

# 論 文 要 約

題名 : A combination of iohexol treatment and ionizing radiation exposure enhances kidney injury in contrast-induced nephropathy by increasing DNA damage

氏名 : 藤野 修

背景：

造影剤は、血流や腫瘍の正確な診断および治療のために種々の放射線手技と共に広く用いられている。一方で、造影剤は検査や治療を受けた一部の症例に造影剤腎症 (contrast-induced nephropathy, CIN) と呼ばれる腎障害をきたすことが知られている。CIN は、ヨウ素系造影剤の静脈内投与後 48~72 時間以内に、ベースラインから血清クレアチニンが 25% 上昇するか、血清クレアチニンの絶対値が 0.5 mg/dL (44  $\mu$ mol/L) 上昇することと定義されている。現在、CIN は、院内で発生する急性腎不全の原因として 3 番目に多いと考えられている。CIN の発症および進行には活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の生成、腎動脈虚血、造影剤自身の毒性などが関与しているとされているが、詳しいメカニズムは未だ解明されていない。

放射線は、様々な種類の DNA 損傷を誘発する。その中でも、DNA 二本鎖切断 (DSB) は、細胞死やそれに続く組織傷害を引き起こすことが明らかになっている。分子レベルでの解析では、DNA 損傷の発生直後に、H2AX (ヒストン H2A バリエーション) がホスファチジル-イノシト-3 キナーゼファミリーの一員である ATM (ataxia telangiectasia mutated) によってリン酸化される ( $\gamma$ H2AX)。その後、これらの因子は p53 結合タンパク質 1 (53BP1) など他の DNA 修復関連因子とともに損傷部位に集積し、 $\gamma$ H2AX フォーカスなどの放射線誘発核内ドメインと呼ばれる核内高次構造体を形成する。近年、造影 CT や冠動脈カテーテル検査を施行した患者において末梢血リンパ球の  $\gamma$ H2AX フォーカスが増加することも報告されており、CIN のメカニズムに放射線照射や腎への DNA 損傷が関与する可能性が示唆されている。しかし、これまでに造影剤投与後の放射線照射による腎組織の DNA 損傷、酸化ストレスなどを検討した報告はない。そこで本研究では、ヒト腎由来の細胞である HK-2 細胞および CIN モデルマウスを用いて、造影剤の存在下で放射線照射が腎機能および腎 DNA 損傷、酸化ストレス、炎症などに与える影響に関する検討を行った。

方法：

- ①. HK-2 細胞の培地中に 100 mg/iodine のイオヘキソール投与と 1 Gy の放射線照射を行い、照射後 1, 8, 24 時間後に  $\gamma$ H2AX、リン酸化 ATM (pATM)、53BP1 が形成する核内フォーカスの蛍光免疫染色法による解析を行った。
- ②. 8 週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いて、片腎摘出と 30 分間の腎動脈クランプを行った後に 200  $\mu$ l のイオヘキソールを眼窩静脈叢から投与した CIN モデルマウスを作製した。同マウスに対してイオヘキソール投与直後に腎へ 10 Gy の放射線照射を行い、24 時間後に屠殺した。血液検体を用いてクレアチニン、BUN を測定し腎機能を評価した。DNA 損傷と修復の評価のために腎組織で  $\gamma$ H2AX、pATM、53BP1 の免疫染色を行った。更に、ROS による DNA 損傷の指標として 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG) を、炎症の指標としてマクロファージマーカーの F4/80 をそれぞれ用いての免疫染色を施行した。

③. HK-2 細胞に対して 100 mg/iodine のイオヘキソール投与と 10 Gy の放射線照射を行い、24 時間後の ROS 生成を核内 8-OHdG の蛍光免疫染色を用いて評価した。

結果：

HK-2 細胞において、造影剤投与と放射線照射を組み合わせた群では、それぞれ単独で行った群に比して照射 1, 8, 24 時間後の  $\gamma$ H2AX フォーカスが有意に増加していた。更に同群において、pATM は照射 1 時間後で、53BP1 は照射 8 および 24 時間後で放射線照射のみを行った群に比して有意なフォーカス数の増加が見られた。核内 8-OHdG は、放射線単独では明らかなシグナル強度の増大を認めなかったが、造影剤を投与した群でわずかに増大し、造影剤投与と放射線照射の両方を行った群では有意な増大が見られた。CIN モデルマウスではクレアチニン、BUN レベルは有意に上昇しており、放射線照射により更なるクレアチニン、BUN の有意な上昇と  $\gamma$ H2AX、pATM および 53BP1 陽性域の著明な増大が見られた。8-OHdG および F4/80 に関しては、放射線照射単独では陽性域の増大は見られなかったが、CIN モデルマウスで増大し、CIN モデルマウスに放射線照射を行った群ではさらに有意な陽性域の増大を認めた。

討論：

HK-2 細胞において、造影剤投与と放射線照射を組み合わせることで  $\gamma$ H2AX、pATM、53BP1 それぞれのフォーカスが増加し、さらに核内の 8-OHdG のシグナル強度も増大したことから、造影剤と放射線照射は相乗的に DNA 損傷の増加と DNA 修復の遅延、ROS 産生の増加を引き起こすことを示した。マウスにおいても、造影剤投与と放射線照射を行った群で腎組織の  $\gamma$ H2AX、pATM、53BP1、8-OHdG それぞれの陽性域の増大が認められ、両者の組み合わせによる DNA 損傷と ROS 産生の相乗的な増加が確認された。更にマウスでは血液検体でのクレアチニン、BUN レベルの上昇と腎組織での F4/80 陽性域の増大が見られ、CIN において腎への放射線照射が炎症細胞の誘導と腎機能障害に関与する可能性が示唆された。

これらの結果から、CIN 発症および進展のメカニズムに、放射線照射による DNA 損傷とそれに引き続く炎症や ROS の増加が関わっていると考えられた。今後は、造影剤投与によって産生される ROS に対する腎保護効果が報告されている抗酸化物質 N-アセチルシステインアミドなどによる CIN 発症予防法の開発が期待される。