

Low dose radiation prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity

低線量の放射線はドキソルビシン誘発心毒性を抑制する

Xin Jiang¹, Yaqiong Hong^{1,*}, Di Zhao¹, Xinxin Meng¹, Lijing Zhao², Yanwei Du³, Zan Wang⁴, Yan Zheng⁵, Lu Cai⁶ and Hongyu Jiang¹

¹Department of Health Examination Center, The First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China.

²The School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China.

³Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130021, China.

⁴Department of Internal Neurology, The First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China.

⁵Department of Gerontology, The First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China.

⁶Pediatric Research Institute, The Departments of Pediatrics, Radiation Oncology, Pharmacology and Toxicology, The University of Louisville, Louisville, KY 40202

Oncotarget, 2018; Vol. 9 (1):332-345.

翻訳者 東京理科大学名誉教授 小島周二

要旨

この研究は、ドキソルビシン（DOX）誘発毒性を抑制するための新規で且つ非侵襲的なアプローチを開発することを目的としていた、低線量の放射線（LDR、75mGyのX線）を用いた。

BALB/cマウスを無作為に、①正常対照群、②LDR（X線の1回照射）群、③非照射（照射を除いてLDR群と同様に処置）群、④DOX（7.5mg/kg DOX単回腹腔内投与）、及び⑤LDR/DOX（LDR照射72時間後に7.5mg/kg DOXを単回腹腔内投与）群の5群に分けた。

心電図（Electrocardiogram, ECG）の解析により、DOX単独処理マウスでは種々の異常プロファイルがみられたが、LDR/DOX群ではこれらの異常は減少した。病理組織学的変化、酸化ストレスマーカー、及びミトコンドリア膜透過性から心毒性を推定した。DOX群にLDRを前照射する事により、DOX群でみられた心組織の酸化的障害（ROS形成、タンパク質ニトロ化、脂質過酸化）が減少し、且つ抗酸化酵素（SOD及びGPx）が増加した。また、LDRの前照射によりDOX群でみられた心細胞のアポトーシス細胞（TUNEL染色及び切断カスパー-3）は減少し、さらにミトコンドリア・アポトーシス経路の変化（p53、Bax及びカスパー-9発現の増加及びBcl2発現の減少、 ΔPm 散逸）は抑制された。

これらの結果は、LDRがDOXに誘導される心毒性を防護できるであろうと言うことを示唆する。LDRによる心組織の保護は、ミトコンドリア依存性酸化ストレスを介したDOX誘発細胞死及びアポトーシスシグナル伝達の抑制に起因しているのかも知れない。

序論

ドキソルビシン（DOX）は、固形腫瘍（乳がん、がん腫）及び血液悪性腫瘍（白血病、リンパ腫）何れをも治療するために一般的に使用される有効な抗がん剤である [1]。DOX

の 50 年以上にわたる使用により、がん生存率が劇的に改善された。しかしながら、投与量依存的な心毒性はその臨床での使用をそことないものである [2-4]。がん生存者数が増加するにつれて、DOX 誘発心筋症の機序やその発生・進行を抑制する有効な手段を明らかにする必要性が高まりつつある。これまでに明らかとなっている DOX 誘発性心筋症のメカニズムとしては、酸化ストレス、炎症、カルシウム及び筋収縮の調節不全、ミトコンドリア変性、及びアポトーシス心筋細胞死がある [2-5]。しかしながら、酸化的ストレスは、DOX 誘発性心筋細胞の生化学的および病理学的变化を引き起こし、進行させる主因であり、最終的に構造的リモデリングと機能障害に繋がる [2, 6]。フリーラジカルが DOX 誘発心毒性に関与するという概念に基づいて、多くの抗酸物が動物モデルやがん患者で検討されてきた [7-9]。カタラーゼやメタロチオネインなどの特定の抗酸化物質の心臓過剰発現の動物モデルを用いた研究では、DOX 誘発心毒性が抑制されたと言う結果が報告されている [7,8]。今日まで、強力な細胞内鉄キレーターであるデクラゾキサンにも DOX 治療を受けたがん患者に予防薬として承認されているものの、DOX の抗腫瘍活性を損なうことなくデクラゾキサンの顕著な血液毒性を改善する為の研究が求められている [10]。現在の主な検査事項は次の 2 つである：(a) 抗酸化物の投与した場合に、用量依存性がみられなかった [10-13]。従って、内因性の抗酸化物質を誘発する方法は良い方法かもしれない。(b) 任意の薬物の全身投与は、DOX 心臓毒性に対して保護するが、一方 DOX の抗がん作用を低下させることもある [10-13]。従って、心臓の抗酸化能を特異的に刺激することができる任意の非侵襲的アプローチは、がん治療効果を低下させる事無く、DOX 心臓毒性を抑制するより良い戦略であり得る。LDR が高線量の放射線や抗がん剤による正常組織障害を抑制することから、私達は LDR を DOX の心毒性から保護するために用いることを提案した [14-16]。私たちの環境に広く存在する LDR とは 100 mSv 以下 (100 mGy 以下) の放射線量として定義されている。低線量率 (単位時間当たりの放射線量) の放射線は、1 時間当たり 6mSv 以下 (<6mSv/h) での放射線被ばくの割合として定義される。線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer, LET) 1Gy (暴露線量) は 1Sv (吸収線量) と同等である (文献[17]参照)。培養細胞実験や生体に対して障害作用を引き起こす高線量放射線とは異なり、LDR は適応応答やホルミシス応答を誘発し、細胞実験及び生体では高線量/濃度の放射線又は化学物質により惹起される損傷に対して耐性を誘発する [14-16]。私達の以前の研究では、“培養細胞を用いた LDR の影響実験では正常細胞の増殖を刺激したが、白血病又は固形腫瘍細胞の増殖を刺激しない、又担がん動物を用いた実験でも同様の結果を示した [16]。さらに LDR は、抗がん免疫を刺激することによってがんリスクを減少させる [18-20]。LDR の防御効果は、アップレギュレーションされた生体の抗酸化能 [21] と DNA 修復酵素活性に起因する [22, 23]。私達は、既に糖尿病ラットやマウスにおける精巣、腎臓、及び心臓の損傷など、様々な糖尿病合併症に対する LDR の保護効果を既に確認している [24-26]。従って、上記で示したデクラゾキサン等の他の抑制剤 [9-13] と比較して、

LDR の特徴は、以下の通りである：(a) 非侵襲的アプローチ；(b) 他の臓器に影響を与えることなく心臓領域に適用可能である。(c) 複数の防御機能を刺激する能力。(d) 検出可能な明白な副作用はない。

実際に、化学療法では LDR 前照射により、抗がん剤、シクロホスファミド誘導体の肝臓への有害作用を緩和することができた [14]。しかしながら、LDR が生体での DOX 心毒性に対して保護効果を有するか否かを検討した研究はない。従って本研究では、マウスにおける DOX 誘発心毒性を防止するための新規で非侵襲的なアプローチである LDR (75mGy X 線) を用いることを検討した。パーキンソン病のラットモデルにおいて、LDR が酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全及びアポトーシスを減弱させることができるという結果に基づき、LDR の DOX 誘発心毒性抑制機序を解明する目的で心ミトコンドリア及び関連酸化ストレス並びに細胞死を検討した。

結果

LDR の DOX 誘発心毒性に対する効果

LDR が DOX 誘発心毒性を減弱させることができるか否かを調べる為、マウスの全体の外観、生存率及び心電図 (ECG) の変化を検討した。DOX 群マウスは病気がちで弱く、その毛皮は光沢も失われていた。これらの変化は、LDR/DOX 群では殆ど観察されなかった。正常対照群、偽照射群、及び LDR 単独照射群間でのこれらの出現に差はなかった。DOX 群では処置後 6 日目及び 7 日目で、其々 80% 及び 60% の生存率を示したが、他の 3 群での生存率は 100% であった。また、DOX 投与マウスへの LDR の前照射 (LDR/DOX 群) は、DOX 処置後の 6 日目及び 7 日目で、それぞれ 90% 及び 80% の生存率を示した (図 1A)。

ECG は、正常対照群及び LDR 群では正常なプロファイルを示した。しかし、DOX 単独群では LDX/DOX 群と比較して、いくつかの種類の異常プロファイルを示すものが頻繁に見られた。異常な ECG プロファイルとしては、不整脈、平坦 T 波、あるいは ST セグメント鬱病がみられた。各群の典型的な ECG 変化を図 1B に示した。

心筋損傷の主な血清生化学マーカーとして血清酵素乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の増加がしばしば用いられていることから [29]、私達はさらに、LDH の血清レベルを検出すことにより、DOX 誘発性心毒性に対する LDR 前処置の保護効果を検討した。図 1C に示す様に、正常対照群、

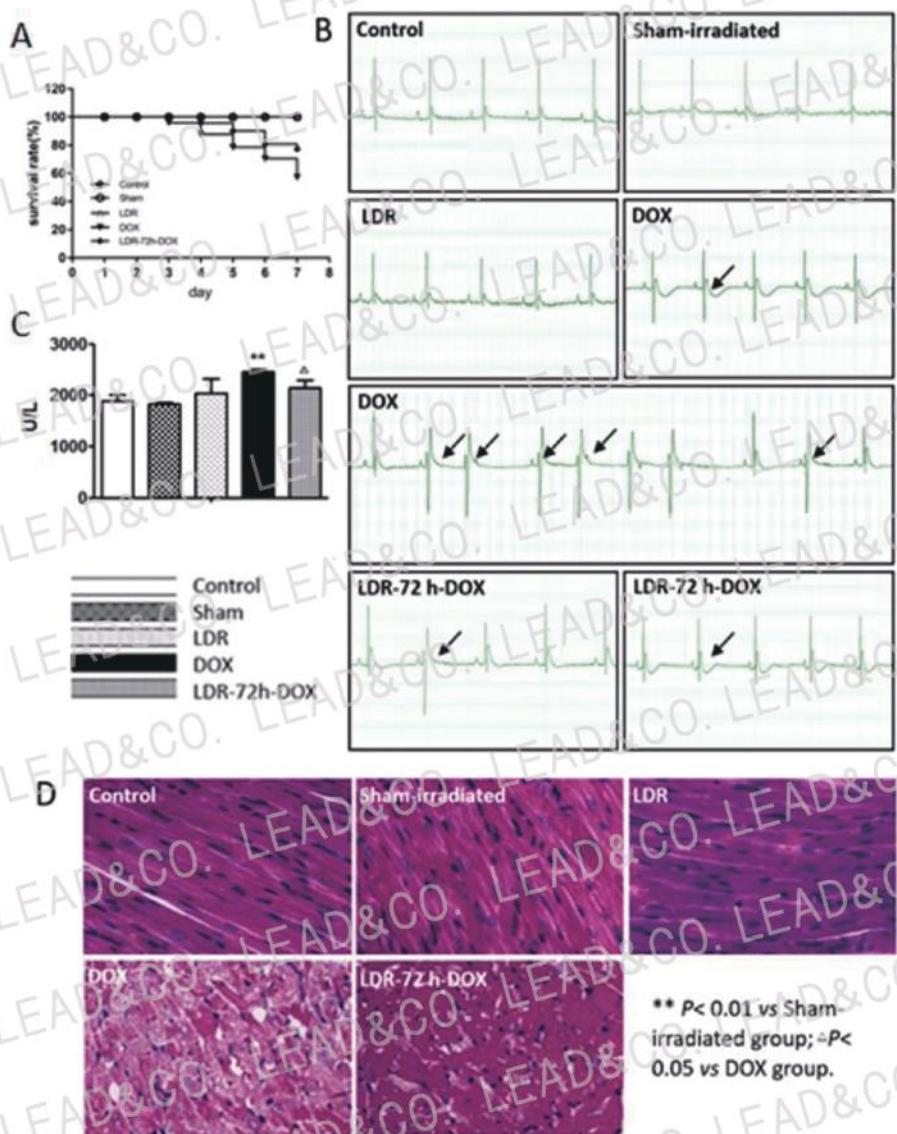


図 1 LDR のマウス生存と DOX 誘発心毒性に対する作用

(A) DOX 投与後 5 日目の生存率。 (B) 心電図。 (C) LDH 活性。 (D) 心筋の組織病態変化

偽照射群、DOX 群及 DOX/LDR 群の間の LDH レベルを評価した。その結果、DOX 群では LDH 値が有意な上昇を示したが、LDR 前照射によりこの上昇は弱められた。

さらに、心筋組織の形態変化を H&E 染色（図 1D）で検討した。正常対照群及び偽照射群心筋組織は正常な形態学的外観を示したが、DOX 群では筋原纖維障害や細胞質の空胞化が観察された。しかしながら、LDR の DOX 群の前照射により筋原纖維障害及び細胞質の空胞化は減少した。

なお、正常対照群と LDR 群間での組織画像には顕著な変化は認められなかった（図 1D）。これらの結果は、DOX は顕著な心臓毒性を引き起こすが、LDR が DOX 誘導心毒性の抑制に効果的に

作用することを示唆する。

DOX 誘発性心筋細胞死に対する LDR の効果

これ迄に蓄積された結果により、DOX が動物の心筋細胞にアポトーシスを引き起こし得ることが示されている [5,11,12]。LDR による DOX 心毒性の抑制がアポトーシスの減少と関連するか否かを検討する目的で、私達は筋組織の TUNEL 染色を行った (図 2A)。アポトーシス指数 (AI) による定量解析により、LDR 群ではアポトーシス細胞は全くないか、又は殆ど観察されなかった。一方、DOX 群では顕著なアポトーシス細胞が観察されたが、LDR/DOX 群では有意な減少がみられた ($P < 0.01$)。

次に、アポトーシス・マーカーの一つである断片化カスパーゼの発現レベルを免疫組織染色により検討した。その結果、偽照射群及び LDR 群では、何れも極めて低い断片化カスパーゼ-3 発現がみられたが、DOX 群ではこの発現は顕著であった。しかしながら、LDR の前照射によってこの断片化は顕著に抑制され、本照射の抑制効果が示唆された (図 2B)。TUNEL 陽性細胞や断片化カスパーゼ-3 分析により、DOX によるアポトーシス細胞死が誘導されるが、この誘導性が LDR の前照射によって有意に抑制されたことが明らかになった。さらに、断片化カスパーゼの免疫組織化学的染色結果はウエスタンプロット解析によっても確認された (図 3)。

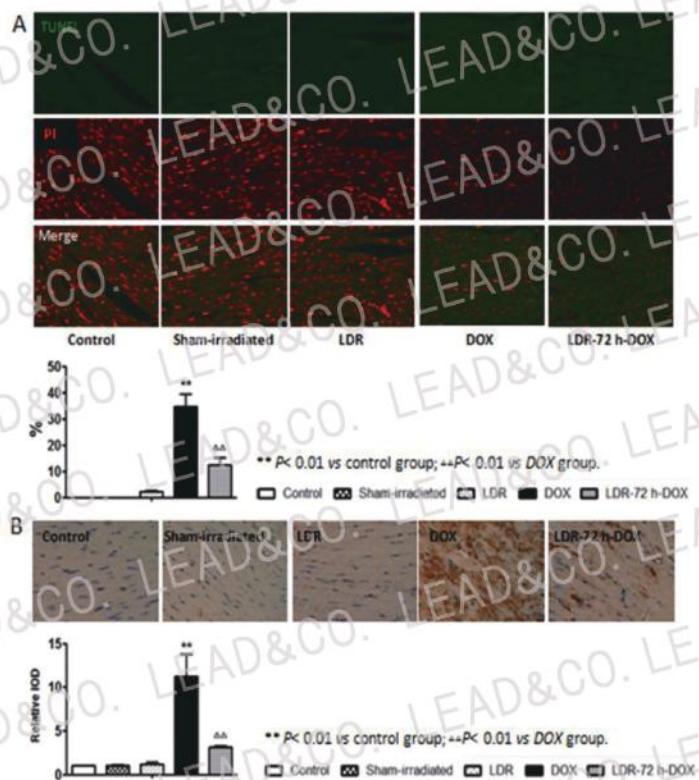


図 2 LDR の DOX 誘発心細胞アポトーシスに対する作用

(A) TUNEL 染色による DOX 誘発アポトーシスの解析。

(B) 断片化カスパーゼ-3 の発現: 褐色 (+); 青色 (-)

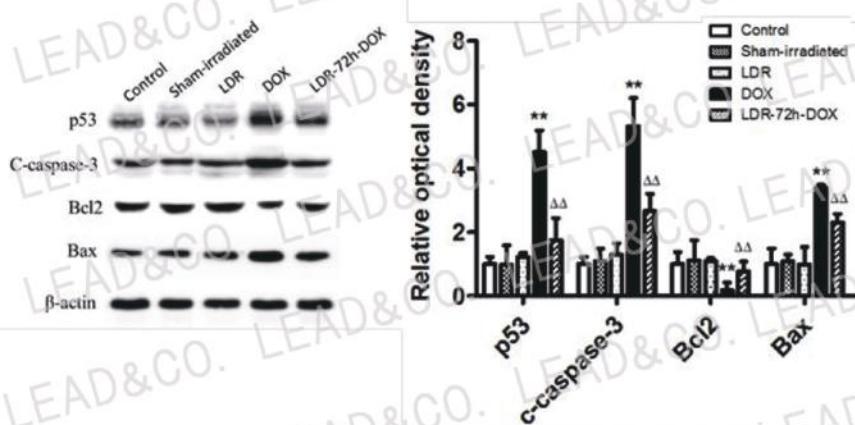


図3 Western blots よる DOX 誘発心細胞 P53 発現アポトーシスとミトコンドリア情報伝達系に対する LDR の作用

各数値は平均値土標準誤差で表示。** $P<0.01$ VS 偽照射群； △△ $P<0.01$ VS DOX 群

DOX 誘発性ミトコンドリア依存アポトーシス経路への LDR の作用

カスパーーゼの活性化等のアポトーシス・マーカー、及び Bax 及び p53 のミトコンドリアへの移行ならびにサイトゾルにおける Bax クラスターの形成が DOX 处理 24 時間後に検出されたことが報告されている [30]。そこで私達は、DOX 誘導アポトーシスの LDR による抑制がミトコンドリア依存性アポトーシス経路の抑制に起因するかどうかの確認を試みた。最初に、DOX 处理マウスにおける p53 の増加が断片化カスパーーゼ-3 の発現と並行して生ずるかを検討、確認した（図 3）。

次にミトコンドリアの Bcl2 ファミリーの抗プロアポトーシスマンバーである Bcl-2 及び Bax タンパク質発現をウェスタンブロッティングアッセイで検討した。その結果、正常対照群、偽照射群、及び LDR 照射群では、何れもこれらの発現に大きな変化がみられなかった（図 3）。一方、DOX 群では Bcl2 発現の顕著な低下と Bax 発現の増加がみられたが、LDR/DOX 群ではこれらの変化はみられなかった。これらウエスタンブロッティングの結果は、Bcl-2 及び Bax 発現の免疫組織化学染色によって、さらに半定量的解析によつても確認された（図 4）。

上記アッセイは、DOX による心筋細胞死誘導でのミトコンドリア・アポトーシス経路の関与を示唆することから、次にフローサイトメトリーを用いたミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 測定を行つた。（図 5 上部パネル）。その結果、正常対照群と偽照射群の心組織 $\Delta\Psi_m$ には差異は見られなかつたが、DOX 群での $\Delta\Psi_m$ は偽照射群の値よりも有意に低かつた。DOX 群でみられた $\Delta\Psi_m$ レベルの低下は DOX 处理の LDR 前照射（LDR/DOX）群では有意な回復がみられた（図 5 上部パネル）。

ミトコンドリア・アポトーシス経路の重要なメディエーターであるカスパーーゼ-9 についても、免疫組織化学、次いで半定量解析で検討した（図 5 の下のパネル）。正常対照群、偽照射群、及び LDR 群では陽性細胞はさほど多くはなかつたが、DOX 群ではカスパーーゼ-9 発現は顕著に増加した。しかしながら、LDR / DOX 群ではこの増加はみられなかつた。

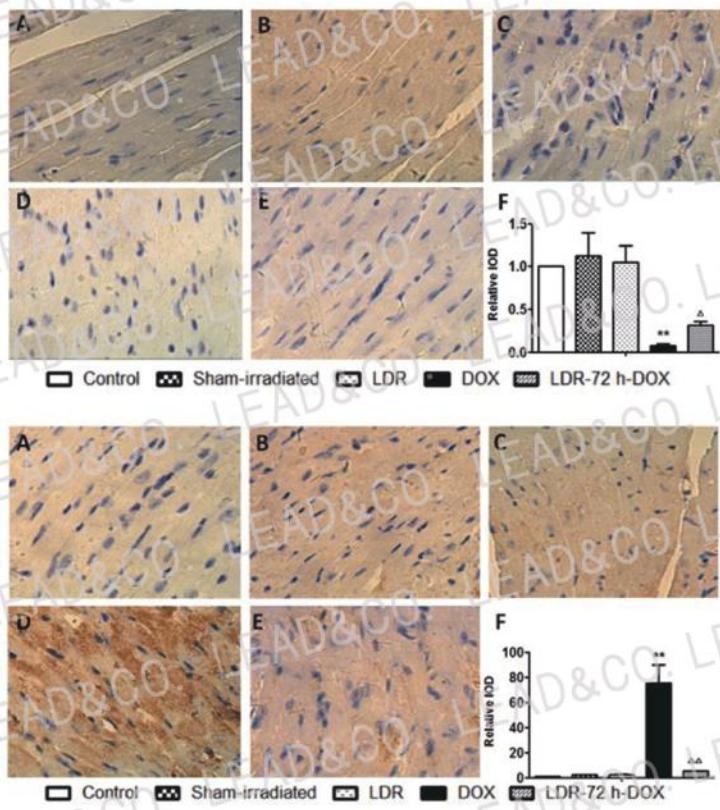


図4 LDR の DOX 誘発ミトコンドリア依存性アポトーシス経路に対する作用
各数値は平均値土標準誤差で表示した。

DOX 誘導酸化ストレスに対する LDR の作用

これまでの報告によれば、心筋細胞でのミトコンドリア依存性アポトーシス経路は主に DOX 誘導酸化ストレスに起因する [6-9,31]。そこで、私達は、主に H_2O_2 を始めとする活性酸素種(ROS)を測定する為に、細胞透過性 DCFH-DA プローブを用いたフローサイトメトリーを実施した。図 6A & 6B に示す様に、DOX 群では偽照射群 ($P < 0.01$) と比較して ROS レベルが有意に増加したが、LDR 前照射 (LDR/DOX 群) によってこの増加は抑制された。なお、LDR/DOX 群の ROS レベルは偽照射群よりもやや高い数値であった ($P < 0.05$)。脂質の酸化的損傷指数の 1 つであるマロンジアルデヒド (MDA) を定量することで脂質過酸化レベルの変化を検討した (図 6C)。正常対照群と偽照射群では MDA レベルの変化はみられなかったが、DOX 群では有意な増加がみられた ($P < 0.01$)。また、LDR/DOX の MDA レベルは DOX 群よりも低値を示した。

さらに、抗酸化酵素である SOD 及び GSH-PX (図 6D、6E) の活性を測定した。何れの酵素活性も正常対照 ($P < 0.01$) と比較して DOX 群では有意な低下がみられた。しかしながら、LDR 前処理によってこれらの低下が抑制される傾向がみられた。これらの結果は、DOX 誘導心組織酸

化ストレスと障害の抑制に抗酸化酵素活性の上方制御と ROS 産生の低下に関連する可能性を示唆する。

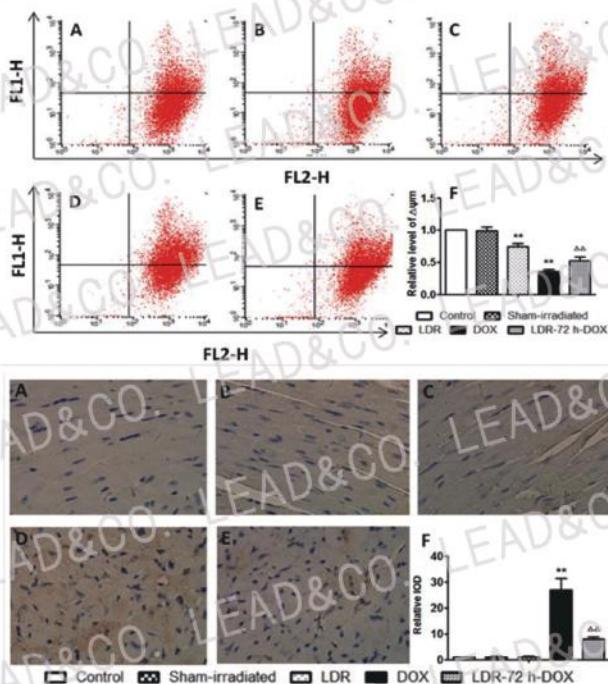


図5 LDR の DOX 誘発ミトコンドリア依存性アポトーシス経路に対する作用
各数値は平均値土標準誤差で表示。(A) 心筋細胞の典型的フローサイト
リーパターン；(B) 免疫組織染色による断片化カスパーーゼ-9 の発現。

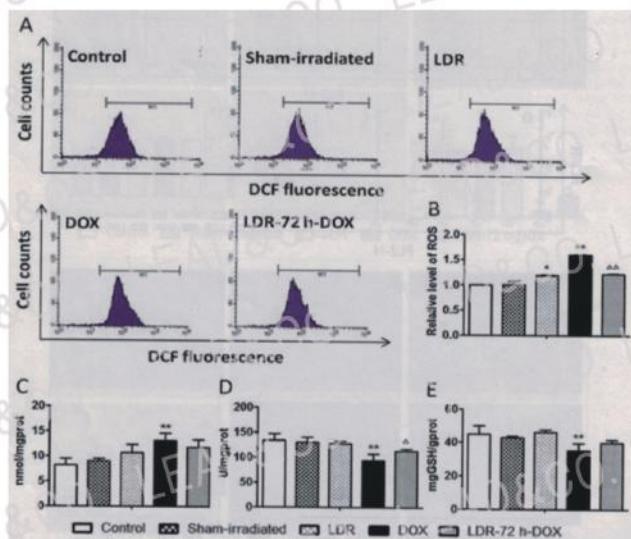


図6 LDR の DOX 誘発ミトコンドリア依存性アポトーシス経路に対する作用
(A) DCFH-DA を用いた ROS の検出フローサイトリーパターン；(B) (A)のグラフ化
(B) 過酸化脂質マーカーMDA 濃度；(D) SOD 活性；(E) GSH-PX 活性
各数値は平均値土標準誤差で表示。**P<0.01 VS 偽照射群；△△P<0.01 VS DOX 群

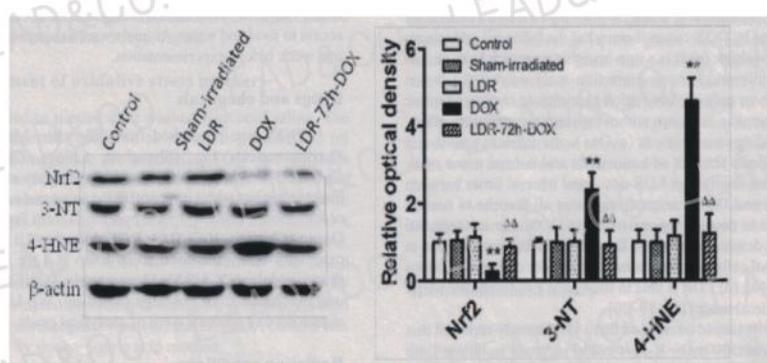


図 7 DOX 誘発酸化ストレス関連蛋白質に対する LDR の作用

各数値は平均値土標準誤差で表示。 ** $P<0.01$ VS 偽照射群；
▲▲ $P<0.01$ VS DOX 群



図 8 LDR の DOX 誘発心毒性から防護する仮想メカニズム

さらにウエスタンブロッティングアッセイを用いて、細胞レドックスホメオスタシスに関与する転写因子である Nuclear factor, erythroid 2 like 2 (Nrf2) の発現を 3-ニトロチロシン (3-NT) 及び 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) 形成等の他の酸化・ニトロ化の変化と共に検討した(図 7)。 LDR 照射群及偽照射群では、Nrf2、4-HNE 及び 3-NT レベルには変化はみられなかったが、DOX 群での 3-NT 及び 4-HNE 発現の顕著な増加と Nrf2 タンパク質発現の著しい低下がみられた。一方、LDR 前照射 (LDR/DOX) 群ではこれらの変化のほぼ完全な抑制がみられた。

考察

DOX は、多くのヒト新生物を治療するために使用される強力な抗生物質であるが、本剤の有する副作用心毒性が臨床応用を妨げている [2-4]。従って、この心毒性を抑制又は改善する為の安全で且有効な手法の探索は心臓および腫瘍学、両分野での重大課題である。LDR によって誘導される適応応答又はホルミシス作用は生体保護効果を示す。本研究は、DOX 誘発心毒性に対する LDR の保護効果を確認するものである。図 8 にその概要を示す様に、DOX によるミトコンドリア依存性 ROS/RNS 生成に由来する酸化ストレスを低下させる LDR 誘導心組織内抗酸化能の増強と関連すると思われる。

本研究では、まず初めにマウスでの DOX 誘発心毒性に対する LDR の改善効果を確認した。これまでの研究では、血清 LDH の活性が著しく上昇し、細胞質空胞化や筋原纖維障害などの損傷が顕著に現れる動物モデル及びヒト生検での DOX 誘発性心筋損傷が示されている [32,33]。これらの以前の研究と一致して、異常な心電図プロファイル、血清 LDH 活性の増加、及び心組織の病理学的変化によって反映された DOX 誘発心毒性もまたマウスで見出された。しかしながら、75mGy での LDR への事前照射による心機能、血清 LDH 酵素、及び構造変化等の DOX 誘発性変化の抑制を本研究で実証出来た。

酸化ストレスは、DOX 誘発心筋機能不全の主因と考えられている [6-9,31,45-48]。この考えは、心臓組織での抗酸化酵素（物質）であるカタラーゼやメタロチオネインの過剰発現マウスは DOX 誘発心毒性に対して抵抗性を示すという実験結果により支持される [7,8]。ブドウの種子から抽出されたプロシアニジンによる内因性抗酸化物質を誘導する事で DOX 誘発心毒性が防護されたとの報告がある [34]。そこで本研究では、DOX 誘発心毒性に対する LDR の防護作用が、酸化ストレスと障害の抑制に関連するか否かを検討した。DOX は心組織の酸化ストレス及び障害を増加させるが、LDR の前照射によりこれらの増加が減弱されることを本研究で示した。

これまでの報告によると、DOX 誘発心毒性の最も直接的な原因である心筋細胞の DOX 誘導アポトーシスはミトコンドリア依存性であると推定される [30,31,35]。心筋細胞におけるミトコンドリア依存性アポトーシス経路が DOX 誘導酸化ストレスによって媒介されることを本研究で示した [6-9,31]。ミトコンドリア膜、酵素、及びミトコンドリア透過性移行孔開口を促進する電子輸送鎖への酸化的損傷は $\Delta \Psi_m$ を変化させ、シトクロム c を細胞質に放出、カスパーーゼ-3 等のエフェクターカスパーーゼを活性化させるカスパーーゼ-9 が活性化され、細胞死が誘導される [36,37]。ミトコンドリア介在アポトーシスは、プロアポトーシス（例えば、Bax や Bid）及び抗アポトーシス（例えば、Bcl-2 や Bcl-xL）メンバーによっても調節される [30,38]。Bcl-xL 又は Bcl-2 発現増加により、DOX 誘導心毒性を防御することができる [30,38]。DOX が Bcl-2 ファミリータンパク質に顕著な影響を及ぼすことを本研究でも示した：即ち、これまでの研究と一致し、Bcl-2 を下方制御し、逆に Bax 発現を上方制御した。

さらに、LDR 前照射が DOX 誘導ミトコンドリア透過性の低下とカスパーーゼ-9 断片化の増加に対し抑制作用を示すことを本研究で明らかにした。また、LDR の DOX 処置マウスへの前照射により DOX 誘導 Bax/Bcl-2 比の増加が弱められた。最近の研究では、0.5Gy の γ 線照射をナマコ又はバルサルタンと組み合わせることにより、酸化ストレスとアポトーシスを抑制することによって DOX 誘発心毒性を緩和することができるとの報告がある [39]。しかしながら、0.5Gy は ICRP 等が定義する LDR 線量ではない（約 100mGy、レビュー[17] の参照）。さらに、ラットに DOX (2.5 mg/kg、腹腔内投与) をナマコ (14.4 mg/kg、連続 2 週間経口投与) 又はバルサルタン (30mg/kg、連続 8 週間経口投与) と共に腹腔内投与した為に、DOX 群と LDR/DOX 群での比較出来ない。LDR は、DOX の初回投与の前に 1 回のみ照射された。従って、本研究は、DOX 誘発心毒性が X 線等の低 LET 線 75mGy の前照射で防護されることを示した初めての研究である。

LDR がミトコンドリアに障害を与えないと言うメカニズムに関する直接的な証拠は本研究では得られなかった。しかしながら、LDR の抑制効果のメカニズムを図 8 のイラストに示す様に推定している。1) LDR が多くの抗酸化物質をアップレギュレートするに足りる ROS 産生を介して Akt と Nrf2 機能を刺激する [21,24,40] ; 2) LDR 誘導 Nrf 転写活性化を介したミトコンドリア SOD の発現増加が心筋細胞の DOX 抵抗性に寄与する[41,42] ; 3) LDR により正常組織での細胞生存にスイッチを入れる(がん組織ではスイッチが入らない)MAP キナーゼが刺激される [40,43]。

細胞及び組織では、細胞分裂促進及び増殖機能に少量の ROS が必要である。一方、中程度の ROS は複製老化等の一時的又は永続的な細胞増殖停止を引き起こし、過剰量の ROS は重度の酸化ストレスを惹起し、最終的には細胞死をもたらす [44,45]。本研究で、正常対照群と比較して LDR 単独照射群では ROS 量がわずかに増加し、DOX 群では顕著な ROS 増加がみられた(図 6B)。Keap1 はシスティンを多く含み、Nrf2 ユビキチン介在分解をつつ阻害させることが知られている。スルフォラファン (SFN) 等のいくつかの化合物は、Keap1 を酸化して Nrf2 を放出、それによって Nrf2 機能を安定化させる少量の ROS を産生することができる [46,47]。従って、LDR で產生される少量の ROS が Keap1 を酸化し、それによって多くの抗酸化物質のアップレギュレーションをもたらす Nrf2 が放出されると共に安定化するもの思われる [21,40]。しかしながら、SFN と LDR、何れも少量の ROS を產生し Nrf2 機能を刺激することができるが、LDR 照射は非侵襲性であるが SFN は外部より投与しなければないことから、LDR 照射は最良の手段であろう。これらの全ての可能性を図 8 に要約した。

要約すると、DOX のがん治療で発生する心毒性を防ぐために LDR を使用する利点は以下の通りである：(a) 種々の内因性保護機構を刺激する非侵襲的手法である；(b) がん組織を含む全組織を刺激すること無く、心組織のみを刺激、即ちホルミシス応答する；(c) がん組織と正常組織では異なる増殖と代謝を示すことから、DOX がん治療と LDR 照射での線量と照射間隔をデザインすることが出来、正常細胞の DOX 抵抗性をあげることが可能になる。例えば、LDR がある特定条件の下では腫瘍細胞ではなく正常細胞に適応応答できることを既に報告している [16,40]；(d) LDR は動物モデルで抗腫瘍免疫を刺激することができる [15,18-20]。

最近の研究では、300mGy の X 線の LDR 照射は、血管新生促進遺伝子の発現を誘導することによる虚血肢四肢灌流回復及び毛細血管や側副枝の密度を増加させることができることがマウス実験で報告されている [48]；この実験では 300mGy の線量を使用していた為、200mGy 又は本研究で使用した線量 (75 mGy の X 線) でさえ同様の効果があるかどうかは不明であるが、実際に検討する価値はある。さらに最近、X 線 39~47 mGy でのコンピュータ断層撮影 (CT) スキャンによる LDR 照射がアルツハイマー患者に実施された報告がある [49,50]。この詳細は、6 ヶ月未満の平均余命でホスピスに入院している 81 歳アルツハイマー病患者が、患者の希望により CT スキャンで 1 年に 1 回治療され、約 4 カ月後には回復してホスピスから退院するようになった [49, 50]。しかし、最初の治療から 2 年以上経過した後、その後に報告 [51] に記載されているように、患者はゆっくりと悪化したとされている。これは、CT スキャンによる患者への有益な効果を示す最初

の治療例ですが、この大きな可能性についてはさらに臨床トライアルを実施する必要がある。したがって、LDR は DOX 誘発心毒性を防護し、腫瘍に影響を与えずに、心筋組織の多機能を刺激することを介して、がん治療の有効性を増強するための新規アプローチであり得るであろう [15,19,21,27,51]。

実験材料と方法

動物

BALB/c マウス（雌性、体重 $18 \pm 2\text{g}$ 、4~6 週齢）は、吉林大学基礎医学研究センター・動物実験センターより供与された。実験プロトコールは実験動物の管理と使用のための施設委員会規則に準拠した同センター倫理審査委員会によって承認された。DOX が主に女性での乳がんの化学療法に使用されていることから雌性マウスを選択した [1]。マウスは維持し、12 時間照明/12 時間消灯サイクル、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の室温で飼育され、水及び食餌を自由に与えた。なお、マウスは 1 週間飼育後実験に用いた。

治療薬と化学物質

DOX は Shenzhen Main Luck 製薬会社（シンセン、中国）から購入した。カスパーゼ-9、カスパーゼ-3、Bcl-2、Bax 抗体及びウサギ又はヤギ二次抗体は Proteintech グループ（Chicago, IL, USA）から購入した。フローサイトメトリー用 ROS 検出キットは、Enzo R Life Sciences（Farmingdale, NY, USA）から購入した。蛍光 TUNE 測定キットは Promega（Madison, WI, USA）から購入した。化学薬品及び溶媒は全て分析グレード（試薬特級）のものを使用した。

照射条件

管電圧 200kVp、電流 10mA、及び 0.5mm 銅及び 1.0mm アルミニウムフィルターを装着した X 線装置（フィリップス社、USA）を用いて照射した。なお、線量率は 12.5mGy/min であり、総吸収線量は 75mGy であった。

実験計画

マウスは飼育室で 1 週間飼育した後、無作為に 5 つのグループに分けた：正常対照群 ($n=10$)；偽照射群（マウスを照射無しで、LDR 照射群と同様に飼育、 $n=10$ ）；LDR 群（75mGy の X 線を単回照射、 $n=10$ ）；DOX 群（DOX を 7.5mg/kg で腹腔内投与、 $n=20$ ）；LDR + DOX (LDR/DOX) 群（75mGy の X 線を照射、72 時間後に DOX 投与、 $n=20$ ）。全身の外観、行動、及び生存率は実験期間中、毎日観察した。DOX 投与の 5 日後、マウスをペントバルビタールナトリウムで麻酔下、Lab Chart7 Analysis Software (AD Instruments Inc., Australia) にて心電図 (ECG) を測定、不整脈を解析した。その後、マウスを屠殺し血液と心臓を採取した。凝固させた血液サンプルを $3000\times g$ で 10 分間の遠心分離し、血清を得た。

心毒性の評価

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は市販の LDH キット（南京 Jiancheng バイオエンジニアリング研究所、南京、中国）を用い、添付プロトコールに従い測定した。

組織化学

心筋組織標本を 10% ホルマリン中に固定し、厚さ 4 μ m のパラフィン切片を調製した。組織切片はヘマトキシリン及びエオシン (H&E) 染色し、光学顕微鏡（オリンパス BX-50 オリンパス K.K., 東京, 日本）を用いて観察した。

酸化ストレスの評価

心臓組織を冷生理食塩水で洗浄後、組織 10g を 100mL の生理食塩水で均一化、10% ホモジネートを調製し、SOD・GSH-Px 活性及び MDA 濃度の測定に供した。これらの測定は各測定キット（南京 Jiancheng バイオエンジニアリング研究所, 南京, 中国）を用い、添付プロトコールに従い測定した。即ち、SOD 活性はキサンチンオキシダーゼ法、GSH-Px 活性は DTNB 発色法、MDA 濃度はチオバルビツール酸 (TBA) 法により測定した。

TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検討

核の断片化はアポトーシス検出キットを用いて、添付プロトコールに従い TUNEL 染色により検出した。

ROS の定量

蛍光プローブ (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate, DCFH-DA) を用いて ROS 検出、定量した。DCFH-DA は細胞内エステラーゼによって非蛍光性の 2',7'-ジクロロジヒドロフルオレスイン (DCFH) に加水分解され、H₂O₂ により酸化され蛍光性の 2',7'-ジクロロフルオレスイン (DCF) に変換される。DCFH は細胞内の酸化ストレスでの広範囲の酸化反応に反応することから、心筋細胞での酸化/還元過程のモニターに広く用いられている。従って、これ迄の報告に基づき [52]、本アッセイキットを用いて心筋細胞での ROS 産生を検討した。即ち、心筋細胞を無血清 DMEM 中でインキュベート、均一化 (ホモジネート) 組織を氷中に保ち、2000rpm で 5 分間遠心分離した。得られた心筋細胞を PBS で 2 回洗浄した後、DCFH-DA を含む無血清 DMEM 中で 1 × 10⁶ 細胞/mL になる様に再懸濁し、37°C の細胞培養器中で 20 分間インキュベートした。細胞内で産生した蛍光性 DCF を検出し、フローサイトメトリー (BD FACSCalibur, SanJose, CA, USA) で解析した。

ミトコンドリア膜電位の測定

膜電位 $\Delta \phi_m$ の変化は既に報告した方法 [52] に基づき JC-1 を用いたミトコンドリア膜電位アッセイキット (Beyotime, 中国) で測定した。JC-1 がミトコンドリア内に J-凝集体として存在する場合には赤色の蛍光、細胞質中にモノマーとして存在する時には緑色の蛍光を発する。従って、緑色/赤色蛍光比を $\Delta \Psi_m$ として測定される蛍光強度比は、ミトコンドリアが脱分極する際の膜透過性増加の指標となる。即ち、先に述べた方法により心筋細胞を単離、懸濁液を調製後、無血清 DMEM を含む 5g/mL の JC-1 で 30 分間インキュベートした。染色された細胞は、無血清 DMEM で 2 回洗浄、その後無血清 DMEM を添加し、フローサイトメトリーで解析した [52]。

免疫組織化学

全ての心筋組織を 10% ホルマリンで固定しパラフィン包埋、4 μ m 厚のスライド切片を調製する。カスパーーゼ 9、カスパーーゼ 3、Bcl-2、及び Bax 発現の免疫組織化学分析のために、スライドを脱パラフィンし、定法により再水和させる。非特異的結合部位は血清と 37°C で 30 分間インキュベートすることでブロックした。次いで、組織切片をカスパーーゼ 9、カスパーーゼ 3、Bcl-2、及び Bax 抗体 (1 : 200) と共に 4°C で一晩インキュベート、その後ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン複合体 DAB 処理し可視化、又切片をヘマトキシリソで対比染色した。タンパク質陽性染色により、褐色の細胞質及び/又は核を染色した。画像はオリンパス顕微鏡で撮影した。陽性細胞密度は、Image-Pro Plus 6.0 ソフトウェア (Media Cybernetics Bethesda, MD, USA) を用いて測定し、平均光学密度 (MOD) 値で表示した。陰性対照は一次抗体の代わりに PBS 処理することで同一方法にて得た。

統計処理

全ての結果は、Windows (SPSS Inc., IL, SA) 用バージョン 19.0 の SPSS ソフトウェアを用いて解析した。データは平均 \pm 標準誤差 (SE) で示した。一元配置 ANOVA を複数の比較に使用した。P 値 <0.05 を統計的に有意であるとした。

引用文献

1. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 2013; 65:157–170.
2. Jain D, Russell RR, Schwartz RG, Panjwani GS, Aronow W. Cardiac Complications of Cancer Therapy: Pathophysiology, Identification, Prevention, Treatment, and Future Directions. *Curr Cardiol Rep.* 2017; 19:36
3. Mc Gowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017; 31:63–75.
4. Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 64:938–945.
5. Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep.* 2017; 7:44735
6. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009; 61:154–171.
7. Kang YJ, Chen Y, Yu A, Voss-Mc Cowan M, Epstein PN. Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity. *J Clin Invest.* 1997; 100:1501–1506.
8. Kang YJ, Chen Y, Epstein PN. Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. *J Biol Chem.* 1996; 271:12610–12616.
9. Broeyer FJ, Osanto S, Suzuki J, de Jongh F, van Slooten H, Tanis BC, Bruning T, Bax JJ, Ritsema van Eck HJ, de Kam ML, Cohen AF, Mituzhima Y, Burggraaf J. Evaluation of Lecithinized human recombinant super oxide dismutase as cardioprotectant in anthracycline-treated breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2014; 78:950–960.
10. Schuler MK, Gerdes S, West A, Richter S, Busemann C, Hentschel L, Lenz F, Kopp HG, Ehninger G, Reichardt P, Pink D. Efficacy and safety of Dexrazoxane (DRZ) in sarcoma patients receiving high cumulative doses of anthracycline therapy-a retrospective study including 32 patients. *BMC Cancer.* 2016; 16:619
11. Rocha VC, França LS, de Araújo CF, Ng AM, de Andrade CM, Andrade AC, Santos Ede S, Borges-Silva Mda C, Macambira SG, Noronha-Dutra AA, Pontes-de- Carvalho LC. Protective effects of mito-TEMPO against doxorubicin cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016; 77:659–62.
12. Kobashigawa LC, Xu YC, Padbury JF, Tseng YT, Yano N. Metformin protects cardiomyocyte from doxorubicin induced cytotoxicity through an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway: an *in vitro* study. *PLoS One.* 2014; 9:e104888.
13. Ghosh AK, Rai R, Park KE, Eren M, Miyata T, Wilzbacher LD, Vaughan DE. A small

- molecule inhibitor of PAI-1 protects against doxorubicin-induced cellular senescence. *Oncotarget.* 2016; 7:79017–79031. <https://doi.org/10.1863/ontotarget.12984>.
14. Yu HS, Song AQ, Liu N, Wang H. Effects of low dose pre-irradiation on hepatic damage and genetic material damage caused by cyclophosphamide. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18:3889–3897.
 15. Blankenbecler R. Low-dose pretreatment for radiation therapy. *Dose Response.* 2010; 8:534–542.
 16. Jiang H, Xu Y, Li W, Ma K, Cai L, Wang G. Low-dose radiation does not induce proliferation in tumor cells in vitro and in vivo. *Radiat Res.* 2008; 170:477–487.
 17. Tang FR, Loke WK, Khoo BC. Low-dose or low-dose-rate ionizing radiation-induced bioeffects in animal models. *J Radiat Res.* 2017; 58:165–182.
 18. Liu SZ. Cancer control related to stimulation of immunity by low-dose radiation. *Dose Response.* 2006; 5:39–47.
 19. Cui J, Yang G, Pan Z, Zhao Y, Liang X, Li W, Cai L. Hormetic response to low-dose radiation: Focus on the immune system and its clinical implications. *Int J Mol Sci.* 2017; 18:E280.
 20. Yang G, Li W, Jiang H, Liang X, Zhao Y, Yu D, Zhou L, Wang G, Tian H, Han F, Cai L, Cui J. Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics. *Int J Cancer.* 2016; 139:2157–2168.
 21. Xing X, Zhang C, Shao M, Tong Q, Zhang G, Li C, Cheng J, Jin S, Ma J, Wang G, Li X, Cai L. Low-dose radiation activates Akt and Nrf2 in the kidney of diabetic mice: a potential mechanism to prevent diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012:291087.
 22. Enns L, Rasouli-Nia A, Hendzel M, Marples B, Weinfeld M. Association of ATM activation and DNA repair with induced radioresistance after low-dose irradiation. *Radiat Prot Dosimetry.* 2015; 166:131–136.
 23. Liu SZ, Cai L, Sun JB. Effect of low-dose radiation on repair of DNA and chromosome damage. *Acta Biol Hung.* 1990;41:149–157.
 24. Zhao H, Xu S, Wang Z, Li Y, Guo W, Lin C, Gong S, Li C, Wang G, Cai L. Repetitive exposures to low-dose X-rays attenuate testicular apoptotic cell death in streptozotocin-induced diabetes rats. *Toxicol Lett.* 2010;192:356–364.
 25. Zhang C, Tan Y, Guo W, Li C, Ji S, Li X, Cai L. Attenuation of diabetes-induced renal dysfunction by multiple exposures to low-dose radiation is associated with the suppression of systemic and renal inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297:E1366–1377.
 26. Zhang C, Jin S, Guo W, Li C, Li X, Rane MJ, Wang G, Cai L. Attenuation of diabetes-induced cardiac inflammation and pathological remodeling by low-dose radiation. *Radiat Res.* 2011;175:307–321.

27. Doss M. Low dose radiation adaptive protection to control neurodegenerative diseases. *Dose Response*. 2014;12:277–287.
28. El-Ghazaly MA, Sadik NA, Rashed ER, Abd-El-Fattah AA. Neuroprotective effect of EGb761(R) and low-dose whole-body gamma-irradiation in a rat model of Parkinson's disease. *Toxicol Ind Health*. 2015;31:1128–1143.
29. Rajadurai M, Stanely Mainzen Prince P. Preventive effect of naringin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Toxicology*. 2007;230:178–188.
30. Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB. Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 cardiomyoblasts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;64:811–270.
31. Granados-Principal S, El-Azem N, Pamplona R, Ramirez-Tortosa C, Pulido-Moran M, Vera-Ramirez L, Quiles JL, Sanchez-Rovira P, Naudi A, Portero-Otin M, Perez-Lopez P, Ramirez-Tortosa M. Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochem Pharmacol*. 2014;90:25–33.
32. Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep*. 1978;62:865–872.
33. Bristow MR, Mason JW, Billingham ME, Daniels JR. Doxorubicin cardiomyopathy: evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. *Ann Intern Med*. 1978;88:168–175.
34. Li W, Xu B, Xu J, Wu XL. Procyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppression of oxidative stress. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;104:192–197.
35. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem*. 2002;234-235:119–124.
36. Camara AK, Bienengraeber M, Stowe DF. Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury. *Front Physiol*. 2011;2:13.
37. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res*. 1999;85:940–949.
38. Shan YX, Liu TJ, Su HF, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:1135–1143.
39. Ibrahim DM, Radwan RR, Abdel Fattah SM. Antioxidant and antiapoptotic effects of sea cucumber and valsartan against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: The role of low dose gamma irradiation. *J Photochem Photobiol B*. 2017;170:70–78.

40. Yang G, Yu D, Li W, Zhao Y, Wen X, Liang X, Zhang X, Zhou L, Hu J, Niu C, Tian H, Han F, Chen X, et al. Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget*. 2016;7:71856–71872.
41. Fan M, Ahmed KM, Coleman MC, Spitz DR, Li JJ. Nuclear factor-kappa B and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. *Cancer Res*. 2007;67:3220–3228.
42. Eldridge A, Fan M, Woloschak G, Grdina DJ, Chromy BA, Li JJ. Manganese superoxide dismutase interacts with a large scale of cellular and mitochondrial proteins in low-dose radiation-induced adaptive radioprotection. *Free Radic Biol Med*. 2012;53:1838–1847.
43. Premkumar K, Shankar BS. Involvement of MAPK signalling in radioadaptive response in BALB/c mice exposed to low dose ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 2016;92:249–262.
44. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002;192:1–15.
45. Garlid AO, Jaburek M, Jacobs JP, Garlid KD. Mitochondrial reactive oxygen species: which ROS signals cardioprotection? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305:H960–968.
46. Bai Y, Wang X, Zhao S, Ma C, Cui J, Zheng Y. Sulforaphane protects against cardiovascular disease via Nrf2 activation. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:407580.
47. Russo M, Spagnuolo C, Russo GL, Skalicka-Woźniak K, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Nabavi SM. Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;21:1–15.
48. Ministro A, de Oliveira P, Nunes RJ, Dos Santos Rocha A, Correia A, Carvalho T, Rino J, Faísca P, Becker JD, Goyri-O'Neill J, Pina F, Poli E, Silva-Santos B, et al. Low-dose ionizing radiation induces therapeutic neovascularization in pre-clinical model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res*. 2017;113:783–794.
49. Cuttler JM, Moore ER, Hosfeld VD, Nadolski DL. Treatment of Alzheimer Disease with CT Scans: A Case Report. *Dose Response*. 2016;14:1559325816640073.
50. Cuttler JM, Moore ER, Hosfeld VD, Nadolski DL. Update on a patient with Alzheimer disease treated with CT scans. *Dose Response*. 2017;15:1559325817693167.
51. Cuttler JM. Response to Commentary: Treating Alzheimer dementia with CT-induced low-dose ionizing radiation: Problematic, yet potential for more precise inquiry. *Dose Response*. 2017;15:1559325817729248.
52. Du Y, Meng Y, Zhu J, Kang L, Jia X, Guo L, Zhang L, Ye M, Hu L, Zhao X, Gu J, Yang B, Zou H. Quantitative proteomic study of myocardial mitochondria in urea transporter B knockout mice. *Proteomics*. 2014;14:2072–2083.