



## 論 文 内 容 要 旨

放射線治療は胸部悪性腫瘍に対し効果的な治療法であるが、放射線肺臓炎の合併がしばしば問題となる。

ヘムオキシゲナーゼ-1（以下 HO-1）は酸化ストレスなどで誘導されるヘムの分解酵素である。HO による酸化的代謝により、ヘムは鉄、ビリベルジン、一酸化炭素に分解され、ビリベルジンはビリベルジンリダクターゼによりビリルビンとなる。近年、鉄が生成する有害なヒドロキシラジカルをフェリチンに貯蔵するメカニズムや、ビリルビンの強力な抗酸化作用が明らかになり、HO は antioxidant enzyme としての機能が注目されている。

HO には HO-1 と HO-2 の 2 つのアイソザイムがある。HO-1 は誘導酵素であり UV 照射や基質であるヘムなどにより誘導されてくる。一方、HO-2 は構成酵素として各臓器で発現しているが、脳や精巣で活性が高い。

今回の研究では、活性酸素が発症に関与している放射線肺臓炎に対し、HO-1 の予防効果についてラット実験モデルを用いて検討した。

実験動物は Wistar 系ラット 6 週齢を用い、充分量の水と飼料を与え、準無菌下で飼育した。照射モデルは X 線 40Gy を胸郭に 1 回照射して作成し、他臓器は鉛板で遮蔽した。

照射後 2 週、4 週、8 週でラット肺よりマイクロソーム画分を抽出し、HO 活性を測定した (n=3)。HO 活性は照射 2 週目より増加し、8 週まで漸増した。ウェスタンブロット法でも同様に照射後 2 週目より HO-1 誘導が見られ、8 週まで漸増維持された。さらに、HO-1 の免疫染色を照射後 8 週目のラット肺を用いて施行した。コントロール肺と比較したところ、照射肺では濃染した気道上皮と肺胞マクロファージが観察された。

そこで、1 週間に 2 回、ヘミン (10  $\mu$ mol/kg) を腹腔内投与し、ラット肺に HO-1 を強制誘導したモデルを作成した。

ラットを、無処置コントロール (C 群)、放射線照射のみ (R 群)、照射後にヘミン (10  $\mu$ mol/kg) 投与 (HO 群)、HO の阻害剤であるスズプロトポルフィリン (SnPP9) を HO 群に投与 (Sn 群) の 4 群に分けた。照射後 4 週で気管支肺胞洗浄液 (BAL) (各群 n=5)、8 週で病理組織検査を施行した。各群間の比較について、統計学的検討は ANOVA 法により multiple comparison test を行った。結果は mean  $\pm$  SD で表記し、p value 0.05 未満を有意差ありと判定した。

BAL 液中の総細胞数では各群間に有意差は認められなかった。しかし、細胞分画では、好中球について C 群 0 に対し、R 群  $0.098 \pm 0.062 \times 10^6$  と有意な増加が見られた (p < 0.001)。一方、

HO 群では  $0.010 \pm 0.10^6$  と R 群に対して有意な抑制効果を示した ( $p=0.001$ )。リンパ球数については、R 群  $0.158 \pm 0.072 \times 10^6$  と C 群  $0.046 \pm 0.059 \times 10^6$  に比して有意に増加 ( $p < 0.01$ ) していたが、HO 群では  $0.052 \pm 0.015 \times 10^6$  と R 群に対して有意な減少を示した ( $P < 0.01$ )。HO 活性を阻害した Sn 群では  $0.190 \pm 0.035 \times 10^6$  と HO 群に比して有意な増加を示した ( $p < 0.01$ )。

一方、病理組織検査で、R 群は C 群と比較して顕著な肺胞隔壁の肥厚や細胞浸潤を示しており、EM 染色でも肺胞隔壁に線維化の増強が見られた。一方、HO 群では照射後の病理変化は R 群に比して軽減していたが、Sn 群では R 群と同様の所見であった。

放射線肺臓炎の発症過程には、血管内皮細胞や II 型肺胞細胞に対する直接障害よりも、活性化肺胞マクロファージとリンパ球が深く関与している。肺胞マクロファージは、放射線照射後の組織障害を契機に一酸化窒素（以下 NO）やスーパーオキシドなどの活性酸素を放出すると共に、モノカインを出して肺内に好中球を動員する。この好中球からも活性酸素が発生し、肺実質を障害する。HO-1 は NO による転写レベルでの誘導を受け、ラジカルの消去に働くと考えられているが、照射後の肺胞マクロファージでの HO-1 誘導は、NO をはじめとする活性酸素を消去し、さらにマクロファージの活性化を抑制することが予想される。その結果、HO 群での BAL 所見では好中球減少を示したと推察される。

一方、リンパ球については、放射線肺臓炎症例の BAL で有意な増加を示していたという報告があり、その成因としては、照射後に生じる遅延型の過敏性肺臓炎と考えられている。今回の実験では、照射後の BAL 中リンパ球数が HO 誘導群で減少し、HO の阻害剤である SnPP9 で増加したことは、HO-1 がリンパ球浸潤を介した放射線肺臓炎の発症を抑制する可能性が考えられる。さらに、照射後の組織障害により生み出される多彩な分解産物が、一過性にリンパ球を感作し、放射線肺臓炎が発症したとすれば、HO-1 のフリーラジカル消去作用や抗炎症作用により組織破壊が軽減されることで、リンパ球浸潤や肺組織との反応が低下し、放射線肺臓炎が抑制されたと考えられる。

以上より、HO-1 が放射線肺臓炎の発症を抑制する可能性が考えられた。

## 審査結果の要旨

本研究は、酸化ストレス防御因子の一つであるヘムオキシゲナーゼ-1（以下 HO-1）の放射線肺臓炎に対する抑制効果について、ラット実験モデルを用いて検討した。X線 40Gy の全胸郭 1 回照射により、2 週間で HO-1 の誘導がみられ、8 週まで漸増維持されることを示し、HO 活性も同様の結果であった。さらに、ラット腹腔内へのヘミン繰り返し投与により、HO-1 を肺に強制誘導させたモデルと、HO の阻害剤であるスズプロトポルフィリンを投与したモデルを作成し、無処置コントロールと照射単独モデルとの比較を BAL 中細胞分画と病理組織所見で行った。

本論文は、スーパーオキシサイドディスムターゼなど、これまで多くの研究がなされてきた antioxidant enzyme 以外にも、抗酸化作用が期待される HO-1 に着目した点は、特に評価すべきであると思われる。

また、HO-1 の誘導酵素としてのユニークな特性に注目し、放射線照射後の肺で誘導されることを示した点、さらに HO の強制誘導により、照射後に生じる病理や細胞分画などの変化を抑制できたという結果については、臨床的にも期待できる研究であるという意味で、評価に値する。

これまで、HO-1 を一過性に発現させる動物モデルは報告されていたが、今回の研究では、ヘミンの繰り返し投与により、肺に HO-1 を長期的かつ安定して発現させる動物モデルを作成しており、それが初めての試みであるということは、非常に意義のあることである。

しかし、あえて苦言を呈するならば、HO を長期誘導させることの安全性については、今後検討すべき課題であると思われる。

また、HO の有用性をヒトに対してどのように応用していくか、治療薬としての使用が可能なのかなど、今後の研究の進展にも期待が持たれるテーマである。

予備審査で指摘された点においても、十分な訂正がなされており、学位論文に値する内容であると思われる。