



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	NADPH oxidase 4が放射線によるストレス誘発性早期老化に伴う活性酸素種産生に与える影響およびその生理的役割に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	酒井, 友里
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13064号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70490
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuri_SAKAI_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：酒井 友里

審査委員	主査	教授	稲波 修
	副査	教授	稲葉 睦
	副査	講師	岡松優子
	副査	准教授	安井博宣

学位論文題名

NADPH oxidase 4 が放射線によるストレス誘発性早期老化に伴う活性酸素種産生に与える影響およびその生理的役割に関する研究

がんの放射線治療は各種限局照射法や新規の制がん剤との併用治療などの新しい技術の目覚ましい近年の発展によって、医療のみならず獣医療でも重要ながんの治療法となってきた。しかしながら、放射線治療の副作用として疾患近傍の正常組織における予期せぬ有害事象の発生が臨床上の問題となっており、克服すべき課題となっている。医療ならび獣医療では粘膜炎、口腔乾燥症ならびに肺線維症などの有害事象が知られている。これらの有害事象の発生は放射線による直接的な細胞死が古くからその有力な原因と考えられてきたが、近年、放射線照射された細胞がストレス誘発性早期老化(Stress-Induced Premature Senescence [SIPS])を起こし、この早期老化細胞（SIPS 細胞）から発生する活性酸素種（Reactive Oxygen Species[ROS]）や炎症性サイトカインの分泌による炎症反応が有害事象の発生に深く関与していることが報告されている。しかし、この ROS 上昇とサイトカイン分泌との因果関係や細胞内の ROS 発生源については現在までのところ明確になっていない。

そこで酒井氏は細胞内の主要な ROS 産生酵素である NADPH オキシダーゼ (NOX) ファミリータンパク質に着目し、その SIPS 細胞における ROS 産生への関与を明らかにすると共に、ROS と炎症応答との関連性についても検討を行った。まず、酒井氏は初代培養のマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) に X 線照射を行うと、照射後 4 日以降に有意に細胞老化の増加が起これ、照射後 7 日目で細胞全体の約 54% から約 65% が老化細胞となることを明らかにした。また、細胞内 ROS についても照射後 7 日目で有意な上昇が起きていることを示した。次に 6 つの NOX アイソフォーム (NOX1～NOX4, DUOX1 ならびに DUOX2) の mRNA 発現に着目し、定量的 PCR で検討したところ、NOX4 発現のみの発現が検出され、他の NOX アイソフォームの発現は検出限界以下であっ

た。さらに *NOX4* 発現のみが照射 1 日後には有意な上昇を示し、照射 7 日後には非照射 MEF と比較して約 4.5 倍まで上昇することを見いだした。また、*NOX4* 欠損 MEF では、野生型 MEF と比較して、X 線照射後に観察される ROS 産生の増加応答が有意に低下していたが、一方では *NOX4* 欠損 MEF でも、照射後の老化細胞の誘導が野生型 MEF と同様に起きる事も明らかにした。以上の結果から、放射線による細胞内 ROS の増加は *NOX4* の発現誘導に起因しているが、*NOX4* 発現と細胞内 ROS 増加は細胞老化の誘導に必須ではないことが示された。

次に酒井氏は、*NOX4* と炎症応答との関連性を明らかにする目的で、X 線照射した MEF の 7 日間培養後の条件培地がヒトリンパ芽球 U937 細胞の遊走能に及ぼす影響について検討した。X 線照射した野生型 MEF の条件培地を用いた場合、U937 細胞の遊走能の有意な増加を起こすことが明らかとなった。しかし、*NOX4* 欠損 MEF 由来の条件培地を用いた時の U937 細胞の遊走能の放射線応答は、野生型 MEF 由来の培地の場合と比較して有意に低下していた。さらに、酒井氏は X 線照射した野生型 MEF 由来の条件培地にカタラーゼ添加処理を行い、*NOX4* が産生する O_2^- の代謝物である H_2O_2 を培地中から消去しても、遊走細胞の放射線応答に全く影響を与えなかったことを明らかにした。この結果は遊走細胞の増加は ROS の U937 細胞に対する直接的な作用でなく、サイトカイン等の炎症性物質を介した間接的な作用であることを示唆していた。そこで、酒井氏は炎症性サイトカインである *IL6*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, *CCL7* ならびに *CXCL12* の発現を定量 PCR 法にて検討したところ、野生型 MEF では X 線照射後に *CCL7* と *CXCL12* の発現の増加が見られ、*NOX4* 欠損 MEF では *CXCL12* の発現増加反応が有意に低下している事を明らかにした。

以上の結果は、放射線照射は老化細胞を誘導し、*NOX4* 発現を増加させることで ROS の産生増加を導いていること、さらに、この放射線による ROS の増加がサイトカイン増加を促し、これが炎症細胞の遊走に関与している可能性を初めて示したものであり、放射線治療における炎症が関与する有害事象発生の機序の解明と今後の予防法の開発にとって重要な情報を含むものである。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者酒井友里氏の学位論文は、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。