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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13064
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72296
Type	doctoral thesis
File Information	Yuri_SAKAI.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文

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

酒井　友里

＜目次＞

目次 1

略語一覧 2

1. 序論 3

2. 材料および方法 7

3. 結果

3-1. X 線照射が細胞老化および細胞内 ROS レベルに及ぼす効果 14

3-2. X 線照射後の NOX アイソフォーム遺伝子の発現 14

3-3. X 線照射後の ROS 産生に NOX4 が与える影響 15

3-4. X 線照射により誘導される SIPS に対し NOX4 が与える影響 16

3-5. NOX4 が炎症細胞の遊走に与える効果 17

3-6. X 線照射後の SASP 因子の発現に NOX4 が与える影響 18

4. 考察 26

5. 総括 31

謝辞 33

引用文献 34

英語抄録 39

＜略語一覧＞

ATM: Ataxia-telangiectasia mutated

BMS: BMS-345541

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DDR: DNA damage response

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

GKT: GKT137831

IGRT: image-guided radiation therapy

IMRT: intensity-modulated radiation therapy

MEF: mouse embryonic fibroblast

NF-κB: nuclear factor-κB

NOX: NADPH oxidase:

PARP: A poly (ADP-ribose) polymerase

PPIA: peptidylprolyl isomerase A

QOL: quality of life

ROS: reactive oxygen species

SASP: senescence-associated secretory phenotype

SIPS: stress-induced premature senescence

4ANI: 4-amino-1,8-naphthalimide

1. 序論

放射線治療は悪性腫瘍に対する治療法のうち、高い治療成績を挙げているもののひとつである。しかしながら、放射線はがん細胞を効果的に殺傷する一方で、がん細胞に隣接する正常な細胞までもを損傷する。その結果、粘膜炎、口腔乾燥症、ならびに肺線維症といった数々の有害事象が引き起こされ、治療によりがんが寛解した後も生活の質(quality of life: QOL)の低下の原因となっている [31, 37, 52]。近年、強度変調放射線治療(intensity-modulated radiation therapy: IMRT)や画像誘導放射線治療 (image-guided radiation therapy: IGRT)をはじめとする放射線治療に関わる技術の改良により、照射範囲に含まれる正常組織の体積や、これに対する照射線量を減少させることが可能となったものの、すべての正常組織を照射野より除外することは依然として十分ではない。それゆえ、よりよい治療効果を得るためには、正常組織を放射線損傷より防護する必要があると考えられる。近年の研究により、放射線照射後の正常組織の応答は複雑で多くのステップを要することが明らかとなっている。放射線照射のエネルギーによって DNA が損傷されると、これを起点として、サイトカインの分泌や、細胞間相互作用の変化、炎症細胞の流入、細胞の修復機構の活性化などが引き起こされ、これにより、照射を受けた細胞の周囲の微小環境には様々な変化が生じる。こうした微小環境の変化に寄与すると考えられている現象の一つに細胞老化が挙げられる。

細胞は放射線照射や抗がん剤処理などによる DNA 損傷や酸化ストレスなどの過剰な、

しかし致死量以下のストレスに応答し、細胞周期を永続的に停止させる[42]。この過程は「ストレス誘発性早期老化 (stress-induced premature senescence (SIPS)」と名付けられ、細胞分裂に伴うテロメアの短小化に起因する複製老化とは区別される[19]。SIPS の誘導には持続的な DNA ダメージとこれに引き続く DNA ダメージ応答 (DNA damage response: DDR)の活性化が必要不可欠であることがこれまでに示されている[43]。また、老化細胞はその増殖を停止させるだけでなく、炎症性サイトカインや成長因子、プロテアーゼなどの種々の液性因子を分泌する。この現象は老化関連分泌形質 (senescence-associated secretory phenotype: SASP)として知られ、周囲組織の構造や機能の変化に寄与している[21,43]。近年の研究により、細胞老化と活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)との関連が示されている。遺伝毒性ストレスによって誘導された SIPS はしばしば ROS 産生の亢進を伴う一方で[35]、この ROS は直接的に DNA を損傷することにより、さらなる細胞老化を誘導および維持する[6]。この DNA ダメージと ROS 産生の間に存在する正のフィードバックループは SIPS の維持に必要であると考えられるものの[16]、SIPS が誘導された細胞における ROS の産生源や、またこれがどのように調節されているのかについては完全には解明されていない。近年、この ROS 産生に対し、ミトコンドリア電子伝達系に加えて[41]、NADPH オキシダーゼ (NADPH oxidase: NOX)が関与する可能性が示されている。

NOX ファミリータンパク質は、NADPH から受け取った電子を用いて酸素を還元す

ることにより ROS を産生する膜貫通型の酵素群であり、細胞内 ROS の主要な産生源として機能する。NOX ファミリータンパク質にはヒトにおいて NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1、ならびに DUOX2 の合計七種類のホモログが存在し、各アイソフォームは発現する組織や活性化の様式、産生する ROS の種類が互いに異なっている [3]。NOX は免疫防御、細胞内シグナル伝達、遺伝子発現の調節、ならびに細胞分化など幅広い生理的役割を持つ一方で [24, 32, 47, 51]、NOX の発現や機能の亢進と糖尿病、動脈硬化症、ならびにがんなどの様々な老化に関連する疾患病態との関連が示唆されている [33, 34, 46]。これまで数多くの研究により、NOX の細胞老化への関与が示されている。Schilder らは、血管内皮細胞において NOX1 および NOX4 がポリフェノールにより誘導される細胞老化を仲介することを報告している [45]。また、マウス線維芽細胞および乳腺上皮細胞において NOX4 を過剰発現させることにより、細胞に老化様の兆候が表れることが報告されている [22, 23]。さらに、がん遺伝子によって誘導される細胞老化が NOX により仲介されることや [29, 54]、放射線照射により NOX の発現レベルが変化することが報告されている [12, 13]。しかしながら、NOX が放射線照射により誘導される SIPS に関与しているかどうか、また SIPS に関連した生理学的事象に対し、NOX が何らかの役割を果たしているかについては不明な点が多く残されている。そこで、本研究では NOX が放射線照射により誘導された老化細胞において ROS 産生に寄与しているかどうかを明らかにするため、初代培養のマウス胎子線維芽細胞を用いて検討を行った。また、NOX

が放射線照射による SIPS に関連する生物学的事象に関与しているかどうかを明らかにするため、炎症細胞の遊走に着目し検討を行った。

2. 材料および方法

2-1. 試薬

NOX1/NOX4 阻害剤である GKT137831 (GKT)は Selleckchem (Houston, TX, USA)より購入した。Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)阻害剤である Ku60019 (Ku)および 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red)は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)より購入した。NF-κB 阻害剤である BMS-345541 (BMS)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。A poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)阻害剤である 4-amino-1,8-naphthalimide (4ANI)は Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA)より購入した。Horseradish peroxidase は和光純薬工業（大阪）より購入した。

2-2. 細胞株および培養方法

BALB/c、C57BL/6JJcl、ならびに NOX4$^{-/-}$ C57BL/6 (JAX stock #022996; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)系統のマウス胎子（胎齢 14 日）より分離した初代培養の線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF)を用いた [7]。以降これらの細胞をそれぞれ BALB/c MEF、WT MEF、ならびに KO MEF と表記する。これらの細胞は 10%ウシ胎子血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific)を含む DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用い、37℃、3% O_2、ならびに 5% CO_2 の条件下で培養した。ヒトリンパ芽球 U937 細胞は RPMI1640 培地 (Thermo Fisher Scientific)を用い、37℃および 5% CO_2 条件下で維持した。

2-3.　X 線照射

X 線発生装置は X-RAD iR-225 X-ray generator (Precision X-Ray, North Brandford, CT, USA) を用いて、200 kVp、15 mA、線源距離 650 nm で 1.0 mm Al フィルターを用いて線量率 1.37 Gy/min の条件下で行った。X 線照射は細胞を播種したシャーレをターンテーブル上に置き、回転させながら室温で行った。

2-4. 老化関連 (senescence-associated: SA) β-galactosidase (gal)染色

細胞は 35 mm ディッシュに播種し、一晩インキュベートした。X 線照射を行う前、もしくは照射を行い、指定した日数培養した後、細胞を Senescence β-Galactosidase Staining Kit (#9860; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)によって、製造元のプロトコールに従い染色した。青色を呈した老化細胞は光学顕微鏡によって観察し、計数した。

2-5. 細胞内 ROS レベルの測定

細胞内 ROS レベルは CellROX Deep Red Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。コラーゲン（Cellmatrix Type I-C; 新田ゼラチン, 大阪）によりコートしたカバーグラスに細胞を播種し、一晩インキュベートした。細胞に X 線照射を行い 7 日間培養した後、細胞を PBS で洗浄し、5 μM の CellROX Deep Red 試薬を 30 分間 37℃で処理した。PBS で 3 回洗浄した後、3.7% (w/v) paraformaldehyde/PBS により 15 分間、室温で

細胞を固定した。PBS で 3 回洗浄した後、細胞を 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で 3 分間洗浄した。カバーグラスは Prolong Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いてマウントした。蛍光顕微鏡による観察および画像の取得は Olympus BX61 microscope（Olympus, 東京）により行った。合計で 200 個の細胞を含む視野を撮影し、CellROX の蛍光強度は Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)により測定した。相対的な蛍光強度は一視野中の CellROX 蛍光強度を視野当たりの細胞数で除し、算出した。

2-6. 定量 RT-PCR

定量 RT-PCR 解析は以前の報告のとおり行った [44]。X 線照射を行う前、もしくは照射を行い、指定した期間培養した後、細胞をスクレイパーで回収し、9,000 ×*g*、4℃にて 1 分間遠心した。上清を除き-80℃で保存した。総 RNA の抽出は Relia PrepTM RNA Cell Mniprep System (Promega Corporation, Madison, WI, USA)を用い、製造元のプロトコールに従って行った。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 μg 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 および Reverse プライマー各 5 pmol ならびに 1× FastStart Essential

DNA Green Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を含む全量 10 µl の反応液を調製し、PCR 反応を行った。PCR 反応に用いたプライマーの配列は表 1 に示す。PCR 条件は 95℃で 10 分加熱後、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 peptidylprolyl isomerase A (PPIA)遺伝子を使用し、その発現量をもとに各遺伝子の発現レベルを標準化した。

2-7. 細胞外過酸化水素レベルの測定

MEF より放出された H_2O_2 のレベルは Amplex Red アッセイにより測定した。細胞に X 線照射を行い 7 日間培養した後に培養上清を回収し、解析に用いた。375 µl の培養上清に Amplex Red（終濃度：50 µM）、horseradish peroxidase （終濃度：0.1 U/ml）、ならびに NaH_2PO_4（終濃度：50 mM）を含む混合液を添加し、20 分間室温でインキュベートした。200 µl の反応液を 96 穴プレートに移し、各サンプルの Amplex Red の蛍光強度をマイクロプレートリーダー（Infinite 200PRO; Tecan, Männedorf, Switzerland)によって測定(Ex 545 nm/Em 590 nm)した。

2-8. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖活性は Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific)

を用いて評価した。細胞を 8-well チャンバースライド（松浪ガラス, 大阪）に播種し、一晩培養した。X 線照射を行う前、もしくは照射を行い、指定した日数培養した後、細胞を 10 μM の 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)を含む培地とともに 4 時間インキュベートした。3.7% (w/v) paraformaldehyde/PBS で固定した後、EdU でラベルされた細胞を Click-iT Plus reaction cocktail とともにインキュベートし、可視化した。EdU 陽性細胞は蛍光顕微鏡により観察し、計数した。

2-9. 細胞遊走アッセイ

U937 細胞の遊走は 24-well transwell inserts with polyethylene membranes (8 μm pore size; Corning, Corning, NY, USA)を用いて評価した。MEF に照射を行った後、培地を 5% FBS を含む DMEM に交換した。この培地中で MEF を 7 日間培養した後、培養上清を回収した。回収した培養上清は 9000 ×*g* で 1 分間 4℃で遠心した。上清を 24 ウェルプレートの各ウェルに 1.3 ml ずつ分注した。インサートをウェルに設置した後、血清不含有培地に懸濁した U937 細胞をインサートあたり 100,000 個播種した。37℃で 9 時間インキュベートした後、インサート下部の遊走した細胞を含む培地を 1.5 ml チューブに回収し、20,000 ×*g* で 5 分間遠心し、1.1 ml の上清を除去した。残った培地に沈殿した細胞を再懸濁し、細胞数を血球計算盤を用いて数えた。

2-10. 統計解析

各実験はそれぞれ独立して 3 回以上行った。統計的有意差は、F 検定による分散比の検定ならびに Student's *t* 検定により検定した。データは平均値±標準偏差 (S.D.)で表示し、危険率が $p<0.05$ の際にその差が有意であると判断した。

ターゲット遺伝子	シンボル	方向	配列 (5'-3')	増幅産物サイズ (bp)
NADPH oxidase 1	NOX1	Forward	AAC CAC TGG CTC TCA GTT TT	78
		Reverse	ATT CAG GAA GGC ATA CAC AA	
NADPH oxidase 2	NOX2	Forward	GTG TGT CGA AAT CTG CTC TC	83
		Reverse	AGG TTC CTG TCC AGT TGT CT	
NADPH oxidase 3	NOX3	Forward	GCT CTT CTG GTA CAC ACA CC	101
		Reverse	GGA GAC TCT CTG GAG TTT GG	
NADPH oxidase 4	NOX4	Forward	GAA GAT TTG CCT GGA AGA AC	154
		Reverse	GGG ATG ATT GAT GAC TGA GA	
dual oxidase 1	DUOX1	Forward	CAG ACC CTC CTC AAG AGA TT	79
		Reverse	TGT GCC TCA GTG AAC AGT AA	
dual oxidase 2	DUOX2	Forward	AAG GAC GAG TTC TTC ACC AT	98
		Reverse	CGG AAC ATA GAC TCA ACC AC	
peptidylprolyl isomerase A	PPIA	Forward	GAG CTG TTT GCA GAC AAA GTT C	230
		Reverse	CCC TGG CAC ATG AAT CCT GG	

表1. 定量RT-PCR法に用いたプライマー配列一覧

3. 結果

3-1. X 線照射が細胞老化および細胞内 ROS レベルに及ぼす効果

以前より、放射線照射が様々な細胞種において SIPS を引き起こすことが報告されている[4, 36, 39]。そこで初代培養の MEF において X 線照射が細胞老化を誘導するかどうかを老化関連 β-gal 染色により評価すると、10 Gy の照射により β-gal 染色陽性細胞の割合は有意に上昇した（図 1A および B)。また、老化細胞では細胞内 ROS レベルが上昇することがしばしば報告されていることから[25]、次に ROS に反応する蛍光プローブである CellROX Deep Red 試薬を用いて細胞内 ROS レベルを評価した。図 1C に示すように、CellROX の蛍光は照射をうけた MEF において顕著に上昇することが観察された。この結果について定量的な解析を行うと、照射によって細胞内 ROS レベルは有意に上昇していた （図 1D)。以上より、X 線照射は以前の研究と同様に、初代培養の MEF において SIPS および細胞内 ROS レベルの上昇を誘導することが示された。

3-2. X 線照射後の NOX アイソフォーム遺伝子の発現

X 線照射による SIPS で観察される細胞内 ROS レベル上昇の原因を明らかにするため、照射を行った MEF における NOX ファミリー遺伝子の発現を解析した。序論でも述べたように、NOX ファミリー遺伝子にはヒトにおいて *NOX1-5* および *DUOX1/2* の七種類のアイソフォームが存在するものの、マウスでは *NOX5* の存在が確認されていない

ことから[20]、*NOX1-4* および *DUOX1/2* の発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。X 線非照射時の各 *NOX* 遺伝子について評価したところ、*NOX4* の mRNA レベルは他の NOX アイソフォームに比べ著しく高かった（図 2)。さらに細胞に照射を行うと、*NOX4* の発現レベルは徐々に上昇し、照射 7 日後には非照射のものに比べ、約 4.6 倍まで上昇した。この結果より、NOX4 が X 線照射に応答する唯一の NOX アイソフォームであることが明らかとなり、これが MEE において放射線照射によって誘導された ROS 産生に関与している可能性が示唆された。

3-3.　X 線照射後の ROS 産生に NOX4 が与える影響

X 線照射を受けた細胞において、NOX4 が ROS の産生に関与しているかどうかを検討するために、NOX1/NOX4 の低分子阻害剤である GKT を MEF に処理し、照射後の ROS レベルを評価した。NOX4 によって産生されたスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)は速やかに過酸化水素 (H_2O_2)に変換されることから、X 線照射から 7 日後に MEF より培養上清を回収し、この H_2O_2 レベルについて Amplex Red アッセイにより定量を行った。すると、GKT の処理により H_2O_2 産生は顕著に低下した（図 3A)。*NOX1* の発現は *NOX4* と比較して無視できるほど低レベルであったため（図 2)、観察された GKT の効果は主に NOX4 の阻害によるものであると考えられる。放射線照射により誘導された ROS 産生に対する NOX4 の関与をさらに評価するため、NOX4 野生型マウスより分離した MEF (WT

MEF)および NOX4 欠損型マウスより分離した MEF (KO MEF)を用いて同様の解析を行った。WT および KO MEF に照射を行うと、WT MEF では *NOX4* の発現が有意に上昇した一方で、KO MEF では *NOX4* の発現は検出されなかった （図 3B)。照射後の培養上清中の H_2O_2 レベルは、WT MEF から回収したものより、KO MEF から回収したものの方が低度であった（図 3C)。以上の結果より、NOX4 は MEF において X 線照射後の細胞老化に関連した ROS 産生を介在することが示唆された。また、X 線照射による NOX4 発現を調節するシグナル経路を明らかにするため、DNA ダメージによって活性化され、その後の DDR 経路において重要な役割を果たす ATM、PARP、ならびに NF-κB の三つのタンパク質を低分子阻害剤により抑制し [27, 48, 49]、これが照射後の NOX4 の発現に与える影響を解析した。図 3D に示すように、照射を受けた MEF の *NOX4* mRNA レベルは ATM 阻害剤である Ku の処理により顕著に上昇した。これに対し、PARP 阻害剤である 4ANI もしくは NF-κB 阻害剤である BMS の処理は NOX4 の発現に有意な影響を与えなかった（図 3E および F)。これらの結果より、放射線誘発性早期老化の過程において、ATM には X 線照射によって誘導された NOX4 の発現を打ち消す効果があることが示唆された。

3-4. X 線照射により誘導される SIPS に対し NOX4 が与える影響

次に X 線照射後に観察される SIPS の誘導に NOX4 が関与しているかどうか調査し

た。WT および KO MEF に照射を行い、照射後 1、4、ならびに 7 日後に細胞老化を評価したところ、老化細胞の割合は徐々に増加し、照射 7 日後には約 60%にまで達した（図 4A）。しかしながら、NOX4 の欠如はどのタイムポイントにおいても老化細胞の割合に有意な影響を与えなかった。この結果をさらに確かめるため、細胞の増殖を EdU 取り込みアッセイによって評価した。図 4B に示したように、EdU 陽性細胞の割合は照射 1 日後において劇的に減少し、照射 4 日後には増殖中の細胞はほぼ観察されなかった。さらに、WT と KO MEF の間で EdU 陽性細胞の数に有意な差は観察されなかった。以上の結果より、NOX4 は X 線照射による細胞老化の誘導に決定的な役割を持たないということが示唆された。

3-5. NOX4 が炎症細胞の遊走に与える効果

以前の研究で NOX4 が炎症を伴う種々の疾患の病態形成に重要な役割を果たしていることが示されている [5, 28]。また、老化細胞は interleukin-8 などのケモカインを分泌することにより [26]、炎症細胞の遊走を促進することが知られている。これらの知見から、NOX4 の発現上昇が炎症細胞の遊走を促進するのではないかという仮説を立てた。これを検証するため、照射した WT および KO MEF より回収した条件培地に対するヒトリンパ芽球 U937 細胞の遊走をトランスウェルアッセイによって評価した。その結果、KO MEF より回収した条件培地に遊走した U937 細胞の数は WT MEF より回収したものに

比べ有意に減少していた （図 5A)。さらに、BALB/c MEF に GKT を処理すると、遊走した U937 細胞の数は未処理のものに比べ減少した （図 5B)。さらに、照射した BALB/c MEF より回収した条件培地に catalase を処理しても、遊走した細胞数は未処理のものに比べ変化がなかった。以上より、この炎症細胞の遊走が NOX4 由来の H_2O_2 による直接的な効果である可能性が否定された。それゆえ、NOX4 は外部環境へ ROS を放出することによってではなく、照射された細胞からのケモカインの分泌を刺激することにより、炎症細胞の遊走を促進することが示唆された。

3-6. X 線照射後の SASP 因子の発現に NOX4 が与える影響

放射線照射などにより誘導された老化細胞は炎症性サイトカイン、ケモカイン、ならびにプロテアーゼなどの様々な液性因子を分泌することが知られ、これらの液性因子は SASP 因子と呼ばれている [14]。そこで SASP 因子である interleukin-6 (IL6)、chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1)、chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)、 chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5)、chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12)、ならびに chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7)の六種類の炎症性サイトカイン遺伝子について発現解析を行い、これに対し NOX4 が与える影響について評価した。すると、*IL6*、*CXCL1*、*CXCL2*、ならびに *CXCL5* の発現は WT および KO MEF のどちらの細胞においても X 線照射によって有意に変動しなかった（図 6A-D)。一方で、*CXCL12* の発現は X 線照射に

より有意に増加したものの、KO MEF での発現レベルは WT MEF に比べ有意に低下していた（図 6E)。*CCL7* の発現は両細胞において X 線照射により上昇したが、NOX4 の欠損は照射後の *CCL7* の発現に有意な影響は与えなかった（図 6F)。以上より、今回検討を行った六種類の遺伝子のうち、X 線照射後によって誘導され、さらにこれが NOX4 によって調節を受けるものは *CXCL12* 遺伝子のみであることが明らかとなった。

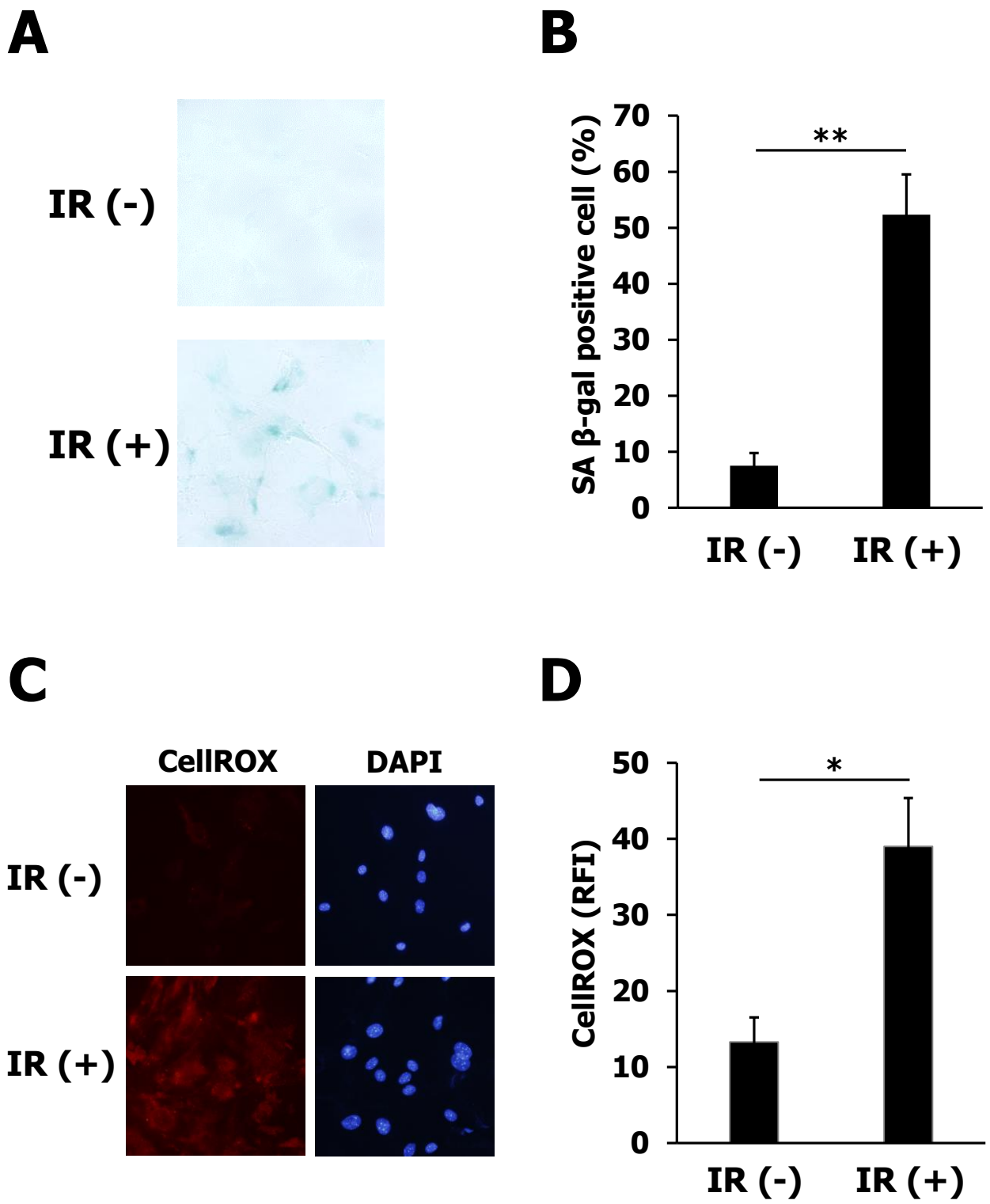

図1. X線が細胞老化および細胞内ROSレベルに及ぼす効果

（AおよびB）BALB/ｃ MEFに10 GyのX線を照射し、7日間培養した。細胞老化はSA β-gal染色によって評価した。代表的な画像（A)およびβ-gal陽性細胞の割合（B)を示した。（CおよびD）BALB/c MEFに10 GyのX線を照射し7日間培養した。細胞内ROSレベルはCellROX Deep Red染色によって観察した。代表的な画像（C)およびCellROX Deep Red の相対蛍光強度（D)を示した。各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*p <0.05, **p <0.01で示した。

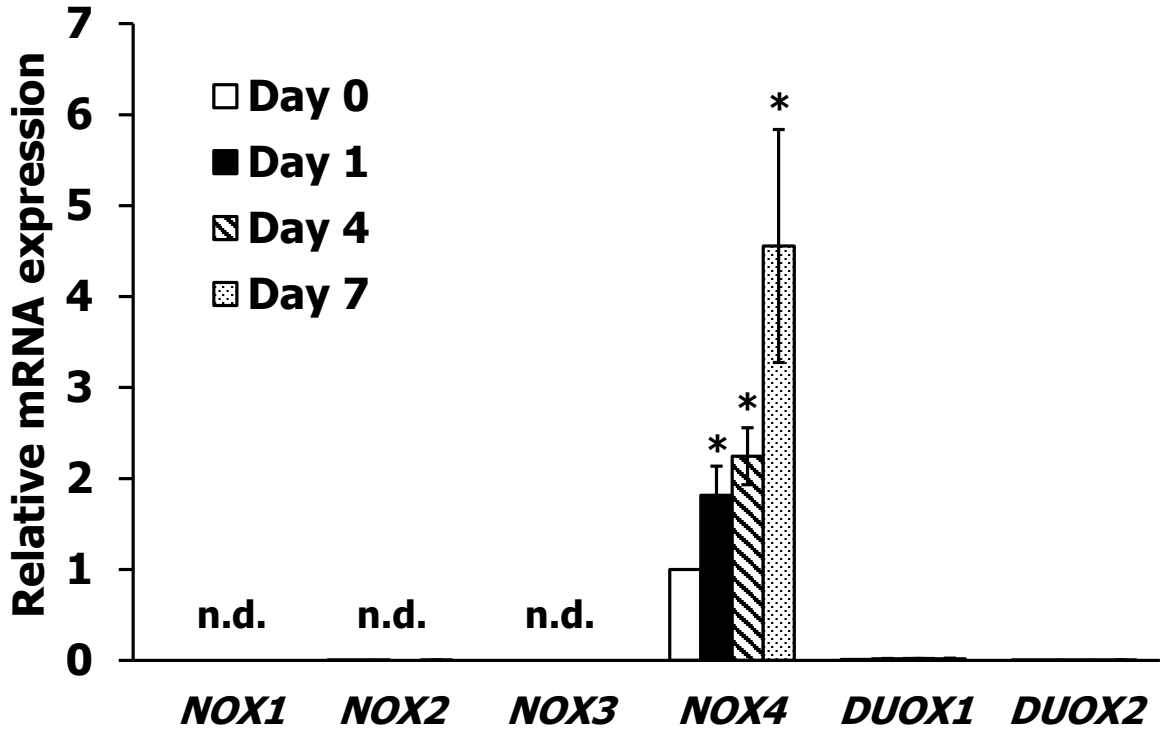

図2. 放射線照射後の各NOXアイソフォームのmRNA発現

BALB/c MEFに10 GyのX線照射を行い、上記に示した期間培養した。NOX1-4およびDUOX1/2の6つの遺伝子のmRNA発現を定量RT-PCR法により解析した。各遺伝子のmRNAレベルは非照射時におけるNOX4の発現レベルを1とし、これに対する相対値で示した。各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*p <0.05で示し、n.d.は検出不可であったことを示す。

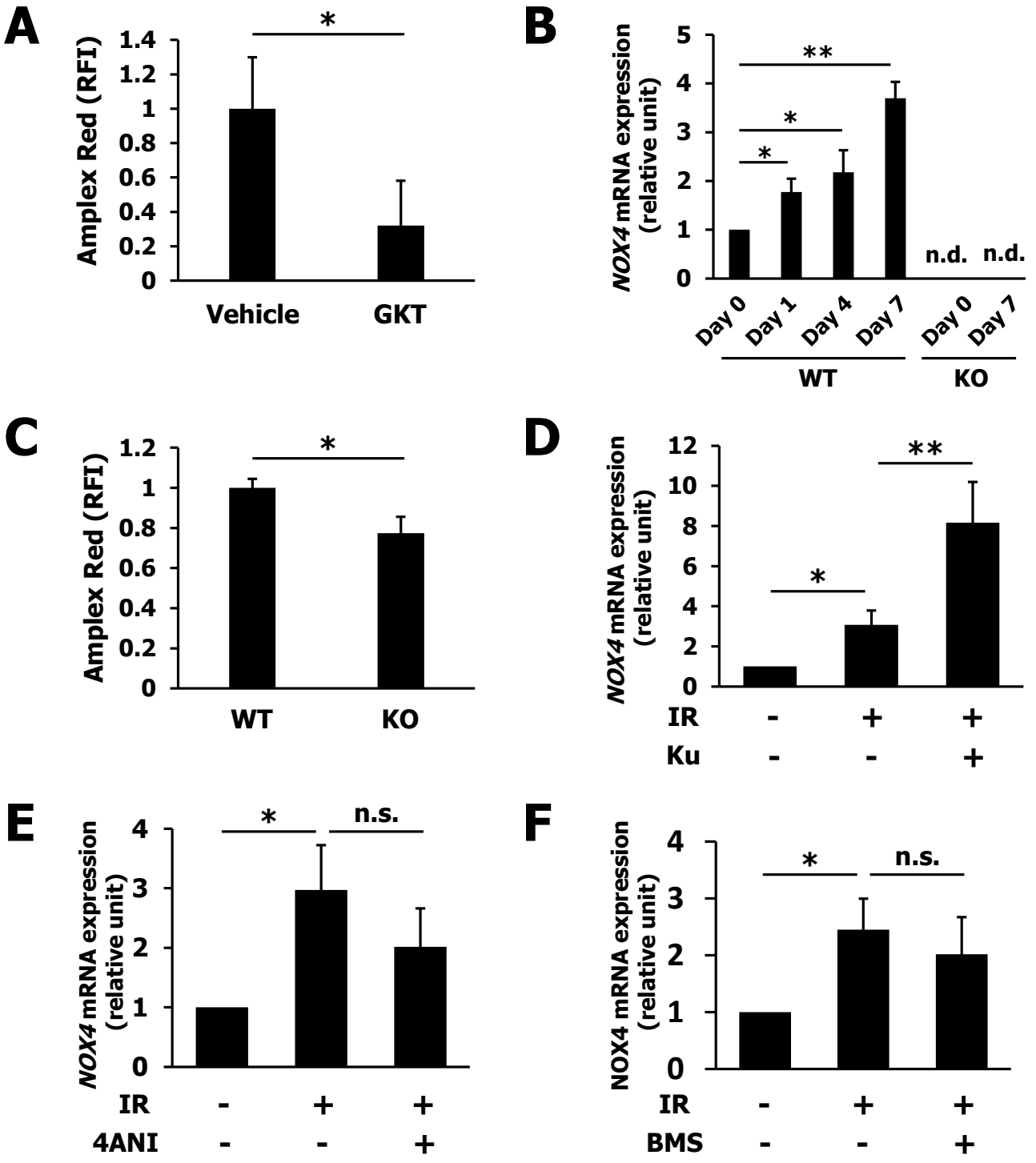

図3. X線照射後のROS産生にNOX4が与える影響

（A）BALB/c MEFに10 GyのX線照射を行った後、20 μMのGKT137831 (GKT)の存在もしくは非存在下で7日間培養した。培養上清中のH_2O_2レベルをAmplex Redアッセイにより測定した。蛍光強度は溶媒コントロール群に対する相対値で表した。（B）WTおよびKO MEFに10 GyのX線照射を行い、上記に示した期間培養した。*NOX4*のmRNAレベルを定量RT-PCR法により解析した。(C) WTおよびKO MEFに10 GyのX線を照射し、7日間培養した。培養上清中のH_2O_2レベルをAmplex Redアッセイにより測定した。（D-F）BALB/c MEFに10 GyのX線照射を行い、10 μMのKu60019 (Ku)、20 μMの4-amino-1,8-naphthalimide (4ANI)、もしくは10 μMのBMS-345541 (BMS)を処理した。7日後に*NOX4*のmRNAレベルを定量RT-PCR法により解析した。各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*p <0.05, **p <0.01で示し、n.s.は統計的有意差がないことを、n.d.は検出不可であったこと示す。

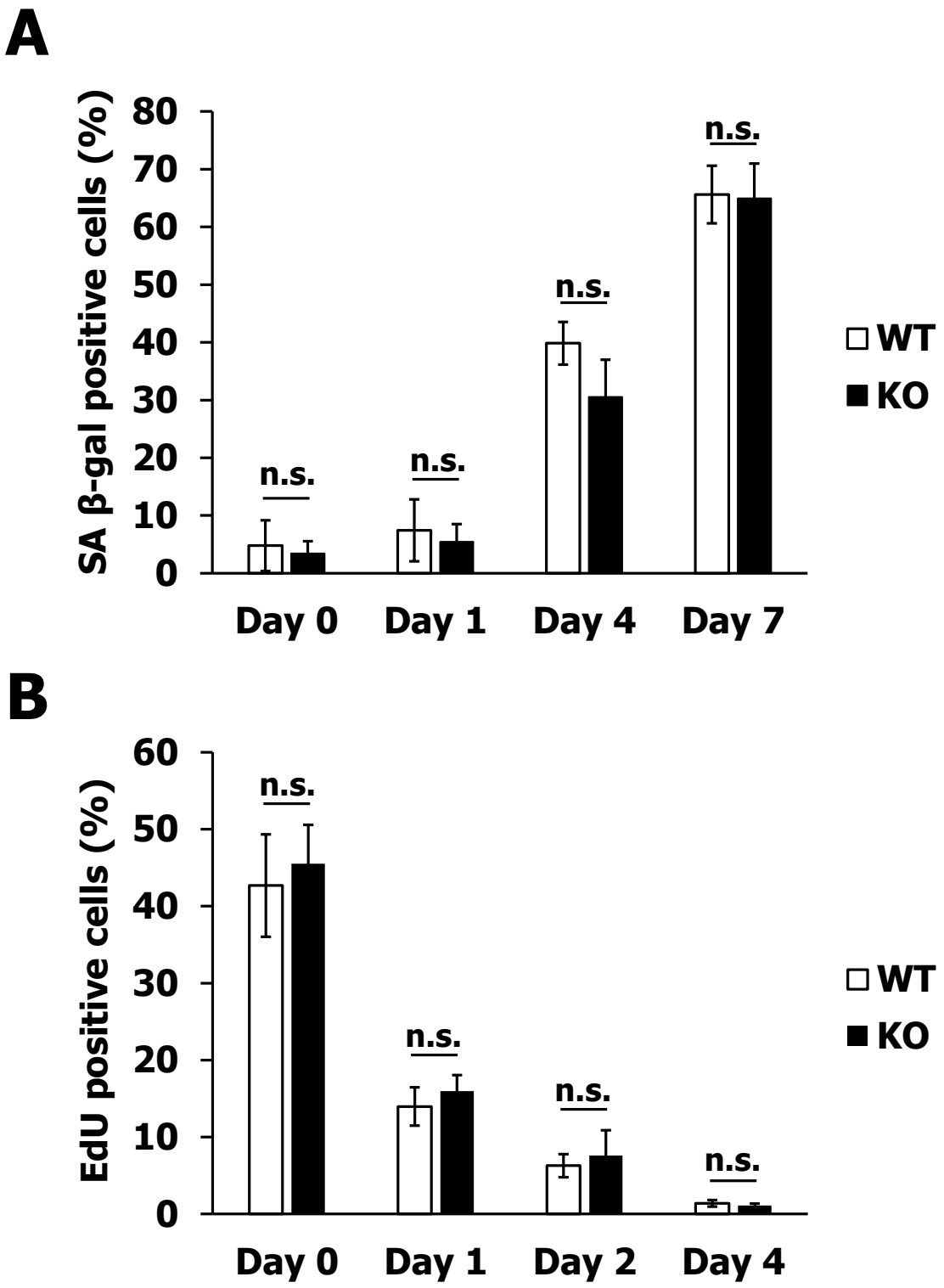

図4. X線照射後の細胞老化にNOX4が与える影響

(A) WTおよびKO MEFに10 GyのX線照射を行い、上記に示した期間培養した。細胞老化は老化関連β-gal染色により評価し、β-gal染色陽性細胞の割合をグラフに示した。(B) WTおよびKO MEFに10 GyのX線を照射し、上記に示した期間培養した。細胞増殖はEdU取り込みアッセイにより評価し、EdU陽性細胞の割合をグラフに示した。各カラムおよびバーは平均±S.D.を表している。n.s.は統計的有意差がないことを示す。

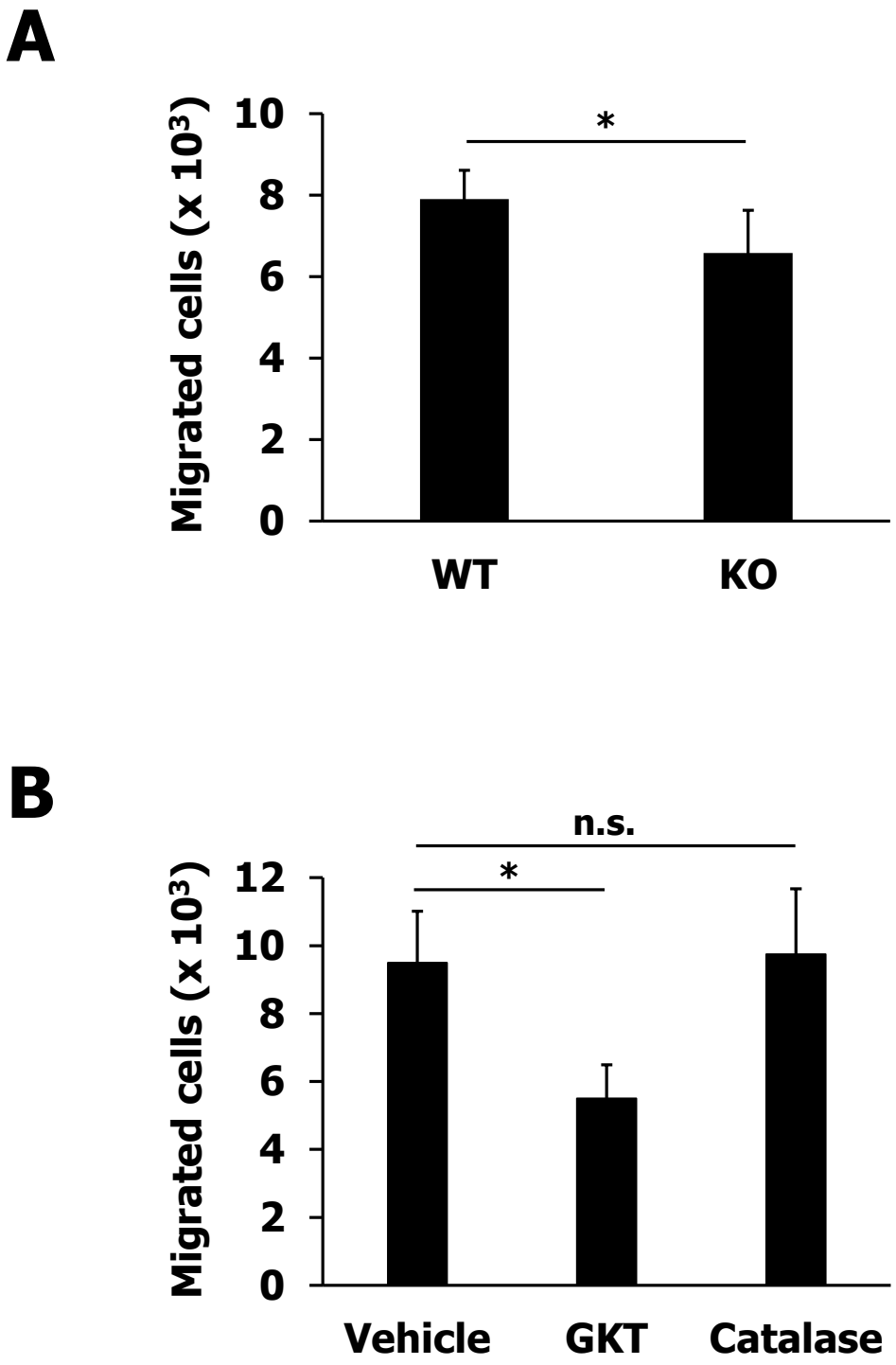

図5. NOX4が炎症細胞の遊走に与える影響
(A) WTおよびKO MEFに10 GyのX線照射を行い、7日間培養した。各サンプルから条件培地を回収し、これに対するU937細胞の遊走をトランスウェルアッセイにより評価した。 (B) BALB/c MEFに10 GyのX線照射を行った後、20 μMのGKT137831 (GKT)の存在もしくは非存在下で7日間培養した。各サンプルから条件培地を回収し、これに対するU937細胞の遊走をトランスウェルアッセイにより評価した。Catalase (50 U/mL)はGKT未処理群の細胞より回収した培地にトランスウェルアッセイの10分前に処理した。統計的有意差は*p <0.05で示し、n.s.は有意差がないことを示す。

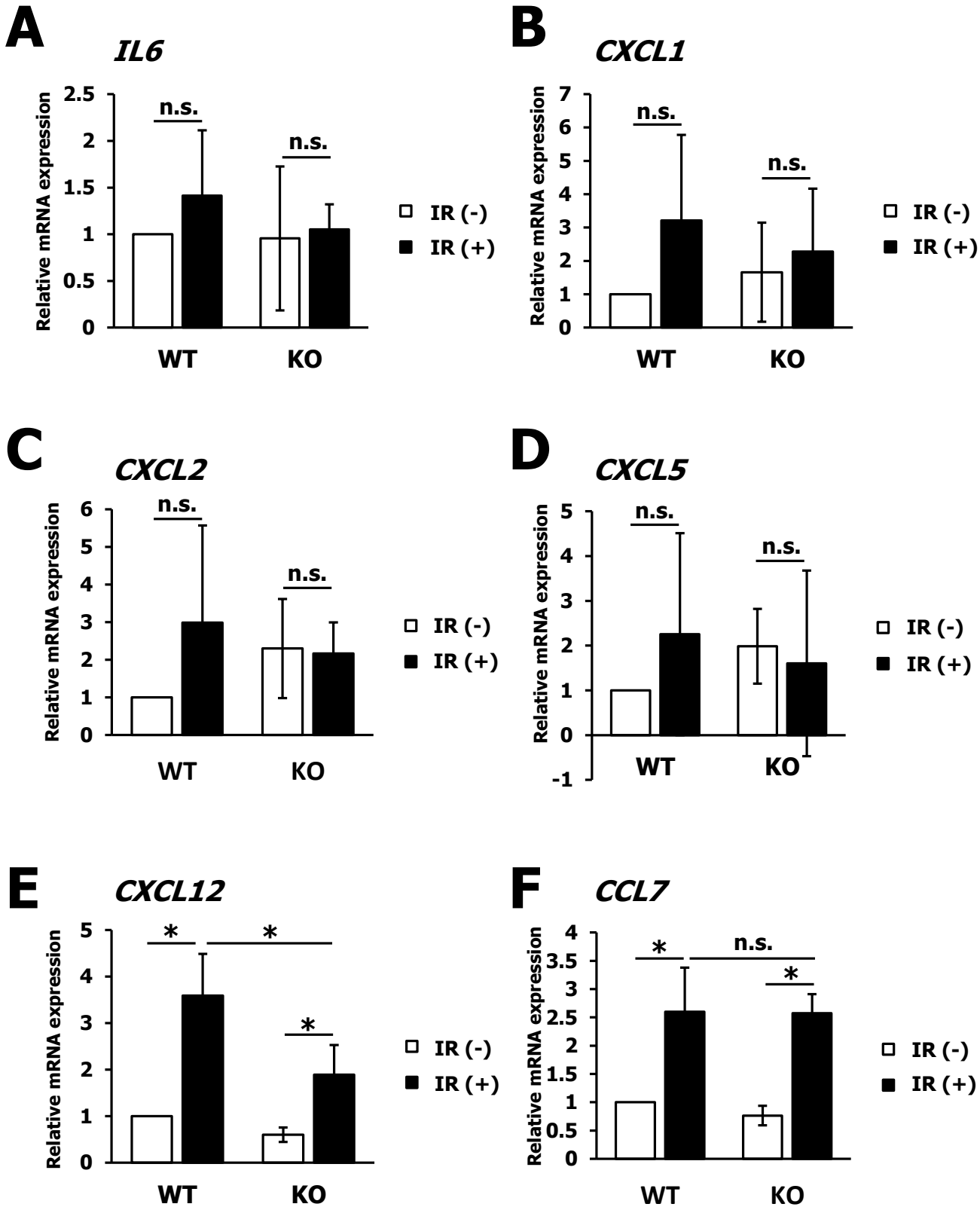

図6. X線照射後の各炎症性サイトカイン遺伝子の発現にNOX4が与える影響

WTおよびKO MEFに10 GyのX線照射を行い、7日間培養した。(A) IL6 、(B) CXCL1、(C) CXCL2、(D) CXCL5、(E) CXCL12、ならびに(F) CCL7遺伝子のmRNA発現を定量RT-PCR法により解析した。各遺伝子のmRNAレベルは、非照射時のWT MEFにおける発現レベルを1とし、これに対する相対値で示した。各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*p <0.05で示し、n.s.は有意差がないことを示す。

4. 考察

本研究の目的のひとつは放射線によって誘導された細胞老化に NOX が関与しているかどうかを解明することである。はじめに、X 線照射によって誘導された SIPS 細胞において *NOX4* 遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった（図 2)。一方で、X 線照射によって他の NOX アイソフォームの発現は影響を受けなかったことから、NOX4 は MEF において放射線誘発性早期老化に関連する特異的な NOX アイソフォームであると考えられる。放射線誘発性の早期老化と NOX の発現との関連性についてはほとんど知見が存在しないものの、Amezine-El-Hassani らはヒト甲状腺細胞において、放射線照射により遅発性の DUOX1 発現が誘導されることを報告している [2)]。これより、放射線照射が細胞の由来（組織、臓器、ならびに生物種）に応じて異なる NOX アイソフォームを誘導することが示唆される。また、がん遺伝子の誘導や化学療法剤の処理による細胞老化の誘導と NOX4 発現の関連性が報告されていることから [18, 29, 54)]、NOX4 の発現誘導は SIPS における共通の特徴のひとつである可能性が示唆された。

以前の研究で、持続的な DNA ダメージおよびそれに引き続く DDR の活性化が SIPS の誘導に重要であることが報告されている [43)]。そのため、DDR が放射線によって誘導される *NOX4* の発現において何らかの役割を果たしているのではないかと仮説を立て、これに関わるシグナル経路について解析を行った。X 線照射によって誘導される *NOX4* の発現は ATM の阻害によって有意に増強されることが明らかとなったことから（図

3D)、ATM は放射線誘導性早期老化の過程において *NOX4* の発現を抑制的に制御していることが示唆された。ATM は DDR において様々なエフェクタータンパク質にシグナルを伝達する重要なタンパク質であることから [48]、この結果は当初の予想に反するものであった。その一方で、以前の研究により ATM はストレス刺激によって誘導された ROS 産生およびその後の DNA ダメージを調節することにより、DDR シグナルの増幅を抑制することが示唆されている [9, 38]。これらの知見により、放射線により誘導される *NOX4* 発現は DDR、ROS、ならびに ATM により構成される負のフィードバック機構により調節されており、ATM の阻害がこのフィードバック機構を破綻させたことで、照射後の *NOX4* の発現上昇を引き起こしたと考えられる。

本研究では、薬剤処理もしくは遺伝子操作によって NOX4 を阻害することにより、放射線照射後の ROS 産生が抑制されたことから（図 3A および C)、SIPS の誘導された細胞において NOX4 が ROS 産生に関与していることが示された。しかしながら、NOX4 の阻害は、特に遺伝的に欠損させた場合、ROS レベルを部分的にしか減少させなかったことから、放射線により誘導された老化細胞には NOX 以外の ROS 産生源が存在すると考えられる。この可能性のひとつとして考え得るのはミトコンドリアである。ミトコンドリアの機能不全およびその結果として起こる ROS の異常な放出が細胞老化の誘導や維持に関与していることが報告されており、これらの知見は老化細胞におけるミトコンドリアの重要性を強く示唆するものである [16, 41]。また、NOX 以外の酵素についても

ROS の産生源として考慮すべきである。NOX4 は MEF において検出し得る唯一の NOX 酵素であったが、GKT 処理による NOX4 の阻害が ROS レベルの低下に及ぼした効果は NOX4 の欠失によるものよりも大きかった （図 3A および C)。GKT は NOX に対し高い特異性をもつ阻害剤であることが報告されているものの [1)]、他の ROS 産生酵素に対する効果については xanthine oxidase を除いて精査されていない。それゆえ、GKT が NOX 以外の ROS 産生酵素に影響を与えた可能性は除外できず、この点に関してはさらなる検討が必要である。

ROS は細胞老化を引き起こす主要な因子の一つであることが示唆されている [10)]。しかしながら、本研究では放射線照射による細胞老化は NOX4 の有無にかかわらず同程度引き起こされた（図４)。この結果は放射線による SIPS に NOX4 の存在は必須ではないということを示唆している。この結果に反し、以前の研究で NOX4 が放射線やがん遺伝子によって誘導される細胞老化に関与することが報告されている [8, 29)]。この矛盾が生じた理由として考えられるのは、細胞培養に用いた酸素濃度の差異である。本研究では細胞を生理的な酸素条件 (3%)で培養したのに対し、前述の研究では標準的な酸素濃度 (20%)が用いられていた。細胞培養における酸素レベルは細胞老化や老化細胞の形質に大きな影響を与えるため [14, 15, 40)]、それぞれの研究で用いた酸素条件の相違が照射後の細胞応答や形質に影響を与え、異なる結果をもたらしたという可能性が考えられる。

本研究では、X 線照射を行った細胞において NOX4 を阻害すると、これにより動員さ

れる炎症細胞の数が減少したものの、炎症細胞の遊走は catalase 処理による ROS の除去によって影響を受けなかった。その一方で、X 線照射後の WT および KO MEF における数種類のケモカイン遺伝子の発現を解析した結果、X 線照射によって誘導された *CXCL12* 遺伝子の発現は NOX4 の欠損により有意に低下した（図 6）。以前より、ROS は細胞内シグナル経路の活性化を介して SASP 因子を誘導するために重要な役割を果たすことが報告されている [17, 53]。また、NOX は monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5)、もしくは CXCL2 などのケモカインの放出に関与することが示されている [30, 50]。さらに、catalase や Cu/Zn-superoxide dismutase を過剰発現させることにより、TNF-α によって誘導された NOX 依存的な *MCP-1* mRNA の発現を減弱させることが報告されている [11]。以上より、NOX4 由来の ROS は上記と同様のメカニズムによって、老化細胞からの CXCL12 の分泌を増加させることにより、炎症細胞の遊走を促進した可能性が示唆された。

結論として、本研究において放射線照射は SIPS の誘導過程において NOX4 の発現を促進し、また NOX4 が放射線照射により誘導された老化細胞における ROS 産生に関与することが明らかとなった。さらに、照射を受けた細胞における NOX4 の発現上昇は周囲の炎症細胞の遊走を促進することが明らかとなった。これらの結果より、NOX4 は炎症細胞を動員することによって放射線照射による正常組織の損傷や炎症の増悪に寄与することが示唆され、NOX4 を抑制することが放射線による有害事象を緩和するための

新しいアプローチになる可能性が示された。

5. 総括

正常組織に対する放射線照射による過剰な DNA ダメージは、細胞に「ストレス誘発性早期老化 (stress-induced premature senescence (SIPS)」と呼ばれる現象を引き起こす。SIPS が誘導された細胞では、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)の産生が亢進していることが報告されており、この ROS は DNA を直接的に傷害することにより、SIPS のさらなる誘導と維持に関与していると考えられている。しかしながら老化細胞における ROS の産生源についてや、老化細胞において亢進した ROS 産生が放射線照射による正常組織の損傷に対してどのような意義を持つのかについては不明な点が多く残されている。そこで本研究では細胞内の主要な 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、この SIPS 細胞における ROS 産生および SIPS に関連する生物学的事象への関与について検討を行った。

初代培養のマウス胎子線維芽細胞 (MEF)に X 線照射を行うと、細胞老化が誘導されるとともに、細胞内 ROS レベルの顕著な上昇が観察された。そこで、マウスに存在する 6 つの NOX アイソフォーム（NOX1-4 および DUOX1/2）の発現を解析すると、X 線非照射の状態ではこれらのうち NOX4 の発現のみが検出され、さらにこの発現は X 線照射によって上昇した。また、低分子阻害薬もしくは遺伝子操作によって NOX4 を阻害すると、X 線照射後に観察される ROS の産生が抑制された。しかしその一方で、NOX4 の欠損によって照射後の細胞老化の誘導に変化は生じなかったことから、NOX4 の存在

は放射線による細胞老化の誘導に必須ではないことが明らかとなった。さらに、X 線照射を行った MEF より回収した条件培地に対するヒトリンパ芽球 U937 細胞の遊走は、MEF の NOX4 を阻害することにより有意に減少したことから、NOX4 は周囲に存在する炎症細胞の遊走を促進することが示された。

以上の結果より、NOX4 は放射線照射によって誘導される老化細胞において ROS の産生源として機能するとともに、周囲の炎症細胞の動員を促進することによって、放射線照射による正常組織の炎症の増悪を引き起こし得る可能性が示された。

＜謝辞＞

本稿を終えるにあたり、御指導賜りました北海道大学大学院獣医学研究院応用獣医科学講座放射線学教室の稲波修教授、山盛徹准教授に深く感謝致します。また、本論文を御校閲頂きました本研究院臨床獣医科学講座動物分子医学教室の稲葉睦教授、本研究院基礎獣医科学講座生化学教室の岡松優子講師、ならびに北海道大学大学院医理工学院応用分子画像科学分野の安井博宣准教授に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究の遂行にあたり終始多大な御助言、御協力を頂きました教室の皆様に謹んで御礼申し上げます。

＜引用文献＞

1) Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, and Schmidt HH. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. Antioxid Redox Signal 23, 406-427, 2015.

2) Ameziane-El-Hassani R, Talbot M, de Souza Dos Santos MC, Al Ghuzlan A, Hartl D, Bidart JM, De Deken X, Miot F, Diallo I, de Vathaire F, Schlumberger M. and Dupuy C. NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 5051-5056, 2015.

3) Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 87, 245-313, 2007.

4) Berkenkamp B, Susnik N, Baisantry A, Kuznetsova I, Jacobi C, Sörensen-Zender I, Broecker V, Haller H, Melk A, and Schmitt R. In vivo and in vitro analysis of age-associated changes and somatic cellular senescence in renal epithelial cells. PLoS One 9, e88071, 2014.

5) Bettaieb A, Jiang JX, Sasaki Y, Chao TI, Kiss Z, Chen X, Tian J, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C, Xi Y, Szyndralewiez C, Schröder K, Shah A, Brandes RP, Haj FG, and Török NJ. Hepatocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 4 regulates stress signaling, fibrosis, and insulin sensitivity during development of steatohepatitis in mice. Gastroenterology 149, 468-480.e410, 2015.

6) Borodkina A, Shatrova A, Abushik P, Nikolsky N, and Burova E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. Aging (Albany NY) 6, 481-495, 2014.

7) Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y, Basset O, Hinz B, Preynat-Seauve O, Guichard C, Arbiser JL, Banfi B, Pache JC, Barazzone-Argiroffo C, and Krause KH. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. Antioxid Redox Signal 15, 607-619, 2011.

8) Chatterjee A, Kosmacek EA, and Oberley-Deegan RE. MnTE-2-PyP treatment, or NOX4 inhibition, protects against radiation-induced damage in mouse primary prostate fibroblasts by inhibiting the TGF-beta 1 signaling pathway. Radiat Res 187, 367-381, 2017.

9) Chen H, Ruiz PD, McKimpson WM, Novikov L, Kitsis RN, and Gamble MJ. MacroH2A1 and ATM play opposing roles in paracrine senescence and the senescence-associated secretory phenotype. Mol Cell 59, 719-731, 2015.

10) Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, and Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 4337-4341, 1995.

11) Chen XL, Zhang Q, Zhao R, and Medford RM. Superoxide, H2O2, and iron are required for TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286, H1001-1007, 2004.

12) Choi SH, Kim M, Lee HJ, Kim EH, Kim CH, and Lee YJ. Effects of NOX1 on fibroblastic changes of endothelial cells in radiation-induced pulmonary fibrosis. Mol Med Rep 13, 4135-4142, 2016.

13) Collins-Underwood JR, Zhao W, Sharpe JG, and Robbins ME. NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells. Free Radic Biol Med 45, 929-938, 2008.

14) Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, and Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu Rev Pathol 5, 99-118, 2010.

15) Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PY, and Campisi J. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. PLoS One 5, e9188, 2010.

16) Correia-Melo C, Hewitt G, and Passos JF. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? Longev Healthspan 3, 1, 2014.

17) D'Apolito M, Colia AL, Lasalvia M, Capozzi V, Falcone MP, Pettoello-Mantovani M, Brownlee M, Maffione AB, and Giardino I. Urea-induced ROS accelerate senescence in endothelial progenitor cells. Atherosclerosis 263, 127-136, 2017.

18) Demelash A, Pfannenstiel LW, Liu L, and Gastman BR. Mcl-1 regulates reactive oxygen species via NOX4 during chemotherapy-induced senescence. Oncotarget 8, 28154-28168, 2017.

19) Dierick JF, Eliaers F, Remacle J, Raes M, Fey SJ, Larsen PM, and Toussaint O. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. Biochem Pharmacol 64, 1011-1017, 2002.

20) Fulton DJ. Nox5 and the regulation of cellular function. Antioxid Redox Signal, 11, 2443-2452, 2009.

21) Fumagalli M and d'Adda di Fagagna F. SASPense and DDRama in cancer and ageing. Nat Cell Biol, 11, 921-923, 2009.

22) Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, and Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 8010-8014, 2000.

23) Graham KA, Kulawiec M, Owens KM, Li X, Desouki MM, Chandra D, and Singh KK. NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. Cancer Biol Ther 10, 223-231, 2010.

24) Ha H and Lee HB. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. Nephrology (Carlton) 10 Suppl, S7-

10, 2005.

25) Hong EH, Lee SJ, Kim JS, Lee KH, Um HD, Kim JH, Kim SJ, Kim JI, and Hwang SG. Ionizing radiation induces cellular senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase. J Biol Chem 285, 1283-1295, 2010.

26) Irvine KM, Skoien R, Bokil NJ, Melino M, Thomas GP, Loo D, Gabrielli B, Hill MM, Sweet MJ, Clouston AD, and Powell EE. Senescent human hepatocytes express a unique secretory phenotype and promote macrophage migration. World J Gastroenterol 20, 17851-17862, 2014.

27) Janssens S and Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. Cell Death Differ 13, 773-784, 2006.

28) Jha JC, Gray SP, Barit D, Okabe J, El-Osta A, Namikoshi T, Thallas-Bonke V, Wingler K, Szyndralewiez C, Heitz F, Touyz RM, Cooper ME, Schmidt HH, and Jandeleit-Dahm KA. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 25, 1237-1254, 2014.

29) Kodama R, Kato M, Furuta S, Ueno S, Zhang Y, Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Tanaka E, and Kamata T. ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. Genes Cells 18, 32-41, 2013.

30) Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, and Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. Antioxid Redox Signal 20, 2794-2814, 2014.

31) Lawenda BD, Gagne HM, Gierga DP, Niemierko A, Wong WM, Tarbell NJ, Chen GT, Hochberg FH, and Loeffler JS. Permanent alopecia after cranial irradiation: dose-response relationship. Int J Radiat Oncol Biol Phys 60, 879-887, 2004.

32) Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y, Steger K, Krause KH, and Jaconi ME. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. Mol Biol Cell 17, 3978-3988, 2006.

33) Liu X, Pei C, Yan S, Liu G, Chen W, Cui Y, and Liu Y. NADPH oxidase 1-dependent ROS is crucial for TLR4 signaling to promote tumor metastasis of non-small cell lung cancer. Tumour Biol 36, 1493-1502, 2015.

34) Lozhkin A, Vendrov AE, Pan H, Wickline SA, Madamanchi NR, and Runge MS. NADPH oxidase 4 regulates vascular inflammation in aging and atherosclerosis. J Mol Cell Cardiol 102, 10-21, 2017.

35) Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, and Aaronson SA. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. Mol Cell Biol 23, 8576-8585, 2003.

36) Marthandan S, Menzel U, Priebe S, Groth M, Guthke R, Platzer M, Hemmerich P,

Kaether C, and Diekmann S. Conserved genes and pathways in primary human fibroblast strains undergoing replicative and radiation induced senescence. Biol Res 49, 34, 2016.

37) Mehta V. Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: pulmonary function, prediction, and prevention. Int J Radiat Oncol Biol Phys 63, 5-24, 2005.

38) Nair RR, Bagheri M, and Saini DK. Temporally distinct roles of ATM and ROS in genotoxic-stress-dependent induction and maintenance of cellular senescence. J Cell Sci 128, 342-353, 2015.

39) Panganiban RA, Mungunsukh O, and Day RM. X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. Int J Radiat Biol 89, 656-667, 2013.

40) Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, and Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. Nat Cell Biol 5, 741-747, 2003.

41) Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, Wappler I, Birket MJ, Harold G, Schaeuble K, Birch-Machin MA, Kirkwood TB, and von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. PLoS Biol 5, e110, 2007.

42) Pawlikowski JS, Adams PD, and Nelson DM. Senescence at a glance. J Cell Sci 126, 4061-4067, 2013.

43) Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, and Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat Cell Biol 11, 973-979, 2009.

44) Sakai Y, Yamamori T, Yasui H, and Inanami O. Downregulation of the DNA repair enzyme apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 stimulates transforming growth factor-β1 production and promotes actin rearrangement. Biochem Biophys Res Commun 461, 35-41, 2015.

45) Schilder YD, Heiss EH, Schachner D, Ziegler J, Reznicek G, Sorescu D, and Dirsch VM. NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. Free Radic Biol Med 46, 1598-1606, 2009.

46) Sedeek M, Montezano AC, Hebert RL, Gray SP, Di Marco E, Jha JC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Schiffrin EL, Wilkinson-Berka JL, and Touyz RM. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes--potential targets for novel therapies. J Cardiovasc Transl Res 5, 509-518, 2012.

47) Segal BH, Grimm MJ, Khan AN, Han W, and Blackwell TS. Regulation of innate immunity by NADPH oxidase. Free Radic Biol Med 53, 72-80, 2012.

48) Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. Curr Opin Genet Dev 11, 71-77, 2001.

49) Sousa FG, Matuo R, Soares DG, Escargueil AE, Henriques JA, Larsen AK, and Saffi J. PARPs and the DNA damage response. Carcinogenesis 33, 1433-1440, 2012.

50) Tephly LA and Carter AB. Constitutive NADPH oxidase and increased mitochondrial respiratory chain activity regulate chemokine gene expression. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293, L1143-1155, 2007.

51) Torres M and Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. Biofactors 17, 287-296, 2003.

52) Vissink A, van Luijk P, Langendijk JA, and Coppes RP. Current ideas to reduce or salvage radiation damage to salivary glands. Oral Dis 21, e1-10, 2015.

53) Wang P, Han L, Shen H, Lv C, Zhao G, Niu J, Xue L, Wang QJ, Tong T, and Chen J. Protein kinase D1 is essential for Ras-induced senescence and tumor suppression by regulating senescence-associated inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A 111, 7683-7688, 2014.

54) Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraqech M, Prenois F, Courtin F, Caillou B, Talbot M, Dardalhon M, Al Ghuzlan A, Bidart JM, Schlumberger M, and Dupuy C. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. Oncogene 31, 1117-1129, 2012.

Effect of NADPH oxidase 4 on ROS production accompanying stress-induced premature senescence (SIPS) after X-irradiation and SIPS-associated biological events

Yuri SAKAI

Laboratory of Radiation Biology,

Department of Applied Veterinary Sciences,

Graduate School of Veterinary Medicine

Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

Excessive DNA damage induced by ionizing radiation (IR) to normal tissue cells is known to trigger cellular senescence, a process termed stress-induced premature senescence (SIPS). SIPS is often accompanied by the production of reactive oxygen species (ROS), and this is reported to be important for the initiation and maintenance of SIPS. However, the source of ROS during SIPS after IR and their significance in radiation-induced normal tissue damage remain elusive. In the present study, involvement of the NADPH oxidase (NOX) family of proteins in ROS production after IR and in SIPS-associated biological events were investigated. X-irradiation of primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) resulted in cellular senescence and the concomitant increase of intracellular ROS. Among all six murine NOX isoforms (*NOX1–4* and *DUOX1/2*), only *NOX4* was detectable under basal conditions and was upregulated following IR. In addition, radiation-induced ROS production was significantly attenuated by genetic or

pharmacological inhibition of NOX4. Meanwhile, NOX4 deficiency did not affect the induction of cellular senescence after IR, indicating that NOX4 is not an essential factor for the radiation-induced premature senescence. Furthermore, the migration of human monocytic U937 cells to the culture medium collected from irradiated MEFs was significantly reduced by NOX4 inhibition, suggesting that NOX4 promotes the recruitment of inflammatory cells. Collectively, these findings imply that NOX4 mediates ROS production in radiation-induced senescent cells and contributes to normal tissue damage after IR via the recruitment of inflammatory cells and the exacerbation of tissue inflammation.