

学位論文題名

Normalization by Edaravone, a Free Radical Scavenger,  
of Irradiation-Reduced Endothelial Nitric  
Oxide Synthase Expression

(放射線照射後のウサギ耳動脈における内皮細胞機能障害に対する  
フリーラジカルスカベンジャーの効果に関する薬理学的研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

血管内皮細胞の内皮由来血管弛緩因子(EDRF)の一つ NO は 血管内皮一酸化窒素合成酵素 (Endothelial NO synthase, eNOS) によって生産され、血管拡張および血圧の調節に重要な役割を果たしており、血小板の接着と凝集を阻害させ、血管平滑筋増殖を制限させ、血管形成も抑制させることが知られている。eNOS 活性の低下は、NO の産生を減少させるため、疾病の血管合併症につながる。放射線により血管内皮細胞が障害をうける可能性がある。放射線障害では内皮依存性血管弛緩反応が減弱されることが知られている。また 当研究室では 4.5 Gy のコバルト 60 照射後、ウサギ耳動脈のアセチルコリンおよび A23187 の内皮依存の弛緩反応は減弱し、eNOS 蛋白発現量も減少していることがわかった。更に、最近の研究は、放射線療法を持っていた患者で照射された頸動脈の eNOS を介した弛緩の不足を実証した。しかしながら 放射線による eNOS 蛋白の減少のメカニズムはまだ鮮明されていない。電離放射線はフリーラジカルを発生し、細胞内の生体分子の障害をもたらす、これは放射線障害の重要なメカニズムとして知られている。放射線照射後の血管での eNOS 蛋白発現量の減少は、照射された器官中でフリーラジカル産生の増加が原因である可能性がある。

それで 本研究では、コバルト-60 照射後のウサギ耳動脈の内皮依存性弛緩反応および eNOS 発現に対するフリーラジカルスカベンジャーの効果を検討する。

【方法】

1. 実験動物：体重 2-3kg の雄性ニュージーランド白色ウサギを対照群、Edaravone 投与群 (Edarabone 10mg/kg i.p. twice a day)、照射群(ウサギの耳に  $\gamma$ 線 45Gy を照射)およびそれに Edaravone 投与群(照射の前一日から Edarabone 10mg/kg i.p. twice a day+ウサギの耳に  $\gamma$ 線 45Gy を照射)の四群にわけた。2週間後に耳介中央動脈を摘出して、標本を作成した。

2. 内皮依存性弛緩反応の測定：摘出した耳介中央動脈は(各群 n=5 ウサギ) 酸化した PSS buffure(in mM NaCl 118.2, KCl 4.7, MgCl<sub>2</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 and glucose 10.0.)中で、内皮を損傷しないように結合組織および脂肪組織を剥離してから、長さ約 4 mm の輪状標本とし、PSS 溶液 (37°C, 95% O<sub>2</sub> と 5%CO<sub>2</sub>混合ガスで通気して) を満たした器官槽で輪状標本を懸垂し、2 g の静止張力をかけ、等張性高 K<sup>+</sup> 溶

液(40mM)による、安定した収縮が得られるようになった後、3  $\mu$ M の phenylephrine で 輪状標本を前収縮させ、1nM-100  $\mu$ M の acetylcholine による濃度依存の弛緩反応を行った。

2. eNOS 蛋白の組織蛍光免疫染色：摘出した耳中央動脈(各群 n=3 動脈)より凍結組織切片を作製し、蛍光免疫染色法で eNOS 蛋白の発現を各群で比較検討した。

3. eNOS 蛋白のイムノ・ブロット解析：摘出した耳中央動脈(各群 n=5 動脈)をホモゲナイズした後、遠心分離で得た上清より、各レーンに 10  $\mu$ g 蛋白を含むサンプルをおき、SDS-polyacrylamide gel で電気泳動後 ウェスタンブロット法で eNOS 蛋白の発現を各群で比較検討した。

4. eNOS mRNA の RT-PCR 解析：摘出した耳中央動脈(各群 n=3 動脈)より guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法で total RNA を抽出し、RT-PCR により eNOS mRNA の発現を各群で検討した。

### 【結果】

1. 3  $\mu$ M の phenylephrine による輪状標本の収縮反応は4群間で差が認めなかった。Acetylcholine による濃度依存の内皮依存性弛緩反応は照射群が対照群と比較して有意な減少を認めた(P<0.001-0.05)。治療群は対照群と比較して有意差を認めなかった。

2. 組織蛍光免疫染色とウェスタンブロットによる eNOS 蛋白の発現は対照群と比較して照射群がそれぞれ 52% と 47±2%に減少した(P<0.001)。Edarabone 治療群では対照群と比べて有意差を認めなかった。

3. RT-PCR による eNOS mRNA の発現は 照射群が対照群と比べて 47%を減少したが(P<0.05)、Edarabone による治療群で回復した。

### 【考察】

コバルト-60 照射二週間後のウサギ耳動脈の輪状標本において、acetylcholine による血管内皮依存性弛緩反応は著しく減弱された。正常なウサギ耳動脈は eNOS 阻害薬ではある N<sup>6</sup>-nitro-L-arginine (100  $\mu$ M) によって血管内皮依存性弛緩反応を消失した。これにより耳介中央動脈の内皮依存性弛緩反応は eNOS に依存することが考えられた。フリーラジカルスカベンジャー Edarabone の投与によって、放射線照射後の障害された血管内皮依存性弛緩反応が改善したが、このことは eNOS の活性がフリーラジカルをスカベンジすることで回復する可能性を示唆する。コバルト-60 照射では、ウサギ耳動脈の eNOS 発現低下(down-regulation)が生じていたが、これは eNOS 活性を抑制された原因の一つと考えられる。Edarabone を投与した際、eNOS の down-regulation が阻止されたが、照射された組織で生成したフリーラジカルを Edarabone がスカベンジし、eNOS の発現を保護したかもしれない。また、照射された血管の eNOS mRNA の発現は eNOS 蛋白の down-regulation と同様に著しく減った。これは放射線による eNOS 蛋白は mRNA レベルで down-regulation されると考えられた。Edarabone はフリーラジカルをスカベンジするが、ラジカルにより eNOS 転写抑制を加え、eNOS の発現を減少する可能性が本研究により示された。

本研究では ラジカルスカベンジャー：edarabone は 放射性照射による down-regulate されたウサギ耳動脈の eNOS 蛋白と eNOS mRNA の発現が正常化することを証明した。Edarabone は 放射線障害の患者の血管合併症を改善させる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 本 裕 二  
副 査 教 授 吉 岡 充 弘  
副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

## Normalization by Edaravone, a Free Radical Scavenger, of Irradiation-Reduced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression

(放射線照射後のウサギ耳動脈における内皮細胞機能障害に対する  
フリーラジカルスカベンジャーの効果に関する薬理学的研究)

血管内皮由来血管弛緩因子の一つである NO (一酸化窒素) は、血管内皮 NO 合成酵素 (endothelial NO synthase, eNOS) により産生され、拡散により血管平滑筋細胞に到達して細胞質に存在するグアニル酸シクラーゼを活性化して、cGMP レベルを上昇させて PKG 経路を介して血管平滑筋弛緩を引き起こす。放射線照射によりこの NO による内皮依存性弛緩反応が障害されると共に eNOS 蛋白の発現も減少することが知られている。しかし、放射線が eNOS 蛋白発現を抑制する機序はいまだ明らかにされていない。放射線は水分子を励起・電離することにより活性酸素種 (フリーラジカル) を発生させて細胞傷害を引き起こすが、このフリーラジカルが種々の放射線障害の重要な機序の一つと考えられている。このように放射線によるフリーラジカル産生が eNOS 蛋白発現を抑制して血管内皮細胞機能障害を惹起する可能性が高いため、本研究は放射線照射による血管内皮依存性弛緩反応の減弱をフリーラジカルスカベンジャーが改善するか否かの確認を目的として施行された。ウサギ耳動脈を使用して Cobalt<sup>60</sup> 照射により放射線障害モデルを作成し、フリーラジカルスカベンジャー: edaravone 前投与の効果を検討した。Cobalt<sup>60</sup> 照射二週間後に恒温槽において摘出耳動脈輪状標本の血管内皮依存性弛緩反応の変化を検討した。同時に eNOS 蛋白発現部位と発現量を免疫組織染色とウェスタンブロットを用いて解析し、RT-PCR により同蛋白 mRNA の発現を検討した。放射線照射によりアセチルコリン (Ach) による血管内皮依存性弛緩反応は著しく障害され、eNOS 蛋白および mRNA 発現は並行して低下した。Edaravone の前投与により障害された内皮依存性弛緩反応は回復し、この変化には eNOS 蛋白と mRNA 発現の改善を伴っていた。以上の結果から放射線照射により形成されたフリーラジカルが、eNOS 発現を転写段階で抑制すること

により、eNOSを介したNO産生低下を引き起こして血管内皮依存性弛緩反応を障害している可能性が示唆される。さらに edaravone が放射線照射により形成されたフリーラジカルをスカベンジして eNOS 蛋白発現の転写レベルでの抑制を解除することにより、NO産生が回復して傷害された血管内皮依存性弛緩反応を改善する可能性が本研究により示唆された。

公開發表にあたり吉岡教授より、1) 放射線が eNOS 発現を抑制する機序、2) 放射線障害と iNOS の関係について、丸藤教授より、1) 放射線障害と活性酸素種の関係、2) edaravone の臨床応用について、森本教授より、1) edaravone 投与方法と放射線障害の関係について、2) 放射線障害と apoptosis の関係についてなど多くの質問がなされた。申請者はこれらの質問に対して、自らの実験結果およびこれまでの学習した知識を駆使しておおむね適切に回答した。この論文は放射線による血管内皮細胞機能障害の機序を明らかにし、その改善方法を確認したことで高く評価され、今後のフリーラジカルスカベンジャーの臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。