

機関番号：82502

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591507

研究課題名 (和文) 放射線誘発アポトーシスとアテローム性動脈硬化症の発症・進展との関連に関する研究

研究課題名 (英文) A study of the relationship between radiation-induced apoptosis and development of atherosclerosis.

研究代表者 中島 徹夫 (NAKAJIMA TETSUO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：80237271

研究成果の概要 (和文)：放射線の血管系影響としてアテローム性動脈硬化症との関連が指摘されている。アテローム性動脈硬化症の修飾因子としては酸化ストレスなどアポトーシス (細胞死) 誘導能を持つものが多いため、動脈硬化症の発症と進展における血管平滑筋細胞のアポトーシスの関与について放射線影響との関わりについて解析を行い酸化型 LDL (低密度リポタンパク質) 前処理で放射線誘導性アポトーシスが增強され、そこにプロテインキナーゼ C (リン酸化酵素の 1 種)、酸化脂質が介在することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：There is a concern that radiation induces atherosclerosis as side effects after radiotherapies. Radiation-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells is one of possible mediating processes, because development of atherosclerosis is mediated by oxidative stresses, which can be apoptosis inducers. Radiation-induced apoptosis in the cells was evaluated under the presence of some mediators related to atherosclerosis. Radiation-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells was increased by pre-treatment with oxLDL (oxidized low-density lipoproteins). It was also demonstrated that the process by oxLDL mediation involves protein kinase C and lipid peroxides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学・放射線治療生物学

キーワード：シグナル伝達、放射線、ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣病は社会の高齢化に伴い深刻さを増しつつある。アテローム性動脈硬化症は生活習慣病の一つであり、他の疾病に伴っても誘発される。一方で高齢化に伴い、がん治療などにおいて外科的手術よりもより患

者の身体に負担の少ない放射線治療を選択しなければならない事例が増加することが予想されている。近年、放射線による影響として放射線治療に伴いアテローム性動脈硬化症の進展が生じることが示唆され (Stewart et al., Am. J. Pathol., 2006)、

放射線感受性関連遺伝子 ATM が欠損するとアテローム性動脈硬化症が生じやすくなる事例が報告される (Schneider et al., Cell Metab., 2006) など放射線とアテローム性動脈硬化症との関連はより明確に示された。

(2) がん抑制遺伝子産物 p53 タンパク質が血管平滑筋細胞のアポトーシスをふせぐことを伴ってアテローム性動脈硬化症を減らすことも報告されている (Mercer et al., Circ Res. 2005). ATM や p53 タンパク質は放射線誘発アポトーシスを制御することが知られている。アテローム性動脈硬化の発症は血管内のプラークの生成に起因するが、進展に伴いそのプラーク内には血管平滑筋細胞や炎症関連細胞が蓄積され、細胞外マトリックスタンパク質を多く含むようになる。最近になって DNA 損傷がプラークにある細胞群に認められ動脈硬化の発症と関連していることや血管平滑筋細胞のアポトーシスがプラークの増大に寄与すること (Mahmoudi et al., Cardiovasc. Res., 2006) などが報告されアテローム性動脈硬化症とアポトーシスは密接に関連していることが明らかにされつつある。放射線は DNA 損傷ストレスであり、放射線治療に伴う被ばくによる DNA 損傷、アポトーシス誘起は副次的障害を考えるうえで重要な指標である。

(3) 私はこれまでに放射線誘発アポトーシスにおけるプロテインキナーゼ C (PKC) の役割について解析を続け、PKC は放射線誘発アポトーシスの制御機構において重要な酵素であることを明確にした (Nakajima., Med. Sci. Moni 2006, J. Rad. Res., 2007)。加えて、ATM 関連のアポトーシス制御に PKC  $\delta$  が関与することを示し、そのカスケードを明らかにしつつある (Nakajima., Mut. Res. 2006)。動脈硬化症の発症において PKC が何らかの役割をしていることは必ずしも明確でないが、PKC  $\beta$  の欠損マウスでアテローム性動脈硬化症が減少するという報告などその関与が示唆されている (Rask-Madsen and King., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2005)。一方でアテローム性動脈硬化症において、放射線被ばく時のアポトーシスの誘起と PKC シグナリング系の関与などについての解析は未だなされてなく、放射線、アテローム性動脈硬化の発症・進展、アポトーシス制御の結びつきは明らかでない。

(4) 血管系の放射線被ばくのリスクは現在

でも検討課題のひとつとして放射線防護委員会の勧告にも挙げられている (2007年 ICRP 新勧告) ように科学的に検討することへの社会的な要請も高いものである。放射線によるアポトーシスの発生とアテローム性動脈硬化症の発症・進展との関連を明らかにすることでアテローム性動脈硬化の主要因となる因子を同定できれば、放射線治療におけるリスクの低減化に有用なだけでなく、広くアテローム性動脈硬化症の予防、治療の方策を提供できると考え本課題を提案した。

## 2. 研究の目的

本課題においては放射線とアテローム性動脈硬化の発症・進展の結びつきをアポトーシス制御機構の視点から明らかにすべく実験モデル系の確立を試み、そして樹立されたモデル系を用いて PKC 関連放射線誘発アポトーシス制御の関与を中心としてアテローム性動脈硬化症の発症・進展への放射線被ばくがもたらす効果、さらに生活習慣病の病歴、年齢などがもたらす因子との複合効果を研究期間内に解析する。

## 3. 研究の方法

本研究は個体レベルのアテローム性動脈硬化症のアッセイ条件をより反映した条件の再構築を試みるため、初代培養系を用いることでモデルシステムの構築を行い、それを用いて、生化学、細胞生物学レベルでの解析を行う。血管平滑筋細胞への放射線効果を検討するため、マウスの初代培養血管平滑筋細胞を用いて放射線誘発アポトーシスを検討する。始めに野生型マウス (C57BL/6J 5週令雄) を用いて放射線誘導性アポトーシスに関するアッセイ系の樹立を行う。初代培養血管平滑筋細胞をマウスの大動脈から採取、培養して実験を行う。培養皿上ほぼ 100% を占めた段階でさらに低血清培地で培養を行ない細胞の増殖を止めた段階で実験に用いる。アポトーシスを指標として影響を評価するが放射線単独で影響を評価することに加え活性酸素処理 (過酸化水素) または低酸素濃度処理と放射線照射との併用効果また LDL、酸化型 LDL、酸化脂質と放射線照射との併用効果を評価する。Hoechst 染色法による核観察、カスパーゼ 3 の活性化などを指標としてアポトーシスは評価する。PKC 関連情報伝達系の関与については PKC 特異的阻害剤存在下で影響評価、また PKC によるリン酸化部位に特異的な抗体 (Cell Signaling 社) によるウェスタンブロット法を用いて評価する。また動脈硬化高発症マウスである ApoE(-/-) マウス由来の血管平滑筋

細胞を用いた実験も一部行う。

#### 4. 研究成果

(1) 放射線誘導性アポトーシスとアテローム性動脈硬化症の発症との関連を調べるため血管平滑筋細胞の初代培養系を用いて解析を行った。放射線誘導性アポトーシスが誘起される系を探索するためアテローム性動脈硬化症との関連や血管平滑筋細胞をアポトーシスさせるストレスとして報告のあったものを組み合わせて実験を行った。酸化ストレスについては動脈硬化症との関連が報告されている過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を用いて、放射線(10 Gy)との組み合わせでアポトーシス誘導の変化をみたところ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.2mM)と放射線(10 Gy)の組み合わせでは相加的に上昇がみられた。アテローム性動脈硬化の進展部位は低酸素状態になっており低酸素ストレスはアポトーシスの刺激因子になるため低酸素状態(1%)と放射線を組み合わせでも検討したが相加的に上昇のみであった。アテローム性動脈硬化症の危険因子として知られるLDL(低密度リポタンパク質)の酸化型の酸化型LDLはアポトーシスの刺激因子となるため放射線との組み合わせで検討したところ(酸化型LDL濃度20 $\mu$ g/ml)組み合わせた場合に相加的以上の上昇が見られた。これらのことから酸化型LDL特異的シグナリング系は放射線誘導性アポトーシスとアテローム性動脈硬化症の発症・進展との関連に関与するものと推察された。

(2) 放射線照射前の酸化型LDL導入では放射線との複合効果としてのアポトーシスは起こるが、放射線照射後で導入した場合にはそのような複合効果は生じないことも明らかにしたことから、酸化型LDLが誘起するシグナリング系の放射線による修飾効果が重要であることが考えられた。また非酸化型LDLでは酸化型LDLのような複合効果はみられなかった。このことは単にLDL量の増加のみでなく酸化状態の亢進などの生体内での状態変化がアポトーシスにおける放射線との複合的誘起には重要であることを示している。

(3) 加えてプロテインキナーゼC(PKC)の特異的阻害剤(Ro 30-8220: 1 $\mu$ M)を用いて、観察された複合的誘起効果への影響を調べたところPKC阻害剤でアポトーシスの複合的誘起が阻害されることを見出し、放射線が修飾する本シグナリング系ではPKCが重要な関与をすることを明らかにした。PKCが介在する細胞情報伝達系により酸化型LDL(低密度リポタンパク質)による効果と放射線被ばくによる効果の併用効果

が生じる可能性が示されたことから、その細胞情報伝達系をさらに詳細に明らかにするためにPKCによりリン酸化されるタンパク質のリン酸化部位を特異的に認識する抗体を用いて、細胞内タンパク質のPKCのリン酸化による変化を解析した。酸化型LDLにより血管平滑筋細胞においてリン酸化が誘導される分子バンドを検出した。そのバンドは放射線照射のみではリン酸化のシグナルは対照レベル以下に消失するが、酸化型LDLと放射線の併用時には酸化型LDL処理時のレベルに戻っていた。

(4) さらに動脈硬化発症モデルマウスであり放射線照射で動脈硬化の進展が加速化される動脈硬化高発症マウスである ApoE(-/-)マウス由来の血管平滑筋細胞を用いた実験でもPKCのリン酸化基質の変化にほぼ同様の傾向がみられた。ApoE(-/-)マウスにおいては放射線による動脈硬化の発症が顕著に亢進されることが報告されていることから、ApoE(-/-)マウス由来血管平滑筋細胞でほぼ同様の傾向がみられたことはPKCの細胞情報伝達系が放射線誘導性アポトーシスの誘起に関与し、それが ApoE(-/-)マウスにおける動脈硬化の進展と関連しているとすれば、細胞自体の性質ではなく代謝系変化による細胞外環境変化によるものだということを示唆するものである。実際に ApoE(-/-)マウスの動脈硬化症は血液内成分の変化など様々な変化に関与していることが示されつつある。

(5) また一方で酸化型LDLの主要な酸化脂質成分であるHNE(4-hydroxy Nonenal)による放射線誘導性アポトーシスへの修飾効果を調べてみると酸化型LDLと同様に修飾しうることを示唆する結果を得た。これらから放射線によるアポトーシス誘導における酸化脂質の修飾効果が重要であり、高脂肪食マウスや ApoE(-/-)マウスで報告された放射線による動脈硬化様障害の進展は、酸化脂質が放射線によるアポトーシス誘導を増強させ、その過程にPKCの細胞情報伝達系が介在すると考えられる。

(6) 本研究において生活習慣病に関わる因子により放射線による影響が増強する可能性が示された。さらに本研究はPKC細胞情報伝達系の介在分子の解析、また酸化型LDL中の酸化脂質の役割の詳細、またマクロファージなどの他の細胞との相互作用など多くの今後の検討課題を供出し、本アプローチが非常に有効なものであることが明らかになった。本研究遂行中の期間においてもDNA損傷とアテローム性動脈硬化症の関連についての興味深い論文が発表され議論され

ている (Mercer et al., Circ. Res., 2010)。A T M 遺伝子の欠損によりミトコンドリアの損傷が上昇し、活性酸素生成も上昇することで動脈硬化の進展が促進されるとするものである。またそこでは脂質分子種の変化も起こっていると報告している。議論はあるもののこれらの結果はDNA損傷とアテローム性動脈硬化症の発生機序との関連の理解には多面的なアプローチが必要なことを示唆している。本研究では放射線によるアテローム性動脈硬化症への影響として単なる活性酸素による修飾でなく酸化脂質を介したシグナル伝達の重要性を示唆する知見を得た。放射線影響の観点からの実験はアテローム性動脈硬化症の発生機序の理解に貢献するであろうと考えられる。今後、今回用いた複合的影響を評価する実験モデル系をさらに改良して影響の実態に迫る必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

① 中島徹夫、王 冰、根井充 「血管平滑筋細胞における放射線誘導性アポトーシス修飾因子の解析」 日本放射線影響学会第 52 回大会 2009/11/11-11/13 広島

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中島 徹夫 (NAKAJIMA TETSUO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：80237271

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：