂肪スキムミルクを含む TBST により 3000 倍希釈した HRP 標識二次抗体にメンブレンを浸し室温、1 時間処理した。その後、化学発光基質（Western Lightning[®] Plus-ECL）を添加し、LAS 4000 mini にてバンドの検出を行った。

2-5. 免疫蛍光法

細胞をカバーガラス上に播種し、48 時間培養した。1 時間の薬剤処理後、X 線を照射し、1 時間後または 6 時間後に 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS で 4℃、20 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、5%ヤギ血清および 1%BSA を含む PBS で室温、30 分反応させブロッキングした。ブロッキング液を除去後、5%ヤギ血清、1% BSA ならびに 0.01% Triton X-100 を含む PBS で希釈した抗 ATM-pSer1981 抗体（1:1000）にて 4℃、一晩処理した。PBS にて 3 回、2 分洗浄後、5%ヤギ血清を含む PBS に 2,000 倍希釈した Alexafluor[®]488 標識抗マウス IgG にて室温、1 時間処理した。PBS にて 3 回、2 分洗浄後、300 nM の 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）を含む PBS により 20 分染色した。ProLong[®] Gold Antifade Reagent により封入後、蛍光画像を LSM700 共焦点顕微鏡ならびに Zeiss Efficient Navigator software（Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）を用いて倍率 1,000 倍で撮像した。

2-6. 統計処理

群間比較の統計的有意性は、F 検定による分散比の検定ならびに *t*-検定により行った。危険率が $p < 0.05$ の際に有意差有りとした。

3. 結果

3-1. NOS 活性に及ぼす放射線の効果

放射線照射後の BAEC における NOS 活性を測定した。10 Gy の X 線照射により、NOS 活性はゆるやかに上昇し、照射 12 時間後および 24 時間後において有意な NOS 活性の上昇が観察された (図 9A)。同様に 5、10 ならびに 15 Gy の X 線を照射したところ、照射 12 時間後の時点ですべての線量において 1.5 倍程度の NOS 活性の上昇を示した (図 9B)。続いて、放射線照射後の NOS 活性化の責任酵素を解析した。第一章と同様に、NOS 活性試験において広域 NOS 阻害剤 L-NAME および特異的 iNOS 阻害剤 1400W 存在下において NOS 活性を測定した。DMSO 存在下では、放射線照射後の NOS 活性は有意な増加を示した。続いて、BAEC 抽出液の NOS 活性を広域 NOS 阻害剤 L-NAME および特異的 iNOS 阻害剤 1400W 存在下で測定した。照射および非照射群において、L-NAME 存在下では NOS 活性は有意に抑制された。しかし、1400W 存在下ではそれらの NOS 活性は抑制作用を示さず、照射群において有意な NOS 活性の上昇が観察された (図 9C)。以上から、放射線照射によって持続的な NOS 活性化が生じること、またその活性が iNOS に由来しないことが示唆された。

3-2. eNOS リン酸化状態に及ぼす放射線の効果

タンパク質発現量に依存する誘導型 NOS(iNOS)と異なり、構成型 NOS(cNOS)の活性化は翻訳後修飾により制御される²⁵。cNOS のうち血管内皮細胞に存在する eNOS では複数のセリン残基およびスレオニン残基のリン酸化修飾により機能調節を受けることが報告されている²⁵。そこで X 線照射後の eNOS リン酸化状態をウェスタンブロットにより評価したところ、照射 3~24 時間後において NO 産生を亢進させる Ser1179 残基の有意なリン酸化レベルの上昇が観察された (図 10A、10B)。また抑制性のリン酸化部位である Thr497 残基は照射 12 時間以降で脱リン酸化していた (図 10B)。以上の結果

より、放射線照射は eNOS-Ser1179 残基をリン酸化することで、持続的な活性化を誘導することが示唆された。

3-3. 放射線による eNOS 活性化に対する ATM の関与

ATM は DNA 損傷センサータンパク質であり、様々なリン酸化シグナルカスケードを誘導する。特に放射線照射により核内で生成される DNA 二本鎖切断部位に集積し、自己リン酸化を経て、DNA 損傷修復や細胞周期制御などの DNA 損傷応答を誘導する³。そこで本研究では、放射線照射後の eNOS 活性化に及ぼす ATM の関与を検討した。免疫蛍光法により Ser1981 のリン酸化 ATM の局在を調べたところ、X 線照射によって照射 30 分後から 24 時間まで持続的な核内 ATM のリン酸化を誘導した (図 11A)。また、ATM 阻害剤である Ku-60019 はこの X 線による ATM のリン酸化を阻害した。次に放射線照射後に生じる eNOS リン酸化への ATM の関与をウェスタンブロットにより検討したところ、Ku-60019 処理により X 線照射後の eNOS-Ser1179 リン酸化が抑制された (図 11B)。加えて、Ku-60019 処理は X 線照射後の NOS 活性の上昇を抑制した (図 11C)。以上の結果から、放射線照射後に生じる ATM のリン酸化がその後の eNOS 活性化に関与していることが示唆された。

3-4. 放射線による ATM リン酸化および eNOS 活性化に対する HSP90 の関与

分子シャペロンである HSP90 は細胞内に多く存在するタンパク質であり、核内の HSP90 が DNA 損傷修復機構を調節していることが報告された⁶。そこで本研究では、ATM から生じる DNA 損傷応答および eNOS リン酸化に及ぼす HSP90 の効果をそのシャペロン機能を阻害する geldanamycin を用いて評価した。免疫蛍光法により、geldanamycin 処理は照射後の ATM-Ser1981 リン酸化を阻害することが明らかとなった (図 12A)。また、HSP90 は誘導型の HSP90 α および構成型の HSP90 β に分類されるが、

放射線照射後の HSP90 α 発現量の増加は観察されなかった。以上から、HSP90 は ATM リン酸化を介した DNA 損傷応答に関与していること、またこの関与には HSP90 自身のタンパク質発現量は依存しないことが示唆された。

続いて、放射線照射後の eNOS リン酸化および活性化への HSP90 の関与を検討した。geldanamycin 処理は、X 線照射後の eNOS-Ser1179 リン酸化を抑制し（図 12C）、さらに NOS 活性の上昇を阻害した（図 12D）。以上より、HSP90 は核内における ATM のリン酸化を制御することで、eNOS 活性化に関与することが示唆された。

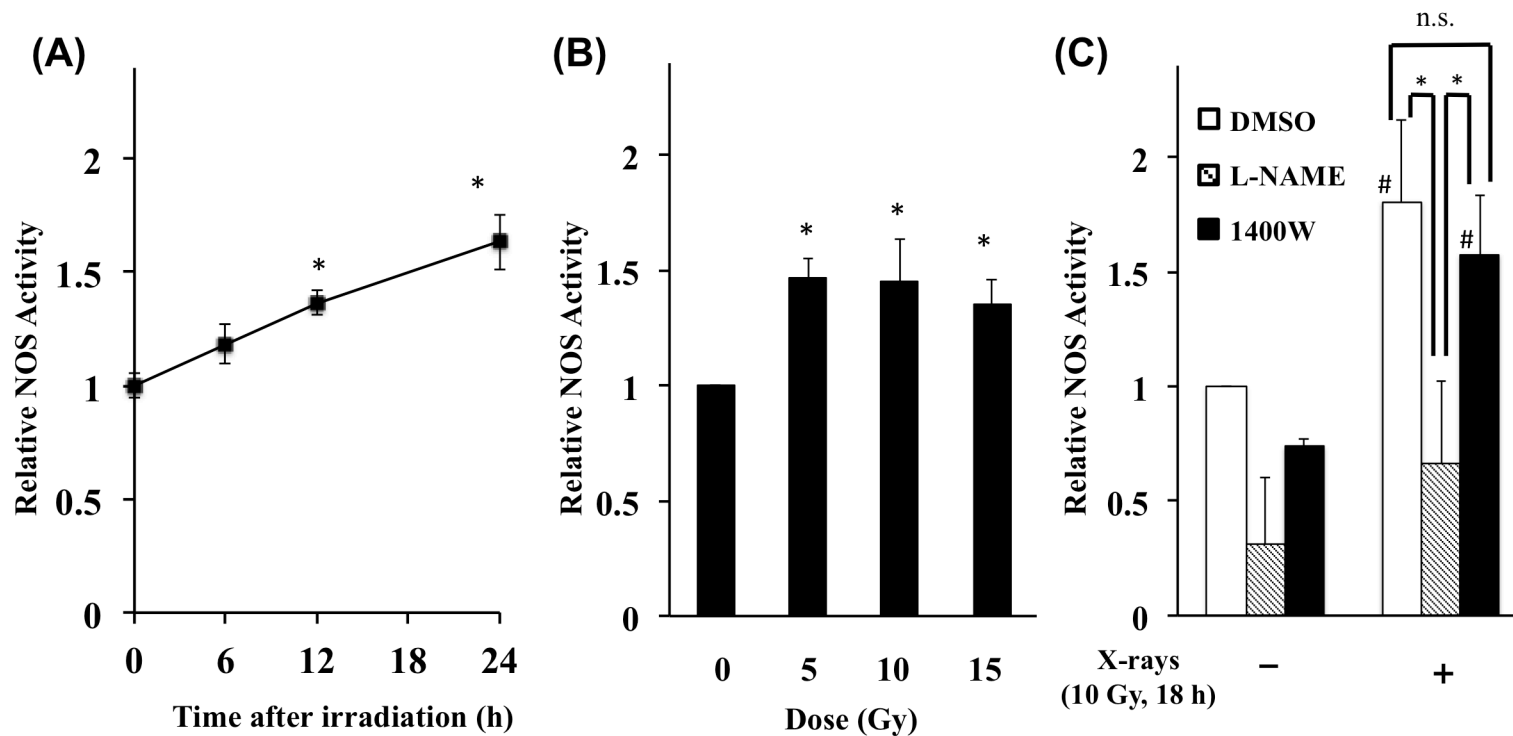


図9. NOS活性に及ぼす放射線の効果

(A)放射線照射後のNOS活性。10 GyのX線照射後に採材し、NOS Activity Assay KitにてNOS活性を測定した。グラフのポイントおよびバーは平均±S.D.を表している。統計的有意差は、非照射群に対して $p<0.05$ で示した。(B)5、10、ならびに15 Gy照射後のNOS活性。グラフのカラムおよびバーは平均±S.D.を表している。非照射群に対して $p<0.05$ で示した。(C)NOS阻害剤存在下におけるNOS活性の評価。10 GyのX線照射12時間後に採材し、広域NOS阻害剤L-NAME (20 mM) および特異的iNOS阻害剤1400W (10 μ M) 存在下でNOS活性を測定した。グラフのカラムおよびバーは平均±S.D.を表している。統計的有意差は、L-NAME処理条件に対して $p<0.05$ で示した。また、X線非照射条件に対しては# $p<0.05$ で示した。

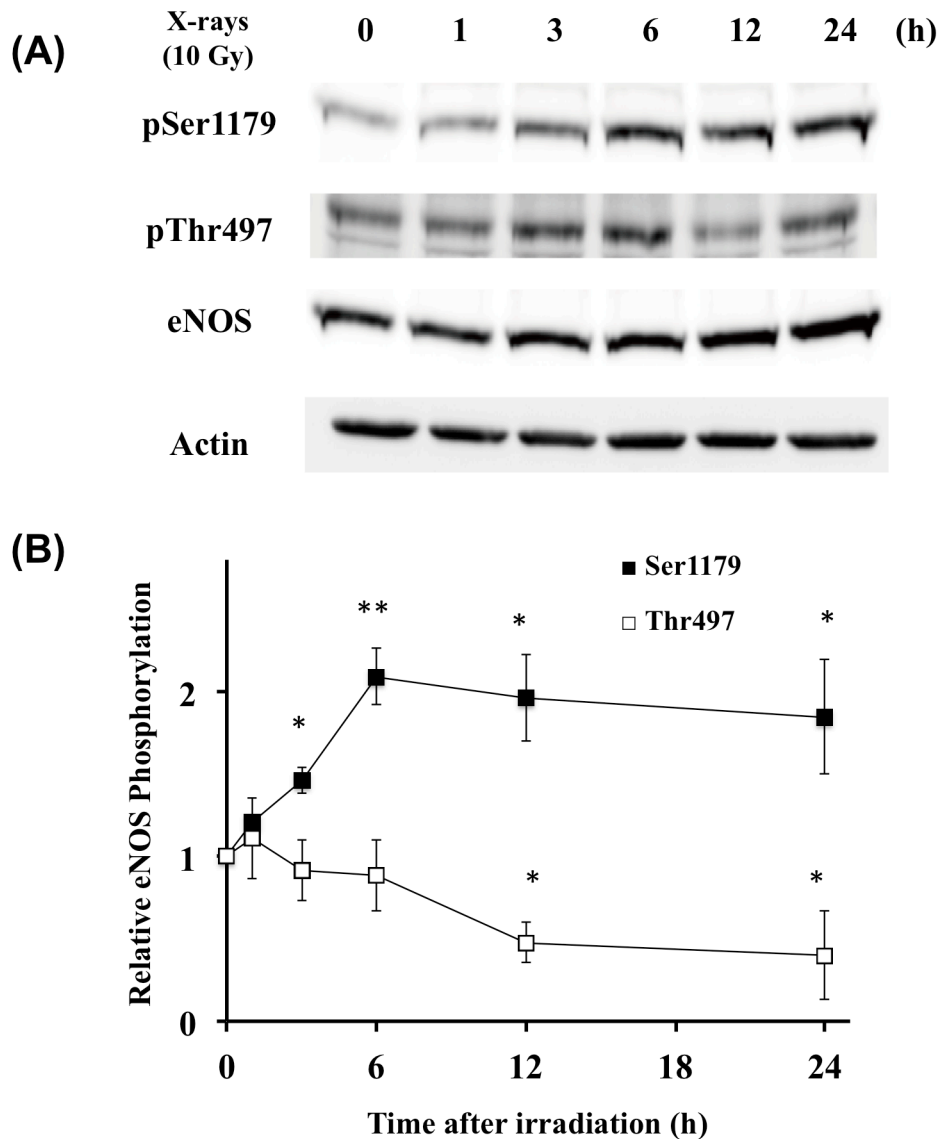


図10. eNOSリン酸化状態に及ぼす放射線の効果

(A)放射線照射後のeNOSリン酸化状態の評価。10 GyのX線照射後に各時点で採材し、ウェスタンブロットにてeNOSおよびそのリン酸化を評価した。(B)eNOSリン酸化状態の定量値。グラフのポイントおよびバーは平均±S.D.を表している。統計的有意差は、非照射群に対して*p<0.05または**p<0.01で示した。

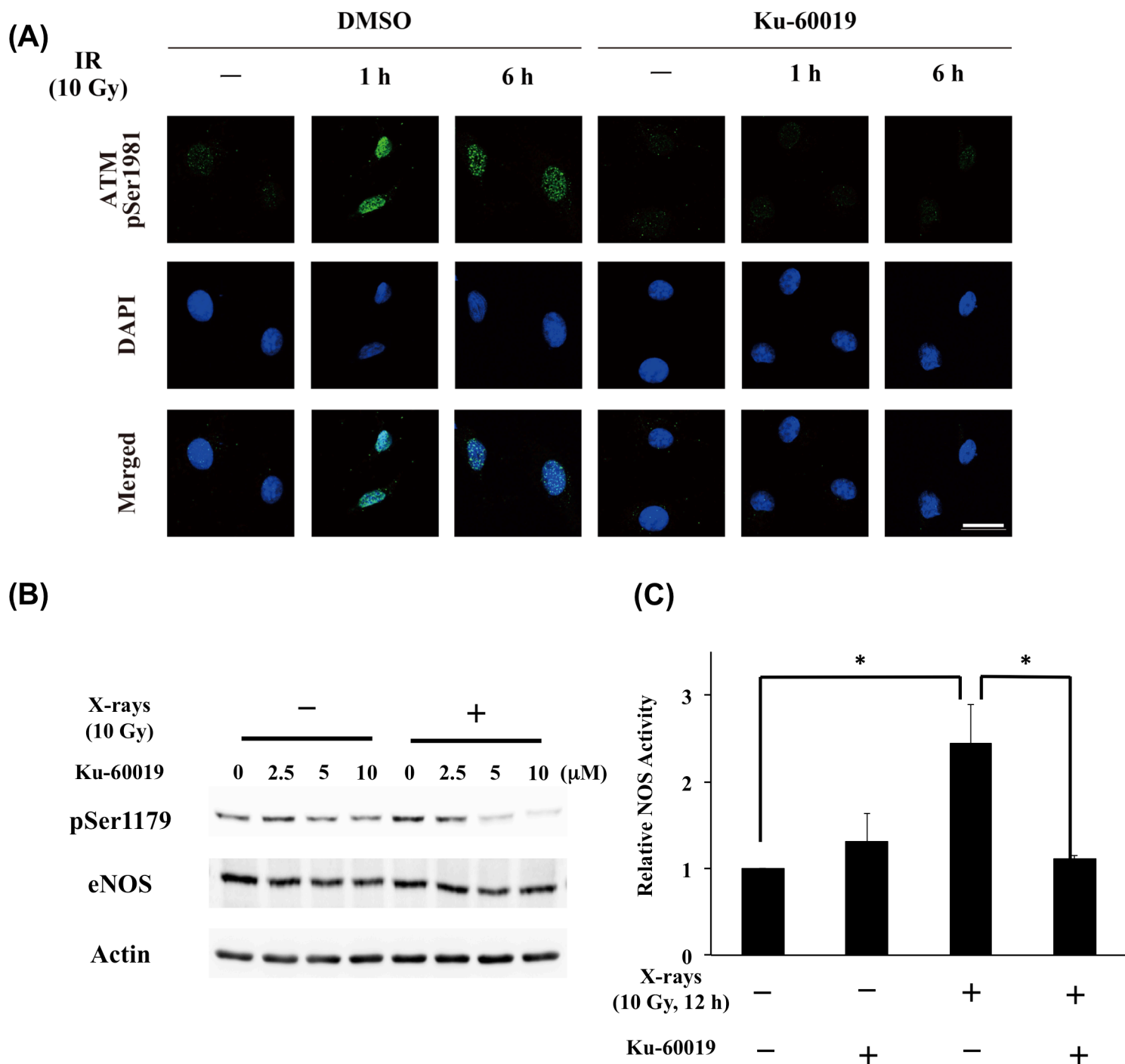


図11. 放射線照射後のeNOSリン酸化状態に及ぼすATMの関与

(A) 放射線照射後のATMリン酸化状態の評価。10 GyのX線照射後に各時点で採材し、免疫蛍光法にて核内のリン酸化を評価した。白線は20 μmを示す。(B) ATM阻害剤処理下におけるeNOSリン酸化状態の評価。10 GyのX線照射6時間後に採材し、ウェスタンブロットにてeNOSのリン酸化状態を評価した。(C) ATM阻害剤処理下におけるNOS活性の評価。10 GyのX線照射12時間後に採材し、NOS活性試験にてNOS活性を評価した。グラフのカラムおよびバーは平均±S.D.を表している。統計的有意差は、照射群に対して*p<0.05で示した。

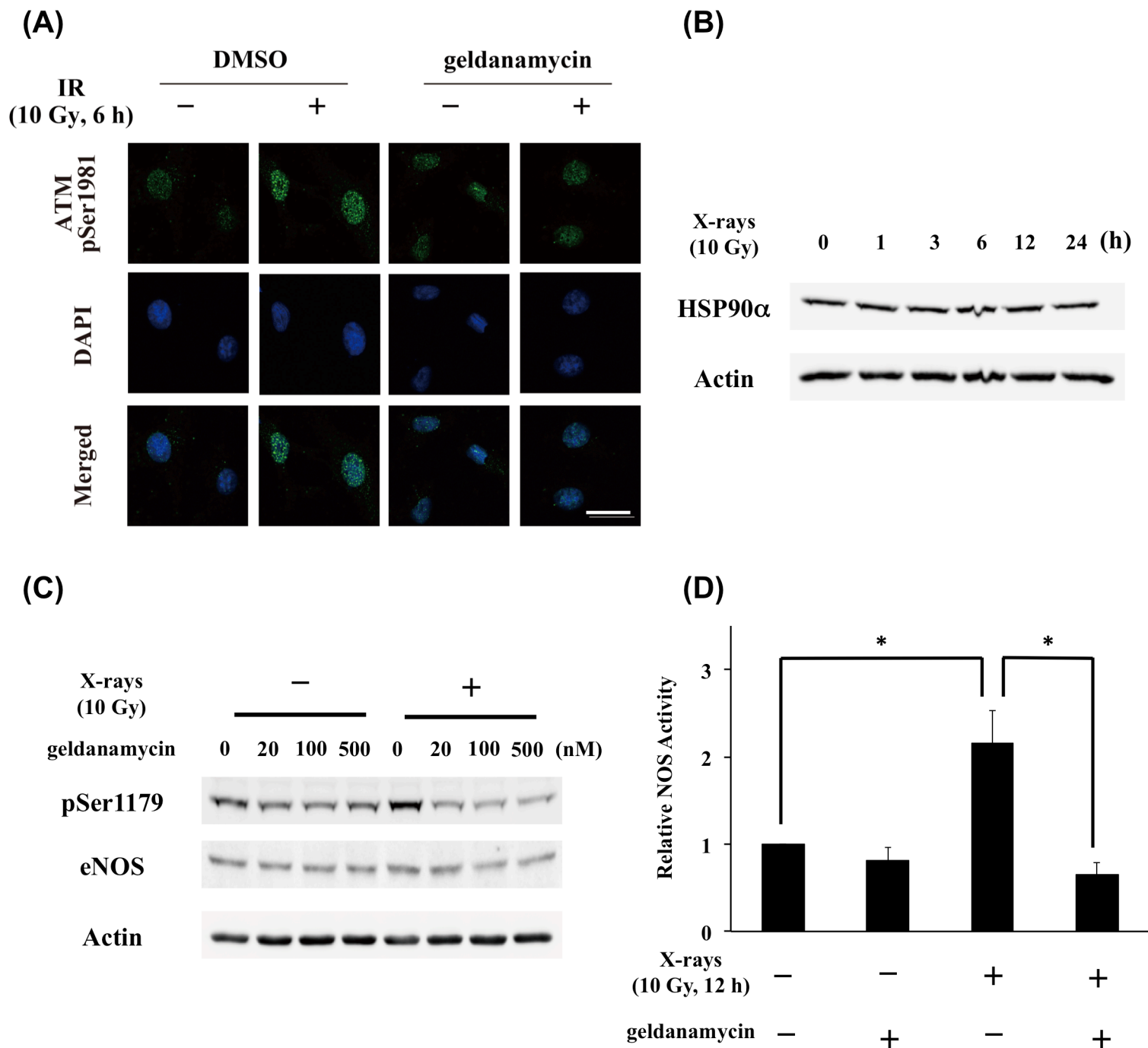


図12. 放射線照射後のeNOSリン酸化状態に及ぼすHSP90の関与

(A)放射線照射後のATMリン酸化状態の評価。HSP90阻害剤処理下において、10 GyのX線照射6時間後に採材し、免疫蛍光法にて核内のリン酸化を評価した。白線は20 μ mを示す。(B) HSP90発現量に及ぼす放射線照射による効果。10 GyのX線照射後に各時点で採材し、ウェスタンブロットにてHSP90 α 発現量进行评估した。(C) HSP90阻害剤処理下におけるeNOSリン酸化状態の評価。10 GyのX線照射6時間後に採材し、ウェスタンブロットにてeNOSのリン酸化状態进行评估した。(D) HSP90阻害剤処理下におけるNOS活性の評価。10 GyのX線照射12時間後に採材し、NOS活性試験にてNOS活性进行评估した。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.D.を表している。統計的有意差は、照射群に対して*p<0.05で示した。

4. 考察

NOS における NO 産生機構は以下の様に考えられている。eNOS の C 末端に存在する reductase domain において NADPH より電子を受け取り、FAD および FMN を介して N 末端の oxygenase domain へと伝達する。基質である L-arginine および酸素分子、ならびに補因子である BH₄ が oxygenase domain に結合することで、活性中心であるヘムを介した L-arginine の酸化反応が生じる¹⁰。産生された NO は様々な酵素やタンパク質と相互作用するが、NO が介する最も重要な生理機能は、guanylyl cyclase の活性化と cyclic GMP の生成である。NOS から生成された NO は、内皮細胞を裏打ちする血管平滑筋へと速やかに拡散する。血管平滑筋において、NO は cyclic GMP を誘導することで血管平滑筋を弛緩させ、血流および血圧調節機構を制御することが報告されている²⁵。血管内皮細胞においては eNOS が主な NO 発生源であることから、eNOS からの NO 産生機構は循環器系においての重要な制御因子である。前章において、放射線は腫瘍内で eNOS を活性化すること、また NO 産生の亢進により組織灌流量が増加し、固形腫瘍内に存在する低酸素領域の再酸素化に関与することを解明した²¹。腫瘍内における NO 産生は放射線抵抗性に深く関与することを示しており、その活性化メカニズムの解明が必要である。しかし、現在まで放射線による eNOS 活性化機構に関する報告は少ない。そこで、第二章ではウシ大動脈内皮細胞において放射線照射後の eNOS リン酸化機構を解明することを目的とした。

ほ乳類における NO 合成酵素は、その制御機構から誘導型および構成型に分類される。発現量によって制御される誘導型と異なり、構成型はリン酸化修飾により厳格に制御されている¹⁰。構成型に属する eNOS は外部ストレスに応答し、Phosphoinositide 3-kinase/Akt 経路を介して Ser1179 残基がリン酸化され活性化されることが知られている⁵。また、Vascular endothelial growth factor や bradykinin は phospholipase C- γ を活性化し、小胞体からカルシウムを放出させる。細胞内カルシウムの増加は脱リン酸化酵素を

活性化し、Thr497 残基の脱リン酸化を促進する。Thr497 残基の脱リン酸化によって eNOS の calmodulin (CaM) 結合領域が露出し、CaM と eNOS が結合する⁷。これら Ser1179 残基のリン酸化および Thr497 残基の脱リン酸化は、NADPH から eNOS の活性中心への電子の移動を促進させるため、その酵素活性を上昇させることが報告されている¹⁰。

現在まで報告されている eNOS 活性化因子は刺激直後における eNOS リン酸化を誘導する^{10,24}。しかし、第一章から得られた知見や、BAEC を含む複数の血管内皮細胞を用いた報告によると、放射線は照射後 12~24 時間において持続的に eNOS を活性化することが報告されている^{21,26}。本研究においても、放射線は照射 12~24 時間後に NOS 活性を増強した (図 9A、9B)。また、その活性に対し広域 NOS 阻害剤 L-NAME は阻害作用を示したが、iNOS 特異的阻害剤 1400W の阻害作用は観察されなかった (図 9C)。1 μ M 以上の 1400W 処理は同程度の NO 産生を起こすマウスマクロファージ由来の iNOS 活性を完全に阻害した (データ未掲載)。加えて、同時点において、eNOS 活性化に関わる Ser1179 のリン酸化レベルの上昇、Thr497 の脱リン酸化が観察された (図 10)。よって、放射線照射は eNOS を持続的にリン酸化し、その活性を増強することが示唆された。

放射線は DNA 二本鎖切断を引き起こし、ATM のリン酸化から続く DNA 損傷応答を誘導する。DNA 損傷応答の下流には数多くのリン酸化酵素が関与しており、放射線はこれらのリン酸化シグナルを持続的に活性化することが知られている。DNA 損傷応答に関与する代表的なリン酸化酵素としては Protein kinase A、Akt、AMP-dependent protein kinase、Chk1 などが知られており、これらのリン酸化酵素は eNOS を基質とすることが報告されている^{20,24}。本研究では X 線照射により、照射 1 時間後から 6 時間後において、核内における ATM-Ser1981 のリン酸化が観察された (図 11A)。ATM の Ser1981 残基は DNA 二本鎖切断によって誘導される自己リン酸化部位であり、そのキナーゼ活性を

増強する事が知られている³。加えて、ATM 阻害剤 Ku-60019 処理により、照射による eNOS リン酸化レベルの上昇および活性化の抑制が観察された（図 11B、11C）。ATM は DNA 修復の主制御因子であり、細胞核に局在することが知られている²⁷。近年、リン酸化された ATM が細胞質へ拡散することが報告されており¹⁴、前述の ATM の下流に存在するリン酸化酵素は、細胞質において eNOS を基質とすることが知られている。以上より、DNA 二本鎖切断が誘導する DNA 損傷応答により ATM 含む複数のリン酸化酵素が細胞質における eNOS の活性化に関与していることが示唆された。

本研究では、放射線照射後に Ser1179 リン酸化に遅れて Thr497 の脱リン酸化が観察された（図 10B）。Thr497 の脱リン酸化は eNOS と CaM との親和性を高め、放射線による eNOS 活性化を増強していることが考えられる。eNOS-Thr497 は基底状態においてリン酸化されており、小胞体からのカルシウム放出により活性化した protein phosphatase1 や protein phosphatase2 により脱リン酸化される⁷。また、これらの脱リン酸化酵素は DNA 損傷応答にも関与し、ATM より生じるリン酸化シグナルカスケードを抑制的に制御している。よって、放射線照射後の Thr497 残基の脱リン酸化がカルシウム依存性であるのか、Ser1179 残基のリン酸化と同様に DNA 損傷応答による事象であるのか、さらなる検討が必要である。

本研究では HSP90 阻害剤 geldanamycin が放射線照射後の ATM リン酸化を抑制する事を示した（図 12A）。さらに geldanamycin は eNOS-Ser1179 リン酸化を抑制し、NOS 活性の上昇を抑制した（図 12B、12C）。シャペロンタンパク質である HSP90 はリン酸化酵素など、細胞増殖・生存に必須なシグナル伝達分子と相互作用し、クライアントタンパク質が正しくシグナルに応答して機能する為に ATP 依存的に働いている²⁹。Dote らは、核内の HSP90 が DNA 損傷修復において、ATM の二本鎖切断部位への集積に関与することを報告している⁶。また、Oda らは ATM の損傷部位への集積に関与する Mre11-Rad50-Nbs1 複合体の安定化に関与することを報告している^{3,22,27}。以上から、

HSP90 は DNA 損傷応答における ATM の集積・リン酸化を修飾することで eNOS リン酸化に関与することが示唆された。

現在報告されている eNOS 活性化経路において、HSP90 は eNOS と直接的に相互作用することで、Akt や Chk1 などのリン酸化酵素と eNOS の親和性を上昇させ、Ser1179 残基のリン酸化を亢進させることが報告されている^{9,24}。しかし、本研究で geldanamycin は DNA 損傷から生じる ATM のリン酸化自体を抑制したため、HSP90 はリン酸化シグナルカスケードの始点における調節因子であることが示唆された。よって、放射線による eNOS 活性化においては、他の eNOS 活性化因子で観察される HSP90 と eNOS との直接的な相互作用だけではなく、その上流において ATM を介した eNOS リン酸化経路に関与していることが示唆された。

5. 小括

前章において、放射線は腫瘍内で eNOS を活性化すること、また NO 産生の亢進により組織灌流量が増加し、固形腫瘍内に存在する低酸素領域を再酸素化することを解明した。eNOS の活性化機構は様々なリン酸化酵素のシグナルにより調節されている。しかし、現在まで放射線による eNOS リン酸化機構に関する報告は少ない。そこで第二章ではウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) において放射線照射後の eNOS リン酸化機構を解明することを目的とした。BAEC を X 線照射すると、eNOS-Ser1179 残基のリン酸化が亢進すると共に、NOS 活性の上昇が観察された。放射線は DNA 鎖切断を形成し、DNA 損傷センサータンパク質である ATM を起点とする DNA 損傷応答を誘導することが知られている。加えて、HSP90 阻害剤は ATM および eNOS のリン酸化を抑制した。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 (図 13)。

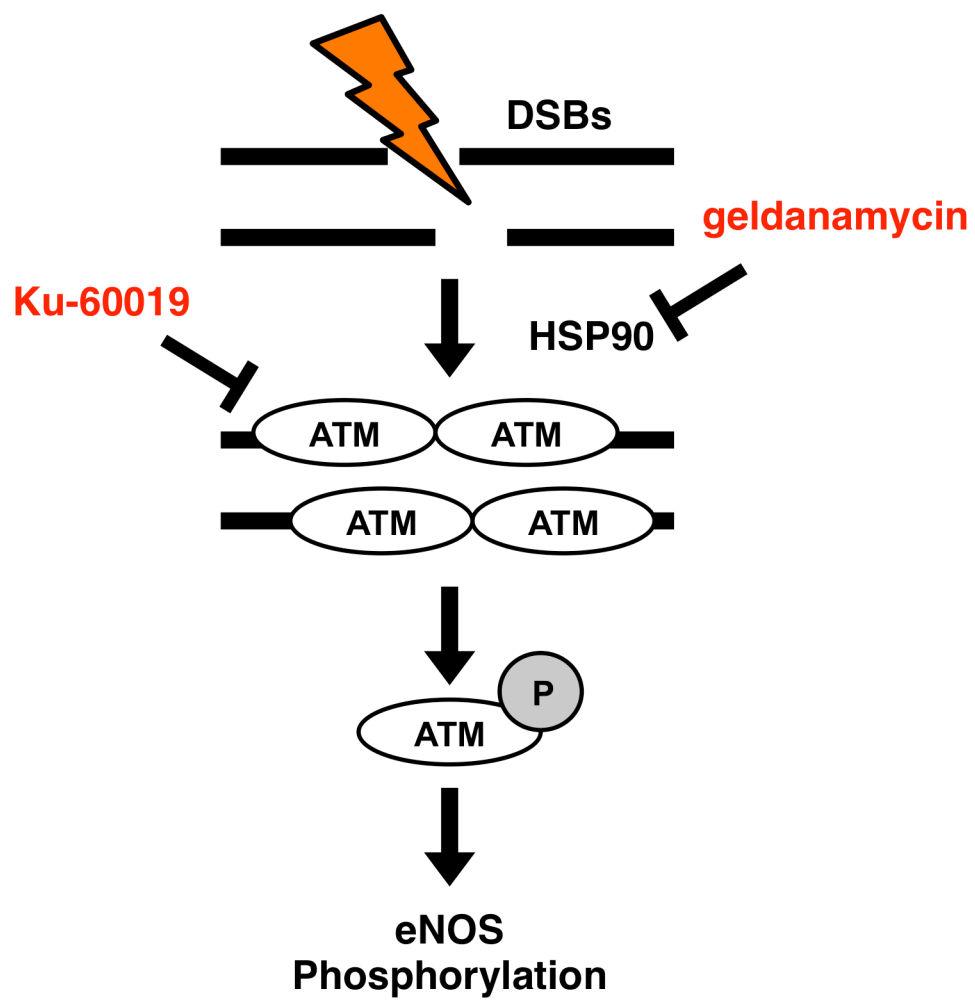


図13. 放射線によるeNOSリン酸化機構

<総括>

現在のがん治療において、放射線療法は外科的療法に並び広く選択されている治療法である。しかし、その抗腫瘍効果は充分であるとは言えず、確実な抗がん作用を得るために高線量が正常組織を含む腫瘍周辺部へと照射されているのが現状である。そのため、周辺領域における被ばくを最小限にし、腫瘍組織のみを限局して傷害する治療戦略が必要である。酸素分子は生体内に存在する内因性の放射線増感剤であり、強力な増感効果を示す。特に、低 LET 線である X 線においてはその抗腫瘍作用を 2~3 倍増感することが知られている¹¹。しかし、固形腫瘍内では酸素供給と酸素消費の不均衡を原因として低酸素領域が形成される。よって、腫瘍内の低酸素細胞では酸素効果の減弱によって放射線感受性が低下し、放射線治療後の再発や転移の原因となることが報告されている。1972 年、Kallman は放射線により固形腫瘍の低酸素領域が減少することを報告した¹⁷。現在の放射線治療では大線量の単回照射ではなく、この低酸素領域の再酸素化現象を利用した分割照射が適用されている。しかし再酸素化の発見以来、その詳細な機構は未だ不明であった。

第一章において、マウス扁平上皮がん SCCVII 細胞を C3H/HeJ マウスに移植し移植腫瘍モデルを作成し、放射線照射後の腫瘍内酸素環境の変化を評価した。腫瘍内組織酸素分圧は照射後 12 時間~24 時間において急激に上昇した後、減少傾向を示したが、照射 120 時間後まで照射前より高い酸素分圧で安定した。また、組織灌流量は照射 24 時間後、48 時間後で有意に上昇していた。加えて、腫瘍内の低酸素領域の再酸素化が観察された。また、NOS 合成酵素阻害剤である L-NAME を用いて、本研究では再酸素化に及ぼす NO の効果を検討した。L-NAME の投与により、放射線照射 12~24 時間後に生じる再酸素化の抑制が観察された。また、mRNA 解析、ウェスタンブロットならびに NOS 活性試験によって放射線照射後に eNOS 活性が上昇することが示された。また、SCCVII 移植腫瘍内にて eNOS は血管内皮細胞へ局在していた。以上から、放射線は血

管内皮細胞の eNOS を活性化し、組織灌流量を増加させることで低酸素領域を再酸素化することが明らかとなった。

第二章においては、ウシ大動脈内皮細胞において、放射線照射による eNOS 活性化機構を検討した。放射線照射により NOS 活性および eNOS-Ser1179 のリン酸化レベルの上昇が観察された。放射線は DNA 二本鎖切断を引き起こし、ATM のリン酸化から続く DNA 損傷応答を誘導する。また、DNA 損傷応答の下流には Chk1 や Chk2 など多くのリン酸化酵素が関与しており、放射線はこれらのリン酸化シグナルを持続的に活性化することが知られている。そこで本研究では、eNOS リン酸化に対する DNA 損傷応答の関与を検討した。ATM 阻害剤 Ku-60019 処理は照射後の eNOS リン酸化を抑制した。また、ATM の損傷部位への集積を制御する HSP90 の阻害剤 geldanamycin 処理は照射後の ATM リン酸化および eNOS リン酸化を抑制した。以上から、固形腫瘍の再酸素化に関与する eNOS リン酸化は、HSP90/ATM 経路による DNA 損傷応答を起点としていることが示唆された。

以上のように、本研究では放射線照射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。

本研究で示された HSP90/ATM 経路による eNOS の活性化は、放射線照射による限定的な血流調節が可能であることを示唆している。血管は抗がん剤投与の主経路であるため、腫瘍部における血流増加は放射線治療だけではなく、化学治療においてもその効果を増強する可能性がある。また、SCCVII 移植腫瘍において、NO による再酸素化は照射 12 時間から 24 時間後に生じる一過性の過程であることが示唆された。加えて、腫瘍

の由来により再酸素化の程度・持続時間が様々であることが知られている¹¹。現在、ニトロイミダゾール系低酸素集積性化合物に、陽電子を放出する ^{19}F を付加した positron emission tomography (PET) 製剤が臨床応用されており、核医学診断法を使用することで個々の腫瘍内の低酸素領域を評価することが可能である。そこで放射線治療後の酸素環境を PET によりモニターし、がんの種類や個性に合わせた適切なタイミングで放射線治療を実施することによって、NO 依存性再酸素化の恩恵を最大限に利用したがん治療が実現可能となると考えられる。

<謝辞>

本稿を終えるにあたり、ご指導賜りました北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座放射線学教室の稲波修教授に深く感謝いたします。また、本論文をご校閲下さいました本研究科比較形態機能学講座生化学教室の木村和弘教授ならびに本研究科診断治療学講座先端獣医療学教室の高木哲准教授に深く感謝いたします。本研究に用いたEF5を供与していただきましたペンシルバニア大学医学部放射線腫瘍学講座のCameron Koch 教授に深く感謝いたします。また、酸素感受性 ESR プローブの合成に関してご指導頂きました北海道教育大学函館校の中村秀夫教授に深く感謝いたします。本研究の遂行に際し終始多大な御助言ならびに御協力を賜りました本研究科環境獣医科学講座放射線学教室の山盛徹准教授、安井博宣助教ならびに教室各位の皆様に謹んでお礼申し上げます。最後に本研究で犠牲となった数多くの尊い命にご冥福をお祈りするとともに心から深く感謝いたします。

<引用文献>

1. Brizel, D.M., Dodge, R.K., Clough, R.W., and Dewhirst, M.W. 1999. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother. Oncol.*, **53**:113-117.
2. Brown, J.M. 1993. SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br. J. Cancer*, **67**:1163-1170.
3. Ciccia, A., and Elledge S.J. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell*, **40**:179-204.
4. Crockart, N., Jordan, B.F., Baudalet, C., Ansiaux, R., Sonveaux, P., Grégoire, V., Beghein, N., Dewever J., Bouzin, C., Feron, O., and Gallez, B. 2005. Early reoxygenation in tumors after irradiation: determining factors and consequences for radiotherapy regimens using daily multiple fractions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **63**:901-910.
5. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**:601-605.
6. Dote, H., Burgan, W.E., Camphausen, K., Tofilon, P.J. 2006. Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation. *Cancer Res.*, **66**:9211-9220.
7. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E., Busse, R.. 2001. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ. Res.*, **88**:E68-75.
8. Fokas, E., Hänze, J., Kamlah, F., Eul, B.G., Lang, N., Keil, B., Heverhagen, J.T., Engenhart-cabillic, R., An, H., and Rose, F. 2010. Irradiation-dependent effects on tumor perfusion and endogenous and exogenous hypoxia markers in an A549 xenograft model. *Int.*

- J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **77**:1500-1508.
9. Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W.C. 2002. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.*, **90**:866-873.
 10. Förstermann, U., Sessa, W.C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.*, 829-837, 837a-837d.
 11. Hall, E.J., and Giaccia, A.J. 2011. *Radiobiology for the Radiologist*. Philadelphia (PA): 86-103, Lippincott Williams & Wilkins.
 12. Harada, H., Inoue, M., Itasaka, S., Hirota, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Zeng, L., Ou, G., Yoshimura, M., Mckenna, W.G., Muschel, R.J., and Hiraoka, M. 2012. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat. Commun.*, **3**:783.
 13. Harris, A.L. 2012. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer*, **2**:38-47.
 14. Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S., Khanna, K.K., Dittmar, G., and Scheidereit, C. 2010. A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF- κ B activation. *Mol. Cell*, **40**:63-74.
 15. Hirayama, R., Uzawa, A., Takase, N., Matsumoto, Y., Noguchi, M., Koda, K., Ozaki, M., Yamashita, K., Li, H., Kase, Y., Matsufuji, N., Koike, S., Masunaga, S., Ando, K., Okayasu, R., and Furusawa, Y. 2013. Evaluation of SCCVII tumor cell survival in clamped and non-clamped solid tumors exposed to carbon-ion beams in comparison to X-rays. *Mutat. Res.*, **756**:146-151.
 16. Jordan, B.F., Sonveaux, P., Feron, O., Grégoire, V., Beghein, N., Dessy, C., and Gallez, B.

2004. Nitric oxide as a radiosensitizer: evidence for an intrinsic role in addition to its effect on oxygen delivery and consumption. *Int. J. Cancer*, **109**:768-773.
17. Kallman, R.F.. 2012. The Phenomenon of Reoxygenation and Its Implications for Fractionated Radiotherapy. *Radiology*, **105**:135-142.
 18. Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z.N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Yujaskovic, Z., Dewhirst, M.W., and Li, C. 2007. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol. Cell*, **26**:63-74.
 19. Ljungkvist, A.S., Bussink, J., Kaanders, J.H., Wiedenmann, N.E., Vlasman, R., and van der Kogel, A.J. 2006. Dynamics of hypoxia, proliferation and apoptosis after irradiation in a murine tumor model. *Radiat. Res.*, **165**:326-336.
 20. Luo, L., Huang, W., Tao, R., Hu, N., Xiao, Z.X., and Luo, Z. 2013. ATM and LKB1 dependent activation of AMPK sensitizes cancer cells to etoposide-induced apoptosis. *Cancer Lett.*, **328**:114-119.
 21. Nagane, M., Yasui, H., Yamamori, T., Zhao, S., Kuge, Y., Tamaki, N., Kameya, H., Nakamura, H., Fujii, H., and Inanami, O. 2013. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **437**:420-425.
 22. Oda, T., Hayano, T., Miyaso, H., Takahashi, N., and Yamashita, T. 2007. Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *Blood*, **109**:5016-5026.
 23. Pandian, R.P., Parinandi, N.L., Ilangovan, G., Zweier, J.L., and Kuppusamy, P. 2003. Novel particulate spin probe for targeted determination of oxygen in cells and tissues. *Free Radic. Biol. Med.*, **35**:1138-1148.
 24. Park, J.H., Kim, W.S., Kim, J.Y., Park, M.H., Nam, J.H., Yun, C.W., Kwon, Y.G., and Jo, I. 2011. Chk1 and Hsp90 cooperatively regulate phosphorylation of endothelial nitric oxide

- synthase at serine 1179. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**:2217-2226.
25. Rafikov, R., Fonseca, F.V., Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., Fulton, D., and Black, S.M. 2011. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J. Endocrinol.*, **210**:271-284.
 26. Sonveaux, P., Frérart, F., Bouzin, C., Brouet, A., Dewever, J., Jordan, B.F., Gallez, and B., Feron, O. 2007. Irradiation promotes Akt-targeting therapeutic gene delivery to the tumor vasculature. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **67**:1155-1162.
 27. Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.*, **22**:5612-5621.
 28. van Putten, L.M.. 1968. Tumour reoxygenation during fractionated radiotherapy; studies with a transplantable mouse osteosarcoma. *Eur. J. Cancer*, **4**:172-182.
 29. Whitesell L, and Lindquist SL. 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **5**:761-772.
 30. Yasui, H., Asanuma, T., Kino, J., Yamamori, T., Meike, S., Nagane, M., Kubota, N., Kuwabara, and M., Inanami, O. 2013. The prospective application of a hypoxic radiosensitizer, doranidazole to rat intracranial glioblastoma with blood brain barrier disruption. *BMC Cancer*, **13**:106.
 31. Yasui, H., Ogura, A., Asanuma, T., Matsuda, A., Kashiwakura, I., Kuwabara, M., and Inanami, O. 2008. Inhibition of HIF-1alpha by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer*, **99**:1442-1452.

**The mechanism of radiation-induced endothelial nitric oxide synthase activation
and its role in tumor reoxygenation after X-irradiation**

Masaki NAGANE

Laboratory of Radiation Biology,
Department of Environmental Veterinary Sciences,
Graduate School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

Low oxygen conditions drastically decreases cellular radiosensitivity and facilitate the adaptive responses of tumor. Hence, hypoxic regions in solid tumor are well-known obstacle for successful radiotherapy. It occurs mainly as a result of the excess proliferation of tumor cells and accompanying deficiency in blood and nutrient supplies. It has been reported that ionizing radiation (IR) decreases hypoxic regions in tumor, leading to the improvement of radiosensitivity of solid tumor. However, the mechanism of IR-induced tumor reoxygenation has not been elucidated.

In the first study, to clarify the effect of radiation-induced nitric oxide (NO) on tumor oxygenation status and the NOS isoforms responsible for the NO production after IR, transplanted SCCVII tumor was employed. Tumor oxygenation status after IR was evaluated by *in vivo* electron spin resonance method with the oxygen sensitive probe, immunohistochemical technique with two different hypoxia probes, and Hoechst33342 perfusion assay. It was shown

that IR increased tissue pO₂ and tissue perfusion after IR. In addition, decrease of the hypoxic regions in tumor was observed after IR. To clarify the involvement of NO in this reoxygenation, a wide-range NOS inhibitor L-NAME was administered to tumor-bearing mice. L-NAME treatment significantly attenuated reoxygenation in hypoxic regions after IR. These results suggested that IR increased NO production that increased tissue perfusion in tumor, leading to the tumor reoxygenation. In mammalian cells, there are three NOS isoforms, endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS), and neural NOS (nNOS). To determine the NOS isoforms responsible for NO-induced reoxygenation, RT-qPCR analysis, Western blot analysis, and NOS activity assay were used. RT-qPCR analysis showed that nNOS hardly expressed in SCCVII tumor, and that IR did not increase mRNA of NOS isoforms. Western blot analysis showed IR did not increase protein expression of iNOS and eNOS. NOS activity assay revealed that IR increased NOS activity, and iNOS was not involved in this activity. In addition, immunohistochemistry showed that eNOS was expressed in vascular endothelial cells of tumor. These results suggested that IR increased eNOS activity in vascular endothelial cells, leading to the tumor reoxygenation. However, the mechanism of eNOS activation after IR remains unclear.

In the second study, bovine aortic endothelial cells (BAEC) were employed to investigate the mechanisms eNOS activation *in vitro* after IR. As a mechanism of eNOS activation, phosphorylation of eNOS-Ser1179 by Ser/Thr kinases is a critical step. IR is known to induce DNA-double strand breaks (DSBs) and elicit subsequent various adaptive responses toward IR. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) plays an important role in coordinating the cellular response to DSBs. In addition to kinases, HSP90 has also been identified as an important regulator modifying ATM function after IR. In this study, I aimed to clarify the involvement of DNA-damage response in IR-induced eNOS activation. NOS activity assay

showed that IR increased NOS activity at 12 and 24 h after IR. In these time points, eNOS-Ser1179 phosphorylation was increased. ATM phosphorylation was increased at 0.5 h after IR, and lasted to 24 h. An ATM inhibitor Ku-60019 inhibited eNOS and ATM phosphorylation after IR. NOS activity was attenuated by Ku-60019. Similarly, a HSP90 inhibitor geldanamycin inhibited ATM and eNOS phosphorylation, and eNOS activation. These results suggested that IR increased eNOS activity through HSP90/ATM pathway.

In conclusion, this study provides new insight for mechanisms in radiation-induced tumor reoxygenation. IR increases eNOS activity via DNA damage response. Activation of eNOS increases tissue perfusion through the production of NO and reoxygenates the hypoxic regions in solid tumor. This radiation-induced tumor reoxygenation increases tumor radiosensitivity toward subsequent irradiation, providing the new insight for the improvement of radiotherapy by modulating eNOS activity.