

氏名 さかた きみまさ
坂田 公正

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 155 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部
博士課程 生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Roles of ROS and PKC- β II in ionizing radiation-induced eNOS
activation in human vascular endothelial cells
(ヒト血管内皮細胞における放射線誘導性 eNOS の ROS, PKC β II を介
する活性化機構)

論文審査委員

(主査) 教授 井村 穰二
(副査) 教授 山本 善裕
(副査) 教授 林 篤志
(副査) 教授 山崎 光章
(指導教員) 教授 芳村 直樹

論文内容の要旨

〔目的〕

放射線による発がん影響に関する研究は歴史も古く、研究情報の集積も膨大であり、例えば100 mSv被ばくにおける発がんリスクも周知されている。一方、放射線による非がん影響の研究は著しく遅れており、その分子機構の解明については殆ど進んでいないのが現状である。

近年、動脈瘤や動脈解離、虚血性心疾患や弁膜症等の心臓血管疾患は手術から、より低侵襲なカテーテルを用いた血管内治療へとシフトしている。そのため、医療現場での患者の放射線被ばく量は年々増加傾向にあり、合併症として急性期の皮膚紅斑や脱毛が問題となっている。

血管内皮細胞は放射線感受性が比較的高いことが知られており、線量と照射時間に依存して機能的障害に加え、細胞形態変化を著明に認める。そのため、放射線照射後の急性障害、晩発性障害において、血管内皮細胞の影響が指摘されている。我々の研究室では以前に、放射線照射 (45-60 Gy分割照射) 6週間後の患者の頸部血管を用い検討したところ、頸動脈内皮依存性弛緩が損なわれており、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現障害と関係していたと報告した。臨床的には、乳癌術後患者において、放射線照射後10年以上経過してから有意に虚血性心疾患を増加させるとの報告もあり、放射線照射後における循環器系への影響は非常に重要であると考えられる。そこで、本研究では非がん影響の放射線照射後における分子機構を解明するため、放射線感受性が高い正常血管内皮細胞を用いて放射線の影響を検討した。

〔方法並びに成績〕

本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、生理学的に重要な役割を果たしている eNOS のシグナリングが、放射線照射 (1-20 Gy) に曝露された内皮細胞で、どのように変化するかを検討した。蛋白レベルによる発現確認にはウェスタンブロッティング法を用いた。活性酸素種 (ROS) の測定について DCF (2',7'-ジクロロフルオレセイン) によって検出した。

HUVEC に対し放射線照射 (1-20 Gy) 後、24 時間での NO 産生量の変化について検討し

たところ、NO 産生量は放射線照射量に依存して増加し、10 Gy 以上において有意差を認めた。HUVEC に対し、X 線照射後72 時間以内での誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現量に変化を認めなかった。一方、eNOS 発現量も変化は認めないが、eNOS activation site である Ser-1177 部位でのリン酸化は増加し、eNOS inhibitory site である Thr-495 部位の脱リン酸化は亢進した。結果的に、[³H]-L-arginine から [³H]-L-citrulline への変換でみた eNOS 活性は亢進し、NO 代謝産物の増加を認めた。

内皮細胞の eNOS 調節因子である Akt のリン酸化は放射線照射により一過性に減少しているため、Akt 阻害薬を用い検討を行った。しかし、eNOS のリン酸化には影響を与えないことから X 線照射による eNOS 活性化は、その上流にある Akt の変化に起因しないと考えられる。また、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) ファミリーのうち、JNK, p-38 のリン酸化レベルには特に変化を認めないが、ERK1/2 のリン酸化レベルは放射線照射により一過性の増加を認めた。そのため ERK1/2 の上流にある MEK に対する阻害薬を用い検討を行ったが、eNOS のリン酸化に対する影響は与えないことが示唆された。HUVEC に存在する多くのプロテインキナーゼ C (PKC) サブタイプのうち、在来型に分類される PKC-β II のみ、放射線照射によって発現量の増加を認めた。そこで、PKC-β siRNA を作成し、その発現を抑制すると、放射線照射で亢進していた Ser-1177 部位での eNOS リン酸化、Thr-495 部位での eNOS 脱リン酸化、NO 代謝産物の増加のいずれも有意に減弱した。

細胞内での活性酸素種 (ROS) の生成は、放射線影響を考える上で重要課題であるが、照射による直接生成よりも、照射後の細胞内代謝修飾により生成する ROS が、その後の病態形成に関係することが知られている。本研究でも放射線照射により時間依存的に ROS 産生量は増加した。放射線照射による ROS 産生は、NADPH oxidase 阻害薬である VAS2870 と apocynin により有意に抑えられることから、NADPH oxidase 活性上昇が関与している可能性が示唆された。ROS scavenger である NAC (N-acetylcysteine) を用い eNOS リン酸化部位への影響を検討したところ、放射線照射で亢進していた Ser-1177 部位での eNOS リン酸化、Thr-495 部位での eNOS 脱リン酸化、NO 代謝産物の増加を抑制したが、PKC-β II の発現、また Akt のリン酸化レベルには特に影響を与えなかった。

〔総括〕

正常ヒト血管内皮細胞への放射線照射は、急性期に PKC-β II の発現増加と ROS の産生を促す。PKC-β II と ROS はそれぞれ別の経路を介して eNOS activation site である Ser-1177 のリン酸化、eNOS inhibitory site である Thr-495 の脱リン酸化を引き起こすことで

eNOS を活性化させる。その結果 NO を産生することにより、生体には血管拡張作用や血小板凝集抑制作用に働くものと考えられる。この血管内皮細胞における放射線照射性 eNOS 活性化機構は、分子機構は現在まで明らかにされていなかった、放射線照射後、早期の皮膚障害である急性反応炎症としての発赤・紅斑の形成メカニズムや、心臓冠動脈に対する放射線照射によりバルーン血管形成術後の再狭窄を予防、また、短期的な冠動脈の開存率が上昇していた理由を説明できる可能性を示唆するものである。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

【目的】

放射線による発がん影響については数多くの研究がなされてきているが、放射線の非がん影響の研究はまだ発展途上にあり、特にその分子機構の解明については十分に明らかにされてきていない。血管内皮細胞は、血管の最内層にある細胞で、血管の健康状態を維持するのに非常に重要な役割を果たしており、一酸化窒素 (NO) やエンドセリンなど数多くの血管作動性物質を放出して、血管壁の収縮・弛緩をはじめとして、血管壁への炎症細胞の接着、血管透過性、凝固・線溶系の調節などを行っている。血管内皮細胞は、放射線感受性が極めて高いことが知られており、その機能的多様性から、放射線照射による非がん的な生体反応や、冠動脈狭窄に対する放射線ステントの効用などの放射線の医学的応用に関してのメカニズムをいくつか説明し得る可能性がある。そこで、坂田君は、培養した正常血管内皮細胞を用い、内皮細胞の主要な機能である血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性化に対する、放射線照射の影響を検討し、その照射後の分子機構を明らかにして、放射線照射による非がん的な生体反応や、放射線の医学的応用に関してのメカニズム解明に発展させようとした。

【方法並びに成績】

本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、生理学的に重要な役割を果たしている eNOS のシグナリングが、放射線照射 (1-20 Gy) に曝露された内皮細胞で、どのように変化するかを検討した。

HUVEC に対し放射線照射 (1-20 Gy) 後、24 時間での NO 産生量の変化について検討したところ、NO 産生量は放射線照射量に依存して増加し、10 Gy 以上において有意差を認めた。HUVEC に対し、X 線照射後 72 時間以内での誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現量に変化を認めなかった。一方、eNOS 発現量も変化は認めないが、eNOS activation site である Ser-1177 部位でのリン酸化は増加し、eNOS inhibitory site である Thr-495 部位の脱リン酸化は亢進した。結果的に、 $[^3\text{H}]$ -L-arginine から $[^3\text{H}]$ -L-citrulline への変換でみた eNOS 活性は亢進し、NO 代謝産物の増加を認めた。

内皮細胞の eNOS 調節因子である Akt のリン酸化は放射線照射により一過性に減少しているため、Akt 阻害薬を用い検討を行った。しかし、eNOS のリン酸化には影響を

与えないことから X 線照射 による eNOS 活性化は、その上流にある Akt の変化に起因しないと考えられる。また、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK)ファミリーのうち、JNK, p-38 のリン酸化レベルには特に変化を認めないが、ERK1/2 のリン酸化レベルは放射線照射により一過性の増加を認めた。そのため ERK1/2 の上流にある MEK に対する阻害薬を用い検討を行ったが、eNOS のリン酸化に対する影響は与えないことが示唆された。HUVEC に存在する多くのプロテインキナーゼ C (PKC) サブタイプのうち、在来型に分類される PKC- β II のみ、放射線照射によって発現量の増加を認めた。そこで、PKC- β siRNA を作成し、その発現を抑制すると、放射線照射で亢進していた Ser-1177 部位での eNOS リン酸化、Thr-495 部位での eNOS 脱リン酸化、NO 代謝産物の増加のいずれも有意に減弱した。

細胞内での活性酸素種 (ROS) の生成は、放射線影響を考える上で重要課題であるが、照射による直接生成よりも、照射後の細胞内代謝修飾により生成する ROS が、その後の病態形成に関係することが知られている。本研究でも放射線照射により時間依存的に ROS 産生量は増加した。放射線照射による ROS 産生は、NADPH oxidase 阻害薬である VAS2870 と apocynin により有意に抑えられることから、NADPH oxidase 活性上昇が関与している可能性が示唆された。ROS scavenger である NAC (N-acetylcysteine) を用い eNOS リン酸化部位への影響を検討したところ、放射線照射で亢進していた Ser-1177 部位での eNOS リン酸化、Thr-495 部位での eNOS 脱リン酸化、NO 代謝産物の増加を抑制したが、PKC- β II の発現、また Akt のリン酸化レベルには特に影響を与えなかった。

【総括】

以上のことから、本研究では、正常ヒト血管内皮細胞への放射線照射は、急性期に PKC- β II の発現増加と ROS の産生を促すことにより、eNOS activation site である Ser-1177 のリン酸化、eNOS inhibitory site である Thr-495 の脱リン酸化を引き起こすことで eNOS を活性化させることが明らかになった。この eNOS 活性化によって産生された NO により、生体において血管拡張作用や血小板凝集抑制作用に働くことが示唆される。この様に、これら血管内皮細胞における放射線照射による eNOS 活性化機構は、分子機構が現在まで明らかにされていなかったが、今回の研究において、それらの機構を解明した点において新規性があると思われ、また、これらの結果は学術的重要性が高

いものと判断される。更に、放射線照射後、早期の皮膚障害である急性炎症反応としての発赤・紅斑の形成メカニズムや、心臓冠動脈に対する放射線照射によりバルーン血管形成術後の再狭窄を予防する手段の開発にも繋がり、臨床面への貢献が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。