

Glioblastoma 温度感受性 p53変異細胞株の特性と

p53機能回復による放射線感受性の検討

学位論文内容の要旨

膠芽腫の放射線感受性における癌抑制遺伝子 p53 の機能的役割を調べるため、今回膠芽腫由来で p53 の状態が異なる 3 つの細胞株:LN444 細胞 (wild-type p53), U251MG 細胞(mutant R273Q), and LN382 細胞 (mutant V197L)について放射線感受性の検討を行った。LN382 細胞では、転写活性を調べる酵母 p53 機能アッセイにおいて、34℃では大部分が正常活性 (ピンク色コロニー) を示したのに対し、37℃ではその活性は不活化 (白色コロニー) されていたことから、V197L p53 変異は温度感受性変異であることがわかっている。

Luciferase assay を用いこの温度感受性 p53 変異株の mdm2、p21/WAF、Bax のプロモーターに対する転写活性を計測したところ、37℃で培養した細胞に対し 34℃で培養した細胞ではその活性がそれぞれ 6.5、33.4、4.9 倍に上昇していた。半定量的 multiplex PCR 用いた実験では、Bax の mRNA 発現は 34℃で培養した方が軽度上昇していたのに対し、p21 mRNA の発現は著明に上昇しておりこの温度感受性 p53 変異株においては 34℃において p21 のプロモーターの転写活性が優位に回復していることが示唆された。この結果を裏付けるように、LN382 細胞は 34℃で培養した場合は増殖が完全に停止していたが、アポトーシスは観察されなかった。しかし 24 時間、或いは 48 時間 34℃で培養した後に 37℃に戻すと、この増殖停止は再び解除され、可逆的であった。

γ 線に対する LN382 細胞のコロニー形成能は線量に依存するものであったが、34℃で培養した細胞は 37℃で培養した細胞に比べ優位に放射線感受性が上昇していた。一方、LN444 細胞、U251MG 細胞も同様にコロニー形成能は線量に依存していたものの、その感受性は培養温度を変えても差を認めなかった。DNA ラダーの形成が認められず、FACS analysis においても sub-G1/0 期の細胞集団はみとめられず、この LN382 細胞の温度による放射線感受性の差の機序としてアポトーシスは否定的であった。

一方、34℃で培養した LN382 細胞では照射後に細胞周期が G1 及び G2/M 期での停止状態にあることが観察された。この結果を裏付けるように、p21 の発現も照射により増加を認めた。

以上の結果より、膠芽腫由来の細胞株 LN382 細胞では、その放射線感受性は野生型 p53 の転写活性に依存するものであり、その機序としては p21 の発現、その結果として細胞周期が G1 及び G2/M 期で停止する事によるものであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 坂 和 男
副 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Glioblastoma 温度感受性 p53変異細胞株の特性と p53機能回復による放射線感受性の検討

膠芽腫の放射線感受性における癌抑制遺伝子 p53 の機能的役割を調べるため、膠芽腫由来の細胞の LN382 細胞 (mutant V197L)の特性を調べ、放射線感受性を検討すると共に p53 の状態が異なる他の 2 つの細胞株: LN444 細胞 (wild-type p53), U251MG 細胞 (mutant R273Q)についても放射線感受性の検討を行った。V197L p53 変異は温度感受性変異であり、その転写活性を調べる酵母 p53 機能アッセイにおいて、34℃では大部分が正常活性(ピンク色コロニー)を示したのに対し、37℃ではその活性は不活化(白色コロニー)されていた。

Luciferase assay を用いこの温度感受性 p53 変異株の mdm2、p21/WAF、Bax のプロモーターに対する転写活性を計測したところ、37℃で培養した細胞に対し 34℃で培養した細胞ではその活性がそれぞれ 6.5、33.4、4.9 倍に上昇していた。半定量的 multiplex PCR 用いた実験では、Bax の mRNA 発現は 34℃で培養した方が軽度上昇していたのに対し、p21 mRNA の発現は著明に上昇しておりこの温度感受性 p53 変異株においては 34℃において p21 のプロモーターの転写活性が優位に回復していることが示唆された。この結果を裏付けるように、LN382 細胞は 34℃で培養した場合は増殖が完全に停止していたが、アポトーシスは観察されなかった。しかしこの増殖停止は 24、或いは 48 時間 34℃で培養した後に 37℃に戻すと再び解除され、可逆性である事が示された。

γ線に対する LN382 細胞の感受性は線量に依存するものであったが、34℃で培養した細胞は 37℃で培養した細胞に比べ有意に感受性が上昇していた。LN444 細胞、U251MG 細胞も同様にその感受性は線量に依存していたが、その感受性は培養温度間で差を認めず、LN382 細胞の培養温度による放射線感受性の差は温度自体によるもの

でなく、温度により変化する p53 の状態に依存するものであると考えられた。 p53 の状態によらず DNA ラダーの形成を認めず、FACS analysis においても sub-G1/0 期の細胞集団は認められず、LN382 細胞の放射線感受性の差の機序としてアポトーシスは否定的であった。

FACS analysis では 37°C で培養した細胞は照射後も細胞周期の停止は認められなかった。一方 34°C で培養した LN382 細胞では照射後に細胞周期が G1 期停止の状態にあった。37°C で培養、照射後 34°C で培養した細胞は G1 期及び G2/M 期での停止状態にあるのが観察された。この結果を裏付けるように、p21 の発現も照射により増加を認めたことから野生型 p53 に依存した G2 期停止が照射により誘導された可能性が示唆された。

以上の結果より、膠芽腫由来の細胞株 LN382 細胞では、その放射線感受性は野生型 p53 の転写活性に依存するものであり、その機序としては p21 の発現、その結果として細胞周期が G1 及び G2/M 期で停止する事によるものであることが示唆された。

口頭発表に際し、阿部教授より培養温度の設定理由、他の細胞株での実験経験の有無、温度変化による他の遺伝子への影響、守内教授よりこの研究の新しい点、臨床データの結果との解離について、GBM 細胞で放射線感受性に影響を与える他の因子の研究の必要性、また GBM 由来の他の細胞株で、温度感受性 p53 変異を有するものについても検討を加えるべきとの意見があった。宮坂教授からは今回の実験の結果を臨床に応用する場合の可能性と問題点、また白土助教授より今回のデータの方が一般的に云われていることとして、文献的な考察について質問がなされた。申請者は文献的考察を中心に今後の実験の示唆を受けながら、概ね妥当な回答を行った。

これまでも GBM 細胞と放射線感受性に関する研究はなされていたが、本研究のように温度感受性株を用い、放射線感受性がアポトーシスでなく細胞周期の調節に依存するものとした研究は少なく、学位論文に値するものと判断した。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。