

## 学位論文題名

白血病ならびに腺がん由来腫瘍細胞における  
放射線誘発デスレセプター発現のレドックス制御

## 学位論文内容の要旨

放射線治療の治療効率を考える上で、問題の一つとされているのが固形腫瘍内の低酸素領域に存在する腫瘍細胞である。一般に、この低酸素細胞は放射線や化学療法剤に対して低感受性であることが知られている。また、放射線は多くの固形腫瘍に対しネクロシスを誘導できるが、能動的な細胞死であるアポトーシスをほとんど引き起こさない事が知られている。しかし、臨床的な治療効果を考えるならば、炎症応答を伴わないアポトーシスをより多く誘導することが理想とされ、アポトーシスの誘導メカニズムとアポトーシスによる増感法の研究は重要である。アポトーシスのシグナル伝達はストレスや細胞の置かれた環境によって影響を受けることが知られているが、低酸素条件がシグナルに与える影響についてまだその詳細は報告されていない。そこで本研究では、放射線によって SAPK/JNK を活性化し、デスレセプター Fas 発現からリガンド非依存性の DISC 形成により caspase-3 を活性化し、高率に短時間でアポトーシス誘導することが知られている白血病由来細胞を用いて、低酸素条件の細胞内シグナル伝達機構に及ぼす影響を調べた。さらに、固形腫瘍由来の細胞でも放射線によりデスレセプターの発現が増強するかどうかについても検討した。

まず、白血病由来細胞 MOLT-4 を用いて次のような X 線照射および培養時の酸素条件を変えた実験プロトコールを作成した。すなわち、condition 1：大気酸素条件氷冷温度下にて X 線（15 Gy、以下同）照射後、大気酸素条件下 37°C にて培養、condition 2：低酸素条件氷冷温度下にて X 線照射後、大気酸素条件下 37°C にて培養、condition 3：大気酸素条件氷冷温度下にて X 線照射後、低酸素条件下 37°C にて培養、condition 4：低酸素条件氷冷温度下にて X 線照射後、低酸素条件下 37°C にて培養、とした。condition 1 と 2 では同程度のアポトーシス誘導が観察された。一方、condition 3 と 4 では condition 1 と 2 に比べ、アポトーシス誘導が減少した。さらに、condition 3 では condition 1 と比べ SAPK/JNK の活性化、Fas 発現の抑制、caspase-3 の活性化の抑制が観察された。加えて、酸素の代替的な働きをする低酸素細胞放射線増感剤 doranidazole が低酸素培養で抑制さ

れていた SAPK/JNK/Fas/caspase-3 シグナル経路を増強させ、結果としてアポトーシス誘導を増強することが観察された。ここで、SAPK/JNK や c-Jun といったシグナルは細胞内の酸化還元状態（レドックス状態）によって制御を受け、アポトーシスを調節している可能性があるため、X 線照射、低酸素培養、doranidazole 処理を行い、細胞内レドックス制御を調節している細胞内グルタチオン濃度[GSH]<sub>i</sub>を測定した。X 線照射後、低酸素培養の[GSH]<sub>i</sub>は大気酸素培養よりも高くなったが、低酸素培養時に doranidazole が存在すると再び減少した。さらに、[GSH]<sub>i</sub>を増加させる N-acetyl-L-cysteine (NAC)は X 線誘導 SAPK/JNK 活性化とアポトーシス誘導を抑制した。これらの結果から、X 線を照射された MOLT-4 細胞において SAPK/JNK 活性化の上流でレドックス制御機構が存在することが示された。

次に、Tp53 status の異なる固形腫瘍由来細胞を用いた検討を行なった。デスレセプター Fas、DR5 を活性化し、アポトーシスを誘導することが知られているアゴニスト CH11、TRAIL で 4 つの腺がん由来細胞 MKN45、MKN28、A549、DU145 を X 線照射後に処理した。その結果、野生型 Tp53 をもつ MKN45 や A549 だけでなく、変異型 Tp53 をもつ MKN28 と DU145 も X 線照射により Fas と DR5 を細胞膜上に過剰発現し、CH11、TRAIL によるデスレセプター媒介アポトーシスの誘導を増強する事が示された。この結果は Tp53 非依存的なデスレセプター発現機構が腫瘍細胞に存在することを示し、X 線とアゴニストの併用処理が Tp53 が正常に働いていない多くの腫瘍細胞に対してもアポトーシスを誘導し、細胞死の感受性を高めうる手段として有効であることを示した。さらに、今回用いた腺がん細胞全てにおいてデスレセプターリガンドによるアポトーシスの放射線増感に対し NAC 処理が抑制的に作用したことから、これらの細胞においても[GSH]<sub>i</sub>が関与するレドックス制御が存在することが示された。

以上の結果をまとめると、低酸素は放射線によるレドックス制御が関与するデスレセプターの発現と、それに関連するアポトーシスシグナル伝達系を抑制する事が MOLT-4 細胞で示され、doranidazole はこの抑制を解除できる事が示された。また、多くの腫瘍細胞で Tp53 の状態に関係なく、放射線によるデスレセプター発現が起き、そのメカニズムにレドックス制御が関与している事も示された。本研究で得られたこの様な知見は、今後の低酸素細胞の抵抗性のメカニズムについて理解を深めるとともにレドックス制御に着目した新しい放射線増感腫瘍治療法の可能性を示したものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 桑 原 幹 典  
副 査 教 授 伊 藤 茂 男  
副 査 教 授 林 正 信  
副 査 教 授 稲 波 修

## 学位論文題名

### 白血病ならびに腺がん由来腫瘍細胞における 放射線誘発デスレセプター発現のレドックス制御

固形腫瘍内には低酸素細胞層が存在し、放射線や化学療法剤に対し抵抗性を示す。また、仮に致死をもたらしたとしても、その死はほとんどネクローシスであり、アポトーシスは誘導されない。アポトーシスは能動的な死であり、炎症などの副作用が少ないことから理想的な治療法と考えられている。そのため、古くからアポトーシス誘導を視野に入れた放射線や制がん剤による治療が試みられている。そこで、本研究ではまず、放射線や化学療法剤に対し比較的アポトーシスを起こしやすい白血病由来 MOLT-4 細胞を用い、低酸素条件とアポトーシス誘導との関係について検討した。次いで、その成果をもとに固形がん由来細胞を用い、X線によるアポトーシス誘導の効率を上げる方法を試みた。

まず、培養 MOLT-4 細胞を窒素ガスにより低酸素状態を作ることの出来る装置に入れ、それを用いて X 線照射時あるいは培養時に対し次の様な条件を作成し、実験を行った。すなわち、条件 1: 大気条件(酸素が存在する条件)下にて X 線照射後、同条件下にて培養、条件 2: 低酸素条件(窒素ガス条件)下にて X 線照射後、大気条件下にて培養、条件 3: 大気条件下にて X 線照射後、低酸素条件下にて培養、条件 4: 低酸素条件下にて X 線照射後、同条件下にて培養、とした。条件 1 と 2 では同程度のアポトーシス誘導が観察された。一方、条件 3 と 4 では条件 1 と 2 に比べアポトーシス誘導が減少した。これらの結果から、X 線照射時ではなく、照射後の低酸素状態が細胞にアポトーシス抵抗性を与えることが判明した。さらに、アポトーシスシグナル SAPK-JNK 活性化/Fas(デスレセプター)過剰発現/caspase-3 活性化の抑制も観察された。それに対し、低酸素細胞を酸素類似化合物ドラニダノールで処理したところ、そのアポトーシスシグナル抑制が解除され、その誘導の増強が見られた。さらに、X 線照射後に細胞内グルタチオン濃度[GSH]<sub>i</sub>を測定したところ、低酸素培養では放射線による[GSH]<sub>i</sub>の減少が抑制され、ドラニダノール処理はそれを促進した。このことから、低酸素培養は [GSH]<sub>i</sub>の減少を抑え、それによりアポトーシス抵抗性を与え、一方、ドラニダノールは[GSH]<sub>i</sub>の減少を促進し、アポトーシス誘導性を与えると結論された。この結論は[GSH]<sub>i</sub>増強剤 N-アセチル-L-システイン(NAC)を添加したところ、アポトーシスシグナルおよびその出現の両方が抑制された事実から確認された。以上、MOLT-4 細胞において X 線照射後の低酸素培養によるアポトーシス抵抗性はレドックス状態の変化によるものであることが判明した。

固形がん(腺がん)由来細胞 MKN45、MKN28、A549、DU145 においても MOLT-4 と同様に X 線照射後に Fas の細胞膜上における過剰発現が観察され、NAC はそれを抑制するように作用した。似たような現象はもう一つのデスレセプター DR5 においても観察された。そこで、それぞれのアゴニスト CH11 と TRAIL で X 線照射後に細胞処理したところ、デスレセプターへのアゴニスト結合によるアポトーシスとそのシグナルの増強が観察されたが、NAC によりその増強が打ち消された。MKN45 と A549 は野生型 *Tp53* を、MKN28 と DU145 は変異型 *Tp53* をそれぞれもつが、この現象は

全ての細胞において観察されたことから、*Tp53* 状態に関係なく、固形腫瘍細胞において X 線照射後のレドックス状態の変化を通してデスレセプターの膜上発現する機構が存在することが明らかとなった。これにより、X 線照射とアゴニスト併用処理が腫瘍細胞においてアポトーシス誘導を増強する方法として有効であることが示された。この様に、固形腫瘍内の低酸素細胞層に対しては、ドラニダゾールなど酸素類似化合物による細胞内レドックス状態の変化、X 線によるデスレセプター発現の増強、さらにアゴニスト処理による効果的な X 線致死作用の増強の可能性が示された。

以上、本研究で得られた成果は、今後の低酸素細胞の放射線抵抗性のメカニズムについて新たな知見を与えるとともに、レドックス制御に着目した新しい X 線増感腫瘍治療法の可能性を示唆したものと考えられる。よって、審査員一同は、博士論文提出者浜洲拓氏の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条により行う博士論文の審査に合格と認めた。